

(19)



(10)

LT 4308 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4308**

(51) Int. Cl.⁶: **C07K 14/00**

(21) Paraiškos numeris: **97-115**

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 07 04**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 11 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1998 03 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/15433**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 11 29**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 07 04**

(31, 32, 33) Prioritetas: **351001, 1994 12 07, US**

(72) Išradėjas:

Syamal Raychaudhuri, US
William H. Rastetter, US

(73) Patento savininkas:

IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, 11011 Torreyana Road,
San Diego, California 92121-1104, US

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Citotoksinių T-limfocitų atsakų indukavimas

(57) Referatas:

Išradime aprašomi būdai ir kompozicijos, kurios gali būti naudojamos citotoksinių T-limfocitų (CTL) atsakų žmonėse, bei prijaukintuose arba žemės ūkio gyvuliuose indukavimui. Būdas apima antigeno, į kurį norima gauti CTL atsaką pateikimo stadiją, ir pateikimą antigeno kompozicijos, į kurią įeina, kuri susideda arba kuri iš esmės susideda iš dviejų arba daugiau stabilizuojančių detergentų, micelės sudarančio agento ir alyvos. Pageidautina, kad antigeno kompozicijoje nebūtų imunostimuliuojančio peptido komponento, arba kad tokio komponento kiekis būtų pakankamai mažas, kad norimas CTL atsakas nebūtų sumažintas. Ši kompozicija pateikiama stabilios "alyva-vandenyje" emulsijos pavidalu.

Išradimo kilmė

Neįregistruoti Syamal Raychaudhuri ir William H. Rastetter U.S.patentai No. 08/919787 (paduotas 1992 m. liepos 24 d.) ir U.S. No. 07/735069 (paduotas 1991 m. liepos 25 d.), abu pavadinti "Citotoksinių T-limfocitų atsakų indukcija" (dabar jų atsisakyta) šiame išradime yra duodami kaip literatūros šaltiniai. Šis išradimas yra susijęs su metodais ir kompozicijomis, kurios yra naudingos citotoksinių T-ląstelių tarpininkaujamų atsakų indukcijai žmonėse ir prijaukintuose ar žemės ūkio gyvuliuose.

Manoma, kad citotoksiniai T-limfocitai (CTL) yra pagrindinis šeimininko apsaugos mechanizmas prieš įvairias virusines infekcijas ir neoplazminį ar vėžinį auglį. Šios ląstelės pašalina infekuotas arba transformuotas ląsteles, atpažindamos antigeninius fragmentus, susijusius su įvairiomis molekulėmis (vadinamomis I klasės MHC molekulėmis) ant infekuotų ar transformuotų ląstelių. CTL gali būti indukuojami eksperimentiškai, į specifinių ląstelių citoplazmą įvedant tam tikrus tirpius antigenus. Paprastai citotoksinių T-limfocitų indukcijai vien tik imunizacijos tirpiu antigenu nepakanka.

Vienas metodas, pagal kurį gali būti indukuojamas CTL atsakas, apima rekombinantinės technikos panaudojimą, norint įvesti aptariamus kritinius antigeno komponentus į palankios infekcijos agento genomą. Tokios strategijos tikslas yra generuoti antigenui specifinius citotoksinio T-limfocito atsakus į norimą epitopą, sukeliant šeimininkui silpną savilimituojančią infekciją. Buvo aprašyti chimeriniai vektoriai, naudojant karvių raupų virusą, poliomelito virusą, adeno- ir retrovirusus bei bakterijas, tokias kaip *Listeria* ir BCG. Pavyzdžiui, Takahashi ir kt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3105 (1988) aprašo rekombinantinį karvių raupų virusą, ekspresuojantį ŽIV gp160 flankuojantį geną, kuris gali būti potencialiai naudojamas indukuojant citotoksinius T-limfocitus.

Kitas metodas, kuriuo gali būti indukuojamas ląstelių tarpininkaujamas atsakas, apima stimuliatorių panaudojimą. Kadangi šioje srityje yra daug diskusijų apie stimuliatorių panaudojimą, neaišku, ar yra indukuojamas ląstelių tarpininkaujamas imuniškumas, ir ar toks ląstelių tarpininkaujamas imuniškumas apima ir citotoksinių T-limfocitų atsaką. Tačiau, kaip matyti iš tolimesnio aprašymo, įvairiose publikacijose atstovaujamas šis požiūris.

Naudodami rekombinantinį BCG, kuris turi β -galaktozidazės geną, Stover ir kt., *Nature* 351, 456 (1991) aprašo CTL atsaką į β -galaktozidazę (šis darbas nelaikomas šios paraiškos pirmtaku). Naudodami nepilną Freundo stimuliatorių ir β -galaktozidazę, tokio atsako nepastebėjo.

Mitchell ir kt., *J. Clinical Oncology* 8, 856 (1990) (šis darbas nelaikomas šio išradimo pirmtaku) aprašo pacientų su metastastine melanoma gydymą stimulatoriumi, vadinamu "DETOX", ir alogeninės melanomos lizatais, įvedamais penkis kartus šešių savaičių laikotarpyje. Buvo pastebėtas citolitinių T-ląstelių pagausėjimas nedidelėje pacientų grupėje. Autoriai aprašo, kad yra reikalinga pakelti citotoksinių T-limfocitų gaminimosi lygį ir siūlo stimulatoriaus su interleukinu-2 kombinuotą terapiją bei išankstinį veikimą ciklofosfamidu tam, kad būtų sumažinatas galinčių egzistuoti augliui specifinių T-supresorinių ląstelių lygis. DETOX sudaro detoksikuotas endotoksinas (monofosforil-lipidas A) iš *Salmonella minnesota*, *Micobacterium phlei* ląstelių sienelių griaučiai, skvaleno aliejus ir emulgiklis.

Allison ir Gregoriadis, *Immunology Today* 11, 427 (1990) (šis darbas nėra šio išradimo pirmtakas) pažymi, kad vienintelis žmogaus vakcinose "leistas naudoti" aliuminio druskų (alum) stimulatorius nevisada sukelia ląstelių tarpininkaujamą imuniškumą. Allison ir Gregoriadis rašo "todėl yra poreikis vystyti adjuvantus, pasižyminčius pilnojo Freundo stimulatoriaus efektyvumu, tačiau neturinčius jo pašalinių efektų, tokių kaip granulomos". Jie tęsia mintį, kad egzistuoja trys galimos strategijos, pavyzdžiui, liposomų naudojimas; stimuliatorių, vadinamų imunostimuliuojančiais kompleksais (ISCOM), į kuriuos įeina saponinas arba Quil

A (triterpenoidas su dviem karbohidratų grandinėmis), cholesterolis ir fosfatidilcholinai), kuri yra leidžiama naudoti vakcinose prieš gripą arkliams, naudojimas (Morein ir kt., *Immunological Adjuvants and Vaccines*, Plenum Press, 1953); ir emulsijų (SAF), sudarytų iš skvaleno arba skvalano (su arba be pluroninio agento) ir muramilo dipeptido (MDP), naudojimas. Teigiama, kad SAF sukelia ląstelių tarpininkaujamą imuniškumą pelėse, tačiau "ilgai buvo manoma, kad antigenų subvienetai negali sukelti citotoksinių T-ląstelių (CTL) atsakų".

Takahashi ir kt., *Nature* 344, 873 (1990) aprašo II klasės restriktuotų helperių ir citotoksinių T-limfocitų indukciją, naudojant ISCOM vienkartinę subkutaninę imunizaciją pelėse. Jie konstatuoja, kad Freundo stimulatoriaus, nepilnojo Freundo stimulatoriaus ir fosfato buferio su NaCl tirpalas neindukuoja citotoksinių T-limfocitų aktyvumo prieš jiems skirtus taikinius. Pažymima, kad, skirtingai nuo rezultatų su kitomis egzogeninio tirpaus baltymo antigeno formomis, jie parodė, kad, imunizuojant egzogeniniu intaktiniu baltymu ir naudojant ISCOM, galima aktyvuoti antigenui specifinius I MHC klasės restriktuotų $CD8^+ CD4^+$ CTL. Jie taip pat pažymi, kad aprašyti eksperimentai su ISCOM turinčiais ŽIV baltymais rodo žmogaus CTL gavimo galimybę, o ISCOM turinčios vakcinos gali pasiekti ilgai ieškotą CTL ir antikūnų indukcijos išvalytu baltymu tikslą.

Byars ir Allison, *Vaccines* 5, 223 (1987) aprašo SAF-1, susidedančio iš TWEEN 80, PLURONIC L121 ir skvaleno arba skvalano, su arba be muramilo dipeptido, naudojimą ir teigia, kad jų duomenys rodo, kad kompozicija su muramilo dipeptidu bus naudinga žmonių ir veterinarinėms vakcinoms gauti. Pakartotinės stimulatoriaus injekcijos buvo vykdomos be muramilo dipeptido. Teigiama, kad muramilo dipeptidas labai padidina antikūnų gaminimąsi, lyginant su tuo, kai yra naudojamas stimulatorius be muramilo dipeptido. Ląstelių tarpininkaujamas imuniškumas buvo matuojamas kaip uždelsto tipo hiperjautrumas, panaudojant odos testus, norint nustatyti T-helperių ląstelių indukciją. Toks hiperjautrumas buvo stipresnis ir ilgesnis, kai muramilo dipeptidas buvo stimulatoriaus sudėtyje. Panašius stimulatorius aprašė Allison ir kt. (US patentas 4770874, kuriame

konstatuojama, kad muramilo dipeptido ir pliuroninio poliolio kombinacija iš esmės sukelia stiprų ląstelių tarpininkaujamą ir humoralinį atsaką prieš kiaušinio albuminą); Allison ir kt. (US patentas 4772466); Murphy-Corb ir kt., *Science* 246, 1293 (1989) (konstatuojama, kad kombinuotų su muramilo dipeptidu stimuliatorių naudojimas gali padidinti tiek humoralinio, tiek ląstelinio imuninio atsako indukciją); Allison ir Byars, *Vaccines* 87, 56 (1987) (pažymima, kad SAF (su muramilo dipeptidu) sukelia ląstelių tarpininkaujamą imuniškumą, kas buvo parodyta pagal uždelsto tipo hiperjautrumą, T-ląstelių proliferatinius atsakus į antigeną, interleukino-2 gaminimąsi ir specifinę genetiškai apribotą nešančių imunizuojantį antigeną taikinio ląstelių lizę); Allison ir Byars, *Immunopharmacology of Infectious Diseases: Vaccine Adjuvants and Modulators of Non-Specific Resistance* 191-201 (1987); Morgan ir kt., *J. Medical Virology* 29, 74 (1989); Kenney ir kt., *J. Immunological Methods* 121, 157 (1989); Allison ir Byars, *J. Immunological Methods* 95, 157 (1986) (parodyta, kad aliuminio druskos ir mineralinių aliejų emulsijos padidina antikūnų formavimąsi, bet ne ląstelių tarpininkaujamą imuniškumą; o ląstelių tarpininkaujamą imuniškumą sukelia muramilo dipeptido kompozicijos); Byars ir kt., *Vaccines* 8, 49 (1990) (konstatuojama, kad jų stimuliatorių kompozicija žymiai padidina humoralinius atsakus ir mažesniu laipsniu padidina ląstelių tarpininkaujamą reakcijas į gripo hemagliutinino antigeną); Allison ir Byars, *Molecular Immunology* 28, 279 (1991) (šis darbas nėra šio išradimo pirmtakas) (konstatuojama, kad muramilo dipeptido funkcija yra susijusi su citokinų ekspresijos indukcija, pagrindinių histosuderinamumo (MHC) genų ekspresijos padidinimu; jie taip pat pažymi, kad gavo geresnius antikūnų ir ląstelinius atsakus negu su kitais stimulatoriais, ir tikisi nustatyti, ar panaši strategija yra veiksminga žmonėms); Allison ir Byars, *Technology Advances in Vaccine Development* 401 (1988) (aprašomas ląstelių tarpininkaujamasis imuniškumas, naudojant SAF); Epstein ir kt., *Advance Drug Delivery Reviews* 4, 223 (1990) (pateikiama įvairių stimuliatorių, naudojamų vakcinų preparatuose, apžvalga); Allison ir Byars *J. Immunological Methods* 95, 157 (1986) (pažymima, kad muramilo dipeptido pridėjimas į

stimuliatorių labai padidina ląstelių tarpininkaujamus atsakus į daugybę antigenų, įskaitant monokloninius imunoglobulinius ir virusinius antigenus); ir Morgan ir kt., *J. Medical Virology* 29, 74 (1989) (aprašomas SAF-1 panaudojimas vakcinoms prieš Epstein-Barr virusą gauti).

Kwak ir kt., *Idiotypic Networks in Biology and Medicine*, Elsevier Science Publishers, p. 163 (1990) (šis darbas nėra šio išradimo pirmtakas) aprašo SAF stimulatoriaus be muramilo dipeptido panaudojimą B-ląstelių limfomos idiotipui žmonėse. Konkrečiau, emulsija, sudaryta iš Pluronic L121, skvalano ir 0,4% TWEEN 80 fosfato buferio su NaCl tirpale, buvo įvedama su idiotipu. Jie rašo, kad "stimulatoriaus pridėjimas gali toliau padidinti... humoralinius atsakus, o taip pat palengvinti ląstelių atsakų indukciją".

Kiti imunologiniai preparatai apima liposomas (Allison ir kt., US patentai 4053585 ir 4117113); ciklinius peptidus (Dreesman ir kt., US patentas 4778784); pilnąjį Freundo stimuliatorių (Asherson ir kt., *Immunology* 22, 465 (1972); Berman ir kt., *International J. Cancer* 2, 539 (1967); Allison, *Immunopotential* 18, 73 (1973); ir Allison, *Non-Specific Factors Influencing Host Resistance* 247 (1973)); ISCOM (Letvin ir kt., *Vaccines* 87, 209 (1987)); stimulatorius, turinčius nejoninių blok-polimerų agentus, suformuotus kartu su mineraline alyva, paviršiaus aktyviu agentu ir TWEEN 80 (Hunter ir Bennett, *J. Immunology* 133, 3167 (1984); ir Hunter ir kt., *J. Immunology* 127, 1244 (1981)); stimulatorius, sudarytus iš mineralinės alyvos, emulgiklio ir su arba be užmuštų mikobakterijų (Sanchez-Pescador ir kt., *J. Immunology* 141, 1720 (1988)); ir kitus stimulatorius, tokius kaip muramilo dipeptido lipofiliniai dariniai ir rekombinantiniai baltymai su prijungtu muramilo dipeptidu (*id.*).

Išradimo santrauka

Pareiškėjas išrado saugų ir naudingą būdą bei kompozicijas, kuriomis žmonėse ir prijaukintuose ar žemės ūkio gyvuliuose gali būti indukuojami CTL

atsakai. Būdas apima turinčių nedidelį toksiškumą gyvuliams arba visai neturinčių toksiškumo antigeno kompozicijų naudojimą. Šios kompozicijos savo sudėtyje neturi imunostimuliuojančio peptido (pvz., muramilo dipeptido), kurio buvimas gali sumažinti norimą ląstelinį atsaką. Be to, šią metodiką paprasta naudoti ir ji nereikalauja papildomo darbo rekombinantinės-DNR metodu *in vivo*, kurio metu egzistuojančių ląstelių antigeniškumas didėja. Šis išradimas yra nelauktas, nes nesitikėta, kad su tokia antigeno kompozicija, kurioje nėra imunostimuliuojančių arba jiems ekvivalentiškų peptidų, galima indukuoti CTL atsakus. Pareiškėjo atradimai tokias antigeno kompozicijas leidžia naudoti įvairių ligų atveju, o taip pat ir kaip profilaktinį agentą. Pavyzdžiui, antigeno kompozicija gali būti naudojama gydant tas virusines ligas, kuriose CTL atsakas yra svarbus, pavyzdžiui, gydant ŽIV infekciją arba gripą; ji taip pat gali būti naudojama gydant bakterines infekcijas, vėžį, parazitines infekcijas ir panašias. Kombinuota antigeno kompozicija su tinkamu antigenu yra naudinga profilaktikai, užkertant kelią įvairioms aukščiau paminėtoms virusinėms infekcijoms, ypačiai ŽIV infekcijos ir taip pat pacientų, kurie gali susirgti vėžiu, profilaktikai, pavyzdžiui, po pirminio auglio pašalinimo.

Taigi, vienu aspektu išradimas pateikia CTL atsako žmonėse ir prijaukintuose (pvz., katėse arba šunyse) arba žemės ūkiui svarbiuose gyvuliuose (pvz., arkliuose, karvėse arba kiaulėse) į antigeną, kitokį nei B-ląstelių limfomos antigenas ar kiaušinio albuminas, indukcijos būdą. Būdas apima antigeno, į kurį norima sukelti CTL atsaką, ir netoksinių antigeno kompozicijų, pateikimo stadijas. Šios kompozicijos apima, susideda arba iš esmės susideda iš stabilizuojančio agento, miceles sudarančio agento ir biologiškai skaldomo ir biologiškai suderinamo aliejaus. Geriau, kai ši kompozicija savo sudėtyje neturi jokio imunostimuliuojančio agento arba tokio komponento turi labai nedidelį kiekį, kad nebūtų sumažintas norimas ląstelinis atsakas. Geriau, kai ši kompozicija yra pateikiama stabilios „alyva-vandenyje“ emulsijos formoje. Tokiu būdu, kiekvienas komponentas yra parenkamas taip, kad kompozicija be fazių atsiskyrimo išliktų emulsijos būsenoje mažiausiai vieną mėnesį, o geriau daugiau nei metus. Pagal šį būdą, iš antigeno ir

antigeno kompozicijos yra formuojamas mišinys (geriau mikrosuskystinimo būdu), kurio įvedamas gyvuliui kiekis yra pakankamas, kad indukuotų CTL atsaką. Reikalingas tik vienkartinis toks įvedimas.

Terminas “stabilizuojantis detergentas” reiškia detergentą, kuris išlaiko komponentus stabilioje emulsijos būsenoje. Tokiems detergentams priklauso polisorbatas, 80 (TWEEN) (sorbitan-mono-9-oktadecenoat-poli(oksi-2,2-etandiilas); kurį gamina ICI Americas, Wilmington, DE), TWEEN 40, TWEEN 20, TWEEN 60, Zwittergent 3-12, TEEPOL HB7 ir SPAN 85. Šių detergentų kiekis paprastai yra 0,05-0,5%, geriau apie 0,2%.

Terminas “miceles sudarantis agentas” reiškia agentą, kuris sugeba kitų komponentų suformuotą emulsiją stabilizuoti micelinėje struktūroje. Infekcijos vietoje tokie agentai yra linkę sukelti nedidelį sudirginimą, o dėl susidariusių naujų makrofagų padidėja ląstelinis atsakas. Tokių agentų pavyzdžiais yra polimerinės paviršiaus aktyviosios medžiagos, kurios yra aprašytos BASF Wayndotte publikacijose, pvz., Schmolka, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 54, 110 (1977) ir Hunter ir kt., *J. Immunol.* 129, 1244 (1981) (abu yra duodami kaip literatūros šaltiniai): PLURONIC L62LF, L101 ir L64, PEG1000 ir TETRONIC 1501, 150R1, 701, 901, 1301 ir 130R1. Tokių agentų cheminės struktūros yra gerai žinomos. Pagal Hunter ir Bennett, *Journal of Immunology* 133, 3167 (1984), geriau, kai pasirinkto agento hidrofilinis-hidrofobinis balansas (HCB) yra tarp 0 ir 2. Pirmenybė teikiama 0,5-10% agento kiekiui, o geriausia, kai jo kiekis yra 1,25-5%.

Aliejus yra paimtas tam, kad padidintų antigeno išlaikymą “alyva-vandenyje” emulsijoje, t.y. norimas antigenas yra aprūpinamas tirpikliu. Pirmenybė yra teikiama aliejui, kurio lydymosi temperatūra yra žemesnė už 65°C, nes tada emulsiją bus galima gauti kambario temperatūroje (apie 20-25°C) arba ji išlaikys savo struktūrą temperatūrai nukritus iki kambario. Tokių aliejų pavyzdžiais yra skvalenas, skvalanas, EICOSANE, tetratetrakontanas, glicerolis ir riešutų arba kitų augalų aliejus. Aliejaus kiekiai gali būti tarp 1 ir 10%, o geriausiai kai jo kiekis sudaro 2,5-5%. Svarbu, kad aliejus būtų biologiškai skaldomas ir suderinamas, nes tada kūnas

galės jį suskaldyti per tam tikrą laiką, ir aliejaus naudojimo metu nebus nepalankių efektų, tokių kaip granulomos, kurios atsiranda naudojant aliejus..

Svarbu, kad aukščiau paminėtos kompozicijos sudėtyje nėra peptidinio komponento, ypačiai muramilo dipeptido (MDP). Toks peptidas trukdytų CTL atsako indukcijai, jeigu jo kiekis pateikiamoje žmogui kompozicijoje viršija 20 mikrogramų. Pirmenybė yra teikiama antigeno kompozicijoms, kurios neturi savo sudėtyje tokių peptidų, nepaisant jų matomos imuninės sistemos humoralinės dalies stimuliacijos. Tokiu būdu, pareiškėjas atrado, kad tokie peptidai yra nenaudingi sukeliant citotoksinių T-limfocitų atsaką, nors jie ir gali padidinti humoralinį atsaką.

Kitu požiūriu, antigeno kompozicija yra sudaroma, imant tik du iš trijų aukščiau minėtų komponentų, ir naudojama CTL atsako aukščiau minėtuose gyvuliuose ir žmonėse indukcijai kartu su bet kuriuo norimu antigenu (šis terminas apima baltymus, polipeptidus ir jų imunogeninius fragmentus), išskyrus kiaušinio albuminą (arba kitus albuminus, pvz., HSA, BSA ir ovalbuminą).

Pareiškėjas mano, kad skirtos žmonėms aukščiau minėtos kompozicijos yra naudingesnės už ankstesnes kompozicijas (įskaitant ISCOM, DETOX ir SAF). Skirtingai nuo kitų kompozicijų, į šią kompoziciją įeina miceles formuojantis agentas, bet joje nėra peptidų, ląstelių sienelių griaučių ar bakterinių ląstelių komponentų. Pateikiama kompozicija taip pat indukuoja CTL atsaką, kuris arba visai nėra indukuojamas ankstesnėmis kompozicijomis, arba yra žymiai didesnis, lyginant su jomis.

Terminas "netoksinis" reiškia, kad antigeno kompozicija arba visai neturi pašalinio poveikio gydomiems gyvuliams ar žmonėms, arba jis yra nedidelis. Eiliniai patyrę medicinos ir veterinarijos srities specialistai pastebės, kad šis terminas turi plačią reikšmę. Pavyzdžiui, sveiki gyvuliai arba žmonės gali toleruoti tik nedidelį toksiškumą, tuo tarpu sergantys žmonės realiai gali toleruoti didesnę toksiškumą.

Tinkamiausiuose realizavimo variantuose antigeno kompoziciją iš esmės sudaro du arba trys komponentai (detergentas, agentas ir aliejus); būdą sudaro vienkartinis mišinio (antigenas plius antigeno kompozicija) įvedimas žmogui arba

gyvuliui; viruso infekuotas žmogus arba gyvulys turi vieną arba daugiau virusinės infekcijos simptomų (kuriuos nustato atitinkamos medicinos srities gydytojas); ir antigeno kompozicija yra netoksiška žmonėms arba gyvuliams.

Kituose realizavimo variantuose antigenas yra pasirenkamas iš ŽIV antigenų antigeninių dalių: gp160, gag, pol, Nef, Tat ir Rev; maliarijos antigenų: CS baltymo ir sporozoito paviršiaus 2 baltymo; hepatito B paviršiaus antigenų: Pre-S1, Pre-S2, Hbc Ag ir Hbe Ag; gripo antigenų: HA, NP ir NA; hepatito A paviršiaus antigenų; Herpes viruso antigenų: EBV gp340, EBV gp85, HSV gB, HSV gD, HSV gH, HSV ankstyvojo baltymo produkto, žmogaus papilomos viruso antigenų (pvz., HPV antigenų, tokių kaip L1, E4, E6, E7 antigenai, ypač E6 ir E7 antigenai iš HPV16 ir 18, kurie yra du bendriausi HPV tipai, susiję su kakline karcinoma; E4 ir L1 antigenų, išvestų iš HPV6 ir HPV11, kurie yra du bendriausi HPV tipai, susiję su smailiagale kondiloma); prostatos specifinio antigeno (PSA), citomegaloviruso gB, citomegaloviruso gH ir IE gP72 baltymo; kvėpavimo sincitinio viruso antigenų: F baltymo, G baltymo ir N baltymo; ir auglio antigenų: karcinomos CEA, susijusios su mucinu karcinomos, karcinomos P21, karcinomos P53, melanomos MPG, melanomos P97 ir karcinomos Neu onkogeno produkto, karcinomos P53 geno produkto, melanomos antigeno, vadinamo MAGE, ir mutacinio p21 ras baltymo, sutinkamo daugybėje piktybinių auglių.

Kitu požiūriu, išradimas pateikia kompoziciją, susidedančią ar iš esmės susidedančią iš antigeno, sumaišyto su aukščiau aprašyta antigeno kompozicija, o antigenas yra pasirenkamas iš aukščiau išvardintų antigeninių dalių.

Dar kitais požiūriais, išradimas pateikia infekuotą ŽIV virusu, sergančių maliarija, gripu, hepatitu, vėžiu, infekuotą Herpes virusu, sergančių kakliniu vėžiu, smailiagale kondiloma (lytinės karpos) ar infekuotą kvėpavimo sincitiniu virusu pacientų gydymo metodus, įvedant kompoziciją, kurią sudaro įprastas antigenas (pvz., pasirinktas iš aukščiau išvardintų), sumaišytą su viena iš aukščiau minėtų antigeno kompozicijų. Šie antigenai ir gydymo būdai yra tik pavyzdžiai tokių antigenų, kurie gali būti naudojami antigeno kompozicijų sudaryme.

Kiti išradimo bruožai ir privalumai aiškiai matysis iš toliau duodamų realizavimo variantų, kuriems yra teikiama pirmenybė, aprašymo ir iš išradimo apibrėžties.

Tinkamiausiu realizavimo variantu aprašymas

Iš pradžių bus trumpai aprašyti brėžiniai.

Brėžiniai

Fig. 1A-1C ir 4A-4C yra grafiškai pavaizduoti duomenys, palyginantys CTL indukciją įvairiomis ovalbumino kompozicijomis. Visose figūrose E:T reiškia efektoriaus santykį su taikiniu;

Fig. 2A ir 2B yra grafiškai pavaizduoti duomenys, palyginantys CTL indukciją įvairiomis β -galaktozidazės kompozicijomis;

Fig. 3 yra grafiškai pavaizduoti duomenys, palyginantys CTL indukciją ovalbuminu, esančiu liposomoje, ir ovalbuminu, esančiu antigeno kompozicijoje;

Fig. 5 ir 6 yra grafiškai pateikti duomenys, rodantys CD4 ir CD8 ląstelių išsiviekojimo įtaką CTL indukcijai;

Fig 7 yra grafiškai pavaizduoti CTL indukcijos gp120 duomenys;

Fig. 8 yra grafiškai pavaizduoti CTL indukcijos plurono, TWEEN ir antigeno mišiniu duomenys;

Fig. 9 yra grafiškai pavaizduoti CTL indukcijos skvalano, TWEEN ir antigeno mišiniu duomenys;

Fig. 10 yra grafiškai pavaizduoti CTL indukcijos skvalano, plurono ir antigeno mišiniu duomenys;

Fig. 11 yra grafiškai pavaizduota OVA su įvairiomis antigeno kompozicijomis įtaka CTL atsakui;

Fig. 12 yra grafiškai pavaizduota anti-gp120 IIIb antikūnų indukcija beždžionėse įvairiomis antigeno kompozicijomis;

Fig. 13 vaizduoja HOPE 2 ląstelių antinavikinį aktyvumą, praėjus 10 dienų po vienkartinės imunizacijos tirpiu E7 baltymu su stimuliatoriumi; ir

Fig. 14 vaizduoja HOPE 2 ląstelių antinavikinį aktyvumą, praėjus 10 ir 19 dienų po dviejų imunizacijų tirpiu E7 baltymu su stimuliatoriumi.

Antigeno kompozicija

Bendrais bruožais šio išradimo antigeno kompozicijos yra aprašytos aukščiau. Eilinis šios srities specialistas pripažins, kad lygiavertės kompozicijos yra lengvai paruošiamos ir galima tikėtis, kad jos turės lygiavertes CTL atsako indukcijos savybes. Tokių kompozicijų savybės yra lengvai tiriamos, naudojantis metodikomis, kurios yra aprašytos žemiau pateikiamuose pavyzdžiuose.

Čia yra pateikiami išradime naudojamos antigeno kompozicijos (AF), sudarytos iš apie 2,5% skvalano, 5% pluroninės rūgšties ir TWEEN 80 fosfato buferio su NaCl tirpale, pavyzdžiai. Konkrečiau, AF emulsija susideda iš: 15 mg skvalano, 37,5 mg poloksamero 401 (PLURONIC L121), 6 mg polisorbato 80 (TWEEN 80), 0,184 mg kalio chlorido, 0,552 mg kalio hidrofosfato, 7,36 mg natrio chlorido ir 3,3 mg natrio dihidrofosfato (bevandens) 1-me ml vandens, pH 7,4. Pagal standartinę metodiką (Microfluidics Model M110F) ši emulsija yra mikrosuskystinama, esant 11000-14000 psi priešslėgio moduliui, laipsniškai grąžinamas slėgis iki atmosferinio, atšaldoma ir supakuojama į ledą.

Kituose pavyzdžiuose antigenas buvo maišomas su mikrosuskystintu skvalano (S), pluroninės rūgšties (P) ir TWEEN 80 (T) mišiniu taip, kad galutinės koncentracijos sudarytų: 0,2% TWEEN 80, 1,25% pluroninės rūgšties ir 5% skvalano. Antigenui specifinio imuninio atsako indukcijai būtinų subkomponentų nustatymui buvo ruošiami skvalano-TWEEN 80, pluroninės rūgšties-TWEEN 80 ir skvalano-pluroninės rūgšties mišiniai, kurių koncentracijos buvo tokios pačios, kaip ir trijų komponentų mišinyje. Taip pat individualūs pluroninės rūgšties, skvalano ir TWEEN 80 tirpalai buvo naudojami atskirų komponentų įtakos į CTL indukciją nustatymui. Įvairių TWEEN darinių įtaka CTL indukcijai ova sistemoje buvo

nustatoma TWEEN 80 keičiant TWEEN 20, TWEEN 40 ir Zwittergent. Trijų komponentų sistemoje skvalanas buvo keičiamas Eicosone ir Triacontone, o pluroninės rūgšties kopolimeras toje pačioje kompozicijoje - PEG 1000, Pluronic L62LF ir Tetronics 1501 ir 150R1. Ova specifinių CTL indukcijos bandymams buvo naudojamos dviejų komponentų kompozicijos, sudarytos iš įvairių analogų įvairiomis kombinacijomis. Šiam tikslui buvo panaudoti cholesterolio-TWEEN 80, skvalano-TWEEN 20, pristano-TWEEN 80 ir alyvų aliejaus-TWEEN 80 mišiniai. Stabilizacijos tyrimuose buvo naudojamas mikrosuskystintas skvalano-TWEEN 80 ir 5% dekstrozės mišinys. Visais atvejais kompozicijų kombinacijos buvo maišomos mikroskystintuve iki stabilios emulsijos. Kai kuriuose eksperimentuose, indukuojant CTL ir humoralinį atsaką, dviejų komponentų kompozicijos buvo maišomos su įvairiais MDP kiekiais. 1 lentelėje yra pateikiamas išsamus šiame tyrime naudotų įvairių kompozicijų sąrašas.

1 lentelė

Įvairių pakeitimų trijų ir dviejų komponentų sistemose įtaka

<u>Pakeitimai trijų komponentu kompozicijose</u>	<u>sunaikinimo % (esant E:T 100:1)</u>
STP	84
Tween 40 (T)	66
Tween 20 (T)	48
T1501 (P)	0
T150R1 (P)	0
Pluronic L62LF (P)	47
Eicosane (S)	*
PEG1000 (P)	*
Triacontane (S)	*
Zwittergent (T)	*
<u>Pakeitimai dviejų komponentu kompozicijose</u>	
ST	76
PT	45
SP	26
Cholesterolis (S) + Tween 80	0
Skvalanas + Tween 20 (T)	65
Pristanas (S) + Tween 80	42
Alyvų aliejus (S) + Tween 80	69

Vieno komponento kompozicija

Pluronic L121	0
Skvalanas	0
Tween 80	0
Skvalanas + Tween 80 + 5% dekstrozės	86

* CTL bandymai kartojami

Stimuliatoriaus kontrolei buvo naudojama susidedanti iš dviejų dalių Syntex stimuliatoriaus kompozicija (mikrosuskystinta; SAFm). I dalį sudaro 5% skvalano, 1,25% pluroninės rūgšties ir 0,2% TWEEN 80 (tirpiklis arba I-SAF) tirpalas kalio fosfato su NaCl buferyje. II dalį sudaro N-acetilmuramil-L-treonil-D-izoglutaminas (Thr-MDP), kuris yra mikobakterijų ląstelių sienelių komponento darinys. Imunizacijai antigenas buvo maišomas su mikrosuskystintu tirpikliu (I dalis), norint gauti homogeninę emulsiją. SAFm gavimui pridedamas MDP ir trumpai pamaišoma. Optimalios CTL indukcijos nustatymui buvo bandomos įvairios MDP koncentracijos. Stimuliatoriaus kontrolei pelės taip pat buvo imunizuojamos tirpiaisiais antigenais, sumaišytais su alum pagal gamintojo instrukciją (Pierce Chemicals, Rockford, IL) arba su pilnuoju Freundo stimuliatoriumi (CFA).

Ši antigeno kompozicija buvo naudojama, indukuojant citotoksinių T-limfocitų atsakus pelėse. Eilinis šios srities specialistas pripažins, kad toks pelės modelis parodo, kad ekvivalentiški eksperimentai arba poveikiai panašiai sukelia citotoksinių T-limfocitų atsakus žmonėse ir prijaukintuose arba žemės ūkio gyvuliuose. Norint pasiekti norimą ląstelinį atsaką, antigeno ir antigeno kompozicijos kiekis gali būti nustatytas empyriškai pagal standartines metodikas, kurias gerai žino eilinis šios srities specialistas, tokiu būdu išvengiant nereikalingų eksperimentų. Taigi, norėdamas minimizuoti poveikio tokiu mišiniu pašalinius efektus, eilinis šios srities specialistas gali nustatyti minimalų mišinio kiekį, reikalingą CTL atsakui žmonėse ir prijaukintuose ar žemės ūkio gyvuliuose sukelti, tokiu būdu indukuojant imuniškumą norimam antigenui. Normaliai naudojant, tokio

mišinio injekcija yra atliekama pagal įvairias standartines metodikas, tačiau ypatingai teikiama pirmenybė intraraumeninei injekcijai tokioje vietoje, kur emulsija galėtų išlikti stabilioje būsenoje kelias dienas ar savaites.

Metodai

Jeigu kitaip nenurodyta, žemiau pateikiamuose pavyzdžiuose buvo panaudotos šios medžiagos ir metodai::

Pelės

C57BL/6 (H-2^b) ir BALB/c (H-2^d) pelių patelės buvo įsigytos iš Harlen Sprague (San Diego, California).

Antigenai

Ovalbuminas (ova, Grade VII; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) buvo naudojamas natyvus. β -Galaktozidazė (β -gal, Grade VIII; BLR) buvo naudojama natyvi, o taip pat 2 min išvirinta 1M NaOH. Rekombinantinis gp120 buvo įsigytas iš American Biotechnology.

Auglio ląstelės ir transfekantai

Buvo naudojamos Ia⁺ linijų EL4 (C57BL/6, H-2^b thymoma) ir P815 (DBA/2, H-2^d mastocytoma) auglių ląstelės. Ova produkuojančio EL4 transfekanto (EG7-ova) gavimas yra aprašytas Moore ir kt., *Cell* 54, 777 (1988). P13.1 β -gal produkuojantis transfekantas buvo išvestas 1 ml kalio fosfato su NaCl buferyje, elektroporuoiant 10^7 P815 ląstelių su 10 mg pCH110 linearizuotų PstI (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway) ir 1 mg pSV2 neo linearizuotų PvuI (Southern ir kt., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327 (1982)), o po to vykdant atrinkimą 400 μ g/ml antibiotiku G418. C3-4 transfekantas buvo gaunamas iš BALB/c Igm 662 hibridomos, transfekuojant ją plazmide, koduojančia β -gal geną, sulietą su trečiuoju ir ketvirtuoju IgM sunkiosios grandinės egzonu (Rammensee ir kt., *Immunogenetics*

30, 296 (1989)). gp160IIIb, ekspresuojantį 3T3 fibroblastą (15-12), pateikė Dr. Germain iš NIH (Bethesda, Md). K^b transfekuotą L ląstelių liniją pateikė Dr. Carbone (Monash University, Australia). D^d ir L^d transfekuotas ląstelių linijas pateikė Dr. Ted Hensen (Washington University, St. Louis).

Imunizacija

Po citoplazminio apdorojimo pagal Moore ir kt., *supra* ir Carbone ir kt., *J. Exp. Med.* 169, 603 (1989), pelės buvo intraveniškai imunizuojamos 25×10^6 splenocitų suspensija. Imunizacijai ova-antigeno ir β -gal-antigeno kompozicijomis po 30 μ g kiekvieno baltymo antigeno buvo subkutaniškai suleidžiami pelei į letenėlę ir uodegos pagrindą. Kiekvieną 200 μ l tūrio injekciją sudaro 67 μ l mikrosuskystintos antigeno kompozicijos (paruoštos pagal standartines metodikas) ir 30 μ g antigeno baltymo. Galutinis tūris pasiekiamas, skiedžiant HBSS (žr., Whittaker manual (Welkersville, MD)). MDP kiekiai buvo nuo 0 iki 300 μ g. Kur nurodyta, pelės buvo imunizuojamos tirpių antigenų CFA arba alum 200 μ l tūrio mišinio tirpalu.

Efektorių populiacijų stimuliacija *in vitro*

Mažiausiai 14 dienų prieš inkubaciją aktyvuotos normalių arba imunizuotų pelių blužnies ląstelės (30×10^6) ova atsakų gavimui buvo inkubuojamos su $1,5 \times 10^6$ EG7-ova (apšvitinta 20000 rad), o β -gal atsakų gavimui buvo inkubuojamos plokštelės 24 duobutėse su $1,5 \times 10^6$ C3-4 ląstelių (apšvitintų 20000 rad), esant 37°C temperatūrai ir 7% CO₂ koncentracijai ore. Visos audinių kultūros buvo ruošiamos pilnoje IMDM terpėje (žr. Whittaker manual (Welkersville, MD)), kurioje buvo 10% veršiuko fetalinio serumo (FCS), 2 mM gliutamino, gentamicino ir 2×10^{-5} M 2-merkaptoetanolio. Išsieikvojimo *in vitro* eksperimentuose CD4⁺ ir CD8⁺ ląstelių pašalinimui, aktyvuotos *in vivo* arba stimuliuotos *in vitro* blužnies ląstelės buvo veikiamos monokloniniais antikūnais (mAb) RL.172 (anti-CD4) arba mAb 3.168 (anti-CD8) (Sarmiento ir kt., *J. Immunol.* 125, 2665 (1980) ir Ceredig ir kt., *Nature*

314, 98 (1985)). mAb RL.172 ir mAb 3.168 buvo gauti iš Dr. Jonathan Sprent (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA).

Mažiausiai 21 dieną prieš inkubaciją aktyvuotos normalių arba imunizuotų pelių blužnies ląstelės (30×10^6) pilnoje IMDM terpėje (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), turinčioje 10% prieš tai atrinkto FCS (ICN Flow; ICN Biochemicals, Inc., Costa Mesa, CA), 2 mM gliutamino, gentamicino ir 2×10^{-5} M 2-merkaptoetanolio, buvo inkubuojamos su $1,5 \times 10^6$ 15-12 ląstelėmis (45 min paveiktomis 200 μ g mitomicino C/ 10^8 ląstelių) arba su 500 μ g 18IIIb peptido, turinčio dominantinį CTL epitopą Balb/c pelėse.. *In vitro* stimuliacijai peptidais, blužnies ląstelės buvo auginamos pilnoje IMDM terpėje, turinčioje 5% ConA nuopilo.

Išsieikvojimo eksperimentuose $CD4^+$ ir $CD8^+$ T ląstelių (22,23) pašalinimui, esant žemo toksiškumo triušio komplementui (Cederlane Laboratories, Ltd., Hornby Ontario, Canada), aktyvuotos *in vivo* arba stimuliuotos *in vitro* blužnies ląstelės buvo veikiamos RL.172 (anti-CD4) arba 3.168 (anti-CD8) mAb. mAb RL.172 ir mAb 3.168 padovanojo Dr. Jonathan Sprent (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA).

Citotoksiškumo bandymas

Taikinio ląstelės (1×10^6) 60 min buvo žymimos 100 μ Ci [51 Cr] natrio chromatu. Žymėjimo laikotarpiu peptidų impulsiniams taikiniams buvo pridedama 50 μ l 1 mg/ml peptido tirpalo HBSS. Po plovimo, 10^4 pažymėtų taikinio ląstelių ir eilės skiedimų efektorių ląstelės 4 valandas buvo inkubuojamos 200 μ l RP10, esant 37°C temperatūrai. Surenkama 100 μ l nuopilo, o specifinė lizė skaičiuojama taip: specifinės lizės procentai = $100 \times \{(\text{išlaisvinimas CTL} - \text{spontaniškas išlaisvinimas}) / (\text{maksimalus išlaisvinimas} - \text{spontaniškas išlaisvinimas})\}$. Nesant citotoksinių T-limfocitų, spontaniškas išlaisvinimas visuose eksperimentuose sudarė <25% detergentų sukulto maksimalaus išlaisvinimo.

Antikūnų atsaku pelėse ir beždžionėse nustatymas

Kiekviena iš 96 plokštelės U formos duobučių (Costar, Cambridge, MA) buvo padengta 150 ng ova arba gp120 50 μ l HBSS tirpalo ir inkubuota per naktį 4°C temperatūroje. Anti-gp120 ir anti-ova antikūnų atsakų pelėse nustatymui plokštelės buvo blokuojamos 1 val. 1% BSA. Po to į kiekvieną duobutę pridedama po 15 μ l laipsniškai praskiesto serumo ir inkubuojama 2 val. Plokštelės perplaunamos ir į kiekvieną duobutę pridedama 1:1000 praskiesto ožkos anti-pelės IgG, konjuguoto su HRPO (SBT, Alabama), tirpalo 1% BSA. Po 1 val. inkubacijos, plokštelės perplaunamos, ir į kiekvieną duobutę pridedama po 100 μ l substrato. OD₄₀₅ matuojamas po 10-15 min. Anti-gp120 antikūnų atsakų beždžionėse nustatymui buvo panaudotos tos pačios metodikos, išskyrus tai, kad plokštelės blokuotos ir serumas praskiestas Hank'o subalansuotu druskų tirpalu, turinčiu 5% normalaus ožkos serumo.

Peptidų sintezė

Sintetiniai peptidai, atitinkantys ovalbumino (ova 253-276) aminorūgščių seką 253-276 (Seka Nr. 1: EQLESIINFELTEWTSSNVMEER, kur kiekvieną aminorūgštį atitinka viena standartinio kodo raidė), pagrindinio mielino baltymo (MBD 84-102) aminorūgščių seką 84-102 (Seka Nr. 2: DENPVVHFFKNIVTPRTPP) ir gp120IIIb aminorūgščių seką 308-322 (18IIIb seka), buvo susintetinti Applied Biosystems 430A sintezatoriumi kietos fazės peptidų sintezės būdu. Aminorūgštys buvo sujungtos iš anksto pagamintais simetriniais anhidridais, išskyrus asparaginą, gliutaminą ir arginimą, kurie buvo sujungti hidroksibenzotriazolo esteriu. Sujungimo efektyvumas buvo stebimas ninhidrino reakcijos metodu pagal Kaiser ir kt., *Anal. Biochem.* 34, 595 (1970). Pagal "mažas-didelis" metodiką, aprašytą Tam ir kt., *J. Am. Chem. Soc.* 21, 6442 (1983), nuo dervos polipeptidai buvo atskeliami HF ir ekstrahuojami 10% acto rūgštimi. Po liofilizacijos, ant Sephadex G-25 kolonėlės iš peptidų buvo pašalintos druskos, o po to peptidų mėginiai buvo gryninami per Vydac preparatyvinę C-18 kolonėlę atvirkštinės fazės HPLC chromatografijos būdu. Išgryninti peptidai (98%)

buvo ištirpinami HBSS (10 mg/ml) ir praskiedžiami iki norimos koncentracijos pilnoje terpėje.

Skaldymas CNBr

Baltymų mėginiai (pvz., β -galaktozidazė) buvo veikiami 100 kartų didesniu bromciano molių kiekiu 100 mM trifluoracto rūgšties tirpale. Reakcija buvo vykdoma 18 valandų kambario temperatūroje (apie 20°C). Pasibaigus reakcijos laikui, peptidų mėginiai buvo atskiriami nuo reagento, naudojant SEP-PAK C-18 prietaisą (Waters), išplaunami 95% acetonitrilo tirpalu ir liofilizuojami.

Šarminis skaldymas

Baltymų mėginiai (pvz., β -galaktozidazė) buvo veikiami 1 N NaOH ir virinami 2 min. Gauti peptidų fragmentai nuo reagentų buvo atskiriami SEP-PAK C-18 prietaisu (Waters), išplaunami 95% acetonitrilo tirpalu ir liofilizuojami.

1 pavyzdys: I klasės ribota CTL aktyvacija

Moore ir kt., *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* 113 (1989) ir Carbone ir Bevan, *J. Exp. Medicine* 171, 377 (1990) parodė, kad blužnies ląstelėmis, kurioms į citoplazmą yra įvestas tirpus ova, imunizuotose pelėse buvo aktyvuojamas ova specifinis I klasės ribotas CTL atsakas. ova ekspresuojantis EL4 transfekantas EG7-ova buvo panaudotas *in vitro* stimuliacijai *in vivo* aktyvuotais blužnies limfocitais, o taip pat panaudotas taikiniu ova specifiniam CTL tarpininkaujamam sunaikinimui. Šis tyrimas taip pat parodė, kad EG7-ova transfekantu ir blužnies ląstelėmis, kurioms į citoplazmą įvestas tirpus ova, indukuoti CD8⁺ efektoriai atpažįsta ova 258-276 peptidu pažymėtą H-2K^b, lizuoja EG7-ova, o taip pat sunaikina EL4 ląsteles su įvestu ova-258-276. Taigi, norint nustatyti ar tirpus antigenas gali indukuoti I klasės ribotą CD8⁺ T ląstelių kelią, tam tikros antigeno kompozicijos parinkimui (kuri gali būti panaudota tirpaus antigeno įvedimui į I klasės ribotą kelią) buvo panaudota aukščiau minėta sistema.

a) ova

C57BL/6 pelės buvo vieną kartą imunizuojamos įvairiais ova kiekiais (30 μ g- 1 mg vienai pelei) su ir be antigeno kompozicijos. Pelės buvo imunizuojamos, subkutaniškai suleidžiant preparatą uodegos pagrindo srityje. Praėjus mažiausiai dviem savaitėms po imunizacijos, iš imunizuotų pelių buvo paimtos blužnies ląstelės, kurios *in vitro* buvo stimuliuojamos EG7-ova transfekantais. Net 30 μ g ova kiekis taip pat efektyviai veikė kaip ir 1 mg dozė. Dėl šios priežasties CTL tyrimai buvo paprastai atliekami 30 μ g ova imunizuotų pelių blužnies ląstelėmis. Po penkių dienų auginimo *in vitro* su EG7-ova pagal ova specifinių efektorių, galinčių lizuoti EG7-ova, buvimą buvo nustatoma aktyvacija.

Pelės, kurioms buvo suleista tirpus ova HBSS, kurio kiekis buvo net 1 mg, nerodė jokių CTL aktyvavimo požymių (Fig. 1A). Tačiau imunizuotose aukščiau aprašyta antigeno kompozicija (figūrose pažymėta AF) su 30 μ g ova pelėse buvo stebimas žymus transfekantui specifinis CTL atsakas (Fig. 1C). Be to, ova-AF imunizuotų blužnies ląstelių indukuotas EG7-ova sunaikinimo kiekis yra panašus į kiekį blužnies ląstelių, paveiktų ova, imunizuotose pelėse (Fig. 1B).

Aiškaus antrinio CTL atsako gavimui *in vitro*, stimuliuojant EG7-ova, pagal blužnies ląstelių trūkumą β -galaktozidaze imunizuotose pelėse buvo parodyta, kad CTL sužadinimo *in vivo* specifiskumas yra antigenui specifinis. Ova specifinės CTL indukcijos nebuvo pastebėta.

b) β -galaktozidazė

Panašūs rezultatai buvo gauti ir naudojant kito tirpaus baltymo antigeną - β -galaktozidazę. β -gal specifinio CTL atsako bandymui taikiniu buvo naudojamos BALB/c išvestas β -gal-ekspresuojantis C3-4 transfekantas. BALB/c pelių imunizacija tirpia β -gal davė foninio lygio CTL atsaką. Dėl to, specifinio CTL atsako nustatymui matavimai buvo atliekami, praėjus mažiausiai aštuonioms savaitėms po blužnies limfocitų surinkimo ir penkių dienų auginimo su apšvitintais C3-4 transfekantais.

Fig. 2B rodo, kad 30 μg β -galaktozidazės AF indukuoja stiprų specifinį CTL atsaką prieš transfekantą. Kai efektoriaus ir taikinio santykis (E:T) yra 3:1, β -gal-AF imunizuotose pelėse stebima apie 80% specifinio C3-4 sunaikinimo. Tačiau, buvo pasiekta tik 20% to paties taikinio sunaikinimo efektoriais, išskirtais iš β -gal-HBSS imunizuotų pelių, esant tam pačiam E:T santykiui (Fig. 2A). Kadangi nei EL4, nei P815 neekspresuoja II klasės MHC geno produktų, o lizė rodo singeninę restrikciją, tai šie ova ir β -gal specifiniai efektoriai yra I klasės MHC restriktuoti.

Norint parodyti antigeno kompozicijos naudingumą, pelės buvo imunizuojamos tirpiu ova, įterptu į dviejų tipų liposomas; vienas iš jų buvo pH jautrios liposomos. Praėjus vienai savaitei, kaip aprašyta aukščiau, blužnies ląstelės buvo stimuliuojamos *in vitro* ir testuojamos ^{51}Cr pažymėtu EG7-ova arba EL4. Fig. 3 yra pateikiamas tipiškas rezultatas, rodantis, kad įterptas į liposomą ova negali aktyvuoti žymios CTL indukcijos pelėse. Panašūs rezultatai buvo pastebėti ir imunizuojant ova alum.

2 pavyzdys: Epitopo atpažinimas CTL

Carbone ir Bevan, *supra*, parodė, kad EG7-ova transfekantu arba splenocitais, kuriems į citoplazmą yra įvestas ova, C57BL/6 pelėse indukuoti CTL atpažįsta ova 258-276 peptidu padengtas EL4 ląsteles. Norint nustatyti, ar tirpus ovalbuminas AF indukuoja panašius CTL atsakus, iš imunizuotų pelių buvo surinktos blužnies ląstelės ir *in vitro* stimuliuotos su EG7-ova. Efektoriai buvo testuojami prieš EL7 ląsteles, padengtas ova 258-276 arba kontroliniu peptidu, išskirtu iš pagrindinio mielino baltymo (MBP 84-102). Rezultatai parodė, kad ova-AF aktyvuoja panašaus specifiškumo CTL, kaip ir transfekantai, arba įvestas į citoplazmą ova (Fig. 1A, 1B ir 1C). ova-AF aktyvuotos efektorių ląstelės efektyviai lizuoja EG7-ova ir netransfekuotas EL4 ląsteles, padengtas 50 $\mu\text{g}/10^8$ ląstelių ova peptido, tačiau nelizuoja tų EL4 ląstelių, kurios buvo padengtos 50 $\mu\text{g}/10^8$ ląstelių MDB peptido.

Carbone ir Bevan, *supra*, parodė, kad β -galaktozidazės sistemoje β -gal ekspresuojantys transfekantai ir splenocitai su įvesta į citoplazmą β -galaktozidaze, indukuoja CTL, kurie lizuoja β -gal ekspresuojantį transfekantą ir netransfekuotas P815 ląsteles, padengtas šarmais hidrolizuota β -galaktozidaze. Tirpi β -galaktozidazė indukuoja CTL, kurie turi panašų specifiškumą kaip ir imunizuojant AF Fig.2).

3 pavyzdys: CTL efektoriai yra CD8⁺ T ląstelės

Žemiau yra parodyta, kad tirpaus baltymo antigenai AF indukuoja CD8⁺ efektorines T ląsteles. Imunizuotų pelių splenocitai 5 dienas buvo auginami su apšvitintais transfekantais *in vitro*. Po to ląstelės buvo surinktos ir atrinktos CD4⁺ arba CD8⁺ T ląstelės, naudojant monokloninius anti-CD4 arba anti-CD8 antikūnus plius komplementą. Vėliau ląstelės buvo testuojamos ova sistemoje prieš ⁵¹Cr-EG7-ova arba β -gal sistemoje prieš ⁵¹Cr-P13.1. Fig. 4 pateikti duomenys rodo, kad ova sistemoje CD8⁺ T ląstelių atrinkimas panaikino suteiktą visai efektorių ląstelių populiacijai citolitinį aktyvumą. Tačiau CD4⁺ T ląstelių populiacijos atrinkimas neturėjo jokios įtakos EG7-ova lizei.

Panašūs rezultatai buvo gauti ir β -gal sistemoje, kur CD8⁺ T ląstelių atrinkimas panaikino β -gal-antigeno kompozicija imunizuotų blužnies ląstelių citolitinį aktyvumą.

4 pavyzdys: Tirpus ova AF aktyvuoja CD8⁺ T ląsteles

Norint parodyti, kad ova-AF aktyvuoja CD8⁺ T ląstelių populiacijas *in vivo* ir kad jam tenka lemiamas vaidmuo antriniam atsakui *in vitro*, iš ova-AF imunizuotų ir paprastų pelių blužnies buvo atrinktos CD4⁺ arba CD8⁺ populiacijos. Vėliau šios populiacijos *in vitro* buvo stimuliuojamos arba tik su EG7-ova, arba kombinacijoje su CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelėmis iš ova-AF imunizuotų pelių, arba įvairiomis kombinacijomis su CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelėmis iš ova-AF imunizuotų pelių ir paprastų pelių CD4⁺ ir CD8⁺ T ląstelėmis. Fig.5 rodo, kad antrinio CTL atsako pasireiškinge *in vitro* lemiamas vaidmuo tenka aktyvuotoms CD8⁺ T ląstelėms. Šie

duomenys taip pat rodo, kad efektyvaus antrinio CTL atsako pasireiškimui *in vitro* reikalingos ir CD4⁺ T ląstelės. Aktyvacijai CD4⁺ T ląstelės nėra būtinos. Panašiai ir β-gal specifinio antrinio CTL atsako pasireiškimui *in vitro* yra reikalingos CD8⁺ T ląstelės.

Aukščiau pateikti pavyzdžiai rodo antigeno kompozicijos įtaką I klasės riboto CTL atsako indukcijoje prieš tirpaus baltymo antigenus. Antigeno kompozicija tarpininkauja tirpaus antigeno indukuotą CTL aktyvaciją, ir aktyvumas yra panašus į transfekantų ir splenocitų, kuriems į citoplazmą įvestas tirpus ova arba β-gal, indukuotą aktyvumą. Ovalbumino sistemoje, EG7-ova, splenocitai su įvestu į citoplazmą ova, ir ova-AF indukuoja: (a) I klasės CD8⁺ apribotą CTL; (b) CTL, kuris atpažįsta taikinį, sensibilizuotą ova 258-276 sintetiniu peptidu; ir (c) ilgai pasireiškiantį po vienkartinės imunizacijos CTL. β-galaktozidazės sistemoje β-gal-AF indukuoja CTL, kurie atpažįsta β-gal ekspresuojantį C3-4 transfekantą, o taip pat netransfekuotas P815 ląsteles, kurios yra sensibilizuotos šarmais hidrolizuota β-gal. Tai yra analogiškas atvejis kaip ir CTL indukcija, imunizuojant blužnies ląstelėmis, kurioms į citoplazmą yra įvesta β-galaktozidazė. Ova specifinių CTL indukcija antigeno kompozicija yra unikali, nes nei įterptas į pH jautrią liposomą, nei ova alum negali indukuoti CTL aktyvavimo *in vivo*.

Šie pavyzdžiai rodo, kad aukščiau aprašyta antigeno kompozicija, o taip pat jos ekvivalentai yra naudingi žmogaus terapijoje bei vakcinų tobulinime, norint indukuoti CTL įvairių vėžinių ir virusinių susirgimų atveju.

5 pavyzdys:

Tai yra charakteringas pavyzdys, rodantis aukščiau minėtos AF naudojimą, sukeliant I klasės ribotą CTL aktyvaciją tirpiu ŽIV gp120.

gp160 IIIB ekspresuojanti ląstelių linija (15-12) buvo gauta iš Balb/c fibroblastų išvestoje 3T3 ląstelių linijoje, kuri buvo gauta iš Dr. Ron Germain ir Dr. Jay Berzofsky (National Institute of Health, Bethesda, M.D.). gp160 ekspresuojanti ląstelių linija buvo naudojama *in vivo* aktyvuotų blužnies limfocitų stimuliacijai *in*

vitro, o taip pat naudota taikiniu gp160 specifinių CTL indukcijai. Balb/c pelės buvo imunizuojamos vieną kartą 10 μ g vienai pelei gp160 doze su ir be AF. Pelėms į letenėlę ir uodegos pagrindo srityje po oda suleistas preparatas. Praėjus dviem savaitėms po imunizacijos, iš imunizuotų pelių buvo paimtos blužnies ląstelės ir *in vitro* stimuliuojamos apšvitintais gp160 transfekantais. Po penkių dienų auginimo *in vitro*, aktyvacija buvo įvertinama pagal specifinių efektorių, galinčių lizuoti gp160 transfekantus, bet nelizuojančių netransfekuotas ląstelių linijas, buvimą. Rezultatai yra parodyti fig. 7, kur CTL atsakas yra sukeltas gp160-AF.

Tolimesni pavyzdžiai demonstruoja šio išradimo antigeno kompozicijų su vienu arba dviem komponentais naudojimą. Šie pavyzdžiai rodo, kad CTL atsakai gali būti indukuojami tik dviem iš aukščiau aprašytų trijų komponentų.

6 pavyzdys: Kritinių komponentų, reikalingu CTL indukcijai, nustatymas

Norint nustatyti, kuris iš visų aukščiau paminėtų komponentų yra būtinas antigenui specifinių CTL indukcijai, pelės buvo imunizuojamos mikrosuskystinta kompozicija, turinčia ovalbuminą ir įvairias dviejų komponentų kombinacijas, kurios yra pasirinktos iš aukščiau pateiktų AF sudarančių trijų komponentų. Buvo naudojamos tokios dviejų komponentų kombinacijos: skvalanas/TWEEN PBS, skvalanas/pluroninė rūgštis PBS ir pluroninė rūgštis/TWEEN PBS. Kita serija apima pelių imunizaciją ova kombinacijoje su vienu komponentu, pvz., skvalanu PBS, pluronine rūgštimi PBS arba tik TWEEN PBS. Aukščiau minėta trijų komponentų antigeno kompozicija buvo pakeista, į pašalinto vieno komponento vietą pridėdant PBS.

Aukščiau minėtos antigeno kompozicijos susideda iš: 0,300 g TWEEN 80 (Aldrich, WI), 1,875 g Pluronic L121 (BASF, NJ) ir 7,5 g skvalano (Aldrich, WI) mišinio, atskiesto iki 50 ml su PBS.

Naudotas dviejų komponentų kompozicijas sudaro:

skvalanas/TWEEN: 0,300 g TWEEN 80 ir 7,5 g skvalano mišinys, atskiestas iki 50 ml su PBS.

pluroninė rūgštis/TWEEN: 1,875 Pluronic L121 ir 0,3 g TWEEN mišinys, atskiestas iki 50 ml su PBS.

pluroninė rūgštis/skvalanas: 1,875 g Pluronic L121 ir 7,5 g skvalano mišinys, atskiestas iki 50 ml su PBS.

Mėginiai buvo apdorojami mikroskystintuvu (model 110T, Microfluidics corp.), supilami į buteliukus ir iki naudojimo laikomi 4°C temperatūroje.

Buvo pagamintas ovalbumino (Sigma, MO) 0,3 mg/ml tirpalas HBSS (Whittaker, *supra*). Šis tirpalas buvo maišomas su dviejų komponentų kompozicija tokiais kiekiais: 5 dalys 0,3 mg/ml ovalbumino tirpalo, 3,3 dalys 2 komponentų kompozicijos ir 1,7 dalys HBSS.

Kompozicija sumaišoma ir iki suleidimo laikoma lede. Visi tirpalai buvo ruošiami prieš pat injekciją.

Kiekviena pelė gavo po 200 μ l vienos kompozicijos, turinčios 30 μ l OVA, tirpalą suleidžiant į abi užpakalines letenėles, o likęs tirpalo kiekis buvo suleidžiamas subkutaniškai uodegos pagrindo srityje. Po to pelės paliekamos ramybėje dviems-keturioms savaitėms iki blužnies paėmimo.

Praėjus dviems savaitėms po imunizacijos, paruoštos blužnies ląstelės buvo stimuliuojamos *in vitro* apšvitintu EG7-OVA. Po penkių dienų auginimo OVA specifinių CTL buvimas buvo matuojamas testuojant prieš ^{51}Cr -EG7-OVA arba ^{51}Cr -EL4 4 valandų ^{51}Cr išsiskyrimo bandymu. Fig.8-10 pateikti duomenys rodo, kad pridėtas į mikrosuskystintą dviejų komponentų sistemą ovalbuminas gali aktyvuoti OVA specifinius CTL *in vivo*.

Toliau buvo įvertinamas individualaus komponento kombinacijoje su baltymo antigenais santykinis įnašas į CTL indukciją. Imunizacijos tikslais tirpus antigenas buvo maišomas su pagalbinėmis medžiagomis, gaunant stabilią homogeninę emulsiją, kurios dalelių dydis yra tarp 250 ir 300 nm. Tolesniam skvalano-Tween 80-pluroninės rūgšties (STP) kompozicijos komponentų, reikalingų CTL indukcijai, nustatymui pelės buvo imunizuotos ova-skvalano-Tween 80 (ST), ova-pluroninės rūgšties-Tween 80 (PT) ir ova-skvalano-pluroninės rūgšties (SP)

mišiniais, kontrolei naudojant ova-skvalaną (S), ova-Tween 80 (T) ir ova-pluroninę rūgštį (P). Stimulatoriaus kontrolei pelės taip pat buvo imunizuojamos ova-SAFm (turinčiu 70 μg MDP) arba ova-alum mišiniais. Teigiamai kontrolei pelės buvo imunizuojamos blužnies ląstelėmis, į kurių citoplazmą įvestas tirpus ova. Taip pat buvo naudojamos ir kitos kombinacijos ir pakeitimai; rezultatai yra pateikti 1 lentelėje.

CTL aktyvavimo nustatymo tyrimams pelės buvo imunizuojamos vieną kartą. Praėjus dviem savaitėms po imunizacijos, blužnies ląstelės buvo sumaišytos penkioms dienoms su apšvitintais EG7-ova (ova ekspresuojančios EL4 ląstelės) ir testuojamos prieš ^{51}Cr -EG7-ova arba ^{51}Cr -EL4 ląsteles. Rezultatai (fig. 11) rodo, kad 30 μg ova kiekis kombinacijoje su STP arba ST pelėse aktyvuoja I klasės ribotą CTL atsaką. Atrodo, kad ova specifinių CTL aktyvacija ova-STP arba ova-ST yra geresnė negu indukcija blužnies ląstelėmis, kurioms į citoplazmą yra įvestas tirpus ova. ova-PT arba ova-ST gali indukuoti tik nepastovius ir silpnus ova specifinius CTL atsakus pelėse. Kitaip negu SAFm, MDP pridėjimas į ST kompoziciją nesukėlė ova specifinių CTL indukcijos pelėse (2 lentelė). Ova specifinių CTL indukcija nebuvo pastebėta ir tais atvejais, kai pelės buvo imunizuojamos sumaišytu su individualiais komponentais (S, P arba T) ova, o taip pat ova-SAFm arba ova-alum. Imunizuotose pelėse netgi 1 mg ova kiekiu (a) HBSS, (b) SAFm arba (c) alum nebuvo aktyvuoti ova specifiniai CTL.

2 lentelė

ST + MDP neblokuoja ova specifinių CTL atsako indukcijos

Stimuliatorius	Taikinyš**	E:T	citotoksiškumo % pelėse, imunizuotose su			
			ova-ST	ova-ST	ova-ST-MDP 300 μg pelei	ova-ST-MDP 72 μg pelei
EG7-ova	EG7-ova	100:1	0	100	82	76
		33:1	0	86	67	62
		11:1	0	33	39	25
		3:1	0	6	13	3
		1:1	0	0	0	0
		3:1	0	0	0	0

* pelės buvo imunizuojamos įvairiomis kompozicijomis su 30 μg ova

- ** citotoksiškumo % buvo skaičiuojami, atimant sunaikinimo procentą iš antigeną neekspresuojančių ląstelių linijų.

7 pavyzdys: Ova specifinių antikūnų gamybai būtini komponentai

Pelės buvo imunizuojamos tris kartus kas 2 savaitės 30 μ g ova kiekiu kartu su HBSS, STP, ST, PT arba SP. Teigiamai kontrolei pelės taip pat buvo imunizuojamos ova-SAFm, nes žinoma, kad SAFm indukuoja stiprų antikūnų atsaką. Praėjus septynioms dienoms po antros ir trečios imunizacijos, buvo imamas pelių kraujas ir serumas buvo testuojamas ova specifinių antikūnų atsakui. Rezultatai, kurie yra pateikti 3 lentelėje, rodo, kad ova-STP, ova-ST arba ova-SAFm imunizuotose pelėse po dviejų imunizacijų sukelia panašius anti-ova atsakus.

3 lentelė

Anti-ova antikūnų atsakų indukcija

30 μ g ova kompozicijoje	reagavusios pelės/ injekotos pelės	1/ serumo atskiedimo titras
HBSS	0/3	<1/20, <1/20, <1/20
STP	3/3	<1/486, >1/486, <1/486
ST	3/3	>1/486, >1/486, >1/486
PT	NA	NA, NA, NA
SP	NA	NA, NA, NA
SAFm	3/3	1/486, 1/486, 1/486

NA negaunamas

8 pavyzdys: ŽIV gp120 specifinių CTL indukcija

Kaip antra antigeno sistema CTL indukcijos nustatyme buvo naudojama ŽIV gp120 IIIB su STP, ST arba MP-T. Pelės buvo imunizuojamos 1 μ g gp120 IIIB su HBSS, STP, PT arba ST. Kontrolei pelės buvo imunizuojamos 1 μ g gp120IIIB su SAFm arba CFA (pilnasis Freundo stimulatorius), arba su RIBI stimulatoriaus sistema, turinčia MPL (monofosforilipidas A) ir TDM (trehalozės dimikolitas). Praėjus trimis savaitėmis po imunizacijos, paruoštos blužnies ląstelės buvo stimuliuojamos mitomicinu apdorotomis 15-12 transfekanto ląstelėmis arba 18IIIB peptidu. Po penkių dienų auginimo gautos efektorių ląstelės buvo testuojamos prieš vakcinia:gp160 III arba tėvine vakcinia infekuotas P815 ląsteles, kaip taikinius. Rezultatai rodo, kad gp120-skvalano-TWEEN 80 kompozicija indukuoja gp120

specifinių CTL atsaką pelėse, o gp120-skvalanas-TWEEN 80-pluroninė rūgštis ir gp120-HBSS neindukuoja (4 lentelė).

4 lentelė

gp120 specifinių atsakų CTL indukcija pelėse.

Stimuliatorius	Taikinyš**	E:T	gp120-HBSS	citotoksiškumo % pelėse, imunizuotose su	
				gp120-ST	gp120-STP
18IIIb/II2	vac:gp120	100:1	23	42	NA***
		33:1	23	38	NA
		11:1	0	0	NA
		3:1	0	35	NA
18IIIb/II2	15-12	100:1	0	50	0
		33:1	0	35	0
		11:1	0	27	0
		3:1	0	18	0
18IIIb/II2	3T3+18IIIb	100:1	0	59	13
		33:1	0	59	2
		11:1	0	57	0
		3:1	0	29	0
15-12	vac:gp120	100:1	35	84	NA
		33:1	19	65	NA
		11:1	12	37	NA
		3:1	0	22	NA
		1:1	0	0	NA

* pelės buvo imunizuojamos įvairiomis kompozicijomis su 1 μ g gp120IIIb

** citotoksiškumo % buvo skaičiuojami, atimant sunaikinimo procentą iš antigeną neekspresuojančių ląstelių linijų

*** NA; negaunamas

9 pavyzdys: gp120 specifinio humoralinio atsako indukcija pelėse

gp120 specifinio humoralinio atsako indukcijai pelės buvo imunizuojamos 1 μ g gp120IIIb tris kartus kas dvi savaitės. Paimtas iš gyvuliukų kraujas buvo testuojamas pagal IgG buvimą, nustatant gp120 IIIb kietos fazės ELISA bandymu. Rezultatai rodo, kad gp120-ST yra geresnis imunogenas, negu gp120-HBSS, gp120-SAFm arba gp120-STP (5 lentelė).

5 lentelė

Anti-gp120 antikūnų atsako indukcija

1 μ g gp120 kompozicijoje	reagavusios pelės/ injekuotos pelės	1/ serumo atskiedimo titras
HBSS	0/3	<1/2, <1/2, <1/2
STP	1/3	<1/2, >1/486, <1/2
ST	3/3	>1/486, >1/486, >1/486
PT	3/3	>1/486, >1/486, >1/486

SP	2/3	<1/2, 1/54, 1/54
SAFm	2/3	1/18, >1/486, 1/54

10 pavyzdys: gp120 specifinių antikūnų atsakai beždžionėse

Beždžionės (po dvi kiekvienoje grupėje) buvo imunizuojamos gp120-SAFm, gp120-SPT, gp120-ST arba gp120-HBSS. Kontrolei grupė beždžionių buvo imunizuojama rekombinantiniu karvių raupų virusu, turinčiu gp160 IIIb. Beždžionės buvo imunizuojamos dviejų savaitių intervalais, o kraujas paimamas po dviejų ir trijų savaitių po antrosios imunizacijos. Kiekvienos beždžionės pre- ir imuninis serumas buvo eilę kartų skiedžiamas ir, kaip aprašyta medžiagose ir metoduose, ELISA metodu tirtas anti-gp120 aktyvumas. Duomenys (fig.12) rodo, kad gp120-STP arba gp120-SAFm imunizuotose beždžionėse yra sukeliama panašūs atsakai. gp120-ST imunizuota beždžionė indukavo panašų į gp120-SAFm ir gp120-SPT imunizuotos grupės anti-gp120 atsaką. gp120-ST imunizuotoje beždžionėje po dviejų savaitių nebuvo stipraus anti-gp120 atsako.

11 pavyzdys: AF su HPV 16 E7 aktyvumas *in vivo*

1. Imunizacijai reikalingo rekombinantinio HPV 16 E7 baltymo generavimas

a) PCR ir E7 geno klonavimas

HPV 16 E7 genas buvo klonuotas iš plazmidės (gauta iš Dr. Karen Vousden, Ludwig Institute), koduojančios E7 geną, išskirtą iš karcinomos CaSki ląstelių linijos. Koduojančios sritys buvo PCR amplifikuotos naudojant pradmenis, kurie koduoja 5' ir 3' genų galus, flankuotus Bam HI ir Sal I klonavimo vietomis. E7 PCR produktas buvo liguotas į pGEX-4T-1 ekspresijos vektorių (Pharmacia Biotech.), gaunant pGEX.E7 ekspresijos plazmidę. XL1-blue (stratagene) *E.coli* kamienas buvo transfekuotas pGEX.E7 ekspresijos plazmide. Iš gautų kolonijų išskirtų plazmidžių E7 seka buvo identiška E7 sekai iš CaSki ląstelių.

b) Bakteriškai ekspresuoto E7 gavimas ir valymas

Bakterinės ekspresijos pGEX.E7 plazmidė koduoja gliutation-S-transferazės (GST) sulietą baltymą, susidedantį iš GST amino-gale, trombino proteazės skėlimo vietos ir E7 baltymo karboksi-gale. E7 baltymas buvo produkuojamas ir valomas taip, kaip aprašyta pGEX-4T-1 vektoriaus gamintojo (Pharmacia Biotech.) produkto informacijos literatūroje. Trumpai tariant, pGEX.E7 ekspresijos plazmidę turinčios bakterijos, pridėdant į kultūrinę terpę izopropil-b-D-tiogalaktozidazės, buvo indukuojamos ekspresuoti sulietą baltymą. Surinktos ląstelės buvo lizuotos silpnu ultragarsu. Lizatas paveiktas Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech.). Kai sulietas baltymas prisijungė prie matricos, derva buvo perplaunama, norint pašalinti nespecifiškai prisijungusius baltymus. Prijungtas sulietas baltymas buvo skaldomas trombinu, atlaisvinant E7 baltymą nuo GST susiliejo partnerio.

E7 baltymo preparatas buvo analizuojamas SDS-PAGE, o E7 baltymo koncentracija buvo nustatoma Bradford analize (BioRad). Iš litro bakterijų kultūros buvo gaunama 9 mg E7 baltymo.

2. X21 E7 transfekantų generavimas

HPV 16 E7 baltymą (žr. aukščiau) koduojančios sekos buvo įterptos į gamtinę eukariotų IDEC ekspresijos plazmidę INPEP4. Šiame vektoriuje E7 ekspresiją kontroliuoja citomegaloviruso promotoriaus/stiprintuvo transkripciniai elementai. Be to, pirmi trys E7 koduojančios sekos nukleotidai buvo pašalinti ir pakeisti imunoglobulino lengvosios grandinės lyderine seka, kuri buvo patalpinta aukščiau E7 ir suderinta su E7 koduojančios srities skaitymo rėmeliu. Po transfekcijos į pelės ląstelių liniją X21, individualūs G418 atsparūs klonai buvo tiriami northerno blotingo analizės būdu, tikrinant E7 produkciją. Kiekvienas klonas rodė detektuojamą E7 signalą. Vėliau buvo atlikta dviejų tokių klonų 4 E7 ir 1C7 (atitinkamai HOPE1 ir HOPE2) ląstelių lizatų vesterno blotingo analizė, kuri parodė E7 baltymo produkciją.

3. E7/AF tirpaus antigeno imunizacijos aktyvumas *in vivo*

Šiuose tyrimuose buvo naudojamos C3H linijos pelių patelės (H2^{k/k}, Harlan Sprague Dawley). Gyvuliukai buvo laikomi, sekant "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (DHHS Publication No. NIH 86-23, Bethesda, MD:NIH, 1985) ir gavo maistą bei vandenį *ad libitum*. Šiuose tyrimuose buvo naudojama E7 transfekuota HOPE2 H2^{k/k} ląstelių linija. Vėžinių ląstelių linija buvo laikoma kelis kartus persėjus *in vitro*.

Vesternio blotingo analizės metodu, sekant pakartotinį kelią *in vitro*, buvo parodyta, kad ši ląstelių linija išlaiko E7 citoplazminio antigeno ekspresiją. Augliai singeninėse C3H pelėse buvo inicijuojami, subkutaniškai suleidžiant 150000 *in vitro* persėtų ląstelių.

Kas dvi savaitės buvo matuojamas auglių dydis. Auglių tūris (V) buvo skaičiuojamas pagal šią formulę:

$$V (\text{mm}^3) = (L \times W^2) / 2,$$

kur L yra didžiausias išmatuotas ilgis (mm), o W- plotis (mm).

6 lentelėje yra pateikiamas turinčių auglių pelių skaičiaus santykis su gyvuliukų, gavusių injekcijas, skaičiumi. Fig.13 ir 14 duomenys rodo kiekvienos gydamosios arba kontrolinės grupės auglio dydžio (mm³) vidurkį. Kiekviena gydomoji grupė buvo lyginama su negavusia gydymo kontroline grupe. Gydymas buvo pradedamas, praėjus 10 dienų po HOPE2 ląstelių inokuliacijos, kai dauguma auglių turėjo apčiuopiamą dydį (apie 50-75 mm³). Gydymas buvo pradėtas peles imunizuojant tirpiu E7 baltymu su AF arba alum stimulatoriais (subkutaniškai, bendras kiekis - 0,2 ml). Prieš pat imunizaciją Hanks'o subalansuotame druskų tirpale (HBSS) AF 60 sekundžių buvo maišomas su tirpiu E7 baltymu taip, kad kiekviena pelė gautų 0,2 ml tirpalo su 30 arba 90 µg E7 baltymo. Alum (Pierce Chemical Co.) buvo sumaišytas su E7 baltymu pagal gamintojo instrukcijas taip, kad kiekvienas gyvuliukas gautų 0,2 ml tirpalo su 90 µg E7 baltymo. Po 9 dienų (19 dienų po auglio ląstelių inokuliacijos) antrai gydomajai grupei buvo atlikta

pakartotinė imunizacija. Booster imunizacija, kaip aprašyta aukščiau, buvo atlikta prieš pat inokuliaciją.

Šiame pavyzdyje (6 lentelė: xp #233), praėjus 41 dienai po auglio inokuliacijos, tik 4/8 ir 5/8 gavusių vienkartinę tirpaus E7 (atitinkamai 30 arba 90 μg) su AF injekciją pelių turėjo išmatuojamus auglius. Priešingai, kaip parodyta fig.13, žymi auglio augimo inhibicija, lyginant su kontrole arba alum gydytomis grupėmis, buvo pastebėta tik tose gydomosiose grupėse, kurios buvo imunizuotos E7-AF. Auglio augimo inhibicija (fig.13) arba padidėjęs auglio nykimo greitis (6 lent.) nebuvo pastebėtas pelėse, gavusiose vienkartinę E7-alum injekciją.

Panašūs rezultatai taip pat buvo pastebėti ir gydomosiose grupėse, kurios gavo dvi imunizacijas, praėjus 10 ir 19 dienų po auglio sukėlimo (6 lent., fig.14), nors buvo pastebėtas šio toks auglio augimo sulėtėjimas gavusiose E7-alum injekcijas pelėse.

Rezultatai rodo, kad žymus antinavikinis aktyvumas buvo pastebėtas imunizuojant tirpiu E7 su AF, kas buvo nustatyta pagal sumažėjusį auglių turinčių pelių skaičių ir auglio augimo inhibiciją. Priešingai, visi gyvuliukai, kurie buvo imunizuoti vienkartinę arba dvikartinę tirpaus E7 baltymo ir alum injekcija, turėjo augančius auglius. Trumpai sakant, imunizacija tirpiu E7 baltymu su AF sukėlė žymią auglio ląstelių augimo inhibiciją, kuri nebuvo pastebėta imunizuojant tirpiu E7 su alum.

6 lentelė

Imunizacijos tirpiu E7, esančiu stimuliatoriuje, antinavikinis aktyvumas.

Exp. #	Gydymas	Dozė (μg /pelei)	Gyvuliukai su augliu ^a . 41 diena
223	Kontrolė		7/8
223	E7-AF	30 $\mu\text{g} \times 1^b$	4/8
223	E7-AF	90 $\mu\text{g} \times 1$	5/8
223	E7-alum	90 $\mu\text{g} \times 1$	8/8
223	E7-AF	30 $\mu\text{g} \times 2^c$	3/8
223	E7-AF	90 $\mu\text{g} \times 2$	1/4
223	E7-alum	90 $\mu\text{g} \times 2$	8/8

- a. turinčių auglių pelių skaičius/ inokuliuotų pelių bendras skaičius
- b. visos imunizacijos pradėtos, praėjus 10 dienų po implantacijos
- c. antra imunizacija ($\times 2$) įvykdyta, praėjus 19 dienų po implantacijos

Kiti realizavimo variantai yra pateikti šio išradimo apibrėžtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Kompozicija, besiskirianti tuo, kad ji susideda iš papilomaviruso antigeno, sumaišyto su mikrosuskystinta antigeno kompozicija, į kurią įeina:

- a) stabilizuojantis detergentas,
- b) miceles sudarantis agentas ir
- c) biologiškai skaldomas ir biologiškai suderinamas agentas,

kurioje minėta antigeno kompozicija yra stabilioje “alyva-vandenyje” emulsijoje; ši antigeno kompozicija iš esmės neturi imunostimuliuojančių peptidų, ir ją skiriant žmonėms, prijaukintiems ir žemės ūkio gyvuliams galima sukelti specifinį citotoksinių T-limfocitų atsaką prieš kompozicijoje esantį papilomaviruso antigeną.

2. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad papilomaviruso antigeną pasirenka iš grupės, kurią sudaro HPV16 E6 antigenas, HPV16 E7 antigenas, HPV18 E6 antigenas, HPV18 E7 antigenas, HPV6 E4 antigenas, HPV6 L1 antigenas, HPV11 E4 antigenas ir HPV11 L1 antigenas.

3. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad detergentą pasirenka iš grupės, kurią sudaro Tween 20, Tween 40 ir Tween 80, alyvą pasirenkama iš grupės, kurią sudaro skvalanas, eikozanas ir pristanas, o miceles sudarantį agentą pasirenka iš grupės, kurią sudaro Pluronic L62LF ir polioksameras 401.

4. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad detergentas yra polisorbatas 80, o miceles sudarantis agentas yra polioksameras 401.

5. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad detergentą pasirenka iš grupės, kurią sudaro polisorbatas 80, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Zwittergent 3-12, Teepol HB7 ir Span 85.

6. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad miceles sudarantį agentą pasirenka iš grupės, kurią sudaro polioksameras 401, Pluronic L62LF, Pluronic L101, Pluronic L64, EG1000, Tetronic 1501, Tetronic 150R1, Tetronic 701, Tetronic 901, Tetronic 1301 ir Tetronic 130R1.

7. Kompozicija pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad dalelių dydis kompozicijoje yra tarp 250 ir 300 nanometrų.
8. Kompozicijos pagal 1-7 apibrėžties punktus panaudojimas vaistų, skirtų aklinio vėžio gydymui, gamybai.
9. Kompozicijos pagal 1-7 apibrėžties punktus panaudojimas vaistų, skirtų smailiagalės kondilomos gydymui, gamybai.

FIG. IA

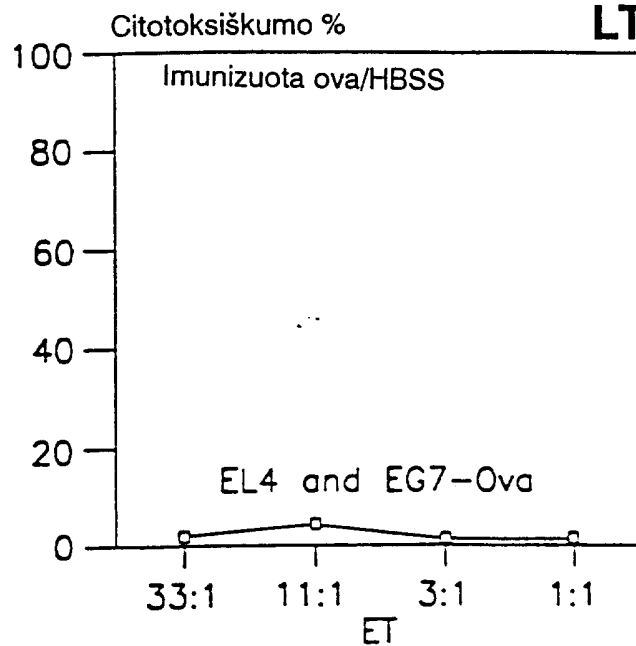


FIG. IB

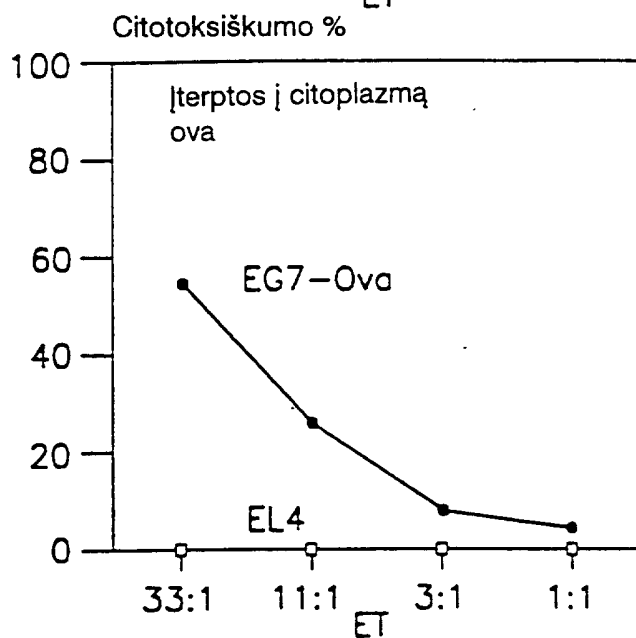
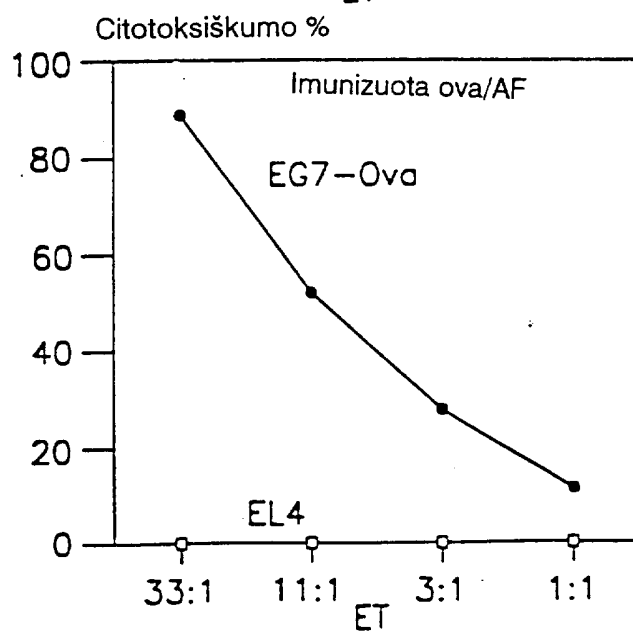
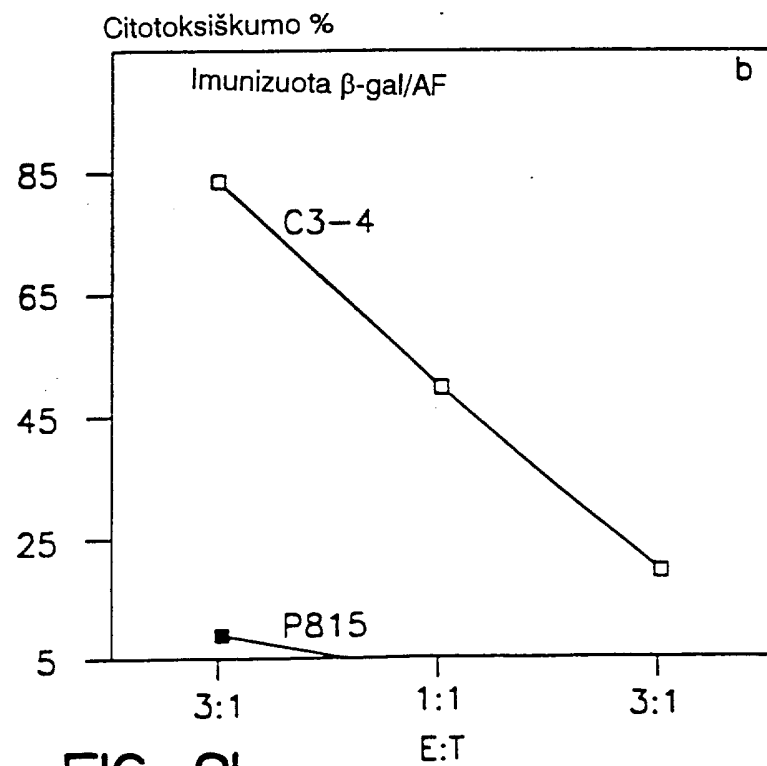
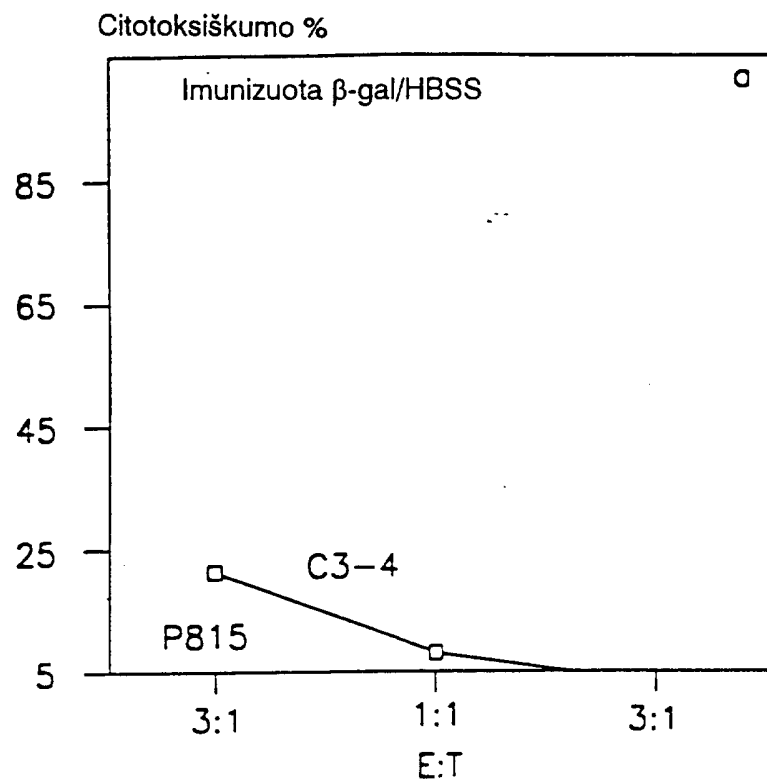


FIG. IC





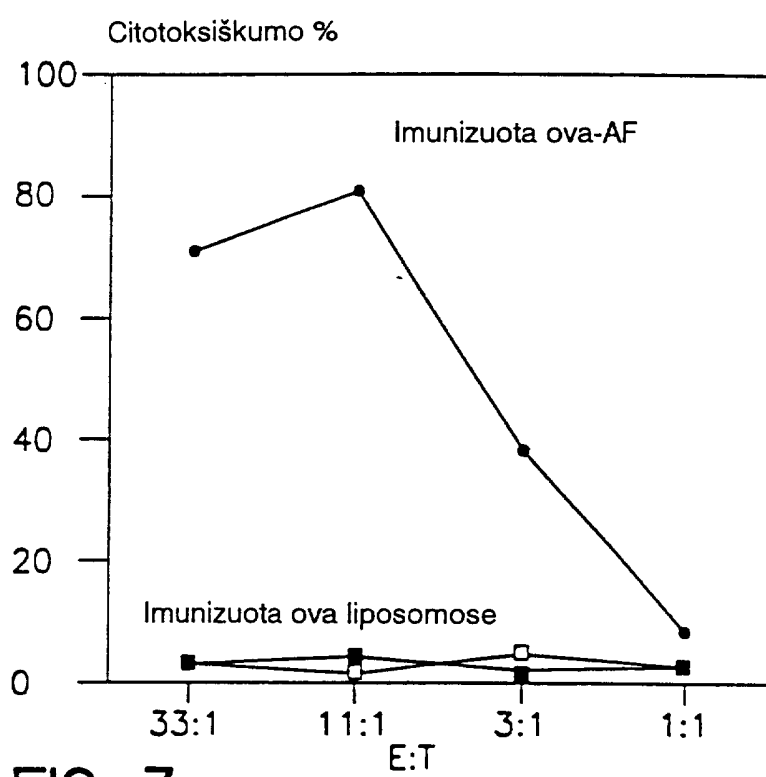


FIG. 3

FIG. 4a

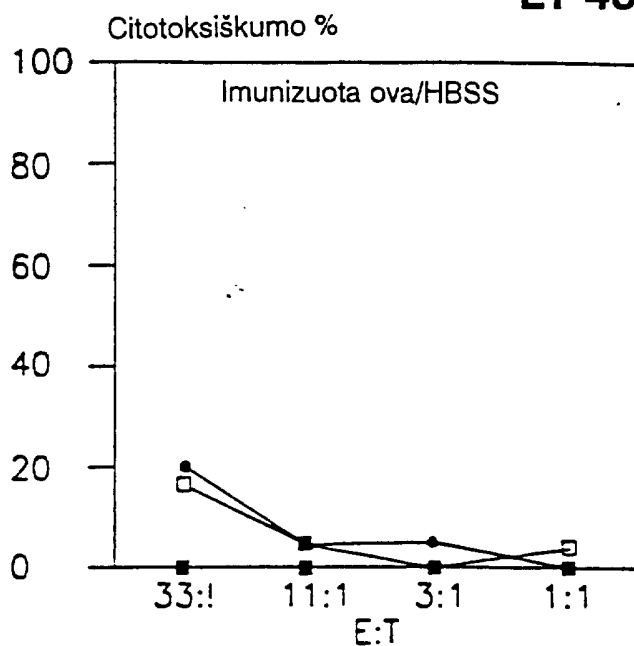


FIG. 4b

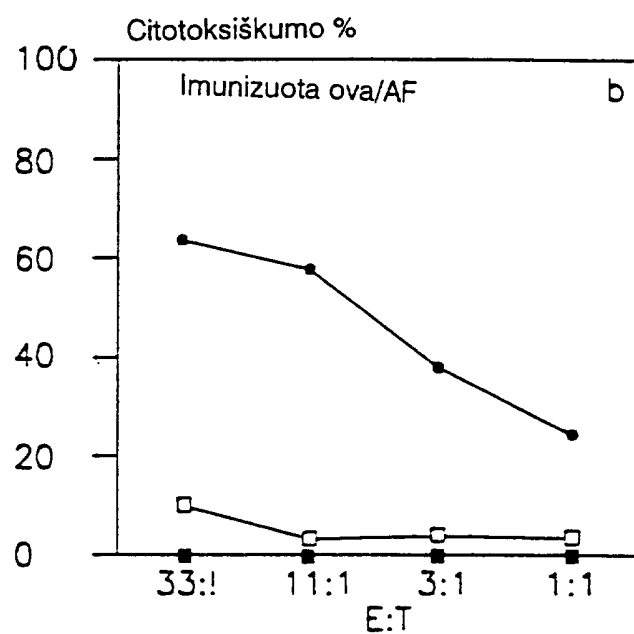
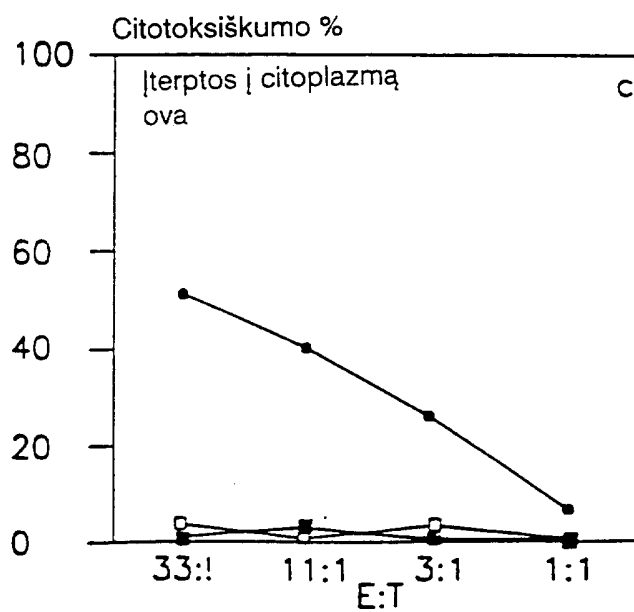


FIG. 4c



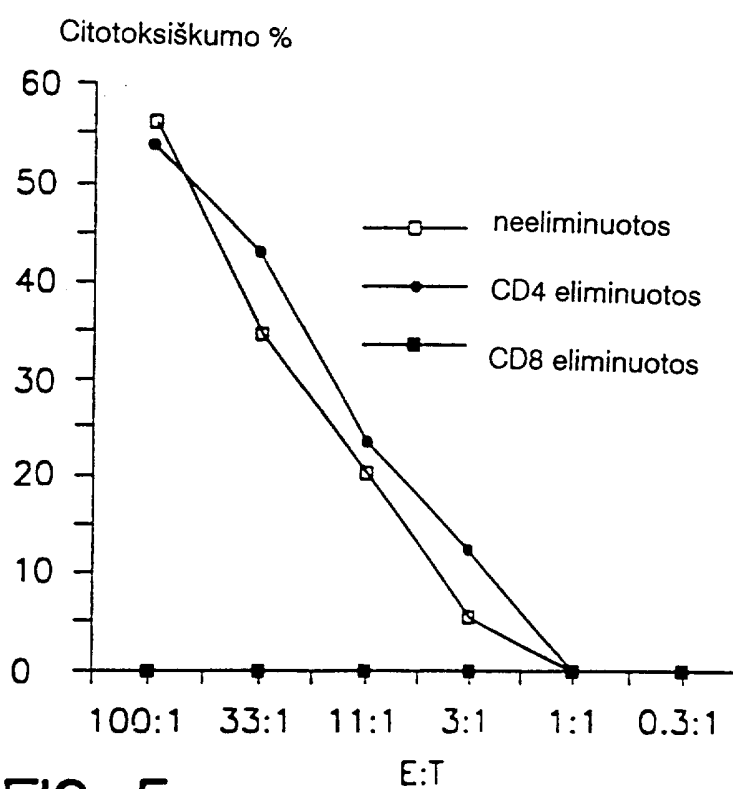


FIG. 5

6 / 12

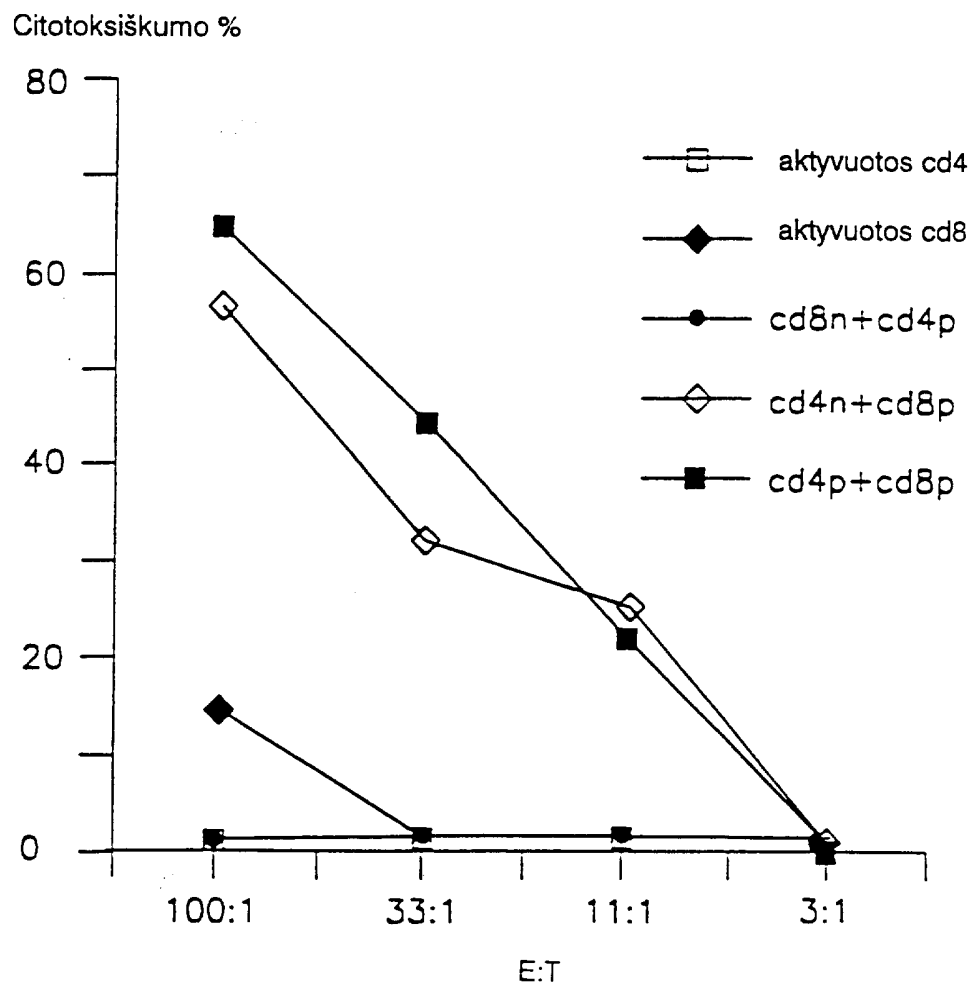


FIG. 6

7/12

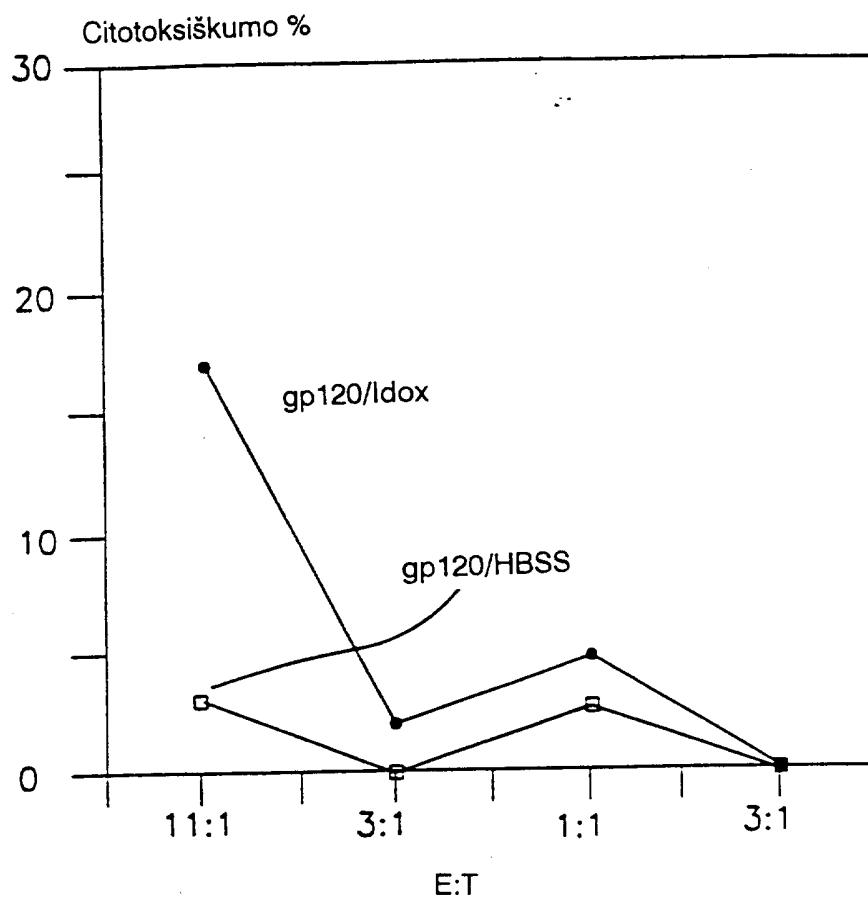


FIG. 7

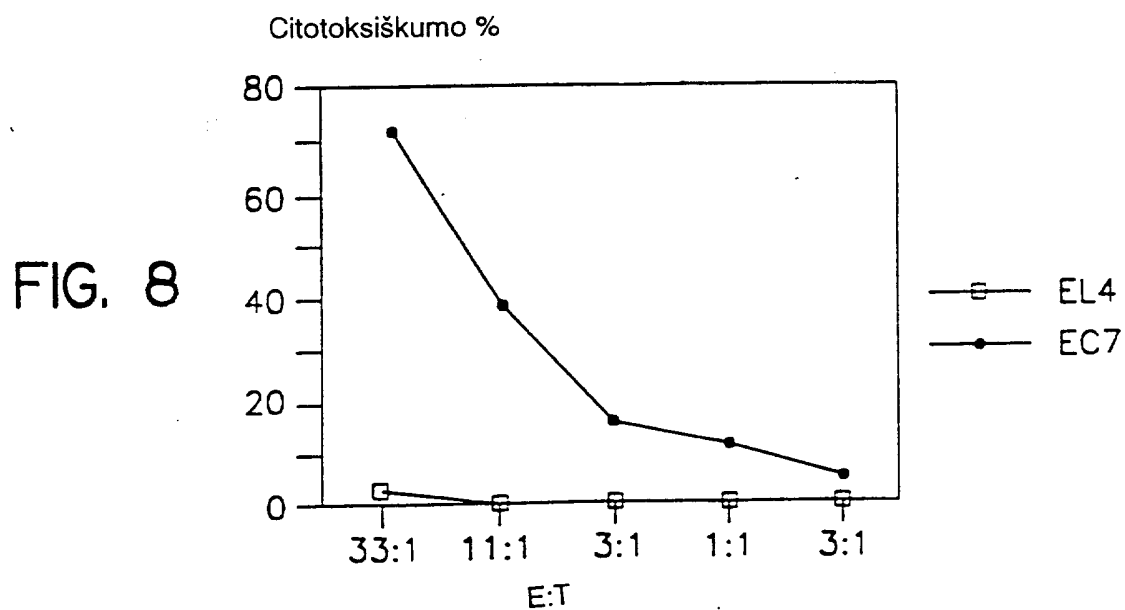


FIG. 8

8/12

FIG. 9

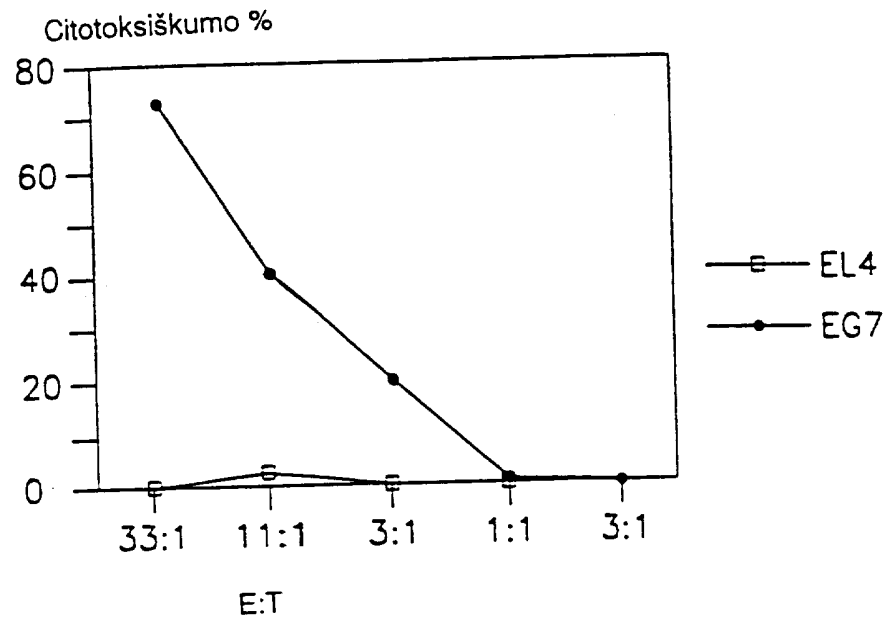


FIG. 10

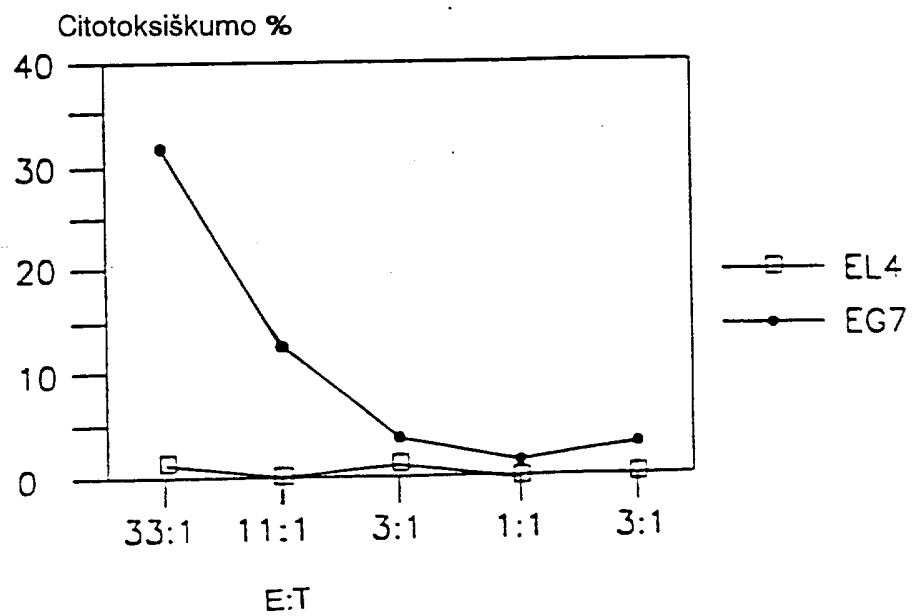
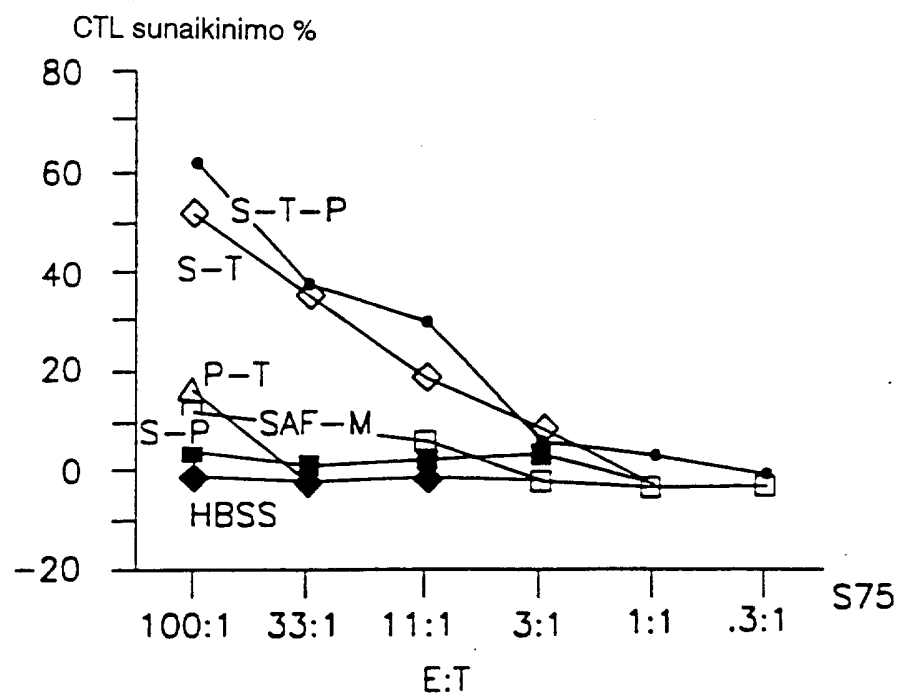


FIG. II



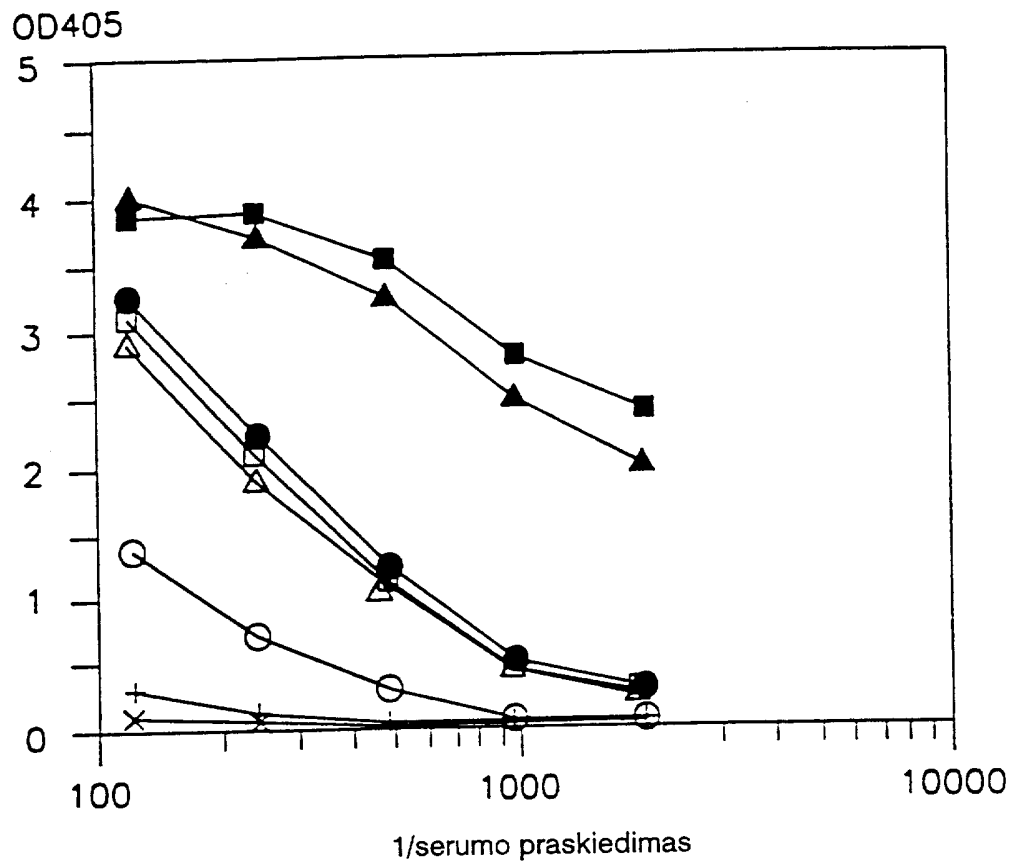
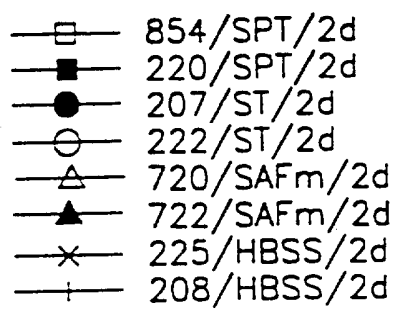


FIG. 12



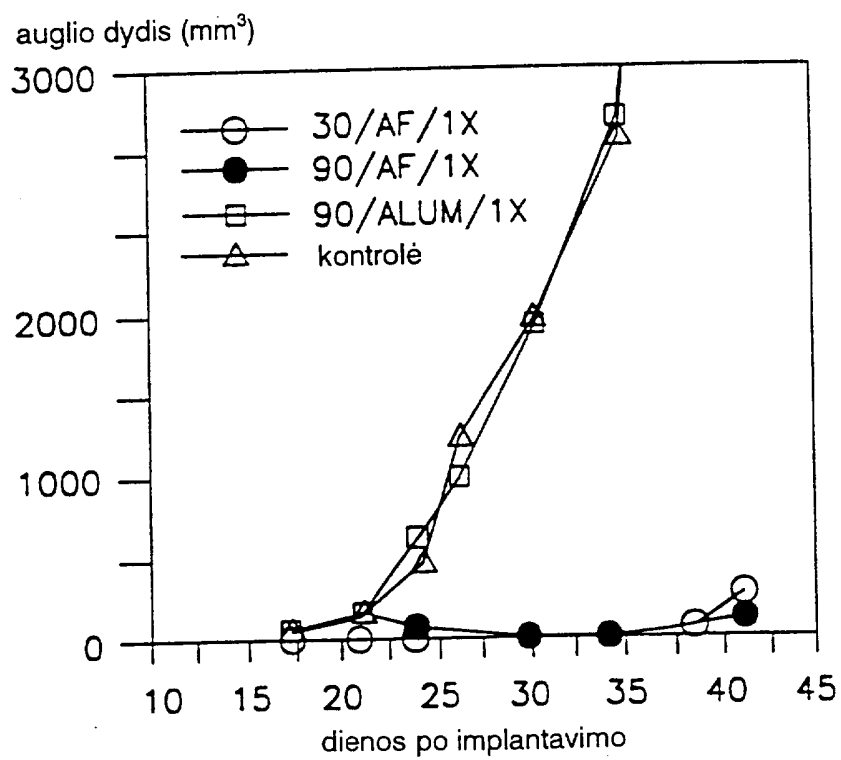


FIG. 13

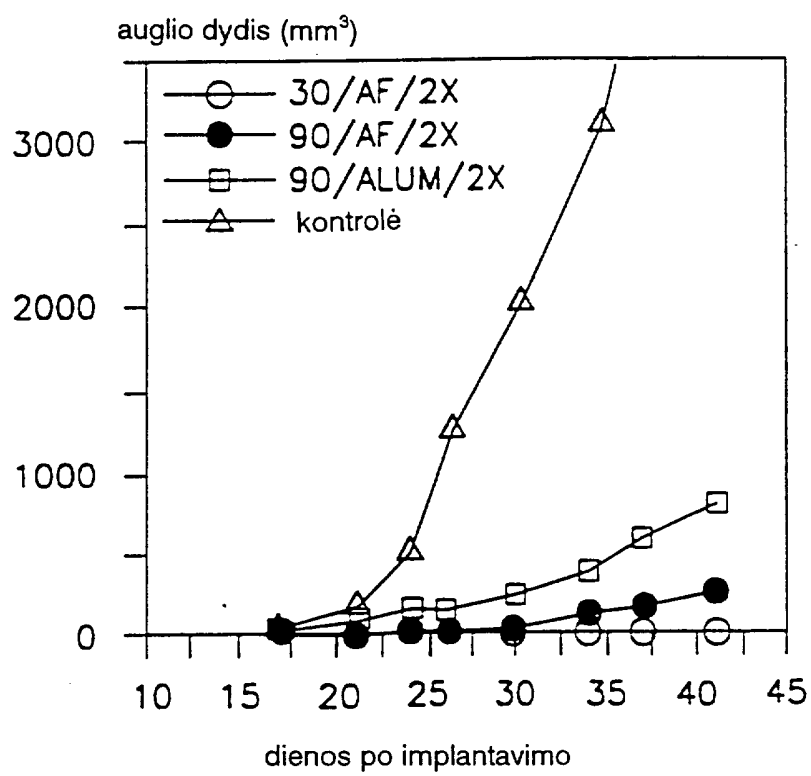


FIG. 14