

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
Abogado

MARIA ANGELICA RODRIGUEZ B.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAPIA O.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica



Rodriguez Madrid & Asociados

NIT. 830.038.010-1

PATENTES

BRANCA

DERECHOS DE AUTOR

LICENCIAS DE USO

SOFTWARE

REGISTROS SANITARIOS

NOMBRES DE DOMINIO

PATENTS

TRADEMARKS

COPYRIGHTS

LICENSING

SOFTWARE PROTECTION

SANITARY PERMITS

DOMAIN NAME

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y CC
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 01011534 00000003

Folios: 160

Fecha (HRS): 2001-06-12 12:36:30

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 229 COMPLET

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF : EXPEDIENTE No. 001- 011534

PATENTE "COMPOSICIONES MEJORADAS INMUNOMODULADORAS Y
NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS".

Estimados señores :

Damos alcance al expediente citado en la referencia, para reivindicar Prioridad de la Patente solicitada, con fundamento jurídico en lo establecido en el Artículo 9 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones (CAN), la fuente normativa de reciprocidad, se basa en :

- a.- El artículo 4 del Convenio de París, aprobado mediante Ley 178/94, declarado exequible por la Corte Constitucional en Sentencia del 18 de Enero/96.
- b.- Ley 170/94 en la cual Colombia aprobó el Acuerdo por el que se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC) suscrito en Marrakech (Marruecos) el 15 de Abril de 1994, y sus Acuerdos multilaterales, los cuales incluyen los aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio; mejor conocido como el Trip'. Dicha Ley 170 de 1997 fue declarada exequible por la Corte Constitucional el 28 de Marzo de 1995.

El Artículo 2, Ord.1, del Trip's establece que la propiedad en el Mundo será reconocida, que los países miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París. A su vez, el artículo 4 del Convenio de París (es decir, uno de los artículos de cumplimiento obligatorio bajo Trip's) establece que la prioridad sobre la primera solicitud en el mundo será reconocida.

Por lo tanto:

Según el Artículo 10 y Literal (a) de la Decisión 486/2000 CAN, Invocamos y anexamos la siguiente prioridad:

Transversal 6a. No. 27-10 * Edificio Antares - Port House * Telefon: 283 09 42 * Tel.: 334 72 84 - 341 70 03
E-mail: rodriguezaso@cable.net.co * Bogotá, D. C.

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
Abogado

MARIA ANGELICA RODRIGUEZ R.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAMAYO R.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica



Rodriguez Madrid & Asociados
NIT. 830.038.010-1

PATENTES

113
MARCAS

DERECHOS DE AUTOR

LICENCIAS DE USO

SOFTWARE

REGISTROS SANITARIOS

NOMBRES DE DOMINIO

PATENTS

TRADEMARKS

COPYRIGHTS

LICENSING

SOFTWARE PROTECTION

SANITARY PERMITS

DOMAIN NAME

1.- Prioridad No.60/182,428

FECHA DE PRESENTACIÓN: 14 -Febrero-2000

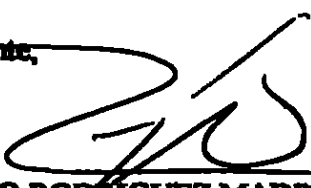
OFICINA : EE.UU.

Debidamente Legalizada

2.- Traducciones de las reivindicaciones de la Primera solicitud de Patente

En consecuencia, ruego a ustedes una vez finalizada esta diligencia, ordenar lo pertinente para que el expediente siga su curso normal.

Atentamente,


" RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
C.C. No. 3'792.584-Cartagena
T.P. No. 59.363 del C.S.J

Anexo.- Lo anunciado.

Transversal 6a. No. 27-10 * Edificio Antares - Port House * Telefon: 283 09 43 * Tel.: 334 72 84 - 341 70 03
E-mail: rodriguezr@cabla.net.co * Bogotá, D. C.

114

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **United States of America**

This public document

2. has been signed by **Araceli Matus-Silva**

3. acting in the capacity of **Notary Public of Florida**

4. bears the seal/stamp of **Notary Public, State of Florida**

Certified

5. at **Tallahassee, Florida**

6. the **Tenth day of May, A.D., 2001**

7. by **Secretary of State, State of Florida**

8. No. **2001-14630**

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Katherine Harris

Secretary of State

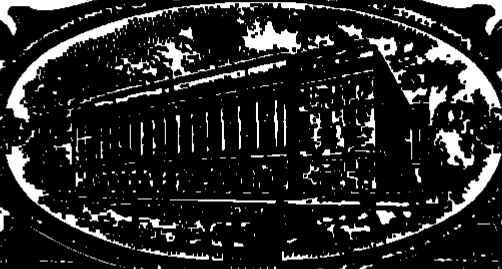
DSDE 99 (1-99)

This document contains an artificial watermark on REVERSE. Hold at 45°. DO NOT ACCEPT UNLESS VIEWED.

If photocopied or chemically altered, the word "VOID" will appear.

State of Florida appears in small letters across the face of this 9 1/2 X 11" document.

PA 40730



117
115

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

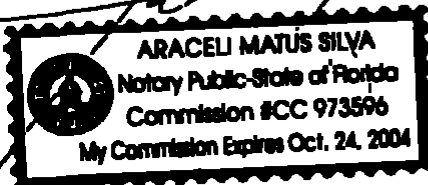
United States Patent and Trademark Office

May 04, 2001

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/182,428/

FILING DATE: February 14, 2000/



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

Andrea T Jones
ANDREA T JONES
Certifying Officer

A/PR 0118
116

jc600 U.S. PRO
02/14/00

50/182/28
02/14/00

"EXPRESS MAILING" Mailing Label No. EL513347267UR. Date of Deposit
 February 14, 2000. I hereby certify that this paper is being deposited with the
 U.S. Postal Service Express Mail Post Office to Addressee Service under
 CPA 1.10 on the date shown above and is addressed to: Asst Commissioner for
 Federal, Washington, D.C. 20231.

Donna Turner
 Donna Turner

Enclosed application parts are:

<u>X</u>	Spec w/Claims	Number of Pages <u>61</u>
<u> </u>	Spec w/o Claims	Number of Pages <u> </u>
<u> </u>	Formal drawings	Number of Sheets <u> </u>
<u>X</u>	Informal drawings	Number of Sheets <u>3</u>
<u>X</u>	Other: Verified Statement Claiming Small Entity Status	

LAST NAME	FIRST NAME	M.I.	RESIDENCE (CITY, STATE OR FOREIGN COUNTRY)
Davis	Gary	R.	Tulsa, Oklahoma

TITLE OF INVENTION: NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY ENHANCING COMPOSITIONS	
CORRESPONDENCE ADDRESS: Edwin S. Flores	
Gardere & Wynne, L.L.P.	
1601 Elm Street, Suite 3000	
Dallas, Texas 75201	PHONE: (214) 999-3000

Was this invention made under a Government contract? X No Yes
Identify contract and the Government agency:

Enclosed check in the amount of \$75 to cover filing fee. If there are additional charges please deduct from Deposit Account No. 07-0153. An original and two copies are enclosed.

Respectfully submitted,


Edwin S. Flores
Registration No. 38,453

Date February 14, 2000

PROVISIONAL APPLICATION ONLY

001000000000000000000000

GARDERE & WYNNE, L.L.P.

ATTORNEYS AND COUNSELORS

**3000 THANKSGIVING TOWER
1801 ELM STREET
DALLAS, TEXAS 75201-4761
214-999-3000
TELECOPIER 214-999-4667**

WEATHER'S DIRECT DIAL NUMBER

214-999-4559

Direct Fax: 214-999-3559

Email: eflores@gardere.com

**HOUSTON
1000 LOUISIANA, SUITE 3400
HOUSTON, TEXAS 77002-8807
713-276-3300
TULSA
200 ONEOK PLAZA
100 WEST FIFTH STREET
TULSA, OKLAHOMA 74103-4240
918-599-2900
MEXICO CITY
Río PANUCO No. 7
COL. GUAYTÁNOC
06800 MÉXICO, D. F.
011 (525) 346-8030**

February 14, 2000

VIA EXPRESS MAIL #EL513247267US

**Box Provisional Patent Application
Commissioner of Patents
and Trademarks
Washington, D.C. 20231**

**Re: U.S. Provisional Patent Application Entitled "NEUTRALIZING ANTIBODY AND
IMMUNOMODULATORY ENHANCING COMPOSITIONS"
Our File No.: 122963-1**

Sir:

Transmitted herewith for filing are:

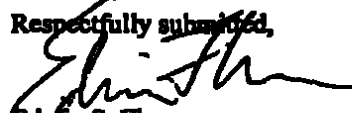
- (1) 61-page patent specification with 48 claims and an abstract (also Figures 1-3 on 3 sheets);**
- (2) Provisional Application Transmittal Form;**
- (3) Declaration Claiming Small Entity Status; and**
- (3) Our check in the amount of \$75.00 for the filing fee.**

Pursuant to 37 C.F.R. 1.10 the Applicants request the Patent and Trademark Office to accept this application and accord a serial number and filing date as of the date this application is deposited with the U.S. Postal Service for Express Mail.

If the check is inadvertently omitted, or should any additional fees under 37 C.F.R. §§ 1.16 to 1.18 be required for any reason relating to the enclosed materials, or should an overpayment be included herein, the Commissioner is authorized to deduct or credit said fees from or to Gardere & Wynne, L.L.P. Deposit Account No. 07-0153.

Please date stamp and return the enclosed postcard to evidence receipt of these materials.

Respectfully submitted,


**Edwin S. Flores
Reg. No. 38,453**

ESF:dmt

Enclosures

6013247267US - 021400

Patent
Attorney Docket No.: 122963-1

Applicant / Patentee: Gary R. Davis, LLC.
Serial No.: N/A
Filed: Herewith
For: NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY ENHANCING COMPOSITIONS

**VERIFIED STATEMENT (DECLARATION) CLAIMING SMALL ENTITY STATUS
(37 CFR § 1.28(c) - SMALL BUSINESS CONCERN)**

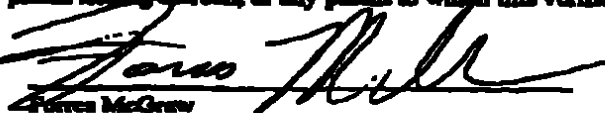
I hereby declare that I am an official of the small business concern empowered to act on behalf of the concern identified below:

I hereby declare that the above-identified small business concern qualifies as a small business concern as defined in 13 CFR §§ 41(a) and (b) of Title 13, United States Code, in that the number of employees of the concern, including those of its affiliates, does not exceed 500 persons. For purposes of this statement, (1) the number of employees of the business concern is the average over the previous fiscal year of the concern of the persons employed on a full-time, part-time or temporary basis during each of the pay periods of the fiscal year, and (2) concerns are affiliates of each other when either, directly or indirectly, one concern controls or has the power to control the other, or a third party or parties controls or has the power to control both.

I hereby declare that rights under contract or law have been conveyed to and remain with the small business concern identified above with regard to the invention entitled "NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY ENHANCING COMPOSITIONS" by inventors named Gary R. Davis, as described in the application filed concurrently herewith.

I acknowledge the duty to file, in this application or patent, notification of any change in status resulting in loss of entitlement to small entity status prior to paying, or at the time of paying, the earliest of the issue fee or any maintenance fee due after the date on which status as a small entity is no longer appropriate. (37 CFR § 1.28(b)).

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application, any patent issuing thereon, or any patent to which this verified statement is directed.

Date: 2/14/2000
Steven McGraw

c30023.1

00120-82428-021400

~~121~~

119

**NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY
ENHANCING COMPOSITIONS**

TECHNICAL FIELD OF INVENTION

This invention in the field of cell biology, physiology and medicine relates to the bioactive compositions containing a combination of antigen and heterologous antibodies to produce an immunomodulatory composition for use in treating immunosuppressive infections.

5

60182428-02140

122

120

BACKGROUND OF THE INVENTION

Without limiting the scope of the invention, its background is described in connection with immunosuppressive viruses, e.g., SIV and HIV, as an example.

5 Acquired immune deficiency (AIDS) is recognized as an epidemic in several areas of the world, including the United States. Human Immunodeficiency Virus (HIV-1), a retrovirus, has been identified as the etiologic cause of the disease. HIV-1 was previously identified as Human T-Cell Lymphotropic Virus Type III (HTLV-III) and Lymphadenopathy Associated Virus (LAV). To date, two related but distinct viruses HIV-2 and HIV-3, have been identified. HIV-2 is closely related to simian immunodeficiency virus (SIV-mac), which causes an AIDS-like disease in macaques. Alignments of the nucleotide sequences of HIV-2 and SIV reveal a considerable homology between HIV-2 and SIV-mac. These two viruses share approximately 75% overall nucleotide sequence homology, but both of them are only distantly related to HIV-1 with approximately 40% homology. Sub-strains of HIV-1, HIV-2 and HIV-3 have been identified. All strains and sub-strains may be referred to individually, HIV-1, HIV-2 and HIV-3 have been identified. All strains and sub-strains may be referred to individually, HIV-1, HIV-2 or HIV-3, or collectively as HIV. It is recognized that HIV-2 and HIV-3 and their sub-strains may cause immune suppression in humans.

10
5018242
-521400
5

123

121

The groups at high risk of infection with HIV include homosexual and bisexual men and abusers of injected drugs. Before the advent of reagents that made large-scale screening for HIV antibodies available, high-risk groups included whole blood transfusion recipients. Other predictable high-risk groups are women artificially inseminated with sperm from infected donors, sexual partners of those infected with HIV, recipients of organs and fetuses in HIV infected women. Evidence indicates that HIV is transmitted heterosexually.

Presently, the therapies in use are generally limited to regimens designed to treat the opportunistic infections and neoplasias associated with AIDS and its related illnesses and to target the replicative cycle of the virus. Very few treatments are available, however, which attack HIV, the underlying cause of AIDS, a fatal disease. Among the known antiviral and antiretroviral drugs, which are believed to merely slow down viral replication and that do not cure the disease, are azidothymidine (AZT), alpha interferon, gamma interferon, azimexon and isopinosine.

Remission of some Karposi's Sarcomas have been reported following treatment with alpha interferon, but other antiviral drugs have not proven effective against HIV infections. Immunomodulators, such as cimetidine and interleukin-2, which are intended to stimulate T-cells and natural killer cell activity, have also been reported as useful in the treatment of AIDS.

501824281021400

124

122

Similar claims have also been made in connection with indomethacin, an anti-inflammatory and prostaglandin inhibitor. In summary, current methods for treating individuals infected with HIV are few, and largely ineffective.

5 In addition to HIV, a number of infectious diseases are caused by virulent immunosuppressive pathogenic organisms. These disease states are often accompanied by other opportunistic infections and/or diseases due to the compromised immune system of affected patients.

10 There is new evidence that new epidemics are emerging
15 throughout the industrialized, developing and transitional
20 countries of the world. For example in South Africa alone, the
25 harm caused by the HIV, is confirmed by the finding that more than
30 14% of its nearly 40 million citizens are infected with HIV. By
35 2010 the national infection rate in South Africa is expected to
40 reach 25%. In other parts of the world the life-expectancy of the
45 adult population is expected to drop 10 to 15 years by the year
50 2010. The human devastation pain, suffering and ultimately death
55 to victims are occurring at rates unmatched in the history of man.

60 Today, the rates of reported cases of HIV infections are
65 increasing in geometric proportions and clinical treatments
70 represent marginal improvements in the management of health care in
75 this area. The rapid spread of HIV infection is out of control.

205

123

Unless improved treatments are found the future outlook for the state of the world's health is dismal.

In addition to the genes that encode structural proteins (the virion capsid and envelope glycoproteins) and the enzymes required for proviral synthesis and integration common to all retroviruses, HIV and SIV encode genes that regulate virus replication as well as genes that encode proteins of yet unknown function. The only notable difference in the genetic organizations of HIV and SIV resides in the open reading frame referred to as vpx, which is absent in HIV-1 and vpu in HIV-1 but not in HIV-2 and SIV. These viruses are both tropic and cytopathic for CD4 positive T lymphocytes. A great number of studies have indicated that CD4 cells function as an incubator for viral replication.

Some therapeutic success has been observed following intravenous immunoglobulin treatment of HIV-infected children (Clavelli et al., *Pediatr. Infec. Dis.* 5:552-557 (1986)). It has been proposed that this treatment may be particularly beneficial to HIV-infected children. These children exhibit increased susceptibility to bacterial and viral infections due to both the destructive effects of HIV-1 infection and because infants possess an immature immune system. Specific anti-HIV-1 antibodies may have protective effects against infection. Passive administration of immunoglobulin from asymptomatic, HIV-1 positive individuals has led to a temporary clinical improvement in these individuals

10
50182428-021400

20

126 1261

(Wendler, et al., AIDS Res. and Hum. Retroviruses 3:177 (1987) and Rank, et al., Clin. Exp. Immunol. 69:231 (1987)). Another study has shown that children born to HIV-1 positive mothers were less likely to be infected with HIV-1 if they possessed serum with high neutralizing activity (Broliden et al., AIDS 3:577 (1989)).

These studies indicate that the presence of maternal antibodies may confer protection when passed from mother to child. Transfusion of serum from HIV-1 infected individuals, however, is not feasible on a large scale from a logistical view. Furthermore, it is unlikely to have broad application as a number of sub-strains have been identified that would evade immune surveillance.

One source of protective immunoglobulin to HIV-1 infected patients are from already infected individuals. The use of human antisera from infected individuals carries with it the obvious risk of additional infection to infected patient and health care workers. In addition, such immunoglobulin may contain virus particles which could be infectious to treated populations, thus complicating antisera production if not ultimately patient therapy.

018242 0041400

~~123~~ 125

SUMMARY OF THE INVENTION

The subject invention relates, in one aspect, to pharmaceutical composition containing as active ingredients thereof (1) heterologous antibodies reactive with a pathogenic organism, such as a virus, bacteria, fungus, venom, pollen and the like, to which the antibodies are specific or cross-reactive; and (2) the antigen to which the heterologous antigens are specific or to which they cross-react. The reactive or cross-reactive antibodies may be polyclonal or monoclonal. The present invention is based on the recognition that natural antibodies react or cross-react with heterologous antibodies. By heterologous antibodies it is meant that the antibodies are derived from a different source than the host or target immune system.

As an illustration of the production of pathogenic reactive antibodies, anti-HIV polyclonal serum is produced by immunizing an animal with HIV viral lysate, i.e., purified or semi-purified components of live or inactivated virus. Alternatively, DNA isolated from HIV virus may be used to produce HIV antigen by recombinant methods. A variety of animals can be immunized with such a lysate including mice, rabbits, horses, cows, donkeys, sheep, pigs, humans, monkeys, primates (including humans) and pigs to produce the heterologous antibodies. When crossing species, the term heterologous is used as the antibodies are from a different source. The passive transfer of xenogenic antibodies has long been

728

126

used in the case of Rh disparate mother and child in the form of RhoGam®. The problem with xenogenic antibody transfer, however, is that the host may develop a strong immune response to the transferred antibodies.

5 Historically, it was specifically recognized that in patients with normal immune systems it would be counter-indicated to immunize with large foreign proteins, such as xenogenic antibody-antigen complexes. In most cases it would be counter-indicated to provide passive immunity with xenogenic antibodies, as a strong
10 immune response would normally be mounted against those antibodies. However, because of similarities between the goat immune system and the human immune system, the inoculation of a human with a normal immune system with goat antibodies will not result in the severe immune complex reactions customarily anticipated with other foreign animal proteins. The present invention is based on the recognition that the immune-suppressed patients that are to receive the inoculation of the present invention do not have normal immune systems. In fact, the compositions and methods of the present invention are designed to activate the host immune system by
20 activating natural and acquired immune responses.

Humans, other primates and goats may be used to produce antibodies for use with the present invention, with goats being a particularly useful animal for this purpose. The discussion that follows focuses on the goat. The antibody ingredient present in

50152428.0214005

129

12

the bioactive compositions of this invention may be of male or female goat origin. In one embodiment of this invention, anti-HIV-1 antibodies are produced by administering to a goat HIV-1 encoded protein in an amount sufficient to stimulate an immune response.

5 The HIV-1 encoded protein may be purified from a lysate of HIV-1 infected cells or it may be produced by recombinant methods.

The goat antibodies produced as described herein may be formulated in accordance with this invention in a composition for inhibiting viral replication in vitro or in vivo biologic system.

10 The inhibitory effectiveness reasonably suggests its administration as an immunotherapeutic to humans infected by the HIV-1 virus, or related viruses.

6018247
15 More particularly, the present invention is directed to an immunostimulatory composition or vaccine for stimulating immune responses in an immunosuppressed host that includes heterologous antibodies specific for an antigen. The heterologous antibodies form a complex with the antigen. Also, the heterologous antibody-antigen complex may be mixed with a pharmaceutically acceptable carrier. In particular, the basis of the immunostimulatory
20 composition is based on the realization that current vaccines and therapies fail to address the immunosuppression of the individuals affected by an immunosuppressive pathogen. In fact, the present invention is based on the counter-intuitive recognition that the immuno-suppressed patient is unable to mount a specific immune

~~130~~

128

response using T cell mediated immunity. By providing the specific antigen that is causing the infectious disease in a killed or attenuated form with heterologous antibodies the immune system of the host is able to recognize the heterologous antibodies and mount an immune response that coordinated both the anti-antibody and the anti-antigen response of the host.

5

01 2428.0214 0

131

129

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For a more complete understanding of the features and advantages of the present invention, reference is now made to the detailed description of the invention along with the accompanying figures in which corresponding numerals in the different figures refer to corresponding parts and in which:

Fig. 1a is a graph depicting the inhibition of SIV infection expressed as the number of fusion sites in CEMx174 cells by various dilutions of goat anti-SIV serum over time.

Fig. 2 is a graph depicting the inhibition of SIV infection expressed as the number of fusion sites in CEMx174 cells by various dilutions of goat anti-SIV serum at Day 2 post-infection versus a normal serum control.

Fig. 3 is a graph depicting the inhibition of SIV infection expressed as the number of fusion sites in CEMx174 cells by 1:20 and 1:80 dilutions of goat anti-SIV serum over time.

5

10

501 242 102140

132 130

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

While the making and using of various embodiments of the present invention are discussed in detail below, it should be appreciated that the present invention provides many applicable inventive concepts that may be embodied in a wide variety of specific contexts. The specific embodiments discussed herein are merely illustrative of specific ways to make and use the invention and do not delimit the scope of the invention.

HETEROLOGOUS CROSSREACTIVE ANTIBODY ACTIVITY

An immunocompetent animal will produce an immunological response to a foreign protein. The immunological response to the foreign protein predictably comprises both humoral (antibody) and cellular (lymphocyte and phagocyte) immune factors. The humoral response produces antibodies which include but are not limited to IgM, IgG and IgA. The antibodies produced may be either of two classes: (a) a neutralizing antibody, i.e., an antibody not requiring the complement system for cellular or viral destruction; and (b) a complement fixing antibody.

The practice of using vaccinations as a technique for acquiring immunity has occurred since at least the 1700's when Edward Jenner first recognized the correlation between cowpox and the lessening of the virological virulence of smallpox in milkmaid's population.

~~133~~

131

In this historical event, in 1798, Jenner inoculated a live cowpox virus into an immunologically healthy boy, and upon subsequent inoculation of the child with live smallpox virus, the child did not develop life-threatening smallpox. In this instance, the outer membrane of the cowpox virus was so similar to the smallpox virus that the body's immune system could not tell the two apart; thus, antibodies raised against cowpox virus administered to a human also could react against invading smallpox virus. This method required the direct administration of a virus to humans, said virus being capable of causing disease in bovines but not in humans.

It has now been found that viral neutralization or bacterial lysis by antibodies developed in one mammal upon exposure to a virus or bacteria, respectively, can be administered to another mammal to provide treatment for the suppression or prevention of infections caused by direct exposure to the virus or bacteria.

Higher animals have, by evolution, established several very effective means of defense against microbes involving the immune system. Invading bacteria are rapidly identified, via complement and immunoglobulin opsonization, phagocytosed and destroyed by the cellular immune system and white blood cells (neutrophils and macrophages). Globulins are essentially nature's perfect antibodies. Complement, available as a precursor protein which is activated by the presence of microorganisms and globulins, also

134

B2

functions in antibacterial activities. Opsonization of foreign organisms is the memory component of the immune system. After previous antigenic exposure, the immune system produces a series of globulins which attach to and coat bacteria or neutralize viruses so that they are readily recognized, phagocytosed and destroyed by neutrophils and macrophages. Foreign proteins of invading organisms also stimulate a humoral immune response which over a period of time (3-6 weeks) amplifies the numbers of cells designed to recognize and destroy specific invaders. Tables 1 and 2 present the antimicrobial functions of immunoglobulins and the metabolic properties of immunoglobulins.

TABLE 1

Antimicrobial functions:

- (1) Bacterial lysis (requires complement)
- (2) Opsonization (enhanced by complement)
- (3) Toxin neutralization
- (4) Viral neutralization (may be enhanced by complement)
- (5) Mediates antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC)
- (6) Synergistic activity with antibiotics

TABLE 2

Metabolic Properties of Immunoglobulins

501824281 2140

~~135~~ 133

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Serum Level	989	200	100	3	0.008
Means (mg/dl)	(600-	(60-	(45-		
(range)	1600)	300)	150)		
5 Total Body Pool	1030	210	36	1.1	0.01
Synthesis rate	36	28	2.2	0.4	0.004
Plasma half life	21	5.9	5.1	2.8	2.4
Fractional turn-over rate	6.9	24.0	10.6	37.0	72.0
10 Fraction for each class in plasma means	0.52	0.55	0.74	0.75	0.51

The fraction represents the portion of the total immunoglobulins of each class that is found in the plasma of humans.

Host responses are initiated only after foreign substances, such as bacterial, fungus, protozoa, parasites, or viruses which already have colonized tissues and are beginning to enhance their own defenses (antigen masking, replication, biofilm, toxins). The host defense strategies require time to reach peak responses. During this time period, serious infection may be established, especially in immuno-compromised patients. The presence of tissue damage and foreign bodies lower thresholds of infection and diminishes effective responses, thus, the foreign agent is

018242
0120.15
012140

136

134

neutralized or coated by antibodies concurrently. The complementary activity would synergistically optimize the antipathogenic effectiveness of the bioactive compositions of this invention.

5 The bacteria contemplated within the scope of this invention includes *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Shigella Flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Eschericia coli*, *vibrio cholera*, Group D-2, Group E, Group G, Group I, Group 1, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Mycobacterium*, Aerobic pathogenic *Actinomycetales*,
10 *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Helicobacter*, *W. succinogenes*, *Acineto bacter spp.*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Bordetalla*, *Mycoplasmas*, *Gardnerella*, *Streptobacillus*, *Spirillum*, *Calymmatobacterium*, *Clostridium*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, Anaerobic Gram-negative Bacterial including bacilli and Cocci, Anaerobic gram-
15 Positive Nonsporeforming-bacilli and Cocci, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Germella*, *Pedioccouccus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Branhamella*,
20 *Coryne bacterium*, *Campylobacter*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Rhodococcus spp.*, *Rhodococcus*, Group A-4.

Also included are resistant or non-resistant bacteria selected from the group consisting essentially of *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella sp.*, *Bacteroides sp.*, *Enterococci*, *Proteus sp.*,

137

135

Streptococcus sp., Staphylococcus sp., Pseudomonas sp., Neisseria
sp., Pedptostreptococcus sp., Fusobaterium sp., Actinomyces sp.,
Mycobacterium sp., Listeria sp., Corynebacterium sp.,
Propriobacterium sp., Actinobacillus sp., Aerobacter sp.,
5 Borrelia sp., Campylobacter sp., cytophaga sp., Pasteurella sp.,
Clostridium sp., Enterobacter aerogenes, Peptococcus sp., Proteus
vulgaris, Proteus morganii, Staphylococcus aureus, Streptococcus
pyogenes, Actinomyces sp., Campylobacter fetus, and Legionella
pneumophila, ampicillin-resistant strain of S. aureus, and
10 methicillin-resistant strain of S. aureus.

The viruses contemplated within the scope of this invention
include hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, Varicella-Zoster
virus, Rotaviruses, polio virus, human immunodeficiency virus
(HIV), herpes simplex virus type 1, human retroviruses, herpes
simplex virus type 2, Ebola virus, cytomegalo viruses, Herpes
Simplex viruses, Human cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus,
Poxvirus, Influenza viruses, Parainfluenze viruses, Respiratory
Syncytial Virus, Rhinoviruses, Coronaviruses, Adenoviruses, Measles
virus, Mumps virus, Rubella Virus, Human Parvoviruses, Arboviruses,
20 Rabies virus, Enteroviruses, reoviruses, viruses Causing
gastroenteritis Hepatitis Viruses, Filoviruses, Arenaviruses,
Papillomaviruses, Polyomaviruses, Human Immunodeficiency viruses,
Human Retroviruses, Spongiform Encephalopathies, Amyotropic
Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis.

01 2428 1021400

138

136

In the last decade, intravenous immunoglobulins (IVIG) have become a major treatment regime for bacterial and viral infections and of primary and secondary immunodeficiency states. For example, Bucklye et al., New Eng. J. Med. 325:110-117 (1991), describe using intravenous immune globulin in the treatment of immunodeficiency diseases, and Cometta, et al., New Eng. J. Med. 327:234-239 (1992), describe the prophylactic intravenous administration of standard immune globulin and core lipopolysaccharide immune globulin in patients at high risk of post-surgical infection. IVIGs are prepared from the pooled plasmas of large numbers of donors, and tend to have a broad representation of antibodies. Specifically, pooled polyvalent human globulins usually contain antibodies for ubiquitous pathogens such as H. influenza type b, pneumococci, staphylococci, diphtheria, tetanus, respiratory syncytial virus (RSV), measles, cytomegalovirus (CMV), and varicella zoster virus. Antibody concentrations from lot to lot and from manufacturer to manufacturer usually vary only two to four fold when measured by antibody binding assays. However, functional assays often show much larger lot to lot variations as do antibody concentrations to less common pathogens (see, Siber et al., "Use of immune globulins in the prevention and treatment of infections", Current Clinical Topics in Infectious Disease, Remington J S, Swartz MM, eds., Blackwell Scientific, Boston, 12:208-257 (1992)).

5
10
15
20

018242
018242
018242
018242

~~139~~

137

IVIG therapy has been reported to be beneficial for more than thirty five diseases produced by immunopathologic mechanisms. Passive immunization depends on the presence of high and consistent titers of antibodies to the respective pathogens in each preparation.

Nosocomial infections are derived from the hospital or clinical setting, and are also a serious problem. Specifically, bacteria and viruses present in the hospital or clinic can infect a recovering patient and put the patient at risk or prolong the recovery period. A patient's risk factors for nosocomial infection can be intrinsic, such as susceptibility to infection due to immunosuppression, or extrinsic, such as invasive medical interventions (e.g., surgery or use of medical devices such as catheters, ventilators, etc.).

Staphylococcus aureus is an important cause of nosocomial infection, especially nosocomial pneumonia, surgical wound infection, and bloodstream infections (Panlilio et al., Infect. Cont. Hosp. Epidemiol. 13:582-586 (1992). Other pathogens commonly associated with nosocomial infection include, but are not limited to, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., coagulase-negative staphylococci (CNS), and *Candida albicans* (Emori et al., Am. J. Med. 91: (Suppl 3B) 289S-293S (1991). Hospitals and clinics typically employ strict sterilization procedures and use antibiotics such as methicillin,

~~140~~

138

oxacillin, and nafcillinio combat virulent bacterial pathogens. However, nosocomial infections still occur in great numbers and are expected to increase with an aging population.

The use of intravenous immunoglobulins to prevent nosocomial infections has been discussed in Siber, New Eng. J. Med. 327:269-271 (1992). Passive immunization against infections has been particularly successful using immune globulins containing antibodies specific for tetanus, hepatitis B, rabies, chickenpox, and CMV. However, it is reported that there is an inconsistent benefit from using intravenous immune globulins to prevent nosocomial infections. This may be due to variable lot-to-lot levels of antibodies to the more common nosocomial pathogens and emerging new serotypes.

U.S. Pat. No. 4,412,990 to Lundblad, et al. discloses an intravenous pharmaceutical composition containing immunoglobulin (IgG) and fibronectin that exhibits a synergistic opsonic activity which results in enhanced phagocytosis of bacteria, immune complexes, and viruses.

U.S. Pat. No. 4,994,269 to Collins et al. discloses the topical use of monoclonal antibodies for the prevention and treatment of experimental P. aeruginosa lung infections. Specifically, the antibodies are administered via aerosol spray to the lungs. Results show beneficial effects in the treatment of Pseudomonas pneumonia.

501 242 15 0021400

~~141~~

139

U.S. Pat. No. 4,714,612 to Nakamura et al. discloses the use of a non-specific gamma globulin IgG in a mouthwash for preventing gingivitis. Ma et al., Arch. Oral Biol., 35 suppl: 115S-122S, 1990, discloses the use of monoclonal antibodies specific for Streptococcus mutans in a mouthwash. Experiments showed control subjects experienced recolonization with Streptococcus mutans within two days, but those treated with the monoclonal antibodies remained free of Streptococcus mutans for up to two years.

The present invention provides for the direct, concentrated, injected or transfusion delivery of passive immunity to a specific antigen and redirection of the host immune system to the antigenic entity. The present invention provides new compositions that include a full repertoire of immunoglobulin classes (IgG, IgA, IgM) and methods for prophylactic positioning of the compositions wherein the compositions are applied directly to stored blood (banked blood) wounds, burns, latex, rubber, tissues, (including the inner and outer surface of the skin body cavities, mouth, system, etc.) and biomaterial devices as a creme, gel, ointment, vaginal and rectal products, coating, layer, or the like to prevent and treat infections from microorganisms and viruses.

The invention may also be provided as a biocompatible vaccine by providing the heterologous immunoglobulin-antigen complex in a biodegradable matrix (such as those that are poly lactic acid based) to provide a broad spectrum of antibodies to specific

018242
1021400

142

140

infectious pathogens immobilized thereon or encapsulated therein.
The invention facilitates the predetermined timed-release of
bioactive compositions of this invention in the treatment of and
for the prevention or substantial inhibition of pathogenic
5 replication.

The invention may also be used to provide a method of using
the immunomodulatory entrapped antigens and heterologous
immunoglobulin compositions in high concentration, whereby
retroviruses or other immunosuppressive pathogenic organisms
10 (virus, fungus, bacteria, and/or protozoa and the like) cause
opportunistic infections are pre-opsonized in situ for enhanced
phagocytosis and killings.

According to the invention, the direct, concentrated local
delivery of passive immunity is accomplished by applying a
composition having a full repertoire of immunoglobulins (IgG, IgM
and IgA) to biomaterials, implants, tissues, and wound and burn
sites. The compositions preferably have elevated concentrations of
certain immunoglobulin classes (IgG, IgM, and IgA), and elevated
antibody titers to specific microorganisms that commonly cause
20 biomaterial, burn, mucosal, tissue, surgical wound, and body cavity
infections. Compositions within the practice of this invention may
take several forms, including cremes, gels, ointments, lavage
fluids, sprays, lozenges, coatings, layers, or any of the topical
mode of administration. In addition, the compositions may be

143

141

combined with or immobilized on a biocompatible and or biodegradable material, or be impregnated in or encapsulated within a biocompatible-biodegradable polymeric matrix a matrix material for sustained release. The compositions can be used for both prevention and treatment of infections.

In oral applications, the composition would ideally be provided as a lozenge, mouthwash, or spray while, in trauma patients the Composition may be best applied as a creme or ointment, or as part of a fluid infusion, biomaterial implant or fixation device. The immunoglobulins and other antibodies of the present compositions can be immobilized on a biocompatible and/or biodegradable material or encapsulated within a biodegradable-biocompatible matrix/microspheres which is placed in-situ in a patient's infected area, wound site or surgical area, or be coated on a catheter or the like that is inserted in a body cavity.

Where the inhibition of immunosuppressive pathogenic organisms is substantial, the pathogen load (i.e. viral, bacterial) will be reduced and the potential for the production of toxins by bacteria, virus, fungus or other microbes minimized.

Upon creating humoral and cellular-immunity in a nonhuman mammal, introduction of the resulting IgA, IgG1, and/or other neutralizing antibodies and other immunocompetent antibodies and cellular activity on or into a system containing a virus, such as human immunodeficiency virus (HIV), prevents virus replication and

0018242845

~~12/1~~

14/2

renders that virus noninfectious. In so doing, further viral replication may be retarded, blocked, or stopped by means of the IgA, IgG1, other neutralizing antibodies and cellular immune action.

5 An immunocompetent animal makes antibodies in response to simian immunodeficiency virus (SIV), HIV and/or other viruses. These antibodies react with the virus in an antigen-antibody reaction. The normal response for antibody production is for IgM to be produced first, followed by IgG. The antibodies IgM and IgG
10 are not capable of activating or causing biodestruction of some viruses, such as the SIV or HIV virus. It is believed that the basis for this incompetent antigen-antibody response is that the SIV/HIV virus either produces intrinsically, through either viral synthesis or host cell synthesis, an SIV, HIV or viral complement
15 inhibiting factor which prevents activation of the complement system, i.e., viral destruction. The incompetent antigen-antibody response is itself incapable of activating the body's complement system, because the antibodies IgM and IgG are known to be complement fixing antibodies. Thus, where the incompetent antigen-
20 antibody response is detected by standard techniques, the incompetent antigen-antibody response can be eliminated or bypassed as an inhibiting factor by the use of antibodies that are of the neutralizing antibody class.

60162428:021400

145

143

Using this methodology of inserting into mammals viruses for which IgM and IgG may not activate or cause biodestruction such as SIV, HIV, Polioviruses, Influenza, Hanta virus, pox viruses, Caprine Encephalitis (CAE) virus, Herpes-viruses, Hepatitis, Encephalitis, measles, mumps, Ebola, and/or Rubella, serum containing neutralizing antibodies and cellular immunity may be obtained naturally. These products when suitably treated and prepared may yield as a minimum the following: (a) a vaccine suitable for use in humans; (b) an immunological barrier to virus transmission via mucosal surfaces by way of creams, sprays, liquids and swabs; and c) a serum to arrest further viral development.

Each of these applications for inhibiting or preventing the proliferation of abnormal cells in biological systems (in vitro or in vivo) is based upon, but not limited to, the use of antibodies produced in non-human mammals in a patient or subject which, upon being exposed to SIV, HIV, or similar viruses, does not die but rather produces an immunological reaction. The mammal's immunological reaction to the introduction of the SIV and/or HIV virus yields antibodies which are complement fixing and/or neutralizing antibodies and also cellular immune reactions which when treated in accord with accepted procedures yield the production of a useable serum immunoglobulin which can then be used to prevent further virus replication.

01
2428
102140

~~146~~

144

It is known that, in procedures described herein, SIV, HIV, and their immunoglobulin, in particular, IgA, do not affect nonhuman hosts. Roitt, Ivan, Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA (1991). A nonhuman host that may be used to demonstrate and develop serum or milk containing neutralizing antibodies and cellular immunity is an advanced pregnant female goat. The goat was chosen because it does not die from infection with SIV or HIV and a pregnant female produces large quantities of neutralizing antibodies that may be isolated from serum and/or milk. Neither a pregnant female goat, nor a female goat, is required. A pregnant female goat is preferred in order to provide a higher level of production as an additional source of IgA, IgG1, and other neutralizing antibodies. Other nonhuman mammals may also be used to obtain the neutralizing antibodies of interest provided that, when exposed to SIV, HIV, or similar viruses, they do not die but rather produce humoral and cellular reactions. Although not required, the nonhuman mammal's immunological reaction can also be potentiated by use of an appropriate adjuvant.

The neutralizing antibody may be administered to humans either intravenously, intradermally, subcutaneously, intramuscularly or as a vaccine prepared from serum or milk. For persons with immature digestive systems which are capable of absorbing antibodies or antibody-making cells, such as newborn infants, the neutralizing

147

145

antibodies may also be ingested via milk or a modified milk product.

The simian immunodeficiency viruses (SIVS) were originally isolated from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with immunodeficiency or lymphoma (SIVmac). Subsequently, SIVs were isolated from asymptomatic mangabey monkeys (SIV/ssm, SIV/smlv, and SIV/Delta) and from *Macaca nemestrina* with lymphoma (SIV/Mne). A strain of SIV thought to be obtained from African green monkeys has since been shown to be SIVmac. Recently, an authentic SIVagm virus was isolated from naturally infected African green monkeys.

In susceptible primate species, SIVs cause a fatal disease with symptoms similar to those associated with the human acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) caused by human immunodeficiency viruses type 1 (HIV-1) or type 2 (HIV-2) or type 3 (HIV-3). The genomic organizations of HIV-1; HIV-2, HIV-3, and SIVmac or SIVagm are very similar, and there is approximately 40% sequence relatedness between SIVmac and HIV-1 or SIVagm and an even closer relatedness 65% overall sequence identity) between-SIVmac and HIV-2. Because of these similarities between HIV and SIV, SIV macaque model is suitable for the development and testing of bioactive agents against human AIDS in vitro.

01824287021400

148 14/6

EXAMPLE I

PREPARATION OF CONCENTRATED SIMIAN

IMMUNODEFICIENCY VIRUS (SIV)

5 A macrophage-tropic strain of SIV (SIVmac239-17E) referred to
as "SIV-17E" was prepared by growing the virus in CEMx174 cells.
Sharma, et al., "Derivation of neurotropic lymphocytotropic
parental virus: pathogenesis of infection in macaques," J Virol 66:
352-35556 (1992). The CEMx174 cell is an immortalized CD4-bearing
human T/B hybrid cell line that is highly susceptible to SIV-
10 induced cytopathicity (fusion) and permissive for replication by
SIVmac. Hoxie, et al., "Biological characterization of a simian
immunodeficiency virus-like retrovirus (HTLV-IV): Evidence for CD4-
associated molecules required for infection," J. Virol 62:2557-2568
(1988). Koenig, et al., "Selective infection of human CD4 + cells
by simian immunodeficiency virus: productive infection associated
with envelope glycoprotein induced fusion," Proc. Nat'l. Acad. Sci.
USA 86:2443-2447 (1989).

20 The cells were grown in RPMI-1640 medium ("RPMI'1) supplemented
with 10% fetal bovine serum, glutamine and gentamicin, and were
used for preparation of stock virus and the virus neutralization
assay. Cell cultures (9 milliliter) were inoculated with 1
milliliter of virus (10^4 TCID 50/milliliter) and examined for cell
fusion. When approximately 50% of the cells had been used, the
cultures were expanded by the addition of fresh cells. Cultures

149

147

were further monitored for infectivity by fusion and reverse transcriptase. Supernatant fluids (approximately 240 milliliters) were collected and clarified by centrifugation. The stock contained 10^4 TCID₅₀/milliliter in CEMx174 cells. Virus was pelleted at 27,000 rpm in a SW28 rotor (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) for two hours at 4 degrees Centigrade, resuspended in two milliliters NET buffer (50 mM HCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM Tris hydrochloride, pH 7.4) and purified on a Sepharose CL-4B column (Pharmacia Diagnostics, Inc., Fairfield, NJ).

EXAMPLE II

NEUTRALIZATION OF THE SIV VIRUS IN VITRO

Neutralizing antibody or antibodies obtained from a nonhuman mammal exposed to SIV virus were examined for antiviral activity in vitro. Simian immunodeficiency virus (SIV) was prepared according to procedures given in Example I. The virus was heat-killed in a 60 deg C water bath for thirty minutes. Killed virus was used for the sake of safety; however, use of live virus will result in a faster immunogenic response.

A pregnant female goat was exposed to the simian virus by intramuscular injection. The goat was injected with a one milliliter suspension of killed SIV at 1×10^6 viral particles per milliliter once per week for three weeks. The goat's immunogenic

50182428 1021400

150

148

response was augmented using the MPL(R) (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH, INC.) + TDM Adjuvant System (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO) according to the manufacturer's instructions, i.e., administering intramuscularly 500 ul into each hind leg.

5 Following exposure of the goat to simian SIV virus, the animal's serum and/or milk was obtained. Milk was obtained from the goat as soon as it became available, generally at about three weeks after the birth of the kid. The milk was frozen until subsequent use.

10 To collect serum, blood samples of at least 10 cc were drawn from a large bore vein after the first week and weekly thereafter for twelve weeks. This regimen was selected to optimize the opportunity to first detect neutralizing antibodies. Each serum sample was obtained by centrifugation of the blood sample, frozen for transport to the laboratory, and subsequently tested for neutralizing antibodies. The neutralizing antibodies were first detected on or about the eighth week. During subsequent weeks, samples were tested to monitor changes in neutralizing antibody concentration, and the amount of antibodies detected increased over
20 time. Straight, untreated serum (without concentrating the antibodies) obtained from the blood sample taken at the twelfth week was used in the in vitro neutralization studies.

A neutralization assay was performed to demonstrate the ability of the neutralizing antibodies and cellular immunity in the

132428:0214 0

157

149

goat serum to prevent infectivity of the SIV virus in vitro. SIV-17E virus (100 TCID₅₀/milliliter) was incubated with doubling dilutions of the goat serum at 37 deg C for one hour. In a 96-well tissue culture plate 100 microliters of each SIV-17E/goat serum mixture was added to wells using three wells per dilution. Approximately 5 x 10⁴ CEMx174 cells were then added to each well. The cultures were incubated at 37 degrees Centigrade and observed for fusion over a period of five days. Fusion was observed in control cultures within one day. The neutralizing antibody titer was taken as the highest dilution of serum which prevented cell fusion.

The results of the neutralization assay are given in Table 3 and illustrated in Fig. 1 is the average number of fusion sites observed over time for various dilutions of goat anti-SIV serum (Go-SIV), compared to normal goat serum (NGS) as the control. Fig. 2 present neutralization data for Day 2 post-infection. Fig. 3 depicts neutralization of SIV infection over time by goat anti-SIV serum used at a 1/20 and a 1/80 dilution. Table 4 presents the neutralization assay data as a percent of inhibition of SIV fusion sites by various dilutions of goat anti-SIV serum at day 2 post-infection.

A 1/20 dilution of the goat anti-SIV serum almost completely inhibited SIV infection of the CEMx174 cells (97.2% inhibition). Dilutions of 1/40 and 1/80 inhibited 92.4% and 83.7%, respectively.

452

150

These results indicate that the goat anti-SIV serum contains potent neutralizing antibodies which can be used to block the infectivity of the SIV virus.

5

Table 3
Average Number of Fusion Sites Over Time For
Various Dilutions of Goat Anti-SIV
Serum vs The Normal Saline Control

10

DIL	NORMAL	ANTI-SIV
1/20	70	2
1/40	72.5	5.5
1/80	75	13
1/160	80	34
1/320	85	58
1/640	85	85

0182428.02140
5

Table 4
Percent Inhibition of SIV Fusion Sites by
Different Dilutions of Goat Anti-SIV Serum
(Day 2 -post-infection)

25

	Dilution	Inhibition
1	1/20	97.2
2	1/40	92.4
3	1/80	83.7
4	1/160	57.5
5	1/320	31.7

153

151

A vaccine may be produced according to the procedures outlined in Example II by first exposing the same or a different mammalian species to a virus such as SIV or HIV. The preferred nonhuman mammal is a goat. The resultant neutralizing antibody or antibodies are extracted from the animal's serum or milk via standard methods such as ammonium sulfate or sodium sulfate precipitation and centrifugation methodology followed by purification by such methods as dialysis or gel filtration. Tijssen, P., "Practice and theory of enzyme immunoassays," Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg (eds.), Amsterdam: Elsevier Science Publishers, vol. 15, pp. 96-98 (1985).

Once the neutralizing antibodies are isolated, placing the neutralizing antibody or antibodies in the presence of live SIV and/or HIV viruses (Brooks, et al., Medical Microbiology, 19th ed., Appleton & Lange, East Norwalk, CN, p. 150 (1991)) or other viruses into a host species, the SIV and/or viral cells are rendered noninfectious and incapable of further replication. This process of using neutralizing antibody or antibodies to attenuate the SIV, HIV or other virus is referred to as an antibody attenuation of a virus to produce a vaccine, or "AAV2".

504824281021400

454 152

EXAMPLE III

PREPARATION AND USE OF A VACCINE

Neutralizing antibody or antibodies are used to attenuate the SIV, HIV, and other viruses to produce a vaccine. The HIV virus is extracted from a human donor who has been diagnosed as being HIV+ and whose HIV virus is both isolated and sero-typed. (Bobkov, et al., "Identification of an env G subtype and heterogeneity of HIV-1 strains in the Russian Federation and Belarus," AIDS 8:1649-1655(1994); Gao, et al., "Genetic Variation of HIV type 1 in Four World Health Organization-sponsored Vaccine Evaluation Sites: Generation of Functional Envelope (Glycoprotein 160) Clones representative of sequence subtypes A, B, C, and E, "AIDS Res Hum Retroviruses 10:1359-1368-(1994); Kaleebu, et al., "Identification of HIV-1 subtype G from Uganda," AIDS Res Hum Retroviruses 11:657-659 (1995); WHO Network for HIV Isolation and Characterization, "HIV Type 1 Variation in World Health Organization-sponsored Vaccine Evaluation Sites: Genetic Screening, Sequence Analysis, and Preliminary Biological Characterization of Selected Viral Strains," AIDS Res. Hum. Retroviruses 10:1327-1343 (1994); Delwart, et al., "Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes," Science 262:1257-1261 (1993).

The HIV virus of the human donor is then placed on or injected into a nonhuman mammal such as a goat. The injection into the goat produces an immunological response in the form of neutralizing

5
10
15
20

601
2428
1021400

antibodies. The neutralizing antibodies are extracted from the mammal's serum or milk and then mixed with the heat killed human donor's HIV sero-typed virus to produce the attenuated antibody viral vaccine, or AAV2.

5 The proportion of virus to antibody requires the antibody is bound to at least one epitope on each virus particle but that not all epitopes are bound. It is believed that attachment of a single neutralizing antibody to a single epitope is sufficient to prevent fusion, and thus, virulence is removed while immunogenicity is maintained. For a given virus-neutralizing antibody(ies) combination, the neutralization assay described in Example II can be performed to determine what ratio of neutralizing antibody to virus results in complete neutralization of the virus. A vaccine is then prepared using a neutralizing antibody concentration of less than that which resulted in complete neutralization as determined in the neutralization assay.

501
242
1502140

 The AAV2 is in the form of an HIV-IGA complex which maintains immunogenicity but neutralizes virulence. The AAV2 is then returned, typically by injection, back into the human donor. Placement of the AAV2 into the human donor produces a competent immunological response which blocks, prevents, or destroys further progress or development of the SIV and/or HIV virus into the AIDS complex disease.

156

154

It is noted that IgA and other antibodies are mixed with the human donor virus in an effective amount so as to allow immunogenicity to be attained and maintained by bonding some but not all viral epitopes, thereby yielding an immunological response different from the parent virus but still achieving neutralization of the SIV/HIV virus by rendering it an attenuated noninfectious virus (AAV2). The binding of epitopes will activate complement and virtually destroy much of the viral complex. This process yields a vaccine, or AAV2, which, when placed into a human body, denies viral replication thereby allowing the human body's immune system to be stimulated to increase its own production of competent antibodies as a result of AAV2 stimulation. This increase of the human body's competent antibodies then prevents the additional production or replication of the simian SIV or human HIV virus and the development of the AIDS complex disease.

Modern vaccination technologies are also well known in the art. For example, recombinant DNA vaccines have been produced for viruses such as cholera, herpes simplex, HIV, and hepatitis B. These vaccines provide selected immunogenic peptides which can also be coupled with adjuvants. Immunogenic virus-like particles (VLP) comprising proteins of the same size and structure as viruses but without the viral DNA or RNA can be produced by fusing foreign genes to the Ty gene in yeast.

001324230.0021400

155

Methodologies for producing vaccines of chemically synthesized peptides which comprise the primary structure of antigenic regions of an infectious virus are also available. Also known in the art are idiotypic vaccines prepared by exposing a host to a classical antigen, allowing the host to produce antibodies (Ab-1) to the antigen, then allowing the host to produce antibodies (Ab-2) to the original antibodies (Ab-1), with the antibodies (Ab-2) having antigenic determinants resembling the original antigen and demonstrating improved immunogenicity by maintaining the tertiary structure of the antigen. (Coleman, et al., Fundamental Immunology, 2d ed., Wm C. Brown Publishers, 1992; Keeton, W.T. and Gould, J.L., Biological Science, W.W. Norton, 1993; Solomon, et al., Biology, 3d ed., Saunders College Publishing, Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, 1983. Recombinant DNA vaccines, VLP'S, synthetic peptides, or idiotypic vaccines, rather than live virus, may be used in the present invention to produce neutralizing antibodies in a host mammal.

Synthetic peptides derived from the complementarity-determining region (CDR) sequences of antibodies may be mass-produced in vitro, which are similar to the intact antibody, inhibitory to idio-anti-idio interactions, bind specific antigens, interact with cellular receptors and stimulate biological processes. (Taub, et. al., J. Biol. Chem. 264:259 (1989); Bruck, et. al., Proc Natl Acad Sci USA 83:6578 (1986) Kang, et al.,

Science 240:1034 (1988); Williams, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci.
USA 86:5537 (1989); Novotny, et al., J. Mol. Biol. 189:715 (1986).
Although these peptide analogs seem to have a limited use in vivo
due to their proteinaceous characteristics such as water
5 insolubility, high immunogenicity, their ability to adopt various
conformations, and subjectability to proteolysis, it is foreseen
that such synthetic peptides might be used in the present
invention.

It is well known in the art that a monoclonal antibody can be
10 mass-produced via hybridoma technology for the purpose of
economically providing large amounts of a vaccine. Virus
neutralizing agents in the form of monoclonal antibodies may also
be used in the present invention. In this technique, neutralizing
antibody producing cells are fused with immortal cells of a myeloma
15 to produce the hybridoma cells; the hybridoma cells are screened
for antibody production; the cells which produce the desired
monoclonal antibody are then either cultured in large numbers in
tissue culture or reinjected into the peritoneal cavities of many
mice where the cells multiply and produce large quantities of
20 monoclonal antibody, in the ascites fluid that is formed; the
ascites fluid containing the monoclonal antibody is collected; and
the monoclonal antibody is purified by techniques such as affinity
chromatography or column chromatography.

Techniques for producing non-peptide compounds referred to as mimetics have been developed which permit the synthesis of a conformationally restricted molecule that mimics the binding and functional properties of monoclonal antibodies. The mimetics are synthesized by first determining the relevant contact residues and conformation involved in the antibody-antigen binding (Williams, et al., J Biol Chem 266:5182 (1991); Segal, et al., Proc Natl Acad Sci USA 71:4298 (1974); Amzel, et al., Proc Natl Acad Sci USA 71:1427 (1974), de la Paz, et al., EMBO J 5:415 (1986); Kieber-Emmons, et al., Int Rev Immunol 2:339 (1987) and then synthesizing conformationally restricted cyclic organic peptides which have the required contact residues and conformation (Kahn, et al., J Mol Recognition 1:75 (1988); Kahn, et al., J Am Chem Soc 110:1638 (1988). Such mimetics can be prepared from the neutralizing antibodies produced by the mammalian hosts of the present invention and utilized in treatment of viral infections.

Furthermore, an isolated neutralizing antibody can be mass-produced by biomolecular sequencing techniques. The neutralizing antibody is first sequenced, and the sequence is then used as a template for in vitro production.

160

158

EXAMPLE IV

IMMUNOLOGICAL BARRIER AND PREVENTATIVES

An immunological barrier to the transmission or invasion of SIV, HIV, or other similar viruses via the mucosal surfaces may be prepared using milk and/or serum neutralizing antibodies extracted as described in Example II. These antibodies are developed into a passive immunological barrier in the form of vaginal creams, rectal creams, eye drops, oral sprays, swabs or injections to be applied directly to the mucosa or at the site of accidental needle pricks or sticks. It should be noted that with oral, vaginal or rectal sex, a latex condom should be used concurrently to achieve maximum benefit but is not necessary if sufficient cream or spray is used. The serum from the mammal is treated with ammonium sulfate to precipitate the neutralizing antibodies. Then, the antibodies will be dissolved in an isotonic solution. Once dissolved, the solution is maintained at or less than 4 degrees Centigrade until used. Long term storage, i.e., in excess of thirty days, can be achieved at temperatures of -20 deg C.

Thereafter, sprays, gels, creams, drops and similar applications can be manufactured using standard, acceptable industrial suspension and preservation technology. Condom use can be either by manual application of the preparation to the interior of the condom prior to its use or by pre-application to the condom before packaging. Concurrent use of the preparation in the form of

5
10
15
20
50182428:021400

161 159
a vaginal cream or spray is recommended to enhance the barrier protection.

5 The average number of viral particles per milliliter of bodily secretions for which the barrier is intended can be determined by measuring the number for a particular patient, or for a population of patients. Once the average number is determined, then a theoretical neutralization number can be obtained using Table 4.

10 A human serum or a serum complex composed of neutralizing antibodies obtained from a mammal similar to, but not limited to, that described herein to arrest further cellular or viral development within the human body as set out may be developed for and against a specific SIV, HIV and/or other viruses, or mutated strain(s) of these viruses. The serum development is applicable for humans and other species. The mammal's neutralizing antibodies which have been produced as described in Example II and which have been processed and stored in solution as described in Example III can be introduced into humans who have the HIV virus or other viruses under treatment. The serum is introduced, in one form, intravenously, intramuscularly, intradermally or subcutaneously.

EXAMPLE V

PREPARATION AND USE OF SERUM OR SERUM COMPLEX

A mammal's neutralizing antibodies, which have been produced, precipitated, and stored in solution as described in Examples II

and III above, can be introduced into humans who have the HIV virus or other viruses under treatment. The serum is preferably introduced sub-cutaneously or IM but may be given intravenously with precaution.

5

Vaccines

The present invention contemplates vaccines for use in both active and passive immunization embodiments. Immunogenic compositions, proposed to be suitable for use as a vaccine, may be prepared most readily directly from immunogenic heterologous antibody-antigen complex prepared in a manner disclosed herein. Preferably the antigenic material is extensively dialyzed to remove undesired small molecular weight molecules and/or lyophilized for more ready formulation into a desired vehicle.

10

601624261.021400

The preparation of vaccines that contain the heterologous antibody-antigen as active ingredients is generally well understood in the art, as exemplified by United States Letters Patents 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; and 4,578,770, all incorporated herein by reference. Typically, such vaccines are prepared as injectables. Either as liquid solutions or suspensions: solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection may also be prepared. The preparation may also be emulsified. The active immunogenic ingredient is often mixed with excipients that are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol,

20

25

163

161

ethanol, or the like and combinations thereof. Examples of such pharmaceutically acceptable carrier or diluents include water, phosphate buffered saline or sodium bicarbonate buffer. A number of other acceptable carriers or diluents are known.

5 In addition, if desired, the vaccine may contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents or adjuvants that enhance the effectiveness of the vaccines.

10 Vaccines may be conventionally administered parenterally, by injection of the heterologous antibody-antigen, for example, either subcutaneously or intramuscularly. Additional formulations which are suitable for other modes of administration include suppositories and, in some cases, oral formulations. For suppositories, traditional binders and carriers may include, for example, polyalkylene glycols or triglycerides. Such suppositories may be formed from mixtures containing the active ingredient in the range of 0.5% to 10%, preferably 1-2%. Oral formulations include such normally employed excipients as, for example, pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate and the like. These compositions take the form of solutions, suspensions, tablets, pills, capsules, sustained release formulations or powders and contain 10-95% of active ingredient, preferably 25-70%.

20 The heterologous antibody-antigen complex may be formulated into the vaccine as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts, include the acid addition salts (formed with the

501 2428-021400

16A

162

heterologous antibody-antigen) and those which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, and the like.

The vaccines are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in such amount as will be therapeutically effective and immunogenic. The quantity to be administered depends on the subject to be treated, including, e.g., the capacity of the individual's immune system to synthesize antibodies, and the degree of protection desired. Precise amounts of active ingredient required to be administered depend on the judgment of the practitioner. Suitable dosage ranges are of the order of several hundred micrograms active ingredient per vaccination. Suitable regimes for initial administration and booster shots are also variable, but are typified by an initial administration followed by subsequent inoculations or other administrations.

The manner of application may be varied widely. Any of the conventional methods for administration of a vaccine are applicable. These are believed to include oral application on a solid physiologically acceptable base or in a physiologically acceptable dispersion, parenterally, by injection or the like. The

501 2428-021400

165

163

dosage of the vaccine will depend on the route of administration and will vary according to the size of the host.

Various methods of achieving adjuvant effect for the vaccine includes use of agents such as aluminum hydroxide or phosphate (alum), commonly used as 0.05 to 0.1 percent solution in phosphate buffered saline, admixture with synthetic polymers of sugars (Carbopol) used as 0.25 percent solution, aggregation of the protein in the vaccine by heat treatment with temperatures ranging between 70° to 101°C for 30 seconds to 2 minute periods respectively. Aggregation by reactivating with pepsin treated (Fab) antibodies to albumin, mixture with bacterial cells such as C. parvum or endotoxins or lipopolysaccharide components of gram-negative bacteria, emulsion in physiologically acceptable oil vehicles such as mannide mono-oleate (Aracel A) or emulsion with 20 percent solution of a perfluorocarbon (Fluosol-DA) used as a block substitute may also be employed.

In many instances, it will be desirable to have multiple administrations of the vaccine, usually not exceeding six vaccinations, more usually not exceeding four vaccinations and preferably one or more, usually at least about three vaccinations. The vaccinations will normally be at from two to twelve week intervals, more usually from three to five week intervals. Periodic boosters at intervals of 1-5 years, usually three years, will be desirable to maintain protective levels of the antibodies. The course of the immunization may be followed by assays for antibodies for the supernatant antigens. The assays may be

466 164

performed by labeling with conventional labels, such as radionucleotides, enzymes, fluorescence, and the like. These techniques are well known and may be found in a wide variety of patents, such as U.S. Patent Nos. 3,791,932; 4,174,384 and 3,949,064, as illustrative of these types of assays.

EXAMPLE VI

AGRICULTURAL USES

A cure or arresting mechanism to the caprine encephalitis (CAE) virus is now disclosed. The principles described herein and the processes set out in Examples II and III are also equally applicable to the CAE virus which presently affects goats or other virulent viral systems in the same manner that the SIV and HIV viruses do humans. The mammal of choice for anti-body production is the milk-producing cow. Use of these principles and techniques set forth above will result in a program that should on proper application eradicate the CAE virus from the goat herds.

Another aspect of the present invention includes the development of an in vitro diagnostic procedure for AIDS that include placing a serum or another biological medium from a patient to be diagnosed in contact with at least one of the proteins or glycoproteins of SIV, HIV-1 or HIV-2, or with a viral lysate or extract, and then detecting the immunological reaction. One method for implementing the present invention includes, for example, an ELISA in which immunoenzymatic reactions or immunofluorescent materials are used to detect the presence of an immunogenic

501824281-5
21400

167

165

complex. The assays may be direct or indirect immunofluorescence measurements or direct or indirect immuno-enzymatic dosages.

Therefore, the present invention also applies to labeled virus extracts regardless of whether the labeling is enzymatic, fluorescent, radioactive, etc. Such assays illustratively include: depositing specific extract quantities or quantities of the proteins of the present invention in the wells of a microtiter plate; introducing increasingly higher dilutions of the serum to be diagnosed into these wells; incubating the microtiter plate; carefully washing the microtiter plate with a suitable buffer; introducing antibodies that are specifically labeled with human immunoglobulins into the wells of the microtiter plate, the labeling being carried out by an enzyme selected from those capable of hydrolyzing a substrate in such a manner that this substrate thereupon alters its radiation-absorptivity at least within a specific band of wavelengths; and detecting, preferably in comparative manner with respect to a control, the amount of substrate hydrolysis both with respect to measuring potential danger and any actual presence of the ailment.

Another aspect of the present invention are kits for the above diagnostic procedure. These kits include: an extract or a more purified fraction of the above described virus types, where this extract or fraction is labeled, for example radioactively, enzymatically or by immuno-fluorescence; human anti-immunoglobulins

5018242 1021400

~~165~~ 166

or a protein A (advantageously fixed on a water-insoluble support such as Agarose beads); an extract of lymphocytes obtained from a healthy person as a control; buffers, and where called for, substrates to visualize the labels.

5 Additionally, the vaccine or immune modulator may be used in a variety of forms to enhance the immune response of an individual that has been infected by HIV in the following forms:

- I. As a topical creme against HIV associated Kaposi's sarcoma.
- II. In an intravenously solution such as saline may be effective
- 10 in reducing viral load and slowing down the onset of immunodeficiency. Surgeons who also use saline washes in cleansing a particular area in the operating field may find it useful. The use of the heterologous antibody-antigen as well as liposomalization may be specifically included. These forms could be reconstituted in the form of mouthwash with the heterologous antibody-antigen alone or in conjunction with antifungal reagents. An inhalant form alone or in conjunction with pentamidine. The use of the heterologous antibody-antigen in tablet form to be taken orally.

20 III. Buffered ophthalmic solution -- for patents suffering from HIV associated retinitis. The buffering is necessary due to pH changes the heterologous antibody-antigen may cause.

IV. Highly concentrated solution for intramuscular injection -- would facilitate treatment of needle stick injuries of health

25 care workers. In this regard use of DMSO as solvent would

169

162

give extremely fast penetration delivering high concentrations of heterologous antibody-antigen to a small area.

V. Suppository form - for chemoprevention in homosexuals because the major sites of infection are the large intestine and rectum.

VI. Chemo-preventative Vaginal douche and creme - the douche may be of use in a pre-sexual exposure in a standard acetic acid solution. The creme may be mixed with 9-nonoxynol spermicide to use in conjunction with birth control.

VII. The creme described in VI could also be used in condoms.

VIII. Vaginal sponge - this could be used by prostitutes so that heterologous antibody-antigen would be time-released over several hours with nonoxynol-9.

IX. Gloves lined with heterologous antibody-antigen may help surgeons and other health care workers dealing heavily with blood and bodily fluids.

X. The use of heterologous antibody-antigen in liquid soap in combination with anti-bacterial agents may be useful in hospitals and research institutions. Although this would probably be no more effective than plain anti-bacterial soap, the employees and hospital insurance companies would appreciate it.

XI. The attachment of heterologous antibodies to sterile HPLC resin (for example SiO₂-peptide or Si(peptide),, etc.) to be used as a disposable filter for blood and blood by-products

170

168

prior to patient transfusion. This is to insure that the donor is not in the seroconversion window.

Aqueous compositions (inocula) of the heterologous antibody solution as described herein, and include an effective amount of the heterologous antibody-antigen complex dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable aqueous medium. As used herein the terms "contact", "contacted", and "contacting", are used to describe the process by which an effective amount of a pharmacological agent, e.g., pure or dilute heterologous antibody-antigen complex, comes in direct juxtaposition with the target cell. The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an allergic or similar untoward reaction when administered to a human, such as the heterologous antibody-antigen as described herein.

The preparation of an aqueous composition that contains a protein or proteoglycan, such as the active components derived from heterologous antibody-antigen complexes, is well understood in the art. Typically, such compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection can also be prepared. The preparation can also be emulsified.

Proteoglycans, for example, may be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts, include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic

5 182428-021400

121

169

acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions, drug release capsules and the like.

For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the heterologous antibody-antigen complex may be used directly without any toxic effects to the animal. Alternatively, the heterologous antibody-antigen complex and carrier solution may be dissolved or resuspended, in a suitable buffer, if necessary. Liquid diluents can first be rendered isotonic with sufficient saline or glucose.

While these particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration, the heterologous antibody-antigen carrier solution of the present invention can be administered directly at full concentration. In this connection, sterile aqueous procedures to produce heterologous antibody-antigen carrier may be employed, as will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 mL of isotonic NaCl solution and either added to

01
1
2425-021400

172

176

1000 mL of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

While this invention has been described in reference to illustrative embodiments, this description is not intended to be construed in a limiting sense. Various modifications and combinations of the illustrative embodiments, as well as other embodiments of the invention, will be apparent to persons skilled in the art upon reference to the description. It is therefore intended that the appended claims encompass any such modifications or embodiments.

0183428-021400

123

121

What is claimed is:

1. An immunomodulatory composition comprising:

heterologous antibodies specific for an antigen; and

an antigen, wherein the heterologous antibodies form a complex

5 with the antigen for combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

2. The composition of claim 1, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

10

3. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are polyclonal.

4. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are monoclonal.

5. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are raised in a goat.

20 6. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are goat anti-retrovirus antibodies.

134

172

7. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are polyclonal antibodies raised in a pregnant goat and are isolated from goat milk.

5 8. The composition of claim 1, wherein the antigen is a heat killed human immunosuppressive virus.

9. The composition of claim 1, wherein the antigen is a heat killed simian immunosuppressive virus.

10

10. The composition of claim 1, wherein the antigen is a chemically inactivated immunosuppressive pathogen.

11. The composition of claim 1, wherein the carrier is buffered saline.

12. The composition of claim 1, wherein the antigen is an attenuated immunosuppressive pathogen.

20 13. The composition of claim 1, wherein the antigen is isolated from the patient to be treated with the composition and the heterologous antibodies are raised against that specific isolate.

0041220281021400
601824281021400

175

173

14. A vaccine for stimulating immune responses in an immunosuppressed host comprising:

- heterologous antibodies specific for an antigen;
- an antigen, wherein the heterologous antibodies form a complex with the antigen; and
- a pharmaceutically acceptable carrier.

15. The composition of claim 14, further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

16. The composition of claim 14, wherein the heterologous antibodies are polyclonal.

17. The composition of claim 14, wherein the heterologous antibodies are monoclonal.

18. The composition of claim 14, wherein the heterologous antibodies are raised in a goat.

19. The composition of claim 14, wherein the heterologous antibodies are goat anti-retrovirus antibodies.

10
601
242
15
042140

~~DA~~

17A

20. The composition of claim 14, wherein the heterologous antibodies are polyclonal antibodies raised in a pregnant goat and are isolated from goat milk.

5 21. The composition of claim 14, wherein the antigen is a heat killed human immunosuppressive virus.

22. The composition of claim 14, wherein the antigen is a heat killed simian immunosuppressive virus.

10

601
242
15
02140

23. The composition of claim 14, wherein the antigen is a chemically inactivated immunosuppressive pathogen.

24. The composition of claim 14, wherein the carrier is buffered saline.

25. The composition of claim 14, wherein the antigen is an attenuated immunosuppressive pathogen.

20

26. The composition of claim 14, wherein the antigen is isolated from the patient to be treated with the composition and the heterologous antibodies are raised against that specific isolate.

~~177~~

175

27. A method of vaccinating a host against an immunosuppressive pathogen, which method comprises administering to said host an effective amount of an attenuated antigen from an immunosuppressive pathogen and heterologous antibodies as defined in claim 1.

5

28. The method of claim 27, wherein the heterologous antibodies are polyclonal.

10

29. The method of claim 27, wherein the heterologous antibodies are monoclonal.

30. The method of claim 27, wherein the heterologous antibodies are raised in a goat.

31. The method of claim 27, wherein the heterologous antibodies are goat anti-retrovirus antibodies.

32. The method of claim 27, wherein the heterologous antibodies are polyclonal antibodies raised in a pregnant goat and are isolated from goat milk.

33. The method of claim 28, wherein the antigen is a heat killed human immunosuppressive virus.

501324281
214
C

178

176

34. The method of claim 29, wherein the antigen is a heat killed simian immunosuppressive virus.

35. The method of claim 29, wherein the antigen is a chemically
5 inactivated immunosuppressive pathogen.

37. The method of claim 29, wherein the carrier is buffered saline.

10 38. The method of claim 29, wherein the antigen is an attenuated immunosuppressive pathogen.

501
2428
15
214
0

39. The method of claim 29, wherein the antigen is isolated from the patient to be treated with the composition and the heterologous antibodies are raised against that specific isolate.

177

177

40. A method of immunomodulation comprising the steps of:
isolating an immunosuppressive etiologic agent from an immune
suppressed host;

purifying the immunosuppressive etiologic agent;

5 inoculating an animal across species barriers with the
purified immunosuppressive etiologic agent;

purifying xenotypic antibodies from the animal specific to the
immunosuppressive etiologic agent; and

10 mixing inactivated immunosuppressive etiologic agent with the
purified xenotypic antibodies to produce an inoculant.

41. The method of claim 40, further comprising the step of:

inoculating the immune suppressed host with the inoculant.

15 42. The method of claim 40, wherein the heterologous antibodies
are polyclonal.

43. The method of claim 40, wherein the heterologous antibodies
are raised in a goat.

20 44. The method of claim 40, wherein the heterologous antibodies
are goat anti-retrovirus antibodies.

60182428:021400

~~180~~

178

45. The method of claim 40, wherein the heterologous antibodies are polyclonal antibodies raised in a pregnant goat and are isolated from goat milk.

5 46. The method of claim 40, wherein the immunosuppressive etiologic agent is a heat killed human immunosuppressive virus.

47. The method of claim 40, wherein the immunosuppressive etiologic agent is a heat killed simian immunosuppressive virus.

10

48. The method of claim 40, wherein the immunosuppressive etiologic agent is a chemically inactivated immunosuppressive pathogen.

04120-2428109

1A

179

NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY
ENHANCING COMPOSITIONS

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

5 A composition and method for immune modulation of pathogenic
infections is disclosed. More particularly, a composition and
method for enhancing a mammals ability to respond to, e.g.,
immunosuppressive pathogens, is disclosed in which a target antigen
is mixed with a heterologous antisera specific or cross-reactive to
10 that antigen to produce an inoculant. The inoculant is used to
cause natural and specific immune responses to the heterologous
antibodies to enhance Complement fixation and specific humoral and
cellular responses.

5 182428 102140

822617.1

DECLARATION

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or (if multiple inventors are listed) the below named inventors are the original, first and joint inventors of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled "NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY ENHANCING COMPOSITIONS", the Specification of which:

X is attached hereto.
— was filed on as Application Serial No. .

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified specification, including the claims.

I acknowledge the duty to disclose to the Patent and Trademark Office all information known to me to be material to patentability of the subject matter claimed in this application, as "materiality" is defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, § 119 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed:

PRIOR FOREIGN APPLICATION(S)

Priority			<u>Claimed</u> Yes/No
(Number)	(Country)	(Date Filed)	
(Number)	(Country)	(Date Filed)	Yes/No

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. §119(e) of any United States provisional application(s) listed below:

NONE

183

181

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose all information known to me to be material to patentability of the subject matter claimed in this application, as "materiality" is defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56, which become available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

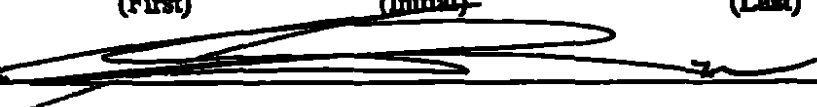
(Application Serial No.) (Filing Date) (Status)

(Application Serial No.) (Filing Date) (Status)

I hereby direct that all correspondence and telephone calls be addressed to Daniel F. Perez, Gardere & Wynne, L.L.P., 1601 Elm Street, Suite 3000, Dallas, Texas 75201-4761, (214)999-3000.

I hereby declare that all statements made of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Inventor's Full Name: Gary R. Davis
(First) (Initial) (Last)

Inventor's Signature: 

Date: Country of Citizenship: U.S.A.

Residence Address: 201 East Marshall Place, Tulsa, Oklahoma 74106
(Include number, street name, city, state, and country)

Post Office Address:
(if different from residence address)

016242 - 21400

184

182

50132428.021400

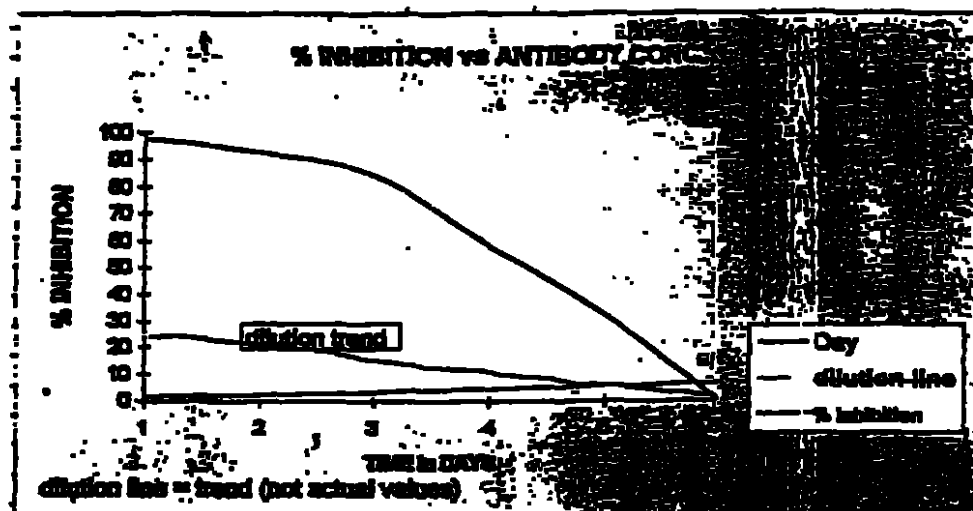


Fig. 1

185

183

6 18242 -021400

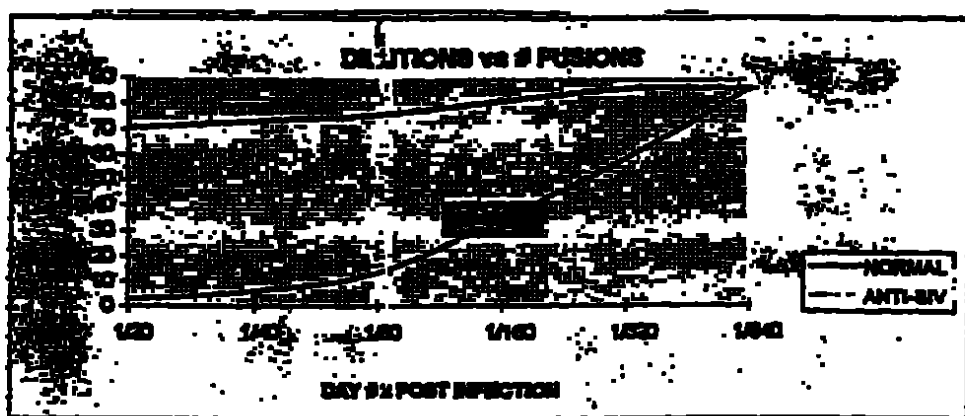


Fig. 2

186

184

6018242 .021400

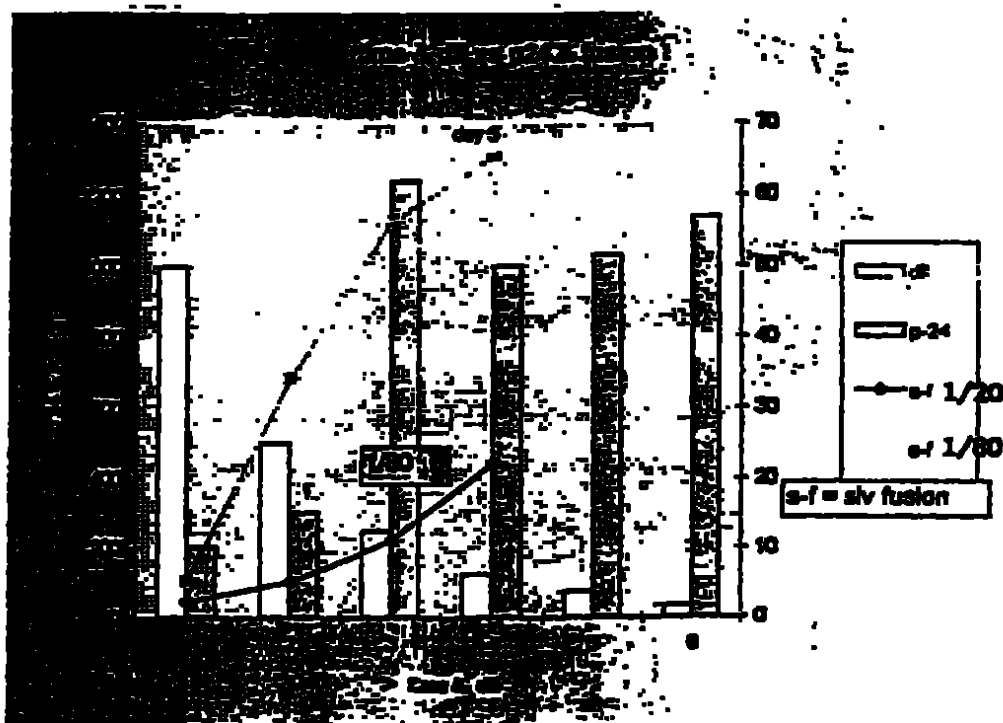


Fig. 3

188

1300Y

185

TRADUCCION-----
LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA-----
A TODOS A QUIENES CORRESPONDA CONSTE POR LA PRESENTE QUE:-----
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA,
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de
América.-----
4 de mayo de 2001-----
POR LA PRESENTE CERTIFICO QUE LA ADJUNTA ES COPIA FIEL DEL
ARCHIVO QUE OBRA EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA DE LOS DOCUMENTOS CORRESPONDIENTES A
LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA MAS ABAJO QUE CUMPLEN CON
LOS REQUISITOS PARA QUE SE LES OTORGUE UNA FECHA DE
PRESENTACION CONFORME AL TITULO 35, ARTICULO 111 DEL CODIGO DE
ESTADOS UNIDOS-----
SOLICITUD NUMERO: 60/182.428-----
FECHA DE PRESENTACION: 14 de febrero de 2000-----
En representación del COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS.
[Aparecen una firma y aclaración de firma que rezan:] Andrea
T. Jones, ANDREA T. JONES, Funcionario Certificador-----
[Sobre el margen inferior izquierdo aparece un sello que
reza:] Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de
América-----
[En el margen izquierdo de todas las páginas del documento
aparece un timbrado que reza:] 60/182.428. 14/02/00-----

184

186

jc688 Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos, 14/02/00

SOLICITUD PROVISORIA DE ACUERDO CON EL TÍTULO 37, ARTÍCULO

1.53(b) (2) DEL CÓDIGO DE NORMAS FEDERALES

FORMULARIO DE TRANSMISIÓN

Archivo Número: 122963-1

Casillero de Solicitudes de Patente Provisorias

Subcomisario de Patentes

Washington, DC 20231

ETIQUETA DE ENVÍO POR "CORREO EXPRESO" N° EL513247267US. Fecha del Depósito: 14 de febrero de 2000. Por la presente certifico que este documento se deposita en el Servicio de "Correo Expreso al Destinatario" del Correo de los Estados Unidos, conforme al Título 37, artículo 1.10 del Código de Normas Federales, en la fecha indicada arriba y que está dirigido al Subcomisario de Patentes, Washington, DC 20231.

[Firma ilegible]

Donna Turner

Estimado señor:

Se adjuntan las siguientes partes de la solicitud:

X Memoria descriptiva con reivindicaciones

Cantidad de Páginas: 61

___ Memoria descriptiva sin reivindicaciones

Cantidad de páginas: --

190

187

- ☐ Dibujos formales Cantidad de Láminas: --
- X Dibujos informales Cantidad de Láminas: 3
- X Otros: Declaración Jurada donde se Reivindica el Estado de Pequeña Empresa

APELLIDO	NOMBRE	INICIAL INTERMEDIA	DOMICILIO (CIUDAD, ESTADO O PAÍS EXTRANJERO)
Davis	Gary	R.	Tulsa, Oklahoma

TÍTULO DE LA INVENCIÓN: COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS
DOMICILIO PARA CORRESPONDENCIA: Edwin S. Flores Gardere & Wynne, L.L.P. 1601 Elm Street, Suite 3000 Dallas, Texas 75201 TELÉFONO: (214) 999-3000

¿Esta invención se hizo de acuerdo con un contrato celebrado con el Gobierno? X No ☐ Sí

Identifique el contrato y la repartición Gubernamental: --

Se adjunta un cheque por el importe de \$75 para cubrir el arancel de presentación. Si existen cargos adicionales,

~~191~~

188

rogamos deducirlos de la Cuenta de Depósito N° 07-0153. Se adjuntan un original y dos copias.

Presentado respetuosamente por,

[Aparece una firma ilegible]

Edwin S. Flores

Registro N° 38.453

Fecha: 14 de febrero de 2000

SÓLO SOLICITUDES PROVISORIAS

192

189

GARDERE & WYNNE, L.L.P.

Abogados y Consultores

5000 Thanksgiving Tower

1601 Elm Street

Dallas, Texas 75201-4763

214-999-3000

Fax: 214-999-4667

Número telefónico directo del Firmante:

214-999-4559

Fax Directo: 214-999-3559

Email: eflores@gardere.com

Houston:

100 Louisiana, Suite 3400

Houston, Texas 7002-507

713-276-5500

Tulsa

200 Oneok Plaza

100 West Fifth Street

Tulsa, Oklahoma 74103-4240

918-699-2900

Ciudad de Méjico

Río Panuco N°7

Col. Cuauhtemoc

06500 Méjico, D.F.

011(525)546-8050

193

190

14 de febrero de 2000

POR CORREO EXPRESO N°EL513247267US

Casillero de Solicitudes de Patente Provisorias

Comisario de Patentes y Marcas

Washington, DC 20231

Re: Solicitud de Patente Provisoria Estadounidense denominada
"COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES
DE ANTICUERPOS"

Nuestro Archivo N° 122963-1

Estimado Señor:

Adjunto a la presente se remiten para su presentación:

(1) memoria descriptiva de patente de 61 páginas con 48
reivindicaciones y un resumen (también las Figuras 1-3 en 3
páginas);

(2) Formulario de Transmisión de Solicitud Provisoria;

(3) Declaración donde se Reivindica Estado de Pequeña Empresa;

y

(4) Nuestro cheque por el importe de \$75,00 para el arancel de
presentación.

Conforme al Título 37, artículo 1.10 del Código de Normas
Federales, solicito a la Oficina de Patentes y Marcas que
acepte esta solicitud y le acuerde un número de acta y una
fecha de presentación a partir de la fecha en que se deposita

~~294~~

191

esta solicitud en el Servicio Postal Estadounidense para Correo Expreso.

Si el cheque es omitido en forma inadvertida, o si se deben abonar aranceles adicionales conforme al Título 37, artículos 1.16 a 1.18 del Código de Normas Federales por alguna razón relacionada con los materiales adjuntos, o si en la presente se incluye un pago excedente, se autoriza al Comisario a deducir o acreditar dichos aranceles de o a Gardere & Wynne, L.L.P., Cuenta de Depósito N° 07-0153.

Rogamos sellar y devolver la tarjeta adjunta como acuse de recibo de estos materiales.

Presentado respetuosamente por,

[firma ilegible]

Edwin S. Flores

Reg. N° 38.453

ESF:dmt

Adj.

295

192

Patente

Archivo N°: 122963-1

Solicitante/Titular: Gary R. Davis, L.L.C.

Acta N°: No asignado

Presentado: adjunto a la presente

Para: COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y
NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS

DECLARACIÓN JURADA (DECLARACIÓN) DONDE SE REIVINDICA ESTADO DE
PEQUEÑA EMPRESA (TÍTULO 37, ARTÍCULO 1.9(C) DEL CÓDIGO DE
NORMAS FEDERALES - PEQUEÑA EMPRESA)

Por la presente declaro que soy una autoridad de la pequeña
empresa facultado para actuar en nombre y representación de la
empresa identificada abajo:

Por la presente declaro que la pequeña empresa identificada
arriba es una pequeña empresa definida en el Título 13,
artículos 41(a) y (b) del Código de Normas Federales del
Título 35, Código de Estados Unidos, porque el número de
empleados de la empresa, incluyendo aquellos de sus
subsidiarias, no supera los 500 empleados. Para los propósitos
de esta declaración, (1) el número de empleados de la empresa
es el promedio del ejercicio anterior de la empresa de los
empleados de jornada completa, de jornada parcial y

temporarios durante cada uno de los períodos de pago del ejercicio, y (2) las empresas son subsidiarias una de otra cuando, directa o indirectamente una empresa controla o tiene poder de control sobre la otra, o un tercero o terceros controlan o tienen poder de control sobre ambas.

Por la presente declaro que los derechos otorgados por contrato o por la ley han sido transferidos y que la pequeña empresa identificada arriba goza de ellos con respecto a la invención denominada "COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS", por los inventores Gary R. Davis, como se describe en la solicitud presentada conjuntamente con la presente.

Reconozco la obligación de presentar, en esta solicitud o patente, una notificación de todos los cambios en el estado derivados de la pérdida del derecho al estado de pequeña empresa con anterioridad al pago, o al momento del pago, el que sea anterior del arancel de concesión o todos los aranceles de anualidades con posterioridad a la fecha en que el estado de pequeña empresa ya no se apropiado. (Título 37, artículo 1.28(b) del Código de Normas Federales).

Por la presente declaro que todas las manifestaciones hechas en la presente son a mi leal saber y entender la verdad y que

todas las manifestaciones hechas sobre la base de información son a mi leal saber y entender la verdad; y que estas manifestaciones se hicieron sabiendo que el falso testimonio doloso es pasible de pena de multa o prisión, o ambas, conforme al Artículo 1001 del Título 18 del Código de Estados Unidos, y que tal falso testimonio puede poner en peligro la validez de la solicitud, las patentes que se concedan en ella o las patentes con las cuales esté relacionada esta declaración jurada.

Fecha: 14/2/2000

[Aparece una firma ilegible]

Forres McGraw

**ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES Y COMPOSICIONES MEJORADORAS
INMUNOMODULADORAS**

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

Esta invención en el campo de la biología celular, la psicología y la medicina se relaciona con las composiciones bioactivas que contienen una combinación de antígeno y anticuerpos heterólogos para producir una composición inmunomoduladora para el uso en el tratamiento de infecciones inmunosupresoras.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

Sin limitarnos al alcance de la invención, se describe su antecedente en relación con los virus, por ejemplo el SIV y el HIV.

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se reconoce como una epidemia en varias partes del mundo, incluyendo los Estados Unidos. El Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (HIV-1), un retrovirus, ha sido identificado como la causa etiológica de la enfermedad. El HIV-1 se identificó previamente como el Virus Linfotrópico de Célula T Tipo III (HTVL-III) y el Virus Asociado con Linfadenopatía (LAV). Hasta la fecha, se han identificado dos virus relacionados pero distintos HIV-2 y HIV-3. El HIV-2 está íntimamente relacionado con el Virus de Inmunodeficiencia Símica (SIV-mac), que causa

una enfermedad tipo SIDA en los macacos. Las alineaciones de las secuencias nucleótidas de HIV-2 y SIV revelan una homología considerable entre el HIV-2 y el SIC-mac. Estos dos virus comparten aproximadamente el 75% de la homología de la secuencia nucleótida total, pero los dos están relacionados de manera distante con el HIV-1 con aproximadamente un 40% de homología. Se han identificado subcepas de HIV-1, HIV-2 y HIV-3. Se han identificado todas las cepas y subcepas que se pueden referir de manera individual al HIV-1, HIV-2 y HIV-3. Se han identificado todas las cepas y subcepas que se pueden referir de manera individual al HIV-1, HIV-2 y HIV-3 y sus subcepas pueden causar inmunosupresión en los seres humanos.

Los grupos con alto riesgo de infección con HIV incluyen los hombres homosexuales y bisexuales y los que abusan del uso de drogas mediante inyección. Antes del advenimiento de los reactivos que hacían screening en gran escala para los anticuerpos de HIV disponibles, los grupos de alto riesgo incluían los receptores de transfusión de sangre entera. Otros grupos de alto riesgo fácil de predecir son las mujeres inseminadas artificialmente con esperma de donantes infectados, parejas sexuales de los infectados con HIV, receptores de órganos y fetos en las mujeres infectadas con HIV. La evidencia indica que el HIV se transmite heterosexualmente.

200

197

En la actualidad, las terapias en uso por lo general se limitan a regimenes diseñados para tratar las infecciones oportunistas y las neoplasias asociadas con el SIDA y sus enfermedades relacionadas y dirigirse al ciclo replicativo del virus. Sin embargo, existen muy pocos tratamientos disponibles que se vinculan con el HIV, la causa subyacente del SIDA, una enfermedad fatal. Entre las drogas antivirales y antirretrovirales conocidas, que se cree que simplemente disminuyen la replicación viral y que no curan la enfermedad, se encuentran la azidotimidina (AZT), interferón alfa, interferón gamma, azimexon e isopinosina.

Se han informado remisiones de algunos Sarcomas de Karposi después del tratamiento con alfa interferón, pero otras drogas antivirales no demostraron ser efectivas contra las infecciones del HIV. Los inmunomoduladores, tal como la cimetidina y la interleuquina-2, que se proponen para estimular las células T y la actividad natural de la célula asesina (killer), también han sido reportados como útiles en el tratamiento del SIDA. Se han hecho afirmaciones similares en relación con la indometacina, un antiinflamatorio e inhibidor de la prostaglandina. En resumen, los métodos actuales para tratar a los pacientes infectados con HIV, son pocos, y bastante ineficaces.

Además del HIV, una serie de enfermedades infecciosas son causadas por organismos patogénicos inmunosupresores. Estos

estados de la enfermedad con frecuencia están acompañados por otras infecciones y/o enfermedades oportunistas debido al sistema inmune comprometido de los pacientes afectados.

Existe nueva evidencia de que las nuevas epidemias emergen en todos los países desarrollados, en vías desarrollo y subdesarrollados del mundo. Por ejemplo, solamente en Sudáfrica, el daño causado por el HIV se confirma mediante el hallazgo de que más del 14% de sus casi 40 millones de ciudadanos están infectados con HIV. Para el año 2010, se supone que el índice de infección nacional en Sudáfrica alcanzará el 25%. En otras partes del mundo, se supone que la expectativa de vida de la población adulta disminuirá de 10 a 15 años para el año 2010. La devastación humana, el dolor, el sufrimiento y por último la muerte para las víctimas se están presentando en índices nunca vistos en la historia de la humanidad.

En la actualidad, los índices de casos reportados de infecciones de HIV están en aumento en proporciones geométricas y los tratamientos clínicos representan mejoras marginales en el manejo del cuidado de la salud en esta área. La rápida expansión de la infección HIV está fuera de control. A menos que se encuentren tratamientos mejorados, la perspectiva futura para el estado de la salud mundial es desconsoladora.

202

199

Además de los genes que codifican las proteínas estructurales (el virión cápside y las glicoproteínas de envoltura) y las enzimas requeridas para la síntesis proviral y la integración común a todos los retrovirus, el HIV y el SIV codifica genes que regulan la replicación del virus así como también genes que codifican proteínas de funciones aún desconocidas. La única diferencia notable en las organizaciones genéticas de HIV y SIV reside en el marco de lectura abierta referido como vpx, que está ausente en HIV-1 y vpu en HIV-1 pero no en HIV-2 y SIV. Estos virus son tanto trópicos como citopáticos para los linfocitos-T positivos CD4. Una gran cantidad de estudios han indicado que las células CD4 funcionan como una incubadora para la replicación viral.

Se ha observado cierto éxito terapéutico después del tratamiento con inmunoglobulina intravenosa en niños infectados con HIV (Clavelli, et al., Padiatr. Infec. Dis. 5SS207 (1986)). Se ha propuesto que este tratamiento puede ser particularmente beneficioso para los niños infectados con HIV. Estos niños exhiben una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas y virales debido a los efectos destructivos de la infección del HIV-1 y debido a que los lactantes poseen un sistema inmune inmaduro. Los anticuerpos específicos anti-HIV-1 pueden tener efectos protectores contra la infección. La administración pasiva de inmunoglobulina de pacientes asintomáticos HIV-1 positivos ha conducido a una

~~403~~

200

mejoría clínica temporaria en estos pacientes (Wendler, et al, AIDS Res. And Hum. Retroviruses 3:177 (1987) y Rank et al., Clin. Exp. Immunol. 69:231 (1987)). Otro estudio ha demostrado que los niños nacidos de madres con HIV-1 positivo tienen menor probabilidad de ser infectados con HIV-1 si poseen suero con alta actividad neutralizante (Broliden, et al.; AIDS 3:577 (1989)).

Estos estudios indican que la presencia de anticuerpos maternos pueden conferir protección cuando se pasan de una madre a un niño. Sin embargo, la transfusión de suero de individuos infectados con HIV-1, no es factible en larga escala desde un punto de vista logístico. Por otra parte, no es probable tener una amplia aplicación ya que se ha identificado una serie de subcepas que evadirían la inmunovigilancia.

Una fuente de inmunoglobulina protectora para los pacientes infectados con HIV-1 es de los pacientes que ya están infectados. El uso de antisueros humanos a partir de individuos infectados trae consigo el riesgo obvio de infección adicional para el paciente infectado y los profesionales que trabajan para el cuidado de la salud. Además, dicha inmunoglobulina puede contener partículas de virus que podrían ser infecciosas para las poblaciones tratadas, complicando de este modo la producción de antisueros si no finalmente también la terapia del paciente.

2004

201

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención expuesta se relaciona, en un aspecto, con composiciones farmacéuticas que contienen como principios activos de las mismas (1) anticuerpos heterólogos con un organismo patogénico, tal como un virus, bacterias, hongo, veneno, polen y similares, para los cuales los anticuerpos son específicos o para los cuales tienen una reacción cruzada; y (2) el antígeno para el cual los antígenos heterólogos son específicos o para los cuales tienen una reacción cruzada. Los anticuerpos reactivos o con reacción cruzada pueden ser policlonales o monoclonales. La presente invención se basa en el reconocimiento de que los anticuerpos naturales reaccionan o reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos heterólogos. Por anticuerpos heterólogos, se entiende que los anticuerpos derivan de una fuente diferente que el huésped o el sistema inmunológico objeto.

Como una ilustración de la producción de anticuerpos patogénicos reactivos, el suero policlonal anti-HIV se produce inmunizando un animal con lisato viral HIV, es decir, componentes purificados o semi-purificados de virus vivos o inactivados. De manera alternativa, el ADN aislado del virus HIV se puede usar para producir antígeno HIV mediante métodos recombinantes. Una variedad de animales se pueden inmunizar con tal lisato incluyendo ratones, conejos, caballos, vacas, burros, ovejas, cerdos, seres humanos, monos y primates

~~203~~

202

(incluyendo los seres humanos) para producir anticuerpos heterólogos. Cuando se cruzan las especies, se usa el término heterólogo ya que los anticuerpos son de una fuente diferente. La transferencia pasiva de anticuerpos xenogénicos se ha usado durante mucho tiempo en el caso de la madre y el hijo con Rh disímil en la forma de RhoGam®. El problema con la transferencia del anticuerpo xenogénico, sin embargo, es que el huésped puede desarrollar una fuerte respuesta inmune a los anticuerpos transferidos.

Históricamente, se reconoció específicamente que en los pacientes con sistemas inmunológicos normales, estaría contraindicado inmunizar con grandes proteínas extrañas, tal como complejos anticuerpo xenogénico-antígeno. En la mayoría de los casos, estaría contraindicado proporcionar inmunidad pasiva con anticuerpos xenogénicos, ya que se armaría una fuerte respuesta inmune normalmente contra esos anticuerpos. Sin embargo, debido a las similitudes entre el sistema inmunológico de la cabra y el sistema inmunológico del ser humano, la inoculación a un humano con un sistema inmunológico normal con anticuerpos de cabra no resultará en las reacciones severas del complejo inmune que habitualmente se anticipan con otras proteínas animales. La presente invención se basa en el reconocimiento de que los pacientes inmuno-suprimidos que deben recibir la inoculación de la presente invención no tienen sistema inmunológico normales. En realidad, las

composiciones y el método de la presente invención se diseñan para activar el sistema inmunológico huésped activando las respuestas naturales e inmuno adquiridas.

Los seres humanos, otros primates y las cabras se pueden usar para producir anticuerpos para uso en la presente invención, siendo la cabra un animal particularmente útil para este propósito. La discusión que sigue se centra en la cabra. El ingrediente anticuerpo presente en las composiciones bioactivas de esta invención puede ser de origen de cabra macho o hembra. En una realización de esta invención, los anticuerpos anti-HIV¹ se producen administrando a una cabra una proteína codificada HIV-1 en una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmune. La proteína codificada HIV-1 puede ser purificada de un lisato de células infectadas con HIV-1 o se pueden producir por métodos recombinantes.

Los anticuerpos de cabra producidos como se describen en la presente se pueden formular de acuerdo con esta invención en una composición para inhibir la replicación viral del sistema biológico in vitro o in vivo. La eficacia inhibitoria sugiere de manera razonable su administración como un inmunoterapéutico para los seres humanos infectados por el virus del HIV-1, o virus relacionados.

Más particularmente, la presente invención se dirige a una composición inmunoestimuladora o vacuna para estimular las respuestas inmunes en un huésped que incluye anticuerpos

~~207~~

204

heterólogos específicos para un antígeno. Los anticuerpos heterólogos forman un complejo con el antígeno. Además, el complejo anticuerpo heterólogo-antígeno puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable. En particular, las bases de la composición inmunoestimuladora se basan en la comprensión de que las vacunas y las terapias actuales no se dirigen a la inmunosupresión de los individuos afectados con un patógeno inmunosupresor. En realidad, la presente invención se basa en el reconocimiento contraintuitivo de que el paciente inmunosuprimido no puede armar una respuesta inmune específica usando inmunidad mediada por la célula T. Al proporcionar el antígeno específico que causa la enfermedad infecciosa en una forma letal o atenuada con anticuerpos heterólogos, el sistema inmune del huésped puede reconocer los anticuerpos heterólogos y armar una respuesta inmune que coordine tanto el anti-anticuerpo como la respuesta del antígeno del huésped.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para un entendimiento más completo de las características y ventajas de la presente invención, se hace ahora referencia a la descripción detallada junto con las figuras que la acompañan en la que los números correspondientes en las diferentes figuras se refieren a las partes correspondientes y en la que:

~~208~~

205

La FIGURA 1 es un gráfico que ilustra la inhibición de la infección SIV expresada como la cantidad de lugares de fusión en las células CEMx174 mediante varias diluciones de suero anti-SIV de la cabra con el transcurso del tiempo.

La FIGURA 2 es un gráfico que ilustra la inhibición de la infección SIV expresada como los lugares de fusión en las células CEMx174 mediante varias diluciones de suero anti-SIV de la cabra en el Día 2 posterior a la infección versus un control normal del suero; y

La FIGURA 3 es un gráfico que ilustra la inhibición de la infección SIV expresada como la cantidad de lugares de fusión en las células CEMx174 mediante diluciones 1:20 y 1:80 de suero anti-SIV de la cabra con el transcurso del tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Si bien la preparación y el uso de varias realizaciones de la presente invención se discuten con más detalle más adelante, se debe apreciar que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que se pueden llevar a cabo en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas discutidas en la presente son meramente ilustrativas de maneras específicas de preparar y usar la invención y no delimitar el alcance de la invención.

229

206

ACTIVIDAD HETERÓLOGA DEL ANTICUERPO DE REACCIÓN CRUZADA

Un animal inmunocompetente producirá una respuesta inmunológica a una proteína extraña. La respuesta inmunológica a la proteína extraña comprende de manera predecible tanto factores inmunes humorales (anticuerpo) como celulares (linfocito y fagocito). La respuesta humoral produce anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, IgM, IgG e IgA. Los anticuerpos producidos pueden ser de dos clases: (a) un anticuerpo neutralizante, es decir, un anticuerpo que no necesita el sistema complemento para la destrucción celular o viral; y (b) un anticuerpo que fije el complemento.

La práctica de usar vacunas como una técnica para adquirir inmunidad se originó por lo menos en 1700 cuando Edward Jenner reconoció por primera vez la correlación entre la viruela vacuna y la disminución de la virulencia virológica de la viruela en la población que ordeña las vacas.

En este histórico evento, en 1798, Jenner inoculó un virus de viruela vacuna vivo en un niño inmunológicamente sano, y con la subsecuente inoculación al niño con el virus de la viruela vivo, el niño no desarrolló viruela con riesgo de muerte. En este caso, la membrana externa del virus de la viruela vacuna fue tan similar al virus de la viruela que el sistema inmunológico del cuerpo no pudo contar los dos por separado; de este modo, los anticuerpos originados contra el

210

207

virus de la viruela vacuna administrados a un ser humano también podrían reaccionar contra el virus invasor de la viruela. Este método requirió la administración directa de un virus a los seres humanos, dicho virus es capaz de causar la enfermedad en bovinos pero no en seres humanos.

En la actualidad, se ha encontrado que la neutralización viral o la lisis bacteriana por los anticuerpos desarrollados en un mamífero con la exposición a un virus o bacterias, respectivamente, se puede administrar a otro mamífero para suministrar tratamiento para la supresión o prevención de infecciones causadas por la exposición directa al virus o bacterias.

Los animales superiores, por evolución, han establecido varios medios de defensa muy efectivos contra los microbios que involucran el sistema inmunológico. Las bacterias invasoras se identifican rápidamente, a través del complemento y la opsonización de la inmunoglobulina, fagocitada y destruida por el sistema inmunológico celular y los glóbulos blancos (neutrófilos y macrófagos). Las globulinas son esencialmente anticuerpos perfectos de la naturaleza. El complemento, disponible como una proteína precursora que se activa en presencia de microorganismos y globulinas, también funciona en actividades antibacterianas. La opsonización de organismos extraños en el componente de memoria del sistema inmunológico. Después de la exposición antigénica previa, el

24

208

sistema inmunológico produce una serie de globulinas que se unen y revisten a las bacterias o neutralizan los virus de modo que se pueden reconocer, fagocitar y destruir fácilmente mediante neutrófilos y macrófagos. Las proteínas extrañas de organismos invasores también estimulan una respuesta inmune hormonal que durante un período de tiempo (3-6 semanas) amplifica la cantidad de células diseñadas para reconocer y destruir invasores específicos. Las Tablas 1 y 2 presentan las funciones antimicrobianas de las inmunoglobulinas y las propiedades metabólicas de las inmunoglobulinas.

TABLA 1

FUNCIONES ANTIMICROBIANAS	
1	Lisis bacteriana (requiere complemento)
2	Opsonización (mejorada por complemento)
3	Neutralización de toxinas
4	Neutralización viral (se puede mejorar por complemento)
5	Media la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo (Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity, ADCC)
6	Actividad sinérgica con antibióticos

212

209

TABLA 2

PROPIEDADES METABÓLICAS DE INMUNOGLOBULINAS					
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Nivel de suero	989	200	100	3	0,008
Medias (mg/dl) (gama)	(600- 1600)	(60- 300)	(45- 150)		
Pool total del cuerpo	1030	210	36	1,1	0,01
Índice de síntesis	36	28	2,2	0,4	0,004
Vida media plasmática	21	5,9	5,1	2,8	2,4
Índice fraccional del recambio	6,9	24,0	10,6	37, 0	72,0
Fracción para cada clase en medias plasmáticas	0,52	0,55	0,74	0,7 5	0,51

La fracción representa la porción de las inmunoglobulinas totales de cada clase que se encuentra en el plasma de los seres humanos.

Las respuestas del huésped se inician sólo después de las sustancias extrañas, tal como bacterias, hongos, protozoos, parásitos o virus que ya han colonizado los tejidos y están comenzando a aumentar sus propias defensas (enmascaramiento del antígeno, replicación, biopelícula, toxinas). Las estrategias de la defensa del huésped necesitan tiempo para alcanzar las respuestas máximas. Durante este periodo de tiempo, se puede establecer una infección seria, especialmente

en pacientes inmunocomprometidos. La presencia de daño tisular y cuerpos extraños disminuye los umbrales de infección y disminuye las respuestas eficaces, de este modo, el agente extraño se neutraliza o reviste por anticuerpos de manera concurrente. La actividad complementaria optimizaría de manera sinérgica la eficacia antipatogénica de las composiciones bioactivas de esta invención.

Las bacterias contempladas dentro del alcance de esta invención incluyen *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Shigella Flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *Eschericia coli*, *vibrio cholera*, Grupo D-2, Grupo E, Grupo G, Grupo I, Grupo 1, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Mycobaterium*, *Actinomicetales* aeróbico patogénico, *Enterobacteriaceae* *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Helicobacter*, *W. succinogenes*, *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Mycoplasmas*, *Gardnerella*, *Streptobacillus*, *Spirillum*, *Calymmatobacterium*, *Clostridium*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, Bacterias Gram-negativa anaeróbicas incluyendo bacilos y cocos, bacilos y cocos gram-Positivo anaeróbicos, no formadores de esporas, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Germella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Branhamella*,

~~214~~

211

Coryne bacterium, Campylobacter, Arcanobacterium haemolyticum, Rhodococcus spp., Rhodococcus, Grupo A-4.

También están incluidas las bacterias resistentes o no resistentes seleccionadas del grupo que consiste esencialmente en Enterobacteriaceae, Klebsiella sp., Bacteroides sp., Enterococci, Proteus sp., Streptococcus sp., Staphylococcus sp., Pseudomonas sp., Neisseria sp., Peptostreptococcus sp., Fusobacterium sp., Actinomyces sp., Mycobacterium sp., Listeria sp., Corynebacterium sp., Propionibacterium sp., Actinobacillus sp., Aerobacter sp., Borrelia., Campylobacter sp., cytophaga sp., Pasteurella sp., Clostridium sp., Enterobacter aerogenes, Peptococcus sp., Proteus vulgaris, Proteus morganii, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Actinomyces sp., Campylobacter fetus, y Legionella pneumophila, cepa resistente a la ampicilina de S. aureus, y cepa resistente a la meticilina de S. aureus.

Los virus contemplados dentro del alcance de la presente invención incluyen hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus Varicela-Zoster, Rotavirus, virus de la poliomielitis, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del herpes simple tipo 1, retrovirus humanos, herpes simple tipo 2, virus Ebola, citomegalovirus, Virus del Herpes Simple, citomegalovirus Humano, Virus Varicela-Zoster, Poxvirus, virus de la Influenza, virus de la Parainfluenza, Virus Sincitial Respiratorio, Rinovirus, Coronavirus, Adenovirus, virus del

sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, Parvovirus Humanos, Arbovirus, virus de la rabia, Enterovirus, reovirus, virus que causan gastroenteritis, Virus de la Hepatitis, Filovirus, Arenavirus, Papilomavirus, Polimavirus, virus de Inmunodeficiencia Humana, Retrovirus Humanos, Encefalopatías Espongiformes, Esclerosis Lateral Amiotrófica, y Esclerosis Múltiple.

En la última década, las inmunoglobulinas intravenosas (intravenous immunoglobulins, IVIG) se han convertido en un regimen de tratamiento principal para las infecciones bacterianas y virales de los estados de inmunodeficiencia primarios y secundarios. Por ejemplo, Bucklye, et al., New Eng. J. Med. 325:110-117 (1991), describen el uso de inmunoglobulina intravenosa en el tratamiento de las enfermedades de inmunodeficiencia y Cometta, et al., New Eng. J. Med. 327:234-239 (1992), describen la administración intravenosa profiláctica de la inmunoglobulina estándar e inmunoglobulina lipopolisacárida núcleo en pacientes con un alto riesgo de infección postoperatoria. Las IVIG se preparan de los plasmas en pool de grandes cantidades de donantes, y tienden a tener una amplia representación de anticuerpos. Específicamente, las globulinas humanas polivalentes en pool generalmente contienen anticuerpos para los patógenos ubicuos tal como la H. influenza tipo b, pneumococos, estafilococos, difteria, tétanos, virus sincitial respiratorio (respiratory

216

213

syncital virus, RSV), sarampión, citomegalovirus (CMV), y virus varicela-zoster. Las concentraciones del anticuerpo de lote a lote y de fabricante a fabricante generalmente varían sólo dos o cuatro veces cuando se mide por ensayos de unión de anticuerpo. Sin embargo, los ensayos funcionales con frecuencia muestran variaciones de lote a lote mucho más grandes como lo hacen las concentraciones del anticuerpo a patógenos menos comunes (ver, Siber, et al., *"Use of immune globulins in the prevention and treatment of infections"*, Temas Clínicos Actuales en Enfermedades Infecciosas, Remington J S, Swartz MM, eds., Blackwell Scientific, Boston, 12:208-257 (1992).

Se ha informado que la terapia con IVIG es beneficiosa para más de las treinta y cinco producidas por los mecanismos inmunopatológicos. La inmunización pasiva depende de la presencia de títulos altos y consistentes de anticuerpos a los patógenos respectivos en cada preparación.

Las enfermedades nosocomiales derivan del ámbito hospitalario o clínico, y también constituyen un serio problema. Específicamente, las bacterias y los virus presentes en el hospital o en la clínica pueden infectar un paciente en recuperación y ponerlo en riesgo o prolongar el período de recuperación. Los factores de riesgo de un paciente para la infección nosocomial pueden ser intrínsecos, tal como la susceptibilidad a la infección debido a la inmunosupresión, o

217

214

extrínsecos, tal como las intervenciones médicas invasoras (por ejemplo, cirugía o uso de dispositivos médicos tal como catéteres, ventiladores, etc.)

Staphylococcus aureus es una importante causa de la infección nosocomial, especialmente neumonía nosocomial, infección de herida por cirugía e infecciones del flujo sanguíneo (Panlilio, et al., Infect. Cont. Hosp. Epidemiol. 13:582-586 (1992). Otros patógenos comúnmente asociados con la infección nosocomial incluyen, pero no se limitan a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus supp.*, *Enterobacter supp.*, estafilococos coagulasa-negativa (CNS), y *Candida albicans* (Emori, et al., Am. J. Med. 91: (Suppl 3B) 289S-293S (1991). Los hospitales y las clínicas por lo general emplean procedimientos estrictos de esterilización y usan antibióticos tales como meticilina, oxacilina, y nafcilinio para combatir los patógenos bacterianos virulentos. Sin embargo, las infecciones nosocomiales todavía ocurren en grandes cantidades y se supone que aumentarán con una población etaria.

El uso de inmunoglobulinas intravenosas para prevenir las infecciones nosocomiales se ha tratado en Siber, New Eng. J. Med. 327:269-271 (1992). La inmunización pasiva contra las infecciones ha sido particularmente satisfactoria con el uso de inmunoglobulinas que contienen anticuerpos específicos para el tétanos, hepatitis B, rabias, varicela, y CMV. Sin embargo,

278

215

se informa que existe un beneficio inconsistente a partir del uso de inmunoglobulinas intravenosas para prevenir las infecciones nosocomiales. Esto se puede deber a niveles variables de lote a lote de anticuerpos para los patógenos nosocomiales más comunes y la emergencia de nuevos serotipos.

La Patente de los Estados Unidos N° 4.412.990 a Lundblad, et al. revela una composición farmacéutica intravenosa que contiene inmunoglobulina (IgG) y fibronectina que exhibe una actividad opsónica sinérgica que resulta en la fagocitosis aumentada de bacterias, complejos inmunes y virus.

La Patente de los Estados Unidos N° 4.994.269 a Collins, et al. revela el uso tópico de anticuerpos monoclonales para la prevención y tratamiento de infecciones pulmonares experimentales de *P. aeruginosa*. Específicamente, los anticuerpos se administran a través de aerosol a los pulmones. Los resultados muestran efectos beneficiosos en el tratamiento de la neumonía por *Pseudomonas*.

La Patente de los Estados Unidos N° 4.714.612 a Nakamura, et al. revela el uso de una gamma globulina IgG no específica en un enjuague bucal para prevenir la gingivitis. Ma, et al., Arch. Oral Biol., 35 suppl: 115s-122s, 1990, revela el uso de anticuerpos monoclonales específicos para *Streptococcus mutans* en un enjuague bucal. Los experimentos mostraron individuos de control que experimentaron recolonización con *Streptococcus mutans* dentro de los dos días, pero aquellos

tratados con los anticuerpos monoclonales permanecieron libres de *Streptococcus mutans* durante hasta dos años.

La presente invención proporciona la distribución directa, concentrada, inyectada o por transfusión de la inmunidad pasiva a un antígeno específico y la redirección del sistema inmunológico huésped a la entidad antigénica. La presente invención proporciona nuevas composiciones que incluyen un repertorio completo de clases de inmunoglobulina (IgG, IgA, IgM) y métodos para la colocación profiláctica de las composiciones cuando las composiciones se aplican directamente a la sangre almacenada (banco de sangre), heridas, quemaduras, látex, caucho, tejidos (incluyendo la superficie interna y externa de la piel del cuerpo, cavidades, boca, sistema, etc.) y dispositivos biomateriales como productos en crema, gel, ungüento, vaginales y rectales, capa de revestimiento, o similares para prevenir y tratar infecciones de los microorganismos y virus.

La infección también se puede proporcionar como una vacuna biocompatible proporcionando el complejo inmunoglobulinas heterólogas-antígeno en una matriz biodegradable (tal como aquellas que son a base de ácido poli láctico) para proporcionar un amplio espectro de anticuerpos para los patógenos infecciosos específicos inmovilizados o encapsulados en el mismo. La invención facilita la liberación de tiempo predeterminado de las composiciones bioactivas de la presente

~~228~~

217

invención en el tratamiento de y para la prevención o inhibición sustancial de la replicación patogénica.

La invención también se puede usar para proporcionar un método para usar los antígenos inmunomoduladores atrapados y las composiciones de inmunoglobulina heteróloga en alta concentración, por medio del cual los retrovirus u otros organismos patogénicos inmunosupresores (virus, hongo, bacterias y/o protozoos y similares) causan infecciones oportunistas que se pre-opsonicen in situ para una mayor fagocitosis y muertes.

De acuerdo con la invención, la distribución directa, local concentrada de la inmunidad pasiva se logra aplicando una composición que tiene un completo repertorio de inmunoglobulinas (IgG, IgM, e IgA) a biomateriales, implantes, tejidos, y lugares con heridas y quemaduras. Las composiciones preferentemente tienen concentraciones elevadas de ciertas clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), y títulos elevados de anticuerpo para microorganismos específicos que comúnmente causan infecciones biomateriales, quemaduras, mucosa, tisular, herida por cirugía y cavidades del cuerpo. Las composiciones dentro de la práctica de esta invención pueden tomar varias formas, incluyendo cremas, geles, ungüentos, flúidos de lavado, atomizadores, pastillas, revestimientos, capas o cualquiera de la forma tópica de administración. Además, las composiciones se pueden combinar o

~~221~~

218

inmovilizar sobre un material biocompatible y/o biodegradable, o impregnarse en o encapsularse dentro de un material matriz polimérico biocompatible-biodegradable para liberación mantenida. Las composiciones se pueden usar tanto para la prevención como para el tratamiento de infecciones.

En las aplicaciones orales, las composiciones serían idealmente proporcionadas como una pastilla, enjuague bucal, o atomizador, mientras que en los pacientes con trauma, la composición se puede aplicar de mejor manera como una crema o ungüento, o como parte de una infusión líquida, implante biomaterial o dispositivo de fijación. Las inmunoglobulinas y otros anticuerpos de la presente composición se pueden inmovilizar sobre un material biocompatible y/o biodegradable o se pueden encapsular dentro de matriz/microesferas biodegradables-biocompatibles que se colocan in situ en el área infectada del paciente, el lugar de la herida o el área quirúrgica, o se pueden revestir sobre un catéter o similares que está inserto en una cavidad del cuerpo.

Cuando la inhibición de los organismos patogénicos inmunosupresores es sustancial, se reducirá la carga patógena (es decir, viral, bacteriana) y el potencial para la producción de toxinas por bacterias, virus, hongos u otros microbios será minimizado.

Al crear inmunidad humoral y celular en un mamífero no humano, la introducción de la IgA, IgG1 resultante, y/u otros

222

219

anticuerpos neutralizantes y otros anticuerpos inmunocompetentes y la actividad celular en o dentro de un sistema que contiene un virus, tal como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), evita la replicación del virus y hace que ese virus sea no infeccioso. Al hacer esto, la replicación viral se puede retardar, bloquear o detener por medio de la IgA, IgG1, otros anticuerpos neutralizantes y la acción inmune celular.

Un animal inmunocompetente produce anticuerpos en respuesta al virus de inmunodeficiencia simica (SIV), HIV y/u otros virus. Estos anticuerpos reaccionan con el virus en una reacción antígeno-anticuerpo. La respuesta normal para la producción de anticuerpo es para IgM que se produce primero, seguido por IgG. Los anticuerpos IgM e IgG no son capaces de activar o causar la biodestrucción de algunos virus, tal como el virus SIV o HIV. Se cree que la base para esta respuesta incompetente antígeno-anticuerpo es que el virus SIV/HIV produce intrínsecamente, a través de la síntesis viral o la síntesis de la célula huésped, un SIV, HIV o un factor de inhibición de complemento viral que previene la activación del sistema complemento, es decir, la destrucción viral. La respuesta incompetente antígeno-anticuerpo es en sí incapaz de activar el sistema complemento del cuerpo porque se conoce que los anticuerpos IgM e IgG son anticuerpos de fijación de complemento. De este modo, cuando se detecta la respuesta

incompetente antígeno-anticuerpo por medio de técnicas estándares, la respuesta incompetente antígeno-anticuerpo se puede eliminar o evitar como un factor de inhibición mediante el uso de anticuerpos que son de una clase de anticuerpos neutralizantes.

El uso de esta metodología de insertar en mamíferos virus para los cuales la IgM y la IgG pueden no activarse o causar la biodestrucción tal como SIV, HIV, virus de la Poliomelitis, Influenza, Hanta virus, poxvirus, virus de Encefalitis Caprina (CAE), virus del Herpes, Hepatitis, Encefalitis, sarampión, paperas, Ebola y/o Rubéola, los anticuerpos neutralizantes que contienen suero e inmunidad celular se pueden obtener naturalmente. Estos productos cuando se tratan y preparan de manera adecuada pueden producir como mínimo lo siguiente: (a) una vacuna adecuada para el uso en seres humanos; (b) una barrera inmunológica para la transmisión de virus a través de las superficies mucosas por medio de cremas, aerosoles, líquidos e hisopos; y (c) un suero para capturar más desarrollo viral.

Cada una de estas aplicaciones para inhibir o prevenir la proliferación de células anormales en sistemas biológicos (in vitro o in vivo) se basa en, pero no se limita al uso de anticuerpos producidos en mamíferos no humanos en un paciente o individuo que, al ser expuesto al SIV, HIV o virus similares, no muere sino que produce una reacción

22A

221

inmunológica. La reacción inmunológica del mamífero a la introducción del virus SIV y/o HIV produce anticuerpos que fijan el complemento y/o anticuerpos neutralizantes y también reacciones inmuno celulares que cuando se tratan de acuerdo con procedimientos aceptados dan la producción de una inmunoglobulina sérica que luego se puede usar para prevenir otra replicación del virus.

Se conoce que, en los procedimientos descritos en la presente, el SIV, HIV y su inmunoglobulina, en particular, la IgA, no afectan los huéspedes no humanos. Riet, Ivan, Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA (1991). Un huésped no humano que se puede usar para demostrar y desarrollar anticuerpos neutralizantes que contienen suero o leche e inmunidad celular es una cabra hembra preñada en estado avanzado. Se ha elegido a la cabra porque no muere por la infección con SIV o HIV y una hembra preñada produce grandes cantidades de anticuerpos neutralizantes que se pueden aislar del suero y/o la leche. No se necesita una cabra hembra preñada, ni una cabra hembra. Se prefiere una cabra hembra preñada con el fin de proporcionar un nivel más alto de producción como una fuente adicional de IgA, IgG1 y otros anticuerpos neutralizantes. También se pueden usar otros mamíferos no humanos para obtener los anticuerpos neutralizantes de interés, siempre que, cuando se expongan a SIV, HIV o virus similares, no mueran sino que

225

222

produzcan reacciones humorales y celulares. Aunque no es necesario, la reacción inmunológica del mamífero no humano también puede ser potenciada por el uso de un adyuvante apropiado.

El anticuerpo neutralizante se puede administrar a seres humanos ya sea por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular o como una vacuna preparada a partir del suero o la leche. Para las personas con sistemas digestivos inmaduros que son capaces de absorber anticuerpos o células que producen anticuerpos, tal como los lactantes recién nacidos, los anticuerpos neutralizantes también se pueden ingerir a través de la leche o un producto modificado de la leche.

Los virus de inmunodeficiencia simica (SIV) fueron originalmente aislados de los monos rhesus (*Macaca mulatta*) con inmunodeficiencia o linfoma (SIVmac). Posteriormente, los SIV fueron aislados de monos mangbey asintomáticos (SIV/ssm, SIV/smlv y SIV/Delta) y de *Macaca nemestrina* con linfoma (SIV/Mne). Una cepa de SIV que se cree que se obtiene de los monos verdes africanos recientemente ha mostrado ser SIVmac. Recientemente, un virus SIVagm auténtico fue aislado de los monos verdes africanos naturalmente infectados.

En las especies primate susceptibles, los SIV causan una enfermedad fatal cuyos síntomas son similares a los asociados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el virus de inmunodeficiencia tipo 1 (HIV-1) o tipo 2

226.

VB

(HIV-2) o tipo 3 (HIV-3). Las organizaciones genómicas de HIV-1, HIV-2, HIV-3 y SIVmac o SIVagm son muy similares, y existe aproximadamente 40% de relación secuencial entre SIVmac y HIV-2. Debido a estas similitudes entre HIV y SIV, el modelo macaco con SIV es adecuado para el desarrollo y el análisis de agentes bioactivos contra el SIDA humano in vitro.

EJEMPLO I

Preparación del Virus Concentrado de Inmunodeficiencia Símica (SIV)

Se preparó una cepa macrófaga-trópica de SIV (SIVmac239-17E) referida como "SIV-17E" haciendo crecer el virus en las células CEMx174. Sharma, et al., *"Derivation of neurotropic lymphocytotropic parental virus: pathogenesis of infection in macaques,"* J Virol 66:352-3556 (1992). La célula CEMx174 es una línea celular híbrida T/B humana inmortalizada con CD4 que es altamente susceptible a la citopaticidad inducida por SIV (fusión) y es permisiva para la replicación por SIVmac. Hoxie, et al., *"Biological characterization of a simian immunodeficiency virus-like retrovirus (HTLV-IV): Evidence for CD4-associated molecules required for infection,"* J. Virol 62:2557-2568 (1988). Koenig, et al., *"Selective infection of human CD4 + cells by simian immunodeficiency virus: productive infection associated with envelope glycoprotein induced fusion,"* Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:2443-2447 (1989).

27

224

Las células crecieron en un medio RPMI-1640 ("RPMI'1) complementado con suero bovino fetal 10%, glutamina y gentamicina, y se usaron para la preparación de virus stock y la valoración de la neutralización del virus. Los cultivos celulares (9 mililitros) se inocularon con 1 mililitro de virus (10^4 TCID 50/mililitro) y se examinaron para determinar la fusión celular. Cuando se ha usado aproximadamente el 50% de las células, los cultivos se expandieron mediante la adición de células nuevas. Los cultivos fueron controlados aún más para determinar la ineficacia mediante fusión y la transcriptasa inversa. Los fluidos sobrenadantes (aproximadamente 240 mililitros) se recolectaron y clarificaron mediante centrifugación. El stock contenía 10^4 TCID 50/mililitro en células CEMx174. El virus se sometió a pellet a 27.000 rpm en un rotor de SW28 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) durante dos horas a 4 grados Centígrados, resuspendido en dos mililitros de buffer NET (50 mM HCl, 5 mM ácido etilenodiaminotetraacético, 10 mM Tris clorhidrato, pH 7,4) y se purificó en una columna Sepharose CL-48 (Pharmacia Diagnostics, Inc., Fairfield, NJ).

EJEMPLO II

Neutralización del Virus SIV in Vitro

El anticuerpo o anticuerpos neutralizantes obtenidos de un mamífero no humano expuesto al virus SIV se examinaron para

~~228~~

225

determinar la actividad antiviral in vitro. El virus de inmunodeficiencia simica (SIV) se preparó de acuerdo con los procedimientos descriptos en el Ejemplo I. El virus se eliminó mediante calor en un baño de agua a 60°C durante treinta minutos. Se usó el virus muerto por motivos de seguridad; sin embargo, el uso de virus vivos resultará en una respuesta inmunogénica más rápida.

Una cabra hembra preñada se expuso al virus simico mediante inyección intramuscular. La cabra fue inyectada con un mililitro de suspensión de SIV muerto a partículas virales 1×10^6 por mililitro una vez por semana durante tres semanas. La respuesta inmunogénica de la cabra fue aumentada usando el Sistema Adyuvante MPL(R) (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH, INC.) + TDM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, es decir, la administración intramuscular del 500 ul en cada pata trasera.

Luego de la exposición de la cabra al virus SIV, se obtuvo el suero y/o la leche del animal. La leche se obtuvo de la cabra tan pronto como estuvo disponible, por lo general aproximadamente tres semanas después del nacimiento de la cría. La leche se congeló hasta el uso.

Para recolectar el suero, las muestras de sangre de al menos 10 cc se extrajeron de una vena grande después de la primera semana y de allí en adelante, semanalmente durante doce semanas. Cada muestra de suero se obtuvo mediante

229

226

centrifugación de la muestra de sangre, congelada para el transporte al laboratorio, y posteriormente analizada para determinar los anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes se detectaron por primera vez en aproximadamente la octava semana. Durante las semanas posteriores, las muestras se analizaron para controlar los cambios en la concentración del anticuerpo neutralizante, y la cantidad de anticuerpos detectados aumentó con el transcurso del tiempo. El suero puro, no tratado (sin concentrar los anticuerpos) obtenido de la muestra de sangre tomada en la semana doce se usó en los estudios de neutralización in vitro.

Se llevó a cabo el ensayo de neutralización para demostrar la capacidad de los anticuerpos neutralizantes y la inmunidad celular en el suero de cabra para prevenir la infección del virus SIV in vitro. El virus SIV-17E (100 TCID₅₀/mililitro) se incubó con diluciones dobles del suero de cabra a 37°C durante una hora. En una placa de cultivo tisular de 96 orificios, se agregaron 100 microlitros de cada SIV-17E/mezcla de suero de cabra a los orificios usando tres orificios por dilución. Aproximadamente 5×10^4 células CEMx174 se agregaron luego a cada orificio. Los cultivos se incubaron a 37 grados centígrados y se observaron para determinar la fusión durante un período de cinco días. La fusión se observó en cultivos de control dentro de un día. El título del

~~220~~

227

anticuerpo neutralizante se tomó como la dilución más alta de suero que evitó la fusión de la célula.

Los resultados del ensayo de neutralización se describen en la Tabla 3 y en la Fig. 1 se ilustra es el número promedio de lugares de fusión observados con el transcurso del tiempo para varias diluciones de suero anti-SIV de la cabra (Go-SIV), en comparación con el suero de cabra normal (NGS) como el control. La Fig. 2 presenta los datos de neutralización para el Día 2 después de la infección. La Fig. 3 ilustra la neutralización de infección SIV con el transcurso del tiempo por el suero anti-SIV de la cabra usado como una dilución 1/20 y 1/80. La Tabla 4 presenta los datos del ensayo de neutralización como un porcentaje de inhibición de lugares de fusión SIV mediante varias diluciones de suero anti-SIV de la cabra en el día 2 después de la infección.

Una dilución 1/20 del suero anti-SIV de la cabra inhibió casi por completo la infección SIV de las células CEMx174 (97,25 de inhibición). Las diluciones de 1/40 y 1/80 inhibieron 92,4% y 83,7%, respectivamente. Estos resultados indican que el suero anti-SIV de la cabra contiene potentes anticuerpos neutralizantes que se pueden usar para bloquear la ineficacia del virus SIV.

227

228

TABLA 3

NÚMERO PROMEDIO DE LUGARES DE FUSIÓN DURANTE EL TRANCURSO DEL TIEMPO PARA VARIAS DILUCIONES DE SUERO ANTI-SIV DE LA CABRA vs. EL CONTROL SALINO NORMAL		
DIL	NORMAL	ANTI-SIV
1/20	70	2
1/40	72,5	5,5
1/80	75	13
1/160	80	34
1/320	85	58
1/640	85	85

TABLA 4

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LUGARES DE FUSIÓN SIV POR DIFERENTES DILUCIONES DE SUERO DE ANTI-SIV DE LA CABRA (Día 2 después de la infección)		
	DILUCIÓN	INHIBICIÓN
1	1/20	97,2
2	1/40	92,4

232

229

3	1/80	83,7
4	1/160	57,5
5	1/320	31,7
6	1/640	0

Se puede producir una vacuna de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo II exponiendo en primer lugar las mismas o diferentes especies mamarias a un virus tal como el SIV o el HIV. El mamífero no humano preferido es la cabra. El anticuerpo o anticuerpos neutralizantes resultantes se extraen del suero o la leche del animal a través de métodos estándares tal como la precipitación de sulfato de amonio o sulfato de sodio y la metodología de centrifugación seguida de purificación por métodos tales como la diálisis o filtración por gel. Tijssen, P., *"Practice and theory of enzyme immunoassays,"* Técnicas de Laboratorio en Bioquímica y Biología Molecular, R.H. Burdon y P.H. van Knippenberg (eds.), Amsterdam: Elsevier Science Publishers, vol. 15, páginas 96-98 (1985).

Una vez que los anticuerpos neutralizantes son aislados, la colocación del anticuerpo o anticuerpos neutralizantes en presencia de los virus SIV y/o HIV vivos (Brooks, et al., *Medical Microbiology*, 19th ed., Appleton & Lange, East Norwalk, CN, página 150 (1991)) u otros virus dentro de una especie huésped hace que el SIV y/o células virales sean no

infecciosas e incapaces de producir replicación. Este proceso de usar anticuerpo o anticuerpos neutralizantes para atenuar el SIV, HIV u otros virus se refiere como una atenuación del anticuerpo de un virus para producir una vacuna, o "AAV2".

EJEMPLO III

Preparación y Uso de una Vacuna

El anticuerpo o anticuerpos neutralizantes se usan para atenuar el SIV, HIV, y otros virus para producir una vacuna. El virus del HIV se extrae de un donante humano que tiene diagnóstico de HIV+ y cuyo virus HIV se aísla y se divide en serotipos. (Bobkov, et al., "Identification of an env G subtype and heterogeneity of HIV-1 strains in the Russian Federation and Belarus," AIDS 8:1649-1655 (1994); Gao, et al., "Genetic Variation of HIV type 1 in Four World Health Organization-sponsored Vaccine Evaluation Sites: Generation of Functional Envelope (Glycoprotein 160) Clones representative of sequence subtypes A, B, C, and E," AIDS Res Hum Retroviruses 10:1359-1368 (1995); WHO Network para Aislación y Caracterización del HIV, "HIV Type 1 Variation in World Health Organization-sponsored Vaccine Evaluation Sites: Genetic Screening, Sequence Analysis, and Preliminary Biological Characterization of Selected Viral Strains," AIDS Res. Hum. Retrovirus 10:1327-1343 (1994); Delwart, et al., "Genetic relationships

23A

231

determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes," Science 262:1257-1261 (1993).

El virus del HIV de un donante humano luego se coloca o se inyecta en un mamífero no humano tal como la cabra. La inyección en la cabra produce una respuesta inmunológica en la forma de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes se extraen del suero o la leche del mamífero y luego se mezclan con el virus del HIV dividido en serotipos eliminado por calor, del donante humano para producir la vacuna viral anticuerpo atenuada, o AAV2.

La proporción de virus a anticuerpo requiere que el anticuerpo esté ligado a al menos un epítotope en cada partícula de virus pero que no todos los epítotope estén unidos. Se cree que la unión a un único anticuerpo neutralizante es suficiente para prevenir la fusión, y así, la virulencia se elimina mientras que se mantiene la inmunogenicidad. Para una combinación de anticuerpo(s) neutralizante(s) determinada, el ensayo de neutralización descrito en el Ejemplo II se puede llevar a cabo para determinar qué relación de anticuerpo neutralizante a virus resulta en una completa neutralización del virus. Luego, se prepara una vacuna usando una concentración de anticuerpo neutralizante de menos de lo que resultó de una completa neutralización tal como se determinó en el ensayo de neutralización.

235

232

El AAV2 se encuentra en la forma de un complejo HIV-IGA que mantiene la inmunogenicidad pero que neutraliza la virulencia. El AAV2 luego se devuelve, por lo general mediante inyección, al donante humano. La colocación del AAV2 en el donante humano produce una respuesta inmunológica competente que bloquea, previene o destruye el progreso o desarrollo del virus SIV y/o HIV en la enfermedad compleja del SIDA. Se observó que la IgA y otros anticuerpos se mezclan con el virus del donante humano en una cantidad efectiva de modo de permitir obtener y mantener la inmunogenicidad uniendo algunos pero no todos los epítopes virales, produciendo así una respuesta inmunológica diferente del virus principal pero aún logrando la neutralización del virus SIV/HIV haciéndolo un virus no infeccioso atenuado (AAV2). La unión de los epítopes activarán el complemento y destruirán virtualmente gran parte del complejo viral. Este proceso produce una vacuna, o AAV2, que, cuando se coloca en un cuerpo humano, rechaza la replicación viral permitiendo de este modo que el sistema inmunológico del cuerpo humano sea estimulado para aumentar su propia producción de anticuerpos competentes como un resultado de la estimulación AAV2. Este aumento de los anticuerpos competentes del cuerpo humano previene la producción adicional o replicación del virus SIV simio o HIV humano y el desarrollo de la enfermedad del complejo de SIDA.

Las tecnologías de vacunación modernas también son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, las vacunas ADN recombinantes se han producido para virus tales como cólera, herpes simple, HIV y hepatitis B. Estas vacunas proporcionan péptidos inmunogénicos seleccionados que también se pueden acoplar con adyuvantes. Las partículas inmunogénicas tipo virus (VLP) que comprenden proteínas del mismo tamaño y estructura que los virus pero sin el ADN o ARN viral se pueden producir uniendo genes extraños al gen Ty en la levadura.

Se encuentran también disponibles metodologías para producir vacunas de péptidos sintetizados químicamente que comprenden la estructura primaria de regiones antigénicas de un virus infeccioso. También conocidas en el arte se encuentran las vacunas idiotípicas preparadas por medio de la exposición de un huésped a un antígeno clásico, permitiendo que el huésped produzca anticuerpos (Ab-1) al antígeno, luego permitiendo que el huésped produzca anticuerpos (Ab-2) que posean determinantes antígenicos parecidos al antígeno original y demostrando una inmunogenicidad mejorada al mantener la estructura terciaria del antígeno. (Coleman, y otros, "Fundamental Immunology, 2da edición Wm C. Brown Publishers, 1992; Keeton, W.T. y Gould, J.L. Biological Science, W.W. Norton, 1993; Solomon, y otros, Biology, 3 edición, Saunders College Publishing, Harcourt Brace Jovanovich College

237

234

Publishers, 1983." Las vacunas de recombinación DNA , VLP, péptidos sintéticos, o vacunas idiotípicas, en lugar de virus vivos, pueden utilizarse en la presente invención para producir anticuerpos neutralizantes en el mamífero huésped.

Los péptidos sintéticos derivados de las secuencias de la región de complementación- determinante (CDR) de anticuerpos pueden fabricarse en serie in vitro, que son similares al anticuerpo intacto, inhibitorio a interacciones idiotipos-anti-idiotipos, antígenos específicos de ligazón, interactúan con receptores celulares y procesos biológicos de estimulación. (Taub y otros, J. Biol. Chem. 264--;259 (1989).; Bruck y otros, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos de Norteamérica 83:6578 (1986) Kang, y otros, Science 240:1034 (1988); Williams y otros , Proc Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos de Norteamérica 86:5537(1989); Novotny, y otros J. Mol. Biol. 189:715 (1986). A pesar de que estos análogos péptidos parecen tener un uso limitado in vivo debido a sus características proteínicas tales como insolubilidad en agua, alta inmunogenicidad, su habilidad para adoptar varias conformaciones, y sujetabilidad a proteólisis, es previsible que dichos péptidos sintéticos pueden utilizarse en la presente invención.

Es bien conocido en el arte que un anticuerpo monoclonal puede producirse en serie a través de una tecnología hibridoma para los propósitos de proporcionar económicamente grandes

cantidades de una vacuna. Los virus que neutralizan agentes en la forma de anticuerpos monoclonales pueden también utilizarse en la presente invención. En esta técnica, neutralizar los anticuerpos que producen células son fusionadas con células inmortales de un mieloma para producir las células hibridomas; las células hibridomas son proyectadas para la producción de anticuerpos; las células que producen el anticuerpo monoclonal deseado son luego cultivadas en grandes cantidades en cultivos de tejidos o reinyectadas en cavidades peritoneales de muchos ratones donde se multiplican las células y producen grandes cantidades de anticuerpos monoclonales en el fluido ascitis que es formado; el fluido ascitis que contiene el anticuerpo monoclonal es recogido; y el anticuerpo monoclonal es purificado por técnicas tales como cromatografía de afinidad o cromatografía de columna.

Se han desarrollado técnicas para la producción de componentes no péptidos referidos como miméticos que permiten la síntesis de una molécula restringida conformacionalmente que imita la propiedades funcionales y de unión de anticuerpos monoclonales. Las imitaciones son sintetizadas al determinar en un principio los residuos de contrato relevante y la conformación encargada de la unión anticuerpo-antígeno (Williams, y otros., J Biol Chem 266:5182 (1991); Segal, y otros., Proc Natl Acad Sci USA 71:4298 (1974); Amzel, y otros., Proc Natl Acad Sci USA 71:1427 (1974), de la Paz, y

otros., EMBO J 5:415 (1986); Kieber-Emmons, y otros, Int Rev Immunol 2:339 (1987) y luego sintetizar conformacionalmente los péptidos orgánicos cíclicos restringidos que posean el contacto de residuo requerido y la conformación (Kahn, y otros., J Mol Recognition 1:75 (1988); Kahn, y otros., J Am Chem Soc 110:1638 (1988). Dichas imitaciones pueden prepararse de anticuerpos neutralizantes producidos por huéspedes mamíferos de la presente invención y utilizados en tratamientos de infecciones virales.

Además, un anticuerpo neutralizantes aislado puede producirse en serie por técnicas de secuencia biomoleculares. El anticuaerpo neutralizante es secuenciado en primer lugar, y la secuencia es luego utilizada como una plantilla para la producción in vitro.

EJEMPLO IV

Barrera inmunológica y preventiva

Una barrera inmunológica para la transmisión o invasión de SIV, HIV u otro virus similar a través de las superficies mucosas pueden prepararse por medio de la utilización de leche y/o anticuerpos neutralizantes de suero extraídos como se describe en el Ejemplo II. Estos anticuerpos se desarrollan dentro de una barrera inmunológica pasiva en la forma de

~~240~~

237

cremas vaginales, cremas rectales, gotas para los ojos, pulverizadores bucales, muestras o inyecciones para aplicarse directamente en la mucosa o en el sitio donde pinche la aguja. Debe notarse que con el sexo oral, rectal o vaginal un preservativo de latex debe utilizarse concurrentemente para lograr el beneficio máximo pero no es necesario si suficiente crema o pulverizador es utilizado. El suero del mamífero es tratado con sulfato de amonio para precipitar los anticuerpos neutralizantes. Luego, los anticuerpos serán disueltos en una solución isotónica. Una vez disuelto, la solución es mantenida a o menos de los 4 grados centígrados hasta ser utilizada. Términos prolongados de almacenamiento, es decir, un exceso de treinta días, puede lograrse a temperaturas de -20° deg C.

A partir de entonces, los pulverizadores, geles, cremas gotas y aplicaciones similares pueden fabricarse utilizando tecnología de preservación y suspensión industrial aceptable. El uso de preservativo puede ser de aplicación manual de la preparación al interior del preservativo con anterioridad a su uso o por la aplicación previa del preservativo con anterioridad al empaquetamiento. El uso concurrente de la preparación en forma de una crema vaginal o pulverización es recomendada para mejorar la barrera de protección.

El número promedio de partículas vitales por mililitro de secreciones corporales por las cuales la barrera se pretende puede determinarse por medio de la medición del número para un

paciente en particular, o por una cantidad de pacientes. Una vez que se determina el número promedio, luego se puede obtener utilizando la Tabla 4 un número de neutralización teórica.

Un suero humano o un complejo de suero compuesto de anticuerpos neutralizantes obtenidos de un mamífero similar a, pero no limitado a, descrito en la presente para detener otras células o desarrollos virales dentro del cuerpo humano al comienzo puede desarrollarse para y contra un SIV específico, HIV y/u otros virus, o cepa/s mutadas de estos virus. El desarrollo del suero se aplica a humanos y otras especies. Los anticuerpos neutralizantes de mamíferos que han sido producidos como se describe en el Ejemplo II y que ha sido procesado y almacenado en solución como se describe en el Ejemplo III puede introducirse en los humanos que tengan el virus del HIV u otros virus bajo tratamiento. El suero es introducido, en una forma, de manera intravenosa, intramuscular, intradérmico o de manera subcutánea.

EJEMPLO V

Preparación y Uso de Suero o complejo de suero

Los anticuerpos neutralizantes de los mamíferos, que han sido producidos, precipitados y almacenados en solución como

se describe en los Ejemplos II y III anteriormente, pueden introducirse en los humanos que tengan el virus HIV u otros virus similares bajo tratamiento. El suero es preferiblemente introducido de manera subcutánea o IM, pero puede darse también de manera intravenosa con precaución.

Vacunas

La presente invención contempla vacunas para el uso en tanto realizaciones preferidas de inmunización pasivas como activas. Las composiciones inmunogenas, propuestas como adecuadas para el uso como vacuna, pueden prepararse más fácilmente diirectamente de complejo anticuerpo-antígeno heterólogo inmunogénico preparados en una manera revelada en la presente. Preferiblemente el material antígeno es dializado extensivamente para remover las moléculas en peso molecular pequeñas no deseadas y/o lipolizadas para una mas fácil formulación en un vehículo deseado.

La preparación de vacunas que contienen anticuerpo-antígeno heterólogo como ingrediente activo es generalmente bien entendido en el arte, como es ejemplificada en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792 y 4,578,770, incorporadas todas a la presente como referencia. Típicamente, tales vacunas son preparadas como inyectables. Ya sea en soluciones líquidas o suspensiones; formas sólidas para ser

disueltas , o en suspensión, líquidas con anterioridad a la inyección pueden también prepararse. La preparación puede también ser emulsionada. El ingrediente inmunogenico activo puede ser a veces mezclado con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y mezclas de los mismos. Los ejemplos de dichos portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, salina de fosfato tamponado o regulador de bicarbonato de sodio. Un número de portadores aceptables o diluyentes son conocidos.

Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades pequeñas de sustancias auxiliares tales como agentes emulsionantes o de remojo, agentes reguladores de pH o adjuvants que mejoran la efectividad de las vacunas.

Las vacunas pueden administrarse convencionalmente por los padres por medio de la inyección de anticuerpo-antígeno heterologos, por ejemplo de manera subcutánea o intramuscular. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluirse, por ejemplo, glicoles polialcalenos o triglicéridos. Dichos supositorios pueden formarse de mezclas que contienen ingrediente activo en el ámbito de 0,5% a 10% preferiblemente

24A

241

1-2%. Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes empleados normalmente como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, "starge", estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas formulaciones de liberación continua o polvos y contienen 10-95% de ingrediente activo , preferiblemente 25-70%.

El complejo anticuerpo-antígeno heterólogo puede formularse en la vacuna como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales con aditivos ácidos (formadas con anticuerpo-antígeno heterólogo) y aquellas que están formadas con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, ácidos fosfórico o hidroc্লóricos, o dichos ácidos orgánicos como acético, oxálico, tártrico mandelico, y similares. Las sales formadas con grupos carboxilos libres pueden también derivarse de bases inorgánicas tales como por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina y similares.

Las vacunas son administradas de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en dichas cantidades como será terapéuticamente efectiva e inmunogénicas. La cantidad a ser administrada depende del sujeto a ser tratado,

245

242

incluyendo por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseada. Las cantidades precisas de ingredientes activos requeridos a ser administrados dependen del juicio del examinador. Los ámbitos de dosificación adecuados son del orden de cientos de ingredientes activos de microgramos por vacunación. Los sistemas adecuados para la administración inicial y vacunas de refuerzo son también variables pero son tipificados por la administración inicial seguida de inoculación subsecuente y otras administraciones.

La manera de aplicación puede variar ampliamente. Cada uno de los métodos convencionales para la administración de una vacuna son aplicables. Se cree que entre estas se incluye la aplicación oral en una base aceptable fisiológicamente sólida o en una dispersión aceptable fisiológicamente, por inyección o similar. La dosificación de la vacuna dependerá de la ruta de administración y variará de acuerdo con el tamaño del huésped.

Varios métodos para lograr efectos adyacentes para la vacuna incluyen el uso de agentes tales como fosfato (alum) o aluminio hidrozido, comunmente utilizado como 0,05 a 0,1 por ciento de la solución salina reguladora de fosfato, mezclada con polímeros sintéticos de azúcar (Carbopol) utilizado como 0,25 por ciento de solución agregado de la proteína en la vacuna por el tratamiento de calor con temperaturas que van de

248

243

entre 70° a 101°C por un período de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. El agregado por la reactivación con anticuerpos (Fab) tratados con pepsina a albumina, mezcla con células bacterianas tales como C. parvum o endotoxinas o componentes lipopolisacáridos de bacteria gram-negativa, emulsión en vehículos aceitosos fisiológicamente aceptables tales como mono-oleato manida (Aracel A) o emulsión con una solución del 20 por ciento de perfluorocarbono (Fluosol-DA) utilizado como un sustituto de bloque sustituto de bloque puede también emplearse.

En muchas oportunidades, será deseable tener administraciones múltiples de la vacuna, normalmente que no excedan seis vacunaciones, más normalmente que no excedan las cuatro vacunaciones y preferiblemente una o más, normalmente por lo menos aproximadamente tres vacunaciones. Las vacunaciones normalmente serán de por lo menos con intervalos de entre dos a doce semanas, más normalmente con intervalos de tres a cinco semanas. Refuerzos periódicos en intervalos de 1-5 años, normalmente tres años. Será deseable mantener niveles de protección de los anticuerpos. El curso de la inmunización puede seguirse por ensayos para anticuerpos para antígenos "supernatant". Los ensayos pueden desarrollarse por medio de etiquetación con etiquetas convencionales, tales como radionucleótidos, enzimas, fluorescencia y similares. Estas técnicas son bien conocidas y pueden encontrarse en una

249
244

variedad amplia de patentes, tales como la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 3,791,932; 4,174,384; y 3,949,064, como ilustración de estos tipos de ensayos.

EJEMPLO VI

Usos agrícolas

Un mecanismo de cura o detención del virus encefalitis "caprine" (CAE) es revelado en la actualidad. Los principios descritos en la presente y los procesos establecidos en los Ejemplos II y III son también igualmente aplicables al virus CAE que afecta a las cabras u otros sistemas virales virulentos de la misma manera de los virus SIV y HIV hacen con los humanos. El mamífero de elección para la producción de anticuerpos es la hembra que produce leche. El uso de estos principios y técnicas establecidas anteriormente darán como resultado un programa que deberán en aplicaciones adecuadas eradicar el virus CAE de la manada de cabras.

Otro aspecto de la presente invención incluye el desarrollo de un procedimiento de diagnóstico in vitro para AIDS que incluye ubicar un suero u otro medio biológico de un paciente a ser diagnosticado en contacto con por lo menos una de las proteínas o glicoproteínas de SIV, HIV-1 o HIV-2, o con un "lysate" viral o extracto y luego detectar la reacción

inmunológica. Un método para implementar la presente invención incluye, por ejemplo, y ELISA en la cual las reacciones inmunoenzimáticas o materiales inmunofluorescentes son utilizados para detectar la presencia de un complejo inmunogenico. Los ensayos pueden ser medidas de inmunofluorescencia indirecta o directa o dosificaciones inmunoenzimáticas indirectas o directas.

Por lo tanto, la presente invención se aplica también a extracciones de virus etiquetados independientemente de que la etiquetación sea enzimática, fluorescente, radioactiva, etc. Dichos ensayos incluyen ilustrativamente: depositar cantidades de extracción específica o cantidades de proteínas de la presente invención en el pozo de un plato "microtiter"; introducir diluciones más altas y en aumento de suero a ser diagnosticado en estos "wells"; incubar el plato "microtiter"; cuidadosamente lavar el plato "microtiter" con un tampon adecuado; introducir anticuerpos que sean específicamente etiquetados con inmunoglobulinas humanas en "wells" del plato "microtiter", la etiquetación siendo llevada a cabo por una enzima seleccionada de aquellas capaces de hidrolizar un sustrato de la manera en que dicho sustrato alerte su radiación-absorción por lo menos dentro de una banda específica de longitud de onda; y detectar, preferiblemente de un modo comparativo con respecto a un control, la cantidad de hidrolisis de sustrato ambos respecto de la medición de daño

potencial y cualquier presencia actual de enfermedad.

Otro aspecto de la presente invención son los "kits" para el procedimiento de diagnóstico. Estos "Kits" incluyen: un extracto o fracción más purificada de los tipos de virus antes descritos, donde este extracto o fracción es etiquetada, por ejemplo, radioactividad, enzimáticamente o por inmunofluorescencia; anti-inmunoglobulinas humanas o una proteína A (ventajosamente fijada en un soporte no soluble en agua tales como gotas Agarose); un extracto de linfocitos obtenidos de una persona saludable como un control; reguladores, y donde se exigen sustratos para visualizar las etiquetas.

Adicionalmente, la vacuna o modulador inmune puede utilizarse en una variedad de formas para mejorar la respuesta inmune de un individuo que ha sido infectado de HIV de las siguiente formas:

- I. Como una crema tópica contra el sarcoma del HIV asociado al Kaposi.
- II. En una solución intravenosa tales como salina puede ser efectiva en reducir la carga viral y disminuir el comienzo de la inmunodeficiencia. Los cirujanos que utilizan también lavados de salina al lavar un área en particular en el campo de la operación puede encontrarla útil. Pude incluirse especialmente el uso de

anticuerpo-antígeno heterólogo así como también la liposomalización. Estas formas podrían reconstituirse en la forma de enjuague bucal con anticuerpo antígeno heterólogo solo o junto con reagentes antifúngicos. Una forma de inhalador sola o junto con una pentamidina. El uso de anticuerpo-antígeno heterólogo en forma de tableta puede tomarse oralmente.

III. Solución controladora oftálmica-- para pacientes que sufren de retinitis asociada al HIV . El regulador es necesario debido a los cambios de pH que puede causar el anticuerpo-antígeno heterólogo.

IV. La solución altamente concentrada para la inyección intramuscular-facilitaría el tratamiento de daños por pinchazos de agujas de trabajadores del cuidado de salud. En este sentido, el uso de DMSO como solvente proporcionaría una penetración extremadamente rápida entregando concentraciones altas de anticuerpo antígeno heterólogo en áreas pequeñas.

V. La forma supositorio- para la quimoprevención en homosexuales debido a que los lugares

principales de infección son el recto e el intestino grueso.

- VI. Quimo-preventivo ducha vaginal y crema. La ducha puede ser de uso en la exposición previa al sexo en una solución ácida acética estándar. La crema puede mezclarse con 9-nonoxinol espermicida para usar junto con el control de natalidad.
- VII. La crema descrita en VI puede usarse también en preservativos.
- VIII. Lavados vaginales con esponjas- esto puede utilizarse por las prostitutas de manera tal que el anticuerpo-antígeno heterólogo se pueda liberar luego de varias horas con nonoxinol -9.
- IX. Guantes cubiertos de anticuerpo antígeno heterólogo pueden ser útiles para los cirujanos y otros trabajadores del cuidado social que tratan con fluidos corporales y sangre.
- X. El uso de anticuerpo-antígeno heterólogo en jabones líquidos en combinación con agentes antibacterianos pueden también ser útiles en hospitales e instituciones de investigación. A pesar de que esto no sería probablemente más efectivo que el jabón anti bacteriano los empleados y empresas de aseguradoras de hospitales lo agradecerían.

XI. El adjunto de anticuerpos heterologos a resina HPLC estéril (por ejemplo SiO_2 -péptido o Si (péptido)₄, etc) a ser utilizados como filtro desechable para sangre y derivados de la sangre con anterioridad a la transfusión de pacientes. Esto es para asegurar que el donante no se encuentra en la ventana "seroconversion" seroconversión.

Las composiciones acuosas (inócula) de solución anticuerpo heterologo como se describe en la presente y que incluye una cantidad efectiva de complejo anticuerpo-antigeno heterologo disuelto o disperso en un medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente, los términos "contacto", "contactado" y "contactante" son utilizados para describir el proceso por el cual una viene una cantidad efectiva de un agente farmacológico por ejemplo, complejo anticuerpo-antigeno heterologo puro o diluto, en yuxtaposición directa con la célula objetivo. La frase " farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o similar al administrarse a un humano, tales como anticuerpo-antigena heterologo como se describe en al presente.

La rpeapración de una composición acuosa que contiene una proteina o proteoglicano, tales como componentes activos

250

derivados de complejos anticuerpo-antígeno heterólogo es bien comprendida en el arte. Típicamente, tales composiciones son preparadas como inyectables, ya sea en soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para la disolución, o suspensión, líquidos con anterioridad a la inyección pueden también prepararse. La preparación puede también emulsionarse.

Los proteoglicanos, por ejemplo, puede formularse de composiciones en una forma salina o neutral. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales con agregados ácidos (formadas con grupos de amino libres de la proteína) y son formados con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, hidrocórico o ácidos fosfóricos, o dichos ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con grupos carboxilos libres pueden derivarse también de bases inorgánicas tales como por ejemplo sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

Al formularse, las soluciones se administrarán de la manera compatible con la formulación en dosificación y de tales cantidades como sean terapéuticamente efectivas. Las formulaciones son administradas fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de droga y similares.

~~251~~ 251

Para la administración parenteral en una solución acuosa, el complejo anticuerpo-antígeno heterólogo puede ser utilizado directamente sin cualquier efecto tóxico para el animal. Alternativamente, el complejo anticuerpo-antígeno heterólogo y la solución portadora puede disolverse o resuspenderse en un regulador adecuado, si fuera necesario. Los diluyentes líquidos pueden primero proporcionarse de isotónico con salina o glucosa suficiente.

Mientras estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular subcutánea e intraperitoneal, la solución portadora anticuerpo-antígeno heterólogo de la presente invención puede administrarse directamente en una concentración completa. En esta relación, los procedimientos acuosos estériles para producir portador anticuerpo-antígeno heterólogo pueden emplearse, como conocerán aquellos expertos en el arte a la luz de la revelación de la presente. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 mL de isotónica solución NaCl y agregarse a 1000 mL de fluido hipodermoclisis o inyectarse al sitio propuesto de infusión (ver por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15 edición páginas 1035-1038 y 1570-1580). alguna variación en dosificación necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, determinará en cualquier

255 252

momento la dosificación apropiada para el sujeto en particular. Además, para la administración humana, las preparaciones deben tener esterilidad pirogenicidad, seguridad general y estándares de pureza como se requiere en la Oficina FDA de Estándar Biológicos.

Mientras que esta invención ha sido descubierta en referencia a realizaciones preferidas ilustrativas, esta descripción no pretende interpretarla en un sentido limitativo. Varias modificaciones y combinaciones de realizaciones preferidas ilustrativas, así como también otras realizaciones preferidas de la invención serán obvias para las personas expertas en el arte al referirse a la descripción. Se pretende por lo tanto que las reivindicaciones mencionadas comprendan cualquiera de las demás realizaciones preferidas o modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunomodulatoria caracterizada porque comprende:
anticuerpos heterologos específicos para un antígeno; y
un antígeno, donde los anticuerops heterologos forman un
complejo con el antígeno para cominar con un portador
aceptable farmacéuticamente.
2. la composición de la reivindicación 1, que comprende
además un portador farmacéuticamente aceptable.
3. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque
los anticueros heterologos son policlonales.
4. La composición de la reivindicación 1, caracterizada proque
los anticuerpos heterologos son monoclonales.
5. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque
los anticuerpos heterologos se crían en una cabra.
6. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque
los anticuepros heterologos son anticuerpos antiretrovirus
de las cabras

7. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque los anticuerpos heterologos son anticuerpos policlonales ue se crían en una cabra embarazada y se asilan de la leche de la cabra.
8. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un virus inmunosupresivo humano muerto caliente .
9. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un virus inmunosupresivo "símico" muerto caliente.
10. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.
11. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el portador es un regulador de salina.
12. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo atenuado.
13. La composición de la reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno es aislado del paciente a ser tratado con la

composición y los anticuerpos heterologos se crían contra aquella aislación específica

14. Una vacuna para estimular respuestas inmunes en un huésped inmunosupresivo que comprende:
anticuerpos heterologos específicos para un antígeno;
un antígeno, caracterizado porque los anticuerpos heterologos forman un complejo con el antígeno; y
un portador farmacéuticamente aceptable.
15. la composición de la reivindicación 14, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
16. La composición de la reivindicación 14, donde los anticuerpos heterologos son policlonales
17. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterologos son monoclonales.
18. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterologos se crían en una cabra.
19. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterologos son anticuerpos antiretrovirus de cabras.

20. La composición ed la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterologos son anticuerpos policlonales criados en una cabra embaraada y aislados de la leche ddela cabra
21. La composición de la reivindicación 14, caracterizados porque el antígeno es un virus inmunosupresivo humano muerto calinte.
22. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno es un virus "símico" inmunosupresivo muerto.
23. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.
24. La composición de la reivindicación 1, caracterizxada porque el portador es una salina regulada.
25. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo atenuado.
26. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno esta aislado del paciente a ser tratado

260 257

con la composición y los anticuerpos heterologos se crían contra aquel aislamiento específico.

27. Un método para vacunar a un huésped contra un patógeno inmunosupresivo, cuyo método comprende la administración de dicho huésped de una cantidad efectiva de antígeno atenuado de un patógeno inmunosupresivo y anticuerpos heterologos como se define en la reivindicación 1.
28. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son policlonales.
29. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterologos son monoclonales.
30. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterologos se crían en una cabra.
31. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterologos son anticuerpos antiretrovirus de cabra.
32. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterologos son anticuerpos policlonales

criados en cabras embarazadas y se aíslan de la leche de cabra.

33. El método de la reivindicación 28, caracterizado porque el antígeno es un virus inmunosupresivo humano caliente muerto.

34. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno es un virus "símico" inmunosupresivo muerto caliente.

35. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.

37. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el portador es una salina reguladora.

38. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo atenuado.

39. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno se encuentra aislado del paciente a ser tratado con la composición y los anticuerpos heterólogos son criados contra ese aislamiento específicos.

267

259

40. Un método de inmunomodulación caracterizado por comprender los pasos:

aislar un agente inmunosupresivo etiológico de un huésped inmune suprimido ; purificando el agente etiológico inmunosupresivo;

inocular un animal a través de barreras de especies con agente purificado etiológico inmunosupresivo;

purificar anticuerpos xenotípicos del animal específico al agente etiológico inmunosupresivo; y

mezclar un agente etiológico inmunosupresivo inactivado con los anticuerpos purificados xenotípicos para producir el inoculante.

41. El método de la reivindicación 40, que comprende además el paso de inocular el huésped suprimido inmune con el inoculante.

42. El método de la reivindicación 40, caracterizados porque los anticuerpos heterólogos son policlonales.

43. El método de la reivindicación 40, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son criados en una cabra.

44. El método de la reivindicación 40, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos anti-retrovirus de cabra.

45. El método de la reivindicación 40, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos policlonales criados en una cabra embarazada y se asilan de la leche de la cabra.

46. El método de la reivindicación 40, caracterizada porque el agente etiológico inmunosupresivo es un virus inmunosupresivo humano muerto caliente.

47. El método de la reivindicación 40, caracterizado porque el agente etiológico inmunosupresivo es un virus inmunosupresivo simio muerto caliente.

48. El método de la reivindicación 40, caracterizado porque el agente etiológico inmunosupresivo es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.

COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES DE
ANTICUERPOS

RESUMEN DE LA INVENCION

Una composición y método para la modulación inmune de infecciones patogénicas es revelada. Más particularmente es revelada una composición y método para mejorar la habilidad para responder de los mamíferos, por ejemplo, patógenos inmunosupresivos, en la cual un antígeno objetivo es mezclado con una antisera heteróloga específica o un reactivo transversal a aquel antígeno para producir un inoculante. El inoculante es utilizado para causar respuestas inmunes específicas y naturales a los anticuerpos heterólogos para mejorar la fijación de complemento y respuestas celulares y humorales específicas.

265 262

PATENTE

Archivo de Apoderado N°: 122963-1

DECLARACIÓN JURADA

En mi carácter de inventor mencionado a continuación, declaro que:

Mi domicilio real, domicilio legal y nacionalidad son los indicados a continuación junto a mi firma.

A mi leal saber y entender soy el primer inventor único y original (si a continuación aparece un solo nombre) o un primer inventor original y conjunto (si aparecen varios nombres) del objeto reivindicado y para el cual se solicita el otorgamiento de patente sobre el invento denominado: COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS cuya memoria descriptiva

[x] se adjunta a la presente.

___ Se presentó el [en blanco] como Solicitud Acta N° [en blanco].

Por la presente declaro que he revisado y comprendo el contenido de la memoria descriptiva identificada más arriba,

~~266~~
263

incluyendo las reivindicaciones, y sus modificaciones indicadas más arriba.

Reconozco mi obligación de revelar toda información que sea relevante para el examen de esta solicitud conforme al Título 37, Código de Disposiciones Federales, Art. 1.56(a).

Por la presente reivindico los beneficios de prioridad extranjera conforme al Título 35, Código de Estados Unidos de Norteamérica, Art. 119, de toda solicitud de patente extranjera o certificación del inventor mencionado más abajo y asimismo he identificado más abajo toda solicitud de patente extranjera o certificación de inventor que tenga fecha de presentación anterior a la de la solicitud de la que se reivindica prioridad:

267 264

Solicitudes Extranjeras anteriores:

			Prioridad
			Reivindicada
			Sí/No
(Número)	(País)	(Fecha de Presentación)	
			Sí/No
(Número)	(País)	(Fecha de Presentación)	

Por la presente reivindico los beneficios de prioridad extranjera conforme al Título 35, Código de Estados Unidos de Norteamérica, Art. 119(e), de toda solicitud de patente provisoria estadounidense mencionado más abajo:

NINGUNA

Por la presente reivindico los beneficios de prioridad conforme al Título 35, Código de Estados Unidos, Artículo 120, de toda solicitud de los Estados Unidos que figure a continuación, en la medida en que el objeto de cada una de las reivindicaciones de esta solicitud no se revele en solicitudes estadounidenses anteriores en la forma prevista en el inciso primero del Título 35 del Código de Estados Unidos, Artículo 112. Reconozco mi obligación de revelar toda información que, conforme a la definición del Título 37, Código de Disposiciones Federales, Art. 1.56(a), sea relevante para el examen de esta solicitud y que haya surgido entre la fecha de

268 265

presentación de la solicitud anterior y la fecha de presentación nacional o internacional de PCT de esta solicitud.

(Solicitud Acta N°)	(Fecha de presentación)	(Estado)
---------------------	-------------------------	----------

(Solicitud Acta N°)	(Fecha de presentación)	(Estado)
---------------------	-------------------------	----------

Por la presente solicito que toda la correspondencia y llamadas telefónicas se dirijan a Daniel F. Pérez, Gardere & Wynne, L.L.P., 1601 Elm Street, Suite 3000, Dallas, Texas 75201-4761, (214)999-3000.

Por la presente declaro que todos los dichos de la presente son a mi entender verdaderos y que todas las declaraciones prestadas con respecto a las informaciones son a mi leal saber y entender auténticas; y asimismo que dichas declaraciones fueron prestadas sabiendo que el falso testimonio doloso es punible con pena de prisión o multa o ambas conforme al Art. 1001 del Título 18 del Código de Estados Unidos y que dicho falso testimonio doloso puede poner en peligro la validez de la solicitud o de la patente otorgada en ella.

Nombre completo del inventor: (Nombre) Gary (Inicial) R.
(Apellido) Davis

269 266

Firma del inventor: [ilegible]

Fecha de la firma: [en blanco]

Nacionalidad: Estados Unidos

Residencia: (Incluir calle, número, ciudad, estado y país)

201 East Marshall Place, Tulsa, Oklahoma 74106

Domicilio para correspondencia: (Si es diferente de la
residencia): [aparece un espacio en blanco]

CERTIFICO QUE LA QUE ANTECEDE ES TRADUCCION FIEL AL ESPAÑOL
DEL DOCUMENTO ORIGINAL REDACTADO EN IDIOMA INGLES QUE TUVE A
MI VISTA Y AL CUAL ME REMITO EN BUENOS AIRES A LOS ONCE DÍAS
DEL MES DE MAYO DE DOS MIL UNO.-

270

267

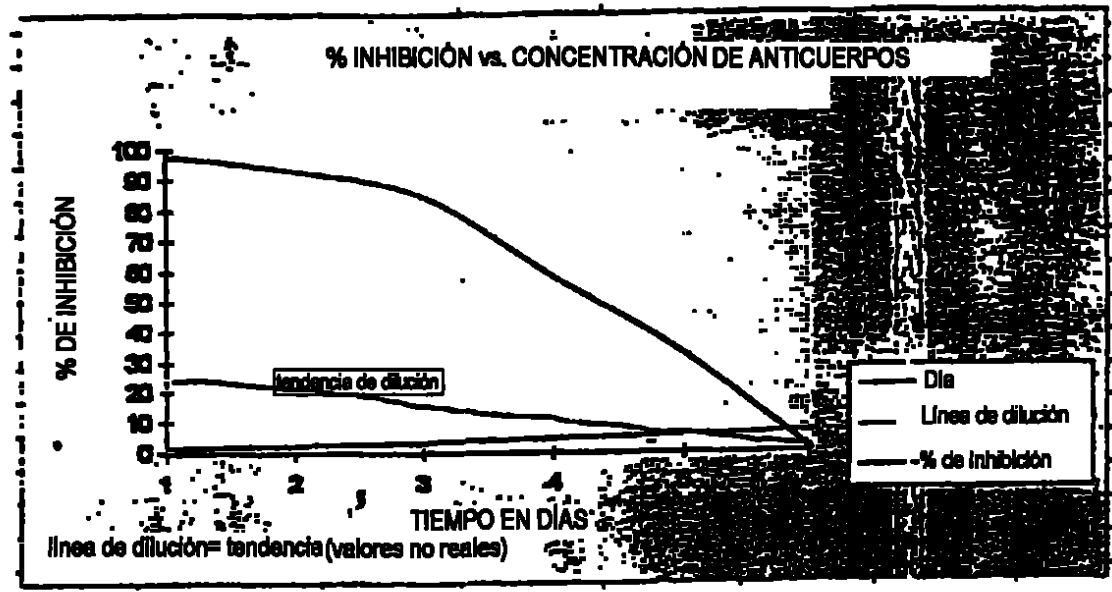


FIG. 1

272

268

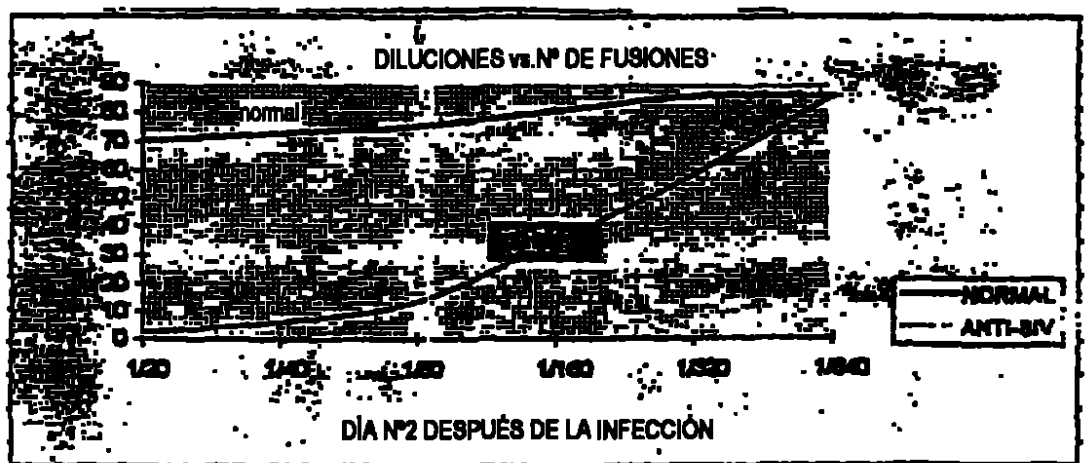


FIG. 2

273

269



FIG. 3

RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
- Abogado -

MARIA ANGELICA RODRIGUEZ B.
Abogada

CARLOS ENRIQUE TAIAYO S.
Ingeniero Industrial

SANDRA CARDENAS
Química Farmacéutica



Rodriguez Madrid & Asociados

NTT. 830.038.010-1

274

270

PATENTES

MARCAS

DISEÑOS DE AUTOR

LICENCIAS DE USO

SOFTWARE

REGISTROS SANITARIOS

NOMBRES DE DOMINIO

PATENTS

TRADEMARKS

COPYRIGHTS

LICENSING

SOFTWARE PROTECTION

SANITARY PERMITS

DOMAIN NAME

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Radicación : 01811534 00000004

Folios: 2

Fecha (AMD): 2001-06-29 17:03:42

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 467 SOLICITUD

Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF :EXPEDIENTE No. 001-011534

TITULO : COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y
NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS".

Estimados señores :

En atención a su Requerimiento con Oficio No. 1246 para completar la documentación del expediente citado en la referencia, ruego a usted prorrogar por dos meses más, el plazo establecido para cumplir con este trámite, previo el pago de las tasas correspondientes, con el fin de que el proceso siga su curso normal.

Esta solicitud la hago con base en el Artículo No. 39 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones C.A.N.

Anticipadamente agradezco su atención.

Atentamente,


RODOLFO RODRIGUEZ MADRID
C.C. No. 3'792.584-Cartagena
T.P. No. 59.363 del C.S.J.

Apxo.- Recibo de Pago Tasas Oficiales.

Transversal 6a. No. 27-10 * Edificio Antares - Port House * Teléfono: 383 09 42 * Tel.: 334 72 84 - 341 70 03
E-mail: rodriguezmadrid@cable.net.co * Bogotá, D. C.

275



271

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800276089-2

Radicación : 01011534 00000004 Folios: 2
Fecha (CPE): 2001-06-20 17:03:02
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 467 SOLICITUD
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 38,180
FECHA : JUNIO 19 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JUAN P. SEPULVEDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3731544	19/06/2001	66,076.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	54,000.00
		TOTAL :	\$ 54,000.00

SOM: CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia