



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-29587

54. TÍTULO

Composiciones Inmunogénicas de HIV
y métodos relacionados.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C 12 N7/00, 7/04, A61K39/2
A61P37/00

71. SOLICITANTE

The Immune Response Corporation

DOMICILIO

Carlsbad, CA, USA.

74. APODERADO

Dilia María Rodríguez D'Alemon

22. BOGOTÁ, D. C.,

Marzo 24/06.

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL = 28-03-2006

1) SOLICITUD DE:

☒ **Patente de invención** ☐ **Patente de Modelo de Utilidad**

☒ **Capítulo I.** ☐ **Capítulo II.**

2) LICITANTE
(71)

Nombre: THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION

Dirección: 5931 Darwing Court, Carlsbad, CA 92008, Estados Unidos

Nacionalidad o domicilio: Carlsbad, CA, Estados Unidos

Lugar de constitución: CA, Estados Unidos

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT:** ☐

C.E. ☐ **OTRO** ☐

NÚMERO **Cual** _____

Teléfono: **Fax:**
E. Mail:

3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C.

Teléfono: 6181088 Fax: 6350824
E. Mail: info@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ **NIT:** ☐

C.E. ☐ **OTRO** ☐

NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: MOSS, Ronald, B.
Dirección: 5021 Manor Ridge Lane, San Diego, CA 92130 Estados Unidos
Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/027995 Fecha: Agosto 27, 2004

Publicación Internacional No. WO2005/021726 A2 Fecha: March 10, 2005

6) Título (54) COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE HIV Y MÉTODOS RELACIONADOS

7) Clasificación Internacional: C12N 7/00, 7/04, A61K 39/21, A61P 37/00

8) PRIORIDAD

33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ **NO** ☐

ESTADOS UNIDOS

AGOSTO 28, 2003

60/498,804

9) Comprobante de pago N°. 06-9,418 Fecha: FEBRERO 3, 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ 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 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 1. Solicitud PCT
 2. Notificación presentación prioridad
 3. Notificación de la recepción de la copia
 4. Oficinas designadas
 5. USA 700194800A

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:


C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

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

7
p759

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radacion : 06029587 00000000 Folios 227
Fecha (AMB): 2006-02-24 17:11:28
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVOS CREATIVOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 9,418
FECHA : FEBRERO 3 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE NODET Y CD. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49044333	03/02/2006	12,853,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 March 2005 (10.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/021726 A2

(51) International Patent Classification: C12N

(21) International Application Number:
PCT/US2004/027995

(22) International Filing Date: 27 August 2004 (27.08.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Date: 28 August 2003 (28.08.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION [US/US]; 5931 Darwin Court, Carlsbad, CA 92008 (US).

(72) Inventor: and

(75) Inventor/Applicant (for US only): MOSS, Ronald, B. [US/US]; 5021 Manor Ridge Lane, San Diego, CA 92130 (US).

(74) Agents: CADENA, Deborah, L. et al.; McDermott Will & Emery LLP, 4370 La Jolla Village Drive, Suite 700, San Diego, CA 92122 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, GU, HK, HN, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMMUNOGENIC HIV COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

(57) Abstract: The invention provides immunogenic compositions which enhance the duration and strength of the immune response in a mammal. The immunogenic compositions contain an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant. The HIV antigen can be a whole-killed HIV virus devoid of outer envelope protein gp120. Alternatively, the HIV antigen can be a whole-killed HIV virus, or a p24 antigen. Also provided are kits, the components of which, when combined, produce the immunogenic compositions of the invention. The invention also provides methods of making the immunogenic compositions, by combining an HIV antigen, an immunomer and optionally an adjuvant. The invention further provides a method of immunizing a mammal, by enhancing an immune response in the mammal by administering to the mammal an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer and optionally an adjuvant. Also provided is a method of inhibiting in a mammal by administering to the mammal an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer and optionally an adjuvant.

WO 2005/021726 A2

IMMUNOGENIC HIV COMPOSITIONS AND RELATED METHODS**BACKGROUND INFORMATION**

This invention relates to Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and, more specifically, to immunogenic compositions for use in preventing and treating AIDS.

More than 30 million people world wide are now infected with the human
5 immunodeficiency virus (HIV), the virus responsible for AIDS. About 90% of HIV
infected individuals live in developing countries, including sub-Saharan Africa and parts
of South-East Asia, although the HIV epidemic is rapidly spreading throughout the world.
Anti-viral therapeutic drugs that reduce viral burden and slow the progression to AIDS
have recently become available. However, these drugs are prohibitively expensive for use
10 in developing nations. Thus, there remains an urgent need to develop effective
preventative and therapeutic vaccines to curtail the global AIDS epidemic.

To date, HIV has proven a difficult target for effective vaccine development.
Because of the propensity of HIV to rapidly mutate, there are now numerous strains
predominating in different parts of the world whose epitopes differ. Additionally, in a
15 particular infected individual, an HIV virus can escape from the control of the host
immune system by developing mutations in an epitope. There remains a need to develop
improved HIV vaccines that stimulate the immune system to recognize a broad spectrum
of conserved epitopes, including epitopes from the p24 core antigen.

During the 1990's, more than 30 different candidate HIV-1 vaccines entered
20 human clinical trials. These vaccines elicit various humoral and cellular immune
responses, which differ in type and strength depending on the particular vaccine
components. There remains a need to develop HIV vaccine compositions that strongly
elicit the particular immune responses correlated with protection against HIV infection.

The nature of protective HIV immune responses has been addressed through studies of individuals who have remained uninfected despite repeated exposure to HIV, or who have been infected with HIV for many years without developing AIDS. These studies have shown that CD4+ T helper cells correlate well with protection against HIV infection and subsequent disease progression. Besides antigen-specific CD4+ helper T cell responses, CD8+ cytotoxic T cell responses are considered important in preventing initial HIV infection and disease progression. During an effective anti-viral immune response, activated CD8+ T cells directly kill virus-infected cells and secrete cytokines with antiviral activity.

The β -chemokine system also appears to be important in protection against initial HIV infection and disease progression. Infection of immune cells by most primary isolates of HIV requires interaction of the virus with CCR5, whose normal biological role is as the principal receptor for the β -chemokines RANTES, MIP-1 α and MIP- β . Genetic polymorphisms resulting in decreased expression of the CCR5 receptor have been shown to provide resistance to HIV infection. Additionally, a significant correlation between β -chemokine levels and resistance to HIV infection, both in exposed individuals and in cultured cells, has been demonstrated. It has been suggested that β -chemokines may block HIV infectivity by several mechanisms, including competing with or interfering with HIV binding to CCR5, and downregulating surface CCR5.

Because of the importance of β -chemokines in preventing initial HIV infection and disease progression, an effective HIV immunogenic composition should induce high levels of β -chemokine production, both prior to infection and in response to infectious virus. HIV immunogenic compositions capable of inducing β -chemokine production have been described. However, immunogenic compositions that stimulate high levels of β -chemokine production, induce strong, durable HIV-specific Th1 cellular and humoral immune response with HIV-specific cytotoxic activity have not been described.

Compositions that elicit certain types of HIV-specific immune responses may not elicit other important protective responses. For example, Deml et al., Clin. Chem. Lab. Med. 37:199-204 (1999), describes a vaccine containing an HIV-1 gp160 envelope

antigen, an immunostimulatory DNA sequence and alum adjuvant, which, despite inducing an antigen-specific Th1-type cytokine response, was incapable of inducing an antigen-specific cytotoxic T lymphocyte response. Furthermore, a vaccine containing only envelope antigens would not be expected to induce an immune response against the more highly conserved core proteins of HIV.

Thus, there exists a need for immunogenic compositions and methods that will either help to prevent HIV infection or at least slow progression to AIDS in infected individuals. The present invention satisfies this need and provides related advantages as well.

10

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides immunogenic compositions which can be used to enhance the potency of immune responses in a mammal. The immunogenic compositions of the invention can enhance the breadth, type, strength and duration of the immune responses induced. The immunogenic compositions contain an optimized HIV antigen, an isolated nucleic acid molecule containing an immunomer and optionally an adjuvant. The HIV antigen can be a whole-killed HIV virus devoid of outer envelope protein gp120. The HIV antigen can also be protease-defective HIV particles such as L2 particles. Alternatively, the HIV antigen can be a whole-killed HIV virus, or a combination of selected HIV antigens or peptides, including p24 antigen, nef, gp41, and the like.

20

In the immunogenic compositions of the invention in which an adjuvant is present, the adjuvant can be suitable for administration to a human. An exemplary adjuvant is Incomplete Freund's Adjuvant.

The immunogenic compositions of the invention can further enhance β -chemokine levels, interferon- γ (IFN γ), interleukin 2 (IL2), tumor necrosis factor alpha (TNF α), and interleukin 15 (IL15) production, and/or HIV-specific IgG2b antibody production in a mammal. The immunogenic compositions of the invention can also enhance HIV specific

25

helper CD4+ T cells, an HIV-specific cytotoxic T lymphocyte response, and non cytotoxic suppressive T lymphocyte responses in a mammal.

Also provided are kits, which contain an HIV antigen, an immunomer and optionally an adjuvant. The components of the kits, when combined, produce the immunogenic compositions of the invention.

The invention also provides methods of making the immunogenic compositions, by combining an HIV antigen, an immunomer and optionally an adjuvant. The components can be combined *ex vivo* or *in vivo* to arrive at the immunogenic compositions.

The invention also provides a method of immunizing a mammal by administering to the mammal an immunogenic composition containing an HIV antigen, an isolated nucleic acid molecule containing immunomer and optionally an adjuvant. Also provided is a method of inhibiting AIDS, by enhancing an immune response in the mammal by administering to the mammal an immunogenic composition containing an HIV antigen, an isolated nucleic acid molecule containing an immunomer and optionally an adjuvant. In the methods of the invention, the mammal can be a primate, such as a human, or a rodent. In certain embodiments of the method, the primate is a pregnant mother or an infant. A human can be HIV seronegative or HIV seropositive. The immunogenic compositions can advantageously be administered to the mammal two or more times and by a variety of administration routes, including subcutaneously, intramuscularly and intramucosally.

20

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the chemical structures of exemplary linkers for linking oligonucleotides to form an immunomer (Yu et al., J. Med. Chem. 45:4540-4548 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30:4460-4469 (2002)).

25

Figure 2 shows a schematic diagram of the immunomer HYB2055, also known as Amplivax™.

Figure 3 shows the induction of HIV-specific cytokines RANTES, MIP1 α , MIP1 β , interleukin-10 (IL-10) and IL-5 by HIV-1 Immunogen. The immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. saline.

5 Figure 4 shows HIV-1 immunogen induced production of HIV-specific interferon- γ (IFN γ) is enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

10 Figure 5 shows the effect of Amplivax™ on production levels of RANTES, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 and IL-5. The immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. saline.

15 Figure 6 shows enhanced HIV-specific IFN γ production by Amplivax™. Similar results were found for RANTES, MIP1 α , MIP1 β and IL-10. The immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. saline.

20 Figure 7 shows the enhancing effect of Amplivax™ on HIV-specific IFN γ -secreting T cells in an Elispot assay. Immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

Figure 8 shows that HIV-specific IFN γ production was enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. Immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

25 Figure 9 shows that HIV-specific RANTES production was enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. Immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

30 Figure 10 shows that HIV-specific MIP-1 α production was enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. Immunogen was administered subcutaneously. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

Figure 11 shows that HIV-specific MIP-1 β production was enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. Immunogen was administered subcutaneously. “*” indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

5 Figure 12 shows that HIV-specific IL-10 production was enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. Immunogen was administered subcutaneously. “*” indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone

10 Figure 13 shows that HIV-specific IL-5 production was reduced by Amplivax™ given subcutaneously (SC). “*” indicates significance vs. HIV-1 immunogen alone.

Figure 14 shows the effect of Amplivax™ on HIV-1 immunogen-induced p24 antibody titers in mice. Immunogen was administered subcutaneously.

15 Figure 15 shows that HIV-1 whole killed vaccine in IFA (HIV-1 immunogen) induced HIV specific cytokine production upon subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) administration.

20 Figure 16 shows that Amplivax™ can be added pre- or post- emulsion with IFA and enhance IFN γ production.

Figure 17 shows that Amplivax™ can be added pre- or post- emulsion with IFA and enhance RANTES production.

25 Figure 18 shows that HIV-1 whole killed vaccine antigen with Amplivax™ triggered HIV-specific IFN γ production in mice immunized subcutaneously without IFA. “*” indicates significance vs. HIV-1 immunogen (IM). HIV antigen is HIV whole killed vaccine without IFA.

30 Figure 19 shows that HIV-1 whole killed vaccine antigen with Amplivax™ triggered HIV-specific IFN γ -secreting CD8+ T cell activity in mice immunized

subcutaneously without IFA. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen (administered IM). HIV antigen is HIV whole killed vaccine without IFA.

5 Figure 20 shows that HIV-1 whole killed vaccine antigen with Amplivax™ triggered HIV-specific RANTES production in mice immunized subcutaneously without IFA. "*" indicates significance vs. HIV-1 immunogen (administered IM). HIV antigen is HIV whole killed vaccine without IFA.

10 Figure 21 shows that percentages of α -defensin producing CD8+ T cells are increased by Amplivax™ added *ex vivo*.

Figure 22 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in REMUNE® treated patients and HIV positive controls (0 μ g/ml Amplivax™).

15 Figure 23 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in the presence of 0.1 μ g/ml of Amplivax™ added *ex vivo*.

Figure 24 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in the presence of 1 μ g/ml of Amplivax™ added *ex vivo*.

20

Figure 25 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in the presence of 10 μ g/ml of Amplivax™ added *ex vivo*.

25 Figure 26 shows IFN- γ ELISpot assay in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). HYB2055 was used at 1 μ g/ml.

Figure 27 shows phenotypic changes in CD4 T cells post 1st injection of REMUNE® in antiretroviral therapy (ART) naïve patients.

30 Figure 28 shows phenotypic changes in CD8 T cells post 1st injection of REMUNE® in ART naïve patients.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides immunogenic HIV compositions containing an HIV antigen, an isolated nucleic acid molecule containing an immunomer, and optionally an adjuvant. Also provided are kits containing the components of such compositions, for use together. The invention also provides methods of immunizing a mammal with such compositions, or with the components of such compositions, so as to enhance the immune response in the immunized mammal relative to HIV antigen alone. Advantageously, the compositions of the invention can also induce HIV specific CD4 T helper cells and CD8+ T cells yielding potent Th1 immune responses against a broad spectrum of HIV epitopes, providing a strong HIV-specific cytotoxic T lymphocyte response. Thus, the immunogenic compositions of the invention are useful for preventing HIV infection and/or slowing progression to AIDS in infected individuals. The compositions and methods can be used to elicit potent Th1 cellular and humoral immune responses specific for conserved HIV epitopes, elicit HIV-specific CD4 T helper cells, HIV-specific cytotoxic T lymphocyte activity, stimulate production of chemokines and cytokines such as β -chemokines, interferon- γ , interleukin 2 (IL2), interleukin 7 (IL7), interleukin 15 (IL15), alpha-defensin, and the like, and increase memory cells. Such vaccines can be administered via various routes of administration. Such vaccines can be used to prevent maternal transmission of HIV, for vaccination of newborns, children and high-risk individuals, and for vaccination of infected individuals. Such vaccines can also be used in combination with other HIV therapies, including antiretroviral therapy (ART) with various combinations of nuclease and protease inhibitors and agents to block viral entry, such as T20 (see Baldwin et al., Curr. Med. Chem. 10:1633-1642 (2003)).

As used herein, the term "HIV" refers to all forms, subtypes and variations of the HIV virus, and is synonymous with the older terms HTLVIII and LAV. Various cell lines capable of propagating HIV or permanently infected with the HIV virus have been developed and deposited with the ATCC, including HuT 78 cells and the HuT 78 derivative H9, as well as those having accession numbers CCL 214, TIB 161, CRL 1552 and CRL 8543, which are described in U.S. Pat. No. 4,725,669 and Gallo, Scientific American 256:46 (1987).

As used herein, the term "whole-killed HIV virus" refers to an intact, inactivated HIV virus. An inactivated HIV refers to a virus that cannot infect and/or replicate.

As used herein, the term "outer envelope protein" refers to that portion of the membrane glycoprotein of a retrovirus which protrudes beyond the membrane, as opposed to the transmembrane protein, gp41.

As used herein, the term "HIV virus devoid of outer envelope proteins" refers to a preparation of HIV particles or HIV gene products devoid of the outer envelope protein gp120, but contains the more genetically conserved parts of the virus (for example, p24 and gp41). An HIV devoid of the outer envelope protein gp120 is also referred to herein as REMUNE™.

As used herein, the term "HIV p24 antigen" refers to the gene product of the gag region of HIV, characterized as having an apparent relative molecular weight of about 24,000 daltons designated p24. The term "HIV p24 antigen" also refers to modifications and fragments of p24 having the immunological activity of p24. Those skilled in the art can determine appropriate modifications of p24, such as additions, deletions or substitutions of natural amino acids or amino acid analogs, that serve, for example, to increase its stability or bioavailability or facilitate its purification, without destroying its immunological activity. Likewise, those skilled in the art can determine appropriate fragments of p24 having the immunological activity of p24. An immunologically active fragment of p24 can have from 6 residues from the polypeptide up to the full length polypeptide minus one amino acid. Other HIV antigens encoded by other HIV gene products can include fragments or modifications similar to those described above for the HIV p24 antigen. Other exemplary HIV antigens include, for example, gp41, nef, and the like.

As used herein, an "immunomer" refers to an oligonucleotide comprising two smaller oligonucleotides linked at their 3' ends, resulting in an oligonucleotide having two 5' ends. The two smaller oligonucleotides of the immunomer can be identical or non-

identical sequences and/or lengths, but generally are identical. In addition to its immunostimulatory activity, an immunomer contains a 3'-3' linkage and therefore has no free 3' end, thus increasing resistance to nuclease digestion. The smaller oligonucleotides of the immunomer are generally at least about 5 or 6 nucleotides that are linked together to form two 5' ends, but can be longer such as 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, or even longer smaller oligonucleotides of the immunomer. One skilled in the art can readily determine a length and/or sequence of immunomer sufficient to stimulate an immune response greater than that seen with antigen alone. Thus, in one embodiment, an immunomer comprises two identical oligonucleotides linked via their 3' ends. An immunomer can also include modified bases. Immunomers are described, for example, in Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem., 9:807-813 (2001); Yu et al., Nucl. Acids Res., 30:4460-4469 (2002); Yu et al., Bioorg. Med. Chem., 11:459-464 (2003); Bhagat et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 300:853-861 (2003); and Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 297:83-90 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res., 30:1613-1619 (2002); Yu et al., J. Med. Chem., 45:4540-4548 (2002); Kandimalla et al., Bioconjugate Chem., 13:966-974 (2002); Yu et al., Bioorganic Med. Chem. Lett., 10:2585-2588 (2000); Agrawal and Kandimalla, Trends Mol. Med., 8:114-121 (2002); each of which is incorporated herein by reference. Such immunomers can have more potent immunostimulatory activity than immunostimulatory sequences containing CpG. An immunomer enhances the immune response in a mammal when administered in combination with an antigen. An immunomer can be a CpG immunomer or CpG-free immunomer, as discussed below. An exemplary immunomer is described in Examples X and XI.

As used herein, a "CpG immunomer" refers to an immunomer, as described above, that specifically contains a CpG motif. Thus, a CpG immunomer is an oligonucleotide comprising two identical or non-identical smaller oligonucleotides, where at least one of the smaller oligonucleotides contains at least one CpG motif.

As used herein, a "CpG-free immunomer" refers to an immunomer that specifically excludes a CpG motif. Thus, a CpG-free immunomer is an oligonucleotide comprising two identical or non-identical smaller oligonucleotides, where neither of the smaller oligonucleotides contains a CpG motif.

X
15

An immunomer can contain modified bases (see Kandimalla et al., *supra*, 2001). For example, an immunomer can contain analogues of CpG. For example, an immunomer can contain a pyrimidine analog of deoxycytosine, designated Y. Particularly useful deoxycytidine analogs for use in an immunomer are deoxy-5-hydroxycytidine or deoxy-N4-ethylcytidine. In another embodiment, an immunomer can contain a purine analog of guanine, designated R. A particularly useful deoxyguanine analog is 7-deazguanine. Thus, an immunomer can contain a YpG motif, a CpR motif, or a YpR motif, where Y and R are analogs of cytosine and guanine, respectively.

10

Methods of linking two smaller oligonucleotides to form an immunomer have been described previously (Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. 9:807-813 (2001); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30:4460-4469 (2002); Yu et al., Bioorg. Med. Chem. 11:459-464 (2003); Bhagat et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 300:853-861 (2003); and Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297:83-90 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30:1613-1619 (2002); Yu et al., J. Med. Chem. 45:4540-4548 (2002); Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13:966-974 (2002); Yu et al., Bioorganic Med. Chem. Lett. 10:2585-2588 (2000); Agrawal and Kandimalla, Trends Mol. Med. 8:114-121 (2002)). Exemplary linkers include, for example, 3'-3' linkages via a glyceryl linker (Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297:83-90 (2002)). Linkers can be alkyl, branched alkyl or ethylene-glycol linkers, as described in Yu et al., J. Med. Chem. 45:4540-4548 (2002) (see Figure 1). One skilled in the art will readily recognize that these and other methods can be used to link oligonucleotides via their 3' ends to generate two free 5' ends.

As used herein, the term "immunostimulatory sequence" or "ISS" refers to a nucleotide sequence containing an unmethylated CpG motif that is capable of enhancing the immune response in a mammal when administered in combination with an antigen. Immunostimulatory sequences are described, for example, in PCT publication WO 98/55495.

As used herein, the term "nucleic acid molecule containing an immunomer" refers to a linear, circular or branched single- or double-stranded DNA or RNA nucleic acid that

30

contains an immunomer. A nucleic acid molecule containing an immunomer can contain a single immunomer. A nucleic acid molecule can also contain more than one immunomer if one or both of the free 5' ends is linked to the 5' end of another nucleic acid sequence to generate another potential 3' end for linkage of an additional immunomer.

- 5 Such a nucleic acid molecule, in addition to the immunomer, can be of any length greater than 6 bases or base pairs, and is generally greater than about 15 bases or base pairs, such as greater than about 20 bases or base pairs, and can be several kb in length. When such a nucleic acid containing an immunomer is circular, or when it contains multiple immunomers requiring 5'-5' linkages, it is understood that the free 5' ends are linked, for
10 example, as described in Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13:966-974 (2002), and Yu et al., Bioorgan. Med. Chem. 10:2585-2588 (2000), so long as the 5'-5' linkage does not interfere with the immunostimulatory activity of the immunomer embedded in the nucleic acid, as is found with short immunomers (Kandimalla et al., *supra*, 2002, and Yu et al., *supra*, 2000). A nucleic acid containing an immunomer can additionally contain
15 nucleic acid sequence encoding one or more HIV antigens for use as a DNA vaccine.

- An immunomer or nucleic acid molecule containing an immunomer can be generated, for example, by chemically synthesizing oligonucleotides and chemically linking the oligonucleotides via their 3' ends, as disclosed herein. In addition, an immunomer or nucleic acid molecule containing an immunomer can be generated by
20 recombinantly synthesizing the two halves of the immunomer or nucleic acid containing an immunomer and chemically linking the two halves via their 3' ends.

- An immunomer can contain either natural or modified nucleotides or natural or unnatural nucleotide linkages. Modifications known in the art, include, for example,
25 modifications of the 3'OH or 5'OH group, modifications of the nucleotide base, modifications of the sugar component, and modifications of the phosphate group. An unnatural nucleotide linkage can be, for example, a phosphorothioate linkage in place of a phosphodiester linkage, which increases the resistance of the nucleic acid molecule to nuclease degradation. Various modifications and linkages are described, for example, in
30 PCT publication WO 98/55495.

As used herein, the term "adjuvant" refers to a substance which, when added to an immunogenic agent, nonspecifically enhances or potentiates an immune response to the agent in the recipient host upon exposure to the mixture. Adjuvants can include, for example, oil-in-water emulsions, water-in oil emulsions, alum (aluminum salts), liposomes and microparticles, such as polystyrene, starch, polyphosphazene and polylactide/polyglycosides. Adjuvants can also include, for example, squalene mixtures (SAF-I), muramyl peptide, saponin derivatives, mycobacterium cell wall preparations, monophosphoryl lipid A, mycolic acid derivatives, nonionic block copolymer surfactants, Quil A, cholera toxin B subunit, polyphosphazene and derivatives, and immunostimulating complexes (ISCOMs) such as those described by Takahashi et al. (1990) Nature 344:873-875. For veterinary use and for production of antibodies in animals, mitogenic components of Freund's adjuvant (both complete and incomplete) can be used. In humans, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) is a particularly useful adjuvant. Various appropriate adjuvants are well known in the art and are reviewed, for example, by Warren and Chedid, CRC Critical Reviews in Immunology 8:83 (1988).

As used herein, "AIDS" refers to the symptomatic phase of HIV infection, and includes both Acquired Immune Deficiency Syndrome (commonly known as AIDS) and "ARC," or AIDS-Related Complex, as described by Adler, Brit. Med. J. 294: 1145 (1987). The immunological and clinical manifestations of AIDS are well known in the art and include, for example, opportunistic infections and cancers resulting from immune deficiency.

As used herein, the term "inhibiting AIDS" refers to a beneficial prophylactic or therapeutic effect of the immunogenic composition in relation to HIV infection or AIDS symptoms. Such beneficial effects include, for example, preventing or delaying initial infection of an individual exposed to HIV; reducing viral burden in an individual infected with HIV; prolonging the asymptomatic phase of HIV infection; maintaining low viral loads in HIV infected patients whose virus levels have been lowered via anti-retroviral therapy (ART); increasing levels of CD4 T cells or lessening the decrease in CD4 T cells, both HIV-1 specific and non-specific, in drug naive patients and in patients treated with ART, increasing overall health or quality of life in an individual with AIDS; and

prolonging life expectancy of an individual with AIDS. A clinician can compare the effect of immunization with the patient's condition prior to treatment, or with the expected condition of an untreated patient, to determine whether the treatment is effective in inhibiting AIDS.

5

As used herein, the term "enhances," with respect to an immune response is intended to mean that the immunogenic composition elicits a greater immune response than does a composition containing HIV antigen alone. In the case where the immunogenic composition contains the three components HIV antigen, immunomer and adjuvant, the immunogenic composition elicits a greater immune response than does a composition containing any two of the three components of the immunogenic composition, administered in the same amounts and following the same immunization schedule. The components of the immunogenic compositions of the invention can act in synergy. An enhanced immune response can be, for example, increased production of chemokines and/or cytokines that promote memory cells, an increase in memory cells, an increase in IgG2b production, an increase in cytotoxic T lymphocyte activity, an increase in β -chemokine or IL15 production, and the like. As an example of an enhanced immune response, the immunogenic compositions of the invention can increase production of γ -interferon by both CD4 cells (helper function) and CD8 cells (cytotoxic T lymphocytes; CTLs).

20

As used herein, the term " β -chemokine" refers to a member of a class of small, chemoattractive polypeptides that includes RANTES, macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α). The physical and functional properties of β -chemokines are well known in the art.

25

In the case of enhanced β -chemokine production, the β -chemokine production can be "HIV-specific β -chemokine production," which refers to production of a β -chemokine in response to stimulation of T cells with an HIV antigen. Alternatively, or additionally, the β -chemokine production that is enhanced can be "non-specific β -chemokine production," which refers to production of a β -chemokine in the absence of stimulation of T cells with an HIV antigen.

30

As used herein, the term "kit" refers to components packaged or marked for use together. For example, a kit can contain an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant in three separate containers. Alternatively, a kit can contain any two components in one container, and a third component and any additional components in one or more separate containers. Optionally, a kit further contains instructions for combining the components so as to formulate an immunogenic composition suitable for administration to a mammal.

The invention provides an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer, and optionally an adjuvant. The immunogenic composition enhances the immune response in a mammal administered the composition. In one embodiment, the immunogenic composition enhances an HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in a mammal. In another embodiment, the immunogenic composition enhances HIV-specific CD4+ helper T cells.

In one embodiment, the HIV antigen in the immunogenic composition is a whole-killed HIV virus, which can be prepared by methods known in the art. For example, HIV virus can be prepared by culture from a specimen of peripheral blood of infected individuals. In an exemplary method of culturing HIV virus, mononuclear cells from peripheral blood (for example, lymphocytes) can be obtained by layering a specimen of heparinized venous blood over a Ficoll-Hypaque density gradient and centrifuging the specimen. The mononuclear cells are then collected, activated, as with phytohemagglutinin for two to three days, and cultured in an appropriate medium, preferably supplemented with interleukin 2 (IL2). The virus can be detected either by an assay for reverse transcriptase, by an antigen capture assay for p24, by immunofluorescence or by electron microscopy to detect the presence of viral particles in cells, all of which are methods well known to those skilled in the art.

Methods for isolating whole-killed HIV particles are described, for example, in Richieri et al., *Vaccine* 16:119-129 (1998), and U.S. Patent Nos. 5,661,023 and 5,256,767. In one embodiment, the HIV virus is an HZ321 isolate from an individual infected in Zaire

in 1976, which is described in Choi et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13:357-361 (1997).

Various methods are known in the art for rendering a virus non-infectious (see, for example Hanson, MEDICAL VIROLOGY II (1983), de la Maza and Peterson, eds., Elsevier,). For example, the virus can be inactivated by treatment with chemicals or by physical conditions such as heat or irradiation. Preferably, the virus is treated with an agent or agents that maintain the immunogenic properties of the virus. For example, the virus can be treated with beta-propiolactone or gamma radiation, or both beta-propiolactone and gamma radiation, at dosages and for times sufficient to inactivate the virus.

In another embodiment, the HIV antigen in the immunogenic composition is a whole-killed HIV virus devoid of outer envelope proteins, which can be prepared by methods known in the art. In order to prepare whole-killed virus devoid of outer envelope proteins, the isolated virus is treated so as to remove the outer envelope proteins. Such removal is preferably accomplished by repeated freezing and thawing of the virus in conjunction with physical methods which cause the swelling and contraction of the viral particles, although other physical or non-physical methods, such as sonication, can also be employed alone or in combination.

In yet another embodiment, the HIV antigen in the immunogenic composition is one or more substantially purified gene products of HIV. Such gene products include those products encoded by the gag genes (p55, p39, p24, p17 and p15), the pol genes (p66/p51 and p31-34) and the transmembrane glycoprotein gp41; and the nef protein. These gene products may be used alone or in combination with other HIV antigens. The HIV antigen can also be peptide fragments of HIV gene products that illicit an immune response.

The substantially purified gene product of HIV can be a substantially purified HIV p24 antigen or other HIV antigens and gene products. p24, as well as other HIV antigens, can be substantially purified from the virus by biochemical methods known in the art, or

can be produced by cloning and expressing the appropriate gene in a host organism such as bacterial, fungal or mammalian cells, by methods well known in the art. Alternatively, p24 antigen, or a modification or fragment thereof that retains the immunological activity of p24, as well as other HIV antigens or modifications or fragments thereof, can be synthesized, using methods well known in the art, such as automated peptide synthesis. Determination of whether a modification or fragment of p24 retains the immunological activity of p24, or other viral antigens retain their respective immunological activity, can be made, for example, by their ability to stimulate proliferation *in vitro* of previously immunized PBMCs as analyzed by conventional lymphocyte proliferation assays (LPA) known in the art (see Example III), by immunizing a mammal and comparing the immune responses so generated, or testing the ability of the modification or fragment to compete with p24 for binding to a p24 antibody, or other HIV antigens to their respective antibodies.

In still another embodiment, the HIV antigen in the immunogenic composition is a substantially purified gene product of a protease defective HIV (see U.S. patent Nos. 6,328,976 and 6,557,296).

The replication process for HIV-1 has an error rate of about one per 5-10 base pairs. Since the entire viral genome is just under 10,000 base pairs, this results in an error rate of about one base pair per replication cycle. This high mutation rate contributes to extensive variability of the viruses inside any one person and an even wider variability across populations.

This variability has resulted in three HIV-1 variants being described and around 10 subspecies of virus called "clades." These distinctions are based on the structure of the envelope proteins, which are especially variable. The M (for major) variant is by far the most prevalent world wide. Within the M variant are clades A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and K, with clades A through E representing the vast majority of infections globally. Clades A, C and D are dominant in Africa. Clade B is the most prevalent in Europe, North and South America and Southeast Asia. Clades E and C are dominant in Asia. These clades differ from one another by as much as 35%.

There are two important results from the very high mutation rate of HIV-1 that have profound consequences for the epidemic. First, the high mutation rate is one of the mechanisms that allows the virus to escape from control by drug therapies. These new viruses represent resistant strains. The high mutation rate also allows the virus to escape the patient's immune system by altering the structures that are recognized by immune components. An added consequence of this extensive variability is that the virus can also escape from control by vaccines, and vaccines based on envelope proteins will likely be non-effective.

The greatest variation in structure is seen in the envelope proteins gp120 and gp41. Less variation is seen in the various internal proteins. As disclosed herein, REMUNE is an immunogen that is made from the whole virus without its gp120 proteins but contains most of the highly conserved epitopes of the HIV-1 virus. Both the number of these epitopes and their lower incidence of mutation mean that an HIV virus devoid of outer envelope proteins such as REMUNE stimulates the immune responses that have a greater chance of success within individuals. In addition, the HuT 78 cell line was purposely infected with a very early strain of HIV virus containing both clades A and G for conserved antigens, which have been retained across most variations in clades seen worldwide, and this HuT 78 HIV infected cell line provided virus used as HIV antigen. Thus, the use of an HIV virus with multiple early clades that is also devoid of outer envelope proteins for immunization can be effective across clades by providing conserved antigens that can be recognized by most patients.

The HIV antigen and an immunomer can be mixed together, or can be conjugated by either a covalent or non-covalent linkage. Methods of conjugating antigens and nucleic acid molecules are known in the art, and exemplary methods are described in PCT publication WO 98/55495.

An oligonucleotide component of an immunomer can be prepared using methods well known in the art including, for example, oligonucleotide synthesis, PCR, enzymatic or chemical degradation of larger nucleic acid molecules, and conventional polynucleotide

isolation procedures. Methods of producing an oligonucleotide component of an immunomer, including an oligonucleotide containing one or more modified bases or linkages, are described, for example, in PCT publication WO 98/55495.

Those skilled in the art can readily determine whether a particular immunomer is effective in enhancing a desired immune response in a particular mammal by immunizing a mammal of the same species, or a species known in the art to exhibit similar immune responses, with a composition containing a particular immunomer. A variety of assays known in the art can then be used to characterize and compare the characteristics of the immune responses induced. For example, an optimized immunomer to include in an immunogenic composition for administration to a human can be determined in either a human or a non-human primata, such as a baboon, chimpanzee, macaque or monkey by evaluating its immune activity, for example, by LPA, ELISPOT, and/or ratios of IgG1/G2 antibody produced.

The immunogenic compositions of the invention can further contain an adjuvant, such as an adjuvant demonstrated to be safe in humans. An exemplary adjuvant is Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). Another exemplary adjuvant contains mycobacterium cell wall components and monophosphoryl lipid A, such as the commercially available adjuvant DETOX™. Another exemplary adjuvant is alum. The preparation and formulation of adjuvants in immunogenic compositions are well known in the art.

Optionally, the immunogenic compositions of the invention can contain or be formulated together with other pharmaceutically acceptable ingredients, including sterile water or physiologically buffered saline. A pharmaceutically acceptable ingredient can be any compound that acts, for example, to stabilize, solubilize, emulsify, buffer or maintain sterility of the immunogenic composition, which is compatible with administration to a mammal and does not render the immunogenic composition ineffective for its intended purpose. Such ingredients and their uses are well known in the art.

The invention also provides kits containing an HIV antigen, immunomer, and optionally an adjuvant. The components of the kit, when combined, produce an immunogenic composition which enhances an immune response in a mammal.

The components of the kit can be combined *ex vivo* to produce an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer and optionally an adjuvant. Alternatively, any two components can be combined *ex vivo*, and administered with a third component, such that an immunogenic composition forms *in vivo*. For example, an HIV antigen can be emulsified in, dissolved in, mixed with, or adsorbed to an adjuvant and injected into a mammal, preceded or followed by injection of immunomer. Likewise, each component of the kit can be administered separately. Those skilled in the art understand that there are various methods of combining and administering an HIV antigen, an immunomer, and optionally an adjuvant, so as to enhance the immune response in a mammal. As discussed below in more detail, an immunogenic composition of the invention can be administered locally or systemically by methods well known in the art, including, but not limited to, intramuscular, intradermal, intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, oral or other mucosal routes.

As disclosed herein, REMUNE has been found to be immunogenic in the majority of patients, although with varying degrees of potency and duration (Example VIII). Therefore, an immunogenic composition comprising HIV devoid of outer envelope proteins combined with IFA adjuvant, such as REMUNE, can be used to induce an immune response in the majority of patients infected with HIV. The immunogenic compositions of the invention enhance the strength and potency of the immune response to an HIV immunogen such as REMUNETM, thereby enhancing therapeutic and/or preventative efficacy of a vaccine. An enhanced immune response can be, for example, increased production of HIV-1 specific CD4⁺ helper T cells, chemokines and/or cytokines, an increase in memory cells, an increase in overall antibody production and more specifically in the ratio of IgG2b production, an increase in cytotoxic T lymphocyte activity, an increase in β -chemokine or IL15 production, and the like. Thus, the immunogenic compositions of the invention can be used to enhance TH1 cytokine profile (high IFN γ , high IgG2/IgG1 ratios). As disclosed herein, the components of the

immunogenic compositions of the invention can act in synergy. For example, the immunogenic compositions of the invention can enhance β -chemokine production by eliciting production of a higher concentration of β -chemokine than would be expected by adding the effects of pairwise combinations of components of the immunogenic composition.

Memory cells are needed for maintaining long term immunity following the initial acute state of infection. During the contraction phase following an initial acute stage of infection, a significant amount of the immune cells induced against the infectious agent are destroyed by apoptosis, with only the surviving cells remaining able to become memory cells. Therefore, protecting HIV-specific CD4 and CD8 T cells from apoptosis promotes an increase in both HIV-specific CD4 helper and CD8 CTL memory cells. The immunogenic compositions of the invention can be used to increase memory cells, thereby promoting long term helper functions and cell-mediated immunity. The immunogenic compositions of the invention can be used to increase the number of memory cells by decreasing apoptosis or by stimulating factors that promote survival of memory cells.

The immunogenic compositions of the invention can be used to shift a TH2 to a TH1 response, thereby increasing cell-mediated immune responses, including a stronger CD8+ response. Thus, the immunogenic compositions of the invention can be used to strengthen the immune response in a patient, who otherwise is only responding weakly, and convert the response to cell-mediated immunity. The immunogenic compositions of the invention can thus be used to increase the strength and duration of an immune response in a patient that would have responded weakly to a similar HIV antigen as that used in the immunogenic composition.

An immunogenic composition of the invention is effective in enhancing an immune response, for example, enhanced β -chemokine and/or IL15, IFN, IL2, TNF α production, increased HIV-specific CD4 helper cells, IgG2b antibody production, HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) production, IFN γ production by CD4+ cells and CD8 T cells, and the like, in a mammal administered the composition. As described in U.S. application serial No. 09/565,906, filed May 5, 2000, and WO 00/67787, each of

which is incorporated herein by reference, and in Examples I and III, below, production of the β -chemokine RANTES can be detected and quantitated using an ELISA assay of supernatants of T cells (such as lymph node cells or peripheral blood cells) from mammals administered the composition. In order to determine antigen-specific β -chemokine production, T cells from an immunized mammal can be stimulated with HIV antigen in combination with antigen-presenting thymocytes, and the β -chemokine levels measured in the supernatant. In order to determine non-specific β -chemokine production, either T cell supernatant or a blood or plasma sample from an immunized mammal can be assayed. Similarly, production of other β -chemokines, such as MIP-1 α and MIP-1 β , can be detected and quantitated using commercially available ELISA assays, according to the manufacturer's instructions.

Methods of measuring cytokine production, including inteferon, IL15, IL2, TNF α , IL10 and IL7, by ELISPOT, ELISA, or intracellular cytokine staining are well known to those skilled in the art (see, for example, Robbins et al., AIDS 17:1121-1126 (2003)).

An immunogenic composition of the invention can further be capable of enhancing HIV-specific IgG2b antibody production in a mammal administered the composition. High levels of IgG2b antibodies, which are associated with a Th1 type response, are correlated with protection against HIV infection and progression to AIDS. Thus, the invention provides compositions that can increase a TH1 response.

An immunogenic composition of the invention can further be capable of enhancing HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses in a mammal administered the composition. An immunogenic composition of the invention can increase IFN- γ production by both CD4+ T cells and CD8+ T cells.

IFN- γ production by CD4+ T cells is characterized as a classic CD4 helper response important to cell-mediated immunity. CD4+ T cells producing both IFN and IL2 may be most effective. IFN- γ production by CD8+ T cells is representative of a cytotoxic T lymphocyte (CTL) response, and is highly correlated with cytolytic activity. Cells producing both IFN and TNF α may be most effective. CTL activity is an important

component of an effective prophylactic or therapeutic anti-HIV immune response.

Methods of determining whether a CTL response is enhanced following administration of an immunogenic composition of the invention are well known in the art, and include cytolytic assays and LPA assays (described, for example, in Deml et al. *supra* (1999); see Example III), and ELISA and ELISPOT assays for CD8-specific IFN- γ production (see U.S. application serial No. 09/565,906 and WO 00/67787 and Examples I and II below), intracellular staining and FACS analysis using a myriad of antibodies against cell surface markers.

The invention also provides a method of immunizing an individual. The method consists of enhancing the immune response in an individual by administering to a mammal an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer, and optionally an adjuvant. The components of the immunogenic composition can be administered in any order or combination, such that the immunogenic composition is formed *ex vivo* or *in vivo*.

In a particular embodiment, the HIV antigen, immunomer and optional adjuvant are administered simultaneously or at about the same time, in about the same site. However, administering the components within several minutes or several hours of each other can also be effective in providing an immunogenic composition that an immune response. Additionally, administering the components at different sites in the mammal can also be effective in providing an immunogenic composition that enhances an immune response. One skilled in the art can readily determine a suitable time and location to separately administer components, that is, the HIV antigen, immunomer and optional adjuvant components, to provide a sufficient immune response by administering the separate components at various times and locations and measuring the immune response. The immunogenic composition can also be administered multiple times, if desired, for example, 2 or more, 3 or more, 4 or more, 5 or more, 6 or more, 7 or more, 8 or more, 9 or more, or 10 or more, or any desired number of times to stimulate or enhance an HIV-specific immune response.

The immunogenic compositions of the invention can be administered to a human to inhibit AIDS, such as by preventing initial infection of an individual exposed to HIV, reducing viral burden in an individual infected with HIV, prolonging the asymptomatic phase of HIV infection, increasing overall health or quality of life in an individual with AIDS, or prolonging life expectancy of an individual with AIDS. As disclosed herein, administration to a mammal of an immunogenic composition containing an HIV antigen, an isolated nucleic acid molecule containing an immunomer, and optionally an adjuvant stimulates immune responses correlated with protection against HIV infection and progression to AIDS.

In particular, the immunogenic compositions enhance the immune response more effectively than would be expected by combination of any of the individual components or, in a three component composition containing HIV antigen, immunomer and adjuvant, any two components of the immunogenic compositions. Additionally, the immunogenic compositions promote strong Th1 type immune responses, including both Th1 type cytokines (for example, IFN- γ) and Th1 type antibody isotypes (for example, IgG2b). Thus, the immunogenic compositions of the invention will be effective as vaccines to prevent HIV infection when administered to seronegative individuals, and to reduce viral burden, prolong the asymptomatic phase of infection, and positively affect the health or lifespan of a seropositive individual.

Individuals who have been exposed to the HIV virus usually express in their serum certain antibodies specific for HIV. Such individuals are termed "seropositive" for HIV, in contrast to individuals who are "seronegative." The presence of HIV specific antibodies can be determined by commercially available assay systems.

At the present time, serological tests to detect the presence of antibodies to the virus are the most widely used method of determining infection. Such methods can, however, result in both false negatives, as where an individual has contracted the virus but not yet mounted an immune response, and in false positives, as where a fetus may acquire the antibodies, but not the virus from the mother. Where serological tests provide an indication of infection, it may be necessary to consider all those who test seropositive as in

fact, being infected. Further, certain of those individuals who are found to be seronegative may in fact be treated as being infected if certain other indications of infection, such as contact with a known carrier, are satisfied.

The immunogenic compositions of the invention can be administered to an individual who is HIV seronegative or seropositive. In a seropositive individual, it may be desirable to administer the composition as part of a treatment regimen that includes treatment with anti-viral agents, such as protease inhibitors. Anti-viral agents and their uses in treatment regimens are well known in the art, and an appropriate regimen for a particular individual can be determined by a skilled clinician.

As described in U.S. application serial No. 09/565,906 and WO 00/67787 and disclosed herein and in Example IV, below, administration of the immunogenic compositions of the invention to a primate fetus or to a primate neonate results in the generation of a strong anti-HIV immune response, indicating that the immune systems of fetuses and infants are capable of mounting an immune response to such compositions which should protect the child from HIV infection or progression to AIDS. Accordingly, the immunogenic compositions of the invention can be administered to an HIV-infected pregnant mother to prevent HIV transmission to the fetus, or to a fetus, an infant, a child or an adult as either a prophylactic or therapeutic vaccine.

The dose of the immunogenic composition, or components thereof, to be administered in the methods of the invention is selected so as to be effective in stimulating the desired immune responses. Generally, an immunogenic composition formulated for a single administration contains between about 1 to 200 μ g of protein antigen. An immunogenic composition generally contains about 100 μ g of protein antigen for administration to a primate, such as a human. As described in U.S. application serial No. 09/565,906 and WO 00/67787 and disclosed herein and shown in Example IV, below, about 100 μ g of HIV antigen in an immunogenic composition elicits a strong immune response in a primate. About 10 μ g of HIV antigen is suitable for administration to a rodent. One skilled in the art can readily determine a suitable amount of HIV antigen to

include in an immunogenic composition of the invention sufficient to stimulate an immune response.

The immunogenic compositions of the invention can further contain from about 5 μg to about 100 μg of an immunomer, and can contain up to 10 mg of immunomer, if
5 desired. For example, in a dose for administration to a human, the dose can be about 0.01 mg to about 5 mg, for example, about 0.05 mg, about 0.1 mg, about 0.2 mg, about 0.3 mg, about 0.4 mg, about 0.5 mg, about 0.6 mg, about 0.7 mg, about 0.8 mg, about 0.9 mg, about 1 mg, about 1.1 mg, about 1.2 mg, about 1.3 mg, about 1.4 mg, about 1.5 mg, about 1.7 mg, or about 2 mg. The amount of immunomer to be administered is generally about
10 0.1 mg/kg to about 0.25 mg/kg up to about 5 mg/kg, and can be, for example, about 0.2, about 0.3, about 0.4, about 0.5, about 0.6, about 0.7, about 0.8, about 0.9, about 1, about 1.2, about 1.5, about 1.7, about 2, about 2.5, about 3, about 3.5, about 4, about 4.5, or about 5 mg/kg. The amount of immunomer can also be about 0.2 $\mu\text{g/kg}$, about 0.5 $\mu\text{g/kg}$, about 1 $\mu\text{g/kg}$, about 2 $\mu\text{g/kg}$, about 3 $\mu\text{g/kg}$, about 4 $\mu\text{g/kg}$, about 5 $\mu\text{g/kg}$, about 6 $\mu\text{g/kg}$,
15 about 7 $\mu\text{g/kg}$, about 8 $\mu\text{g/kg}$, about 9 $\mu\text{g/kg}$, about 10 $\mu\text{g/kg}$, about 11 $\mu\text{g/kg}$, about 12 $\mu\text{g/kg}$, about 13 $\mu\text{g/kg}$, about 14 $\mu\text{g/kg}$, about 15 $\mu\text{g/kg}$, about 16 $\mu\text{g/kg}$, about 17 $\mu\text{g/kg}$, about 18 $\mu\text{g/kg}$, about 19 $\mu\text{g/kg}$, about 20 $\mu\text{g/kg}$, about 22 $\mu\text{g/kg}$, about 25 $\mu\text{g/kg}$ and the like. As described previously in U.S. application serial No. 09/565,906 and WO
00/67787, a ratio of at least 5:1 by weight of nucleic acid molecule to HIV antigen was
20 more effective than lower ratios for eliciting immune responses. One skilled in the art can readily determine an appropriate or optimized ratio of immunomer to HIV antigen for eliciting an immune response. For example, the ratio can be varied and the immune response measured by methods disclosed herein to determine a suitable or optimized ratio of immunomer to HIV antigen. In rodents, an effective amount of an immunomer in an
25 immunogenic composition is from 5 μg to greater than 50 μg , such as about 100 μg . In primates, about 500 μg of an immunomer is suitable in an immunogenic composition. Those skilled in the art can readily determine an appropriate amount of immunomer to elicit a desired immune response.

As with all immunogenic compositions, the immunologically effective amounts are
30 determined empirically, but can be based, for example, on immunologically effective

amounts in animal models, such as rodents and non-human primates. Factors to be considered include the antigenicity, the formulation (for example, volume, type of adjuvant), the route of administration, the number of immunizing doses to be administered, the physical condition, weight and age of the individual, and the like. Such factors are well known in the vaccine art and it is well within the skill of immunologists to make such determinations without undue experimentation.

The immunogenic compositions of the invention can be administered locally or systemically by any method known in the art, including, but not limited to, intramuscular, intradermal, intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, oral or other mucosal routes. The immunogenic compositions can be administered in a suitable, nontoxic pharmaceutical carrier, or can be formulated in microcapsules or as a sustained release implant. The immunogenic compositions of the invention can be administered multiple times, if desired, in order to sustain the desired immune response. The appropriate route, formulation and immunization schedule can be determined by those skilled in the art.

It is understood that modifications which do not substantially affect the activity of the various embodiments of this invention are also included within the definition of the invention provided herein. Accordingly, the following examples are intended to illustrate but not limit the present invention.

20

EXAMPLE I

Elicitation of cytokine, antibody and chemokine responses by HIV immunogenic compositions

This example is designed to show that immunogenic compositions containing an HIV antigen, immunomer and an adjuvant, are potent stimulators of IFN- γ production (a Th1 (CD8) and Th2 (CD4 helper) cytokine), antibody responses and β -chemokine production in a mammal. Therefore, immunogenic compositions containing an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant mediate potent immune responses of the types that are important in protecting against HIV infection and disease progression, indicating that these compositions will be effective prophylactic and therapeutic vaccines.

Immunomers. Immunomers are synthesized as described previously (Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. 9:807-813 (2001); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30:4460-4469 (2002); Yu et al., Bioorg. Med. Chem. 11:459-464 (2003); Bhagat et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 300:853-861 (2003); and Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297:83-90 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30:1613-1619 (2002); Yu et al., J. Med. Chem. 45:4540-4548 (2002); Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13:966-974 (2002); Yu et al., Bioorganic Med. Chem. Lett. 10:2585-2588 (2000); Agrawal and Kandimalla, Trends Mol. Med. 8:114-121 (2002)).

Immunizations. The HIV-1 antigen is prepared essentially as described previously (WO 00/67787). Briefly, the HIV-1 antigen is prepared from virus particles obtained from cultures of a chronically infected Hut 78 with a Zairian virus isolate (HZ321) which has been characterized as subtype "M," containing an env A/gag G recombinant virus (Choi et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13:357-361 (1997)). The gp120 is depleted during the two-step purification process. The antigen is inactivated by the addition of β -propiolactone and gamma irradiation at 50 kGy. Western blot and HPLC analysis is used to show undetectable levels of gp120 in the preparation of this antigen (Prior et al., Pharm. Tech. 19:30-52 (1995)). For *in vitro* experiments, native p24 is preferentially lysed from purified HIV-1 antigen with 2% triton X-100 and then purified with Pharmacia Sepharose™ Fast Flow S resin. Chromatography is carried out at pH = 5.0, and p24 is eluted with linear salt gradient. Purity of the final product is estimated and is generally found to be >99% by both SDS (sodium dodecyl sulfate) electrophoresis and reverse phase high pressure liquid chromatography. The immunomer is added to the diluted HIV-1 antigen in a volume of at least 5% of the final volume.

CFA (complete Freund's adjuvant) is prepared by resuspending mycobacterium tuberculosis H37RA (DIFCO, Detroit, Michigan) at 10 mg/ml in IFA (DIFCO, Detroit, Michigan). IFA or ISA 51® is formulated by adding one part of the surfactant Montanide 80 (high purity mannide monoleate, Seppic, Paris) to nine parts of Drakeol 6 VR light mineral oil (Panreco, Karnes City, Pennsylvania). The gp120-depleted HIV-1 antigen is

33
diluted in PBS to 200 µg/ml and emulsified with equal volumes of CFA or IFA with or without immunomer.

C57B1 mice, maintained in a pathogen-free facility, are injected intradermally with 100 µl of emulsion. Each animal receives 1-10 µg of the inactivated HIV-1 antigen in either CFA, IFA, 10-100 µg immunomer, or IFA plus 10-100 µg immunomer. Two weeks later, the animals are boosted subcutaneously in the base of the tail using the same regimen, except that the animals primed with HIV-1 antigen in CFA are instead boosted with HIV-1 antigen in IFA. Mice are primed and boosted with HIV-1 antigen in the presence of immunomer. Negative controls are administered as saline or IFA in saline. On day 28, the animals are sacrificed for cytokine, chemokine, and antibody analysis.

ELISA for antigen-specific antibody. Whole blood is collected from immunized animals by heart puncture at the end of the study. The SST tubes are centrifuged at 800 rpm for 20 minutes. Sera are aliquoted and stored at -20°C until assayed. PVC plates (polychlorinated biphenyl plates, Falcon, Oxnard, California) are coated with native p24 diluted in PBS at 1 µg/ml and stored at 4°C overnight. Plates are blocked by adding 200 µl per well of 4% BSA in PBS for 1 hour. Sera are diluted in 1% BSA in PBS at 1:100 followed by four-fold serial dilution. 100 µl of diluted sera are added in duplicate and incubated at room temperature for 2 hours. Plates are washed with 0.05% Tween 20 in PBS three times and blotted dry. The detecting secondary antibodies (goat or rat anti-mouse IgG biotin, goat or rat anti-mouse IgG1 biotin, or goat or rat anti-mouse IgG2a biotin, for example, Zymed, San Francisco, California) are diluted in 1% BSA in PBS. 100 µl of diluted secondary antibody is added to each well and incubated at room temperature for another hour. After washing excess secondary antibody, strep-avidin-biotin-HRP (Pierce, Rockford, Illinois) are added at 50 µl per well and incubated for 30 minutes. Plates are washed with 0.05% Tween 20 in PBS three times. ABTS substrate (KPL, Gaithersburg, Maryland) is added until a bluish-green color developed. The reaction is stopped by the addition of 1% SDS and the plate is read at absorbance 405 nm.

The antibody response reported as 50% antibody titer is the reciprocal of the dilution equal to 50% of the maximum binding (highest optical reading) for every given

34

sample. The absorbance value (OD @ 405 nm) is plotted against antibody dilution in a log scale, yielding a sigmoidal dose response curve. 50% of the maximum binding is calculated by multiplying the highest OD by 0.5. The 50% value is located on the curve and the corresponding x-axis value is reported as the antibody dilution.

- 5 ELISA Assay for Cytokine and Chemokine Analysis. The draining lymph nodes (superficial inguinal and popliteal) are isolated from immunized animals two weeks after the boost. Single cell suspensions from these lymph nodes are prepared by mechanical dissociation using sterile 70 μ m mesh screen. T cells are purified from lymph node cells by the panning method. Briefly, petri dishes (100 x 15mm) are pre-coated with 20 μ g/ml
- 10 of rabbit anti-mouse IgG for 45 minutes at room temperature. The petri dishes are washed twice with ice cold PBS and once with ice cold 2% human AB serum in PBS. 1×10^7 lymph node cells are added to pre-washed plates and incubated at 4°C for 90 minutes. The non-adherent cells (enriched T cells) are then collected and transferred into sterile 50-ml conical tubes. The plates are washed twice and combined with the non-adherent cells.
- 15 The cells are then centrifuged and cell pellets resuspended in complete media at 4×10^6 cells/ml (5% human AB serum in RPMI 1640, with 25 mM hepes, 2mM L-glutamine, 100 μ g streptomycin and 5×10^{-6} M β -mercaptoethanol).

- Gamma-irradiated thymocytes from a C57BL mouse are used as antigen presenting cells. 2×10^5 enriched T cells and 5×10^5 thymocytes are added to each well of a 96-round
- 20 bottom plate. The HIV-1 antigen and native p24 are diluted in complete media at 10 μ g/ml while con A is diluted to 5 μ g/ml. 100 μ l of each antigen or T cell mitogen are added in triplicates. The plates are incubated at 5% CO₂, 37°C for 72 hours. Supernatants are harvested and stored at -70°C until assayed. The samples are assayed for IL-4, IFN- γ and RANTES using commercially available kits (for example, Biosource, Camarillo,
- 25 California) specific for mouse cytokines and chemokines.

Statistical methods. The Mann-Whitney U nonparametric statistic is utilized to compare groups. All p values are two tailed.

Complete Freund's Adjuvant (CFA) is currently the most potent adjuvant known for stimulating cell-mediated immune responses. However, CFA is not an appropriate adjuvant for use in humans because of safety issues. Thus, the combination of immunomer and IFA for use in an HIV immunogenic composition provides for safe and effective vaccines for human therapy.

To examine the dose-related immune response to IFN- γ , C57BL mice are immunized with the inactivated gp120-depleted HIV-1 antigen emulsified in IFA containing different concentrations of immunomer.

To examine whether can also boost the antibody response to an HIV-1 antigen, sera are assayed for total IgG and Th2 isotype (IgG1 and IgG2a) antibody responses to p24 antigen.

Thus, the immunogenic compositions of the invention can be used to enhance β -chemokine production in an individual. Because of the strong correlation between β -chemokine levels and protection from HIV infection and disease progression, the compositions of the invention will be more effective than other described compositions for inhibiting AIDS.

EXAMPLE II

Elicitation of CD4 and CD8 immune responses by HIV immunogenic compositions

This example is designed to show the induction of potent CD4 helper functions, CD8 HIV-specific Th1 type immune responses, and a shift to higher IgG2a/IgG1 antibody ratios following immunization with an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant. Antigen-specific responses by CD8+, cytotoxic T lymphocytes are an important factor in preventing initial HIV infection and disease progression. Thus, this example provides further evidence that the immunogenic compositions of the invention are effective prophylactic and therapeutic vaccines.

HIV antigen, immunomer and IFA are prepared essentially as described in Example I. C57BL mice are immunized essentially as described in Example I, and sacrificed at day 28 for ELISPOT and p24 antibody analysis. p24 antibody analysis is performed essentially as described in Example I.

- 5 ELISPOT for gamma-interferon from bulk and purified T cell populations. Single cell suspensions are prepared from spleens of the immunized mice by mincing and pressing through a sterile fine mesh nylon screen in RPMI 1640 (Hyclone, Logan, Utah). The splenocytes are purified by ficoll gradient centrifugation. CD4 and CD8 cells were isolated by magnetic bead depletion. 2×10^7 cells are stained with $5 \mu\text{g}$ of either rabbit or
10 rat anti-mouse CD4 or rabbit or rat anti-mouse CD8. Cells are incubated on ice for 30 minutes and washed with ice cold 2% Human AB serum in PBS. Pre-washed Dynabeads (DYNAL, Oslo, Norway) coated with goat anti-mouse IgG are added to the cell suspension and incubated at 4°C for 20 minutes with constant mixing.

- Purified CD4, CD8 and non-depleted splenocytes are resuspended in complete
15 media (5% inactivated Human AB serum in RPMI 1640, Pen-strep, L-glutamine and β -ME) at 5×10^6 cells/ml and used for ELISPOT assay to enumerate the individual IFN- γ secreting cells. Briefly, 96 well nitrocellulose bottom microtiter plates (Millipore Co., Bedford, U.K.) are coated with 400 ng per well of rabbit anti-mouse IFN- γ (Biosource, Camarillo, California). After overnight incubation at 4°C , plates are washed with sterile
20 PBS and blocked with 5% human AB serum in RPMI 1640 containing pen-strep, L-glutamine and β -ME) for 1 hour at room temperature. Plates are washed with sterile PBS and 5×10^5 per well of splenocytes (purified CD4, purified CD8 or non-depleted) were added in triplicate and incubated overnight at 37°C and 5% CO_2 . Cells are cultured with media, OVA (Chicken Egg Ovalbumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), native p24 or
25 gp120-depleted HIV-1 antigen. CD4 purified and CD8 purified splenocytes are assayed in complete media containing 20 units/ml of recombinant rat IL-2 (Pharmingen, San Diego, CA).

After washing unbound cells, 400 ng per well of the polyclonal rabbit anti-mouse IFN- γ are added and incubated at room temperature for 2 hours, then washed and stained

with goat anti-rabbit IgG biotin (Zymed, San Francisco, California). After extensive washes with sterile PBS, avidin alkaline phosphatase complex (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) is added and incubated for another hour at room temperature. The spots are developed by adding chromogenic alkaline phosphate substrate (Sigma, St. Louis, MO), and the IFN- γ cells are counted using a dissection microscope (X 40) with a highlight 3000 light source (Olympus, Lake Success, NY).

Statistical Methods. The Mann-Whitney U nonparametric statistic is utilized to compare groups. The Spearman rank correlation is performed to examine relationships between CD4 and CD8 gamma interferon production. All p values are two tailed.

10 The production of IFN- γ by non-depleted splenocytes, and by purified CD4+ or purified CD8+ populations, is examined. IFN- γ production by CD4+ cells is a characteristic Th1 immune response, whereas IFN- γ production by CD8+ cells is a correlate of cytotoxic T lymphocyte (CTL) cytolytic activity. Total IgG, IgG1 and IgG2b specific for p24 is also examined.

15 In summary, this Example shows that an immunogenic composition containing an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant can be used to generate potent HIV-specific CD4 and CD8 HIV-specific immune responses. The induction of CD4 T helper cells may be pivotal for generation of CD8 effector cells. CD8 T cells can serve as effectors against HIV virus by several mechanisms, including direct cytolytic (CTL) activity, as well as
20 through the release of antiviral suppressive factors, such as β -chemokines and other less well-characterized factors. Accordingly, the compositions described herein are superior to other described compositions for use as HIV vaccines.

83

EXAMPLE III

Comparison of immune responses elicited by different immunogenic compositions and immunization schedules

5 This example is designed to show that a nucleic acid containing an immunomer is more effective in eliciting protective immune responses, including RANTES production and HIV-specific IgG2b antibody production, when administered simultaneously with an HIV antigen and an adjuvant than when used to prime the mammal one week prior to administration of the antigen and adjuvant. This example also shows that a composition containing an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant promotes antigen-dependent lymphocyte proliferation more effectively than a composition containing only HIV and IFA.

 HIV antigen, immunomers and IFA are prepared essentially as described in Example I. C57bBL mice (at least three per group) are immunized at day 7 and, where indicated, primed at day 0, with the following compositions shown in Table 1.

15 **Table 1**

Group	Day 0	Day 7
A	Immunomer	HIV-1
B		HIV-1
C	Immunomer	HIV-1/IFA
20 D		HIV-1/IFA
E		HIV-1/IFA/Immunomer

 Animals are sacrificed at day 21 for cytokine, chemokine and antibody analysis, essentially as described in Example I, as well as for analysis of lymphocyte proliferation.

25 Lymphocyte proliferation assay. Single cell suspensions are prepared from the draining lymph nodes of immunized animals. B cells are depleted from the lymph node cells by

panning. Briefly, lymph node cells are incubated with anti-mouse IgG pre-coated petri dishes for 90 minutes. The non-adherent cells (enriched T cells) are collected and resuspended in complete tissue culture media at 4×10^6 cells/ml. The enriched T cells are cultured with p24 or HIV-1 antigen in the presence of γ -irradiated thymocytes at 37°C, 5% CO₂ for 40-48 hours. Samples are pulsed with tritiated thymidine and incubated for another 16 hours. Cells are harvested, and tritiated thymidine incorporation is counted using a β -scintillation counter.

Cytokine production in T cells, for example, IFN- γ and β -chemokines such as RANTES, MIP-1 β and MIP-1 α is determined using methods well known to those skilled in the art. Serum levels of total IgG, IgG1 and IgG2b specific for p24 are also examined. In addition, T cell proliferative responses to p24 antigen and gp120-depleted HIV are examined.

Thus, the immunogenic compositions of the invention can effectively elicit HIV-specific Th1 cytokine (IFN- γ) and humoral responses (IgG2 antibodies), and can enhance both non-specific and HIV-specific β -chemokine production. These responses to the immunogenic compositions correlate with strong HIV-specific T lymphocyte proliferative responses.

EXAMPLE IV

Immunization of a primate with an HIV immunogenic composition

This example is designed to show that immunogenic compositions containing an HIV antigen, an immunomer and an adjuvant are effective in enhancing HIV-specific immune responses in primates.

Three baboon fetuses are injected *in utero* with an immunogenic composition containing gp120-depleted HIV-1 (100 μ g total protein, equivalent to 10 p24 units) in IFA with 500 μ g of immunomer. Four weeks later, the fetuses are boosted using the same regimen.

Peripheral blood mononuclear cells from the neonatal baboons are collected, and proliferative responses to p24 and HIV-1 antigen are assayed.

Production of HIV-specific antibodies, cytokines and β -chemokines are also measured in the same baboons. These results show that the types of immune responses elicited by the immunogenic compositions described in Examples I-III, above, for rodents, are also elicited in primates.

These results demonstrate that the HIV immunogenic compositions and methods of the invention are effective in primates in stimulating HIV-specific immune responses. Furthermore, these results demonstrate that fetuses and infants are able to elicit strong HIV immune responses to the immunogenic compositions of the invention, indicating that these compositions will be useful for preventing maternal transmission of HIV and as pediatric vaccines.

EXAMPLE V

Immune response to vaccination with inactivated gp120 depleted HIV immunogen combined with immunomer in a mouse model

This example describes characterization of the ability of an immunomer to enhance the immunogenicity of HIV-1 antigen and HIV-1 Immunogen (antigen emulsified in IFA) in a mouse model.

C57BL/6 mice (6-8 weeks of age) are injected as indicated below. The number per group is generally at least 8-10 mice.

- 1) PBS
- 2) Immunomer at 30 μ g per mouse = 1.5mg/kg
- 3) Immunomer (highest dose of 90 μ g) = 4.5 mg/kg
- 4) HIV-1 immunogen (10 μ g)
- 5) HIV-1 immunogen + Immunomer (10 μ g, 30 μ g, 90 μ g)
- 6) HIV-1 immunogen + Immunomer 30 μ g

The gp120 depleted HIV-1 antigen is diluted in phosphate buffered saline (PBS) to concentration of 200 µg/ml and emulsified in equal volumes of IFA, with and without of immunomer. The immunomer is added to the diulted HIV-1 antigen prior to emulsion in a volume of at least 5% of the final volume.

- 5 An initial single intradermal injection is performed at time 0 followed by intradermal injection after 2 weeks. The mice are sacrificed 2 weeks after the booster injection. The HIV-1 immunogen used is inactivated gp120 depleted HIV-1 antigen in IFA.

- 10 Immunological analyses. Fresh splenic mononuclear cells are isolated and stimulated *in vitro* for 4 days (Davis et al., *J. Immunol.* 160:870-876 (1998). The isolated cells are stimulated in medium alone; with native p24 antigen; or with HIV-1 antigen.

- The production of various cytokines are evaluated using ELISA methods. Exemplary cytokines to be assayed include, for example, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-10, MIP1 α , MIP1 β , RANTES, α -defensin as disclosed herein and described previously, and
15 are assayed by methods well known to those skilled in the art.

P24 antigen- and HIV-1 antigen-specific IFN γ production in CD4 and CD8 lymphocytes is evaluated in ELISPOT assays, as described in Examples I and II.

P24 antigen-, HIV-1 antigen, and LPS-specific lymphocyte proliferation are evaluated in a standard proliferation assay using well known methods.

EXAMPLE VI**In vitro effect of immunomer on HIV specific immune response generated by PBMCs from HIV-infected patients previously immunized with HIV-1 immunogen**

5 This example describes evaluation of the ability of an immunomer to increase HIV-specific immune responses *in vitro* in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients who have been treated with inactivated gp120 depleted HIV-1 antigen in IFA (REMUNE).

10 The following groups of patients are examined: 15 HIV-infected, HAART + REMUNE-treated patients; 15 HIV-infected, HAART-treated patients. The patients are matched for disease duration, CD4 counts, HIV viremia, and absence/presence of protease inhibitor (PI). Whole blood (530 ml) is drawn by venipuncture in EDTA-containing tubes for subsequent analysis. Immunomer is added to the PBMCs at the following concentrations: 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml.

15 Responses specific to various antigens are measured, for example, HIV antigens p24 antigen, HIV-1 antigen, env peptides, gag peptides; and flu (control antigen). Other HIV antigens can also be measured, if desired. Antigen-specific IFN γ -production in CD4 and CD8 lymphocytes is evaluated in ELISPOT assays, as described in Examples I and II. Antigen-specific lymphocyte proliferation is also evaluated in a standard proliferation assay.

20 The production of RANTES, α defensin is evaluated by intracellular staining in CD8+ with fluorescence activated cell sorting (FACS) methods. If desired, other cytokines or other cell types can be assayed.

EXAMPLE VII**In vivo effect of immunomer on HIV specific immune response in
a Trimera murine model**

This example describes the use of a Trimera mouse model for determining the effect of an HIV immunogenic composition containing immunomers.

- A Trimera mouse model is used to test the effect of immunomers when combined with an HIV antigen. Both induced immune responses as well as protective immunity can be monitored. Trimera mice are generated as described previously (Reisner and Dagan, Trends Biotechnol. 16:242-246 (1998); Ilan et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 4:102-109 (2002); U.S. Patent No. 6,254,867; WO 97/47654). Briefly, a normal mouse host is rendered immuno-incompetent by a lethal split-dose total body irradiation. The mice are then radioprotected by T-cell-depleted murine SCID bone marrow and converted to Trimera mice by intraperitoneal injection of human peripheral blood mononuclear leukocytes (PBMCs). Engraftment of the human cells in the Trimera mice is verified by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis of human T cell markers such as CD3 or others.
- Trimera mice are infected with HIV as a model of AIDS. Briefly, Trimera mice are infected with one or more strains of HIV-1. Control animals are Trimera mice injected with medium only (without HIV-1) and mice not injected with PBMCs. Mice are evaluated at various time points for HIV-1 infection by determining the levels of plasma HIV-1 RNA, the presence of proviral DNA, and active virus in coculture experiments. The presence of proviral HIV-1 DNA is demonstrated by PCR of an HIV-1 sequence such as gag.

- To test an immunogenic composition containing an immunomer for stimulation of an immune response, Trimera mice are injected with gp120-depleted HIV-1, with or without at least one immunomer and with or without adjuvant. Various ratios of antigen and immunomer can be used, for example, as described in Example V, and tested for an optimized immune response. Alternatively, the compositions above are pulsed into human

autologous monocyte-derived dendritic cells (DCs), and these DCs are injected into the Trimera mice. Optionally, the mice can be boosted with a similar composition.

Following immunization, blood and peritoneal lymphocytes are collected. The presence of immunoglobulins specific for HIV antigens is determined. In addition,
5 specific cellular anti-HIV responses are determined in human lymphocytes isolated from the mice. For example, IFN γ production in human lymphocytes recovered from Trimera mice is determined following exposure to HIV-1 antigens. The enhanced immunogenic response to HIV antigen in the presence of immunomer is determined.

Protective immunity is monitored in a similar fashion, except that mice are
10 immunized with the various compositions prior to inoculation with infective HIV. The ability of the various compositions to influence the level of ensuing viremia is measured, as described above. The most efficacious vaccine is the one providing the most effective control of circulating virus and/or prolonging survival.

EXAMPLE VIII

Immunization of HIV infected patients with REMUNE™

This example describes immunization of HIV infected patients with REMUNE™
15 (GP120 depleted HIV-1 antigen in IFA) and demonstrates that the majority of patients can mount immune responses, although at variable strengths and durations. The objective of this particular study was to evaluate HIV-1 specific immunologic responses following treatment with REMUNE in combination with highly active retroviral therapy (HAART) (indinavir /ZDV /3TC) compared to Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) plus HAART.

20 The study protocol was a randomized, double blind, two arm, parallel group, adjuvant controlled, multicentre study. The number of subjects (total and for each treatment) was 52 patients randomized, with 43 evaluable patients in intent to treat analysis (22 REMUNE + HAART; 21 IFA + HAART). The diagnosis and criteria for inclusion was HIV-1 infected patients with CD4 counts >350 cells/ μ L with no previous
25 use of HIV protease inhibitors or lamivudine (3TC). The test product, dose, and mode of

administration were REMUNE (HIV-1 Immunogen); 10 units (equal to 10 µg/ml p24 content), volume of 1.0 ml given IM (batch No. 8155-015 and 8155-017). For duration of treatment, patients received HAART for 32 weeks. REMUNE or IFA placebo (control) was given at weeks 4, 16 and 28. The reference therapy, dose, and mode of administration were adjuvant controlled; IFA placebo was used (batch nos: 8144-006 and 8160-005).

The primary efficacy criteria was lymphocyte proliferative (LP) responses to HIV-1 antigen stimulation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Secondary efficacy criteria included LP response to native p24 and BaL HIV-1 antigen stimulation in PBMC; chemokine response to native p24 and HIV antigen stimulation in PBMC; gag CTL activity (in a subset of patients); changes in CD4 cell count and percent CD4; changes in viral load measured as plasma RNA and PBMC DNA; and DTH skin test response to HIV-1 and p24 antigens. The statistical methods used were Fisher's Exact Test (two-tailed) in an intent-to-treat analysis and two-sided Mann-Whitney test.

The primary analysis defined response rate as stimulation index (SI) to HIV-1 antigen five fold over baseline at two time points. Results showed that there were 14/22 (64%) responders in the REMUNE + HAART group and 4/21 (19%) responders in the IFA + HAART group ($p=0.005$). Secondary analyses defined response rate as SI to BAL type HIV-1 antigen and/or p24 antigen three fold over baseline at two time points. Results showed there were 15/22 (68%) responders in the REMUNE + HAART group and 5/21 (24%) responders in the IFA + HAART group ($p=0.006$). The magnitude of the LP response to HIV-1 (HZ321) antigen among subjects receiving REMUNE + HAART was greater than among those receiving IFA + HAART ($p=0.0028$), defined as the ratio for each subject of the geometric mean SI measured after the first injection to the geometric mean of pretreatment values.

There was a statistically significant greater LP response rate to native p24 ($p=0.0002$) and to HIV-1 BaL antigen ($p=0.007$) in the REMUNE + HAART compared to IFA + HAART group. There were no differences in LP response to recall antigens (candida, streptokinase, tetanus) between the two groups. MIP-1 β production by PBMC stimulated with HIV-1 antigen was significantly augmented in the REMUNE + HAART

group ($p=0.0007$ at week 32) compared to the IFA + HAART group. There was a greater DTH skin test response rate in the REMUNE + HAART group compared to the IFA + HAART group for HIV-1 (53% vs. 9%) and native p24 antigens (47% vs. 0%).

5 The administration of REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir resulted in a significant stimulation of lymphocyte proliferation (LP) responses to HIV-1 antigen in terms of both the number of responders and magnitude of the response. For response rate, defined as stimulation index to HIV-1 antigen five-fold over baseline at two time points, there was a significantly higher number of responders ($p=0.005$) in the REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir group (14/22, 64%) than in the IFA plus ZDV/3TC/indinavir group
10 (4/21, 19%).

A high percentage of subjects receiving REMUNE generated strong LP response to native p24 antigen, demonstrating that REMUNE can generate responses specifically to the more conserved core antigens of HIV. Treatment with IFA did not stimulate HIV-1 specific immune responses to any antigen. REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir produced
15 a significantly higher lymphocyte proliferation response rate to purified native p24 ($p=0.0002$).

Administration of REMUNE stimulated LP responses to the HIV-1 (HZ321) immunizing antigen as well as to an HIV-1 antigen that is clade B, HIV-1 BaL antigen, demonstrating that the immune responses generated by REMUNE are cross-clade and not
20 limited to the immunizing agent. REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir produced a significantly higher lymphocyte proliferation response rate to HIV-1 BaL antigens ($p=0.007$) compared to IFA plus ZDV/3TC/indinavir.

The production of antigen stimulated MIP-1 β was significantly increased in the REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir group throughout the study ($p=0.0007$ at week 32)
25 and did not change in the IFA plus ZDV/3TC/indinavir group during the study. Subjects in both groups showed significant increases in CD4 cell count and significant decreases in plasma HIV RNA and proviral HIV DNA copy number. There was a trend of less risk of relapse in the REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir group in an analysis of time to HIV

RNA relapse; 6/22 (27%) of REMUNE plus ZDV/3TC/indinavir subjects relapsed between Week 16 and 32 versus 12/21 (57%) of the IFA plus ZDV/3TC/indinavir subjects ($p=0.08$ by log-rank test). A stronger, more durable response is expected by administering immunogenic compositions of the invention that include an HIV antigen such as

5 REMUNE and one or more immunomers.

These results demonstrate that REMUNE stimulates an immune response in the majority of patients.

EXAMPLE IX

Immunization of HIV infected patients with REMUNE™ and Immunomers

This example describes immunization of HIV infected patients with REMUNE and immunomers.

A study is conducted with the objective of evaluating HIV-1 specific immunologic responses following treatment with REMUNE in combination with immunomers and/or

10 highly active retroviral therapy (HAART) (indinavir /ZDV /3TC) compared to Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) plus immunomers and/or HAART.

The methodology uses a randomized, double blind, two arm, parallel group, adjuvant controlled study. The diagnosis and criteria for inclusion of HIV-1 infected patients are patients with CD4 counts >350 cells/ μ L with no previous use of HIV protease

15 inhibitors or lamivudine (3TC). Other criteria for selecting patients can also be used. The test product, dose, and mode of administration are REMUNE (HIV-1 Immunogen); 10 units (equal to 10 μ g/ml p24 content), volume of 1.0 ml given IM. A dose of immunomer between about 1 to 5 mg/kg is administered. Other doses of immunomer, either greater or lower, can also be tested for effective enhancement of an immune response. For duration

20 of treatment in patients being treated with HAART, patients receive HAART for 32 weeks. REMUNE or IFA placebo (control) and immunomer is given at weeks 4, 16 and 28. The reference therapy, dose, and mode of administration, are adjuvant control, in which IFA placebo is used.

98
48

The criteria for evaluation is similar to that described in Example VIII for efficacy and safety. In addition, assays for determining an immune response can be included, for example, interferon ELISPOT, IgG1/IgG2 antibody ratios, ELISA assays for production of cytokines, lymphocyte proliferation assay, stimulation of spleen cells, and the like, as disclosed herein and described in Examples I-III and V.

The combination of immunomers with REMUNE or other HIV antigen is expected to enhance the immune response in comparison to HIV antigen without immunomers. Thus, the immune response in the present example is expected to be stronger and/or have a longer duration than that observed in Example VIII.

This example describes the enhanced effect of administering HIV antigen with immunomer to stimulate an immune response in HIV infected patients.

EXAMPLE X

HIV-1 Antigen with an Immunomer Elicits HIV-specific Immunity

This example describes the use of HIV antigen and an immunomer to stimulate HIV-specific immunity.

HIV-1 Immunogen is a gp120-depleted whole killed virus vaccine candidate formulated with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA), previously reported to induce HIV-1 specific immune responses; synthetic oligonucleotides containing immunostimulatory cytosine-guanine (CpG) dinucleotide motifs are potent stimulators of cell-mediated immune responses. The possibility of generating enhanced immunogenicity of HIV-1 Immunogen in combination with an immunomer adjuvant (Amplivax™) was studied in a mouse model. In subsequent experiments, it was verified that HIV-specific immune responses could be elicited by the gp120-depleted whole killed virus without IFA (HIV-1 Antigen) + Amplivax™.

In these studies, the HIV-1 immunogen used was a gp120-depleted whole killed virus vaccine formulated with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). The experiments were performed essentially as described in Example V. This immunogen induces HIV-specific immune responses. Amplivax™ is an immunomodulatory oligonucleotide, also referred to herein as an immunomer, containing a novel structure and a synthetic immunomodulatory motif. This immunomer induces distinct immunostimulatory profiles.

Figure 2 shows a schematic diagram of the Amplivax™ immunomer, also referred to as HYB2055. HYB2055 is a second-generation immunomodulatory oligonucleotide (IMO) consisting of a novel structure and synthetic, CpR, immunostimulatory motif. This immunomer stimulates the immune system by signaling through TLR9 and induces Th1 immune responses. The immunomer shows enhanced metabolic stability. A phase I trial in healthy volunteers has been completed.

These mouse studies were initiated to evaluate the ability of Amplivax™ (HYB2055) to enhance immunogenicity of HIV-1 whole killed vaccine in IFA (HIV-1 immunogen) in a mouse model. These studies also examined whether HIV-specific immune responses can be elicited by the whole killed virus without IFA (HIV-1 antigen) used in combination with Amplivax™.

Briefly, C57/BL6 mice were immunized subcutaneously (SC) or intramuscularly (IM) (day 0 and 14) with 10 µg of HIV whole killed vaccine in incomplete Freund's adjuvant (IFA) (HIV-1 Immunogen) plus three doses of Amplivax™ (90, 30 or 10 µg/mouse) or with HIV whole killed vaccine (HIV-1 Antigen without IFA, 10 µg/mouse) and Amplivax™ (90 µg/mouse). Animals immunized with HIV-1 Immunogen, with Amplivax™ alone, or with PBS were used as controls (8-10/group). Mouse Immunomer, HYB 2048, was used as a reference compound. Mice were sacrificed on day 28. HIV-1 antigen- and p24-stimulated cytokine production and IFNγ-secreting T cells were evaluated in fresh splenic mononuclear cells. P24 antibody production was evaluated in serum.

As shown in Figure 3, HIV-1 Immunogen induces HIV-specific RANTES, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 and IL-5 production. Table 2 shows that the combination of HIV-1 Immunogen and Amplivax™ shifted cytokine profile towards Th1 type responses. Immunogen was administered SC. The values shown are mean values.

5 Table 2

	IFN- γ pg/ml	RANTES pg/ml	MIP-1 α pg/ml	MIP-1 β pg/ml	IL-10 pg/ml	IL-5 pg/ml	Cytokine profile
HIV-1 Immunogen alone	12	101	28	317	67	644	Th2
HIV-1 Immunogen plus Amplivax	1783	700	83	438	287	6	Th1
Amplivax alone	0.08	107	27	91	3	-	-

51

A similar analysis is shown in Table 3, which also shows the ratio of IFN- γ to IL-5. Stimulation was with HIV-1 antigen. IFN- γ and IL-5 were measured by ELISA.

Table 3

5

10

	IFN- γ pg/ml	IL-5 pg/ml	IFN- γ /IL5 pg/ml	Cytokine Profile
HIV-1 Immunogen	12	644	0.02	Th2 Type
HIV-1 Immunogen + Amplivax	1828	5.7	321	Th1 Type
Amplivax	.064	5.4	—	—

15 Figure 4 shows HIV-specific IFN γ production is enhanced by AmplivaxTM in a dose dependent manner. The amount of immunomer used is shown in parentheses (μ g/mouse). Similar results were seen for RANTES, MIP1 α , MIP1 β and IL-10. Figure 5 shows the effect of AmplivaxTM on HIV-1 immunogen-induced production levels of RANTES, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 and IL-5. Figure 6 shows that HIV-specific IFN γ production is enhanced by AmplivaxTM (data shown for 90 μ g/mouse AmplivaxTM).

20 Similar results were found for RANTES, MIP1 α , MIP1 β and IL-10. As shown in Figure 7, AmplivaxTM has an enhancing effect on HIV-specific IFN γ -secreting T cells in an Elispot assay. Immunogen was administered subcutaneously. The amount of immunomer used is shown in parentheses (μ g/mouse).

25 Figure 8 shows that HIV-specific IFN γ production was enhanced by AmplivaxTM in a dose dependent manner. The amount of immunomer used is shown in parentheses (μ g/mouse). Figure 9 shows that HIV-specific RANTES production was enhanced by AmplivaxTM in a dose dependent manner. Figure 10 shows that HIV-specific MIP-1 α production was enhanced by AmplivaxTM in a dose dependent manner. The amount of immunomer used is shown in parentheses (μ g/mouse). Figure 11 shows that HIV-specific MIP-1 β production was enhanced by AmplivaxTM in a dose dependent manner. The amount of immunomer used is shown in parentheses (μ g/mouse). Figure 12 shows that

30

HIV-specific IL-10 production was enhanced by Amplivax™ in a dose dependent manner. The amount of immunomer used is shown in parentheses (µg/mouse). Figure 13 shows that HIV-specific IL-5 production was reduced by Amplivax™ given subcutaneously. The amount of immunomer used is shown in parentheses (µg/mouse).

5

Figure 14 shows the effect of Amplivax™ on HIV-1 immunogen-induced p24 antibody titers in mice. The amount of immunomer used is shown in parentheses (µg/mouse). Figure 15 shows that HIV-1 whole killed vaccine in IFA (HIV-1 immunogen) induced HIV specific cytokine production upon subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) administration.

10

Figure 16 shows that Amplivax™ can be added pre- or post- emulsion with IFA and enhance IFNγ production. Figure 17 shows that Amplivax™ can be added pre- or post- emulsion with IFA and enhance RANTES production. As shown in Table 4, the combination of HIV-1 Immunogen and Amplivax™ shifts the cytokine profile toward Th1 type responses.

15

Table 4

20

	IFN-γ/IL-10 ratio	IFN-γ/IL-5 ratio	Cytokine profile
HIV-1 Immunogen	1,42	0,02	Th2 type
HIV-1 Immunogen + Amplivax™	74,04	321	Th1 type
Amplivax™	—	—	—

25

Figure 18 shows that HIV-1 whole killed vaccine with Amplivax™ triggered HIV-specific IFNγ production in mice immunized subcutaneously without IFA. Figure 19 shows that HIV-1 whole killed vaccine with Amplivax™ triggered HIV-specific IFNγ-secreting CD8+ T cell activity in mice immunized subcutaneously without IFA. Figure 20

30

shows that HIV-1 whole killed vaccine with Amplivax™ triggered HIV-specific RANTES production in mice immunized subcutaneously without IFA.

5 C57/BL6 mice immunized subcutaneously with a combination of HIV-1 Immunogen and Amplivax™ showed significantly enhanced HIV-specific production of p24 antibody, HIV-specific IFN-γ (both quantity and number of CD4 and CD8 T cells producing it), chemokines (RANTES, MIP-1α, MIP-1β), and IL-10 when compared to HIV-1 Immunogen or Amplivax™ alone. Importantly, the enhancements by Amplivax™ were still observed if HIV-1 antigen was not emulsified with IFA.

10

Immunization with both the combinations of Amplivax™ + HIV-1 Immunogen and Amplivax™ + HIV-1 Antigen significantly enhanced HIV- and p24- specific IFNγ, RANTES, MIP 1α, MIP 1β and IL-10 production as well as the number of IFNγ-producing cells compared to HIV-1 Immunogen or Amplivax alone. The magnitude of immune responses observed in mice immunized with the HIV-1 Immunogen or with the HIV-1 Antigen in combination with Amplivax was comparable.

15

These results show that immunization with HIV-1 Immunogen plus Amplivax™ significantly enhanced HIV-specific IFNγ, RANTES, MIP-1α, MIP-1β and IL-10 production as well as the number of IFNγ-producing cells compared to HIV-1 Immunogen or Amplivax™ alone. The magnitude of immune responses observed in mice immunized with HIV-1 antigen and Amplivax™ (without IFA) was comparable to the responses obtained with HIV-1 Immunogen (HIV-1 Antigen plus IFA) and Amplivax™. Amplivax™ in association with the whole killed virus vaccine elicits strong HIV-specific immune responses independently of the use of IFA.

20

25

Amplivax in association with either HIV-1 Immunogen or HIV-1 Antigen elicits strong virus-specific immune responses independently of the use of IFA. The strong immunogenicity of the combination of HIV-1 + Amplivax warrants its use as a therapeutic vaccine for HIV infected patients.

30

EXAMPLE XI**The Effect of HIV Immunogen in Combination with an Immunomer on *in vitro* HIV-specific Immune Responses Using Human Peripheral Blood Mononuclear Cells**

5 This example describes the effect of Amplivax™ on *in vitro* HIV-specific immune responses in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

 These studies were initiated to evaluate if Amplivax™ could increase *in vitro* HIV-specific immune responses of human PBMCs from antiretroviral-treated HIV-infected
10 patients, who were or were not immunized with HIV-1 whole killed vaccine.

 Amplivax™ was investigated *ex vivo* for its ability to enhance HIV antigen stimulation of PBMC isolated from HIV+ patients treated with antiretroviral therapy (ART). Patients were either non-immunized, or previously immunized with HIV-1
15 Immunogen. Both patient groups had comparable CD4 counts, HIV plasma viremia, duration of infection, and ART. Results showed that Amplivax™ induced stronger HIV-specific cell-mediated immune responses in patients vaccinated with HIV-1 Immunogen, as measured by total spots produced in the IFN- γ ELISPOT assay and a higher percentage of alpha defensin-producing cells. Both effects were most evident using 1 μ g/ml of
20 Amplivax™.

 Briefly, patients had been vaccinated with 6-24 doses of HIV whole killed vaccine (REMUNE® = HIV-1 Immunogen). The last dose was given 6-8 months before blood collection. Non-vaccinated patients were matched for CD4, HIV viremia and HAART
25 exposure. Amplivax™ was added to PBMCs at 4 concentrations (0, 0.1, 1.0 and 10 μ g/ml). Cells were stimulated with HIV-1, nP24, gag and flu antigens. The evaluation of CD8+, IFN γ -producing cells was carried out by ELISPOT. Analysis of α -defensin producing cells was by fluorescence activated cell sorting (FACS) methods.

30 Figure 21 shows that percentages of α -defensin producing CD8+ T cells are increased by Amplivax™ added *ex vivo*. Figure 22 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in REMUNE® treated patients and HIV positive controls (without

45
55

Amplivax™). Figure 23 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in the presence of 0.1 μ g/ml of Amplivax™ added *ex vivo*. Figure 24 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in the presence of 1 μ g/ml of Amplivax™ added *ex vivo*. Figure 25 shows HIV-specific IFN γ -producing CD8+ T cells in the presence of 10 μ g/ml of Amplivax™ added *ex vivo*.

Figure 26 shows IFN- γ ELISpot assay in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). HYB2055 was used at 1 μ g/ml.

Preliminary data have been generated for REMUNE® (HIV-1 immunogen plus IFA) in HAART naive patients. The trial, when completed, will monitor fifty HIV-1 positive subjects with HIV-1 RNA in the range from 10,000 - 40,000 copies/mL and CD4 cells above 350 cells/ μ L. Patients were randomized into three groups: REMUNE® (HIV-1 immunogen in IFA); IFA adjuvant; or saline.

Phenotypic changes in CD4 T cells (Figure 27) and for CD8 T cells (Figure 28) were observed post 1st injection of REMUNE® in antiretroviral therapy (ART) naïve patients. Preliminary data on the first few patients are shown. Additional patients will be analyzed similarly.

Preliminary data from an ongoing clinical trial in drug-naïve HIV+ patients suggests that HIV-1 Immunogen also has a positive effect on generation of HIV-specific immune responses in this patient population. The potential enhancing effect of Amplivax™ will be examined in a roll over trial in these same patients by adding Amplivax™ to the HIV-1 Immunogen as part of the vaccine.

Throughout this application various publications have been referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

Although the invention has been described with reference to the disclosed embodiments, those skilled in the art will readily appreciate that the specific experiments detailed are only illustrative of the invention. It should be understood that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention.

56

57

What is claimed is:

1. An immunogenic composition, comprising:
 - (a) a whole-killed HIV virus devoid of outer envelope protein gp120;
 - (b) an immunomer; and
 - (c) an adjuvant.
2. The immunogenic composition of claim 1, wherein said HIV virus is HIV-1.
3. The immunogenic composition of claim 1, wherein said HIV virus is an HZ321 strain virus.
4. The immunogenic composition of claim 1, wherein said isolated nucleic acid molecule comprises a phosphorothioate backbone.
5. The immunogenic composition of claim 1, wherein said HIV virus is conjugated to said nucleic acid molecule.
6. The immunogenic composition of claim 1, wherein said immunomer is a CpG immunomer.
7. The immunogenic composition of claim 1, wherein said immunomer is a CpG-free immunomer.
8. The immunogenic composition of claim 1, wherein said adjuvant is suitable for use in humans.
9. The immunogenic composition of claim 1, wherein said adjuvant comprises incomplete Freund's adjuvant (IFA).

58

10. The immunogenic composition of claim 1, wherein said adjuvant comprises mycobacterium cell wall components and monophosphoryl lipid A.

11. The immunogenic composition of claim 1, wherein said adjuvant comprises alum.

5 12. The composition of claim 1, wherein said composition enhances β -chemokine production.

13. The immunogenic composition of claim 12, wherein said enhanced β -chemokine production is non-specific β -chemokine production.

10 14. The immunogenic composition of claim 12, wherein said enhanced β -chemokine production is HIV-specific β -chemokine production.

15. The immunogenic composition of claim 1, wherein said β -chemokine is RANTES.

16. The immunogenic composition of claim 1, wherein said composition enhances HIV-specific IgG2b antibody production in a mammal.

15 17. The immunogenic composition of claim 1, wherein said composition enhances an HIV-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in a mammal.

18. The immunogenic composition of claim 1, wherein said composition enhances HIV-specific CD4+ helper T cells.

20 19. A kit, comprising:

- (a) a whole-killed HIV virus devoid of outer envelope protein gp120;
- (b) an immunomer; and
- (c) an adjuvant,

said kit components, when combined, producing the immunogenic composition of claim 1.

27
39

20. A method of making the immunogenic composition of claim 1, comprising combining:

- (a) a whole-killed HIV virus devoid of outer envelope protein gp120;
- (b) an immunomer; and
- (c) an adjuvant.

5

21. The method of claim 20, wherein said combining is *ex vivo*.

22. The method of claim 20, wherein said combining is *in vivo*.

23. A method of immunizing a mammal, comprising enhancing an immune response in the mammal by administering to the mammal the immunogenic composition of claim 1.

10

24. A method of inhibiting AIDS, comprising enhancing an immune response in a mammal by administering to the mammal the immunogenic composition of claim 1.

25. The method of claim 23 or claim 24, wherein said mammal is a primate.

26. The method of claim 25, wherein said primate is an infant.

15

27. The method of claim 25, wherein said primate is pregnant.

28. The method of claim 25, wherein said primate is a human.

29. The method of claim 28, wherein said human is HIV seronegative.

30. The method of claim 28, wherein said human is HIV seropositive.

31. The method of claim 30, wherein said mammal is a rodent.

32. The method of claim 30 or claim 31, wherein said composition is administered to said mammal two or more times.

33. The method of claim 23 or 24, wherein said composition is administered to said mammal two or more times.

34. The method of claim 23 or 24, wherein the composition is administered subcutaneously, intramuscularly or intramucosally.

61

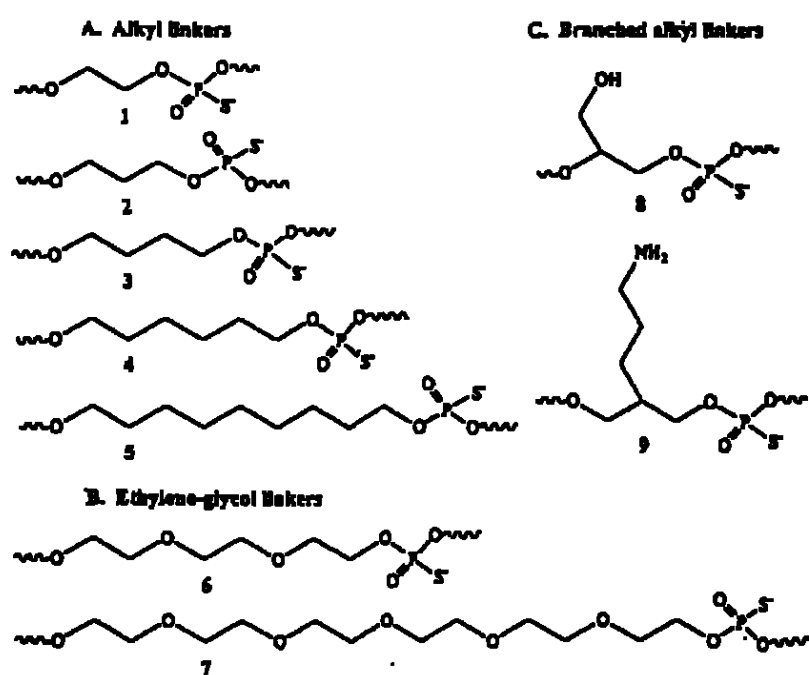


FIGURE 1

79
62

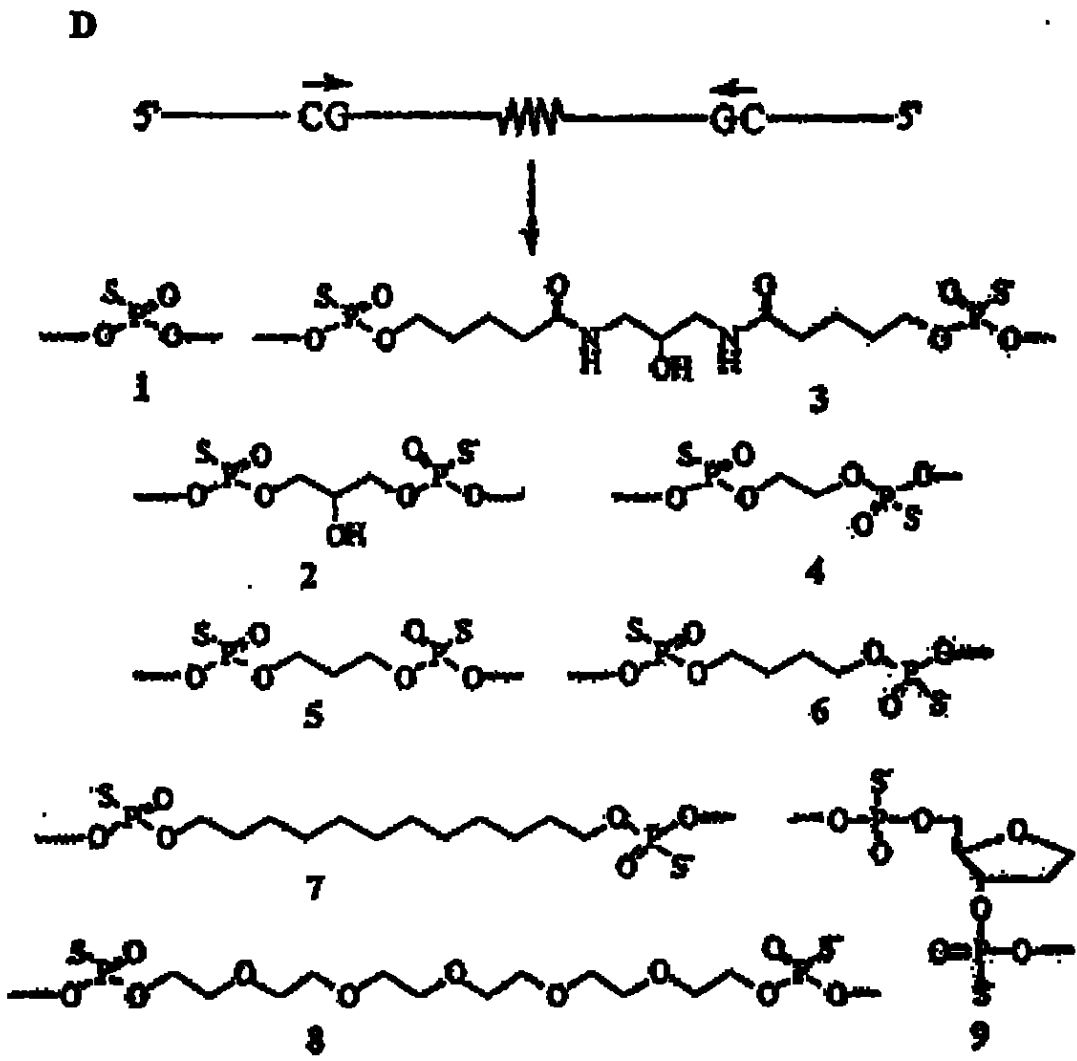


FIGURE 1 CONT.

Fig. 2

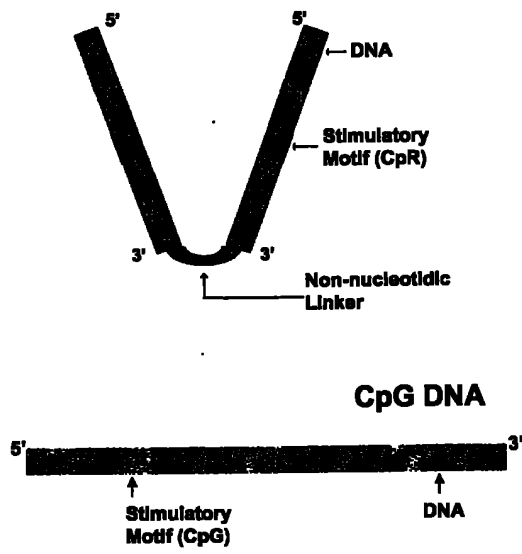
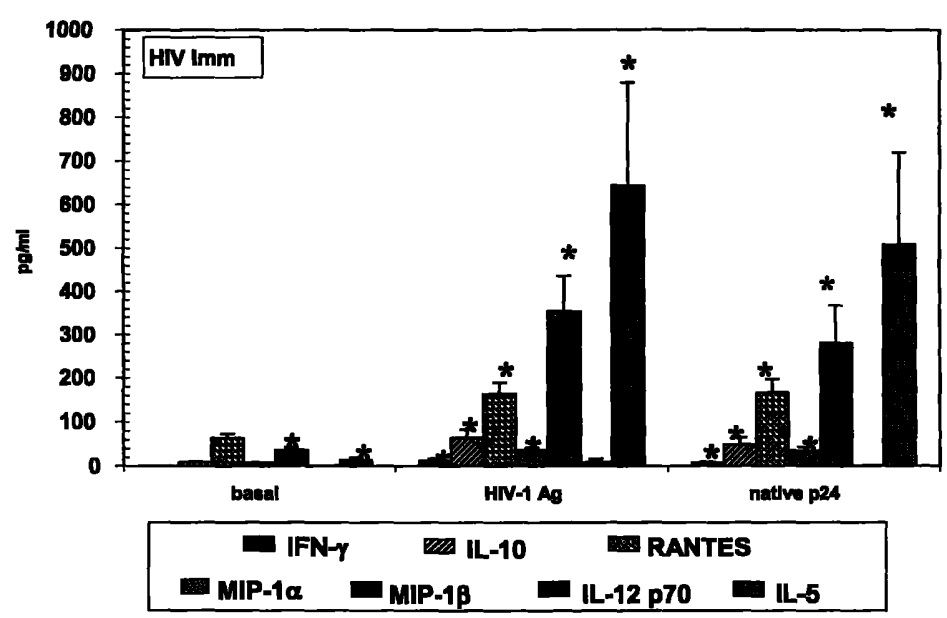


Fig. 3



66

Fig. 4

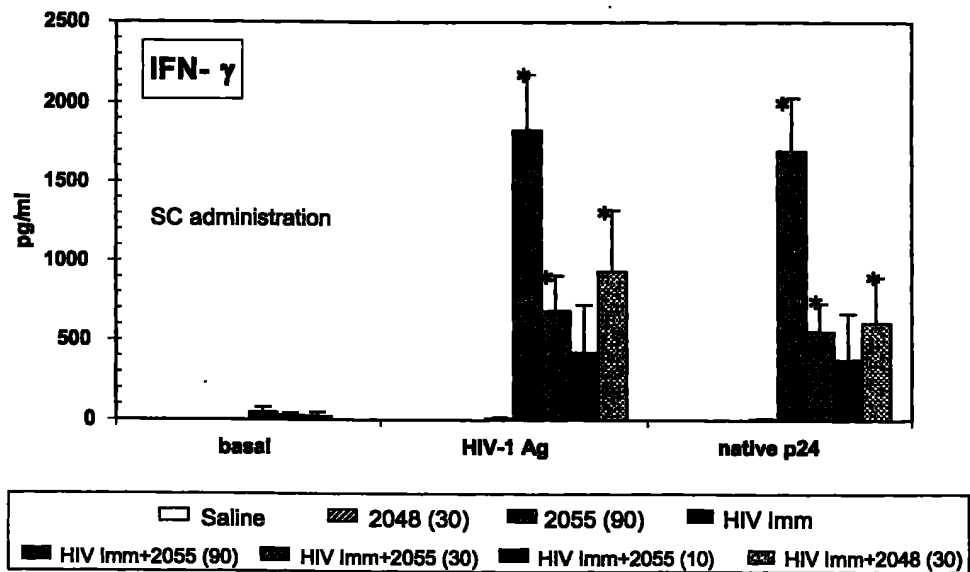
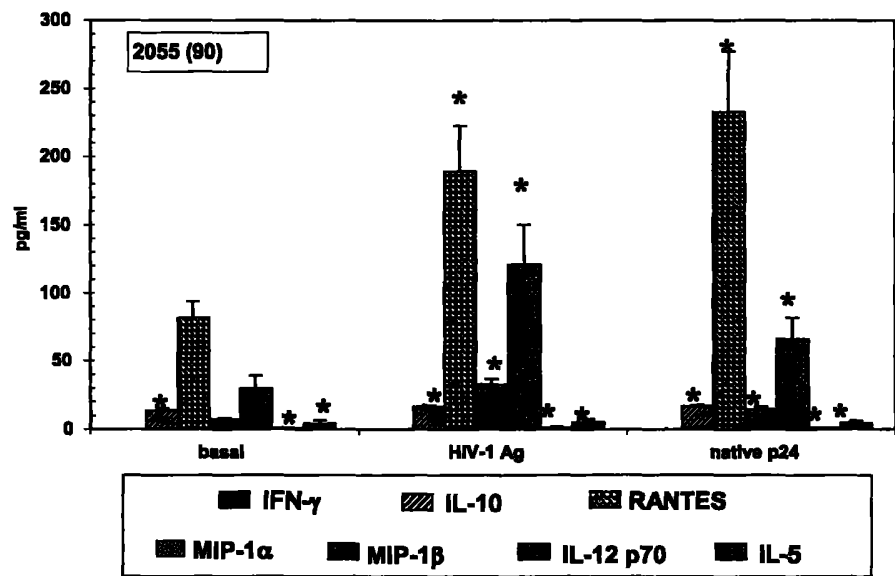
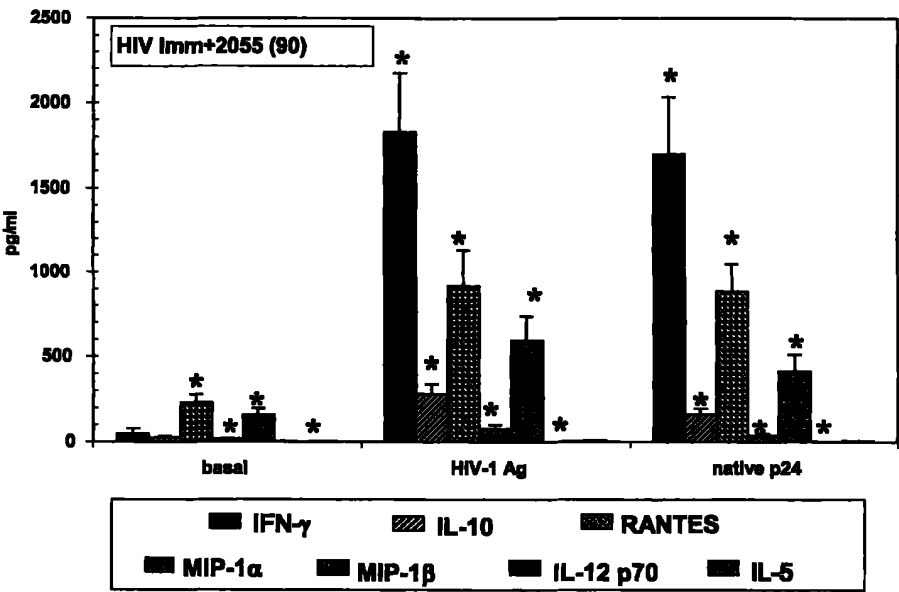


Fig. 5



6/29

Fig. 6



7/29

6x

Fig. 7

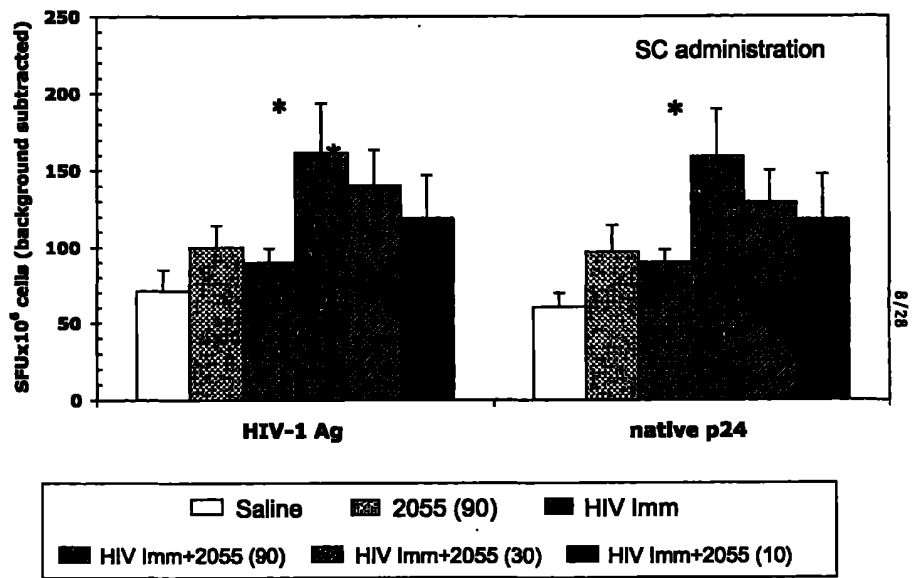
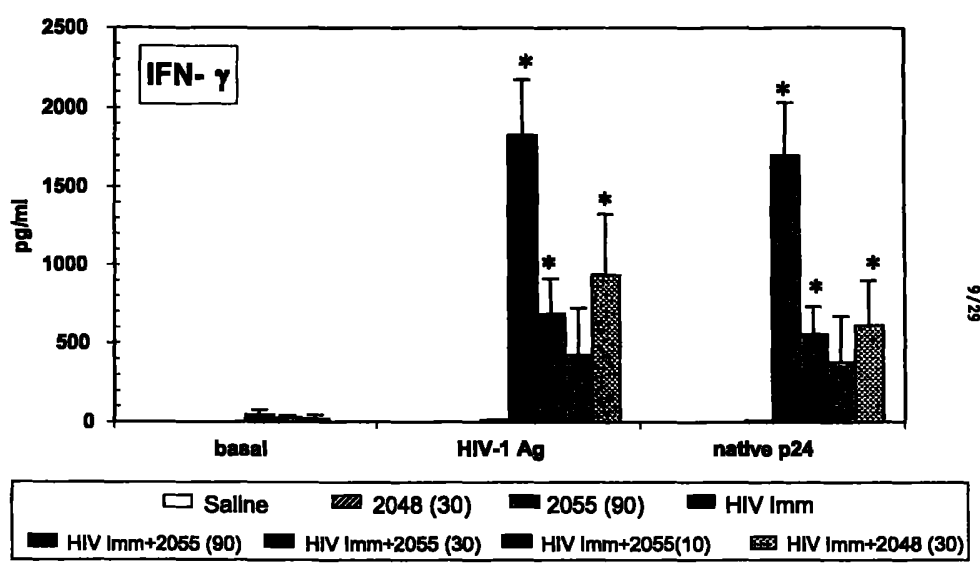
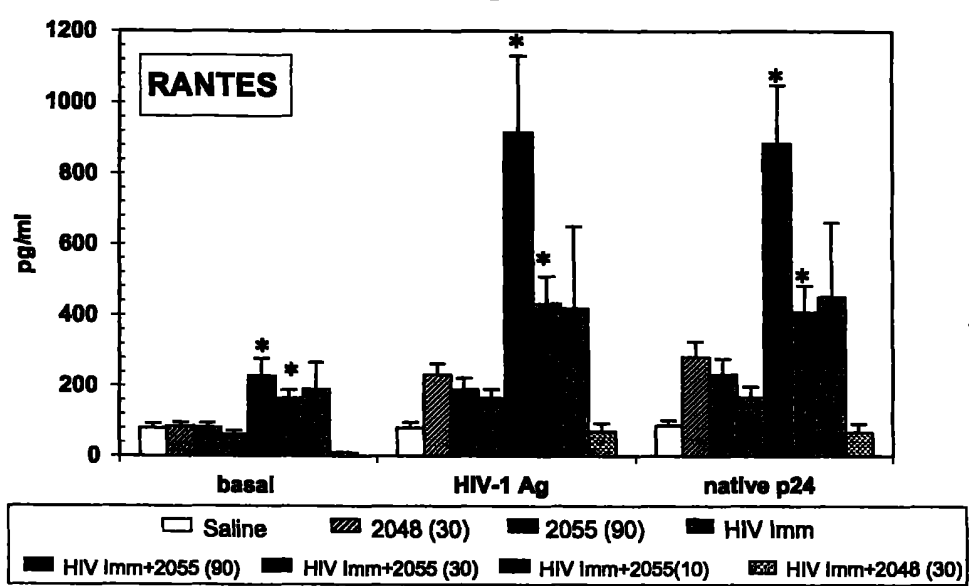


Fig. 8



70

Fig. 9



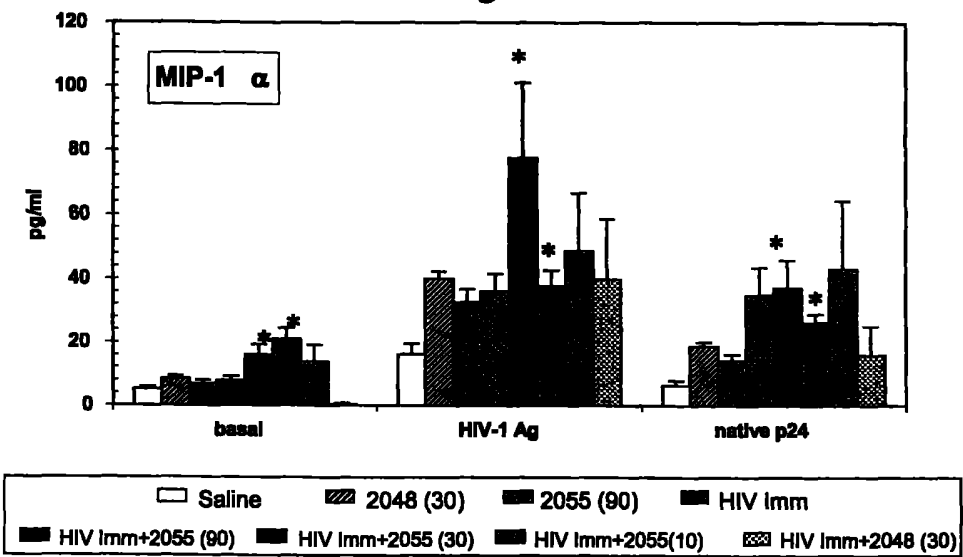
W/O 2005/021726

10/29

PCT/US2004/071995

70

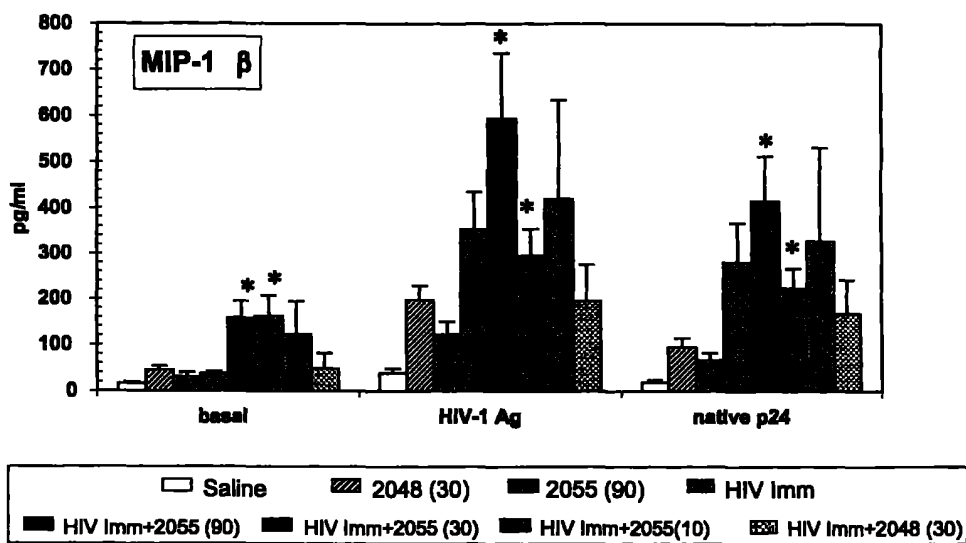
Fig. 10



1

12/29

Fig. 11

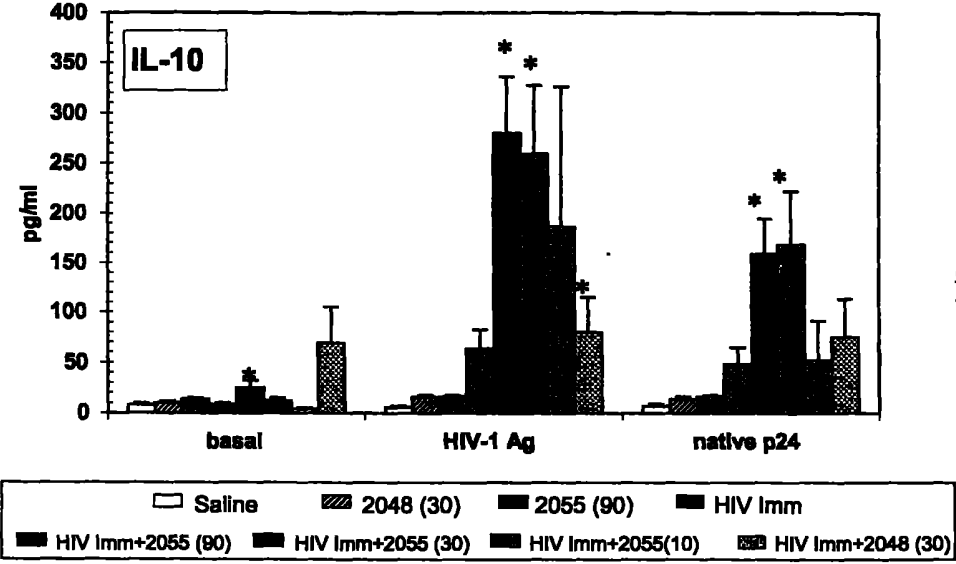


22

13/29

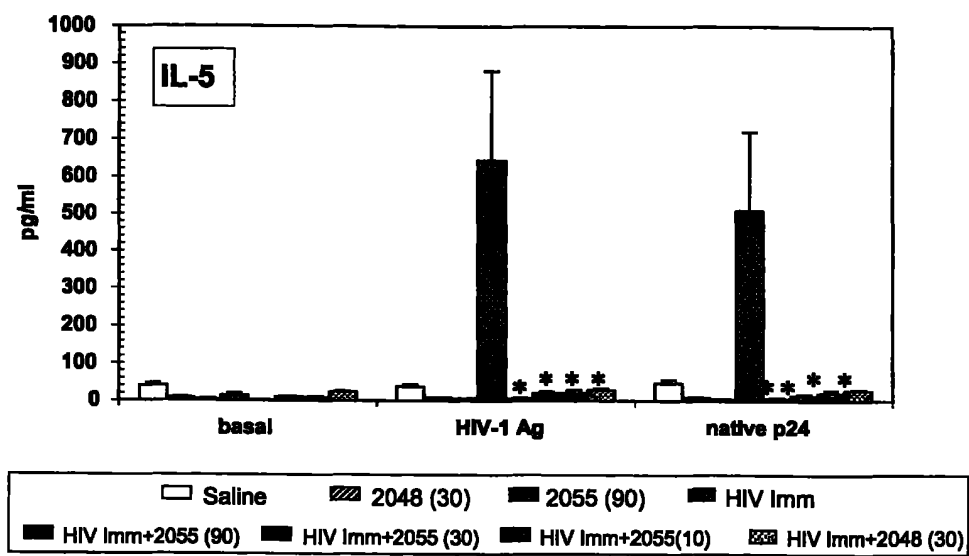
23

Fig. 12



fy

Fig. 13



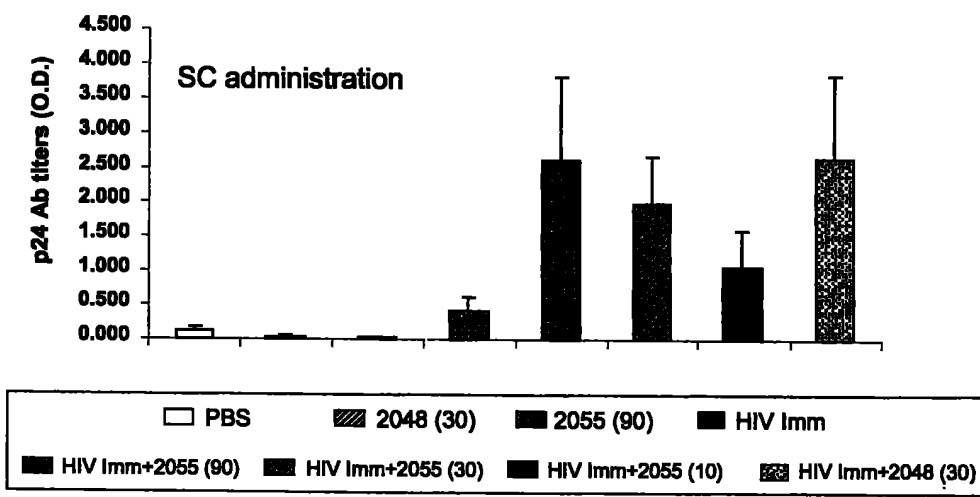
W/O 2005/021726

14/29

PCT/US2004/027995

24

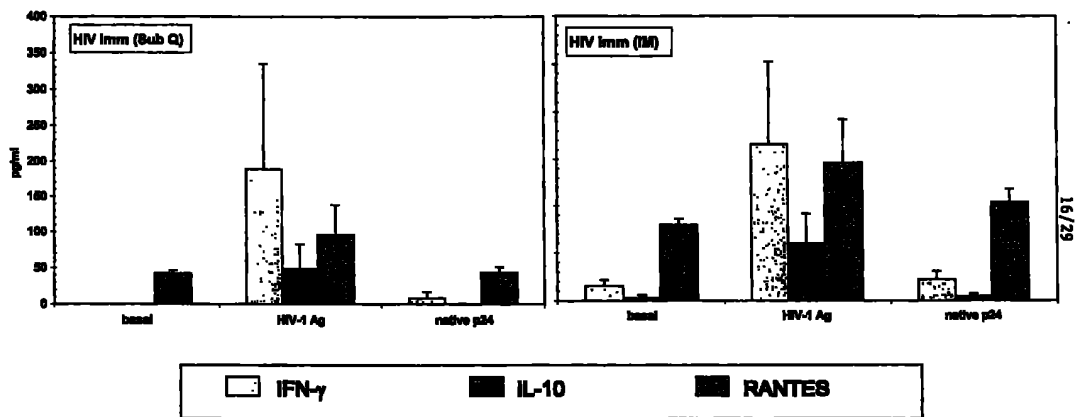
Fig. 14



26

Fig. 15

W/O 2005/021726



PCT/US2004/027935

26

37

WFO 2005/021726

PCT/US2004/027995

37

Fig. 16

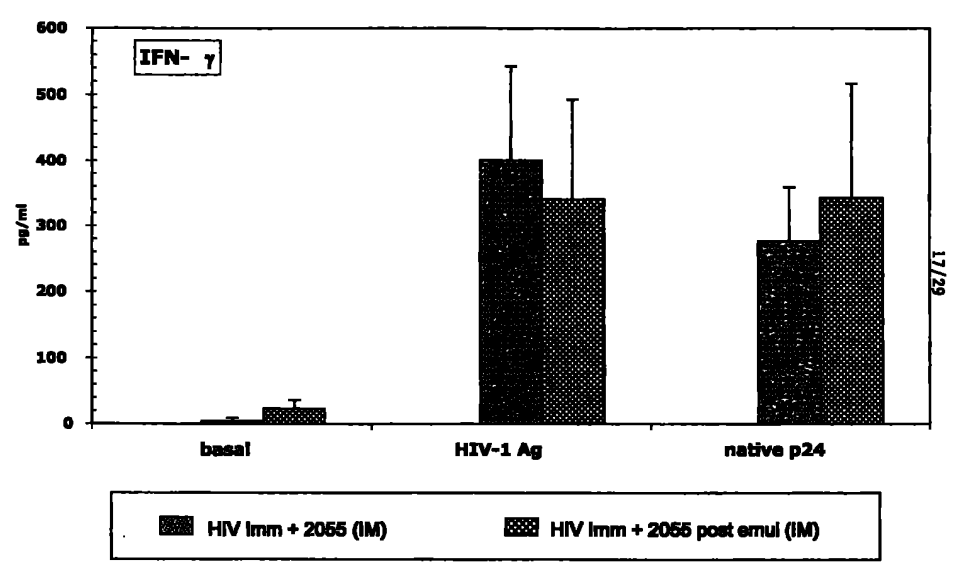


Fig. 17

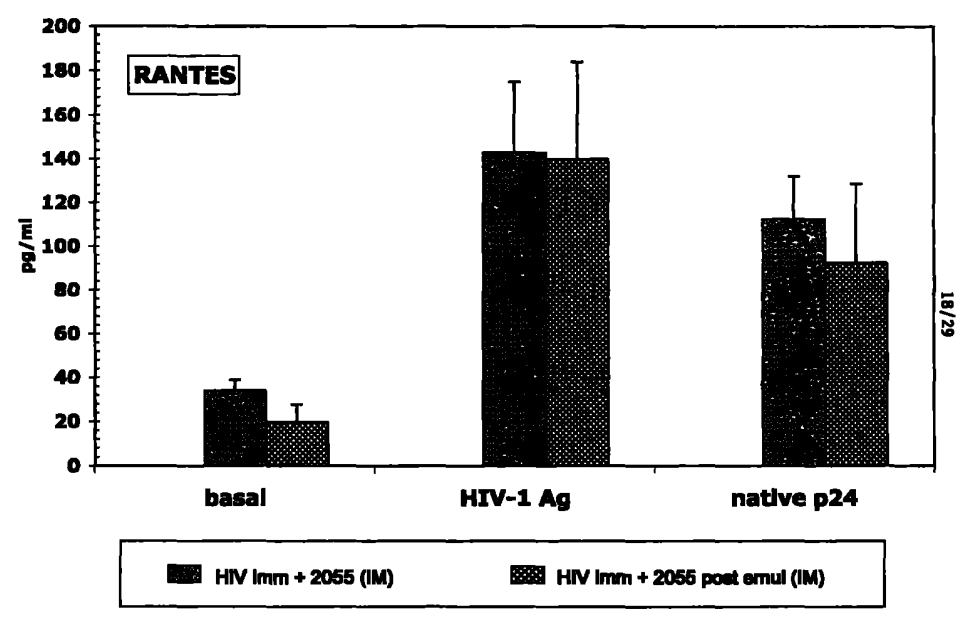


Fig. 18

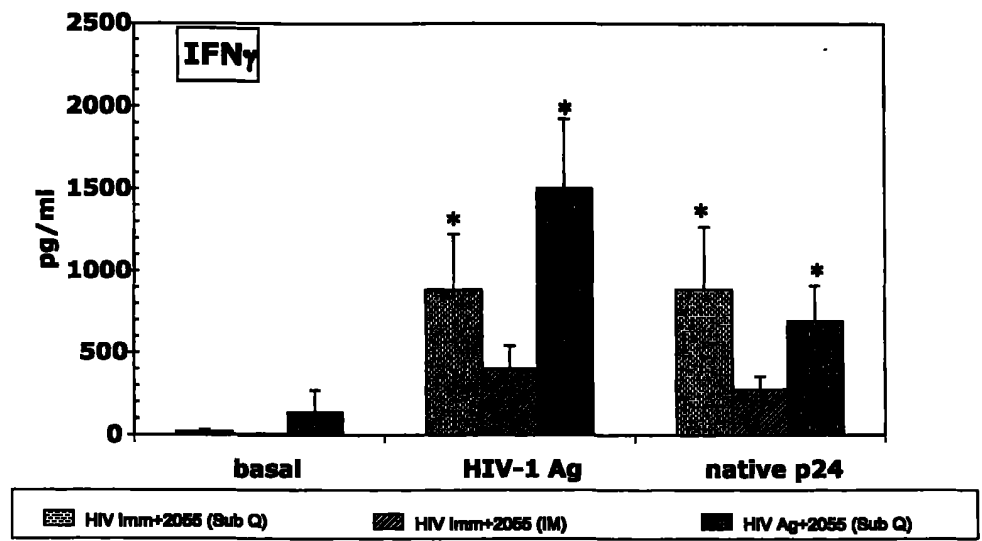
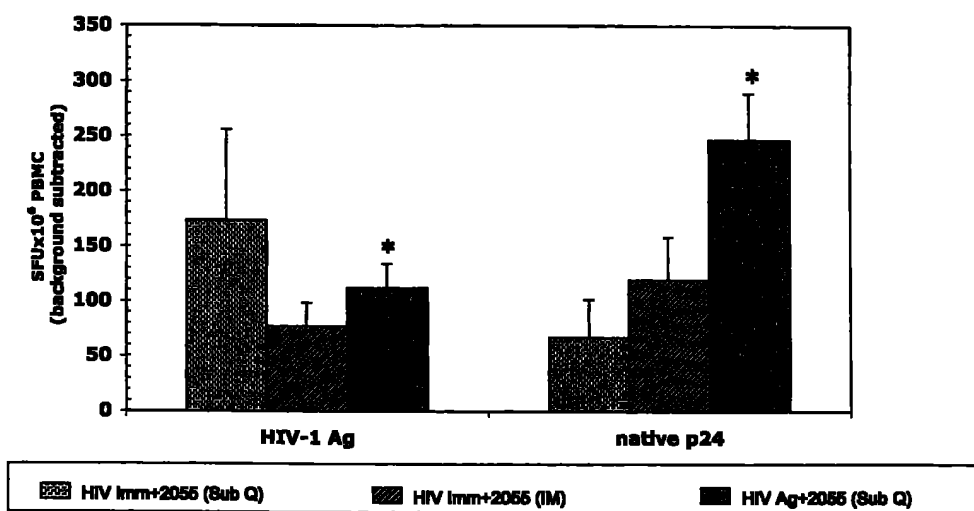
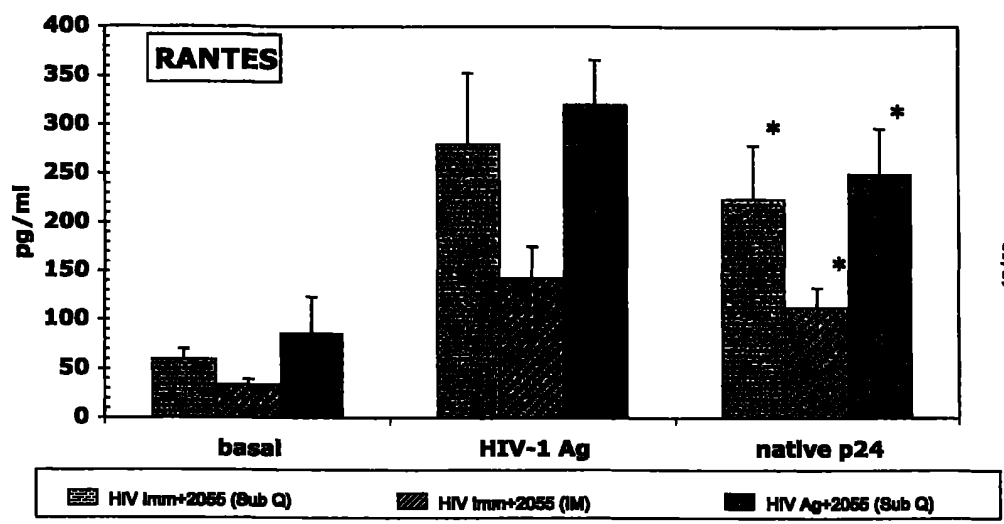


Fig. 19



8)

Fig. 20



WFO 2005/021726

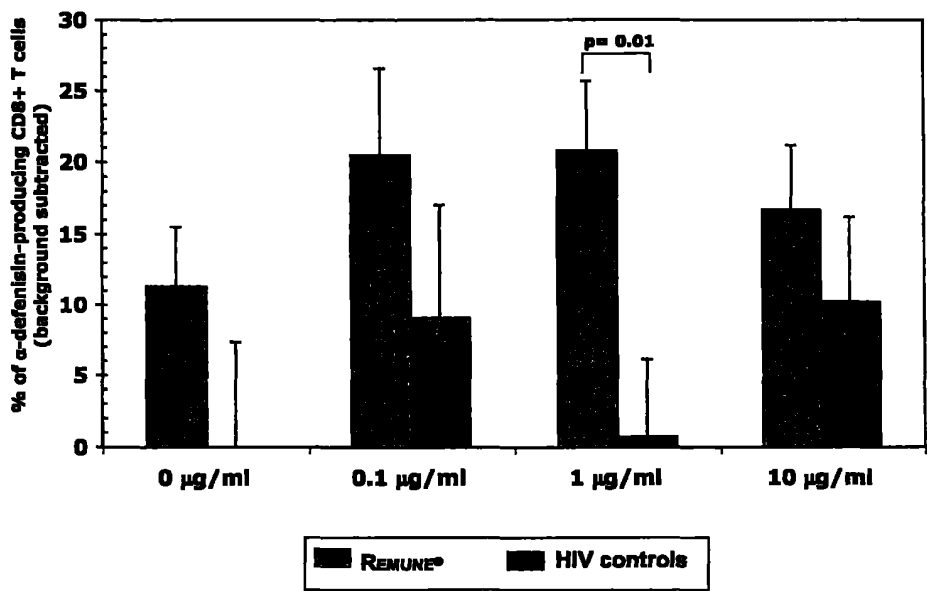
21/29

PCT/US2004/027995

8)

82

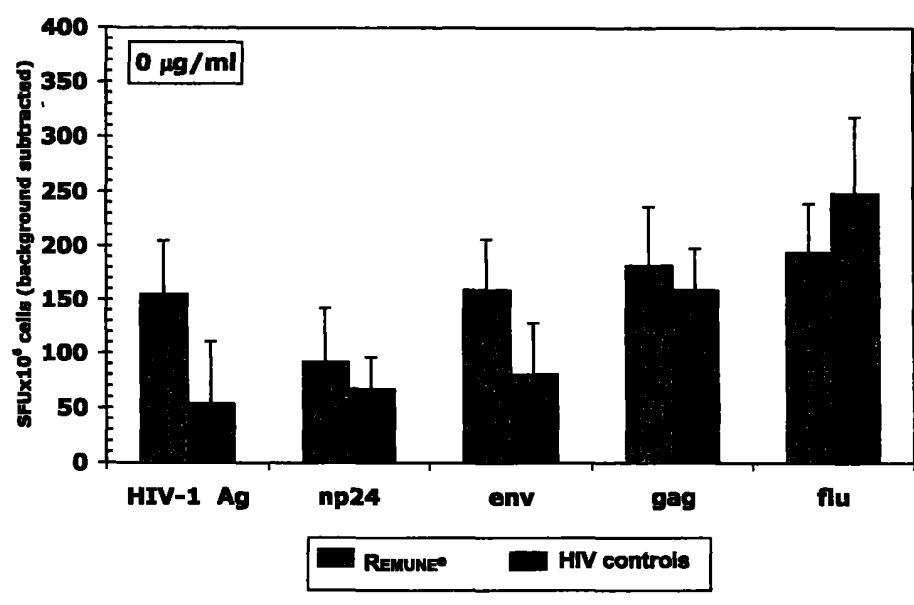
Fig. 21



82

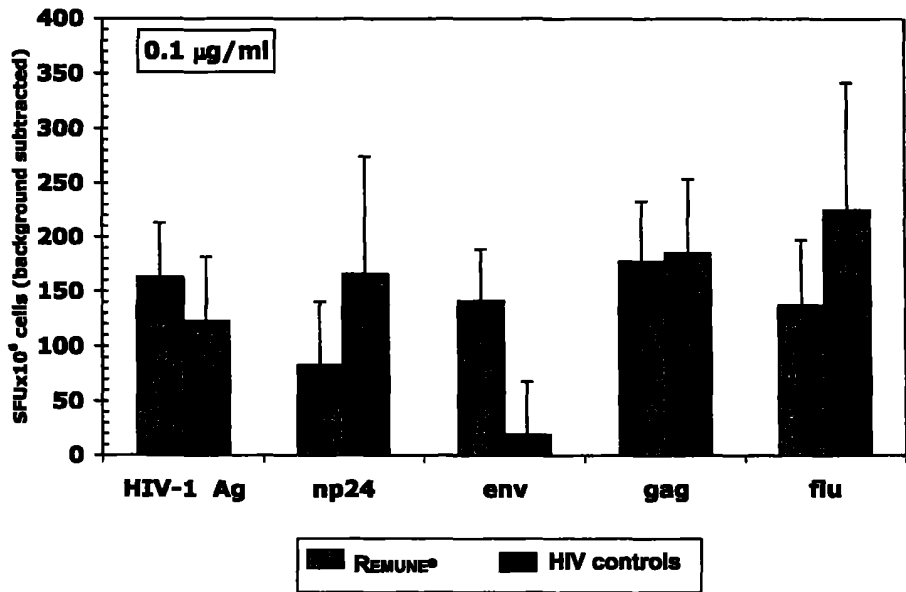
23/29

Fig. 22



84

Fig. 23



WO 2005/021726

24/29

PCT/US2004/027995

84

85

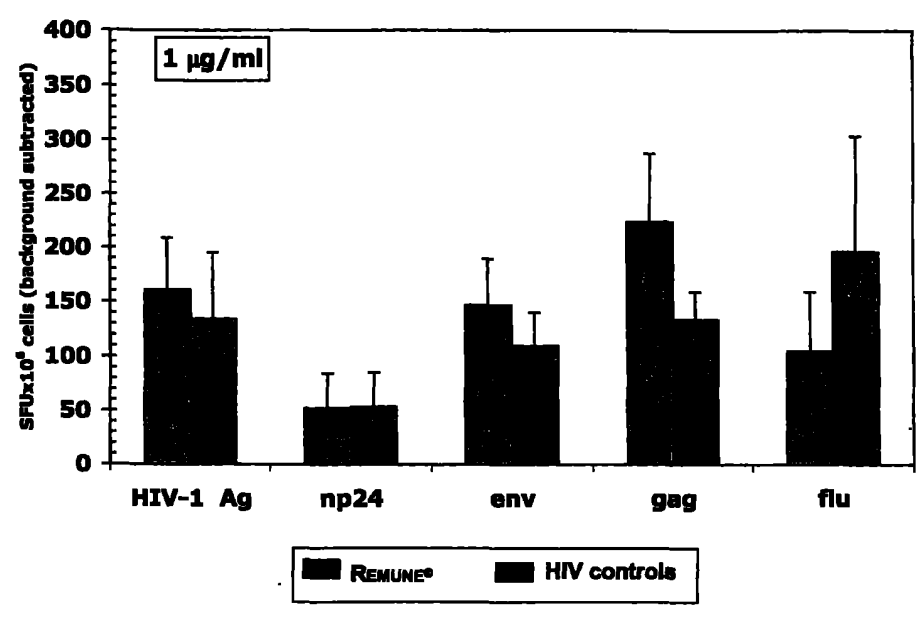
WO 2005/021726

25/29

PCT/US2004/017995

85

Fig. 24



26/29

Fig. 25

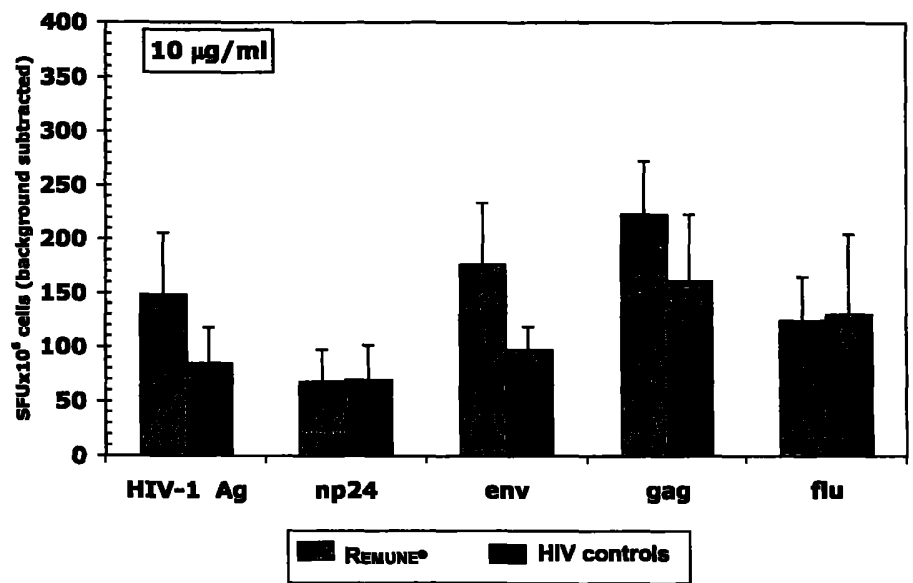
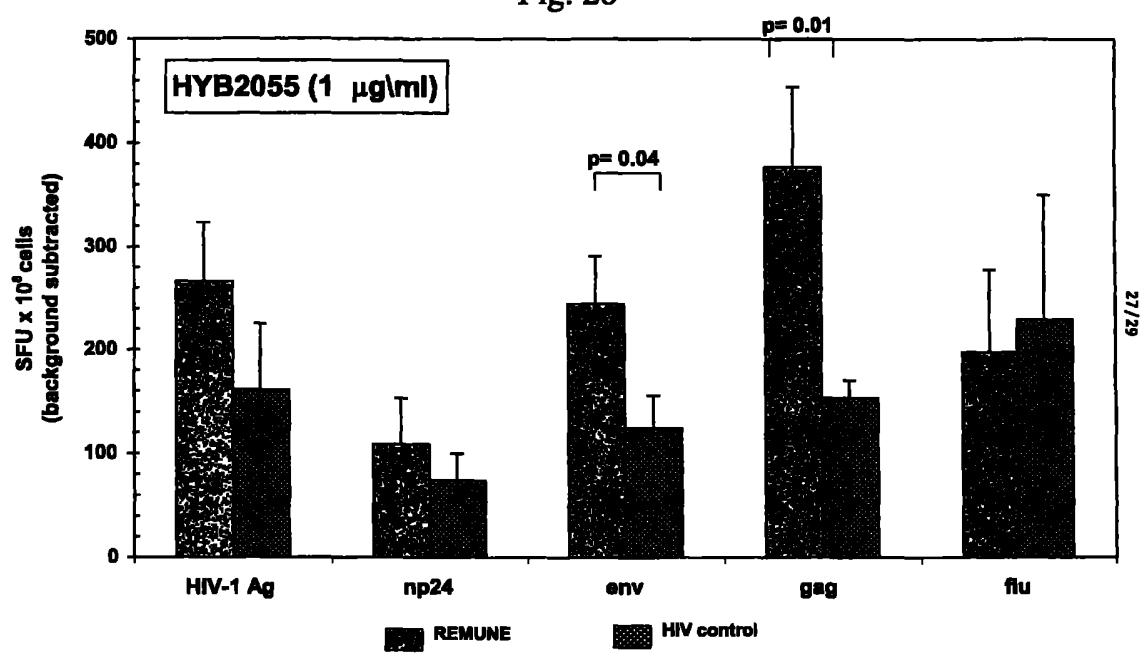


Fig. 26



00

00

Fig. 27

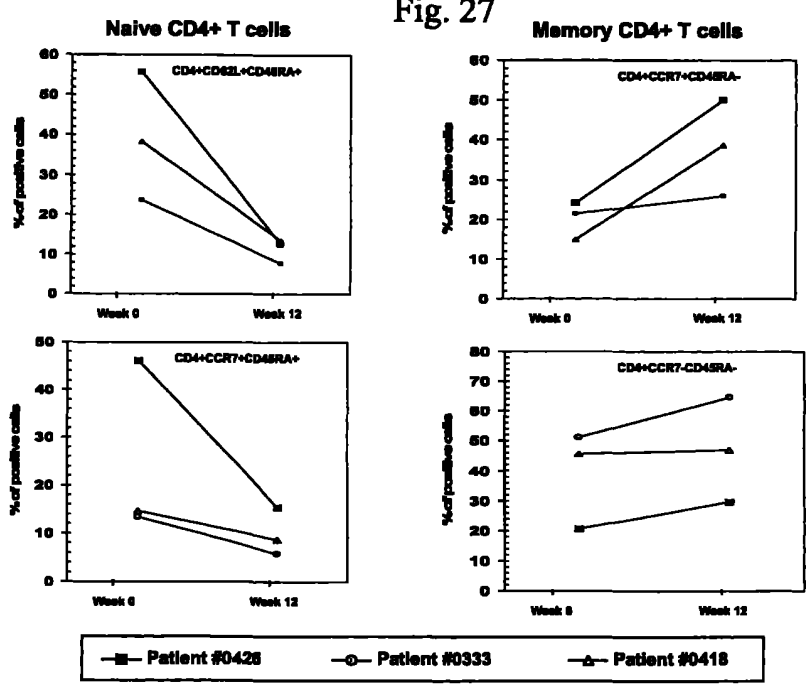
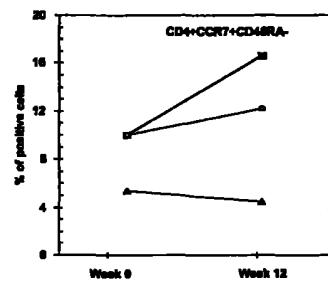
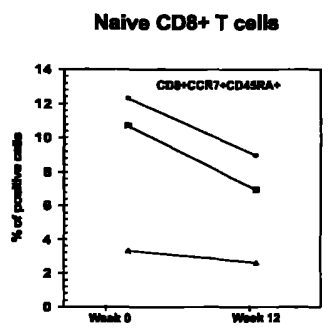
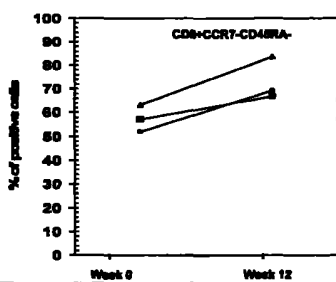
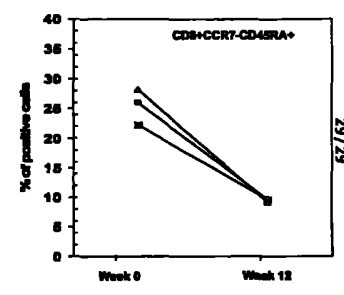


Fig. 28

Memory CD8+ T cells



Terminally differentiated CD8+ T cells



—■— Patient #0426 —●— Patient #0333 —▲— Patient #0418

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS DE HIV Y MÉTODOS RELACIONADOS**ANTECEDENTE DE LA INFORMACIÓN**

Esta invención se relaciona con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y más específicamente a composiciones inmunogénicas para uso en la prevención y el tratamiento del sida.

Más de 30 millones de personas alrededor del mundo están ahora infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus responsable del SIDA. Cerca del 90% de los individuos infectados viven en países en desarrollo, que incluyen el África sub-Sahariana y partes del sureste Asiático, aunque la epidemia de HIV se esparce rápidamente a través del mundo. Las drogas terapéuticas antivirales que reducen la carga viral y retardan la progresión al SIDA están disponibles recientemente. Sin embargo, estas drogas son prohibitivamente costosas para uso en naciones en desarrollo, así, subsiste una urgente necesidad para desarrollar vacunas terapéuticas y preventivas efectivas para cortar el SIDA epidémico global.

Hasta la fecha, el HIV ha probado ser un objetivo difícil para el desarrollo de vacunas efectivas. Debido a la

propensión del HIV a mutar rápidamente existen ahora numerosas cepas predominantes en diferentes partes del mundo cuyos epítomos difieren. Adicionalmente, en un individuo particular infectado, un virus HIV puede escapar del control del sistema del anfitrión inmune al desarrollar mutaciones en un epítomo. Subsiste una necesidad para desarrollar vacunas mejoradas de HIV que estimulen el sistema inmune para reconocer un amplio espectro de epítomos conservados, que incluyen epítomos del antígeno de núcleo p24.

Durante la década del noventa, más de 30 vacunas HIV-1 candidato ingresaron en ensayos clínicos humanos. Estas vacunas elicitán varias respuestas inmunes celulares y humorales, que difieren en tipo y fuerza dependiendo de los componentes particulares de vacuna. Subsiste la necesidad para desarrollar composiciones de vacuna de HIV que eliciten fuertemente las respuestas inmunes particulares correlacionadas con la protección contra infección por HIV.

La naturaleza de las respuestas inmunes protectoras de HIV se han dirigido a través de estudios de individuos quienes han permanecido no infectados a pesar de exposición repetida al HIV, o quienes se han infectado con HIV durante muchos años sin desarrollar SIDA. Estos estudios han mostrado que las células T auxiliares CD4+ correlacionan bien con protección contra infección por HIV y posterior progresión de la

enfermedad. A pesar de las respuestas de célula T auxiliar CD4+ específico de antígeno, las respuestas de la célula citotóxica CD8+ se consideran importantes en la prevención de la infección inicial por HIV y progresión de la enfermedad. Durante una respuesta inmune antiviral efectiva, las células T CD8+ activada matan directamente las células infectadas por virus y secretan citocinas con actividad antiviral.

El sistema β -quimocina también parece ser importante en la protección contra infección inicial por HIV y progresión de la enfermedad. La infección de células inmunes por la mayoría de aislados primarios de HIV requiere interacción del virus con CCR5, cuyo papel biológico normal es como el principal receptor para las β -quimocinas RANTES MIP-1 α y MIP- β . Los polimorfismos genéticos que resultan en la reducción de expresión del receptor CCR5 han mostrado que suministran resistencia para la infección por HIV. Adicionalmente, una correlación significativa entre los niveles de β -quimocina y resistencia para la infección por HIV, ambos en individuos expuestos y en células cultivadas, se ha demostrado. Se ha sugerido que las β -quimocinas pueden bloquear el contagio por HIV mediante varios mecanismos, que incluyen competir con o interferir con la unión del HIV al CCR5, y subregular la superficie CCR5.

Debido a la importancia de las β -quimocinas en la prevención de infección inicial por HIV y progresión de la enfermedad, una composición HIV inmunogénica efectiva debe inducir altos niveles de producción de β -quimocina, ambos antes de infección y en respuesta a la infección del virus. Las composiciones inmunogénicas de HIV capaces de inducir producción de β -quimocina se han descrito. Sin embargo, las composiciones inmunogénicas que estimulan altos niveles de producción de β -quimocina, inducen fuerte respuesta inmune humoral y celular Th1 específica del HIV durable con actividad citotóxica específica de HIV que no se ha descrito.

Las composiciones que elicitán ciertos tipos de respuestas inmunes específicas de HIV pueden no elicitár otras respuestas protectoras importantes. Por ejemplo, Deml et al., Clin. Chem. Lab. Med. 37:199-204 (1999), describe una vacuna que contiene un antígeno de envoltura gp160 HIV-1, una secuencia de ADN inmunoestimulatória y un adyuvante de alumbre, que, a pesar de incluir una respuesta de citocina tipo Th1 específica de antígeno, es incapaz de inducir una respuesta de linfocito T citotóxico específico de antígeno. Adicionalmente, una vacuna que contiene solo antígenos de la envoltura no se puede esperar que induzca una respuesta inmune contra las proteínas del núcleo más altamente conservadas de HIV.

Así, subsiste la necesidad para composiciones inmunogénicas y métodos que ayuden a evitar la infección por HIV o al menos reducir la progresión a SIDA en individuos infectados. La presente invención satisface esta necesidad y también suministra ventajas relacionadas.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención suministra composiciones inmunogénicas que se pueden utilizar para mejorar la potencia de la respuesta inmune en un mamífero. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden mejorar la amplitud, tipo, fuerza y duración de las respuestas inmunes inducidas. Las composiciones inmunogénicas contienen un antígeno HIV optimizado, una molécula de ácido nucleico aislado que contiene un inmunómero y opcionalmente un adyuvante. El antígeno de HIV puede ser un virus de HIV completamente muerto desprovisto de la proteína de envoltura exterior gp120. El antígeno HIV también pueden ser partículas de HIV de proteasa defectuosa tal como partículas L2. Alternativamente, el antígeno HIV puede ser un virus HIV completamente muerto, o una combinación de antígeno de HIV seleccionados o péptidos, que incluyen antígeno p24, nef, gp41 y similares.

Las composiciones inmunogénicas de la invención en las que se presenta un adyuvante, el adyuvante puede ser adecuado para administración a un humano. Un adyuvante de ejemplo es un adyuvante Freund Incompleto.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden además mejorar los niveles de β -quimocina, interferon- γ (IFN γ), interleucina 2 (IL2), factor de necrosis de tumor alfa (TNF α), y producción de interleucina 15 (IL15), y/o producción de anticuerpo IgG2b específico de HIV en un mamífero. Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden mejorar células T CD4+ auxiliares específicas de HIV, una respuesta de linfocito T citotóxico específica de HIV, y respuestas de linfocito T supresoras no citotóxicas en un mamífero.

También se suministran kits, que contienen un antígeno de HIV, un inmunómero y opcionalmente un adyuvante. Los componentes de los kits, cuando se combinan, producen las composiciones inmunogénicas de la invención.

La invención también suministra métodos para fabricar las composiciones inmunogénicas, al combinar un antígeno de HIV, un inmunómero y opcionalmente un adyuvante. Los componentes

se pueden combinar ex vivo o in vivo para llegar a las composiciones inmunogénicas.

La invención también suministra un método para inmunizar un mamífero al administrar al mamífero una composición inmunogénica que contiene un antígeno de HIV, una molécula de ácido nucleico aislado que contiene inmunómero y opcionalmente un adyuvante. También se suministra un método para inhibir el SIDA al mejorar una respuesta inmune en el mamífero al administrar al mamífero una composición inmunogénica que contiene un antígeno de HIV, una molécula de ácido nucleico aislado que contiene un inmunómero y opcionalmente un adyuvante. En los métodos de la invención, el mamífero puede ser un primate, tal como un humano, o un roedor. En ciertas modalidades del método, el primate es una madre preñada o un infante. Un humano puede ser HIV seronegativo o HIV seropositivo. Las composiciones inmunogénicas pueden ser ventajosamente administradas al mamífero dos o más veces y mediante una variedad de rutas de administración, que incluyen administración subcutánea, intramuscular e intramucosal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra las estructuras químicas de ligadores de ejemplo para ligar oligonucleótidos para formar un inmunómero

(Yu et al., J. Med. Chem. 45:4540-4548 (2002); Yu et al., Nucl. Acids. Res. 30:4460-4469 (2002)).

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático del inmunómero HYB2055, también conocido como Amplivax™.

La Figura 3 muestra la inducción de citocinas específicas de HIV RANTES MIP-1 α , MIP-1 β , interleucina-10 (IL10) e IL-5 por Inmunógeno HIV-1. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus salina.

La Figura 4 muestra producción inducida por inmunógeno HIV-1 de interferony (IFN γ) específico de HIV que se mejora por Amplivax™ en una forma dependiente de dosis. "*" indica significancia versus inmunógeno de HIV solo.

La Figura 5 muestra el efecto del Amplivax™ sobre los niveles de producción de RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-10 e IL-5. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus salina.

La Figura 6 muestra una producción IFN γ específica de HIV por Amplivax™. Resultados similares se encontraron para RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , e IL-10. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus salina.

La Figura 7 muestra el efecto mejorador del Amplivax™ sobre las células T que secretan IFN γ específico de HIV en un ensayo Elispot. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus HIV-1 inmunógeno solo.

La Figura 8 muestra la producción IFN γ específica de HIV que se mejora por Amplivax™ en una forma dependiente de dosis. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus HIV-1 inmunógeno solo.

La Figura 9 muestra que la producción RANTES específico de HIV se mejora por el Amplivax™ en una forma dependiente de dosis. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus inmunógeno HIV-1 solo.

La Figura 10 muestra que la producción MIP-1 α específico de HIV se mejora por el Amplivax™ en una forma dependiente de dosis. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus inmunógeno de HIV-1 solo.

La Figura 11 muestra que la producción MIP-1 β específico de HIV se mejora por el Amplivax™ en una forma dependiente de dosis. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus inmunógeno de HIV-1 solo.

La Figura 12 muestra que la producción IL-10 específica de HIV se mejora por el Amplivax™ en una forma dependiente de dosis. El inmunógeno se administra subcutáneamente. "*" indica significancia versus inmunógeno de HIV-1 solo.

La Figura 13 muestra que la producción de IL-5 se reduce por el Amplivax™ dada subcutáneamente (SC). "*" indica significancia versus inmunógeno de HIV-1 solo.

La Figura 14 muestra el ejemplo del Amplivax™ sobre los títulos de anticuerpo p24 inducidos por inmunógeno HIV-1 en ratones. El inmunógeno se administra subcutáneamente.

La Figura 15 muestra que la vacuna de HIV-1 completamente muerto en IFA (inmunógeno HIV-1) induce la producción de citocina específica de HIV inducida luego de administración subcutánea (SC) e intramuscular (IM).

La Figura 16 muestra que el Amplivax™ se puede agregar pre o post emulsión con producción de IFA e IFN γ mejorado.

La Figura 17 muestra que el Amplivax™ se puede agregar pre o post emulsión con producción de IFA y mejoradores RANTE.

La Figura 18 muestra que la vacuna de HIV-1 completamente muerto con Amplivax™ dispara la producción de IFN γ específica de HIV en ratones inmunizados subcutáneamente sin IFA. "*" indica la significancia versus inmunógeno HIV-1 (IM). El antígeno HIV es la vacuna de HIV completamente muerto sin IFA.

La Figura 19 muestra que el antígeno de vacuna de HIV-1 completamente muerto con Amplivax™ dispara la actividad de célula T CD8+ que secreta IFN γ específica de HIV en ratones inmunizados subcutáneamente sin IFA. "*" indica la significancia versus inmunógeno HIV-1 (IM administrado). El antígeno HIV es la vacuna de HIV completamente muerto sin IFA.

La Figura 20 muestra que el antígeno de vacuna de HIV-1 completamente muerto con Amplivax™ dispara la producción de RANTES específico de HIV en ratones inmunizados subcutáneamente sin IFA. "*" indica la significancia versus inmunógeno HIV-1 (IM administrado). El antígeno HIV es la vacuna de HIV completamente muerto sin IFA.

La Figura 21 muestra que los porcentajes de α -defensina producen células T CD8+ se incrementan por el Amplivax™ agregado ex vivo.

La Figura 22 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específico de HIV en pacientes tratados con REMUNE® en controles de HIV positivo (0 μ g/ml de Amplivax™).

La Figura 23 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específico de HIV en la presencia de 0,1 μ g/ml de Amplivax™ agregado ex vivo.

La Figura 24 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específico de HIV en la presencia de 1 μ g/ml de Amplivax™ agregado ex vivo.

La Figura 25 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específico de HIV en la presencia de 10 μ g/ml de Amplivax™ agregado ex vivo.

La Figura 26 muestra ensayo ELIspot IFN γ en células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) se utiliza HYB2055 en 1 μ g/ml.

La Figura 27 muestra cambios fenotípicos en células T CD4 luego de la primera inyección de REMUNE® en pacientes que no

se han sometido a experimentos de terapia antiretroviral (ART).

LA Figura 28 muestra cambios fenotípicos en células T CD8 luego de la primera inyección de REMUNE® en pacientes que no se han sometido a experimentos ART.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención suministra composiciones inmunogénicas de HIV que contiene un antígeno de HIV, una molécula de ácido nucleico aislado que contiene un inmunómero, y opcionalmente un adyuvante. También se suministran kits, que contienen componentes de tales composiciones, para uso junto. La invención también suministra métodos para inmunizar un mamífero con tales composiciones o con los componentes de tales composiciones, de tal forma que mejore la respuesta inmune en el mamífero inmunizado relacionado con antígeno de HIV, solo. Ventajosamente las composiciones de la invención también pueden inducir células auxiliares T CD4 específicas de HIV y células CD8+ que producen potentes respuestas inmunes de Th1 contra un amplio espectro de epítomos de HIV que suministran una fuerte respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos de HIV. Así, las composiciones inmunogénicas de la invención son útiles para evitar la infección por HIV y/o retardar la progresión a SIDA en

121

individuos infectados. Las composiciones y métodos pueden ser utilizados para elicitación de respuestas inmunes humorales y celulares de Th1 potentes específicas para epítopos HIV conservados, elicitación de células auxiliares T CD4 específicas de HIV, actividad de linfocito T citotóxico específico de HIV, estimular la producción de quimocinas y citocinas tales como β -quimocinas, interferon- γ , interleucina 2 (IL2), interleucina 7 (IL7), interleucina 15 (IL15), α -defensina, y similares, e incrementar células de memoria. Tales vacunas se pueden administrar por vía de varias rutas de administración. Tales vacunas se pueden utilizar para evitar la transmisión materna del HIV, para vacunación de neonatos, niños e individuos en alto riesgo, y para vacunación de individuos infectados. Tales vacunas también se pueden utilizar en combinación con otras terapias de HIV, que incluyen terapia antiretroviral (ART) con varias combinaciones de inhibidores de nucleasa y proteasa y agentes para bloquear la entrada viral, tales como T20 (ver Baldwin et al., Curr. Med. Chem. 10:11633-1642 (2003)).

Como se utiliza aquí, el término "HIV" se refiere a todas las formas, subtipo y variaciones del virus HIV, y es sinónimo con los antiguos HTLVIII y LAV. Varias líneas de células capaces de propagar el HIV o infectar permanentemente con el virus de HIV se han desarrollado y depositado con el ATCC,

402

que incluye células HuT78 y el derivado de HuT78 H9, así como también aquellas que tienen los números de acceso CCL 214, TIB 161, CRL 1552 y CRL 8543, que se describe en la patente estadounidense No. 4,725,669 y Gallo, Scientific American 256:46 (1087).

Como se utiliza aquí, el término "virus de HIV completamente muerto" se refiere a un virus de HIV inactivo, intacto. Un virus HIV inactivo se refiere a un virus que no puede infectar y/o replicar.

Como se utiliza aquí, el término "proteína envoltente exterior" se refiere a esa porción de la glicoproteína de membrana de un retrovirus que resalta más allá de la membrana, como opuesta a la proteína de transmembrana, gp41.

Como se utiliza aquí, el término "virus HIV desprovisto de proteínas envoltentes" se refiere a una preparación de partículas de HIV o productos de gen HIV desprovisto de la proteína envoltente exterior gp120, pero contiene la mayor parte genéticamente conservada del virus (por ejemplo, p24 y gp41) y HIV desprovisto de la proteína gp120 envoltente exterior también se refiere aquí como REMUNE®.

Como se utiliza aquí, el término "antígeno p24 de HIV" se refiere al producto de gen de la región gag del HIV,

caracterizado por tener un peso molecular relativo aparente de cerca de 24,000 daltons designado p24. El término "antígeno p24 HIV" también se refiere a modificaciones y fragmentos de p24 que tiene la actividad inmunológica de p24. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar modificaciones apropiadas de p24, tales como adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos o análogos de aminoácidos, que sirven, por ejemplo, para incrementar la estabilidad o biodisponibilidad o facilitar su purificación, sin destruir su actividad inmunológica. De la misma manera, aquellos expertos en la técnica pueden determinar fragmentos apropiados de p24 que tiene la actividad inmunológica de p24. Un fragmento activo inmunológicamente de p24 puede tener de 6 residuos de polipéptido hasta la longitud completa de polipéptido menos un aminoácido. Otros antígenos de HIV codificados por otros productos de gen HIV pueden incluir fragmentos o modificaciones similares a aquellas descritas anteriormente para el antígeno p24 HIV. Otros antígenos HIV de ejemplo incluyen. Por ejemplo, gp41, nef, y similares.

Como se utiliza aquí, un "inmunómero" se refiere a un oligonucleótido que comprende dos oligonucleótidos más pequeños ligados en sus extremos 3', lo que resulta en un oligonucleótido que tiene dos extremos 5'. Los dos oligonucleótidos más pequeños del inmunómero pueden ser secuencias idénticas o no idénticas y/o longitudes, pero

30

generalmente son idénticos en adición a su actividad inmunoestimuladora, un inmunómero contiene una unión 3'-3' y por lo tanto no tiene extremo libre 3', incrementando así la resistencia para la digestión de nucleasa. Los oligonucleótidos más pequeños del inmunómero generalmente son al menos de cerca de 5 o 6 nucleótidos que se ligan juntos para formar dos extremos 5', pero pueden ser más grandes tales como 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o a un oligonucleótidos más pequeños más largos del inmunómero. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una longitud y/o secuencia de inmunómero suficiente para estimular una respuesta inmune mayor que la vista con el antígeno solo. Así, en una modalidad un inmunómero comprende dos oligonucleótidos idénticos ligados por vía de sus extremos 3'. Un inmunómero también puede incluir bases modificadas. Los inmunómeros se describen, por ejemplo, en Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. 9: 807-813 (2001); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30: 4460-4469 (2002); Yu et al., Bioorg. Med. Chem. 11: 459-464 (2003); Bhagat et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 300: 853-861 (2003); y Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297: 83-90 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30: 1613- 1619 (2002); Yu et al., J. Med. Chem. 45: 4540-4548 (2002); Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13: 966-974 (2002); Yu et al., Bioorganic Med. Chem. Lett. 10: 2585- 2588 (2000); Agrawal y Kandimalla, Trends Mol. Med. 8: 114-121 (2002); cada uno de os cuales se

1
to/

incorpora aquí como referencia. Tales inmunómeros pueden tener más actividad estimuladora potente que las secuencias inmunoestimuladoras que contienen CpG. Un inmunómero mejora la respuesta inmune en un mamífero cuando se administra en combinación con un antígeno. Un inmunómero puede ser un inmunómero CpG o inmunómero CpG libre, como se discute adelante. Un inmunómero de ejemplo se describe en los ejemplos X y XI

Como se utiliza aquí, el término "un inmunómero CpG" se refiere a un inmunómero, como se describió anteriormente, que contiene específicamente un motivo CpG. Así, un inmunómero CpG es un oligonucleótido que comprende dos oligonucleótidos idénticos o no idénticos más pequeños, en donde al menos uno de los oligonucleótidos más pequeños contiene al menos un motivo CpG.

Como se utiliza aquí, el término "un inmunómero CpG libre" se refiere a un inmunómero que excluye específicamente un motivo CpG. Así, un inmunómero CpG libre es un oligonucleótido que comprende dos oligonucleótidos idénticos o no idénticos más pequeños, en donde ninguno de los oligonucleótidos más pequeños contiene un motivo CpG.

Un inmunómero puede contener bases modificadas (ver Kandimalla et al., *supra*, 2001). Por ejemplo, un inmunómero

32/

puede contener análogos de CpG. Por ejemplo, un inmunómero puede contener un análogo de pirimidina de desoxicitosina, designada Y. Particularmente los análogos de desoxicitidina útiles para uso en un inmunómero son desoxi-5-hidroxicitidina o desoxi-N4-etilcitidina. En otra modalidad, un inmunómero puede contener un análogo de purina de guanina, designado R. un análogo de desoxiguanina particularmente útil es 7-desazguanina. Así, un inmunómero puede contener un motivo YpG. Un motivo CpR, o un motivo YpR, en donde Y y R son análogos de citosina y guanina, respectivamente.

Los métodos de ligar dos oligonucleótidos más pequeños para formar un inmunómero se han descrito previamente (Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. 9: 807-813 (2001); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30: 4460-4469 (2002); Yu et al., Bioorg. Med. Chem. 11: 459-464 (2003); Bhagat et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 300: 853-861 (2003); y Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297: 83-90 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30: 1613- 1619 (2002); Yu et al., J. Med. Chem. 45: 4540-4548 (2002); Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13: 966-974 (2002); Yu et al., Bioorganic Med. Chem. Lett. 10: 2585- 2588 (2000); Agrawal y Kandimalla, Trends Mol. Med. 8: 114-121 (2002)). Ligadores de ejemplo incluyen, por ejemplo, uniones 3'-3' por vía de un ligador de gliceril (Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297: 83-90 (2002)). Los ligadores pueden ser alquilo, alquilo ramificado o

del

ligadores de etilen-glicol como se describe en Yu et al., J. Med. Chem. 45: 4540-4548 (2002) (ver Figura 1). Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que estos y otros métodos se pueden utilizar para ligar oligonucleótidos por vía de sus extremos 3' para generar dos extremos 5' libres.

Como se utiliza aquí, el término "secuencia inmunoestimuladora" o "ISS" se refiere a una secuencia de nucleótido que contiene un motivo CpG no metilado que es capaz de mejorar la respuesta inmune en un mamífero cuando se administra en combinación con un antígeno. Las secuencias inmunoestimuladoras se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 98/55495.

Como se utiliza aquí, el término "molécula de ácido nucleico que contiene un inmunómero" se refiere a un ácido nucleico ARN o ADN de doble hebra o hebra sencilla, ramificado, lineal o circular que contiene un inmunómero. Una molécula de ácido nucleico que contiene un inmunómero puede contener un inmunómero sencillo. Una molécula de ácido nucleico también puede contener más de un inmunómero si uno o ambos de los extremos 5' libres se ligan al extremo 5' de otra secuencia de ácido nucleico para generar otro extremo 3' potencial para ligar un inmunómero adicional. Tal una molécula de ácido nucleico, en adición al inmunómero puede ser de cualquier longitud mayor que 6 bases o pares base, y es generalmente

mayor de 15 bases o pares base, tal como mayor 20 bases o pares base y pueden ser de varios kb de longitud. Cuando tal un ácido nucleico que contiene un inmunómero es circular, o cuando este contiene múltiples inmunómeros que requieren uniones 5'-5' se entenderá que los extremos libres 5' se ligan, por ejemplo, como se describe en Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13: 966-974 (2002), y Yu et al., Bioorgan. Med. Chem. 10: 2585-2588 (2000), tan largo que la unión 5'-5' no interfiere con la actividad inmunoestimuladora del inmunómero embebido en el ácido nucleico, como se encuentra con inmunómeros cortos (Kandimalla et al., *supra*, 2002, y Yu et al., *supra*, 2000). un ácido nucleico que contiene un inmunómero puede contener adicionalmente secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos HIV para uso como una vacuna de ADN.

Una molécula de ácido nucleico o inmunómero que contiene un inmunómero se puede generar, por ejemplo, al sintetizar químicamente oligonucleótidos y ligar químicamente los oligonucleótidos por vía de los extremos 3', como se describe aquí. Adicionalmente, un inmunómero o molécula de ácido nucleico que contiene un inmunómero se puede generar al sintetizar recombinantemente las dos mitades del inmunómero o ácido nucleico que contiene un inmunómero y que liga químicamente las dos mitades por vía de sus extremos 3'.

Un inmunómero puede contener uniones de nucleótido natural o modificado o nucleótido natural o modificado. Las modificaciones se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, modificaciones del grupo 3'OH o 5'OH, modificaciones de la base de nucleótido, modificaciones del componente de azúcar, y modificaciones del grupo fosfato. Un enlace de nucleótido no natural puede ser, por ejemplo, un enlace de fosforotioato en lugar de un enlace fosfodiéster, que incrementa la resistencia de la molécula de ácido nucleico para la degradación de nucleasa. Varias modificaciones y enlaces se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 98/55495.

Como se utiliza aquí, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia que, cuando se agrega a un agente inmunogénico mejora no específicamente o potencia una respuesta inmune para el agente en el huésped recipiente luego de la exposición a la mezcla. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, emulsiones aceite en agua, emulaciones agua en aceite, alúmina (sales de aluminio), liposomas y micropartículas, tales como poliestireno, almidón, polifosfazeno y polilacturo/poliglicosidas, los adyuvantes también pueden incluir, por ejemplo, mezclas de escualeno (SAF-I), péptido muramilo, derivados de saponina, preparaciones de pared celular de microbacteria, lípido A monofosforilo, derivados de ácido micólico, tensoactivos de

copolímero de bloque no iónico, Quil A, subunidad B de toxina de cólera, polifosfazeno y derivados, y complejos de inmunoestimulación (ISCOM) tal como aquellos descritos por Takahashi et al. (1990) Nature 344: 873-875. Para uso veterinario y para la producción de anticuerpos en mamíferos, los componentes mitogénicos del adyuvante de Freund (ambos completos e incompletos) se pueden utilizar. En humanos, el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) es un adyuvante particularmente útil. Varios adyuvantes apropiados son bien conocidos en la técnica y se revisa, por ejemplo, por Warren y Chedid, CRC Critical Reviews in Immunology 8: 83 (1988).

Como se utiliza aquí, el término "SIDA" se refiere a la fase sintomática de la infección de HIV, e incluye el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (comúnmente conocido como SIDA) y "ARC", o Complejo Relacionado con SIDA, como se describe por Adler, Brit. Med. J. 294: 1145 (1987). Las manifestaciones clínicas e inmunológicas del SIDA son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, infecciones oportunistas y cánceres que resultan de deficiencia inmune.

Como se utiliza aquí, el término "que inhibe SIDA" se refiere a un efecto profiláctico o terapéutico benéfico de la composición inmunogénica en relación con la infección de HIV o síntomas de SIDA. Tales efectos benéficos incluyen, por ejemplo, evitar o retardar la infección inicial de un

21

individuo expuesto al HIV; reducir la carga viral en un individuo infectado con HIV; prologar la fase asintomática de la infección por HIV; mantener bajas cargas virales en pacientes infectados con HIV cuyo niveles de virus se han reducido por vía de terapia antiretroviral (ART); incrementar los niveles de células T CD4 o reducir la disminución en células T CD4, ambos HIV-1 específico y no específico en pacientes que no han experimentado tratamiento de droga y en pacientes tratados con ART, incrementando la salud general o calidad de vida en un individuo con SIDA; y prolongar la expectativa de vida de un individuo con SIDA. Un componente clínico puede comparar el efecto de la inmunización con la condición del paciente antes del tratamiento, o con la condición esperada de un paciente no tratado, para determinar si el tratamiento es efectivo en la inhibición del SIDA.

Como se utiliza aquí, el término "mejora" con respecto a una respuesta inmune se pretende signifique que la composición inmunogénica elicitte una mayor respuesta inmune que una composición que contiene antígeno de HIV solo. En el caso en donde la composición inmunogénica contiene los tres componentes de antígeno HIV, inmunómero y adyuvante, la composición inmunogénica elicitte una mayor respuesta inmune que lo que lo hace una composición administrada en las mismas cantidades y siguiendo el mismo programa de inmunización. Los componentes de las composiciones inmunogénicas de la

311

invención pueden actuar en sinergia. Una respuesta inmune mejorada puede ser, por ejemplo, incrementar la producción de quimocinas y/o citocinas que promuevan las células de memoria, un incremento en células de memoria, un incremento en la producción de IgG2b, un incremento en actividad de linfocito T citotóxico, un incremento en la producción de β -quimocina, o IL15, y similares. Como un ejemplo de una respuesta inmune mejorada las composiciones inmunogénicas de la invención pueden incrementar la producción de γ -interferón por ambas células CD4 (función auxiliar) y células CD8 (linfocitos T citotóxicos; CTL).

Como se utiliza aquí, el término " β -quimocina" se refiere a un miembro de una clase de polipéptidos quimioattractivos pequeños que incluyen RANTES, proteína- 1β (MIP- 1β) inflamatorio macrófago y proteína- 1α (MIP- 1α) inflamatorio macrófago. Las proteínas funcionales y físicas de las β -quimocinas son bien conocidas en la técnica.

En el caso de la producción de β -quimocina mejorada, la producción de β -quimocina puede ser "producción de β -quimocina específica de HIV", que se refiere a la producción de una β -quimocina en respuesta al estímulo de células T con un antígeno HIV. Alternativamente, o adicionalmente la

5/

producción de β -quimocina que se mejora puede ser "producción de β -quimocina no específica", que se refiere a la producción de β -quimocina en la ausencia de un estímulo de las células T con un antígeno HIV.

Como se utiliza aquí, el término "kit" se refiere a componentes empacados o marcados para ser usados juntos. Por ejemplo, un kit puede contener un antígeno HIV, un inmunómero y un adyuvante en tres contenedores separados. Alternativamente, un kit puede contener cualquiera de dos componentes en un contenedor, y un tercer componente y cualesquier componentes adicionales en uno o más contenedores separados. Opcionalmente, un kit adicional contiene instrucciones para combinar los componentes para formular una composición inmunogénica adecuada para administración a un mamífero.

La invención suministra una composición inmunogénica que contiene un antígeno HIV y, un inmunómero, y opcionalmente un adyuvante. La composición inmunogénica mejora la respuesta inmune en un mamífero al que se le ha administrado la composición. En una modalidad, la composición inmunogénica mejora una respuesta citotóxica de linfocito T (CTL) específica de HIV en un mamífero. En otra modalidad, la

composición inmunogénica mejora las células T auxiliares CD4+ específicas de HIV.

En una modalidad, el antígeno de HIV en la composición inmunogénica es un virus de HIV completamente muerto, que puede ser preparado por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el virus de HIV se puede preparar mediante cultivo de un espécimen de sangre periférica de individuos infectados. En un método de ejemplo de cultivo de virus de HIV las células mononucleares de la sangre periférica (por ejemplo, linfocitos) se puede obtener al cubrir un espécimen de sangre venosa heparinizada sobre un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque y centrifugar el espécimen. Las células mononucleares se recolectan luego, se activan con fitohemaglutinina durante dos a tres días, y cultivadas en un medio apropiado, preferiblemente complementado con interleucina 2 (IL2). El virus se puede detectar ya sea por un ensayo de transcriptasa reversa, por un ensayo de captura de antígeno para p24, por inmunofluorescencia o por microscopio de electrones para detectar la presencia de partículas virales en la células, todos los cuales son métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los métodos para aislar las partículas de HIV completamente muerto se describen, por ejemplo, Richieri et al., Vaccine 16: 119-129 (1998), y patentes estadounidenses No. 5,661,023

118

y 5,256,767. En una modalidad, el virus HIV es un HZ321 aislado de un individuo infectado en Zaire en 1976, que se describe en Choi et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13: 357-361 (1997).

Se conocen varios métodos en la técnica para hacer un virus no infeccioso (ver, por ejemplo, Hanson, MEDICAL VIROLOGY II (1983), de la Maza and Peterson, eds., Elsevier,). Por ejemplo, el virus se puede inactivar mediante tratamiento con químicos o mediante condiciones físicas tales como calor o irradiación. Preferiblemente, el virus se trata con un agente o agentes que mantiene las propiedades inmunogénicas del virus. Por ejemplo, el virus se puede tratar con beta-propiolactona o radiación gama, o ambos beta-propiolactona y radiación gama, en dosis durante tiempo suficiente para inactivar el virus.

En otra modalidad, el antígeno de HIV en la composición inmunogénica es un virus de HIV completamente muerto desprovisto de proteínas envolventes exteriores, que se pueden preparar mediante los métodos conocidos en la técnica. Con el fin de preparar virus completamente muertos desprovistos de proteínas envolventes exteriores, el virus aislado se trata para remover las proteínas envolventes exteriores. Tal remoción se acompaña preferiblemente por congelamiento y descongelamiento repetido del virus en

conjunto con los métodos físicos que originan el hinchamiento y contracción de las partículas virales, aunque otros métodos físicos o no físicos, tal como sonicación, también se pueden emplear solo o en combinación.

En aun otra modalidad, el antígeno de HIV en la composición inmunogénica es uno o más productos de gen substancialmente purificados de HIV. Tales productos de gen incluyen aquellos productos codificados por los genes gag (p55, p39, p24, p17 y p15), los genes pol (p66/p51 y p31-34) y la glicoproteína de transmembrana gp41; y la proteína nef. Estos productos de gen se pueden utilizar solos o en combinación con otros antígenos HIV. Los antígenos HIV también pueden ser fragmentos de péptido de productos de gen HIV que elicitán una respuesta inmune.

El producto de gen substancialmente purificado de HIV puede ser un antígeno p24 de HIV substancialmente purificado u otros antígenos de HIV y productos de gen. El p24, así como también otros antígenos de HIV, pueden ser substancialmente purificados a partir de virus mediante métodos bioquímicos conocidos en la técnica, o se pueden producir al clonar y expresar el gen apropiado en un organismo anfitrión tal como bacterias, hongos o células de mamíferos, por métodos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el antígeno p24, o una modificación o fragmento de este que retiene la actividad

inmunológica de p24, así como también otros antígenos de HIV o modificaciones o fragmentos de este, se pueden sintetizar, utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como síntesis de péptido automatizado. La determinación de si una modificación o fragmento de p24 retiene la actividad inmunológica de p24, u otros antígenos virales retiene su respectiva actividad inmunológica, se puede hacer, por ejemplo, mediante su capacidad de estimular la proliferación in vitro de PBMS inmunizado previamente como se analiza por ensayos de proliferación de linfocitos convencionales (LPA) conocidos en la técnica (ver Ejemplo III), al inmunizar un mamífero y comparar la respuesta inmune así generada, o ensayar la capacidad de modificación o fragmento para competir con el p24 para unirse a un anticuerpo p24 u otros antígenos de HIV a sus anticuerpos respectivos.

En todavía otra modalidad, el antígeno HIV en la composición inmunogénica es un producto de gen substancialmente purificado de un HIV de proteasa defectuosa (ver patentes estadounidenses No. 6,328,976 y 6,557,296).

El proceso de replicación para el HIV-1 tiene un índice de error de cerca de uno por 5-10 pares base. En razón a que el genoma viral completo esta justo por debajo de 10,000 pares base, esto resulta en un índice de error de cerca de un ciclo de replicación por par base. Este alto índice de mutación

contribuye a la variabilidad extensiva de los virus dentro de cualquier persona y a una amplia variabilidad a través de las poblaciones.

Esta variabilidad ha resultado en tres variantes de HIV-1 que se describen y están cerca de 10 subespecies de virus llamados "clados". Estas distinciones se basan en la estructura de las proteínas de la envoltura, que son especialmente variables. La variante M (para mayor) es de lejos la más prevalente a nivel mundial. Dentro de la variante M están los clados A, B, C, D, E, F, G H, I, J y K, con clados A hasta E que representan la vasta mayoría de infecciones globalmente. Los clados A, C y D son dominantes en África. El clado B es el más prevalente en Europa, Norte y Suramérica, Sureste Asiático. Los clados E y C son dominantes en Asia. Estos clados difieren el uno del otro tanto como 35%.

Existen dos resultados importantes de la muy alta proporción de mutación de HIV-1 que tiene profundas consecuencias para la epidemia. Primero, la alta proporción de mutación es uno de los mecanismos que permite al virus escapar del control por terapias de droga. Estos nuevos virus representan cepas resistentes. La proporción de alta mutación también permite al virus escapar al sistema inmune del paciente al alterar las estructuras que se reconocen por los componentes inmunes.

12/

Una consecuencia agregada de esta variabilidad extensiva es que el virus también puede escapar del control de vacunas, y las vacunas basadas en las proteínas de envoltura probablemente no serán efectivas.

La mayor variación en la estructura se ve en las proteínas de envoltura gp120 y gp41. La menor variación se ve en las varias proteínas internas. Como se describe aquí, REMUNE es un inmunógeno que se hace del virus completo sin sus proteínas gp120 pero contiene la mayoría de los epítomos altamente conservados del virus HIV-1. El número de estos epítomos y su menor incidencia de mutación significan que un virus HIV desprovisto de las proteínas de envoltura exterior tal como REMUNE estimula la respuesta inmune que tiene una mayor oportunidad de éxito dentro de los individuos. Adicionalmente, la línea de célula HuT78 se infecta con una cepa muy reciente de virus HIV que contiene ambos clados A y G para antígenos conservados, que se ha retenido a través de la mayoría de las variaciones en los clados vistos a nivel mundial, y su línea de célula infectada de HIV HuT78 provista de virus utiliza antígeno HIV. Así, el uso de un virus HIV con múltiples clados recientes que también están desprovistos de proteínas de envoltura exterior para inmunización pueden ser efectivos a través de los clados al suministrar antígenos conservados que se reconocen por la mayoría de los pacientes.

21

El antígeno HIV y un inmunómero se pueden mezclar juntos, o pueden ser conjugados por un enlace covalente o no covalente. Los métodos para conjugar antígenos y moléculas de ácido nucleico se conocen en la técnica, y los métodos de ejemplo se describen en la publicación PCT WO 98/55495.

Un componente de oligonucleótido de un inmunómero se puede preparar utilizando los métodos bien conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, síntesis de oligonucleótido, PCR, degradación química o enzimática de gran número de moléculas de ácido nucleico, y procedimientos de aislamiento de polinucleótido convencional. Los métodos para producir un componente de oligonucleótido de un inmunómero, incluyen un oligonucleótido que contiene uno o más bases modificadas o enlaces, se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 98/55495.

Aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente si un inmunómero particular es efectivo en mejorar una respuesta inmune deseada en un mamífero particular al inmunizar un mamífero de la misma especie, o una especie conocida en la técnica para exhibir similar respuesta inmune, con una composición que contiene un inmunómero particular. Una variedad de ensayos conocidos en la técnica pueden ser luego utilizados para caracterizar y comparar las características de las respuestas inmunes inducidas. Por

21

ejemplo, un inmunómero optimizado para incluir en una composición inmunogénica para administración a un humano se puede determinar en un humano o un primate no humano, tal como un babuino, chimpancé, macaco o mono al evaluar su actividad inmune, por ejemplo, por LPA, ELISPOT, y/o índices de anticuerpo de IgG1/G2 producido.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden además contener un adyuvante, tal como un adyuvante demostrado por ser seguro en humanos. Un adyuvante de ejemplo es el Adyuvante de Freund Incompleto (IFA). Otro adyuvante de ejemplo contiene componentes de pared celular de microbacteria y lípido A monofosforilo, tal como el adyuvante disponible comercialmente DETOX™. Otro adyuvante de ejemplo es alúmina. La preparación y formulación de los adyuvantes en composiciones inmunogénicas son bien conocidas en la técnica.

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden contener o ser formuladas junto con otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen agua estéril o salina fisiológicamente amortiguada. Un ingrediente aceptable farmacéuticamente puede ser cualquier compuesto que actúa, por ejemplo, para estabilizar, solubilizar, emulsificar, amortiguar o mantener estéril la composición inmunogénica, que es compatible con la administración a un

21

mamífero y no hace la composición inmunogénica inefectiva para su propósito propuesto. Tales ingredientes y sus usos son bien conocidos en la técnica.

La invención también suministra kits que contienen un antígeno HIV, inmunómero y opcionalmente un adyuvante. Los componentes del kit, cuando se combinan, producen una composición inmunogénica que mejora una respuesta inmune en un mamífero.

Los componentes del kit se pueden combinar ex vivo para producir una composición inmunogénica que contiene un antígeno HIV, un inmunómero y opcionalmente un adyuvante. Alternativamente, cualquiera de dos componentes puede ser combinado ex vivo, y administrado con un tercer componente, de tal como una forma de composición inmunogénica in vivo. Por ejemplo, un antígeno de HIV se puede emulsificar en, disolver en, mezclar con, o absorber con un adyuvante e inyectar en un mamífero precedido o seguido por inyección de inmunómero. De igual manera, cada componente del kit se puede administrar en forma separada. Aquellos expertos en la técnica entenderán que existen varios métodos de combinar y administrar un antígeno HIV, un inmunómero y opcionalmente un adyuvante, de tal forma que mejore la respuesta inmune en un mamífero. Como se discute adelante en mas detalle una composición inmunogénica de la invención se puede administrar

12/

localmente o sistemáticamente por métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero no están limitados a, intramuscular, intradérmico, intravenosa, intrasubcutánea, intraperitoneal, intranasal, oral u otras rutas de mucosa.

Como se describe aquí, REMUNE se ha encontrado que es inmunogénico en la mayoría de los pacientes, aunque con varios grados de potencia y duración (ejemplo VIII). Por lo tanto, una composición inmunogénica que comprende HIV desprovista de las proteínas de envoltura exterior combinada con adyuvante IFA, tal como REMUNE, se pueden utilizar para inducir una respuesta inmune en la mayoría de los pacientes infectados con HIV. Las composiciones inmunogénicas de la invención mejoran la fuerza y la potencia de la respuesta inmune para un inmunógeno de HIV tal como REMUNETM, mejorando por lo tanto la eficacia terapéutica y/o preventiva de una vacuna. Una respuesta inmune mejorada puede ser, por ejemplo, producción incrementada de células T auxiliares CD4+ específicas de HIV-1, quimocinas y/o citocinas, un incremento en células de memoria, un incremento en la producción de anticuerpo general y mas específicamente en la proporción de producción de IgG2b, un incremento en actividad de linfocito T citotóxico, un incremento en β -quimocina o producción de IL15, y similares. Así, las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden utilizar para mejorar el perfil de

citocina Th1 (proporción IFN γ alto, proporción IgG2/IgG1 alto). Como se describe aquí, los componentes de las composiciones inmunogénicas de la invención pueden actuar en sinergia. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden mejorar la producción de β -quimocina al elicitar la producción de una concentración mayor de β -quimocina que se puede esperar al agregar los efectos de combinaciones en forma de par de los componentes de la composición inmunogénica.

Las células de memoria se necesitan para mantener la inmunidad a largo plazo luego del estado agudo inicial de infección. Durante la fase de contracción luego de una etapa aguda inicial de infección, una cantidad significativa de células inmunes inducidas contra el agente infeccioso se destruyen por apoptosis, solo con las células supervivientes restantes capaces de ser células de memoria. Por lo tanto, proteger las células T CD8 y CD4 específicas de HIV de apoptosis promueve un incremento en las células de memoria CTL CD8 y auxiliar CD4 específica de HIV. Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden utilizar para incrementar las células de memoria, promoviendo por lo tanto a largo plazo las funciones auxiliares y de inmunidad mediada por célula. Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden utilizar para incrementar el número de células de

52

memoria al reducir la apoptosis o al estimular factores que promueven la supervivencia de las células de memoria.

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden utilizar para cambiar una respuesta TH2 a una TH1, incrementando por lo tanto la respuesta inmune mediada por la célula, que incluye una respuesta CD8+ más fuerte. Así, las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden utilizar para fortalecer la respuesta inmune en un paciente, quien de otra forma responde débilmente, y convierte la respuesta a inmunidad mediada por célula. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser así utilizadas para incrementar la fuerza y duración de una respuesta inmune en un paciente que habría respondido débilmente aun antígeno HIV similar como aquel utilizado en la composición inmunogénica.

Una composición inmunogénica de la invención es efectiva en el mejoramiento de una respuesta inmune, por ejemplo, producción de β -quimocina y/o IL15, IFN, IL2, TNF α mejorado, células auxiliares CD4 específicas de HIV incrementadas, producción de anticuerpo IgG2b, producción de linfocito citotóxico T (CTL) específico de HIV, producción de IFN γ por células CD4+ y células T CD8, y similares, en un mamífero al que se la ha administrado la composición. Como se describe en la solicitud estadounidense No. de serie 09/565,906,

presentada en Mayo 5, 2000 y WO 00/67787, cada uno de los cuales se incorpora como referencia, y en los Ejemplos I y III, la producción de β -quimocinas RANTES se puede detectar y cuantificar utilizando un ensayo ELISA de supernadantes de células T (tal como células de nodo linfático o células de sangre periférica) de mamíferos a los que se les administra la composición. Con el fin de determinar la producción de β -quimocina específica de antígeno, las células T de un mamífero inmunizado se pueden estimular con antígeno HIV en combinación con timocitos que presentan antígeno, y los niveles de β -quimocina medidos en el supernadante. Con el fin de detectar la producción de β -quimocina no específica, sea en supernadante de célula T o muestra de sangre o plasma de un mamífero inmunizado se pueden ensayar. De forma similar, la producción de otras β -quimocinas, tales como MIP-1 α y MIP-1 β se pueden detectar y cuantificar utilizando ensayos ELISA disponibles comercialmente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los métodos para medir la proporción de citocina, que incluyen interferón, IL15, IL2, TNF α , IL10 e IL7, por ELISPOT, ELISA, o teñido de citocina intracelular son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Robbins et al., SIDA 17: 1121-1126 (2003)).

22

Una composición inmunogénica de la invención puede además ser capaz de mejorar la producción de anticuerpo IgG2b específico de HIV en un mamífero al que se le ha administrado la composición. Los altos niveles de anticuerpo IgG2b, que se asocian con respuesta tipo Th1, se correlacionan con la protección contra infección de HIV y progresión a SIDA. Así, la invención suministra composiciones que pueden incrementar una respuesta TH1.

Una composición inmunogénica de la invención puede además ser capaz de mejorar las respuestas citotóxicas de linfocito T (CTL) específicas de HIV en un mamífero al que se le administra la composición. Una composición inmunogénica de la invención puede incrementar la producción IFN- γ mediante células T CD4+ y células T CD8+.

La producción de IFN- γ por células T CD4+ se caracteriza como una respuesta auxiliar CD4 clásica importante a la inmunidad mediada por células. Las células T CD4+ que producen IFN e IL2 pueden ser más efectivas. La producción de IFN- γ por células T CD8+ es representativa de una respuesta citotóxica de linfocito T (CTL), y se correlaciona altamente con la actividad citolítica. Las células que producen el IFN y el TNF α pueden ser más efectivas. La actividad del CTL es un componente importante de una respuesta inmune anti-HIV

terapéutico o profiláctico efectivo. Los métodos para determinar si una respuesta CTL se mejora luego de la administración de una composición inmunogénica de la invención son bien conocidos en la técnica, e incluyen ensayos citolíticos y ensayos LPA (descritos, por ejemplo, en in Deml et al. *supra* (1999); ver Ejemplo III), y ensayos ELISA y ELISPOT para producción de IFN- γ específico de CD8 (ver solicitud estadounidense No. de serie 09/565,906 y WO 00/67787 y Ejemplos I y II adelante), el teñido intracelular y el análisis FACS que utilizan una miríada de anticuerpos contra marcadores de superficie celular.

La invención también suministra un método para inmunizar un individuo. El método consiste en mejorar la respuesta inmune en un individuo al administrar a un mamífero una composición inmunogénica que contiene un antígeno HIV, un inmunómero, y opcionalmente un adyuvante. Los componentes de la composición inmunogénica se pueden administrar en cualquier orden o combinación tal como la composición inmunogénica se forma ex vivo o in vivo.

En una modalidad particular, el antígeno HIV, inmunómero y adyuvante opcional se administran simultáneamente o cerca del mismo tiempo, cerca del mismo sitio. Sin embargo, administrar los componentes dentro de varios minutos o varias horas del

uno al otro también puede ser efectivo al suministrar una composición inmunogénica que en una respuesta inmune. Adicionalmente, administrar los componentes en diferentes sitios en el mamífero también puede ser efectivo en el suministro de una composición inmunogénica que mejora una respuesta inmune. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un tiempo adecuado y ubicación para administrar en forma separada los componentes, esto es, el antígeno HIV, inmunómero y componentes adyuvantes opcionales, para suministrar una respuesta inmune suficiente al administrar los componentes separados en varios tiempos y ubicaciones y medir la repuesta inmune. La composición inmunogénica también se puede administrar múltiples veces, si se desea, por ejemplo, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, o 10 o más, o cualquier número deseado de veces para estimular o mejorar una repuesta inmune específica de HIV.

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar a un humano para inhibir SIDA, tal como mediante la prevención de infección inicial de un individuo expuesto al HIV, reducción de la carga viral en un individuo infectado con HIV, prolongar la fase asintomática de la infección por HIV, incrementar la salud general o calidad de vida en un individuo con SIDA, o prolongar la expectativa de vida de cualquier individuo con SIDA. Como se describe aquí, la

23

administración a un mamífero de una composición inmunogénica que contiene un antígeno HIV, una molécula de ácido nucleico aislado que contiene un inmunómero, y opcionalmente un adyuvante estimula la respuesta inmune correlacionada con la protección contra infección por HIV y la progresión a SIDA.

En particular, las composiciones inmunogénicas mejoran la respuesta inmune más efectivamente que lo que se esperaría por la combinación de cualquiera de los componentes individuales o, en una composición de tres componentes que contienen un antígeno HIV, inmunómero, y adyuvante, cualquiera de dos componentes de composiciones inmunogénicas. Adicionalmente, la composición inmunogénica promueve la fuerza de la respuesta inmune de tipo Th1, que incluye las citocinas tipo TH1 (por ejemplo, IFN- γ) y los isotipos de anticuerpo tipo Th1 (por ejemplo, IgG2b). Así, las composiciones inmunogénicas de la invención serán efectivas como vacunas para evitar la infección por HIV cuando se administra a individuos seronegativos, y para reducir la carga viral, prolongar la fase asintomática de la infección, y afectar positivamente la salud o esperanza de vida de un individuo seropositivo.

Los individuos que han sido expuestos al virus HIV usualmente expresan en su suero ciertos anticuerpos específicos para

150

HIV. Tales individuos se denominan "seropositivos" para HIV, en contraste con individuos que son "seronegativos." La presencia de anticuerpos específicos para HIV se puede determinar mediante sistemas de ensayo disponibles comercialmente.

Actualmente, los ensayos serológicos para detectar la presencia de anticuerpos para virus son los métodos más ampliamente utilizados para determinar la infección. Tales métodos pueden, sin embargo, resultar en negativos falsos, como en donde un individuo a contraído el virus pero no a montado una respuesta inmune y en positivos falsos, como cuando un feto puede adquirir los anticuerpos, pero no el virus de la madre. En donde los ensayos serológicos suministran una indicación de infección, puede ser necesario considerar todos aquellos cuyos ensayos seropositivos como un hecho, están infectados. Adicionalmente, ciertos de aquellos individuos quienes se encuentran son seronegativos pueden de hecho ser tratados por ser infectados si ciertas otras indicaciones de infección tales como contacto con portador conocido se satisfacen.

Las composiciones inmunogénicas de la in se pueden administrar a un individuo quien es HIV seronegativo o seropositivo. En un individuo seropositivo, puede ser deseable administrar la composición como parte de un régimen

451

de tratamiento que incluye tratamiento con agentes antivirales, tal como inhibidores de proteasa. Agentes antivirales y su uso en regímenes de tratamiento son bien conocidos en la técnica, y un régimen apropiado para un individuo particular se puede determinar por un médico experto.

Como se describe en la solicitud estadounidense No. de serie 09/565,906 y WO 00/67787 y descrito aquí y un ejemplo IV adelante, la administración de composiciones inmunogénicas de la invención a un feto de primate o a un neonato de primate resulta en la generación de una fuerte respuesta inmune anti-HIV, que indica que el sistema inmune de los fetos e infantes es capaz de montar una respuesta inmune a tales composiciones que deben proteger al niño de la infección de HIV o progresión a SIDA. De acuerdo con esto, las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar a una madre preñada infectada con HIV para evitar la transmisión de HIV al feto, o a un feto, un infante, un niño o un adulto mediante una vacuna terapéutica o profiláctica.

La dosis de la composición inmunogénica, o componentes de esta, para ser administrada en los métodos de la invención se selecciona por ser efectiva en la estimulación de las respuestas inmunes deseadas. En forma general, una composición inmunogénica formulada para una administración sencilla

contiene entre cerca de 1 a 200 μ g de antígeno de proteína. Una composición inmunogénica generalmente contiene cerca de 100 μ g de antígeno de proteína para administración a un primate, tal como un humano. Como se describe en la solicitud estadounidense No. de serie 09/565,906 y WO 00/67787 y descrita aquí y mostrada en el Ejemplo IV, adelante, cerca de 100 μ g de antígeno de HIV en una composición inmunogénica elicitaba una fuerte respuesta inmune en un primate. Cerca de 10 μ g de antígeno de HIV es adecuado para administración a un roedor. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar una cantidad adecuada de antígeno HIV para incluir en una composición inmunogénica de la invención suficiente para estimular una respuesta inmune.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden además contener cerca 5 μ g a cerca de 100 μ g de un inmunómero y pueden contener hasta 10 mg de inmunómero, si se desea. Por ejemplo, en una dosis para administración a un humano la dosis puede ser de cerca de 0.01 mg a cerca de 5 mg, por ejemplo, cerca de 0.05 mg, cerca de 0.1 mg, cerca de 0.2 mg, cerca de 0.3 mg, cerca de 0.4 mg, cerca de 0.5 mg, cerca de 0.6 mg, cerca de 0.7 mg, cerca de 0.8 mg, cerca de 0.9 mg, cerca de 1 mg, cerca de 1.1 mg, cerca de 1.2 mg, cerca de 1.3 mg, cerca de 1.4 mg, cerca de 1.5 mg, cerca de 1.7 mg, o cerca de 2 mg. La cantidad de inmunómero a ser administrada

es generalmente de cerca de 0.1 mg/kg a cerca de 0.25 mg/kg hasta a cerca de 5 mg/kg, y puede ser, por ejemplo, cerca de 0.2, cerca de 0.3, cerca de 0.4, cerca de 0.5, cerca de 0.6, cerca de 0.7, cerca de 0.8, cerca de 0.9, cerca de 1, cerca de 1.2, cerca de 1.5, cerca de 1.7, cerca de 2, cerca de 2.5, cerca de 3, cerca de 3.5, cerca de 4, cerca de 4.5, o cerca de 5 mg/kg. La cantidad de inmunómero también puede ser de cerca de 0.2 µg/kg, cerca de 0.5 µg/kg, cerca de 1 µg/kg, cerca de 2 µg/kg, cerca de 3 µg/kg, cerca de 4 µg/kg, cerca de 5 µg/kg, cerca de 6 µg/kg, cerca de 7 µg/kg, cerca de 8 µg/kg, cerca de 9 µg/kg, cerca de 10 µg/kg, cerca de 11 µg/kg, cerca de 12 µg/kg, cerca de 13 µg/kg, cerca de 14 µg/kg, cerca de 15 µg/kg, cerca de 16 µg/kg, cerca de 17 µg/kg, cerca de 18 µg/kg, cerca de 19 µg/kg, cerca de 20 µg/kg, cerca de 22 µg/kg, cerca de 25 µg/kg, y similares. Como se describió previamente en la solicitud estadounidense No. de serie 09/565,906 y WO 00/67787, una proporción de al menos 5:1 por peso de molécula de ácido nucleico para antígeno de HIV es más efectivo que las proporciones inferiores para elicitación de respuesta inmune. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar una proporción apropiada u optimizada de inmunómero para antígeno HIV para elicitación de una respuesta inmune. Por ejemplo, la proporción se puede variar y la respuesta inmune medir por métodos descritos aquí para determinar una proporción adecuada u optimizada de inmunómero

para antígeno HIV. En roedores, una cantidad efectiva de un inmunómero en una composición inmunogénica es de 5 µg a mayor de 50 µg, tal como cerca de 100 µg. en primates cerca de 500 µg de un inmunómero es adecuado en una composición inmunogénica. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente una cantidad apropiada de inmunómero para elicitación una respuesta inmune deseada.

Como con todas las composiciones inmunogénicas, las cantidades inmunológicamente efectivas se determinan empíricamente, pero se pueden basar, por ejemplo, en cantidades inmunológicamente efectivas en modelos animales, tales como roedores y primates no humanos. Factores a ser considerados incluyen la antigenicidad, la formulación (por ejemplo, volumen, tipo de adyuvante) la ruta de administración, el número de dosis de inmunización a ser administrada, la condición física, peso y edad del individuo, y similares. Tales factores son bien conocidos en la técnica de vacuna y esta está bien dentro de la experiencia del inmunólogo para hacer tales determinaciones sin experimentación.

Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar en forma local o sistemáticamente mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no

está limitado a, ruta intramuscular, intradérmica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, oral u otras rutas de mucosa. Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar en un portador farmacéutico no tóxico adecuado, o se pueden formular en microcápsulas o como un implante de liberación sostenida. Las composiciones inmunogénicas de la invención se pueden administrar múltiples veces, si se desea, con el fin de sostener la respuesta inmune deseada. La ruta apropiada, formulación y programación de inmunización se puede determinar por aquellos expertos en la técnica.

Se entenderá que modificaciones que no afecten substancialmente la actividad de las varias modalidades de esta invención también incluyen dentro de la definición de la invención suministrada aquí. De acuerdo con esto, los siguientes ejemplos se destinan a ilustrar pero no a limitar la presente invención.

EJEMPLO I

Elicitación de respuestas de quimocina, citocina y anticuerpo mediante composiciones inmunogénicas de HIV

Este ejemplo se diseña para mostrar que las composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno HIV, inmunómero y un

9/27

adyuvante, son estimuladores potentes de la producción IFN- γ (citocina un Th1 (CD8) y Th2 (auxiliar CD4)), respuesta de anticuerpo y producción de β -quimocina en un mamífero. Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno HIV, un inmunómero y un adyuvante median respuestas inmunes potentes de los tipos que son importantes en la protección contra la infección HIV y la progresión de la enfermedad, que indican que estas composiciones serán vacunas terapéuticas y profilácticas efectivas.

Inmunómeros. Los inmunómeros se sintetizan como se describió previamente (Kandimalla et al., Bioorg. Med. Chem. 9: 807-813 (2001); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30: 4460-4469 (2002); Yu et al., Bioorg. Med. Chem. 11: 459-464 (2003); Bhagat et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 300: 853-861 (2003); y Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 297: 83-90 (2002); Yu et al., Nucl. Acids Res. 30: 1613- 1619 (2002); Yu et al., J. Med. Chem. 45: 4540-4548 (2002); Kandimalla et al., Bioconjugate Chem. 13: 966-974 (2002); Yu et al., Bioorganic Med. Chem. Lett. 10: 2585- 2588 (2000); Agrawal y Kandimalla, Trends Mol. Med. 8: 114-121 (2002)).

Inmunizaciones. El antígeno HIV-1 se prepara esencialmente como se describió previamente (WO 00/67787). En resumen. El antígeno HIV-1 se prepara de partículas de virus obtenidas de

cultivo de un Hut78 infectado crónicamente con un virus aislado Zairiano (HZ321) que se ha caracterizado como subtipo "M" que contiene un virus recombinante G A/gag env (Choi et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 13: 357-361 (1997)). El gp120 se agota durante los procesos de purificación de dos etapas. El antígeno se inactiva mediante la adición de β -propiolactona e irradiación gama a 50 kGy. Se utiliza análisis Western blot y HPLC para Mostar niveles indetectables de gp120 en la preparación de este antígeno (Prior et al., Pharm Tech. 19: 30-52 (1995)). Para experimentos in vitro, p24 nativo es preferencialmente lisado de anticuerpo HIV-1 purificado con 2% de tritón X-100 y luego purificado con resina S de Flujo Rápido Farmacia Sepharose™. La cromatografía se lleva a cabo en pH = 5,0, y p24 se eluye con un gradiente de sal lineal. La pureza del producto final se estima y se encuentra generalmente que es >99% por ambos SDS (dodecil sulfato de sodio) electrofóresis y cromatografía líquida de alta presión de fase reversa. Se agrega el inmunómero al antígeno HIV-1 diluido en un volumen de la menos 5% del volumen final.

Se prepara CFA (adyuvante completo de Freund) al resuspender el micobacterium tuberculosis H37RA (DIFCO, Detroit, Michigan) en 10 mg/ml en IFA (DIFCO, Detroit, Michigan). Se formula IFA o ISA 51® al agregar una parte del tensoactivo

Montanide 80 (monoleato de manida de alta pureza, Seppie, Paris) a nueve partes de Drakeol 6 VR aceite mineral liviano (Panreco, Karnes City, Pennsylvania). El antígeno HIV-1 agotado gpl20 se diluye en PBS en 200 µg/ml y emulsificada con volúmenes iguales de CFA o IFA con o sin inmunómero.

Los ratones C57B1, mantenidos en una instalación libre de patógenos, son inyectados intradérmicamente con 100 µl de emulsión. Cada animal recibe 1-10 µg de antígeno HIV-1 inactivado en CFA, IFA, 10-100 µg de inmunómero, o IFA más 10-100 µg de inmunómero. Dos semanas más tarde, los animales son reforzados subcutáneamente en la base de la cola utilizando el mismo régimen, exceptuando que los animales cebados con antígeno HIV-1 en CFA son por el contrario reforzados con antígeno HIV-1 en IFA. Los ratones son cebados y reforzados con antígeno HIV-1 en la presencia de inmunómero. Los controles negativos son administrados como solución salina o IFA en solución salina. En el día 28, los animales son sacrificados para análisis de citocina, quimocina y anticuerpo.

ELISA para anticuerpo específico de anfígeno. Toda la sangre se recolecta de animales inmunizados mediante punción cardíaca al final del estudio. Los tubos SST son centrifugados a 800 rpm durante 20 minutos. El suero es puesto en alicuotas y almacenado menos 20°C hasta que se

231

ensaya. Las placas de PVC (placas de bifenil policlorinado, Falcon, Oxnard, California) son recubiertas con p24 diluido en PBS a un $\mu\text{g/ml}$ y almacenado a 4°C durante toda la noche. Las placas son bloqueadas al agregar 200 μl por pozo de BSA al 4% de PBS durante 1 hora. El suero se diluye en BSA en 1% en PBS a 1:100 seguido por dilución en serie 4 veces. 100 μl de suero diluido es agregado en duplicado e incubado a temperatura ambiente de cuarto durante 2 horas. Las placas son lavadas con Tween 20 al 0.05% en PBS tres veces y secado por absorción. Los anticuerpos secundariamente detectados (biotina IgG anti-ratón de cabra o rata, biotina IgG1 anti-ratón de cabra o rata, o biotina IgG2 a anti-ratón de cabra o rata, por ejemplo, Zymed, San Francisco, California) se diluyen en BSA al 1% en PBS. 100 μl de anticuerpo secundario diluido se agrega a cada pozo y se incuba temperatura ambiente de cuarto durante otra hora. Después de lavar el exceso de anticuerpo secundario, se agrega strep-avidin-biotin-HRP (Pierce, Rockford, Illinois) a 50 μl por pozo y se incuba durante 30 minutos. Las placas son lavadas con Tween 20 0.05% en PBS tres veces. El sustrato de ABTS (kpl, Gaithersburg, Maryland) se agrega hasta que se desarrolla un color verde azulado. La reacción se detiene mediante la adición de SDS al 1% y la placa es leída a absorbancia 405 nm.

231

La respuesta del anticuerpo reportada como título de anticuerpo 50% es la recíproca de la dilución igual al 50% de la unión máxima (lectura óptica más alta) para una muestra dada. El valor de absorbancia (OD@ 405 nm) se grafica contra la dilución del anticuerpo en una escala log, produciendo una curva de respuesta de dosis sigmoidal. 50% de la unión máxima es calculada al multiplicar el OD más alto por 0.5. El valor del 50% se localiza sobre la curva y el valor del eje x correspondiente es reportado como la dilución del anticuerpo.

El ensayo ELISA para análisis de Citosina y Quimocina. Los nodos linfáticos de drenaje (inguinal, superficial y popliteal) son aislados de los animales inmunizados dos semanas después del refuerzo. Suspensiones de células simples de estos nodos linfáticos se preparan mediante disociación mecánica utilizando un tamizado de malla de 70 μ m estéril. Las células T son purificadas de las células de nódulo linfático por el método de paneo. En resumen, se pre-recubren platos petri (100 x 15 mm) con 20 μ g/ml de IgG de anti-ratón de conejo durante 45 minutos a temperatura ambiente de cuarto. Los platos petri son lavados dos veces con PBS enfriado con hielo y una vez con suero AB humano al 2% enfriado con hielo en PBS. 1×10^7 células de nodo linfático son agregadas a las placas pre lavadas e incubadas a 4°C durante 90 minutos. Las células no adherentes (células T enriquecidas) son entonces recolectadas y transferidas a

127

tubos cónicos estériles de 50 ml. Las placas son lavadas dos veces y combinadas con las células no adherentes. Las células son entonces centrifugadas y los glóbulos de células resuspendidos en medio completo a 4×10^6 células/ml (suero AB humano 5% en RPMI 1640, con 25 mM hepes, 2mM de L-glutamina, 100 μ g estreptomycin y 5×10^{-6} M de β -mercaptoetanol).

Los timocitos irradiados con rayos gama provenientes de un ratón C57BL son utilizados como antígeno que presenta células. 2×10^5 Células T enriquecidas y 5×10^5 timocitos son agregados a cada pozo de las 96 placas con base redonda. El antígeno HIV-1 y el p24 nativo son diluidos en medio completo a 10 μ g/ml mientras el A se diluye a 5 μ g/ml. 100 μ l de cada antígeno o célula T mitógena son agregados triplicados. Las placas son incubadas a CO₂ al 5%, 37°C durante 72 horas. Los supernadantes son cosechados y almacenados a -70°C hasta ensayo. Las muestras son ensayadas para IL-4, IFN- γ y RANTES utilizando kits comercialmente disponibles, (por ejemplo, Biosource, Camarillo, California) específico para citocinas y quimocinas de ratón.

Métodos estadísticos. Las estadísticas no para métricas Mann-Whitney U se utilizan para grupos. Todos los valores p son biunidos.

El Adyuvante de Freund Completo (CFA) es habitualmente el adyuvante más potente conocido para estimular las respuestas inmunes mediadas por células. Sin embargo, el CFA no es un adyuvante apropiado para uso en humanos en razón de su tema de seguridad. Así, la combinación de inmunómero IFA para uso en una composición inmunogénica HIV suministra seguridad y vacunas efectivas para terapia humana.

Para examinar la respuesta inmune relacionada con dosis al IFN-(ratones C57BL son inmunizados con el antígeno HIV-1 vaciado de gp 120 inactivado emulsificado en IFA que contiene concentraciones diferentes de inmunómero.

Para examinar si también se puede reforzarla respuesta de anticuerpo a un antígeno HIV-1, es ensayado suero para IgG total e isotipo de Th2 (IgG1 e IgG2a) para el antígeno p24.

Así, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser utilizadas para mejorar la producción de β -quimocina en un individuo. En razón de la correlación fuerte entre los niveles de β quimocina y la protección de la infección de HIV y la progresión de la enfermedad, las composiciones de la invención serán más efectivas que otras composiciones descritas para inhibir el SIDA.

EJEMPLO II

146

Elicitación de respuestas inmunes CD4 y CD8 mediante composiciones inmunogénicas de HIV

Este ejemplo se diseña para mostrar la inducción de las funciones de ayuda CD4 potentes, las respuestas inmunes tipo Th1 específicas de CD8 HIV, y un cambio a proporciones de anticuerpo IgG2a/IgG1 mayores o más altas luego de inmunización con una composición inmunógena que contiene un antígeno de HIV, un inmunómero y un adyuvante. Las respuestas específicas de antígeno mediante CD8+, linfocitos citotóxicos T son un factor importante para prevenir la infección HIV inicial y la progresión de la enfermedad. Así, este ejemplo suministra evidencia adicional de que las composiciones inmunogénicas de la invención son vacunas profilácticas y terapéuticas efectivas.

El antígeno HIV, el inmunómero IFA son preparados esencialmente como se describió en el ejemplo 1. Los ratones C57BL son inmunizados esencialmente como se describió en el ejemplo 1, y sacrificados en el día 28 para ELISPOT y análisis anticuerpo p24. El análisis de anticuerpo p24 se desarrolla esencialmente como se describió en el ejemplo 1.

ELISPOT para interferón gama proveniente de masa y poblaciones de células T purificadas. Las suspensiones de células simples son preparadas de bazos de ratones

21

inmunizados al desmenuzar y presionar a través de un tamiz de nylon de maya fina estéril en RPM1640 (Hyclone, Logan, Utah). Los esplenocitos son purificados mediante centrifugación de gradiente ficoll. Las células CD4 y CD8 fueron aisladas mediante vaciamiento de glóbulo magnético. 2×10^7 células son tenidas con 5µg de CD4 anti-ratón de conejo o de rata o CD8 anti-ratón de conejo o de rata. Las células son incubadas sobre hielo durante 30 minutos y lavadas con suero AB humano al 2% inflado con hielo en PBS. Los Dynabeads pre-lavados (DYNAL, Oslo, Noruega) recubiertos con IgG anti-ratón de cabra son agregados a la suspensión de célula e incubados a 4°C durante 20 minutos con mezcla constante.

El CD4, CD8 y los esplenocitos no vaciados purificados son resuspendidos en un medio completo (5% de suero AB humano inactivado en RPMI 1640, Pen-strep, L-glutamina y β-ME) al 5×10^6 células/ml y utilizadas para el ensayo de ELISPOT para enumerar las células secretoras de IFN-γ individuales. En resumen, 96 placas microtituladoras con fondo de nitrocelulosa (Millipore, Co., Bedford, U.K) son recubiertas con 400 ngs por pozo de IFN-γ anti-ratón de conejo (Biosource, Camarillo, California). Después de incubación durante toda la noche a 4°C, las placas son lavadas con PBS estéril y bloqueadas con suero AB humano al 5% en RPMI 1640 que contiene pen-strep, L-glutamina y β-ME) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas son lavadas con PBS estéril

231

y 5×10^5 por pozo de esplenocitos (CD4 purificados, CD8 purificados y no vaciados) fueron agregados en triplicado e incubados durante toda la noche a 37°C y CO_2 al 5%. Las células son cultivadas con medio, OVA (Ovo Albúmina de Huevo de Pollo Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri), p24 nativo o antígeno HIV-1 vaciado de gp 120. Los esplenocitos CD4 purificado y CD8 purificado son ensayados en medio completo que contiene 20 unidades/ml de IL-2 de rata recombinante (Pharmlingen, San Diego, CA).

Después de lavar células no unidas, 400 ng por pozo de IFN-(anti-ratón de conejo policlonal son incubadas a temperatura ambiente de cuarto durante 2 horas, luego lavadas y teñidas con biotina IgG anti-conejo de cabra (zymed, San Francisco, California). Después de lavados extensivos con PBS estéril, el complejo de fosfatasa alcalina avidina (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) se agrega y se incuba durante otra hora a temperatura ambiente de cuarto. Las manchas son desarrolladas al agregar sustrato de fosfato alcalino cromogénico (Sigma, San Luis, MO), y las células IFN-(son contadas utilizando un microscopio de disección (X40) con una fuente de luz Highlight 3000 (Olympus, Lake Success, NY).

Métodos estadísticos. Las estadísticos no paramétricas Mann-Whitney U se utilizan para comparar los grupos. La correlación de rango Spearman se desarrolla para examinar la

148

relación entre la producción de interferón gama CD4 y CD8. Todos los valores p son biunidos.

La producción de IFN- γ mediante esplenocitos no vaciados, y mediante poblaciones de CD4+ purificado o CD8+ purificadas, se examina. La producción de IFN- γ mediante células CD4+ es una característica de la respuesta inmune Th1 mientras que la producción de IFN- γ mediante células CD8+ es una correlación de la actividad citolítica del linfocito T citotóxico (CTL). El IgG, IgG1 y IgG2b total específico para p 24 también se examina.

En resumen, este ejemplo muestra que una composición inmunogénica que contiene un antígeno HIV, un inmunómero y un adyuvante se pueden utilizar para generar respuestas inmunes específicas a HIV CD4+ y CD8+ específicas de HIV potente. La inducción de células adyuvantes CD4+ T pueden ser pivote para la generación de células efectoras CD8+. Las células T CD8 pueden servir como efectoras contra el virus HIV mediante varios mecanismos, que incluyen la actividad citolítica directa (CTL), así como también a través de la liberación de factores supresores antivirales, tales como β -quimocinas y otros factores menos bien caracterizados. De acuerdo con esto, las composiciones descritas aquí son superiores a otras composiciones descritas para uso como vacunas para HIV.

52

EJEMPLO III

Comparación de la respuesta inmune elicitada por diferentes composiciones inmunogénicas y programas de inmunización.

Este ejemplo se diseña para mostrar que el ácido nucleico que contiene un inmunómero es más efectivo para elicitar respuestas inmunes protectoras, que incluyen la producción RANTES y la producción de anticuerpo IgG2b específica para HIV, cuando se administra simultáneamente con un antígeno HIV y un adyuvante cuando se utilizan para cebar el mamífero una semana antes de la administración del antígeno y adyuvante. Este ejemplo también muestra que una composición que contiene un antígeno HIV, un inmunómero y un adyuvante promueve la proliferación de linfocito dependiente de antígeno más efectivamente que la composición que contiene solamente HIV e IFA.

El antígeno HIV, los inmunómeros e IFA son preparados esencialmente como se describió en el ejemplo I. Los ratones C57bBL (al menos tres por grupo) son inmunizados el día 7 y, donde se indica, cebados el día 0, con las siguientes composiciones mostradas en la Tabla I.

Tabla I

Grupo	Día 0	Día 7
A	Inmunómero	HIV-1

15

B		HIV-1
C	Inmunómero	HIV-1/IFA
D		HIV-1/IFA
E		HIV-1/IFA/Inmunómero

Los animales son sacrificados el día 21 para análisis de citosina, quimocina y anticuerpo, esencialmente como se describió en el Ejemplo I, así como también para análisis de proliferación de linfocito.

Ensayo de proliferación de linfocito. Las suspensiones de célula simple son preparadas de los nodos linfáticos de drenaje de animales inmunizados. Las células B son vaciadas de células de nodo de linfa mediante paneo. En resumen, las células de nodo linfático son incubadas con platos petri recubiertos con IgG anti-ratón durante 90 minutos. Las células no adherentes (células T enriquecidas) son reconectadas y resuspendidas en un medio de cultivo de tejido completo a 4×10^6 /ml. Las células T enriquecidas son cultivadas con p 24 o antígeno HIV-1 en la presencia de timocitos irradiados o gama irradiados a 37°C, CO₂ al 5% durante 40-48 horas. Las muestras son purificadas con timidina tritiada e incubadas durante otras 16 horas. Las células son cosechadas, y la incorporación de timidina tritiada se cuenta utilizando un contador de β -centelleo.

152

La producción de citocina en las células T, por ejemplo, quimocinas IFN- γ β tal como las RANTES, MIP-1 β y MIP-1 α se determinaron utilizando métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los niveles de suero del IgG, IgG1 e IgG2b específicas para p 24 también son examinadas. Además, las respuestas proliferativas de las células T para antígeno p 24 y HIV vaciado de pgl20 son examinadas.

Así, la composición inmunogénica de la invención puede efectivamente elicitar citocina Th1 específica para HIV (IFN- γ) y respuestas tumorales (anticuerpos IgG2), y pueden mejorar tanto la producción de β -quimocina específica para HIV como no específica. Estas respuestas a las composiciones inmunogénicas se correlacionan con respuestas fuertes proliferativas de linfocito T específicas de HIV.

EJEMPLO IV

Imunización de un primate con una composición inmunogénica de HIV.

Este ejemplo se diseña para mostrar que las composiciones inmunogénicas que contienen un antígeno de HIV, un inmunómero y un adyuvante son efectivas para mejorar las respuestas inmunes específicas de HIV en primates.

153

Tres fetos de maní son inyectados *in utero* con una composición inmunogénica que contiene HIV-1 vaciado de gp 120 (100 µg de proteína total, equivalentes a 10 unidades p 24) en IFA con 500 µg de inmunómero. Cuatro semanas después, los fetos son reforzados utilizando el mismo régimen.

Las células mononucleares de sangre periférica provenientes de mandriles neonatos son recolectadas, y se ensayan las respuestas proliferativas a antígeno p24 y HIV-1.

La producción de anticuerpos específicos para HIV, citocinas y β-quimocinas también son medidas en los mismos mandriles. Estos resultados muestran que los tipos de respuestas inmunes y licitadas por las composiciones inmunogénicas descritas en los Ejemplos I-III, anteriores, para roedores también son elicítadas en primates.

Estos resultados demuestran que las composiciones inmunogénicas de HIV y los métodos de la invención son efectivas en primates para estimular las respuestas inmunes específicas para HIV. Adicionalmente, estos resultados demuestran que los fetos y los infantes son capaces de elicitar respuestas inmunes fuertes a HIV a las composiciones inmunogénicas de la invención, que indican que tres composiciones serán útiles para evitar la transmisión maternal de HIV y como vacunas pediátricas.

154

EJEMPLO V**Respuesta inmune a vacunación con inmunógeno HIV vaciado****De gp120 inactivado combinado con inmunómero en un modelo de ratón.**

Este ejemplo describe la caracterización y la capacidad de un inmunómero para mejorar la inmunogenicidad del antígeno HIV-1 y del inmunógeno HIV-1 (antígeno emulsificado IFA) en un modelo de ratón.

Los ratones C57BL/6 (6-8 semanas de edad) son inyectados como se indica adelante. El número por grupos es generalmente al menos 8-10 ratones.

- 1) PBS
- 2) Inmunómero a 30 µg por ratón = 1.5 mg/kg
- 3) Inmunómero (dosis más alta de 90 µg) = 4.5 mg/kg
- 4) Inmunógeno de HIV-1 (10 µg)
- 5) Inmunógeno de HIV-1 + Inmunómero (10 µg, 30 µg, 90 µg)
- 6) INMUNÓGENO hiv-1 + Inmunómero 30 µg.

El antígeno de HIV-1 vaciado de gp120 se diluye en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a una concentración de 200 µg/ml y emulsificada en volúmenes iguales IFA, con y sin inmunómero. El inmunómero se agrega al antígeno de HIV-1

155

diluido antes de la emulsión en un volumen de al menos 5% del volumen final.

Una inyección intradérmica simple inicial se desarrolla al momento 0 o seguido por inyección intradérmica después de dos semanas. Los ratones son sacrificados dos semanas después de la inyección de refuerzo. El inmunógeno de HIV-1 utilizado es antígeno HIV-1 vaciado con gp 120 inactivado en IFA.

Análisis inmunológicos. Células mononucleares esplénicas frescas son aisladas y estimuladas *in vitro* durante 4 días (Davis et al., J. Immunol, 160:870-876 (1998)). Las células aisladas son estimuladas en medio solo, con antígeno p 24 nativo; o con antígeno HIV-1.

La producción de varias citocinas se evalúan utilizando métodos ELISA. Las citocinas de ejemplo a ser ensayadas incluyen, por ejemplo, IFN γ , il-12, il-4, il-5, il-10, mip1 α , MIP1 β , RANTES, α -defensina como se describió aquí y se describió previamente, y son ensayadas mediante métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

La producción de IFN γ específica de antígeno p24 y antígeno HIV-1 en linfocitos CD4 y CD8 se evalúa en ensayos ELISPOT, como se describió en los Ejemplos I y II.

8'
156

La proliferación de linfocito específico de antígeno p 24, antígeno HIV-1 y LPS se evalúan en un ensayo de proliferación estándar utilizando métodos bien conocidos.

EJEMPLO VI

Efecto in vitro del inmunómero sobre la respuesta inmune específica de HIV generada por los PBMC de pacientes infectados con HIV previamente inmunizados con inmunógeno HIV-1.

Este ejemplo describe la evaluación de la capacidad de un inmunómero para incrementar las respuestas inmunes específicas de HIV *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes que han sido tratados con antígeno HIV-1 vaciado de gp 120 inactivado en IFA (REMUNE).

Los siguientes grupos de pacientes son examinados: 15 pacientes tratados con HAART + REMUNE infectados con HIV; 15 pacientes tratados con HAART infectados con HIV. Los pacientes son equiparados para la duración de la enfermedad, conteo CD4, viremia de HIV, y ausencia/presencia de inhibidor de proteasa (PI). La sangre completa (530 ml) extraída mediante venipuntura en tubos que contienen EDTA para el análisis subsiguiente. Se agrega el inmunómero a los PBMC a

152

las siguientes concentraciones: 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml, 10.0 µg/ml.

Las respuestas específicas a varios antígenos son medidas, por ejemplo, los antígenos HIV, el antígeno p 24, el antígeno HIV-1, los péptidos env, los péptidos gag; y flu (antígeno de control). Otros antígenos HIV también se pueden medir, si se desea. La producción de IFN-(específica de antígeno en linfocitos CD4 Y CD8 se evalúa mediante ensayos ELISPOT, Como se describió en el Ejemplo I y II. La proliferación de linfocito específica de antígeno también se evalúa en un ensayo de proliferación estándar.

La producción de RANTES, α defensiva se evalúa mediante ténido intracelular en CD8+ con métodos de selección de célula activada (FACS. Si se desea también se pueden ensayar otras citocinas y otros tipos de células.

EJEMPLO VII

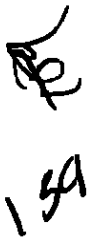
Efecto in vivo del inmunómero sobre la respuesta inmune específica de HIV en un modelo de murino Trimer.

Este ejemplo describe el uso de un modelo de ratón Trimer para determinar el efecto de los inmunómeros que contienen la composición inmunogénica de HIV.

158

Un modelo de ratón Trimera se utiliza para ensayar el efecto de los inmunómeros cuando se combinan con un antígeno HIV. Tanto las respuesta inmunes inducidas así como también la inmunidad protectora se pueden monitorear. Los ratones Trimera son generados como se describió previamente (Reisner y Dagan, Trends Biotechnol. 16:242-246 (1998); Ilan et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 4:102-109 (2002); U.S. Patente No. 6,254,867; WO 97/47654). En resumen, un huésped ratón normal se hace inmunocompetente mediante una irradiación al cuerpo total con una dosis partida de tal. Los ratones son radio protegidos mediante médula ósea SCID de murino vaciada de célula T y convertida a ratones Trimera mediante inyección intraperitoneal de los leucocitos Mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). El injertamiento de células humanas en ratones Trimera se verifica mediante análisis de selección d célula activada con fluorescencia (FACS) de los marcadores de célula T humana tales como el CD3 y otros.

Los ratones Trimera están infectados con HIV como modelo de SIDA. En resumen, los ratones Trimera son infectados con uno o más cepas de HIV-1. Los animales de control son los ratones Trimera inyectados con medios solamente (sin HIV-1) y los ratones no inyectados con PBMC. Los ratones son evaluados en varios puntos de tiempo en cuanto a la infección con HIV-1 al determinar los niveles de HIV-1 ARN del plasma, la presencia del ADN proviral, y el virus activo en experimentos de

Handwritten signature and initials in the top right corner of the page.

cocultivo. La presencia del HIV-1 ADN proviral se demuestra mediante PCR de una secuencia HIV-1 tal como gag.

para ensayar una composición inmunogénica que contiene un inmunómero para estimulación de una respuesta inmune, los ratones Trimera son inyectados con HIV-1 vaciado en gp 120, con o sin al menos un inmunómero y con o sin adyuvante. Varias proporciones de antígeno e inmunómero se pueden utilizar, por ejemplo, como se describió en el Ejemplo V y ensayado para una respuesta inmune optimizada. Alternativamente, las composiciones anteriores son pulsadas en células dendríticas derivadas de monocito autólogas humanas (DC) y estas DC son inyectadas en los ratones Trimera. Opcionalmente, los ratones pueden ser reforzados con una composición similar.

Luego de la inmunización los linfocitos de sangre y peritoneales son recolectados. Se determina la presencia de inmunoglobulinas específicas para los antígenos HIV además, las secuencias anti-HIV celulares específicas se determinan en linfocitos humanos aislados de los ratones. Por ejemplo, la producción de IFN γ en linfocitos humanos recuperados de ratones Trimera se determina luego de la exposición del antígeno de HIV-1 se determinó la respuesta inmunogénica mejorada al antígeno de HIV en la presencia del inmunómero.

160

Se monitorea la inmunidad protectora de forma similar, exceptuando que los ratones son inmunizados con las varias composiciones antes de la inoculación con el HIV infeccioso. Se midió la capacidad de varias composiciones de influenciar el nivel de la viremia resultante como se describió anteriormente. La vacuna más eficaz es aquella que suministra el control más efectivo del virus circulante y/o prolongar la supervivencia.

EJEMPLO VIII

Inmunización de pacientes infectados con HIV con REMUNE™.

Este ejemplo describe la inmunización de pacientes infectados con HIV con REMUNE™ (antígeno de HIV-1 vaciado de GP 120 en IFA y demuestra que la mayoría de los pacientes pueden montar respuestas inmunes, aunque con resistencia y duración variable. el objetivo del estudio particular fue evaluar las respuestas inmunológicas específicas para HIV-1 luego del tratamiento con RIMUNE en combinación con terapia retroviral altamente activa (HAART) (indinavir/ZDV/3TC) comparado con los adyuvantes de Freund incompletos (IFA) más HAART.

El protocolo fue un estudio aleatorizado, de doble ciego, dos brazos, grupo paralelo, controlado adyuvante multicentro. El número de sujetos (totales para cada tratamiento) fue de 52

1/2

pacientes aleatorizados, con 43 pacientes evaluables en el intento de tratar análisis (22 REMUNE+ HAART; 21 IFA + HAART). El diagnóstico y los criterios de inclusión fue que los pacientes infectados con HIV con conteos de CD4 > 350 células/ μ L sin previo uso de niveles de proteasa HIV o lamivudina (3TC). El producto de ensayo, la dosis, y el modo de administración con REMUNE (inmunógeno de HIV-1); 10 unidades (igual a un contenido de p 24 20 μ g/ml). Empezando con un volumen de 1.0 ml IM (estándar No. 8155-015 y 8155-0170). Para la duración del tratamiento, los pacientes recibieron HAART durante 32 semanas. El placebo de REMUNE o IFA (control) fue dado a las 4, 16 y 28 semanas. La terapia, dosis y modo de administración de referencia fueron controlados con adyuvante; se utilizó un placebo IFA (estándar No. 8144-006 y 8160-005).

Los criterios de eficacia primaria fueron las respuestas proliferativas de linfocito (LP) a estimulación de antígeno de HIV-1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los criterios de eficacia secundaria incluidos en la respuesta LP al p 24 nativo y a la estimulación de antígeno en PBMC; la respuesta de quimocina a P 24 nativo y la estimulación de antígeno HIV en PBMC; la actividad gag CTL (en un subconjunto de pacientes); los cambios en el conteo de células CD4 y en CD4 porcentual; los cambio en la carga viral medida como ARN de plasma y PBMC ADN; y el ensayo de piel DTH

responde a los antígenos HIV-1 y p 24. Los métodos estadísticos utilizados fueron el Ensayo Exacto de Fisher (biounido) y un intento par análisis y ensayo de dos lados de Mann-Whitney.

La proporción de respuesta definida de análisis primario como índice de estimulación (SI) a un antígeno HIV-1 cinco veces sobre la línea base en dos puntos de tiempo. Los resultados mostraron que había 14/22 (64%) de los que respondieron en el grupo REMUNE + HAART y 4/21 (19%) quienes responden en el grupo IFA + HAART ($P=0.005$). Los análisis secundarios definieron la proporción de respuesta como antígeno de HIV-1 tipo SI o BAL y/o al antígeno p 24 tres veces sobre la línea base en dos puntos de tiempo. Los resultados mostrados fueron respondedores 15/22 (68%) en el grupo de REMUNE + HAART y respondedles 5/21 (24%) en el grupo IFA + HAART ($p = 0.006$). La magnitud de la respuesta LP al antígeno HIV-1 (HZ321) entre los sujetos que reciben REMUNE + HAART fue mayor que aquellos que reciben IFA + HAART ($p = 0.0028$), definida como la propensión para cada sujeto del medio geométrico SI medido después de la primera inyección al medio geométrico para valores de pretratamiento.

Hubo una proporción de respuesta LP estadísticamente significativa mayor a el p 24 nativo ($p = 0.0002$) y el antígeno HIV-1 BaL ($p = 0.007$) en REMUNE + HAART comparado

con el grupo IFA + HAART. No hubo diferencias en las respuestas de LP para llamar a los antígenos (Candida, estreptocinasa, tétano) entre los dos grupos. La producción de MIP-1 β mediante PBMC estimulado con antígeno de HIV-1 fue significativamente aumentada en el grupo de REMUNE + HAART ($p=0.0007$ en la semana 32) comparado con el grupo IFA + HAART. Hubo una mayor proporción de respuesta de ensayos de piel DTH en el grupo de REMUNE + HAART comparado con el grupo de IFA + HAART para el HIV-1 (53 vs. 9%) y antígenos p 24 nativos (47 vs. 0%).

La administración de REMUNE + ZDV/3TC/indinavir dio como resultado una estimulación significativa de la respuesta y proliferación de linfocito (LP) al antígeno HIV-1 en términos tanto en numero de respondedores y la magnitud de la respuesta. Para la proporción de respuesta, definida como el índice de estimulación para el antígeno HIV-1 cinco veces sobre la línea base en dos puntos de tiempo, hubo un número significativamente mayor de respondedores ($p = 0.005$) en el grupo de REMUNE + ZDV/3TC/indanivir (14/22, 64%) (4/21, 19%).

Un porcentaje alto de los sujetos que recibieron REMUNE generaron una fuerte respuesta LP al antígeno p24 nativo, que demuestran que el REMUNE puede generar respuestas específicamente a antígenos de de núcleo más conservado de HIV. El tratamiento con IFA no solo estimuló las respuestas

inmunes específicas para HIV-1 a cualquier antígeno. El REMUNE más ZDV/3TC/indinavir produjeron una proliferación de linfocitos significativamente mayor al nativo purificado p24 ($p=0.0002$).

La administración de REMUNE estimuló las respuestas LP del agente inmunizante HIV-1 así como también del antígeno HIV-1 que es el antígeno clado B, HIV-1 BaL que demuestra que las respuestas inmunes generadas por el REMUNE son de clado cruzado y no limitadas agente de inmunizante. El REMUNE más ZDV/3TC/indinavir produjo una proporción de respuesta de proliferación de linfocito significativamente mayor al antígeno HIV-1 BaL ($p=0.007$) comparado con el IFA más ZDV/3TC/indinavir.

La producción del MIP-1 β se incrementó significativamente en el grupo de REMUNE más ZDV/3TC/indinavir a lo largo del estudio ($p=0.007$) en la semana 32. Y no cambio en el grupo IFA más el grupo ZDV/3TC/indinavir durante el estudio. Los sujetos en ambos grupos mostraron incrementos significativos en el conteo de células CD4 y disminuciones significativas en el HIV ARN del plasma y en el número de copias de HIV ADN. Esta fue una tendencia de menos riesgo de recaída en el grupo de REMUNE de ZDV/3TC/indinavir en un análisis de tiempo al HIV relapso de ARN; 6/22 (27%) de REMUNE más sujetos ZDV/3TC/indinavir recayeron entre la semana 16 y 32 contra la

12/21 (57%) de los sujetos IFA más ZDV/3TC/indinavir ($p=0.08$ por ensayo de rango log). Una respuesta más fuerte, más durable se espera al administrar las composiciones inmunogénicas de la invención que incluyen un antígeno de HIV tal como REMUNE y uno o más inmunómeros.

Estos resultados demuestran que el REMUNE estimula la respuesta inmune de la mayoría de los pacientes.

EJEMPLO IX

Inmunización de pacientes infectados con HIV con REMUNE™ e inmunómeros

Este ejemplo describe la inmunización de pacientes infectados con HIV con REMUNE e inmunómeros.

Se conduce un estudio con el objeto de evaluar las respuestas inmunológicas específicas para HIV-1 luego del tratamiento con REMUNE en combinación CON INMUNÓMEROS y/o terapia retroviral ampliamente activa (HAART) (indinavir /ZDV/3TC) comparado con Adyuvantes Freund Incompletos (IFA) más inmunómeros y/o HAART.

La metodología utiliza un estudio controlado adyuvante aleatorizado, doble ciego, de dos brazos, de grupo paralelo. El diagnostico y los criterios para la inclusión de los

99/

pacientes infectados con HIV-1 son pacientes con conteos de CD4 mayor 350 células/ μ L sin previo uso de inhibidores de proteasa HIV o lamivudina (3TC). Otros criterios para seleccionar los apacientes también se pueden utilizar. El producto de ensayo, la dosis, y el modo de administración son REMUNE inmunógeno de (HIV-1); 10 unidades iguales al contenido de 10 μ g/mL p24), por un volumen de 1.0 ml dado IM. Una dosis de inmunómero entre aproximadamente 1 a 5 mg/kg se administra. Otras dosis de inmunómero, bien sea mayores o menores, se pueden ensayar para el mejoramiento efectivo de una respuesta inmune. Para la duración del tratamiento en pacientes que son tratados con HAART, los pacientes reciben HAART durante 32 semanas. El REMUNE o placebo IFA (control) y el inmunómero es dado a las 4, 16 y 28 semanas. La terapia de referencia, dosis, y modo de administración, son un control adyuvante, en el cual se utiliza el placebo IFA.

Loa criterios para evaluación son similares a aquellos descritos en el Ejemplo VIII para eficacia y seguridad. Además se pueden incluir los ensayos para determinar una respuesta inmune, por ejemplo, interferón ELISPOT, proporciones de anticuerpo IgG1/IgG2, ensayos ELISA para la producción de citocinas, ensayo de proliferación de linfocito, estimulación de células de baso, y similares, como las descritas aquí y las descritas en los ejemplos I-III y V.

db
167

La combinación de los inmunómeros con REMUNE u otro antígeno HIV se espera que mejore la respuesta inmune en comparación con el antígeno HIV sin inmunómeros. Así, la respuesta inmune en el presente ejemplo se espera que sea más fuerte y/o tenga una duración mayor que la observada en el Ejemplo VIII.

Este ejemplo describe el efecto mejorado de administrar el antígeno HIV con inmunómero para estimular una respuesta inmune de los pacientes infectados con HIV.

EJEMPLO X

Antígeno HIV-1 con un inmunómero elicitó inmunidad específica para HIV.

Este ejemplo describe el uso del antígeno HIV y de un inmunómero para estimular la inmunidad específica con HIV.

El inmunómero de HIV-1 es un candidato a vacuna de virus muerto completamente vaciado de gp120 formulado con un adyuvante suave incompleto (IFA), previamente reportado o inducir respuestas inmunes específicas para HIV-1; los oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos di nucleótido citosina-guanina (CpG) inmuno estimulatoria son estimuladores potentes de las respuestas inmunes mediadas por célula. La posibilidad de generar inmunogenicidad mejorada del inmunógeno HIV-1 en combinación con un adyuvante

26

inmunómero (Amplivax™) se estudio en un modelo de ratón. En experimentos subsecuentes, se verificó que las respuestas inmunes específicas para HIV se podían elicitar mediante el virus muerto completo vaciado de gp 120 sin IFA (antígeno HIV-1) + Amplivax™.

En estos estudios, el inmunógeno HIV-1 utilizado fue vacuna de virus muerto completo vaciado de gp 120 formulada con Adyuvantes Freund Incompleto (IFA). Los experimentos fueron desarrollados esencialmente como se describieron en el Ejemplo V. Este inmunógeno induce respuestas inmunes específicas para HIV. El Amplivax™ es un oligonucleótido inmunomodulatorio, también denominado aquí inmunomodulatorio, también denominado aquí como inmunómero, que contiene una estructura novedosa y un motivo inmunomodulatorio sintético. Este inmunómero induce distintos perfiles inmunoestimulatorios.

La figura 2 muestra un diagrama esquemático del inmunómero Amplivax™ también denominado como HYB2055. El HYB2055 es un oligonucleótido inmunomodulatorio de segunda generación (IMO) que consiste de una estructura novedosa y sintética, CpR, motivo inmunoestimulatorio. Este inmunómero estimula el sistema inmune al señalar a través del TLR9 e induce respuestas inmunes Th1. El inmunómero muestra estabilidad

161

metabólica mejorada. Se completó un ensayo fase I en voluntarios saludables.

Estos estudios en ratón fueron iniciados para evaluar la capacidad del Amplivax™ (HYB2055) para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna muerta completa HIV-1 en IFA (inmunopogeno HIV-1) en un modelo de ratón. Estos estudios también examinaron si las respuestas inmunes específicas para HIV pueden ser elicitadas mediante virus muerto completo sin IFA (antígeno HIV-1) utilizado en combinación con Amplivax™.

En resumen, los ratones C57/BL6 fueron inmunizados subcutáneamente (SC) o intramuscularmente (im) (A día 0 y 14) con 10µg de vacuna muerta completa de HIV en un adyuvante Freund incompleto (IFA (inmunógeno HIV-1) más tres dosis de Amplivax™ (80, 30 o 10 µg/ratón) o con una vacuna muerta completa de HIV (antígeno HIV-1 sin IFA, 10 µg/ratón) de Amplivax™ (90 µg/ratón). Los animales inmunizados con inmunógeno HIV-1, con Amplivax™ solo o con PBS fueron utilizados como controles (8-10/grupo). El inmunómero de ratón, HYB2048, se utilizó como un compuesto de referencia. Los ratones fueron sacrificados el día 28. El antígeno de HIV-1 y la producción de citocina estimulada por p24 y las células T que secretan IFNγ se evaluaron en células

21

mononucleares esplénicas frescas. Ka producción de anticuerpo p 24 se evaluó en suero.

Como se muestra en la figura 3, el inmunógeno HIV-1 induce producción de RANTES específica de HIV, MIP1 α , MIP1 β , IL-10 e IL-5. La Tabla II muestra que la combinación del inmunógeno HIV-1 y el AmplivaxTM cambio el perfil de citosina hacia la respuestas tipo Th1. El inmunógeno se administro SC. Los valores mostrados son valores medios

Tabla 2

	IFN γ Pg/ml	RANTES Pg/ml	MIP-1 α Pg/ml	MIP-1 β pg/ml	IL-10 pg/ml	IL-5 PG-ML	Perfil de citocina
Inmunógeno HIV-1 solo	12	101	28	317	67	644	Th2
Inmunógeno HIV-1 más Amplivax	1783	700	83	438		257	6
Th1Amplivax solo	0.06	107	27	91	3	-	-

Un análisis similar se muestra en la Tabla 3, la cual también muestra la proporción de IFN- α IL-5. La estimulación fue con antígeno HIV-1, el IFN- γ IL-5 fueron medidos mediante ELISA.

Tabla 3

	IFN-g Pg/ml	IL-5 Pg/ml	IFN-g/IL-5 Pg/ml	Perfil de Citosina
Inmunógeno HIV-1	12	644	0.02	Th2 Tipo
Inmunógeno HIV-1 + Amplivax	1828	5.7		Th1 Tipo
Amplivax	.064	5.4		

La figura 4 muestra que la producción de IFN γ específica para HIV es mejorada por AmplivaxTM de una manera dependiente de la dosis. La cantidad de inmunómero utilizada es mostrada en paréntesis (μ g/ratón). Se ven resultados similares para RANTES, MIP1 α , MIP1 β , y IL-10. La figura 5 muestra el efecto de AmokivaxTM sobre los niveles de producción inducidos por inmunológico HIV-1 de RANTES, MIP1 α , MIP1 β , y IL-10e IL-5. La figura 6 muestra que la producción IFN γ específica para HIV se mejora mediante AmplivazTM (datos mostrados para 90 μ /AmplivaxTM para ratón. Resultados similares se encontraron para RANTES, MIP1 α , MIP1 β , y IL-10. Como se muestra en la figura 7, el amplivaxTM tiene un efecto d mejoramiento sobre las células T que secretan IFN γ específica para HIV en un ensayo Elispot. El inmunógeno se administró subcutáneamente. La cantidad de inmunómero utilizado se muestra en (μ g/ratón).

La figura 8 muestra que la producción de IFN γ específica para HIV se mejoró mediante AmplivaxTM de una manera dependiente de

27

dosis. La cantidad de inmunómero utilizada se muestra en ($\mu\text{g/ratón}$). La figura 9 muestra que la producción de RANTES específica para HIV se mejoró mediante Amplivax™ de una manera dependiente de dosis. La figura 10 muestra que la producción de MIP-1 α específica para HIV se mejoró mediante Amplivax™ de una manera dependiente de dosis. La cantidad de inmunómero utilizada en paréntesis ($\mu\text{g/ratón}$). La figura 11 muestra que la producción de MIP-1 β específica para HIV se mejoró mediante Amplivax™ de una manera dependiente de dosis. La cantidad de inmunómero utilizada es mostrada en paréntesis ($\mu\text{g/ratón}$). La figura 12 muestra que la producción de IL-10 específica para HIV se mejoró mediante Amplivax™ de una manera dependiente de dosis. La cantidad de inmunómero utilizados se muestra en paréntesis ($\mu\text{g/ratón}$). La figura 13 muestra que la producción de IL-5 específica para HIV se redujo mediante amplivax™ dada subcutáneamente, La cantidad de inmunómero utilizada se muestra en paréntesis ($\mu\text{g/ratón}$).

La figura 14 muestra el efecto del Amplivax™ sobre títulos de anticuerpo p 24 inducido por inmunógeno HIV-1 en ratones. La cantidad de inmunómero utilizado se muestra en paréntesis ($\mu\text{g/ratón}$). La figura 15 muestra que la vacuna muerta completa de HIV-1 en IFA (inmunógeno HIV-1) indujo producción de citosina específica para HIV luego de administración subcutánea (SC) e intramuscular (IM).

La figura 16 muestra que el Amplivax™ se puede agregar pre o post emulsión con IFA y mejorar la producción de IFN γ . La figura 17 muestra que el Amplivax™ puede ser agregado pre o post emulsión con IFA y mejora la producción de RANTES. Como se muestra en la Tabla 4, la combinación de inmunógeno HIV-1 y Amplivax™ cambia el perfil de citosina hacia respuestas tipo th1.

Tabla 4

	Proporción IFN γ /IL-10 Pg/ml	Proporción IFN- γ /IL-5	Perfil de Citosina
Inmunógeno HIV-1	1,42	0.02	Tipo Th2
Inmunógeno HIV-1 + Amplivax™	74,04	321	Tipo Th1
Amplivax™	-	-	-

La figura 18 muestra que la vacuna muerta completa de HIV-1 con Amplivax™ disparó la producción de IFN γ específica para HIV en ratones inmunizados subcutáneamente sin IFA. La figura 19 muestra que la vacuna muerta completa de HIV-1 con Amplivax™ disparó la actividad celular de células T CD8+ que secretan IFN γ específicas de HIV en ratones inmunizados subcutáneamente sin IFA. La figura 20 muestra que la vacuna

muestra completa con HIV-1 con Amplivax™ disparó la producción de ERRANTE específica para HIV en ratones inmunizados subcutáneamente con IFA.

Los ratones C57/BL6 inmunizados subcutáneamente con una combinación de inmunógeno HIV-1 y Amplivax™ mostraron una producción específica de HIV significativamente mejorada del anticuerpo p 24, IFN-(específica para HIV (tanto en cantidad como en número y las células T CD4 y CD8 que las producen), quimocinas (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β), e IL-10 cuando se comparan con el Inmunógeno HIV-1 o el Amplivax™ solo. De manera importante, los mejoramientos mediante Amplivax™ fueron aún observados en un antígeno HIV-1 no fueron emulsificados con IFA.

La inmunización tanto con las combinaciones de Amplivax™ más el inmunógeno HIV-1 ty el Amplivax™ + el antígeno HIV-1 mejoraron significativamente la producción de IFN γ específica para p 24, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β IL-10 así como también el número de células que producen IFN γ comparadas con el inmunógeno HIV-1 o el Amplivax solo. La magnitud de las respuestas inmunes observadas en ratones inmunizados con el inmunógeno HIV-1 o con el antígeno HIV-1 en combinación con el Amplivax fue comparable.

541
125

Estos resultados muestran que la inmunización con el inmunógeno HIV-1 más el Amplivax™ mejoró significativamente la producción de IFN γ específica para HIV, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β e IL-10 así como también el número de células que producen IFN γ comparadas con el inmunógeno HIV-1 o el Amplivax™ solo. La magnitud de las respuestas inmunes observadas en ratones inmunizados con el inmunógeno HIV-1 o con el antígeno HIV-1 en combinación con el Amplivax™ fue comparable.

Estos resultados muestran que la inmunización con el inmunógeno HIV-1 más el Amplivax™ mejoró significativamente la producción de IFN γ específica para HIV, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β e IL-10 así como también el número de células que producen IFN γ comparadas con el inmunógeno HIV-1 o el Amplivax™ solo. La magnitud de las respuestas inmunes observadas en ratones inmunizadas con antígeno HIV-1 y Amplivax™ (sin IFA) fue comparable a las respuestas obtenidas con el Inmunógeno HIV-1 (Antígeno HIV-1 IFA) y el Amplivax™ el Amplivax™ en asociación con la vacuna de virus muerta completa elicitó unas fuertes respuestas inmunes específicas para HIV independientemente del uso del IFA.

El Amplivax en asociación con el inmunógeno HIV-1 o el antígeno HIV-1 elicitó unas fuertes respuestas inmunes específicas

para el virus independientemente del uso de IFA. La inmunogenicidad fuerte de la combinación del HIV-1 más Amplivax garantiza su uso como vacuna terapéutica para pacientes infectados con HIV.

EJEMPLO 11

El efecto del Inmunógeno HIV en combinación con un Inmunómero o una Respuestas Inmunes Específicas para HIV in vitro Utilizando Células Mononucleares de Sangre Periférica Humana.

Este ejemplo describe el ejemplo del Amplivax™ sobre respuestas inmunes específicas para HIV in vitro en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

Estos Estudios se iniciaron para evaluar si el Amplivax™ podría incrementar las respuestas inmunes específicas para HIV in vitro de los PBMC humanos de pacientes infectados con HIV tratados con antiretroviral, quienes fueron o no fueron inmunizados con vacunas muerta completa de HIV-1.

El Amplivax™ fue investigado ex vivo por su capacidad para mejorar la estimulación del antígeno HIV de PBMC aislado de pacientes HIV + tratados con terapia antiretroviral (ART). Los pacientes fueron no inmunizados o previamente inmunizados con inmunógeno HIV-1. Ambos grupos de pacientes recibieron conteo CD4 comparables, viremia de plasma HIV, duración de la

infección, y ART. Los resultados mostraron que el Amplivax™ indujo una fuertes respuestas inmunes mediadas por célula específica para HIV en pacientes vacunados con inmunógeno HIV-1, medidos mediante manchas totales producidas en el ensayo IFN γ - ELISPOT y porcentajes superiores de células que produjeron alfa defensina. Ambos efectos fueron más evidentes utilizando un μ g/ml de Amplivax™.

En resumen, los pacientes que habían sido vacunados con 6-24 dosis de vacuna muerta completa de HIV (REMUNE® = inmunógeno HIV-1). La última dosis fue dada 6-8 meses antes de la recolección de la sangre. Ningún paciente no vacunado fueron pareados para CD4, viremia de HIV y exposición a HAART. El Amplivax™ fue agregado a los PBMC a 4 concentraciones (0, 0.1 y 10 μ g/ml). Las células fueron estimuladas con HIV-1, nP24, gag y antígenos flu. La evaluación de células que producen CD8+, y IFN γ -se llevó a cabo mediante ELISPOT. El análisis de las células que producen α -defensina fue mediante métodos del tipo célula activada con fluorescencia (FACS).

La figura 21 muestra que los porcentajes de las células CD8+ T que producen α -defensina son incrementadas mediante Amplivax™ ex vivo. La figura 22 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específica para HIV en pacientes tratados con REMUNE® y controles positivos de HIV (sin Amplivax™). La

figura 23 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específica para HIV en la presencia de 0.1 μ g/ml de AmplivaxTM agregada ex vivo. La figura 24 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específica para HIV en la presencia de 1 μ g/ml de AmplivaxTM agregada ex vivo. La figura 25 muestra células T CD8+ que producen IFN γ específica para HIV en la presencia de 10. μ g/ml de AmplivaxTM agregada ex vivo.

La figura 26 muestra un ensayo ELISPOT y IFN γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El HYB2055 se utilizó a 1 μ g/ml.

Los datos preliminares habían sido generados para REMUNE[®] (inmunógeno HIV-1 más IFA) en pacientes que ignoraban el HAART. El ensayo, cuando se complete, monitoreará 50 sujetos positivos HIV-1 con ARN HIV-1 en el rango desde 10.000-40.000 copias/mL y células CD4 por encima de 4350 células/ μ L. Los pacientes fueron aleatorizados en tres grupos: REMUNE[®], (inmunógeno HIV-1 en IFA); adyuvante IFA; o solución salina.

Los cambios fenotípicos en las células T CD4 (figura 27) y las células T CD8 (figura 28) se observaron post primera inyección de REMUNE[®] en pacientes que ignoraban la terapia antiretroviral (ART). Son mostrados los datos preliminares

ST
129

sobre los primeros pocos pacientes. Los pacientes adicionales serán analizados similarmente.

Los datos preliminares provenientes de un ensayo químico en proceso en pacientes HIV+ ignorantes de la droga sugieren que el inmunógeno de HIV-1 también tiene un efecto positivo sobre la generación de respuestas inmunes específicas para HIV en esta población de pacientes. El efecto de mejoramiento potencial del Amplivax™ será examinado en un papel sobre ensayo en estos mismos pacientes al agregar el Amplivax™ al inmunógeno HIV-1 como parte de la vacuna.

A lo largo de esta solicitud han sido referenciadas varias publicaciones. La descripción de estas publicaciones en su totalidad se incorpora aquí como referencia en esta solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la técnica al cual corresponde la invención.

Aunque la invención ha sido descrita con referencia a las modalidades descritas, aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son solamente ilustrativos de la invención. Se debe entender que varias modificaciones pueden hacerse sin apartarse del espíritu de la invención.

8
180**REIVINDICACIONES**

1. Una composición inmunogénica que comprende
 - (a) un virus HIV muerto completo exento de gp 120 proteína de envoltorio exterior;
 - (b) un inmunómero; y
 - (c) un adyuvante
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho virus HIV es HIV-1.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho virus HIV es un virus de la cepa de HZ321.
4. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico aislada comprende una estructura de fosforotioato.
5. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho virus de HIV es conjugado a dicha molécula de ácido nucleico.
6. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho inmunómero es un inmunómero CpG.



7. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho inmunómero es un inmunómero libre de CpG.
8. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho adyuvante es adecuado para uso en humanos.
9. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho adyuvante comprende adyuvante Freund incompleto (IFA).
10. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho adyuvante comprende componentes de pared de células de microbacteria y monofosforil lípido A.
11. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicho adyuvante comprende alúmina.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicha composición mejora la producción de β -quimocina.

2005
182

13. La composición inmunogénica de la reivindicación 12, en donde dicha producción de quimocina de β -quimocina mejorada es producción de β -quimocina no específica.
14. La composición inmunogénica de la reivindicación 12, en donde dicha producción de β -quimocina mejorada es producción de β -quimocina específica para HIV.
15. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicha β -quimocina es RANTES.
16. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicha composición mejora la producción de anticuerpo IgG2b específica para HIV en un mamífero.
17. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicha composición mejora la respuesta a linfocito T (CTL) citotóxica específica para HIV en un mamífero.
18. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en donde dicha composición mejora las células T ayudantes CD4+ específicas para HIV.
19. Un kit, que comprende:

183

(a) un virus HIV muerto completo desprovisto de la proteína de envoltorio exterior gp 120;

(b) un inmunómero;

(c) un adyuvante,

Dichos componentes del kit, cuando se combinan, producen la composición inmunogénica de la reivindicación 1.

20. Un método para elaborar la composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende combinar:

(a) el virus HIV muerto completo desprovisto de la proteína de envoltorio exterior gp 120;

(b) un inmunómero;

(c) un adyuvante.

21. El método de la reivindicación 20 en donde dicha combinación es *ex vivo*.

22. El método de la reivindicación 20, en donde dicha combinación es *in vivo*.

23. Un método para inmunizar un mamífero, que comprende mejorar una respuesta inmune en el mamífero al

184

administrarle al mamífero la composición inmunogénica de la reivindicación 1.

24. Un método para inhibir SIDA, que comprende mejorar una respuesta inmune en un mamífero y administrarle al mamífero la composición inmunogénica de la reivindicación 1.

25. El método de la reivindicación 23 o la reivindicación 24, en donde dicho mamífero es un primate.

26. El método de la reivindicación 25, en donde dicho primate es un infante.

27. El método de la reivindicación 25, en donde dicho primate está embarazado.

28. El método de la reivindicación 25, en donde dicho primate es un humano.

29. El método de la reivindicación 28 en donde dicho humano es HIV seronegativo.

30. El método de la reivindicación 28, en donde dicho humano es HIV seropositivo.

193

31. El método de la reivindicación 30, en donde dicho mamífero es un roedor.

32. El método de la reivindicación 30 o reivindicación 31, en donde dicha composición es administrada a dicho mamífero 2 o más veces.

33. El método de la reivindicación 22 o 24, en donde dicha composición se administra a dicho mamífero 2 o más veces.

34. El método de la reivindicación 23 o 24, en donde la composición se administra subcutáneamente, intramuscularmente o intramucosalmente.

98/196

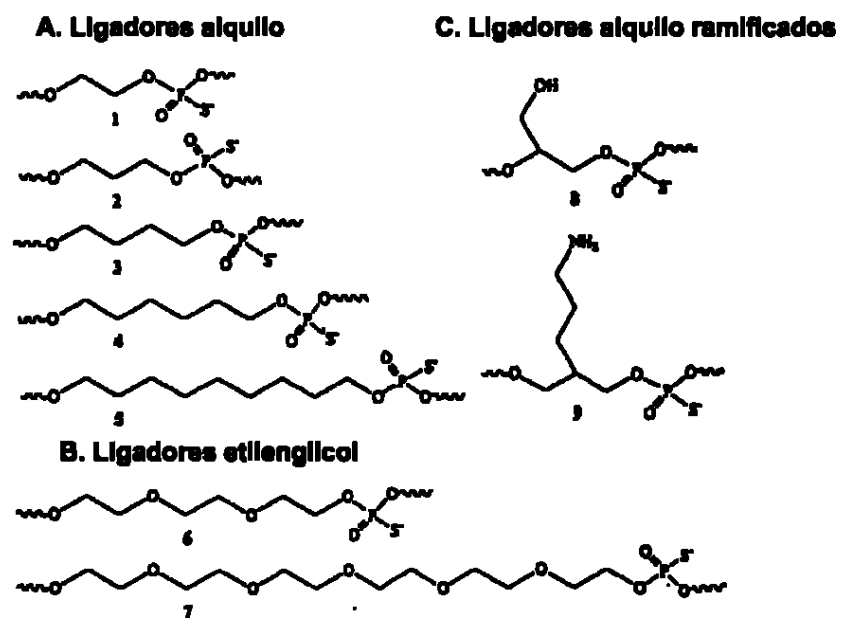


FIGURA 1

19x

D

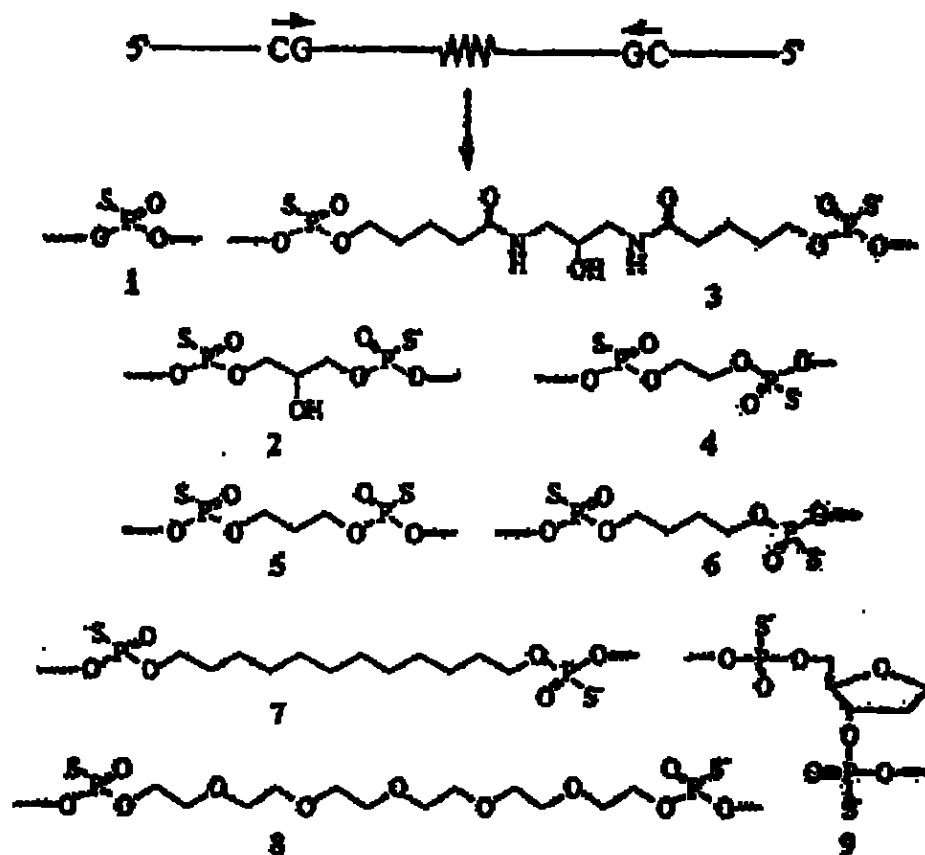


FIGURA 2 CONT.

Fig. 2

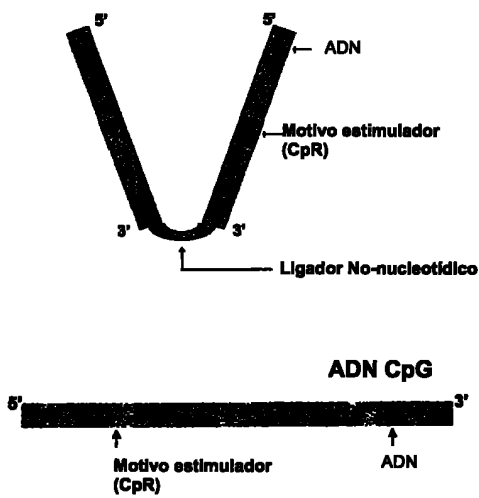


Fig. 3

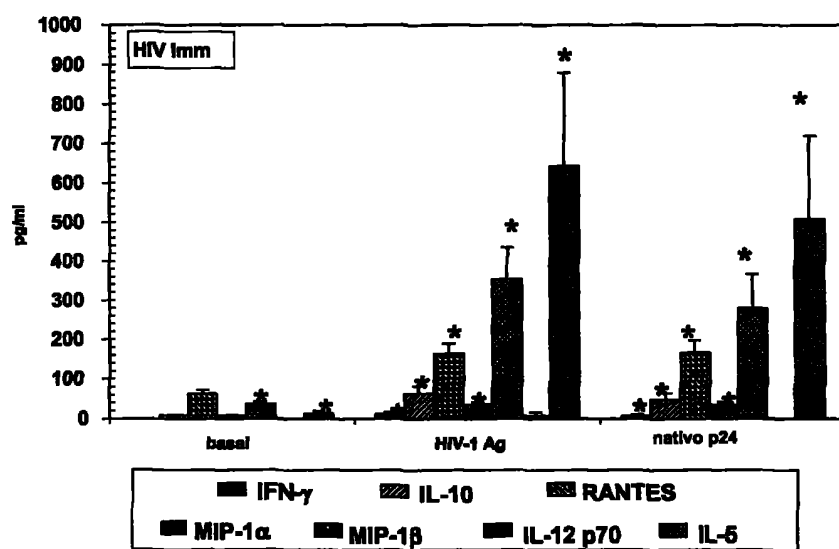
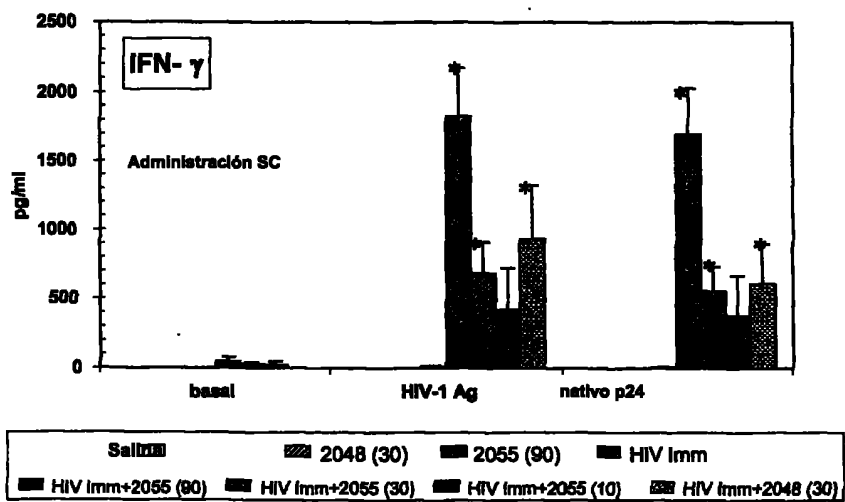


Fig. 4



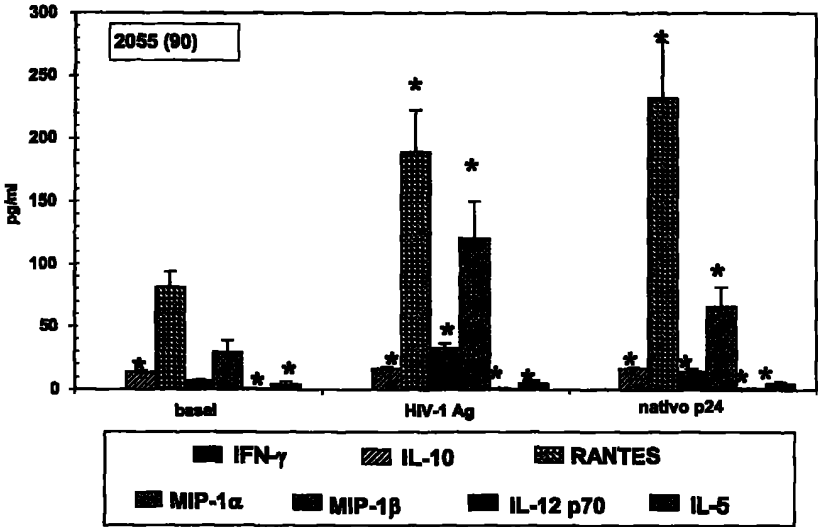
WFO 2005/031726

5/29

PCT/US2004/027995

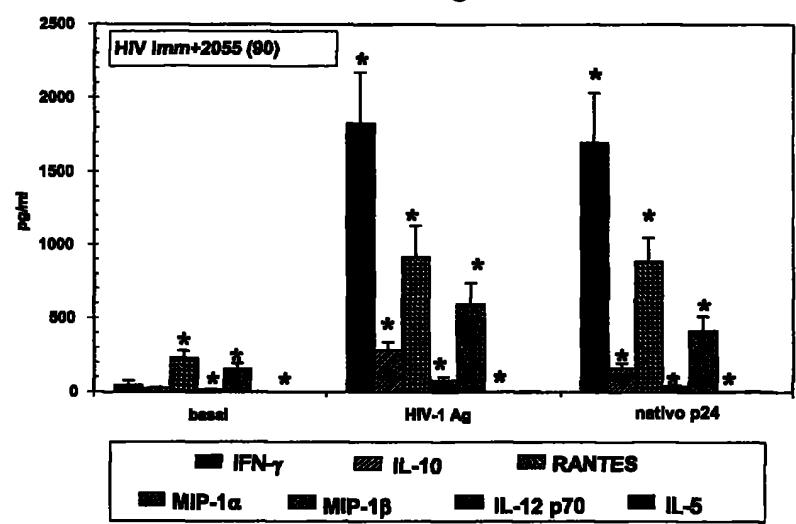
190

Fig. 5



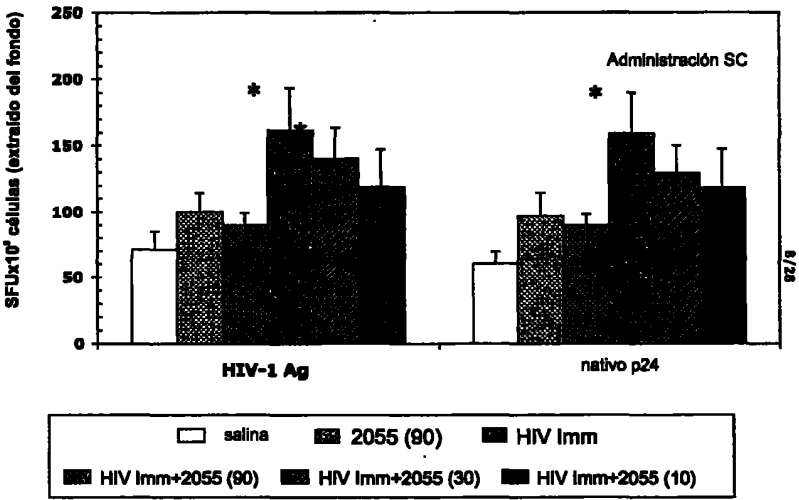
7/29

Fig. 6



792

Fig. 7

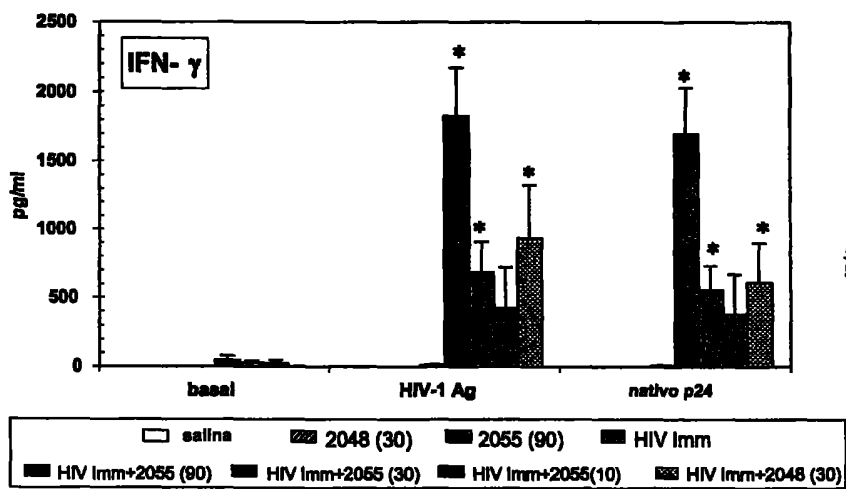


VO 2005/01726

ICT/US004027995

7/28

Fig. 8



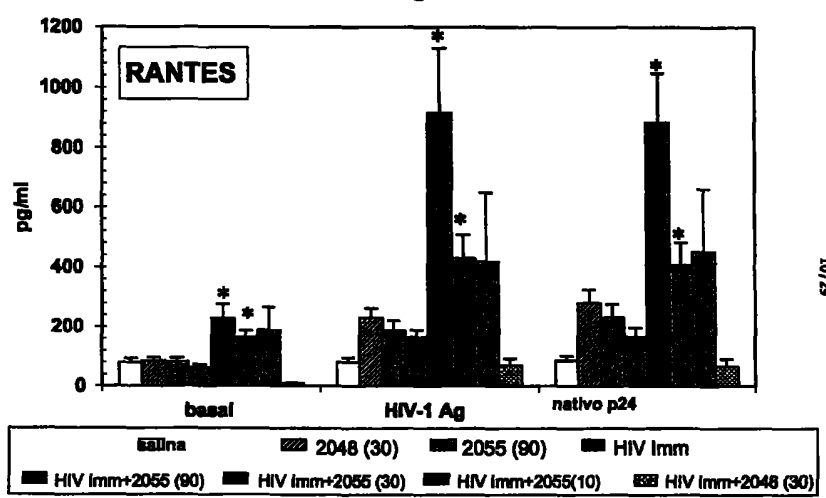
WFO 2005021726

9/29

ECT/ISS00402795

744

Fig. 9



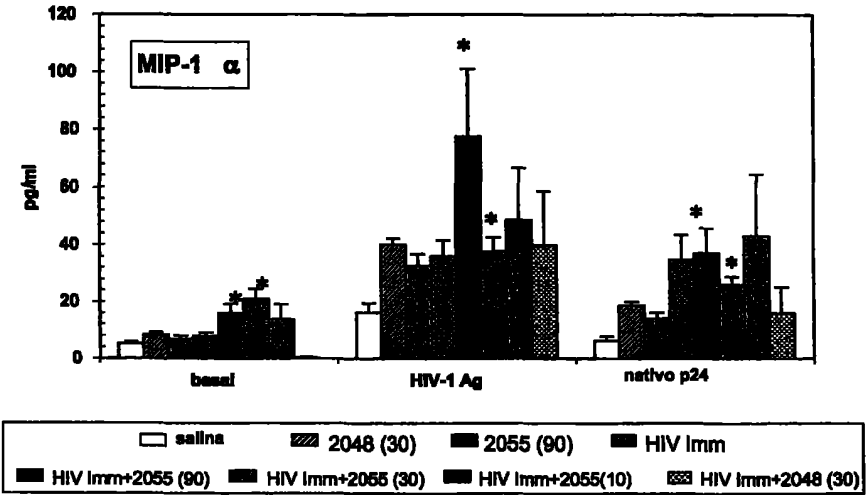
WFO 2008/02/17/26

10/29

PCV102004027995

745

Fig. 10



7916

Fig. 11

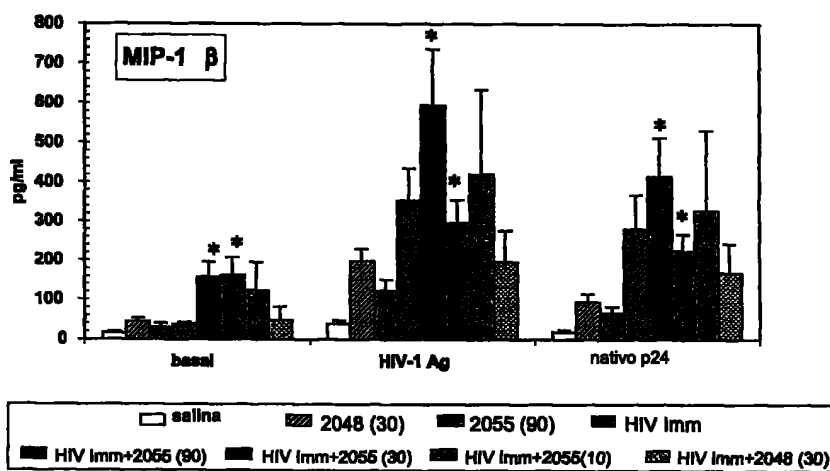
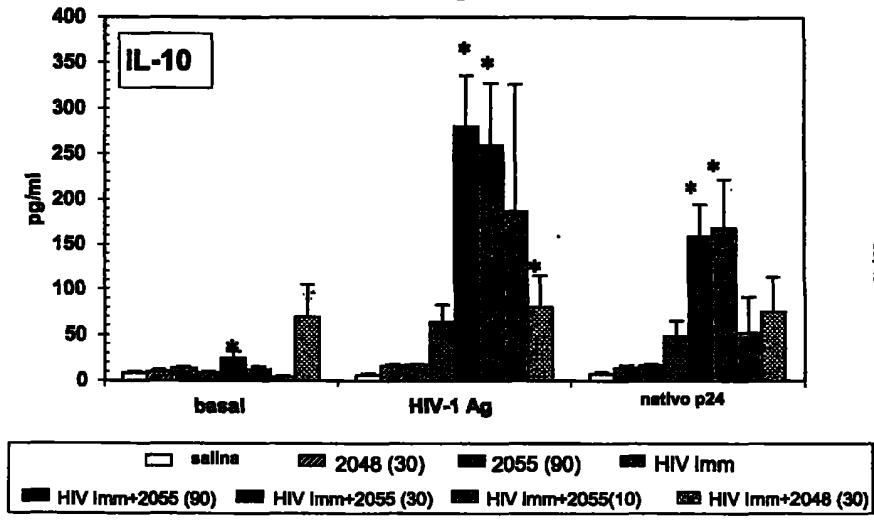


Fig. 12



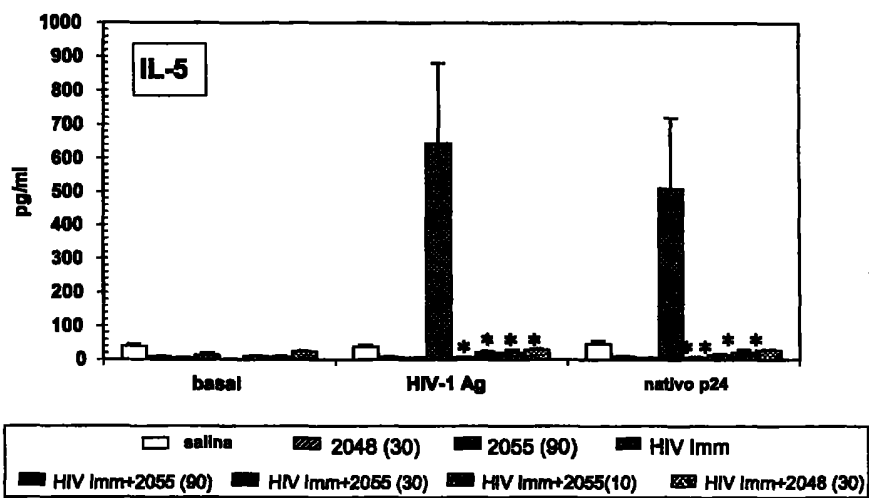
W/O 2005/021795

13/29

PCT/US2004/021795

198

Fig. 13



WFO 2005/02/17/95

14/29

PCT/US2004/021795

Fig. 14

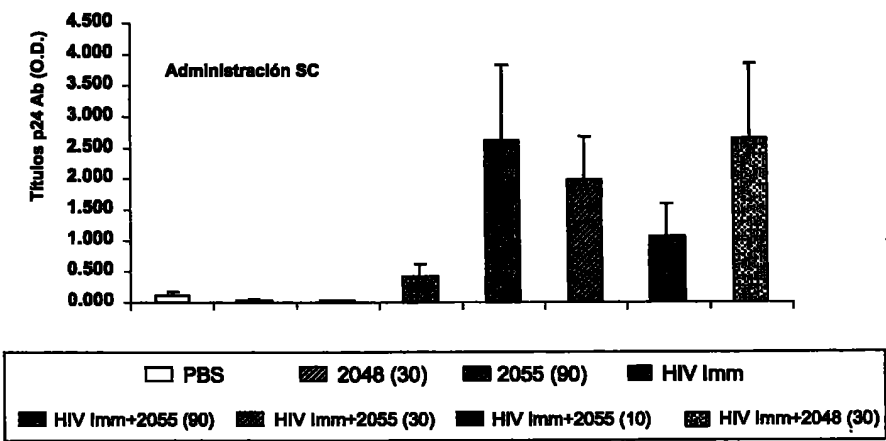
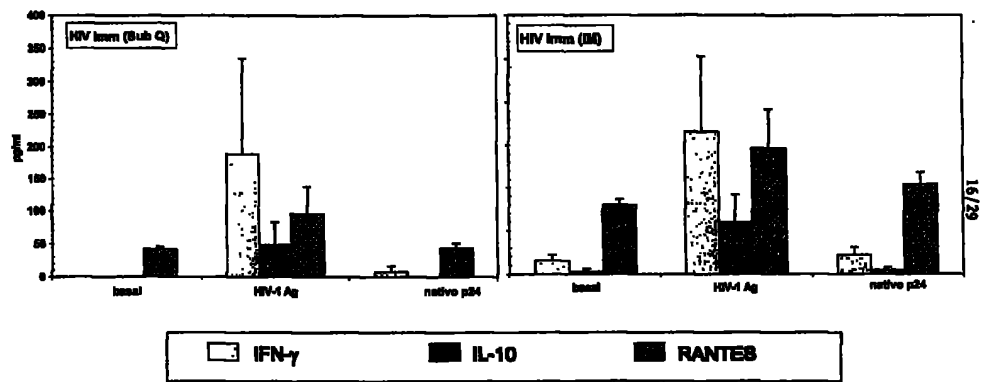


Fig. 15

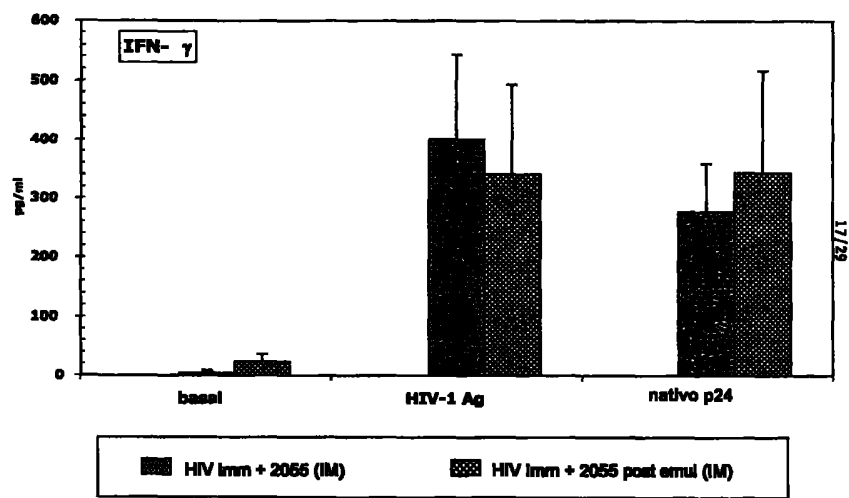


WFO 2005/01/296

PCV/US004/01796

101

Fig. 16



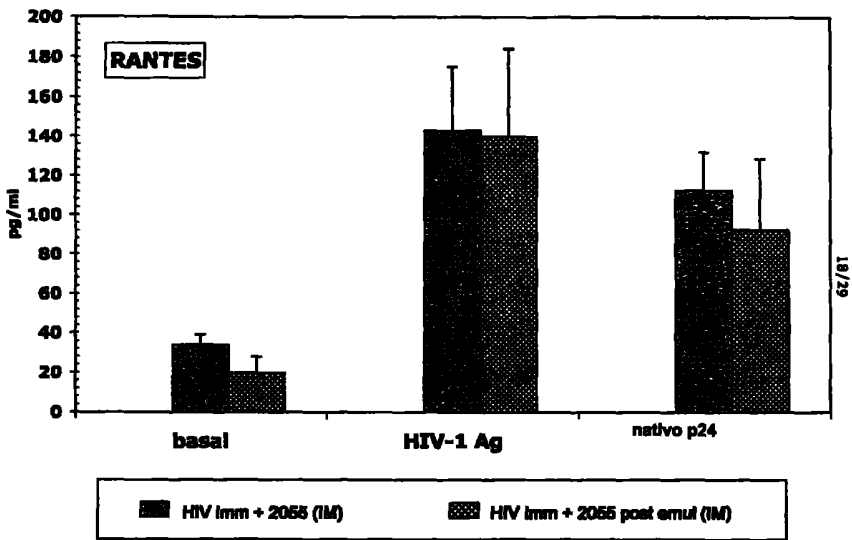
WFO 2005/01795

PCT/US2004/02795

202

203

Fig. 17

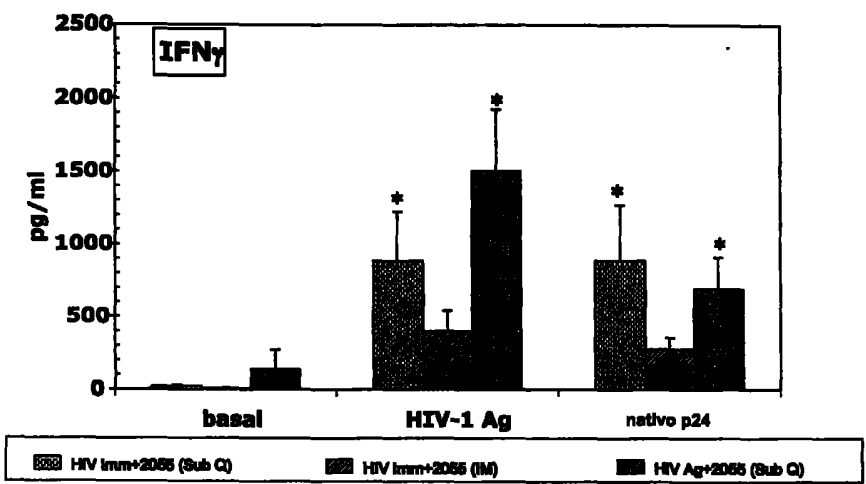


WFO 2004021726

PCT/US2004/027995

204

Fig. 18



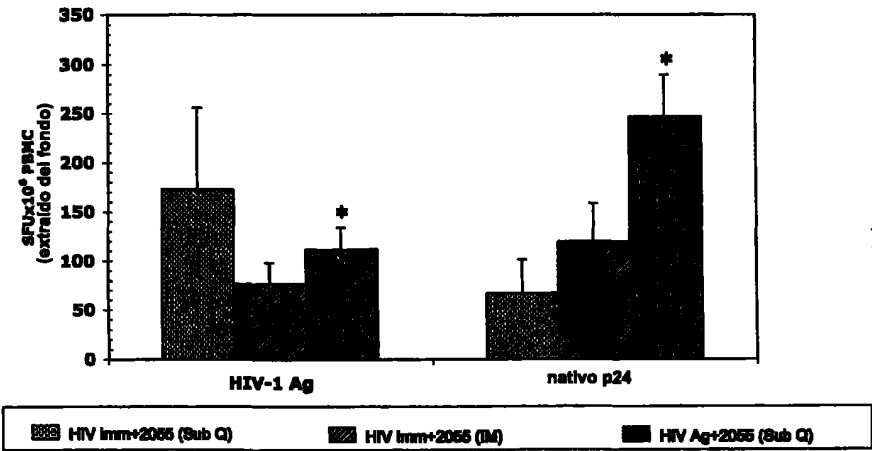
W/O 2005021726

19/29

PCT/US2004/07795

204

Fig. 19



WO 2005/01726

20/29

PCT/US2004/01796

Fig. 20

W/O 2005011726

21/29

PCT/US2004/027995

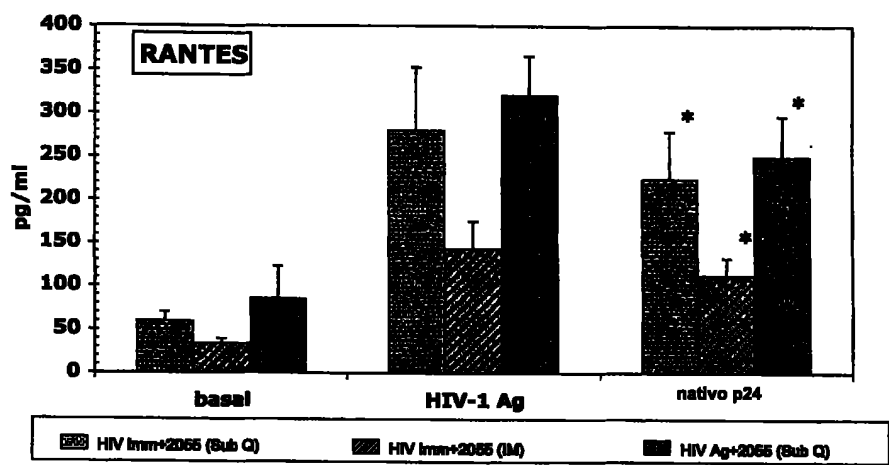
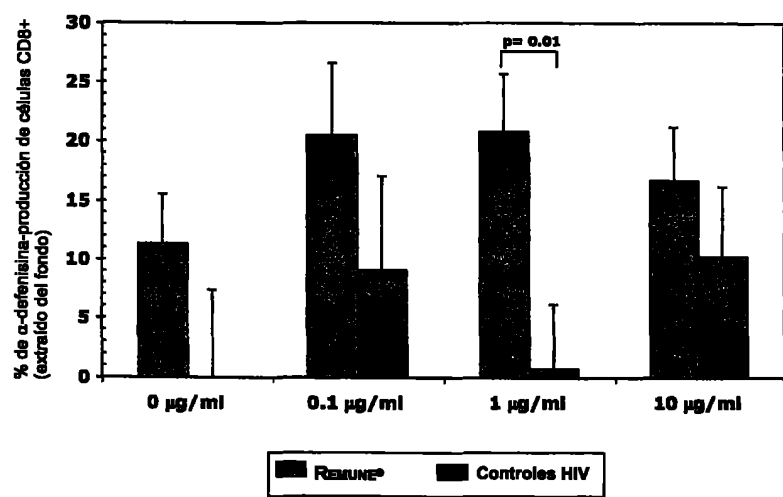


Fig. 21



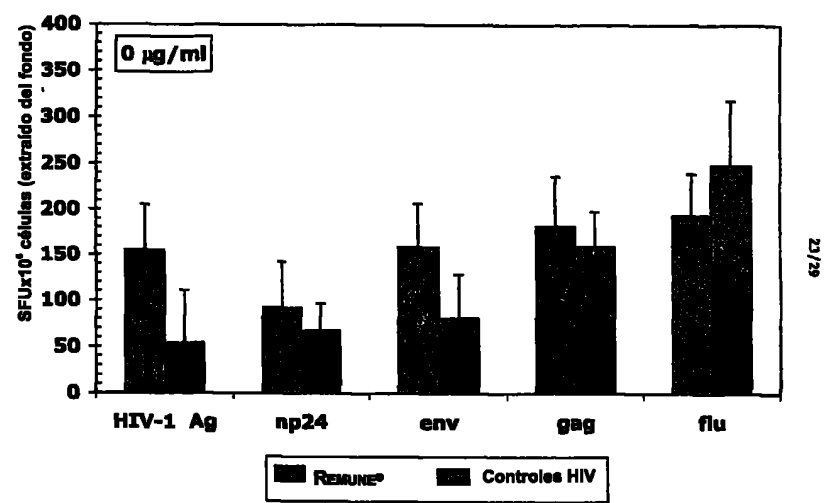
W02005021726

22/29

PCT/US2004/017994

1008

Fig. 22

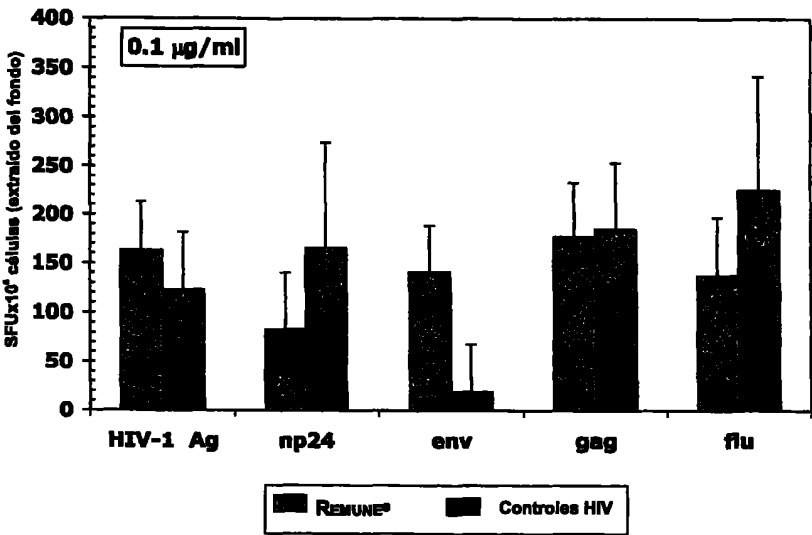


WFO 304507126

PCT/US2004/02795

23/29

Fig. 23

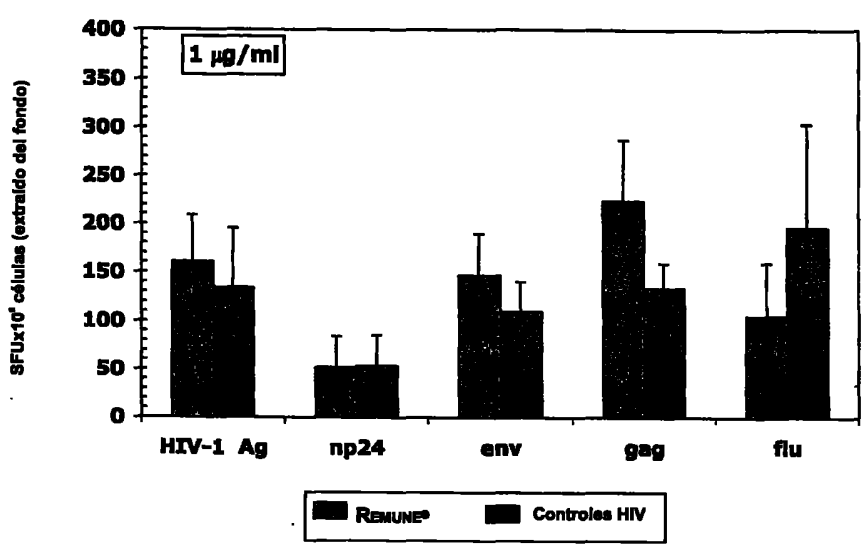


WFO 2005/02/17/26

24/29

PCT/US2004/027595

Fig. 24



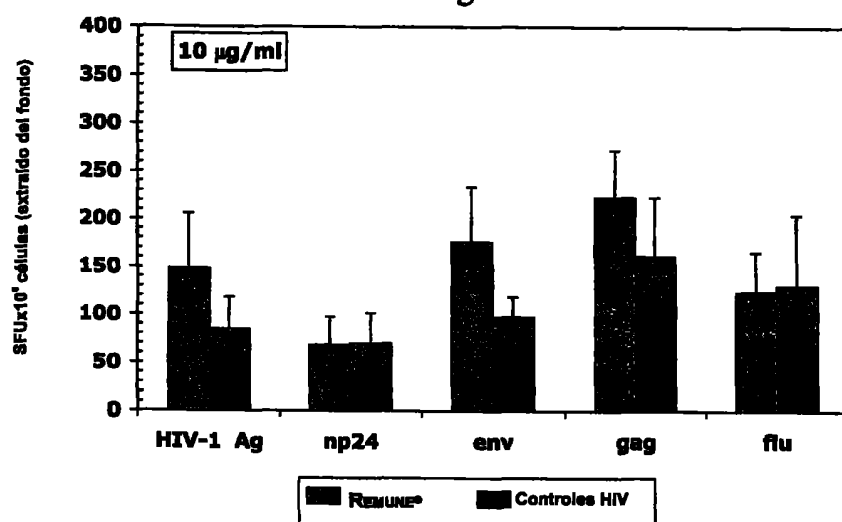
W/O 2005/021726

25/29

PCT/US2004/02795

210

Fig. 25



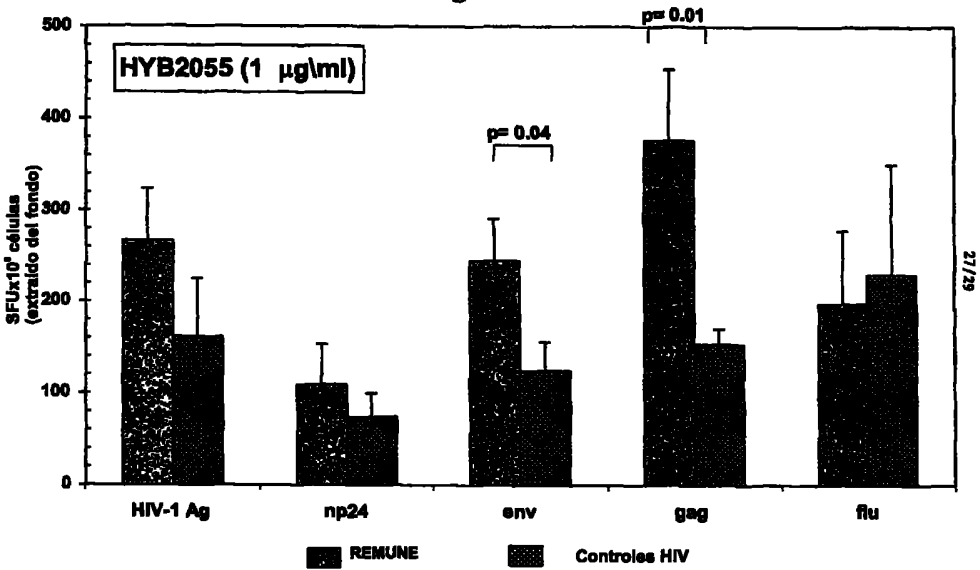
W0 2005/01726

26/29

PCT/US2004/01795

21

Fig. 26



WJ0 268821736

PCT/US2004/077993

Fig. 27

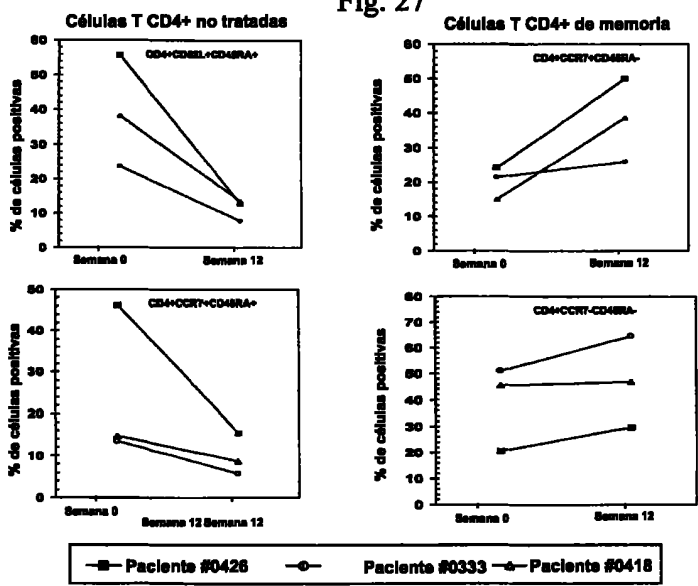
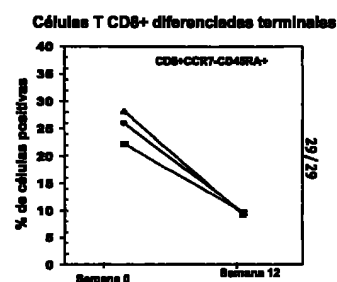
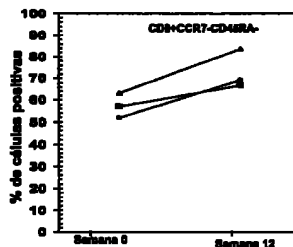
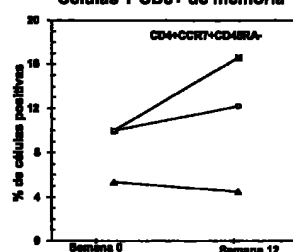
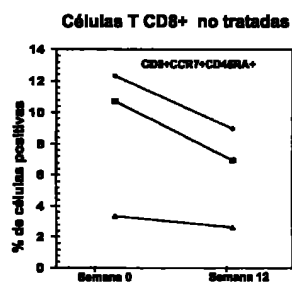


Fig. 28

Células T CD8+ de memória



29/29

—●— Paciente #0426 —●— Paciente #0333 —▲— Paciente #0418

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 66669-032

Box No. I TITLE OF INVENTION

IMMUNOGENIC HIV COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION
5931 Darwin Court
Carlsbad, California 92008
United States of America

Telephone No.
760-431-7080

Facsimile No.
760-431-8636

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MOSS, Ronald B.
5021 Manor Ridge Lane
San Diego, California 92130
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

CADENA, Deborah L.
McDermott Will & Emery LLP
4370 La Jolla Village Drive, Suite 700
San Diego, California 92122
United States of America

Telephone No.
858.535.9001

Facsimile No.
858.535.8949

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
44,048

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.

1. If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of this Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of this Box in which the space was insufficient, in particular:
 - (i) If more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
 - (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
 - (v) If, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.
2. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1(a) or (b)).
3. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1(d)).

Continuation of Box IV:

CONTINUATION OF BOX NO. IV:

CAMPBELL, Cathryn
GAY, David A.
GASHLER, Andrea L.
CADENA, Deborah L.
SPAIN, Astrid R.
GRUMBLING, Matthew V.

The above-named attorneys and patent agents are all members of the firm McDERMOTT WILL & EMERY LLP and their address is the same as that shown in Box IV of this Request.

212

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 28 August 2003 (28.08.2003)	60/498,804	US		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☐ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / US

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

Number of declarations

- | | | |
|---|--|---|
| ☐ Box No. VIII (i) | Declaration as to the identity of the inventor | : |
| ☐ Box No. VIII (ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent | : |
| ☐ Box No. VIII (iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | : |
| ☐ Box No. VIII (iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) | : |
| ☐ Box No. VIII (v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty | : |

212812

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING**This international application contains:****(a) In paper form, the following number of sheets:**

request (including declaration sheets) : 4
 description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 52
 claims : 4
 abstract : 1
 drawings : 29

Sub-total number of sheets : 90

sequence listing :

tables related thereto :

(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)

Total number of sheets : 90

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))**(i) ☐ sequence listing****(ii) ☐ tables related thereto****(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))****(i) ☐ sequence listing****(ii) ☐ tables related thereto**

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the

☐ sequence listing:☐ tables related thereto:

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):

- | | |
|---|-----|
| 1. ☒ fee calculation sheet | : 1 |
| 2. ☐ original separate power of attorney | : |
| 3. ☐ original general power of attorney | : |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | : |
| 5. ☐ statement explaining lack of signature | : |
| 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): | : |
| 7. ☐ translation of international application into (language): | : |
| 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material | : |
| 9. ☐ sequence listing in computer readable form (Indicate type and number of carriers) | : |
| (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : | : |
| (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : | : |
| (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column : | : |
| 10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (Indicate type and number of carriers) | : |
| (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) : | : |
| (ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater) : | : |
| (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column : | : |
| 11. ☒ other (specify): Transmitted w/Express Mail Cert.; Postcard | : 2 |

Figure of the drawings which should accompany the abstract: 1

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).



Deborah L. Cadena, Registration No. 44,048

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:

2. Drawings:

☐ received:

3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:

☐ not received:

4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 1(2):

5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /

6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid**For International Bureau use only**

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

RECEIVED
NOV 30 2004

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US04/027995

From the INTERNATIONAL BUREAU

McDERMOTT, WILL & EMERY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

CADENA, Deborah, L.
McDermott Will & Emery LLP
4370 La Jolla Village Drive
Suite 700
San Diego, CA 92122
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 10 November 2004 (10.11.2004)	
Applicant's or agent's file reference 60000-032	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US04/027995	International filing date (day/month/year) 27 August 2004 (27.08.2004)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 28 August 2003 (28.08.2003)
Applicant THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(e) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(e) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
28 August 2003 (28.08.2003)	60/498,804	US	14 October 2004 (14.10.2004)

NO
DUE
DATE

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Lachavanne Mylene

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 70 90
Telephone No. +41 22 338 9521

RECEIVED
NOV 16 2004

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2004/027995

22

From the INTERNATIONAL BUREAU

McDERMOTT, WILL & EMERY PCT

**NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY**

(PCT Rule 24.2(a))

To:

CADENA, Deborah, L.
McDermott Will & Emery LLP
4370 La Jolla Village Drive
Suite 700
San Diego, CA 92122
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 25 October 2004 (25.10.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 86689-032	International application No. PCT/US2004/027995

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION (for all designated States except US)
MOSS, Ronald, B. (for US)

International filing date : 27 August 2004 (27.08.2004)

Priority date(s) claimed : 28 August 2003 (28.08.2003)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 14 October 2004 (14.10.2004)

List of designated Offices :

AP : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

NO
DUE
DATE

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Eric VUAGNIAUX
Facsimile No. (41-22) 338.70.90	Telephone No. (41-22) 338 8768

Continuation of Form PCT/IB/301

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 25 October 2004 (25.10.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 06669-032	International application No. PCT/US2004/027995

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

☒ time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)

☐ requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 18 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19928, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 18 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 18-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 18-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 18-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(a)(b)).

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

CADENA, Deborah, L
McDermott Will & Emery LLP
4370 La Jolla Village Drive
Suite 700
San Diego, CA 92122
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
JAN 09 2006
McDERMOTT, WILL & EMERY

Date of mailing (day/month/year)

29 December 2005 (29.12.2005)

Applicant's or agent's file reference

66689-032

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/027995

International filing date (day/month/year)

27 August 2004 (27.08.2004)

Priority date (day/month/year)

28 August 2003 (28.08.2003)

Applicant

THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does not apply, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
10 March 2005 (10.03.2005)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CF, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS** for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

NO
DUE
DATE

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Philippe Becamel

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 70 90

RECEIVED
APR 06 2005
PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

Handwritten: 222

McDERMOTT WILL & EMERY

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

To:

CADENA, Deborah, L
McDermott Will & Emery LLP
4370 La Jolla Village Drive
Suite 700
San Diego, CA 92122
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Rule 47.1(c))

Date of mailing (day/month/year) 31 March 2005 (31.03.2005)		IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference 66669-032		
International application No. PCT/US2004/027985	International filing date (day/month/year) 27 August 2004 (27.08.2004)	Priority date (day/month/year) 28 August 2003 (28.08.2003)
Applicant THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION et al		

1. ATTENTION: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
10 March 2005 (10.03.2005)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

Handwritten: telephone deadlines
DOCKETS
Handwritten: CC

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 740 14 35	Authorized officer Philippe Becamel Facsimile No. +41 22 338 70 90
---	--



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231

700194800A

SEPTEMBER 12, 2005

PTAS

700194800A

MCDERMOTT WILL & EMERY LLP
4370 LA JOLLA VILLAGE DRIVE, SUITE 700
SAN DIEGO, CA 92122

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL ST P: ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 07/13/2005

REEL/FRAME: 016518/0442
NUMBER OF PAGES: 4

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: 066669-0528

ASSIGNOR:

MOSS, RONALD B.

DOC DATE: 04/04/2005

ASSIGNEE:

THE IMMUNE RESPONSE CORPORATION
5935 DARWIN COURT
CARLSBAD, CALIFORNIA 92008

SERIAL NUMBER: 10928642

FILING DATE: 08/27/2004

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: IMMUNOGENIC HIV COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

SERIAL NUMBER: 60498804

FILING DATE: 08/28/2003

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: IMMUNOGENIC HIV COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

700184800

622

RECORDATION FORM COVER SHEET		U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE Patent and Trademark Office
Form PTO-150 (Rev. 10/03)		
Docket No.: 065569-8528		
PATENTS ONLY		
To the Honorable Commissioner for Patents and Trademarks: Please return the attached original documents or copy thereof.		
1. Name of Conveying Party(ies): MOSE, Ronald B.	2. Name and address of receiving party(ies): Name: The Inman Response Corporation Address: 3923 Darwin Court Carlsbad, CA 92008	
Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☐ No		Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No
3. Nature of Conveyance: ☒ Assignment ☐ Mortgage ☐ Security Agreement ☐ Change of Name ☐ Other Execution Date: April 4, 2005		
4. Application number(s) or patent number(s): If the document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: A. Patent Application No(s): 10/022,642 60498,804 PGT/US2004/027995 B. Patent No(s):		
Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No		
5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed: Name: MCDERMOTT WILL & EMERY LLP Internal Address: Street Address: 4378 La Jolla Village Drive, Suite 700 City: San Diego State: CA Zip: 92122		6. Total number of application and patents involved: 1 7. Total fee (37 CFR 1.41): \$40.00 ☐ Enclosed ☒ Authorized to be charged to deposit account 8. Deposit account number: 282624
DO NOT USE THIS SPACE		
9. Statement and signature. To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.		
Deborah L. Collins, Reg. No.: 44,048 Name and Registration No. of Person Signing		May 17, 2005 Signature Date
Total number of pages including cover sheet: 5		
OMB No. 0451-0027 (exp. 6/30/2005)		

622

016518/0442 PAGE 2

SERIAL NUMBER:

PATENT NUMBER:

PCT NUMBER: US4027995

TITLE:

FILING DATE:

ISSUE DATE:

LAZENA MARTIN, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

228
7



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ()	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.		()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se 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 se 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 Diseño Industrial.		()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.		()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 06029507 00000000 Folios: 227
Fecha (MM): 2006-03-24 17:11:28
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NNCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES