

(19)



(10) **LT 3365 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) **Patento numeris: 3365**

(51) **Int.Cl.⁵: C12N 15/49,
C12N 15/86,
A61K 39/21,
C07K 13/00**

(21) **Paraiškos numeris: IP335**

(22) **Paraiškos padavimo data: 1993 02 11**

(41) **Paraiškos paskelbimo data: 1995 01 31**

(45) **Patento paskelbimo data: 1995 07 25**

(72) **Išradėjas:
Gale E. Smith, US
Franklin Volvovitz, US**

(73) **Patento savininkas:
MicroGeneSys, Inc., 1000 Research Parkway, Meriden, Connecticut 06450, US**

(74) **Patentinis patikėtinis:
Ljudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT**

(54) **Pavadinimas:
Vakcina prieš žmogaus imunodeficito virusą**

(57) **Referatas:**

Atrasta, kad rekombinantinio ŽIV-1 gp 160 apvalkalo baltymas ("rgp 160"), ypač adsorbuotas ant tokio adjuvanto, kaip alumas (pvz., aliuminio fosfatas), yra labai tinkamas vakcinai prieš AIDS. Vienas šio išradimo aspektų yra AcNPV ekspresijos vektorius, turintis ŽIV-1 apvalkalo geno koduojančios sekos dalį, kuri apima 1-757 amino rūgštis, randamas rekombinantiniame klone Nr. 3046. Kitas šio išradimo aspektas yra šio rekombinantinio ŽIV-1 apvalkalo baltymo (ir baltymo kaip tokio) gamyba vabzdžių ląstelėse - ypač baltymo rgp 160, atitinkančio 1-757 (t. y. 03046) aminorūgščių seką.

Kiti šio išradimo aspektai apima gryninimą ir rekombinantinio apvalkalo baltymo dalelių formavimą iš rekombinantinio bakuloviruso, gaminančio 3046 baltymą, geno produkto bei 3046 baltymo dalelių adsorbciją ant aliuminio fosfato agregatų.

Išradimas taip pat apima profilaktines ir/ar gydomąsias vakcinas prieš AIDS ir ŽIV infekcijas.

Ši paraiška yra paraiškos JAV patentui, serija Nr. 151,976, užpildytos 1988 m. vasario 3 d., tęsinys. Paraiška Nr. 151,976 yra paraiškos JAV patentui, serija Nr. 920,197, užpildytos 1986 m. spalio 3 d. (dabar serijos Nr. 585,266), tęsinys. Šios paraiškos ir cituojami darbai yra įtraukti į šį patentą nors jie tik cituojami.

1 tipo žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV-1) yra retrovirusas, sukeliantis patologiją imuninėje sistemoje. Žmogaus imunodeficito virusas yra įgyto žmogaus imunodeficito sindromo (AIDS) sukėlėjas. Barre-Sinoussi, et al., Science, 220: 868-871 (1983); Popovic et al., Science, 224: 497-500 (1984); Klinikiniai ŽIV-1 izolatai be to buvo priskiriami asocijuotam su limfadenopatija virusui (Feorino, et al., Science, 225: 69-72 (1984) ir AIDS giminingam virusui (Levy et al., Science 225: 840-842 (1984)).

AIDS įgavo pandemini pobūdį, todėl vakcinų prieš AIDS sukūrimas tapo viena iš pagrindinių sveikatos apsaugos uždavinių. Didelis procentas žmonių, užsikrėtusių ŽIV-1, sparčiai praranda imuninę funkciją dėl T4 limfocitų sumažėjimo. Šios T4 ląstelės, taip pat kaip ir tam tikros nervinės ląstelės, savo paviršiuje turi molekulę, vadinamą CD4. ŽIV-1 atpažįsta CD4 molekulę dėka receptoriaus, esančio ant virusinių dalelių apvalkalo, patenka į ląstelę, replikuojasi ir galiausiai ją nužudo. Manoma, kad efektyvi vakcina prieš AIDS turėtų sukelti antikūnų prisirišimą prie ŽIV-1 viruso apvalkalo, tuo būdu apsaugodama T4 limfocitus bei kitas jautrias ląsteles nuo ŽIV-1.

Paprastai vakcinomis, kaip imunoprofilaktikai skirtomis priemonėmis, skiepijami sveiki asmenys, dar nesirgę nurodyta liga. Tačiau visiškai priimtina efektyvią vakciną prieš AIDS vartoti po užsikrėtimo, kaip

imunoterapinę priemonę. Salk, J., Nature, 327: 473-476 (1987).

Šiuo metu plačiai paplitusi nuomonė, kad tinkamiausias
 5 kandidatas vakcinos prieš AIDS sukūrimui yra ŽIV-1 apvalkalas ("env"). Francis and Petricciani. New Eng. J. Med., 1586-1559 (1985); Vogt and Hirsh, Rewiews of Infectious Disease, 8: 991-1000 (1986); Fauci, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 83: 9278-9283. Iš pradžių ŽIV-1 apvalkalo baltymas yra susintetinamas kaip
 10 160000 molekulinio svorio glikoproteinas (gp160). Tada gp160 pirmtakas suskaidomas į 120000 molekulinio svorio išorinį glikoproteiną (gp120) ir 41000 molekulinio svorio transmembraninį glikoproteiną (gp41). Šitie
 15 apvalkalo baltymai yra svarbiausi antikūnų taikiniai-antigenai ligonių, sergančių AIDS, organizme. Barin, et al., Science, 228: 1094-1096 (1985). Buvo parodyta, kad natyvus ŽIV-1 gp120 yra imunogeniškas ir sugeba indukuoti neutralizuojančius antikūnus graužikuose,
 20 ožkose, rėzus beždžionėse ir šimpanzėse. Robey, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 7023-7027 (1986).

Dėl labai žemo natyvaus ŽIV-1 apvalkalo baltymo lygio užkrėstose ląstelėse ir pavojaus, susijusio su AIDS
 25 vakcinės paruošimu iš ŽIV-1 užkrėstų ląstelių, ŽIV-1 apvalkalo antigenų, skirtų vakcinės prieš AIDS gamybai, buvo pradėta naudoti rekombinantinės DNR metodus. Pasirodo, kad rekombinantinės DNR technika suteikia geriausias galimybes vakcinės prieš AIDS
 30 viruso subvienetų gamybai, nes įgalina saugiai ir pigiai gaminti imunogenus dideliais kiekiais. ŽIV-1 apvalkalo baltymo genas buvo ekspresuotas genetiškai pakeistuose rekombinantiniuose vakcinijos virusuose. Chakrabarti, et al., Nature, 320: 535-537 (1986); Hu, et al., Nature, 320: 537-540 (1986); Kieny, et al.,
 35 Biotechnology, 4: 790-795 (1986). Be to, apvalkalo baltymo genai buvo ekspresuojami bakterijų ląstelėse

(Putney, et al., Science, 234: 1392-1395 (1986)), žinduolių ląstelėse (Lasky, et al., Science, 23: 209-12 (1986)) bei vabzdžių ląstelėse. Sintetiniai peptidai, atitinkantys ŽIV-1 gp41 amino rūgščių seką, irgi buvo laikomi tinkamais vakcinų prieš AIDS gamybai. Kennedy, et al. (1986). Deja, naudojant tokius metodus bei medžiagas nepavyko sukurti efektyvios vakcinos prieš AIDS.

10 Vienas iš išradimo aspektų yra bakuloviruso - vabzdžių ląstelės vektorinės sistemos naudojimas rekombinantinio ŽIV-1 apvalkalo baltymo gamybai, aprašytas kartu paduotoje ir pasirašytoje paraiškoje JAV patentui gauti, serijos Nr. 920,197, užpildytoje 1986 m. spalio 15 16 d., (dabar serijos Nr. 585,266) aspektų. Taip pat žr. serijos Nr. 151,976.

Buvo parodyta, kad bakuloviruso sistema, apskritai, yra naudinga gaminant ŽIV-1 bei kitus baltymus. Pavyzdžiui, 20 bakulovirusas - *Autographa californica* branduolinės polihedrozės virusas (AcNPV) buvo panaudotas, kaip vektorius viso ilgio gp160 ir atskirų ŽIV-1 apvalkalo geno dalių ekspresijai užkrėstose Spodoptera frugiperda ląstelėse (Sf9 ląstelės). Be to, ankstesnėse paraiškose 25 patentui yra aprašytas sutrumpintas gp160 genas (rekombinanto numeris Ac3046); baltymas, pagamintas rekombinantiniame Ac3046, ir Ac3046 geno produkto gryninimo būdai, kuriuose naudojama lęšių lektino afininė chromatografija bei gelfiltracinė 30 chromatografija. Buvo nustatyta, kad šiuo būdu išgrynintas ir agreguotas į daleles gp160 baltymas yra labai imunogeniškas graužikams ir primatų rūšims.

Ideali vakcina prieš AIDS turėtų būti ne tik 35 biologiškai gryna bei apirogeniška, bet viena ar kelios jos injekcijos turėtų visam gyvenimui apsaugoti nuo ŽIV-1 infekcijos. Tai yra būdinga gyvoms susilpnintoms

vakcinoms. Kai vakcinų gamybai yra naudojamos užmuštos bakterijos ar virusai, arba iš jų išskirtos medžiagos, pvz.: toksoidai, baltymai, dažniausiai sukeliamas silpnas imuninis atsakas ir įgyjamas tik trumpalaikis imunitetas. Siekiant įveikti arba sumažinti šiuos vakcinų trūkumus, paprastai į vakciną įdedama papildoma medžiaga, vadinama adjuvantu. Adjuvantai - tai medžiagos, kurios padeda sukelti imuninį atsaką. Apskritai vakcinose, skirtose žmonėms, naudojami adjuvantai yra aliuminio druskų geliai (aliuminio fosfatas arba aliuminio hidroksidas), paprastai vadinami alumo adjuvantais. Bomford, et al., "Adjuvants", Animal Cell Biotech. Vol. 2: 235-250, Academic Press Inc. (London: 1985).

Šis išradimas - tai vakcina prieš žmogaus imunodeficito virusą (ŽIV). Tinkamiausioje vakcinos paruošimo schemoje apvalkalo baltymas yra gryninamas, agreguojamas ir sumaišomas su adjuvantu (pvz., alumu).

Šio išradimo detalės ir nuorodos į pridedamus brėžinius yra pateiktos žemiau:

Fig. 1 iliustruoja klonavimo strategiją, panaudotą ŽIV-1 apvalkalo geno (env) išskyrimui iš E.coli plazmidės pNA2. Užtušuotos dalys rodo ŽIV-1 seką, neužtušuotos - klonavimo vektoriaus DNR seką. Tamsus plazmidės p1774 regionas yra sukonstruotas iš sintetinių oligonukleotidų ir įstatytas į plazmidės 01614 SmaI-KpnI saitus kaip SmaI-KpnI fragmentas. Parodyta šio sintetinio oligonukleotido seka.

Fig. 2 iliustruoja rekombinantinės plazmidės vektoriaus (p3046) konstravimo strategiją, šis vektorius savo ruožtu buvo panaudotas bakuloviruso ekspresijos vektoriaus Ac3046 konstravimui.

Plazmidė pMGS3 turi bakuloviruso AcNPV sekas (užbrūkšniuotos skersai) kiekvienoje klonavimo saitų pusėje, pozicijoje 4.00. Šis regionas turi unikalius restrikcijos endonukleazių SmaI, KpnI ir BglII saitus. AcNPV polihedrino promotorius yra 5' galo kryptimi nuo 4.00 pozicijos. Seka 5'-TAATTAATTAA-3' yra 3'kryptimi ir turi transliacijos terminacijos kodoną visuose trijuose skaitymo rėmeliuose. Plazmidė p1774 ir sintetinio oligonukleotido regiono seka yra parodyti Fig. 1. Plazmidė p3046 turi visą pMGS3, išskyrus sekas tarp SmaI ir BglII saitų, kur yra įterptas p1774 ŽIV-1 apvalkalo genas.

Fig. 3 parodytos DNR, supančios Ac3046 gp160 koduojančias sekas, nukleotidų sekos.

Fig. 4 yra parodyta 3046 env DNR seka tarp +1 ir +2267.

Fig. 4a-4t rodo Ac3046 ŽIV env geno segmento pirminę DNR seką kartu su sintetinio oligonukleotido seka, esančia prie 5' env geno galo (tarp +1 ir +2267). Restrikcijos endonukleazių saitai yra surašyti virš DNR sekos, o numatoma amino rūgščių seka - po DNR seka. Bazės sunumeruotos kairėje ir dešinėje.

Fig. 5a-5h yra lyginamos Ac3046 env geno ir publikuota LAV-1 env geno DNR sekos. LAV-1 seka yra viršuje, o Ac3046 - apačioje. Linija (1) po LAV-1 seka rodo, kad šioje pozicijoje Ac3046 seka yra ta pati. DNR sekos sunumeruotos tuo pačiu būdu, kaip LAV-1 Wain-Hobson et al., Cell, 40: 9-17 (1985).

- Fig. 6 rodo antikūnų prieš ŽIV-1 titrą, nustatytą imunofermentine analize (IFA), teigiamuose žmonių serumuose (viršutinis grafikas) ir rėzus beždžionių, imunizuotų gp160 (IJ55, KL55) ar gp120 (AB55, CD55, GH55), serumuose (apatinis grafikas). Serumų titras prieš gerai išgrynintus baltymus gp120 ir gp160 buvo išmatuotas IFA. Specifiškai prisijungę antikūnai buvo išryškinti, naudojant ožkos antikūnus prieš žmogaus IgG, konjuguotus su peroksidaze iš krienų. Šiame teste titru laikomas didžiausias serumo praskiedimas, kuriam esant gaunamas teigiamas atsakas.
- Fig. 7 pateikta lentelė, apibendrinanti imuninius atsakus, sukeltus gp160 vakcinos, pacientams su teigiamais serumais.
- Fig. 8 (A ir B) rodo vakcinos sukeltus imuninius atsakus į specifinius ŽIV-1 apvalkalo epitopus.
- Fig. 9 rodo vakcinos sukelta T ląstelių proliferacinį atsaką į gp160 paskiepytuose pacientuose su teigiamais serumais.
- Fig. 10 rodo limfocitų skaičiaus didėjimą po skiepijimo vakcina gp160.
- Fig. 11 yra grafikas, rodantis CD4 ląstelių skaičiaus pokytį procentais laike vakcinai jautriuose ir nejautriuose individuose.
- Buvo atrasta, kad rekombinantinio ŽIV-1 gp160 apvalkalo baltymas ("rgp160"), ypač adsorbuotas ant tokio adjuvanto, kaip alumas (pvz., aliuminio fosfatas), yra labai tinkamas vakcinai prieš AIDS.

Vienas šio išradimo aspektų yra AcNPV ekspresijos vektorius, turintis ŽIV-1 apvalkalo geno koduojančios sekos dalį, kuri yra ekvivalentinė rekombinantinio klonu Nr. 3046 1-757 Wain-Hobsono (ibid) sekai ir atitinka 1-752 amino rūgštis.

Antras išradimo aspektas yra šio rekombinantinio ŽIV-1 apvalkalo baltymo (ir paties baltymo) gaminamas vabzdžių ląstelėse, ypač baltymo rgp160, koduojamo amino rūgščių 1-757 Wain-Hobson sekos (t.y. 03046, turinčio 752 amino rūgščių liekanas).

Kiti šio išradimo aspektai - apvalkalo baltymo gryninimas ir dalelių formavimas iš rekombinantinio bakuloviruso, gaminančio 3046 baltymą, geno produkto bei to produkto dalelių adsorbcija ant aliuminio fosfato agregatų.

Išradimas taip pat apima vakcinas ir priemones AIDS ir ŽIV infekcijų profilaktikai ir/arba terapijai.

Tolesni pavyzdžiai iliustruoja išradimą, neribodami jo pritaikymo sferos.

Rekombinantinis bakulovirusas Autographa californica branduolinės polihedrozės virusas (AcNPV), turintis sutrumpintą ŽIV-1 gp160 geną, koduojantį ŽIV-apvalkalo baltymo 1-757 amino rūgštis, yra aprašytas užregistruotoje paraiškoje JAV patentui, serijos Nr. 920,197 (dabar serijos Nr. 585,260). Klonavimo pakopos, naudojamos konstruojant rekombinantinį bakulovirusą, turintį ŽIV-1 genus ar ŽIV-1 genų dalis, irgi yra aprašytos šiame patente ir yra šio patento dalis.

Toliau pateiktas detalus geno inžinerinių stadijų, panaudotų konstruojant Ac3046 ekspresijos vektorių, aprašymas. Naudotos medžiagos, tarp jų fermentai ir

imunologiniai reagentai, buvo gauti iš komercinių šaltinių. Pridedami pavyzdžiai parodo, kaip atlikti ir taikyti išradimą.

5 Turimi omenyje taip pat ir kiti rekombinantiniai apvalkalo baltymai, kurie visi priskiriami rgp160, čia įeina ir rekombinantiniai gp120 ir gp41 baltymai. Ac3046 kaip tik yra tokio ekspresijos vektoriaus ir rekombinantinio apvalkalo baltymo pavyzdys pagal
10 išradimą.

1 PAVYZDYS

15 Rekombinantinio bakuloviruso Ac3046, turinčio ŽIV-1 koduojančios sekos dalį, atitinkančią 1-757 amino rūgštis, konstravimas

Svetimus baltymus koduojančių sekų klonavimui ir ekspresijai bakuloviruso vektoriuje reikia, kad
20 koduojanti seka su polihedrino promotoriumi ir prieš ją esančios sekos būtų išrikiuotos vienoje pusėje, o bakuloviruso koduojančios sekos - kitoje pusėje. Esant tokiam išsidėstymui, homologinės rekombinacijos su bakuloviruso genomu metu svetimos koduojančios sekos
25 yra perkeliamos kartu su polihedrino promotoriumi ir neaktyviu polihedrino genu.

Todėl ŽIV apvalkalo geno konstravimui buvo sukurti įvairūs insercijos vektoriai. Insercijos vektorius
30 MGS3, aprašytas žemiau, buvo sukonstruotas tam, kad tiektų ATG transliacijos iniciacijos kodoną. Svetimų sekų įterpimas į šį vektorių turėtų būti toks, kad transliacijos rėmelis, prasidedantis iniciacijos kodonu, tiksliai tiktų svetimoms sekoms.

35 Insercijos vektorius MGS3 buvo sukonstruotas iš Eco RI-I restrikcijos fragmento klono, kurio DNR buvo išskirta

iš išgryninto AcMNPV izoliato (WT-1). MGS3 buvo sukonstruotas taip, kad turėtų šias struktūrines savybes: (a) 4000 b.p. seką, esančią prieš polihedrino promotoriaus iniciacijos kodoną ATG; (b) polilinkeri, 5 įterptą "sait-specifinės" mutagenizės būdu, kuris turi iniciacijos kodoną ATG pozicijoje, atitinkančioje polihedrino iniciacijos kodono poziciją, ir restrikcijos saitus SmaI, KpnI, BglIII, o taip pat universalų "stop" kodono segmentą; (c) 1700 b.p. seką, 10 nusitęsusia nuo Kpn restrikcijos saito (kuris yra polihedrino gene) iki terminalinio EcoRI-I klonu EcoRI restrikcijos saito. Žr. pvz.: fig. 2.

2 PAVYZDYS

15

Bakuloviruso rekombinantų, turinčių LAV env koduojančias sekas, konstravimas

Rekombinantinė plazmidė, pažymėta NA2 (fig. 1), 20 susideda iš viso ŽIV-1 proviruso 21.8 k.b. segmento, įterpto į pUC18. Buvo duomenų, kad šis klonas yra infekcinis, kadangi gali gaminti virusą, sugebantį užkrėsti tam tikras žmogaus ląsteles. Adachi, et al., J.Virol. 59: 284-291 (1986). Visos apvalkalo geno 25 sekos, esančios NA2, yra kilusios iš ŽIV LAV štamo. Barre-Sinoussi (1983).

ŽIV-1 apvalkalo genas buvo išskirtas ir su juo atliekamos genoinžinerinės procedūros taip, kaip 30 aprašyta žemiau ir parodyta pav.1. Pirmiausiai iš NA2 buvo išskirtas 3846 b.p. EcoRI/SacI restrikcijos fragmentas, turintis apvalkalo geną ir klonuotas į EcoRI//SacI restrikcijos saitą pUC19. Sukonstruota plazmidė pavadinta p708.

35

Apvalkalo genas buvo pakartotinai išskirtas, kaip 2800 b.p. KpnI restrikcijos fragmentas ir klonuotas į

pUC18 KpnI restrikcijos saitą. Sukonstruota plazmidė pavadinta p1614.

KpnI restrikcijos fragmentas, esantis p1614, turėjo
 5 nežymiai sutrumpintą ŽIV apvalkalo geną, kuriame trūko
 121 b.p. ilgio N-galą atitinkančios sekos. Ši trūkstama
 geno dalis, koduojanti signalines peptidų sekas, buvo
 pakeista, įterpiant dvigrandį sintetinį oligomerą.
 Įterptas oligomeras buvo susintetintas iš LAV amino
 10 rūgščių sekos, naudojant polihedrino genui būdingus
 kodonus. Siekiant palengvinti tolesnes manipuliacijas,
 vietoj ATG iniciacijos kodono buvo įterpta nauja Smal
 restrikcijos seka. ATG iniciacijos kodonas gaunamas iš
 bakuloviruso insercijos vektoriaus. Sukonstruota
 15 plazmidė pavadinta p1774.

Remiantis fig. 2., restrikcijos fragmentai iš p1774,
 turintys įvairių ŽIV apvalkalo domenų koduojančias
 sekas, buvo klonuoti į MGS insercijos vektorių (pvz.,
 20 MGS3) taip, kad insercijos vektoriaus iniciacijos
 kodonas ATG būtų skaitymo rėmelyje kartu su apvalkalo
 geno kodonais. Sukonstruota p3046 susideda iš
 Smal/BglIII restrikcijos fragmento, išskirto iš p1774,
 įterpto į plazmidės vektoriaus pMGS3 Smal/BamHI saitą.
 25 Šis klonas turi sekas, koduojančias baltymo gp160 1 -
 757 amino rūgštis ir MGS3 vektoriaus terminacijos
 kodoną.

3 PAVYZDYS

30

Rekombinantinio bakuloviruso paruošimas ir selekcija

ŽIV env geno rekombinantinė plazmidė p3046 buvo
 išsodinta kalcio fosfatu su AcMNPV DNR (WT-1) ir įdėta
 35 į neužkrėstas Spodoptera frugiperda ląsteles. Tada
 chimerinis genas homologinės rekombinacijos būdu buvo
 įterptas į AcMNP genomą. Rekombinantiniai virusai buvo

indenfikuojami morfologiškai, pagal neigiamą plokštelių okliuziją. Tokiose plokštelėse pastebimas citopatinis efektas, bet be branduolio okliuzijos. Siekiant gauti gryną rekombinantinį virusą, buvo atliktos dvi papildomos, viena po kitos sekančios, plokštelių gryninimo procedūros. Lyginant restrikcijos ir hibridizacijos charakteristikas su atitinkamom "laukinio tipo" virusinės DNR charakteristikom, buvo išanalizuota, ar rekombinantinėje virusinėje DNR įvyko ŽIV env sekų "sait-specifinė" insercija.

4 PAVYZDYS

ŽIV env iš rekombinantinio bakuloviruso ekspresija užkrėstose vabzdžių ląstelėse

ŽIV env sekų iš rekombinantinių virusų ekspresija vabzdžių ląstelėse turėtų baigtis pirminio transliacijos produkto sinteze. Šis pirminis produktas bus sudarytas iš amino rūgščių, transliuojamų nuo rekombinantinio vektoriaus kodonų. Tokiu būdu, gaunamas baltymas, kuris turi visas amino rūgštis, koduojamas regione nuo ekspresijos vektoriaus iniciacijos kodono ATG, esančio už polihedrino promotoriaus, iki transliacijos terminacijos signalo, esančio ekspresijos vektoriuje (pvz.: rgpl60). Pirminis Ac3046 transliacijos produktas turėtų skaityti Met-Pro-Gly-Arg-Val, kur Arg, esantis pozicijoje 4, originaliame LAV klone turėtų būti pozicijoje 2. Met-Pro-Gly kodonai - klonavimo strategijos pasekmė.

5 PAVYZDYS

gp160 intarpo ir supanti DNR nukleotidu seka

gp160 intarpo ir šoninės DNR nukleotidų seka buvo nustatyta pagal restrikcijos fragmentą, išskirtą iš

virusinio ekspresijos vektoriaus Ac3046 DNR. Sekos buvo nustatomos tokia tvarka: 3.9 kb EcoRV-BamHI fragmentas buvo išgrynintas, restrikacijos endonukleazėmis suskaidžius Ac3046 virusinę DNR. Ac3046 virusinė DNR
5 buvo paruošta iš ekstraląstelinio viruso, esančio ląstelių, naudotų vakcinos serijos gamybai, terpėje.

Kaip parodyta fig. 2, 3.9 kb EcoRV-BamHI fragmentas susideda iš viso gp160 geno ir 100 b.p. DNR, esančios
10 prieš geną ir 1000 b.p. DNR, esančios už geno.

Taigi, sekų nustatymo rezultatai parodė, kad gauta chimerinė konstrukcija, kurią nulėmė klonavimo strategija. gp160 seka iš esmės buvo tokia pati, kaip
15 nurodė Wain-Hobson, et al. (1985). 2256 bazių porų seka tarp tariamų transliacijos iniciacijos ir terminacijos kodonų lemia 752 amino rūgščių kodoną ir 28 potencialus N-glikozilinimo saitus. Šio rgp160 molekulinis svoris (kartu su angliavandenių liekanomis) apytiksliai yra
20 145000.

Kaip matyti Fig. 3,4 ir 5, 200 bazių, priklausančių supančiai DNR, sekų analizė parodė tikslią inserciją.

25 6 PAVYZDYS

gp160 amino rūgščių seka

Naudojant standartinę automatizuotą Edmano degradaciją
30 ir HPLC buvo nustatyta, kad pirmų 15-kos gp160 liekanų N-galinė seka yra identiška pagal DNR numatytai sekai. gp160 baltymas neturi N-galinio metionino. Tai atitinka stebėjimus, kad AcNPV polihedrino baltymas taip pat yra sintetinamas be N-galinio metionino. Analizuojant AcNPV
35 3046 DNR ir išgrynintą gp160, nustatyta, kad pirminės gp160 DNR ir N-galo baltymo sekos tokios (1 lentelė):

1 LENTELĖ

LAV env AcNPV 3046 ekspresijos vektoriuje

5 Liekana

2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Pro	Gly	Arg	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Gln	His	Leu	Trp	Arg	Trp	Gly	
ATG	CCC	GGG	CGT	GTG	AAG	GAG	AAG	TAC	CAA	CAC	CTG	TGG	CGT	TGG	GGC

Šie rezultatai lyginami su originaliu LAV-1 klonu
(2 lentelė):

10

2 LENTELĖ

LAV env genas AcNPV originaliame LAV-1 klone

15 Liekana

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Met	Arg	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Gln	His	Leu	Trp	Arg	Trp	Gly
ATG	AGA	GTG	AAG	GAG	AAG	TAT	CAG	CAC	TTG	TGG	AGA	TGG	GGG

7 PAVYZDYS

20 Rekombinantinio gp160 gryninimas

Vienas šio išradimo aspektų yra procedūra, naudojama rekombinantinio HIV-1 apvalkalo baltymo, koduoto Ac3046 ekspresijos vektoriuje, ekstrakcijai ir išskyrimui. Rekombinantinis HIV-1 apvalkalo baltymas gp160 yra sintetinamas S. frugiperda ląstelėse 4-5 dienas po užkrėtimo Ac3046. Šio rgp160 baltymo gryninimas vyksta sekančiom pakopom:

- 30
1. Ląstelių plovimas
 2. Ląstelių suardymas

3. Gelfiltracinė chromatografija

4. Lęšių lektino afininė chromatografija

5. Dializė

Šiame pavyzdyje aprašytas rekombinantinio gp160 grynimas iš maždaug 2×10^9 ląstelių, užkrėstų Ac3046.

1. Ląstelių plovimas. Užkrėstos ląstelės plaunamos buferyje, turinčiame 50mM Tris'o buferio (pH 7.5), 1 mM EDTA ir 1 % Triton'o X-100. Šiame buferyje ląstelės resuspenduojamos, homogenizuojamos standartiniais metodais ir centrifuguojamos 20 minučių, esant 5000 aps/min. Šis procesas pakartojamas 3 kartus.

2. Ląstelių suardymas. Nuplautos ląstelės suardomos ultragarsu 50mM Tris'o buferio (pH 8.0-8.5), 4 % dezoksicholato ir 1 % beta-merkaptoetanolio mišinyje. Ardymas ultragarsu atliekamas naudojant standartinius metodus. Po ardymo ultragarsu lieka nesuirusios tik branduolio membranos dalelės, kurios pašalinamos centrifuguojant 30 minučių, esant 5000 aps/min. Stebėjimai per šviesinį mikroskopą rodo, kad supernatante, turinčiame ekstrahuotą gp160, nėra nesuirusių ląstelių.

3. Gelfiltracija. Gelfiltracija atliekama stiklinėse 5.0x50 cm kolonose (Pharmacia), užpildytose Sefakrilu (Pharmacia). Bendras sorbento tūris yra apytiksliai 1750 ml. Kolona ir žarnelių jungtys depirogenizuojami bei dezinfekuojami leidžiant per koloną 24 valandas mažiausiai 6 litrus 0.1 N NaOH. Eliuatas, ištekantis iš kolonos, eina per UV-kiuvetę, sujungtą su monitoriumi ir savirašiu (Pharmacia), kolona nulygsvarinama 4 litrais gelfiltracinio buferio. Nevalytas gp160 yra pakraunamas ant kolonos ir per ją leidžiamas gelfiltracinis buferis.

5 Kolonoje nevalytas mišinys susiskirsto į tris dideles UV absorbuojančias frakcijas. Pirmasis pikas nubrėžiamas tarp apytiksliai 500 ir 700 ml, antrasis tarp 700 ir 1400 ml ir trečiasis tarp 1400 ir 1900 ml buferio. Toks pat eliuacijos profilis stebimas nedidelėse analitinėse kolonose, pagal kurias buvo nustatyta, kad pirmą piką duoda medžiaga, kurios molekulinis svoris $>2\ 000\ 000$.

10 Šio piko frakcija silpnai absorbuojama, nes joje yra didelio molekulinio svorio lipidų bei lipidų kompleksų. Be to, šio piko frakcijoje yra nuo 10 % iki 20 % gp160, ekstrahuoto iš užkrėstų ląstelių. Neabejotinai, ši gp160 frakcija sudaro kompleksus pati su savimi ir su
15 kitais ląstelių komponentais, suformuodama didelio molekulinio svorio agregatus.

Antrojo, plataus, piko frakcijoje, yra didžioji dalis gp160 ir baltymų, kurių molekulinis svoris apytiksliai
20 yra 18 000 - 200 000.

Trečiojo piko frakcijoje yra mažai baltymų, ir didžia dalimi UV absorbcija sąlygojama beta-merkaptetoetanolio, esančio pavyzdyje.

25 Kai tik antrasis pikas užregistruojamas UV detektoriumi, eliuatas, ištekantis iš kolonos, nukreipiamas tiesiai į koloną su lęšių lektinu. Kai antrasis pikas išeina iš kolonos, eliuatas atjungiamas nuo kolonos su
30 lęšių lektinu ir nukreipiamas lauk.

4. Lęšių lektinas. Didelis kiekis lęšių lektino afininės gelio terpės (Lentil Lectin Sepharose 4B) buvo išsigytas firmoje "Pharmacia". Lęšių lektinas buvo
35 išgrynintas iki 98 % švarumo afininės chromatografijos būdu ant Sefadekso ir tada imobilizuotas ant Sefarozės 4B, naudojant bromcianą. Ligando kiekis matricoje yra

maždaug 2 mg/ml gelio. Lęšių lektino kolona - tai 5.0x30 cm stiklinės kolona (Pharmacia) kurioje yra 125 ml lęšių lektino Sefarozės 4B gelio. Rūpestingai praplovus ir pagal gamintojo rekomendacijas regeneravus, afininę matricą galima naudoti pakartotinai. Nenaudojant gelis yra saugojamas kolonoje, pripildytoje tirpalo, kuri sudaro 0.9 % NaCl, 1 mM $MnCl_2$, 1mM $CaCl_2$ ir 0.01 % mertiolato. Prieš kiekvieną naudojimą kolona yra plaunama ir nulygsvarinama 250 ml anksčiau aprašyto lęšių lektino buferio.

Nevalytas gp160 yra leidžiamas tiesiai per koloną, nes nuo gelfiltracinės kolonos jis eliuuojamas anksčiau aprašytu būdu. Kai neišgrynintas gp160 prisijungia prie kolonos, jis plaunamas 800 ml lęšių lektino buferio, turinčio 0.1 % dezoksicholato. Esant šioms sąlygoms, visas gp160 prisijungia prie kolonos. Prisijungusių glikoproteinų, nustatomų UV detektoriumi, esant 280 nm bangos ilgiui, eliucijai naudojamas lęšių lektino buferis su 0.3 M alfa-metil-manozidu.

5. Dializė. Angliavandeniai ir dezoksicholatas pašalinami įprastos dializės būdu.

Baltymo gp160 išgryninimo iš 1 litro užkrėstų ląstelių procedūrą galima reziumuoti sekančioje lentelėje (lentelė 3). Kitu atveju, vietoj gelfiltracijos galima atlikti įprastinę jonų mainų chromatografiją (anijonų ir katijonų). Darbo eiga irgi neturi lemiamos įtakos: pavyzdžiui, gelfiltracinė ar jonų mainų chromatografija gali būti atliekama po lęšių lektininės chromatografijos. Pagal išradimą, galima naudoti ir kitus reagentus. Pavyzdžiui, vietoje dezoksicholato rekombinantinio baltymo gryninimui galima naudoti kitus detergentus, t.y. nejoninius detergentus tokius, kaip Tween 20 (polisorbatus 20), Tween 80, Lubrol ir Triton X-100.

3 LENTELE - gryninimo reziumė

Gryninimo stadija	Bendras baltymas	gp160 balty- mas (mg) ¹	Bendras gp160 (mg)	Pašalintos priemaišos %
Ląstelių nuosėdos	1-2000	20	1-2	Augimo terpė
1,2,3-ias plovimas	250	15	6	Serumo albuminas, dauguma nukleino rūgščių, tirpūs ląstelių baltymai
Gelfiltra- cija	120	12	12	Lipidai, nukleino rūgštys, didelio mol. svorio agregatai
Lęšių lektino afininė chromato- grafija	14	10	70	Neglikozilinti baltymai

- 5 ¹ Bendras baltymo kiekis buvo nustatytas pagal absorbciją, esant 280 nm bangos ilgiui.

8 PAVYZDYS

10 A. gp160 dalelių surinkimas.

- 15 Vienas šio išradimo aspektų buvo tai, kad gryninimo metu antigenas gp160 gali būti surinktas į >2000000 molekulinio svorio daleles. Iš ląstelių ekstrahuojamas gp160 baltymų mišinys, turintis 80-90 % monomerų (160.000 molekulinio svorio) ir 10-20 % polimerų (dalelių forma). Gelfiltracijos pakopoje pašalinamos agreguotos gp160 formos. Nepavykę bandymai

išskirti gp160 iš šios frakcijos (pirmasis pikas po gelfiltracijos) perša išvadą, kad jis sudaro kompleksus su kitais ląstelės baltymais ir, galbūt, net su membranos fragmentais. Tačiau gp160 antigenas
5 frakcijoje, duodančioje antrą piką po gelfiltracijos, yra apytiksliai 160000-300000 molekulinio svorio. Tai rodo, kad dominuoja monomerinės bei dimerinės formos.

Baltymo gp160 agregatai ar polimerai susidaro kolonoje su lęšių lektinu. Buvo nustatyta, kad antigenas sudaro agregatus tiek eliuuojant 0.5 % dezoksicholatą nuo kolonos su lęšių lektinu, kai kritinė micelių koncentracija (KMC) dezoksicholato atžvilgiu yra apytiksliai 0.2 %, tiek ir eliuuojant gp160 nuo kolonos
15 0.1 % dezoksicholatu.

Agregatų dydis yra matuojamas didelę skiriamąją galia turinčioje FPLC Superozės 12 kolonoje (Pharmacija). Tipiškų išgryninto gp160 serijų pavyzdžiai dažniausiai
20 yra 20000000 ar didesnio molekulinio svorio, lyginant su Dekstran Blue standartu.

Schwaller, et al. (1989) darbuose parodyta, kad vabzdžių ląstelėse susintetintas gp160, - tai tetramerinės dalelės, sudarytos iš identiškų subvienetų. Be to, šie tyrimai rodo, kad ŽIV užkrėstose ląstelėse ir virusinėse dalelėse gp160 yra tetramerinis. Taigi, rekombinantinio gp160 dalelės gali turėti tretinę ir ketvirtinę struktūras, panašias į natyvaus HIV gp160.
25

30 Tinkama trimatinė struktūra gali būti svarbi epitopų, reikalaujančių tikslaus gp160 erdvinio išsidėstymo, formavimui. Kadangi neglikozilinti baltymai atskiriami nuo gp160 antigeno lęšių lektino chromatografijos metu, 35 panašu, kad hidrofobinės gp160 porcijos pradeda formuoti tarpmolekulinius asocijatus. Dezoksicholatas, matyt, neprisijungia prie gp160, kadangi galima

palaikyti didesnę nei KMC jo koncentraciją, o antigenas toliau formuoja kompleksus. Pasirodo, kad toks antigeno agregavimasis yra būdinga šio baltymo savybė, jei jis gryninamas pagal šį išradimą. Gali būti, kad
 5 būtent ta hidrofobinė N-galinė seka, kuri yra gp160 baltyme, prisideda prie natūralaus šio baltymo sugebėjimo formuoti daleles. Po gryninimo galima gp160 kompleksus steriliai filtruoti per 0.2 mikronų skersmens celiuliozės acetato filtrą. tokios procedūros
 10 metu neprarandama daug baltymo.

B. Dalelių susidarymo analizė.

Išgryninto gp160 dalelių analizė elektroninės
 15 mikroskopijos būdu parodė, kad tai yra panašios į baltymus, sferinės 30-100 nM dalelės.

Norint įsitikinti, jog dalelės susidarė, išgrynintas gp160 papildomai analizuojamas gelfiltracijos būdu.
 20

Apytiksliai 100 mikrogramų gp160 buvo praleista per FPLC gelfiltracijos HR 10/30 Superozės koloną (Pharmacia, Inc.). Prieš tai kolona buvo kalibruojama, naudojant molekulinio svorio baltyminius standartus.
 25 Šioje kolonoje baltymų eliacijos profilis labai gerai atsikartoja; eliacijos tūris yra atvirkščiai proporcingas baltymų standartų molekuliniam svoriui. Kolonoje monomerinis gp160 atskiriamas nuo polimerinių formų ir pašalinami globuliniai baltymai, kurių
 30 molekulinis svoris $> 2 \times 10^6$. Dirbant su šia kolona visas baltymas gp160 išteka su tuščiu tūriu, taigi molekulinis svoris yra $> 2 \times 10^6$ (2000000).

9 PAVYZDYS

35

A. gp160 adsorbcija ant alumo.

Netirpių aliuminio junginių, kaip imunologinių adjuvantų, efektyvumas priklauso nuo antigenų adsorbcijos ant kietos fazės. Viena šio išradimo dalis tai atradimas, jog galima padaryti tokius alumo
5 junginius, kurie efektyviai adsorbuotų gp160. Šiuo atveju, pH turėtų būti toks, kad nesumažėtų gp160-alumo komplekso imunogeninis aktyvumas. Šio alumo (aliuminio fosfato gelio) junginio susidarymo metu kontroliuojami tokie faktoriai:

10

1. Optimalus antigenų adsorbcijos ant alumo pH yra apytiksliai 5.0. Tačiau buvo atrasta, kad gp160, esant pH 6.5. praranda imunogeniškumą labiau nei, esant pH 7.5. Todėl alumas buvo pagamintas, esant pH 7.1 ± 0.1 .
15 Buvo atrasta, kad esant šiam pH, visi 100% gp160 dar adsorbuojasi prie alumo.

2. Joninė jėga, sąlygojama NaCl, yra santykinai maža ir yra mažesnė nei 0.15 M.

20

3. Naudojamas moliarinis aliuminio chlorido perteklius, lyginant su natrio fosfatu, užtikrinantis, kad supernatante nėra laisvų fosfato jonų.

25 4. Baltymas gp160 įdedamas į šviežiai pagamintą alumą, kad sustotų kristalų augimas ir sumažėtų dalelių dydis.

200 ml alumo ruošiami ir išgrynintas gp160 adsorbuojamas prie alumo taip, kad galutinė antigeno koncentracija būtų 40 $\mu\text{g/ml}$, kaip nurodyta žemiau.
30

B. Reagentų paruošimas (serijos po 200 ml).

Toliau nurodytus tirpalus ruoškite 100 ml talpos
35 steriliuose deprogenizuotuose buteliuose ar stiklinėse. Sumaišykite druskas, skirtas tirpalo 1 ir tirpalo 2 paruošimui, su natrio hidroksidu ir

filtruokite per 0.2 mikronų skersmens celiuliozės acetato filtrus į 100 ml talpos sterilius depirogenizuotus butelius.

Tirpalas 1	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.895 g
	$\text{NaHAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.136 g
Ištirpinti 40 ml vandens injekcijoms (VI), filtruoti per 0.2 mikronų filtra		
Tirpalas 2	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.234 g
Ištirpinti 40 ml VI, filtruoti per 0.2 mikronų filtra		
Tirpalas 3	NaOH	2.0 g
Ištirpinti 100 ml VI, filtruoti per 0.2 mikronų filtra		
Tirpalas 4	Tris	1.25 g
Ištirpinti 100 ml VI, įpilti 1 ml į 90 ml VI, pH koreguoti iki 7.5 su 0.5N HCl ir pripilti VI iki 100 ml		

5

Tirpalus autoklavuoti 30 min; lėtai išleisti garą. Atšaldyti iki kambario temperatūros.

C. Alumo paruošimas

10

1. Supilkite 1 tirpalą (aluminio chloridas-natrio acetatas) į paruošimo indą, naudodami 25 ml sterilias vienkartinės pipetes. Pasižymėkite 1 tirpalo tūrį ir pradėkite maišyti tirpalą.

15

2. Į indą įpilkite 2 tirpalą (natrio fosfatas), naudodami 25 ml sterilias vienkartinės pipetes ir toliau maišykite krentant nuosėdoms. Pasižymėkite tirpalo 2 tūrį.

20

3. Įpilkite 3 ml 3 tirpalo (natrio hidroksidas) ir maišykite dar 5 min. Paimkite 0.5 ml pavyzdį ir pamatuokite pH. Jei pH mažesnis nei 7.0, papildomai įpilkite 0.5 ml natrio hidroksido, maišykite dar 5 min
5 ir vėl pamatuokite pH. Tęskite, kol pH nusistovės tarp 7.0 ir 7.2.

4. Nustatykite bendrą tūrį, įpiltą į paruošimo indą (tirpalas 1 + tirpalas 2 + tirpalas 3), tada įpilkite
10 sterilaus VI iki 100 ml.

5. Skubiai įdėkite 8,000 mikrogramus išgryninto gp160 100 ml 1 mM Tris pH 7.5 tiesiai į paruošimo indą.

15 6. Plakite dar bent 20 minučių, tada paruoštą vakciną išpilstykite į sterilius mėgintuvėlius.

10 PAVYZDYS

20 Alumo, adsorbuoto ant gp160, imunogeniškumas (specifinis Ab atsakas)

Tinkamas metodas antigeninio preparato (vakcinos) imunogeniškumo nustatymui yra specifinio imuninio
25 atsako matavimas pelių, paskiepytų vienkartinę antigeno doze, grupėse. Baigiantis 4 savaitei pelės yra nukraujinamos ir antikūnų prieš nurodytus antigenus (paprastai prieš tuos antigenus, kuriais gyvūnai buvo imunizuoti) lygis serume yra matuojamas standartiniu
30 testu, t.y. IFA (imunofermentinė analizė).

Išgryninto gp160 be adjuvanto, esant pH 6.0 ir 7.5, adsorbuoto prie alumo (kaip aprašyta pavyzdyje 9) arba sumaišyto su pilnu Freund'o adjuvantu imunogeniškumas
35 pelėms yra susumuotas žemiau (4 lentelė).

4 LENTELĖ

gp160	Grupė	gp 160 IFA vidurkis		Serokonversija	
	Adjuvantas	Serijs	OT ²	%	(P/N) ³
1 mkg	Nėra, pH 7,5	8702	0.140	57	4/6
	Nėra, pH 6.0	8702	0.110	26	2/7
	Alumas	8702	1.000	90	9/10
	Alumas	8705	2.285	100	6/6
	Freund'o	8604	1.108	83	5/6
	Freund'o	8702	1.396	100	7/7
	Freund'o	8604	0.434	67	4/6
	Freund'o	8604	0.434	67	4/6
0.1 mkg	Freund'o	8604	0.434	67	4/6
	Alumas	8705	1.003	67	4/6

5 ² Praėjus 28 dienoms po imunizacijos pelės buvo nukraujintos ir serumai, praskiedus 1:10; testuojami IFA būdu, prieš gelfiltracijos metodu išgrynintą gp160. Panašūs rezultatai buvo gauti, naudojant komercinę IFA (Genetic System Inc.; EIA™ ELISA) prieš natyvius HIV-1 baltymus, serumo praskiedimui esant 1:400.

10 ³ Serokonvertuotų pelių skaičiaus (P) santykis su bendru testuotų pelių skaičium (N).

15 Pelėse, imunizuotose vienakartine 1.0 mikrogramine gp160 antigeno doze jokio adjuvanto, kyla imuninis atsakas į gp160 (žr. lentelę žemiau). Žymiai stipresnis imuninis atsakas stebimas pelėse, imunizuotose vienkartinę 1.0 mikrogramine gp160, adsorbuoto ant alumo adjuvanto, doze. Vienkartinė, mažesnė nei 20 0.1 mikrogramas gp160, sumaišyto su pilnu Freund'o adjuvantu arba adsorbuoto alumu, dozė sukels serokonversiją >50% imunizuotų pelių. Nors ir

nestipriai, antigenas gp160 be adjuvanto buvo imunogeniškas pelėms, esant pH 7.5 ir pH 6.0. Esant žemesniam pH imunogeniškumas prarandamas.

5 **11 PAVYZDYS**

Ant alumo adsorbuoto gp160 imunogeniškumas (serumo tyrimas IFA metodais)

10 Vakcinų sugebėjimas sukelti imuninę atsaką yra labai svarbi biologinė savybė. Siekiant patvirtinti, kad gp160 vakcina, paruošta su alumu, yra imunogeniška gyvūnams, o alumo adjuvantas didina šį imunogeniškumą, buvo atlikti tokie eksperimentai:

15

Nulinę dieną pelėms (10 individų grupėje) buvo suleista vienakartinė dozė (0.5 mikrogramo, 1.0 mikrogramas ir 5.0 mikrogramai) vieno gp160, gp160 adsorbuoto ant alumo ar gp160 su pilnu Freund'o adjuvantu (PFA). 28-tą

20 dieną pelės buvo nukraujintos ir IFA (praskiedimas 1:10) būdu patikrinti serumai, ar yra antikūnų prieš gp160.

Rezultatai, gauti po 28-nių dienų, yra susumuoti

25 lentelėje, pateiktoje žemiau (lentelė 5). Visose grupėse daugiau nei 50% pelių buvo stebima serokonversija. Serokonversijų skaičius ir vidutinė serumo absorbcija (OT_{450} nm, esant praskiedimui 1:10, IFA) buvo didesni, suleidus bet kuria gp160, adsorbuoto

30 ant alumo, dozę, nei imunizavus atitinkama vieno gp160 doze.

Šie rezultatai rodo, kad alumo adjuvantas žymiai padidina gp160 antigeno imunogeniškumą.

5 LENTELE - 28 dienos po suleidimo

	0.5 µg dozė		1.0 µg dozė		5.0 µg dozė	
	Vidurkis		Vidurkis		Vidurkis	
	P/N ⁴	OT ⁵	P/N	OT	P/N	OT
gp160	9/10	0.407	7/10	0.699	7/10	0.430
gp160 (alumas)	9/10	0.547	8/10	0.797	10/10	0.347
gp160 (CFA)	10/10	1.130	10/10	1.967	10/10	1.317

5 ⁴ Serokonvertavusių pelių skaičius (P), lyginant su bendru tirtų pelių skaičiumi (N), praėjus 28 dienoms po imunizacijos 0.5 mikrogramais, 1 mikrogramu ir 5 mikrogramais ŽIV-1 VaxSyn™.

10 ⁵ Vidutinė serokonvertavusių pelių serumų absorbcija (OT₄₅₀), išmatuota IFA prieš gp160, serumo praskiedimui esant 1:10.

12 PAVYZDYS

15 Neutralizacijos duomenys

20 ŽIV neutralizacijos analizė yra pripažintas metodas norint nustatyti ar antikūnų preparatas inhibuoja ŽIV-1 virusą ir apsaugo nuo užkrėtimo jautrias žmogaus limfocitų kultūrų ląsteles. Gyvūnėlių, imunizuotų gp160, antiserumai buvo tikrinami ŽIV-1 neutralizacijos analizės būdu; rezultatai susumuoti lentelėje, pateiktoje žemiau (6 lentelė).

6 LENTELĖ

Gyvūnas	Identifi- kacija	Imunogenas/A djuvantas	Mikrogramai ⁶	Neutralizuoj antis titras ⁷
Rėzus	G55	gp120/Alumas	16/8/8	1:80-1:160
Rėzus	H55	gp120/Alumas	16/8/8	1:80-1:16
Rėzus	L55	gp160/Alumas	16/8/8	≥1:80
Pelės				
1:40-1:80	Mišinys 3	gp120/Freund'o	.25/.25/.25	
Pelės	Mišinys 8	gp160/Freund'o	.1/.1/.1	1:40-1:80
J.kiau- lytės	Išgry- nintas IgG	gp160/Freund'o	10/10/10	1:320

5 ⁶ gp160 ar gp120 kiekis mikrogramais pirmos/
antros/trečios imunizacijos metu.

10 ⁷ Didžiausias antiserumo praskiedimas, kuris 50%
stabdo užkrėtimą, lyginant su ŽIV-1 užkrėstomis
ląstelėmis, kurios buvo laikomos neimunizuotų
gyvūnų serume.

15 Jūrų kiaulytės, triušiai ir rėzus beždžionės irgi buvo
imunizuoti gp160 (su alumu arba Freund'o adjuvanto).
Apskritai, šiuos gyvūnus imunizavus, buvo stebimas
geras imuninis atsakas į ŽIV-1 apvalkalo baltymus.

13 PAVYZDYS

Imunogeniškumas šimpanzėse

20 Genetiškai šimpanzės yra artimiausi žmogaus gimi-
naičiai. Šiuo metu tai vienintelis gyvūno modelis,
tinkamas ŽIV-1 infekcijos tyrimams. Toksiškumo/imuno-
geniškumo bandymai buvo atliekami su trimis
25 beždžionėmis; dvi buvo imunizuotos 40 mikrogramų arba

80 mikrogramų gp160 su alumu paruošta vakcina. Po 4 savaitių kiekviena jų buvo papildomai imunizuota, atitinkamai 40 mikrogramų arba 80 mikrogramų gp160. Kontroliniam gyvūnui tuo pat metu buvo suleistas 1 ml druskos tirpalo. Kiekvieną savaitę buvo imami visų trijų šimpanzių kraujo pavyzdžiai ir tikrinama, ar yra antikūnų prieš gp160 ir ŽIV-1 virusinius antigenus. Tam buvo atliktos trys imunologinės analizės: IFA, naudojant išgrynintą gp160, sukurtą MicroGeneSys, Inc., "Western Blot" analizė ir komercinė ŽIV-1 IFA analizė. Šių analizių duomenys yra pateikti žemiau.

A. IFA (MGSearch HIV 160)

IFA analizė MGSearch HIV 160 (MGSearch yra MicroGeneSys, Inc. of Meriden, Connecticut, U.S.A. prekybinis ženklas imunosorbentinei analizei prieš gp160) yra aprašyta kartu paduotoje ir pasirašytoje paraiškoje JAV patentui, serijos Nr. 920,197 (dabar Nr. 585,266).

Serumo pavyzdžiai paimti prieš imunizaciją ir 11 savaitių po pirminės imunizacijos buvo praskiesti nuo 1:10 iki 1:100 000 ir inkubuoti su nitroceliuliozės juostomis, turinčiomis 100 µg išgryninto gp160 kiekviename taške. Galutinis titras - tai didžiausias antikūnų prieš gp160 praskiedimas, kuriame testas davė teigiamus rezultatus, naudojant ožkos antikūnus prieš žmogaus IgG konjuguotus su šarmine fosfataze.

Serumo pavyzdžiai, paimti iš kontrolinių bei bandomųjų gyvūnų prieš imunizaciją buvo neigiami. Šimpanzės, kuriai buvo suleista 80 mikrogramų dozė, serumas buvo teigiamas, praskiedus 1:100, antrą savaitę, o šimpanzės, kuriai buvo suleista 40 mikrogramų dozė, serumas buvo teigiamas, praskiedus 1:10, ketvirtą savaitę. Antikūnų prieš gp160 titras didėjo iki 5-tos

savaitės, kai galutinis titras atitinkamai buvo 1:100000 ir 1:2000000. Antikūnų titrai abiejuose gyvūnuose per 6-11 savaites nukrito labai nežymiai.

- 5 Toks atsako tipas yra ir kokybiškai ir kiekybiškai panašus į imuninį atsaką, stebimą šimpanzėse, paskiepytose vakcina prieš žmogaus hepatitą B.

B. Komerčinis IFA testas

10

Iš šimpanzių, imunizuotų VaxSyn⁸, serumų analizės MGSearch ŽIV 160 ELISA ir Western blot'o metodais, aišku, kad jose vyko serokonversija ir buvo antikūnų prieš rekombinantinį gp160. Siekiant ištirti, ar jose gaminami ir anti-ŽIV antikūnai, atpažįstantys natyvių virusinio apvalkalo baltymus, serumai prieš imunizaciją ir serumai paimti 1-11 savaitę buvo tikrinami licenzijuotame komerciniame IFA testų rinkinyje. (LAV EIATM test kit of Genetic System Corporation, Seattle, Washigton). Gyvūno, imunizuoto 80 mikrogramų gp160, serumas buvo teigiamas, praskiedus 1:100, 2-rą savaitę; antikūnų lygis jame ir toliau augo visas 6 savaites. Gyvūno, imunizuoto 40 mikrogramų gp160, serumas, praskiedus 1:100, buvo teigiamas 6-tą savaitę.

25

14 PAVYZDYS

Antikūnų prieš gp120 ir gp41 pasiskirstymas

- 30 Svarbu nustatyti, ar imuninis atsakas į gp160 paskiepytame gyvūne nukreiptas prieš gp41, gp120 ar prieš abu. Antikūnų prieš įvairius ŽIV-1

35

⁸ VaxSyn yra čia aprašytos MicroGeneSys, Ins. vakcinos prieš AIDS prekybinis ženklas.

apvalkalo baltymo regionus nustatymui ir jų lygio išmatavimui buvo naudojami įvairūs imunologiniai metodai, tarp jų radioimunoprecipitacija (RIP), imunofluorescencija (IF), "Western blot" analizė (WB) ir kiekybinė IFA prieš tris skirtingus rekombinantinius apvalkalo antigenus.

6 fig. susumuoti trijų skirtingų rekombinantinių antigenų imuniniai reaktyvumai: [ART] [TAB] (1) gp120--delta (sutrumpintas ŽIV-1 gp120, kurio molekulės C-gale trūksta maždaug 40 amino rūgščių); [ART] [TAB] (2) gp120 (pilno ilgio rekombinantinis ŽIV-1 gp120) ir [ART] [TAB] (3) gp160.

50 žmonių, turinčių antikūnus prieš ŽIV-1, serumai ir 3 sumaišyti žmonių serumai gerai reagavo į gp160, vidutiniškai - į gp120 ir silpnai arba visai nereagavo į sutrumpintą gp120. Panašu, kad sutrumpintas gp120, kuris sudaro daugiau nei 90% išorinio ŽIV-1 glikoproteino, turi apsauginių determinančių. Tai, kad AIDS teigiami žmogaus serumai turi mažai antikūnų prieš šį apvalkalo regioną, atitinka faktą, jog imuninis atsakas nevisiškai apsaugo nuo virusinių infekcijų, o teigiami žmonių serumai paprastai rodo žemą neutralizuojančio aktyvumo lygį in vitro.

Priešingai, rėzus beždžionių, imunizuotų arba imunogenu gp160, arba sutrumpintu gp120, serumuose yra antikūnų, reaguojančių tik su ŽIV-1 apvalkalo sutrumpinta gp120 dalimi. Gali būti, kad tokie antikūnų atpažinimo saitų pasiskirstymo viruso apvalkale skirtumai ir aukštesni titrai, stebėti beždžionėse, yra aukštų neutralizuojančių titrų beždžionių serumuose priežastis.

Kiekybinis šių trijų rekombinantinių apvalkalo antigenų imuninio reaktyvumo žmogaus ir imunizuotų rėzus

beždžionių serumas įvertinamas yra parodytas 7 fig. Visi testuoti beždžionių serumai, tarp jų ir gyvūnų, imunizuotų gp160, turėjo aukštą antikūnų prieš sutrumpintą gp120 titrą (gp120-delta).

5

Šie rezultatai rodo, kad rekombinantinis gp160 sukelia imuninį atsaką rėzus beždžionėse. Šis atsakas skiriasi nuo to, kuris paprastai atsiranda natūralių infekcijų metu. Baltymo gp160 regione gp120-delta yra epitopai, kurie efektyviai atpažįstami imunizuotose beždžionėse ir kurie nebuvo pastebėti žmogaus imuninėje sistemoje infekcijos metu. Šie nauji epitopai gali būti reikalingi apsisaugojimui nuo ŽIV-1 ir turėtų būti svarbi rekombinantinio gp160 savybė, tinkama ŽIV-1 infekcijos profilaktikai bei gydymui.

15

15 PAVYZDYS

Vakcinos taikymas gydymui

20

Skiepijimo klonuotu ŽIV gp160 (susintetintu bakuloviruso sistemoje pagal aukščiau aprašytą schemą) poveikis ŽIV užkrėstiems asmenims, buvo studijuojamas klinikinių bandymų su 30 pacientų, turinčių teigiamus ŽIV serumus, metu.

25

Skiepijimas rekombinantiniu gp160 sukėlė gp160 ŽIV-specifinio humoralinio ir ląstelinio imuninio atsako sustiprėjimą 19-oje iš 30 (63%) ŽIV-1 savanorių, kurių serumai buvo teigiami ŽIV. Keturiolikai iš 15 (93%) savanorių, kuriems buvo suleistos 6 vakcinų dozės, padidėjo bendras antikūnų prieš gp160 kiekis. Todėl rekombinantiniai ŽIV baltymai (t.y. rgp41, rgp120, rgp160 ir jų priedai) gali būti sėkmingai naudojami pacientų, užkrėstų ŽIV, gydymui.

35

Efektyvius ŽIV-1 baltymo kiekius, taikytus šioje išradimo schemoje, galima nustatyti tradiciniais metodais, aprašytais žemiau. Apskritai, šie efektyvūs kiekiai gali kisti tarp apytiksliai 1 mikrogramo ir 5 apytiksliai 100 mikrogramų vienam paciento svorio kilogramui. Vartojimo dažnumą irgi galima nustatyti tradicinėmis priemonėmis. Labiausiai tinkamas vartojimo būdas - parenteralus, t.y. leidžiama į veną, pilvaplėvę, raumenis, po oda ir t.t., kas gerai žinoma 10 turintiems patirtį šioje srityje.

A. Savanorių atranka

15 Buvo atrinkta trisdešimt savanorių, užkrėstų ŽIV. Registruojami buvo tik tie asmenys, kurių serumas buvo teigiamas ir diagnozuota ankstyva ŽIV infekcijos stadija, vadinama Walter Reed Stage 1 arba 2 (daugiau nei 3 mėnesius CD4 ląstelių kiekis ne mažesnis nei 400: 20 su arba be limfadenopatijos). (Redfield, et al., New Eng. J. Med. 314: 131-132 (1986). Pagal papildomus kriterijus buvo atrinkti 18-50 metų amžiaus suaugę savanoriai, turintys normalią kraujo formulę, be 25 akivaizdžių pagrindinių organų ligų, nepiknaudžiavę alkoholiu bei narkotikais pastaruosius 12 mėnesių ir nevartoję antiretrovirusinių bei imunomoduliuojančių vaistų. Prieš atsitiktiniu būdu paskirstant į 30 gydomąsias grupes, visų pacientų būklė buvo vertinama 2 mėnesius. Bandymo metu nei vienas savanoris negavo jokių antiretrovirusinių ar imunomoduliuojančių vaistų.

Iš 30 savanorių dvidešimt šeši buvo vyrai, 4 - moterys. Tarp jų buvo keturiolika kaukaziečių, 13 juodaodžių ir 3 ispanų rasės atstovai. Vidutinis amžius 29 metai (intervalas 18-24). Registracijos pradžioje 35 8 savanoriams buvo diagnozuota Walter Reed Stage 1 ir 22 - Walter Reed Stage 2. Pradinis vidutinis CD4 kiekis buvo 668 (intervalas 388-1639). Vidutinis laiko tarpas

tarp pradinės diagnozės ir studijų pradžios buvo 24 mėnesiai (intervalas - nuo 3 iki 49 mėnesių).

B. Vakcina ir imunizavimo schema

- 5 Šiame dokumente aprašyta, bandomąją vakciną sudaro neinfekcinis subvienetinis glikoproteinas, kilęs iš gp160 - bakuloviruse ekspresuojamo rekombinantinio baltymo. Imunogeninis baltymas buvo susintetintas
- 10 Lepidoptera vabzdžių ląstelėse, išgrynintas biocheminiais būdais ir adsorbuotas prie aliuminio fosfato. Taip buvo gauta galutinė vakcinos forma.
- Buvo naudotos trys gp160 dozės: 40 mikrogramų mililitrui, 160 mikrogramų mililitrui ir 320 mikrogramų mililitrui. Injekcijos tūris buvo 1 ml tiek 40 µg, tiek 160 µg dozėms; (320 µg/mililitrui) 640 µg dozės injekcijoms buvo naudojamos 2 ml tūris.
- 20 Trisdešimt savanoriu buvo suskirstyti į šešias grupes po penkis savanorius kiekvienoje grupėje. Imunizacijos buvo atliekamos pagal tokias schemas: schema A, kur skiepijama 0, 30 ir 120 dienomis; ir schema B, kur skiepijama 0, 30, 60, 120, 150 ir 180 dienomis.
- 25 Skiepijant pagal abi imunizacijos schemas (A ar B), buvo sudarytos trys grupės, kuriose pacientai gaudavo skirtingas vakcinos dozes (7 lentelė). Skiepijama buvo į trikampius raumenis. Tyrimai truko 10 mėnesių: 2 mėnesius - pradinis įvertinimas ir 8 mėnesius -
- 30 stebėjimai po pirminio paskiepijimo.

7 LENTELĖ - imunizacijos schema

Suleisto gp160 kiekis (µg)

	Diena	0	30	60	120	150	180
Schema A							
Grupė 1		40	40		40		
Grupė 3		160	160		160		
Grupė 5		640	640		640		
Schema B							
Grupė 2		40	40	40	160	160	160
Grupė 4		160	160	160	640	640	640
Grupė 6		640	640	640	640	640	640

5

C. Saugumo ir toksiškumo įvertinimas

Visi savanoriai buvo apklausti ir ištirti 0, 1, 2, 3, 15 ir 30 dienomis po kiekvienos injekcijos. Savanorių buvo teiraujamasi dėl karščiavimo, peršalimo, šleikštulio, pykinimo, artralgijos (sąnarių skausmų), mialgijos (raumenų skausmų), negalavimų, dilgėlinės, dusulio, galvos svaigulio ar galvos skausmo. Vietinės reakcijos vaistų suleidimo vietoje buvo vertinamos pagal eritemą, patinimą, niežulį, skausmą ir padidintą jautrumą, odos spalvos pakitimą, odos sutrūkimą, regioninės limfadenopatijos pakitimus, galūnės, į kurią buvo injekuota, funkcijos pakitimus, poodinių mazgelinių sustorėjimų atsiradimą injekcijos vietoje. Be to, kas mėnesį buvo vertinama pilna kraujo formulė, serumo cheminiai parametrai, kraujo krešėjimo greitis, atliekama šlapimo analizė.

10

15

20

Ląstelių imuninė funkcija in vitro buvo įvertinta, fenotipuojant T-ląsteles (bendrus limfocitus, CD4 ir CD8 ląstelių fenotipus) pagal Rickman, et al., Clinical Immuno. 52: 85-95, 1989; Birx, et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 4:188-196, (1991). T-ląstelių dauginimasis, sukeltas mitogenų (amerikietiškoji fitolaka ir Con A) bei kontrolinių antigenų (Candida albicans ir stabligės), irgi buvo įvertinatas. Birx et al., supra. Ląstelių imuninė funkcija in vivo buvo įvertinta sulėtinto hipersensityvumo odos testais prieš kontrolinius antigenus (t.y. kiaulytės virusas, stabligės toksoidas, Candida albicans ir trichofitonas).

Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL) ir plazmos virusinės kultūros buvo kiekybiškai įvertintos pagal Burke, et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 3: 1159-1167, 1991. DNR polimerazinė grandininė reakcija (Wages, et al., J. Med. Virol. 33: 58-63, 1991) ir p24 antigeno lygis serume buvo nustatyti tam, kad būtų galima įvertinti ŽIV viruso kiekį in vivo.

Nebuvo pastebėta ryškaus sistemos toksiškumo, bet vietinės reakcijos buvo konstatuotos 87 procentams pacientų (13 kiekvienoje skiepytoje grupėje). Vietinės reakcijos apėmė sukietėjimus, padidintą jautrumą, ir laikinų poodinių mazgelių atsiradimą injekcijos vietoje; regioninės adenopatijos sustiprėjimas buvo retas. Nei vienas asmuo neatsisakė nuo pakartotinių injekcijų. Vietinių reakcijų dažnumas nepriklausė nuo pirminės imunizacijos, papildomų injekcijų ir dozavimo.

Aiškių pašalinių poveikių imuninei sistemai nebuvo konstatuota, nei in vitro matuojant mitogeno ir antigeno specifinius proliferacinius atsakus, nei - in vivo sulėtinto hiperjautrumo odos reakcijoje ar pagreitėjusiame CD4 tipo ląstelių pašalinime. Pirminis vidutinis CD4 ląstelių kiekis buvo 716 ir 605,

atitinkamai. CD4 ląstelių kiekio vidurkis jautriuose ir
 nejautriuose vakcinai asmenyse paskaičiuotas 180-
 240 dienomis buvo 714 ir 561, atitinkamai. Per 240-ies
 5 dienų eksperimentą grynas CD4 ląstelių kiekio vidurkio
 pokytis buvo minus 0.2 procentai vakcinai jautriuose
 pacientuose, tuo tarpu nejautriuose CD4 ląstelių kiekio
 vidurkis sumažėjo 7.3 procentais (11 fig.). Viso
 bandymo kurso metu nei viename atskirame atvejuje
 vakcinos sukeltas imunogeniškumas prieš ŽIV nepriklausė
 10 nuo pagreitinėjusio CD4 tipo ląstelių pašalinimo. ŽIV
 viruso replikacijos ir viruso susikaupimo galimybės
 vertinimui po paskiepijimo buvo išmatuotas virusinis
 aktyvumas, kiekybiškai įvertinus plazmą ir PKLV
 virusines kultūras, PKLV DNR amplifikavimą polimera-
 15 zinės grandininės reakcijos būdu ir p24 antigeno lygį
 serume. Kiekybinė kultūrų ir DNR amplifikacijos
 polimerazės grandininės reakcijos analizė neparodė
 jokių pakitimų viso bandymo metu. Antigenas p24 nebuvo
 surastas šių asmenų serume.

20

D. Imunogeniškumo įvertinimas

Antikūnai prieš bendrus ŽIV baltymus buvo išmatuoti
 naudojant ir rekombinantiniu būdu pagamintus viruso
 25 geno produktus gp160, p66, p24 ir bendrą prototipinio
 ŽIV štamo MN virusinį lizatą. Dot blot'as ir Western
 blot'as buvo atliekami pagal Toubin, et al., Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354 (1979). Be to, buvo
 išmatuoti imuniniai atsakai į specifinius apvalkalo
 30 epitopus (žr. fig. 7).

Fig. 7 buvo atrinkti epitopai 88 (amino rūgštys 88-
 89 baltyme gp120) ir 448C (amino rūgštys 448-
 514 baltyme gp120), kadangi yra duomenų, jog antikūnai
 35 prieš šiuos gp120 regionus turi savitarpio ryšį su
 ankstyvąja ŽIV infekcijos stadija.

Epitopai 106 (aminorūgštys 106-121 baltyme gp120),
241 (aminorūgštys 241-272), 254 (aminorūgštys 254-272),
300 (aminorūgštys 300-340), 308 (aminorūgštys 308-322),
422 (aminorūgštys 422-454) ir 735 (aminorūgštys 735-
5 752) buvo atrinkti dėl jų spėjamos funkcinės svarbos.
Epitopai 106 ir 422 dalyvavo CD4 prijungime; epitopai
241, 254 ir 735 dalyvavo grupių specifinėje neutrali-
zacijoje, o epitopai 300 ir 308 dalyvavo tipų speci-
finėje neutralizacijoje.

10

Epitopas 582 (aminorūgštys 582-602) buvo pasirinktas
kontroliniu, kadangi jis atstovauja imunodominuojanti
apvalkalo domeną natūralioje ŽIV infekcijoje.
Papildomai buvo ištirti 49 (aminorūgštys 49-128) ir
15 342 (aminorūgštys 342-405) epitopai.

Fig. 7a taškuoti kvadratai rodo imuninio atsako,
nukreipto į ŽIV apvalkalą, dokumentais patvirtintą
pokytį. Kvadratai su (-) žymi pirminį humoralinį
20 atsaką; taškuotas kvadratas su (+) žymi antrinį
humoralinį atsaką; (-) žymi antikūnus, nesąveikau-
jančius su specifiniais epitopais nei prieš, nei po
imunizacijos; (+) žymi antikūnus sąveikaujančius su
specifiniais epitopais prieš imunizaciją ir po jos, bet
25 be kiekybinių pakitimų. Taškuose stulpelis su (.) žymi
naują T-ląstelių proliferacinį atsaką į imunizaciją
gp160. Vienas (.) žymi imuninio atsako į gp160 nebuvimą
tuo tarpu hb žymi "high background" (neįmanoma
interpretuoti); nd žymi "not done" (nepadaryta).

30

Neutralizacijos aktyvumas buvo matuojamas prieš tris
prototipinius izoliatus (ŽIV-IIIB, RF ir MN),
analizuojant sincitijų inhibiciją pagal Nara, Nature,
333: 469-470 (1988). ŽIV specifinis ląstelinis atsakas
35 buvo išmatuotas įprasta limfocitų proliferacinės
analizės technika, naudojant gp160, p24 ir bakuloviruso

ekspresinės sistemos kontrolinius baltymus (Birx, supra).

E. Vakcinai jautrūs ir nejautrūs individai

5

Individai buvo laikomi jautriais vakcinai tik tuomet, jei atsikartojantis selektyvus ląstelinio bei humoralinio imuninio atsako į ŽIV apvalkalo specifinius epitopus sustiprėjimas priklausė nuo skiepijimo serijų (7 fig.). Vakcinos sukeltas humoralinis imunitetas buvo apibrėžtas kaip serokonversija prieš ŽIV apvalkalo specifinius epitopus ir/ar antrinis pastiprinantis imuninis atsakas prieš specifinius apvalkalo epitopus. Vakcinos sukeltas ląstelinis imunitetas buvo apibrėžtas kaip naujo, atsikartojančio, vakcinos sukulto proliferacinio atsako į gp160, atsiradimas⁹. Vakcinai nejautriais asmenimis buvo laikomi tie asmenys, kuriuose neatsirado nei humoralinio, nei ląstelinio proliferacinio atsako, arba išsivystė vien tik humoralinis ar vien tik ląstelinis proliferacinis atsakas į gp160 epitopus ar ŽIV apvalkalą.

F. Vakcinos sukeltas humoralinis atsakas

Remiantis fig. 7, 19 iš 30 asmenų (63 procentai) buvo stebimas vakcinos sukeltas specifinio humoralinio bei ląstelinio imuninio atsako į gp160 ŽIV sustiprėjimas. Šie 19 individų buvo laikomi "jautriais vakcinai". Keturiems iš 11 vakcinai nejautrių asmenų atsirado vien tik humoralinis arba vien tik ląstelinis imuninis atsakas. Visi 7 asmenys, kuriuose nepavyko aptikti jokių vakcinos sukeltų atsakų, buvo gavę tik 3 dozes

⁹ Toks vakcinai jautraus individo apibrėžimas yra labai ribotas šio bandymo mokslinių tikslų šviesoje: pvz., įvertinti imunizacijos po užkrėtimo pagrįstumą.

(Schema A). Nebuvo rasta pokyčių antikūnams jungiantis prie ŽIV polimerazės (p66), nei struktūriniuose (p24) genų produktuose ar ne-ŽIV kontroliniame stabligės antigene. Nei vieno individo organizme nesusidarė antikūnų prieš bakuloviruso-Lepidoptera sistemos baltymus.

Apvalkalo baltymų (gp160) kiekio padidėjimas buvo rastas 13 individų Western blot'o analizės metodu, naudojant bendrą viruso lizatą ŽIV-MN. Pakitimai priklausė nuo imunizacijos schemos. Trys iš 15 individų (20 procentų) buvo skiepyti pagal schemą A, o 10 iš 15 individų (67 procentai) - pagal schemą B. Skiepijant pagal schemą B, išaugo antikūnų prieš apvalkalo baltymus kiekis ($P=0.025$ pagal tikslių Fišerio testą, dviejų sigmų taisyklė). Visi 13 individų irgi serokonvertavo prieš specifinius apvalkalo epitopus.

Priešingai, iš 10 asmenų, kuriems nepavyko serokonvertuoti nei prieš vieną specifinį apvalkalo epitopą, nė viename nebuvo pastebėtas padidėjęs apvalkalo baltymų kiekis, analizuojant Western blot'u. Kiti 7 individai, kurie serokonvertavo prieš specifinius apvalkalo epitopus, neparodė pakitimų bendruose antikūnuose prieš viruso apvalkalą, analizuojant Western blot'u. Antikūnai, nukreipti prieš neapvalkalinius ŽIV baltymus, nebuvo pakitę nei vieno individo organizme.

Keturiolikai iš 15 individų (93 procentai), skiepytų pagal schemą B (6 dozės), padidėjo bendras antikūnų prieš gp160 kiekis. Tuo tarpu grupėje, gydytoje pagal schemą A (3 dozės) tokie buvo tik 7 iš 15 asmenų (47 procentai) ($P=0.01$ pagal Fišerio testą, dviejų sigmų taisyklė) (7 fig.).

Iš 8 fig. matyti, kad laiko tarpe nuo prieš imunizacijos iki po paskiepijimo kiekvieno

- gp160 specifinio epitopo pasiskirstymas buvo toks: epitopas 49 (27 - 70 procentų), epitopas 88 (28 - 52 procentai), epitopas 106 (50 - 87 procentai), epitopas 214 (0 - 14 procentų), epitopas 254 (0 - 13 procentų), epitopas 300 (47 - 77 procentai), epitopas 308 (42 - 69 procentai), epitopas 342 (0 - 27 procentai), epitopas 422 (3 - 10 procentų), epitopas 448C (73 - 87 procentai) ir epitopas 735 (17 - 30 procentų). Vakcinos sukelta serokonversija buvo nukreipta prieš visus specifinius epitopus, išskyrus epitopą 582 (7 fig.). Antikūnai (serekonversija) nukreipti prieš epitopus 241, 254 ar 342, buvo aptikti tik po kito skiepijimo.
- 15 Antrinis imuninis atsakas buvo nukreiptas prieš tokius epitopus: 88, 106, 300, 448C ir 582. Prieš skiepijimą antikūnų prieš epitopą 582 paplitimas buvo 100 procentų ir tik vienam individui (3 procentai) buvo stebimas antrinis imuninis atsakas.
- 20 Vakcinos indukuotų antikūnų prieš ŽIV apvalkalo epitopus skalė įvairavo (fig. 7). Pirminis imuninis atsakas (serokonversija) bent prieš vieną epitopą atsirado 20 individų; 14 iš 15 gydytų pagal schemą B ir 6 iš 15, kuriems atsitiktiniu būdu buvo parinkta schema A ($P=0.005$ Fišerio testas, 2-jų sigmų taisyklė). Individai, gydyti pagal schemą A, serokonvertavo tik prieš 15 iš 110 (14 procentų) galimų epitopų, prieš kuriuos jie neturėjo priešimunizacinių antikūnų.
- 30 Individai, gydyti pagal schemą B, serokonvertavo prieš 60 iš 129 (47 procentai) ($p<0.0001$ Fišerio testas, 2-jų sigmų taisyklė) epitopų. Serokonversija prieš tris ar daugiau apvalkalo epitopų įvyko 9 individams (60 procentų), gydytiems pagal schemą B ir tik 2 asmenims (13 procentų), gydytiems pagal schemą A ($p=0.02$ Fišerio 2-jų sigmų taisyklė).
- 35

Serumo neutralizuojantis aktyvumas prieš tris skirtingus štamus (ŽIV-IIIB, MN ir RF) buvo konstatuotas 7 asmenyse 0, 90 ir 195 dienomis. Keturiems iš 5 vakcinai jautrių individų didėjo neutralizuojantis aktyvumas prieš vieną ar daugiau izoliatų. Be to, vakcinai jautrūs individai geriau inhibavo sincitijų formavimąsi, nei vakcinai nejautrūs individai.

G. Vakcinos sukeltas ląstelinis atsakas

10

Pakitimai ląsteliniam imuniniame atsake buvo nustatomi, lyginant vidutinį limfocitų stimuliacijos indeksą (LSI) prieš skiepijimą (pradinis) ir po skiepijimo Wilcoxon'o eilės sumavimo metodu.

15

Dvidešimt vienam iš 30 individų (70 procentų) atsirado naujas T ląstelių proliferacinis atsakas į gp160 post-imunizaciją (7 fig.).

20

Fig. 9 iliustruoja proliferacinius atsakus į gp160, p24 ir bakuloviruso kontrolės baltymą keturiems tipiškiems vakcinai jautriems individams, bėgant laikui. Visiems individams gp160 sukelta proliferacija išaugo nuo pradinio vidutinio LSI lygaus 3 iki LSI lygaus 10 (paskaičiuota pagal vidurkį, gautą iš 4 reikšmių po paskutinės imunizacijos). Priešingai, nebuvo pastebėta proliferacinių atsakų, nukreiptų į ŽIV p24 baltymą ar į kontrolinį bakuloviruso baltymą.

25

30

Fig. 10. rodo vakcinos sukeltus vidutinių LSI reikšmių pakitimus visiems individams, bei individams, sugrupuotiems pagal jautrumą vakcinai ir pagal imunizacijos schemą.

35

Vakcinai jautrių ir nejautrių individų proliferacinio atsako į gp160 pakitimai aiškiai skyrėsi (<0.001 , Wilcoxon, vienos sigmos taisyklė). Proliferacinis

individų, gydytų pagal schemą B (6 dozės), atsakas į gp160, buvo stipresnis nei individų, gydytų pagal schemą A (3 dozės) ($P < 0.10$, Wilcoxon, vienos sigmos taisyklė).

5

Devyniolikai iš 21 individo, kuriuose atsirado proliferacinis atsakas į gp160, pastebėtas ir humoralinis atsakas (vakcinai jautrūs individai). Visų vakcinai jautrių individų maksimalus vidutinis limfocitų stimuliacijos indeksas (LST) į gp160 buvo 50.1. Vis dėl to visi vakcinai jautrių individų atsakai buvo variabilūs (LSI reikšmės kito intervale nuo 3 iki 171) (fig. 7). Taip pat variabilus yra laikinas santykis tarp ląstelinio atsako į gp160 dydžio bei trukmės (fig. 9) ir vakcinavimo.

15

H. Rezultatų aptarimas

Nepaisant ribotos šio bandymo apimties, buvo parodyta, kad keliolika faktorių siejasi su vakcinės imunogeniškumu. Šeši iš 15 (40 procentų) individų, gydytų pagal schemą A, lyginant su 13 iš 15, gydytų pagal schemą B, buvo jautrūs vakcinai ($P = 0.02$ Fisher'io testas, 2-jų sigmų taisyklė) (pav. 7). 13 iš 16 individų (procentais), kuriuose vidutinis pradinis CD4 kiekis buvo didesnis nei 600 viename mililitre, buvo jautrūs vakcinai, tuo tarpu 6 iš 14 (43 procentai) individų, kuriems vidutinis pradinis CD4 kiekis buvo mažesnis nei 600/mililitrui ($p = 0.07$ Fisher'io. dvi sigmos) buvo nejautrūs vakcinai. Lentelėje 8 režiuiuojama, kad daugkartinės imunizacijos pagerino imunogeniškumą net tiems pacientams, kurių vidutinis pradinis CD4 kiekis buvo mažesnis nei 600/mililitrui. Pavyzdžiui, 5 iš 6 individų, imunizuotų pagal schemą B (6 injekcijos) buvo jautrūs vakcinai, lyginant su 1 iš 8, gydytų pagal trijų injekcijų režimą (schemą A) ($p = 0.03$ Fisher'io, dviejų sigmų taisyklė) (8 lentelė).

35

8 LENTELĖ

Imuninis atsakas į gp160 vakciną pagal pradinį CD4 kiekį ir
 5 imunizacijos schema

<u>CD4 kiekis</u>	N	Jautrių individų <u>skaičius, %</u>	Nejautrių individų <u>skaičius, %</u>
SCHEMA A			
>600	7	5 (71%)	2 (29%)
500-600	5	1 (20%)	4 (80%)
<500	3	0 (0%)	3 (100%)
Viso	15	6 (40%)	9 (60%)
SCHEMA B			
600	9	8 (89%)	1 (11%)
500-600	2	2 (100%)	0 (0%)
<500	4	3 (75%)	1 (25%)
Viso	15	13 (87%)	2 (13%)
IŠ VISO	30	19 (63%)	11 (37%)

Gydymui vakcinas 19-tame amžiuje pradėjo naudoti
 Pasteras. Jis taikė vakciną ūmios pasiutligės
 10 infekcijos gydymui. Tačiau vakcinų tinkamumas kitų
 infekcijų gydymui nebuvo plačiai tyrinėjimas. Nors yra
 virusinio specifinio imuniteto postinfekcinės modifi-
 kacijos pavyzdžių (po Hepatito A ir B), deja, nėra
 atliktų ir tinkamai dokumentais patvirtintų tyrimų,
 15 kurie parodytų, kad tikslinga vakcinas taikyti žmogaus
 ūmių ar lėtinių virusinių infekcijų gydymui.

Aktyviai imunizuojant po užsikrėtimo pagal šią išradimą atsiranda virusinė-specifinė imuninė modifikacija. Iš ŽIV apvalkalo geno kilusi gp160 vakcina sustiprina žmogaus virusinę specifinę humoralinę ir ląstelinę atsakus 19 iš 30 asmenų, kuriems diagnozuota ankstyva ŽIV stadija.

Šiame darbe buvo kokybiškai lyginami skirtingi imuniniai atsakai į specifinius ŽIV epitopus natūralioje infekcijoje ir imunizavus po užsikrėtimo. Tuo būdu, tiksliai nustatius vakciną sukeltą humoralinę imunogeniškumą jau užkrėstuose individuose, buvo dokumentais patvirtinta, kad jis atsirado 70 procentų individų. Pavyzdžiui, dvidešimt individų (19 jautrių vakcinai ir 1 nejautrus) serokonvertavo prieš specifinius apvalkalo epitopus. Serokonversija, priklausanti tik nuo skiepijimo (epitopai 241, 254 ir 342), buvo patebėta 10 individų.

Be to, humoralinio atsako į šią vakciną variacijos, nustatytos identifikuojant epitopus, atvers perspektyvas tolimesnei eigai ir efektyviai specifinio imuninio atsako analizei bei sudarys unikalios prielaidas galimų imunoregulatorinių mechanizmų, nesukeliamų natūralios infekcijos metu, charakterizavimui.

Nors serumo neutralizuojančio aktyvumo svarba in vivo kol kas nežinoma, 4 iš 5 vakcinai jautrių individų pastebėtas padidėjęs neutralizuojantis aktyvumas prieš skirtingus ŽIV štamus (IIIB, RF, MN) pasiūlė prielaidą, kad poinfekcinė imunizacija sukėlė pakitimus funkciniuose antikūnuose. Bandomoji vakcina sukėlė serumo neutralizuojančio pajėgumo prieš skirtingus ŽIV štamus padidėjimą ir, matyt, padės nustatyti grupinius specifinius neutralizuojančius epitopus.

Proliferacinis atsakas į ŽIV apvalkalo baltymus natūralios ŽIV infekcijos atveju kyla retai. Tačiau po imunizacijos gp160, specifinis T-ląstelių proliferacinis atsakas buvo užregistruotas 21 (70 procentų) 5 individų. Tokio skirtumo priežastis nėra aiški. Viena galima priežastis yra tai, kad naujas proliferacinis atsakas gali būti nukreiptas prieš apvalkalo epitopą (us), kurie yra unikalūs šiai vakcinai (vakcinos gamybos metodologijos ar alternatyvaus antigeno 10 procesingo *in vivo* rezultatas). Priešingai, baltymas, naudotas proliferacijos analizėje, negali stimuliuoti pirminio T-ląstelių proliferacinio atsako į homologinius natūralaus viruso "laukinio tipo" apvalkalus. Tačiau buvo gauti papildomi įrodymai, kad 15 vakcina sustiprina ląstelinį imuninį atsaką: atrinktuose vakcinai jautriuose individuose kilo tipų specifiniai citoksiniai T-ląstelių atsakai į ŽIV-IIIB po stiprinančios imunizacijos.

20 Faktoriai, lemiantys imuninį jautrumą vakcinai ŽIV užkrėstuose individuose, ir toliau turi būti tiriami. Net ankstyvoje ŽIV infekcijos stadijoje individai prasčiau reaguoja į įvairias vakcinas, lyginant su kontrole. Toks žemas jautrumas siejamas su ankstyvu B 25 ląstelių išsigimimu ir T ląstelių funkciniais sutrikimais. Čia jautrumas vakcinai buvo susietas su pradiniu CD4 ląstelių kiekiu, kuris atitinka hipotezę, kad imunologinė šeimininko būklė yra svarbi determinantė, sąlygojanti jautrumą vakcinai. Tačiau 30 imunizacijos schema (pagal specifinį T ląstelių kiekio intervalą) irgi turėjo įtakos jautrumui vakcinai: schema B (6 injekcijos) buvo pranašesnė. Iš tiesų, sumažėjęs jautrumas vakcinai, stebėtas individams, turintiems mažesnį CD4 ląstelių kiekį, gali būti 35 sustiprintas, padidinus skiepijimų skaičių. Iš to galima padaryti prielaidą, kad toliau keičiant dozavimą, režimą, adjuvantus ar vaistinę formą galima

5 tikėtis imuninio jautrumo sustiprėjimo. Nors ir buvo susirūpinta, ar saugu ŽIV specifiniais vakcinos produktais aktyviai imunizuoti asmenis, užkrėstus ŽIV, imuninis specifinis toksiškumas nebuvo įrodytas.

10 Kiekybinė kultūros, grandininės polimerazinės DNR reakcijos ir serumo antigeno analizė parodė padidėjusį ŽIV kiekį in vivo. Puikus ŽIV replikacijos in vivo markeris, CD4 ląstelių mažėjimo rodiklis, tinkamai pakito pacientų organizme, ypač tų, kurie laikomi

15 jautriais vakcinai. Vidutinis CD4 ląstelių kiekio pakitimas buvo -0.2 procentai vakcinai jautriems individams ir -7.3 procentai - nejautriems. Duomenys parodė, kad imuninis jautrumas po užsikrėtimo nebuvo susijęs su padidėjusia CD4 ląstelių destrukcija. Buvo padaryta prielaida, kad tai siejasi su padidėjusia HIV replikacija in vivo.

20 Šiose stadijose skiepijimo rezultatai taip pat buvo lyginami su pradiniais duomenimis, gautais iš dešimties užsikrėtusių ir negydytų asmenų, sugrupuotų pagal amžių, etninę grupę ir pradinį CD4 ląstelių skaičių. Vidutinis CD4 ląstelių kiekis šioje tyrimų grupėje sumažėjo 8.7 procentais, individuose, gydytuose pagal schemą A sumažėjo 7.2 procentais ir individuose,

25 gydytuose pagal schemą B išaugo 0.6 procentais. Šie rezultatai rodo, kad skiepijimas rekombinantiniu ŽIV apvalkalo po užsikrėtimo yra galimas. Gauti rezultatai teikia vilčių, kad tokias vakcinas galima naudoti profilaktikoje.

30 Vakcina prieš įgytą imunodeficito sindromą (AIDS), turinti 1 tipo žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV-1) apvalkalo baltymus yra kilusi iš ŽIV-1 apvalkalo geno, klonuoto bakuloviruso-vabzdžių ląstelės vektorinėje

35 sistemoje. Rekombinantiniai ŽIV baltymai yra išgryninti, surinkti į daleles ir adsorbuoti ant aliuminio fosfato adjuvanto. Gauta adsorbuoto

- 5 rekombinantinio ŽIV-1 viruso apvalkalo baltymo forma (vakcina prieš AIDS) yra labai imunogeniška gyvūnams ir skatina antikūnų, prisijungiančių prie ŽIV-1 viruso apvalkalo, gamybą, o taip pat neutralizuoja užkrėtimą virusu testuose *in vitro*. Aukščiau aprašyta vakcina prieš AIDS sukelia naujus humoralinius ir ląstelinis imuninius atsakus ŽIV-užkrėstuose pacientuose ir yra naudinga, kaip gydomoji vakcina, skirta imuninės sistemos irimui išvengti arba jį sulėtinti.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicija, tinkama taikyti farmacijoje individų, užkrėstų žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV) gydymui,
5 b e s i s k i r i a n t i t u o, kad į jos sudėtį įeina:

 rekombinantinis ŽIV apvalkalo baltymas, kurio kiekis pakankamas ŽIV-specifinio ląstelinio ar imuninio humoralinio atsako padidinimui.
10
2. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i t u o, kad rekombinantinis baltymas yra gaminamas bakuloviruso-vabzdžių ląstelės ekspresinėje sistemoje.
- 15 3. Kombinacija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i t u o, kad rekombinantinis baltymas yra apytiksliai 145000 molekulinio svorio.
- 20 4. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i t u o, kad ŽIV apvalkalo baltymas yra bent vienas iš gp160, gp120 ir gp41.
- 25 5. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i t u o, kad rekombinantinis baltymas yra ekspresuojamas bakuloviruso vabzdžių ląstelės vektoriumi Ac3046.
- 30 6. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i t u o, kad rekombinantinis baltymas yra aglomeruojamas į daleles, kurių molekulinis svoris mažiausiai apytiksliai 2000000.
- 35 7. Kompozicija pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n - t i t u o, kad rekombinantinis baltymas jungiamas prie adjuvanto.
8. Kompozicija, tinkama užkrėstų žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV) gydymui, b e s i s k i r i a n t i t u o,

kad į jos sudėtį įeina rekombinantinis ŽIV apvalkalo baltymas ir alumo adjuvantas, kai rekombinantinis baltymas sudaro daleles, kurių molekulinis svoris mažiausiai yra apytiksliai 2000000.

5

9. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n - t i tuo, kad rekombinantinis baltymas yra gaminamas bakuloviruso-vabzdžių ląstelės ekspresinėje sistemoje.

10

10. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n - t i tuo, kad rekombinantinis baltymas yra atrenkamas iš grupės, susidedančios iš rekombinantinio gp160, rekombinantinio gp120, rekombinantinio gp41, rekombinantinio ŽIV apvalkalo baltymo, kurio molekulinis svoris apytiksliai 145000 ir rekombinantinio baltymo, ekspresuoto vektoriuje Ac3046.

15

11. Kompozicija pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n - t i tuo, kad rekombinantinis baltymas sudarytas iš apytiksliai 757 gp160 viena po kitos einančių aminorūgščių ir kuriame visiškai pašalinta apytiksliai 40 viena po kitos einančių galinių aminorūgščių.

20

12. Terapinė vakcinos prieš ŽIV kompozicija, b e - s i s k i r i a n t i tuo, kad į jos sudėtį įeina rekombinantinis ŽIV apvalkalo baltymas ir alumo adjuvantas, kai rekombinantinis baltymas yra aglomeruojamas į daleles, kurių molekulinis svoris mažiausiai apytiksliai 2000000.

25

30

13. Kompozicija pagal 12 punktą, b e s i s k i - r i a n t i tuo, kad rekombinantinio ŽIV apvalkalo baltymo kiekis yra apytiksliai nuo 10 µg iki 4000 µg dozėje.

35

14. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i - r i a n t i tuo, kad rekombinantinis baltymas yra

gaminamas bakuloviruso-vabzdžių ląstelės ekspresinėje sistemoje.

- 5 15. Kompozicija pagal 13 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad rekombinantinis baltymas sudarytas
iš apytiksliai 757 gp160 viena po kitos einančių
aminorūgščių, gp160 baltymas nutrauktas apytiksliai
757 pozicijoje, ir jame visiškai nėra bent
40 gp160 galinių aminorūgščių.

ŽIV-1 GENO IŠSKYRIMAS IR INŽINERIJA

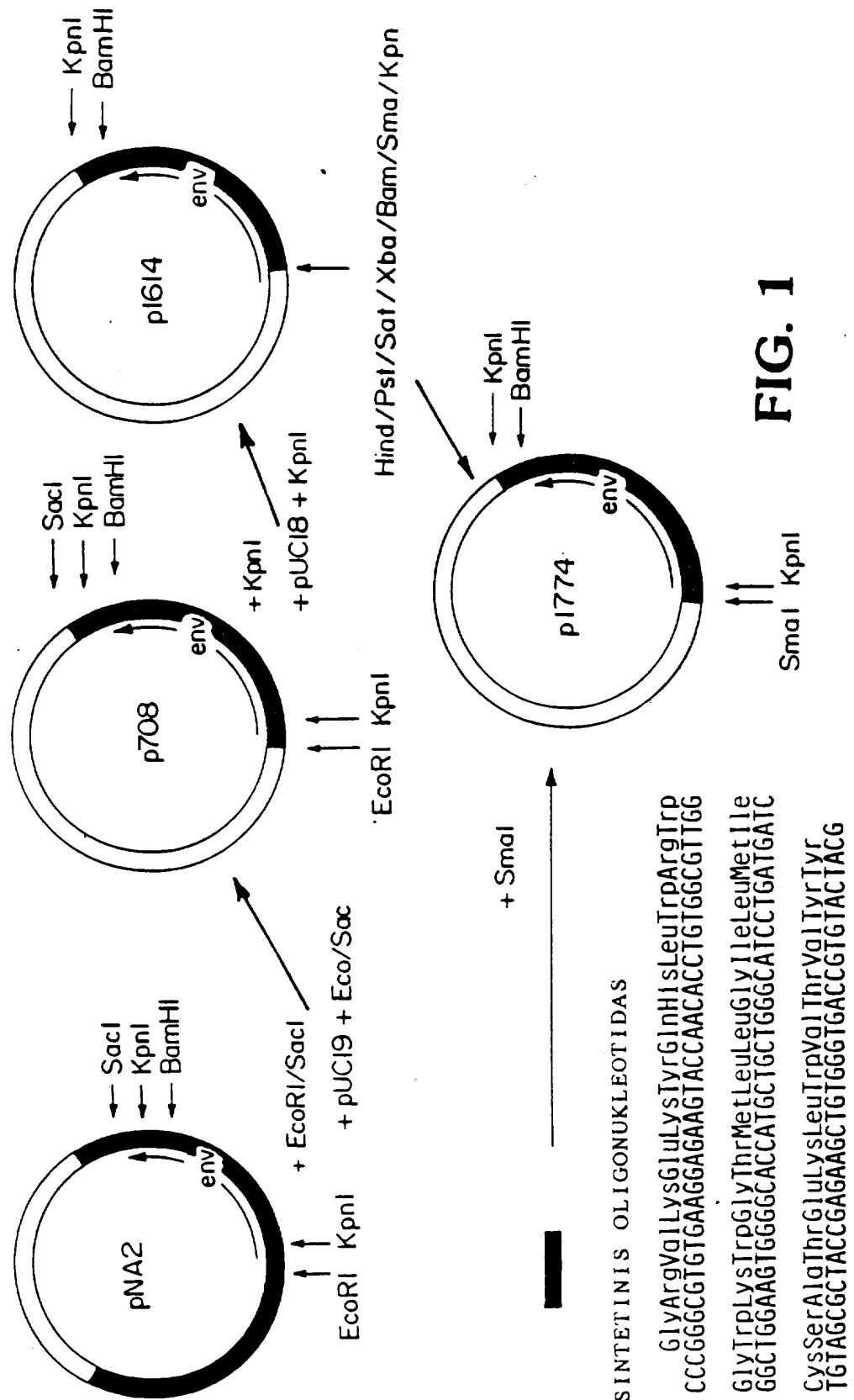


FIG. 1

REKOMBINANTINIO VEKTORIAUS p3046 KONSTRAVIMAS

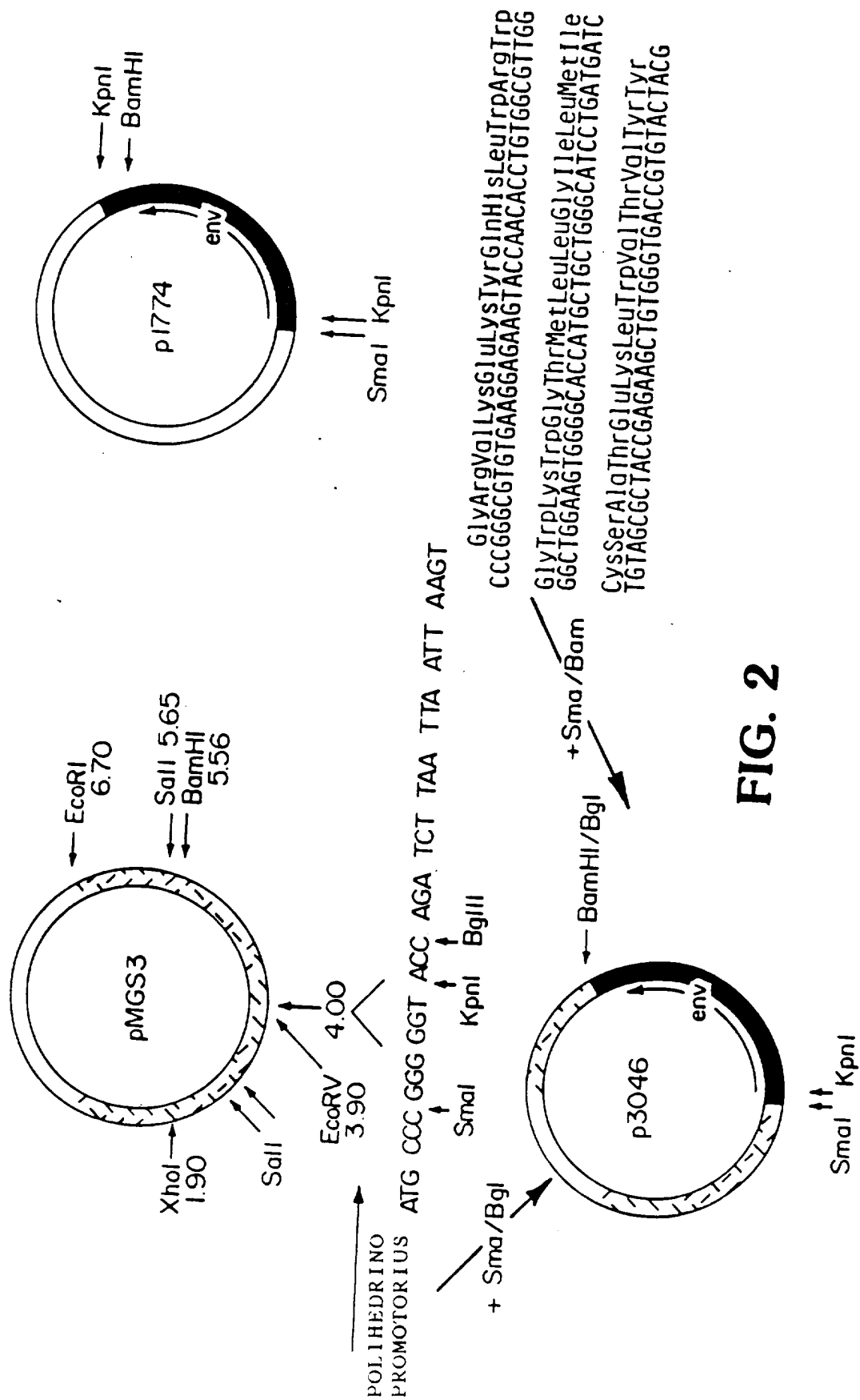


FIG. 2

DNR. SUPANČIOS Ac3046 gp160 KODUOJANČIAS
SEKAS. NUKLEOTIDŲ SEKA

TGCTGATATC ATGGAGATAA TTAAAATGAT AACCATCTCG CAAATAAATA
-100

AGTATTTTAC TGTTTTCGTA ACAGTTTTGT AATAAAAAAA CCTATAAATA
-50

ATG -----/3046/----- TAATTAATTAA GT ACC GAC TCT GCT GAA GAG
+1 +2256

GAG GAA ATT CTC CTT GAA GTT TCC CTG GTG TTC AAA GTA AAG GAG
+2288

TTT GCA CCA GAC GCA CCT CTG TTC ACT GGT CCG GCG TAT TAA
+2333 +2374

FIG. 3

FIG. 4a

Su fermentais:

[illegible]

[illegible]

FIG. 4b

[illegible]

[illegible]

Gene	Position	Sequence	Protein
Nla3	1	ATG	Met
	2	ATG	Met
	3	ATG	Met
	4	ATG	Met
Nla3	5	ATG	Met
	6	ATG	Met
	7	ATG	Met
	8	ATG	Met
Nla3	9	ATG	Met
	10	ATG	Met
	11	ATG	Met
	12	ATG	Met
Nla3	13	ATG	Met
	14	ATG	Met
	15	ATG	Met
	16	ATG	Met
Nla3	17	ATG	Met
	18	ATG	Met
	19	ATG	Met
	20	ATG	Met
Nla3	21	ATG	Met
	22	ATG	Met
	23	ATG	Met
	24	ATG	Met
Nla3	25	ATG	Met
	26	ATG	Met
	27	ATG	Met
	28	ATG	Met
Nla3	29	ATG	Met
	30	ATG	Met
	31	ATG	Met
	32	ATG	Met
Nla3	33	ATG	Met
	34	ATG	Met
	35	ATG	Met
	36	ATG	Met
Nla3	37	ATG	Met
	38	ATG	Met
	39	ATG	Met
	40	ATG	Met
Nla3	41	ATG	Met
	42	ATG	Met
	43	ATG	Met
	44	ATG	Met
Nla3	45	ATG	Met
	46	ATG	Met
	47	ATG	Met
	48	ATG	Met
Nla3	49	ATG	Met
	50	ATG	Met
	51	ATG	Met
	52	ATG	Met
Nla3	53	ATG	Met
	54	ATG	Met
	55	ATG	Met
	56	ATG	Met
Nla3	57	ATG	Met
	58	ATG	Met
	59	ATG	Met
	60	ATG	Met
Nla3	61	ATG	Met
	62	ATG	Met
	63	ATG	Met
	64	ATG	Met
Nla3	65	ATG	Met
	66	ATG	Met
	67	ATG	Met
	68	ATG	Met
Nla3	69	ATG	Met
	70	ATG	Met
	71	ATG	Met
	72	ATG	Met
Nla3	73	ATG	Met
	74	ATG	Met
	75	ATG	Met
	76	ATG	Met
Nla3	77	ATG	Met
	78	ATG	Met
	79	ATG	Met
	80	ATG	Met
Nla3	81	ATG	Met
	82	ATG	Met
	83	ATG	Met
	84	ATG	Met
Nla3	85	ATG	Met
	86	ATG	Met
	87	ATG	Met
	88	ATG	Met
Nla3	89	ATG	Met
	90	ATG	Met
	91	ATG	Met
	92	ATG	Met
Nla3	93	ATG	Met
	94	ATG	Met
	95	ATG	Met
	96	ATG	Met
Nla3	97	ATG	Met
	98	ATG	Met
	99	ATG	Met
	100	ATG	Met
Nla3	101	ATG	Met
	102	ATG	Met
	103	ATG	Met
	104	ATG	Met
Nla3	105	ATG	Met
	106	ATG	Met
	107	ATG	Met
	108	ATG	Met
Nla3	109	ATG	Met
	110	ATG	Met
	111	ATG	Met
	112	ATG	Met
Nla3	113	ATG	Met
	114	ATG	Met
	115	ATG	Met
	116	ATG	Met
Nla3	117	ATG	Met
	118	ATG	Met
	119	ATG	Met
	120	ATG	Met
Nla3	121	ATG	Met
	122	ATG	Met

M	b	o	2	ACT	TGA	T ^{hr}	420
TTG	AAG	AAT	GAT	CTA	Asp	140	
AAC	TTC	TTA					
Leu	Lys	Asn					

FIG. 4d

FIG. 4e

[illegible]

[illegible]

LT 3365 B

1095

[illegible]

GAA	TTT	TTC	TAC	TGT	AAT	TCA	ACA	CAA	CTG	TTT	AAT	AGT	ACT	TGG
CTT	AAA	AAG	ATG	ACA	TTA	AGT	TGT	GTT	GAC	AAA	TTA	TCA	TGA	ACC
Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Ser	Thr	Gln	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr	Trp
				385					390					395

[illegible]

FIG. 4j

ACC 1200
Trp 400

[illegible]

FIG. 41

1441

55

M b O 2

A S S

F u u 4 H

[illegible]

FIG. 40

[illegible]

	M	SS	MB	
	m	et	as	
	e	cy.	em.	
	l	ll	ll	
		—		
	GCT	CCT	AAT	GCT
	CGA	GGA	TTA	CGA
	Ala	Pro	Asn	Ala
	GTG			
	CAC	ACC	AGT	TGG
	Val	Trip	TCA	ACC
			Ser	Tip
	ACT		AAT	AGT
	TGA		TTA	TCA
	Thr		Asn	Ser
			AAA	TCT
			TTT	AGA
			Lys	Ser
			CTG	
			GAC	
			Leu	
			GAA	
			CTT	
			Glu	
			620	
1816			615	
			610	

[illegible][illegible]

FIG. 4p

FIG. 4q

[illegible]

2104	CTT	TCT	ATA	GTG	AAT	AGA	GTT	AGG	CAG	GGA	TAT	TCA	CCA	TTA	TCG
	GAA	AGA	TAT	CAC	TTA	TCT	CAA	TCC	GTC	CCT	ATA	AGT	GGT	AAT	AGC
	Leu	Ser	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Arg	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ser
				705					710					715	
H P h l															
	TTT	CAG	AAC	CAC	CTC	CCA	ATC	CCG	AGG	GGA	CCC	GAC	AGG	CCC	GAA
	AAA	GTC	TGG	GTG	GAG	GGT	TAG	GGC	TCC	CCT	GGG	CTG	TCC	GGG	CTT
	Phe	Gln	Thr	His	Leu	Pro	Ile	Pro	Arg	Gly	Pro	Asp	Arg	Pro	Glu
				720					725					730	
P S a u 9 6 3															
	GGA	ATA	GAA	GAA	GAA	GGT	GGA	GAG	AGA	GAC	GAG	CTG	TCC	Pro	Glu
	CCT	TAT	CTT	CTT	CTT	CCA	CCT	CTC	TCT	CTG	Pro	Asp	Arg	Pro	Glu
	Gly	Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Arg	Asp	Pro	Asp	Arg	Pro	Glu
				735					740						
M b o 2															

FIG. 4r

Fig. 4t

ATVIRO SKAITYMO RĖMELIO BAZIŲ SKAIČIUS: 2256

AMINO RŪGŠČIŲ KODONŲ SKAIČIUS: $\square 2256 \div 3 \square 752$

AMINO RŪGŠTIS	SKAIČIUS	SVORIS	VISO
GLY -	53	75.1	3,980.3
GLU -	41	147.1	6,031.1
ASP -	25	133.1	3,327.5
VAL -	48	117.1	5,620.8
ALA -	38	89.1	3,385.8
ARG -	39	174.1	6,793.8
SER -	28	105.1	2,942.8
LYS -	42	146.2	6,140.4
ASN -	58	132.1	7,661.8
MET -	17	149.2	2,536.4
ILE -	57	131.2	7,478.4
THR -	53	119.1	6,312.3
TRP -	26	204.2	5,309.2
CYS -	21	121.2	2,545.2
TYR -	16	181.2	2,899.2
LEU -	61	131.2	8,003.2
PHE -	25	165.2	4,130.0
SER -	26	105.1	2,732.6
GLN -	38	146.2	5,555.6
HIS -	11	155.2	1,707.2
PRO -	29	115.1	3,337.9
VISO	752		98,431.5 -H ₂ O (752 x 18)

Bendras nustatytas neglikozilintų polipeptidų svoris = 84,895.5

Bendras glikozilinimo saitų skaičius

28 x 2100 (svoris, tenkantis vienam oligosacharidui)

Bendras nustatytas gp160 molekulinis svoris = 84,895.5 + 58800
= 143,695.5

Fig. 5a

Seka ir atitinkami kodonai viršutinėse eilutėse yra numatyti iš inžinerijos ir Wain-Hobson et al. (1985). Seka, pateikta kiekvienos eilutės apačioje yra Ac3046 seka iš rekombinantinės virusinės DNR.

[illegible]

Fig. 5c

Ala GCA 	Phe TTT C Phe	Phe TTT 	Tyr TAT 	Lys AAA 	Leu CTT 	Asp GAT 	Ile ATA 	Ile ATA G Val	Pro CCA 	Ile ATA 	Val GAT 	Asn AAT 	Asp GAT ACT (-----)	Thr ACT 	6802
Thr ACC 	Ser AGC 	Tyr TAT 	Thr ACG G Arg	Leu TTG 	Thr ACA T Ile	Ser AGT 	Cys TGT 	Asn AAC 	Thr ACC 	Ser TCA 	Val GTC 	Ile ATT 	Thr ACA 	Gln CAG 	6847
Ala GCC 	Cys TGT 	Pro CCA 	Lys AAG 	Val GTA 	Ser TCC 	Phe TTT 	Glu GAG 	Pro CCA 	Ile ATT 	Pro CCC 	Ile ATA 	His CAT 	Tyr TAT 	Cys TGT 	6892
Ala GCC 	Pro CCG 	Ala GCT 	Gly GGT 	Phe TTT 	Ala GCG 	Ile ATT 	Leu CTA 	Lys AAA 	Cys TGT 	Asn AAT 	Asn AAT 	Lys AAG 	Thr ACG 	Phe TTC 	6937
Asn AAT 	Gly GGA 	Thr ACA 	Gly GGA 	Pro CCA 	Cys TGT 	Thr ACA 	Asn AAT 	Val GTC 	Ser AGC 	Thr ACA 	Val GTA 	Gln CAA 	Cys TGT 	Thr ACA 	6982
His CAT 	Gly GGA 	Ile ATT C Ile	Arg AGG 	Pro CCA 	Val GTA 	Val GTA 	Ser TCA 	Thr ACT 	Gln CAA 	Leu CTG 	Leu CTG 	Leu TTG A Leu	Asn AAT 	Gly GGC 	7027

Fig. 5e

[illegible]

270	Ser	Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Arg	Ser	Ala	Asn	Phe	Thr	7072
	AGT	CTA	GCA	GAA	GAA	GAG	GTA	GTA	ATT	AGA	TCT	GCC	AAT	TTC	ACA	
						T										
						Asp										
290	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Val	Gln	Leu	Asn	Gln	Ser	Val	Glu		7117
	GAC	AAT	GCT	AAA	ACC	ATA	GTA	CAG	CTG	AAC	CAA	TCT	GTA	GAA		
											AC			GAA		
											Thr					
310	Ile	Asn	Cys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Arg		7162
	ATT	AAT	TGT	ACA	AGA	CCC	AAC	AAT	ACA	AGA	AAA	AGT	ATC	CGT		
330	Ile	Gln	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Thr	Ile	Gly	Lys	Ile		7207
	ATC	CAG	AGG	GGA	CCA	GGG	AGA	GCA	TTT	ACA	ATA	GGA	AAA	ATA		
350	Gly	Asn	Met	Arg	Gln	Ala	His	Cys	Asn	Ile	Ser	Arg	Ala	Lys	Trp	7252
	GGA	AAT	ATG	AGA	CAA	GCA	CAT	TGT	AAC	ATT	AGT	AGA	GCA	AAA	TGG	
370	Asn	Ala	Thr	Leu	Lys	Gln	Ile	Ala	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Phe	7297
	AAT	GCC	ACT	TTA	AAA	CAG	ATA	GCT	AGC	AAA	TTA	AGA	GAA	CAA	TTT	
7342	Gly	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe	Lys	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	
	GGA	AAT	AAT	AAA	ACA	ATA	ATC	TTT	AAA	CAA	TCC	TCA	GGA	GGG	GAC	

Fig. 5d

Asp GAT 	Met ATG 	Arg AGG 	Arg GAC 	Asn AAT 	Trp TGG 	Arg AGA 	Ser AGT 	Glu GAA 	Leu TTA 	Tyr TAT 	Lys AAA 	Tyr TAT 	Lys AAA 	Val GTA 	7702
Val GTA 	Lys AAA 	Ile ATT 	Glu GAA 	Pro CCA 	Leu TTA 	Gly GGA 	Val GTA 	Ala GCA 	Pro CCC 	Thr ACC 	Lys AAG 	Ala GCA 	Lys AAG 	Arg AGA 	7747
Arg AGA 	Val GTG 	Val GTG 	Gln CAG 	Arg AGA 	Glu GAA 	Lys AAA 	Arg AGA 	Ala GCA 	Val GTG 	Gly GGA 	Ile ATA 	Gly GGA 	Ala GCT 	Leu TTG 	7792
gion Phe TTC 	Leu CTT 	Gly GGG 	Phe TTC 	Leu TTG 	Gly GGA 	Ala GCA 	Ala GCA 	Gly GGA 	Ser AGC 	Thr ACT 	Met ATG 	Gly GGC 	Ala GCA 	Arg CGG 	7837
Ser TCA 	Met ATG 	Thr ACG 	Leu CTG 	Thr ACG 	Val GTA 	Gln CAG 	Ala GCC 	Arg AGA 	Gln CAA 	Leu TTA 	Leu TTG 	Ser TCT 	Gly GGT 	Ile ATA 	7882
Val GTG 	Gln CAG 	Gln CAG 	Gln CAG 	Asn AAC 	Asn AAT 	Leu TTG 	Leu CTG 	Arg AGG 	Ala GCT 	Ile ATT 	Glu GAG 	Ala GCG 	Gln CAA 	Gln CAG 	7927
His CAT 	Leu CTG 	Leu TTG 	Gln CAA 	Leu CTC 	Thr ACA 	Val GTC 	Trp TGG 	Gly GGC 	Ile ATC 	Lys AAG 	Gln CAG 	Leu CTC 	Gln CAG 	Ala GCA 	7972

Fig. 5f

FIG. 6

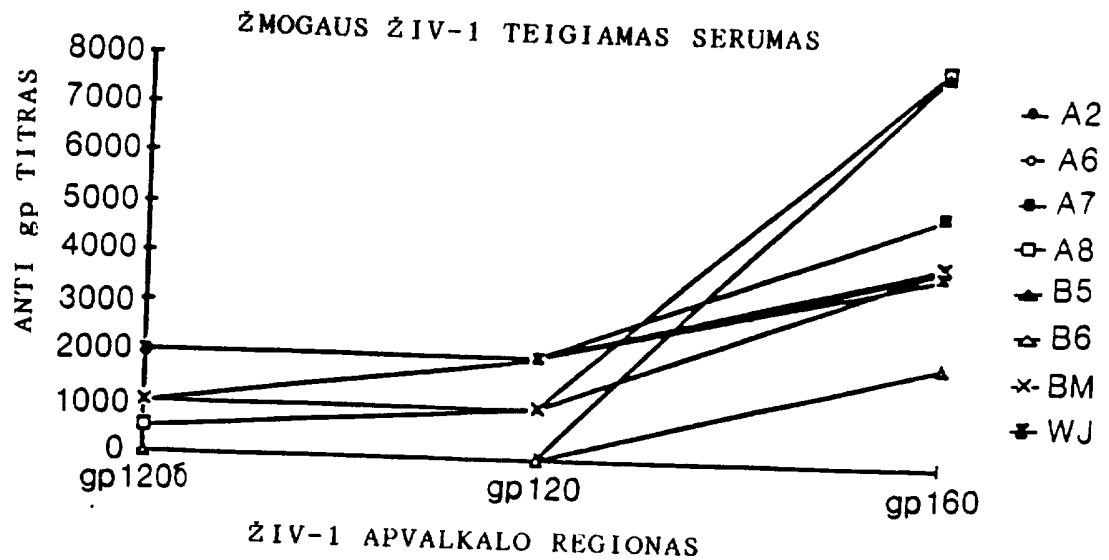


FIG. 6a

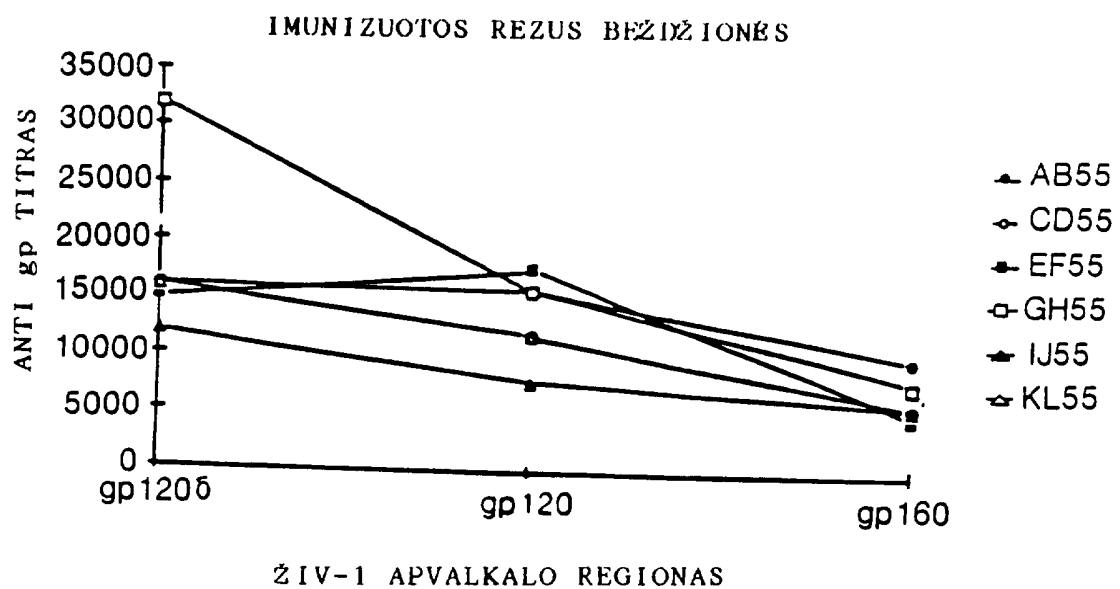


FIG. 7a

Bendras imuninis atsakas, kurį indukuoja gp160 vakcina

Ląstelinis atsakas

T-ląstelių Proliferacija

Pacientas Grupė Humoralinis antikūnų atsakas į specifinius epitopus

Bendras gp160

(peak I.S.I)

735

582

448

422

342

308

300

254

241

106

88

49

+

+

+

+

+

+

JAUTRŲS INDIVIDAI

8

15

17

SCHEMA A

10

20

22

1

3

16

19

6

7

13

28

32

11

23

29

33

SCHEMA B

2

2

2

2

4

4

4

4

4

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

1

5

5

5

2

2

2

2

4

4

4

4

4

4

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

6

1

1

FIG. 7b

Pacientas Grupė		Humoralinis antikūnų atsakas į specifinius epitopus				T-ląstelių proliferacija				Ląstelinis atsakas			
		49	88	106	241	254	300	308	342	422	448	582	735 Bendras gp160peak I.SI)
NEJAUTRŲS INDIVIDAI													
SCHEMA A	2	1	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	.
	18	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	.
	5	3	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	.
	12	3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	.
	14	3	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	.
	21	3	-	+	hb	-	+	hb	-	-	+	+	.
	35	3	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	.
	27	5	-	+	-	-	+	nd	-	-	-	+	(10)
	31	5	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	.
SCHEMA B	4	2	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	.
	24	6	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	(28)

FIG. 8a

VAKCINOS INDUKUOTI ANTIKŪNAI
PRIEŠ SPECIFINIUS ŽIV APVALKALO EPITOPUS

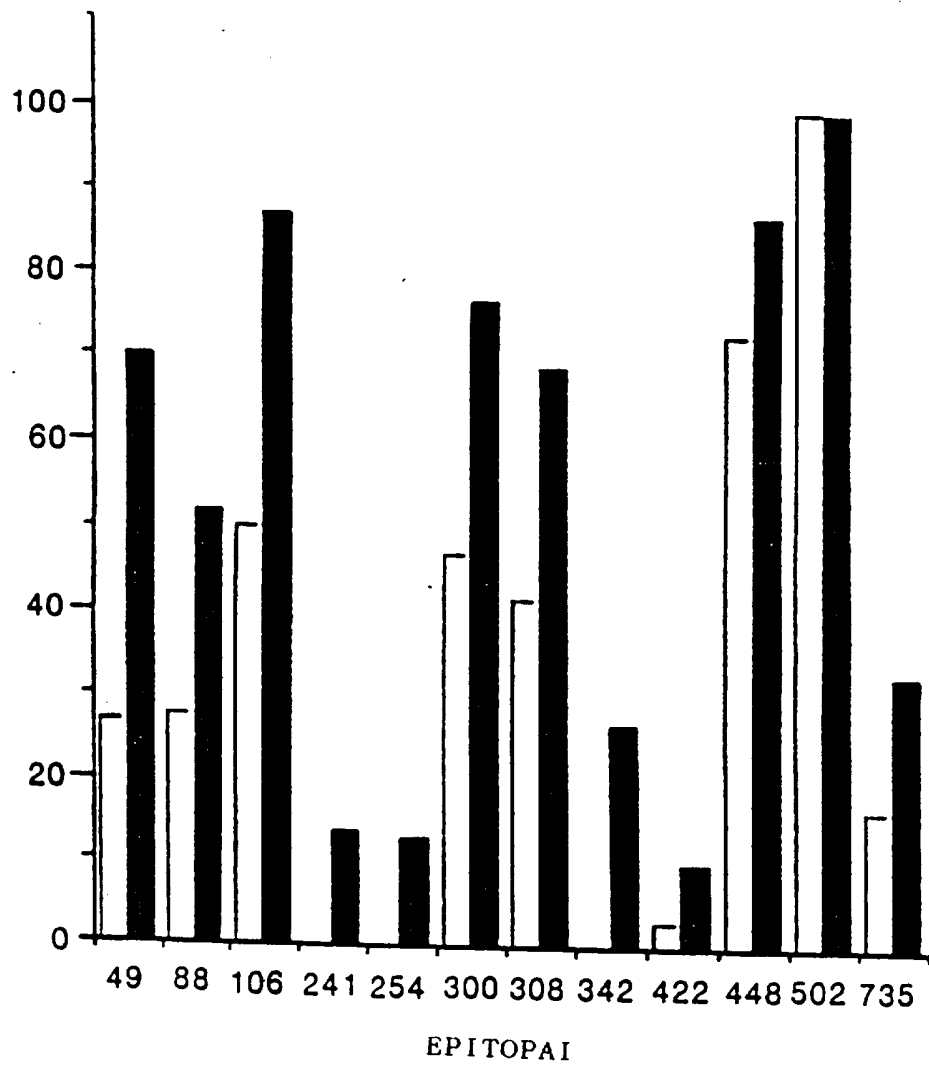


FIG. 8b

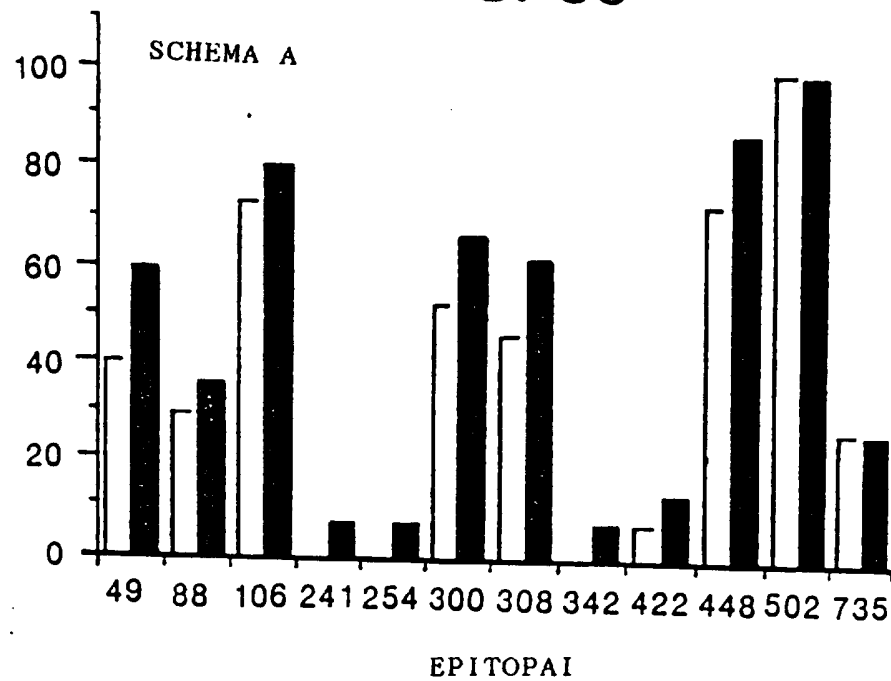
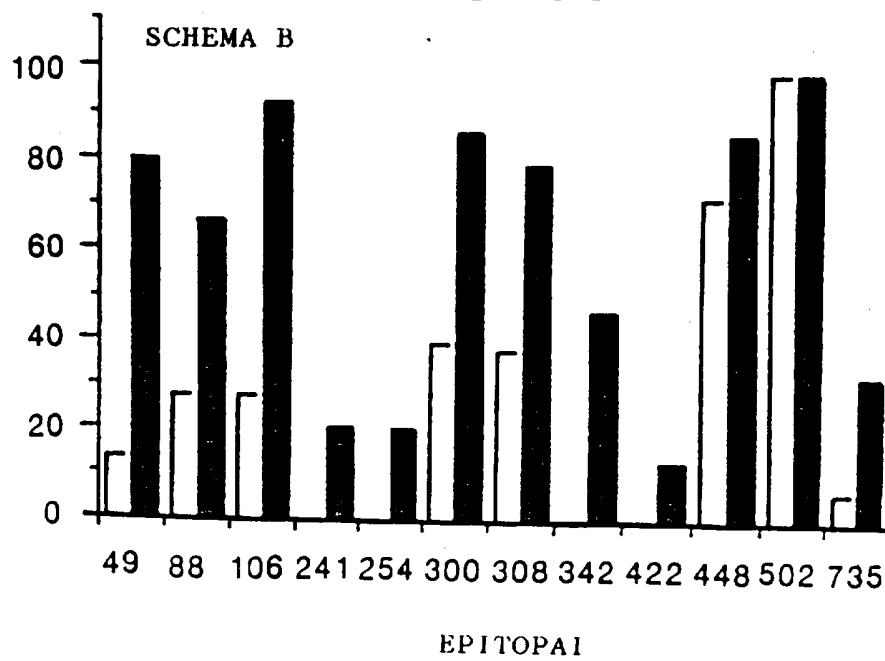


FIG. 8c



Vakcinos sukeltas T-ląstelių proliferacinis atsakas į gp160

FIG. 9a

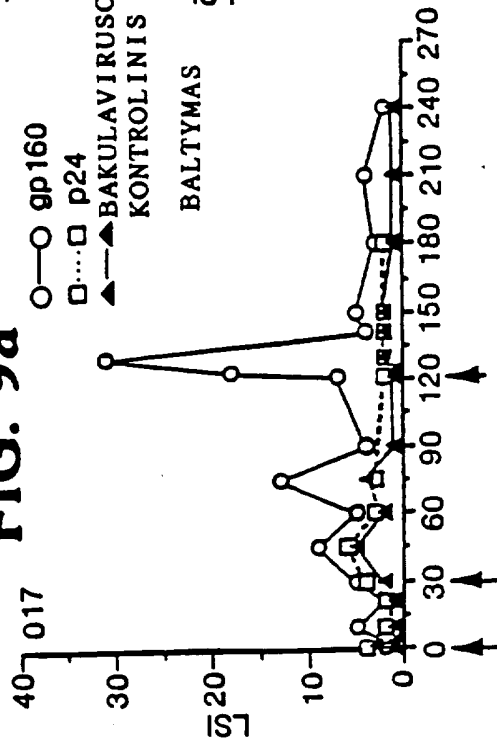
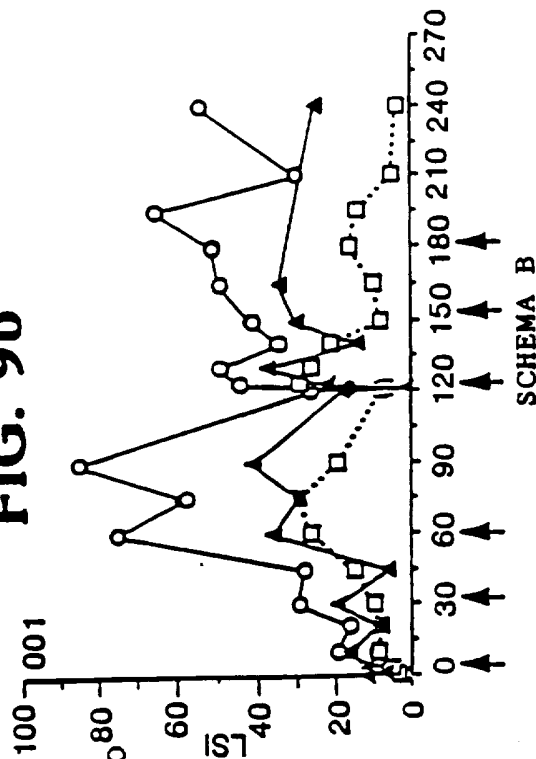
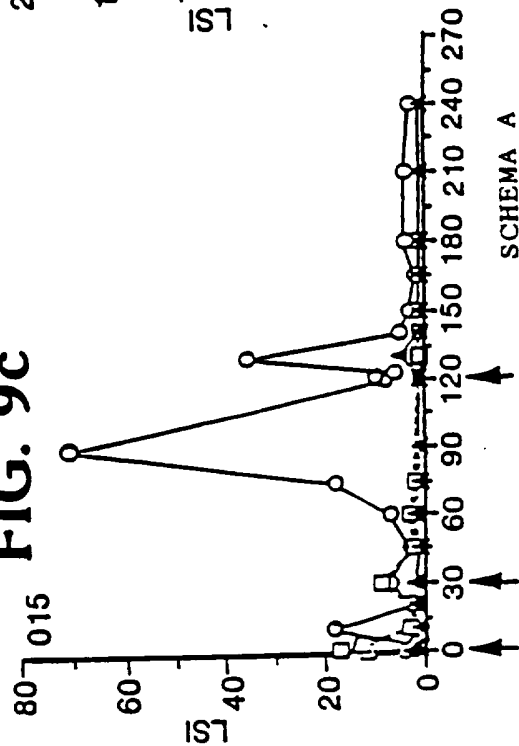


FIG. 9b



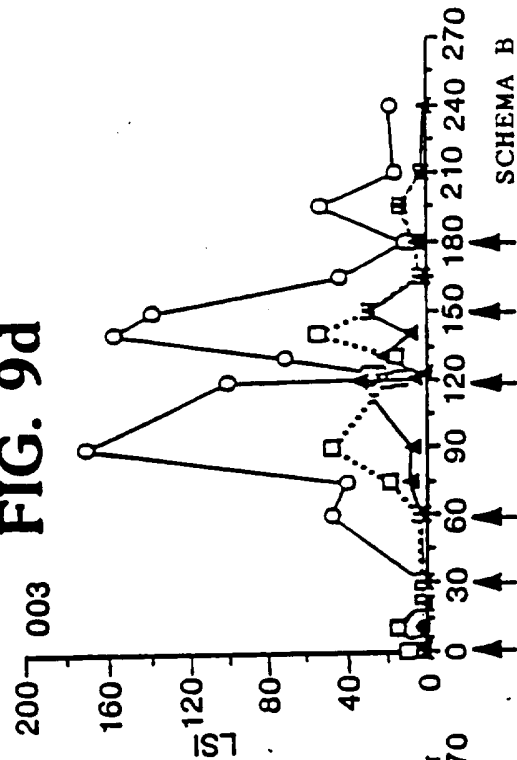
SCHEMA A

FIG. 9c



SCHEMA A

FIG. 9d



SCHEMA B

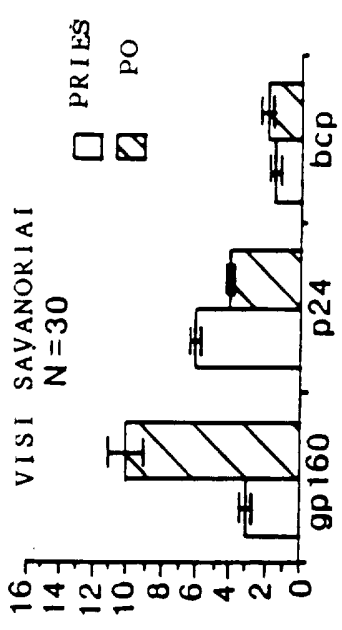


FIG. 10a

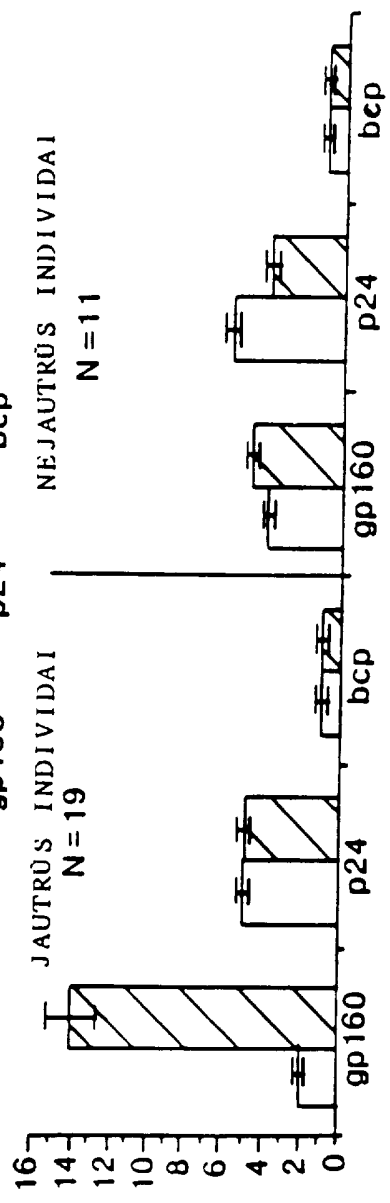


FIG. 10b

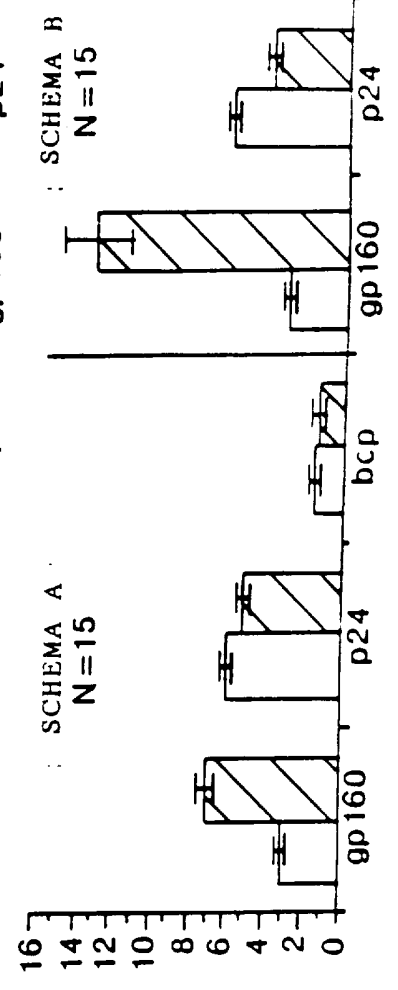


FIG. 10c

FIG. 11

