

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



01 11634

Superindustria y Comercio
Radicación : 01011534 00000000 Folios: 107
Fecha (GMD): 2001-02-14 17:00:11
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.			
2 SOLICITANTE (70)	Nombre: NOSTRUM BIOTECHNOLOGY, INC. Dirección: Bahamas Financial Center 4th Floor, Shirley & Charlotte Street, P.O. Box CB-13136 Teléfono: Fax: E-mail: Domicilio: NASSAU, BAHAMAS	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número:	
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: RODOLFO RODRIGUEZ MADRID Dirección: Transv. 6 #27-10 Pent-House Teléfono: 3-417003 Fax: 2-830942 E-mail: rodriguezaso@cable.net.co	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: 3792584 TP59363	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: DAVIS, GARY R. Dirección: 1715 E. Monhawk Blvd. Tulsa, OK. 74110 EE.UU. Teléfono: Fax: E-mail: Domicilio: Tulsa, OK, EE.UU.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número:	
5 Título (54) COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS.			
6 Clasificación Internacional (51) A61K 45/05, 39/395			
7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen EE.UU. _____ _____	(32) Fecha 14.Feb/2000 _____ _____	(31) Número de Solicitud 60/182.428 _____ _____
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los: 6 meses ☒ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No. 01-8.921-y Fecha Feb. 14/2001			

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

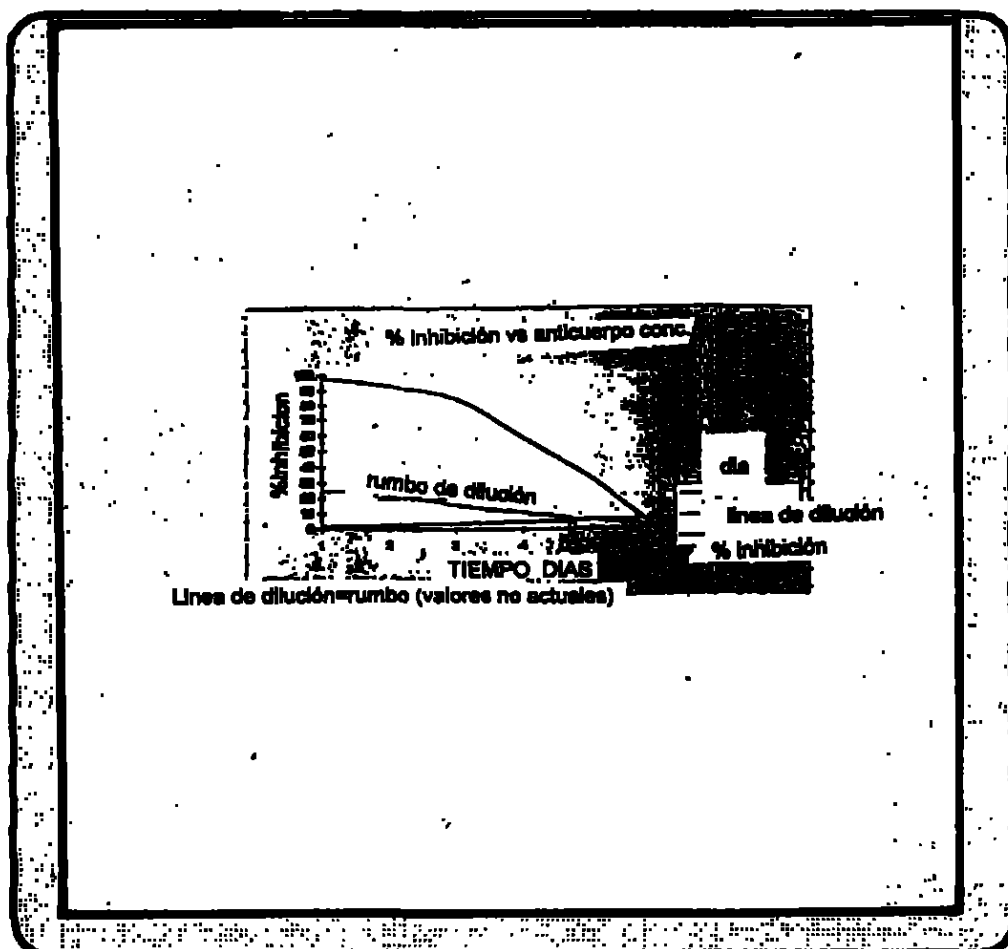
10

ANEXOS

2.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Descripción de la invención.
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

NOMBRE: RODOLFO RODRIGUEZ MADRID

FIRMA:

C.C. 31792.584 TP. 59.363-C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS

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 Simiana (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 espermatozoides 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 heteroséxualmente.

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.

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., *Pediatr. Infec. Dis.* 5:552-557 (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 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.

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 (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 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:

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.

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 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 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

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	0,75	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 período 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, Enteroccus, Streptococcus, Aerococcus, Planococcus, Stomatococcus, Micrococcus, Lactococcus, Germella, Pediococcus, Leuconostoc, Bacillus, Neisseria, Branhamella, 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 poliomelitis, 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 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 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 inmonoglobulinas 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, 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 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-opsonean 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, fluidos de lavado, atomizadores, pastillas, revestimientos, capas o cualquiera de la forma tópica de administración. Además, las composiciones se pueden combinar o 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 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 simiana (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 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. Riot, 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 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 simiana (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 (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 Simiana

(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).

Las células crecieron en un medio RPMI-1640 ("RPMI'l) 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 TCID₅₀/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 determinar la actividad antiviral in vitro. El virus de inmunodeficiencia simiana (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 simiano 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 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 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.

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

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 descriptos 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 Laboratotio 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 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 epítotos 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.

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

simiano 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
5 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
10 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 Publishers, 1983." Las vacunas de
recombinación DNA , VLP, péptidos sintéticos, o vacunas
idiotípicas, en lugar de virus vivos, pueden utilizarse en la
5 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
10 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
15 (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 en vivo debido a sus características
proteínáceas tales como insolubilidad en agua, alta
20 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 contracto 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
 5 (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
 10 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 anticuerpo
 15 neutralizante es secuenciado en primer lugar, y la secuencia es luego utilizada como una plantilla para la producción in vitro.

EJEMPLO IV

20 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
 25 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 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
5 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.
10 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
15 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
20 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
25 determinarse por medio de la medición del número para un paciente en particular, o por una cantidad de pacientes. Una vez que se

~~19.~~
47

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

20

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

- 5 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 directamente de complejo anticuerpo-antígeno
- 10 heterólogo inmunogenico 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 más fácil formulación en un vehículo deseado.
- 15 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,
- 20 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, 5 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 10 desea, la vacuna puede contener cantidades pequeñas de sustancias auxiliares tales como agentes emulsionantes o de remojo, agentes reguladores de pH o auxiliares que mejoran la efectividad de las vacunas.

Las vacunas pueden administrarse convencionalmente 15 parentenal por medio de la inyección de anticuerpo-antígeno heterólogos, 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 20 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 1-2%. Las formulaciones orales incluyen dichos excipientes

empleados normalmente como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, "starge", estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, 5 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 neutral. Las 10 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, oxalico, tártico mandélico, y 15 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.

20 Las vacunas son administradas de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en dichas cantidades como será terapéuticamente efectiva e inmunogenicas. La cantidad a ser administrada depende del sujeto a ser tratado, 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
5 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.

10 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
15 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
20 ciento de la solución salina reguladora de fosfato, mezclada con polímeros sintéticos de azúcar (Carbopol) utilizado como 0,25 por cento de solución agregado de la proteína en la vacuna por el tratamiento de calor con temperaturas que van de 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 albúmina, mezcla con células bacterianas tales como C. parvum o endotoxinas o componentes lipopolisacáridos de bacteria gram-negativa, 5 emulsión en vehículos aceitosos fisiológicamente aceptables tales como mono-oleato manida (Arancel 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.

10 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 15 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 20 puede seguirse por ensayos para anticuerpos para antígenos "supernatant". Los ensayos pueden desarrollarse por medio de clasificación con clasificaciones convencionales, tales como radionucleótidos, enzimas, fluorescencia y similares. Estas técnicas son bien conocidas y pueden encontrarse en una

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.

5 EJEMPLO VI

Usos agrícolas

Un mecanismo de cura o detención del virus encefalitis
10 "caprine" (CAE) es revelado en la actualidad. Los principios
descriptos 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
15 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
erradicar el virus CAE de la manada de cabras.

20 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 lisado 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
5 utilizados para detectar la presencia de un complejo inmunogénico. 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
10 extracciones de virus clasificados independientemente de que la clasificación 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";
15 introducir diluyentes más altas y en aumento de suero a ser diagnosticado en estas cavidades; incubar el plato "microtiter"; cuidadosamente lavar el plato "microtiter" con un tampón adecuado; introducir anticuerpos que sean específicamente clasificados con inmunoglobulinas humanas en
20 cavidades del plato "microtiter", la clasificación 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 hidrólisis 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 clasificado, 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 clasificaciones.

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

5 salina al lavar un área en particular en el
campo de la operación puede encontrarla útil.
Puede 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 anticueropi-
10 antígeno heterólogo en forma de tableta puede
tomarse oralmente.

15 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.

20 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.

25 V. La forma supositorio- para la quimoprevención en
homosexuales debido a que los lugares principales
de infección son el recto e el intestino grueso.

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 XI. El adjunto de anticuerpos heterólogos a resina HPLC estéril (por ejemplo SiO_2 -péptido o Si (péptido),, 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.

5 Las composiciones acuosas (inocula) de solución anticuerpo heterólogo como se describe en la presente y que incluye una cantidad efectiva de complejo anticuerpo-antígeno heterólogo disuelto o disperso en un medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente, los términos

10 "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-antígeno heterólogo puro o diluto, en yuxtaposición directa con la célula objetivo. La frase " farmacéuticamente

15 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 heterólogo como se describe en al presente.

La preparación de una composición acuosa que contiene una

20 proteína o proteoglicano, tales como componentes activos 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

25 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, hidroc্লórico o ácidos fosfóricos, o dichos ácidos orgánicos como acético, oxalico, tartico, mandelico y similares. Las sales formadas con grupos carboxilos libres pueden derivarse también de bases inorgánicas tales como por ejemplo sodio, potasio, amonio, calcio, o hidroxidos 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.

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 espacialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular subcutánea e intraperitoneal, la solución portadora anticuerpo-antigena 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 isotónico solución NaCl y agregarse a 1000 mL de fluido hipodermocclisis o inyectarse al sitio propuesto de infusión (ver por ejemplo "Remington 's Pharamautical Sciences" 15 edición páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en dosificación necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto que se esta tratando. La persona responsable de la administración, determinará en cualquier 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.

5

10

15

20

en

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunomoduladora caracterizada porque comprende:
anticuerpos heterólogos específicos para un antígeno; y
un antígeno, donde los anticuerpos heterólogos forman un
complejo con el antígeno para combinar 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 anticuerpos heterólogos son policlonales.
4. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque
los anticuerpos heterólogos son monoclonales.
5. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque
los anticuerpos heterólogos se crían en una cabra.
6. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque
los anticuerpos heterólogos son anticuerpos antiretrovirus
de las cabras

7. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos policlonales que se crían en una cabra embarazada y se asilan de la leche de la cabra.

5

8. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un virus inmunosupresivo humano muerto caliente .

10

9. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un virus inmunosupresivo "simian" muerto caliente.

15

10. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.

20

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.

25

13. La composición de la reivindicación 1, caracterizado porque el antígeno es aislado del paciente a ser tratado con la composición y los anticuerpos heterólogos se crían contra aquel aislamiento específico
- 5
14. Una vacuna para estimular respuestas inmunes en un huésped inmunosupresivo que comprende:
- anticuerpos heterólogos específicos para un antígeno;
- un antígeno, caracterizado porque los anticuerpos
- 10 heterólogos 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.
- 15
16. La composición de la reivindicación 14, donde los anticuerpos heterólogos son policlonales
17. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterólogos son monoclonales.
- 20
18. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterólogos se crían en una cabra.

19. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos antiretrovirus de cabras.

5

20. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos policlonales criados en una cabra embarazada y aislados de la leche de la cabra

10

21. La composición de la reivindicación 14, caracterizados porque el antígeno es un virus inmunosupresivo humano muerto caliente.

15

22. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno es un virus "simian" inmunosupresivo muerto.

20

23. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.

25

24. La composición de la reivindicación 1, caracterizada porque el portador es una salina regulada.

25. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo atenuado.

5

26. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque el antígeno está aislado del paciente a ser tratado con la composición y los anticuerpos heterólogos se crían contra aquel aislamiento específico.

10

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 heterólogos como se define en la reivindicación 1.

15

28. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son policlonales.

20

29. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son monoclonales.

25

30. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos se crían en una cabra.

31. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos antiretrovirus de cabra.
- 5 32. El método de la reivindicación 27, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos policlonales criados en cabras embarazadas y se aíslan de la leche de cabra.
- 10 33. El método de la reivindicación 28, caracterizado porque el antígeno es un virus inmunosupresivo humano caliente muerto.
- 15 34. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno es un virus "simian" inmunosupresivo muerto caliente.
- 20 . 35. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.
36. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el portador es una salina reguladora.

25

37. El método de la reivindicación 29,c caracterizado porque el antígeno es un patógeno inmunosupresivo atenuado.
- 5 38. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el antígeno se encuentra asilado del paciente a ser tratado con la composición y los anticuerpos heterólogos son criados contra ese aislamiento específicos.
- 10 39. Un método de inmunomodulación caracterizado por comprender los pasos:
- aislar un agente inmunosupresivo etiológico de un huésped inmune suprimido ; purificando el agente etiológico inmunosupresivo;
- 15 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
- 20 los anticuerpos purificados xenotípicos para producir el inoculante.
40. El método de la reivindicación 39, que comprende además el paso de inocular el huésped suprimido inmune con el
- 25 inoculante.

41. El método de la reivindicación 39, caracterizados porque los anticuerpos heterólogos son policlonales.

5 42. El método de la reivindicación 39, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son criados en una cabra.

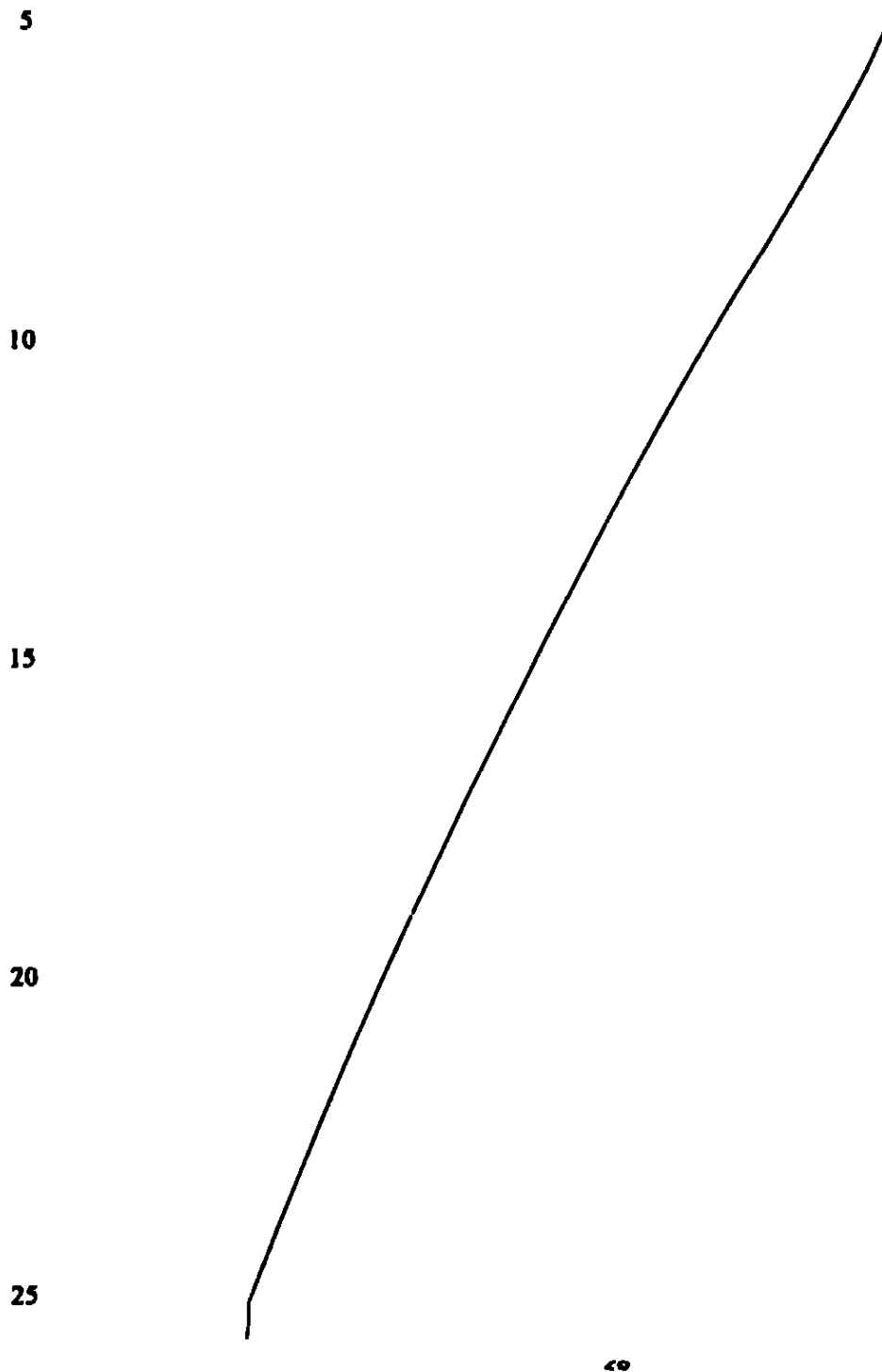
10 43. El método de la reivindicación 39, caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos anti-retrovirus de cabra.

15 44. El método de la reivindicación 39 caracterizado porque los anticuerpos heterólogos son anticuerpos policlonales criados en una cabra embarazada y se asilan de la leche de la cabra.

20 45. El método de la reivindicación 39, caracterizada porque el agente etiológico inmunosupresivo es un virus inmunosupresivo humano muerto caliente.

25 46. El método de la reivindicación 39, caracterizado porque el agente etiológico inmunosupresivo es un virus inmunosupresivo simian muerto caliente.

47. El método de la reivindicación 39, caracterizado porque el agente etiológico inmunosupresivo es un patógeno inmunosupresivo inactivado químicamente.



COMPOSICIONES MEJORADORAS INMUNOMODULADORAS Y
NEUTRALIZANTES DE ANTICUERPOS

5

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Una composición y método para la modulación inmune de infecciones patogénicas es revelados. 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.

10

15

20

NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY ENHANCING COMPOSITIONS

TECHNICAL FILED 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

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.

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 and HIV-3 and their sub-strains may cause immune suppression in humans.

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 Kaposi'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. 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.

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.

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

Today, the rates of reported cases of HIV infections are increasing in geometric proportions and clinical treatments represent marginal improvements in the management of health care in this area. The rapid spread of HIV infection is out of control. 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. Infect. Dis.* 5:553-557 (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 (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)).

5 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.

10 One source of protective immunoglobulin to HIV-1 infected patients is 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.

15

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.

25 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 and primates (including humans) 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 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.

35 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 immune response would normally be mounted against those antibodies. However, because of similarities between the goat immune system and 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 method of the present invention are designed to activate the host immune system by 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 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. 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. The inhibitory effectiveness reasonably suggests its administration as an immunotherapeutic to humans infected by the HIV-1 virus, or related viruses.

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 bases of the immunostimulatory 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 immunosuppressed patient is unable to mount a specific immune 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.

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:

FIGURE 1 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;

5 FIGURE 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; and

FIGURE 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.

10

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
15 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 CROSS-REACTIVE ANTIBODY ACTIVITY

An immunocompetent animal will produce an immunological response to a foreign protein.
20 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.

25 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.

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
30 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.

35 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 microorganism and globulins, also function in antibacterial activities. Opsonization of foreign organisms in the memory component of the immune system. After previous antigenic exposure, the immune system produces a series of globulins which attach to and coat bacterial 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 number 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					
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Serum level	989	200	100	3	0.008
Means (mg/dl) (range)	(600-1600)	(60-300)	(45-150)		
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 turnover rate	6.9	24.0	10.6	37.0	72.0
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 neutralized or coated by antibodies concurrently. The complementary activity would synergistically optimize the antipathogenic effectiveness of the bioactive compositions of this invention.

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*, *Enterobacteriaceae* *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Helicobacter*, *W. succinogenes*, *Acineto bacter spp.*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Mycoplasmas*, *Gardnerella*, *Streptobacillus*, *Spirillum*, *Calymmatobacterium*, *Clostridium*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, Anaerobic Gram-negative Bacterial including bacilli and Cocci, Anaerobic gram-Positive Nonsporeforming-bacilli and Cocci, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Germella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Branhamella*, *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.*, *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*, and *Legionella pneumophila*, ampicillin-resistant strain of *S. aureus*, and 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 type 2, Ebola virus, cytomegalo viruses, Herpes Simplex viruses, Human cytomegalovirus, Varicella-Zoster Virus, Poxvirus, Influenza viruses, Parainfluenza viruses, Respiratory Syncytial Virus, Rhinoviruses,

Coronaviruses, Adenoviruses, Measles virus, Mumps virus, Rubella Virus, Human Parvoviruses, Arboviruses, Rabies virus, Enteroviruses, reoviruses, viruses Causing gastroenteritis Hepatitis Viruses, Filoviruses, Arenaviruses, Papillomaviruses, Polymaviruses, Human Immunodeficiency viruses, Human Retroviruses, Spongiform Encephalopathies, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis.

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, Buckley, 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).

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, oxacillin,

and nafcillinio combat virulent bacterial pathogens. However, nosocomial infections still occur in great numbers and are expected to increase with a 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. Patent 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 bacterial, immune complexes and viruses.

U.S. Patent 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*.

U.S. Patent 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 cream, gel, ointment, vaginal and rectal products, coating layer, or the like to prevent and treat infections from microorganisms and viruses.

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

In oral applications, the compositions would ideally be provided as a lozenge, mouthwash or spray, while, in trauma patients, the composition may be best applied as a cream or ointment, or as part of a fluid infusion, biomaterial implant or fixation device. The immunoglobulins and other antibodies of the present composition 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 to 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 bacterial, virus, fungus or other microbes minimized.

Upon creating humoral and cellular-immunity in a non-human 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 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.

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 are not capable of activating or causing

biodestruction of some viruses, such as the SIV or HIV virus. It is believed that the bases 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 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-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.

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 usable serum immunoglobulin which can then be used to prevent further virus replication.

It is known that, in procedures described herein, SIV, HIV and their immunoglobulin, in particular, IgA, do not affect non-human hosts. Riott, Ivan, *Essential Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA (1991). A non-human 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 non-human 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 non-human mammal's immunological reaction can also be potentiated by use of an appropriate adjuvant.

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

10 The simian immunodeficiency viruses (SIVs) were originally isolated from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with immunodeficiency or lymphoma (SIVmac). Subsequently, SIVs were isolated from asymptomatic mangbey 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.

15 In susceptible primate species, SIVs cause a fatal disease which 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.

EXAMPLE I

Preparation of Concentrated Simian Immunodeficiency Virus (SIV)

25 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 66:352-3556 (1992). The CEMx174 cell is an immortalized CD4-bearing human T/B hybrid cell line that is highly susceptible to SIV-induced cytophaticity (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).

35 The cells were grown in RPMI-1640 medium ("RPMI") 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 TCID₅₀/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 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-48 column (Pharmacia Diagnostics, Inc., Fairfield, NJ).

10

EXAMPLE II

Neutralization of the SIV Virus in Vitro

Neutralizing antibody or antibodies obtained from a non-human 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 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.

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.

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 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 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 x10⁴ 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. 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.

TABLE 3

AVERAGE NUMBER OF FUSION SITES OVER TIME FOR VARIOUS DILUTIONS OF GOAT ANTI-SIV SERUM vs. THE NORMAL SALINE CONTROL		
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

TABLE 4

PERCENT INHIBITION OF SIV FUSION SITES BY DIFFERENT DILUTIONS OF GOAT ANTI-SIV SERUM (Day 2-post-infection)		
	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
6	1/640	0

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 non-human 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".

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 (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).

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

10 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
15 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.

 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
20 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. 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
25 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
30 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
35 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.

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) 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-type-anti-idio-type 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 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 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 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 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.

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

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.

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' 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, 5 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 10 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 subcutaneously or IM, but may be given intravenously with precaution.

Vaccines

15 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 20 ready formulation into a desired vehicle.

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 25 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, ethanol, or the like and combinations thereof. Examples of such pharmaceutically acceptable carrier or diluents 30 include water, phosphate buffered saline or sodium bicarbonate buffer. A number of other acceptable carriers or diluents are known.

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.

35 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, stearic acid, 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%.

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 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 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.

5 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 least 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 performed by labeling with
10 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

15 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
20 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,
25 or with a viral lysate or extract, and then detecting the immunological reaction. One method for implementing the present invention includes, for example, and ELISA in which immunoenzymatic reactions or immunofluorescent materials are used to detect the presence of an immunogenic complex. The assays may be direct or indirect immunofluorescence measurements or direct or indirect immuno-enzymatic dosages.

30 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
35 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 immunofluorescence; human anti-immunoglobulins 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.

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 cream against HIV associate Kaposi's sarcoma.
- II. In an intravenously solution such as saline may be effective 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.
- III. Buffer ophthalmic solution - - for patients 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 care workers. In this regard, use of the DMSO as solvent would 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 hour 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 SiO_2 -peptide or $\text{Si}(\text{peptide})_4$, etc.) to be used as a disposable filter for blood and blood by-products prior to patient transfusion. This is to insure that the donor is not in the seroconversion window.

Acqueous 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 compositions 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 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 skilled 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 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.

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 with the antigen for
5 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
15 goat.
6. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are goat anti-
retrovirus antibodies.
- 20 7. The composition of claim 1, wherein the heterologous antibodies are polyclonal
antibodies raised in a pregnant goat and are isolated from goat milk.
8. The composition of claim 1, wherein the antigen is a heat killed human
immunosuppressive virus.
25
9. The composition of claim 1, wherein the antigen is a heat killed simian
immunosuppressive virus.
10. The composition of claim 1, wherein the antigen is a chemically inactivated
30 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
35 immunosuppressive pathogen.

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.

5 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
10 a pharmaceutically acceptable carrier.

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

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

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

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

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

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

30 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.

35 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.

5

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.

10

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.

15

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

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.

20

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

25

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.

30

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 inactivated immunosuppressive pathogen.

35

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

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

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

39. A method of immunomodulation comprising the steps of:
isolating an immunosuppressive etiologic agent from an immune suppressed host;
10 purifying the immunosuppressive etiologic agent;
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
15 mixing inactivated immunosuppressive etiologic agent with the purified xenotypic antibodies to produce an inoculant.

40. The method of claim 39, further comprising the step of inoculating the immune
20 suppressed host with the inoculant.

41. The method of claim 39, wherein the heterologous antibodies are polyclonal.

42. The method of claim 39, wherein the heterologous antibodies are raised in a goat.

25 43. The method of claim 39, wherein the heterologous antibodies are goat anti-retrovirus antibodies.

44. The method of claim 39, wherein the heterologous antibodies are polyclonal
antibodies raised in a pregnant goat and are isolated from goat milk.

30 45. The method of claim 39, wherein the immunosuppressive etiologic agent is a heat killed human immunosuppressive virus.

46. The method of claim 39, wherein the immunosuppressive etiologic agent is a heat
35 killed simian immunosuppressive virus.

47. The method of claim 39, wherein the immunosuppressive etiologic agent is a chemically inactivated immunosuppressive pathogen.

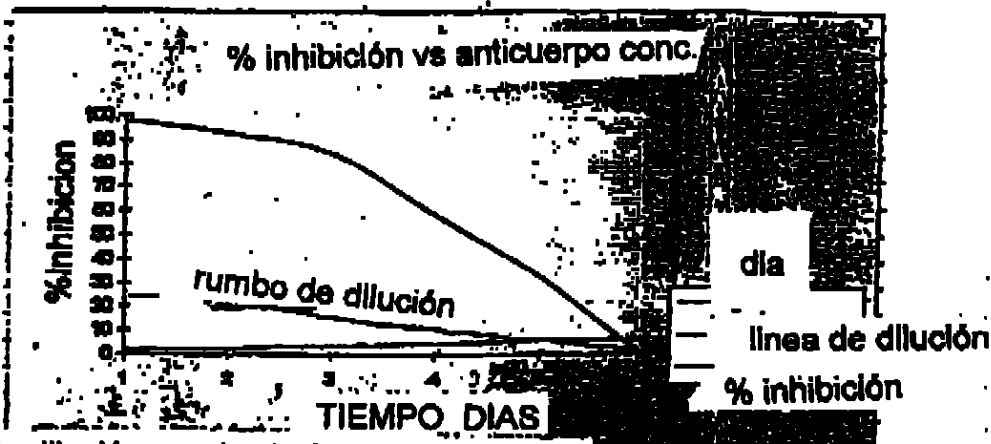
**NEUTRALIZING ANTIBODY AND IMMUNOMODULATORY
ENHANCING COMPOSITIONS**

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

A composition and method for immune modulation of pathogenic infections is disclosed. More particularly, a composition and method for enhancing a mammal's ability to respond to, e.g., immunosuppressive pathogens, is disclosed in which a target antigen is mixed with a
5 heterologous antisera specific or cross-reactive to 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.

PHONE NO. :

Feb. 14 2001 10:12AM F2



Línea de dilución=rumbo (valores no actuales)

Fig. 1

FROM :

PHONE NO. :

Feb. 14 2001 10:13AM PT

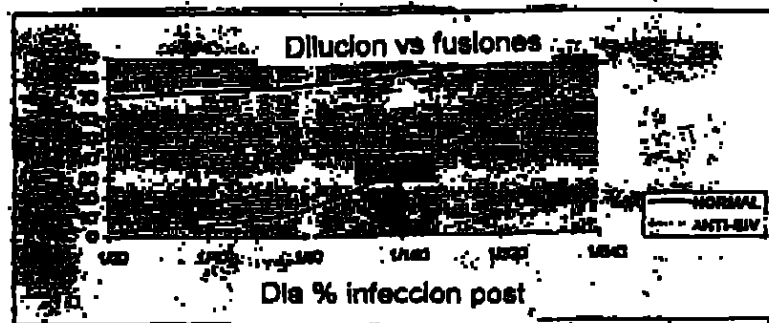


Fig. 2

FROM :

PHONE NO. :

Feb. 14 2001 10:13AM P4

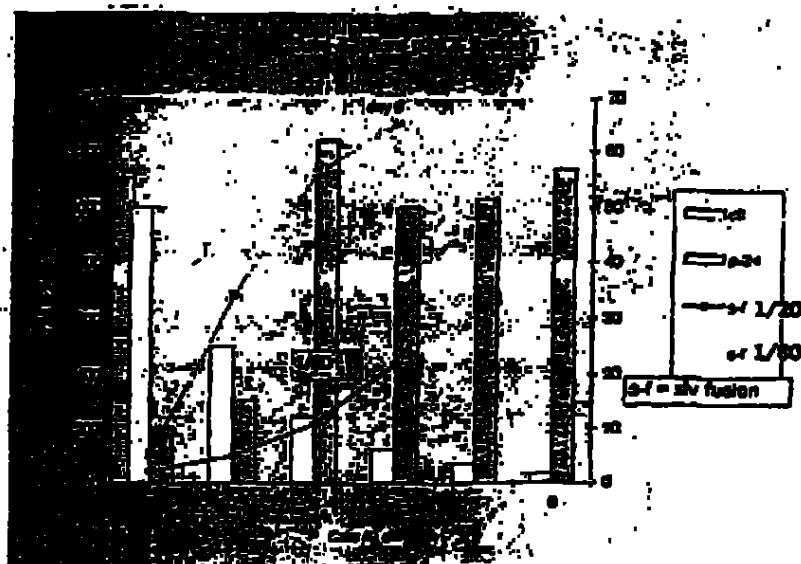
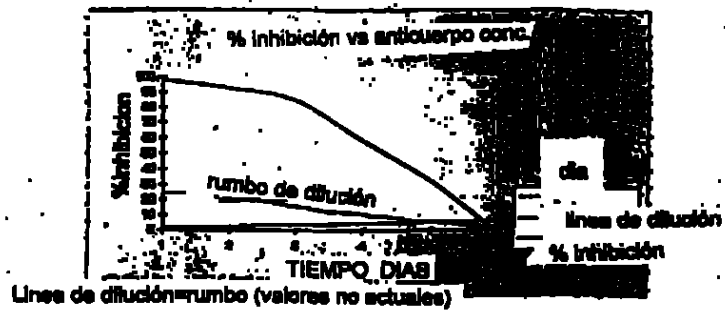


Fig. 3





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 01011534 00000000 Folios: 107
Fecha (MM): 2001-02-14 17:00:11
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2009 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 8,921
FECHA : FEBRERO 14 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JUAN P. SEPULVEDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2747274	14/02/2001	456,640.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
	TOTAL :	\$ 356,640.00

SOM: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA 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



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
 Radicación : 01011534 00000000. Folios: 107
 Fecha (HH): 2001-02-14 17:00:11
 Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
 Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 8,922
 FECHA : FEBRERO 14 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
JUAN P. SEPULVEDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2747274	14/02/2001	456,640.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	
	02 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO 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



REQUISITOS MINIMOS PARA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 01011534 00000000 Folios: 107
Fecha (SIB): 2001-02-14 17:00:11
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRAR/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [4]

MODELO DE UTILIDAD []

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- Descripción de la invención [☒]
- Dibujos de ser estos pertinentes [☐]
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [☐]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. [☐]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. [☐]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [☐]
- Representación gráfica del esquema de trazado [☐]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. [☐]

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Se extraen plus
de 109 y 100 correspondiente
al extracto
Angelly



109

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
RODOLFO RODRIGUEZ MADRID

REFERENCIA:	Radicación No.	01-11534
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1246
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Debe indicarse el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art. 27-c, D 486/00).
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

26 ABR. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de este plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: Info@slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia