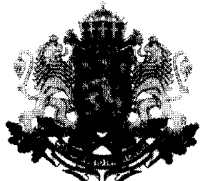


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 97519A

(51) A61K 39/21
C12N 15/49
C07K 15/04

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 97519 (22) Заявено на 10.03.1993 (24) Начало на действие на патента от:				(71) Заявител(и): MICROGENESYS INC. , , , MERIDEN,CT , MERIDEN,CT (US) ; (72) Изобретател(и): SMITH , GALE E . , GUILFORD (US) ; VOLVOVITZ , FRANKLIN . , NEW HAVEN (US) ; (74) Представител по индустриална собственост: Фани Владимирова Божинова , 1000 София , п.к.728	
Приоритетни данни				(86) № на PCT заявка: PCT/ US92/0 / 4980 , 10.06.1992 (87) № и дата на PCT публикация: 92/226 / 54 , 23.12.1992	
(31) 714152	(32) 11.06.1991	(33)	US		
(41) Публикувана заявка в бюлетин № 2 24.03.1994 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:					
(62) Разделена заявка от рег. №					

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА СЪСТАВ НА HIV ВАКСИНА

(57) Ваксината на синдрома на придобита имунна недостатъчност (спин) съдържа човешки имунодефицитен вирус, тип-1 (hiv-1) повърхностни протеини, продуциран след клониране на hiv-1 повърхностни гени от векторна система на заразени с бакуловирус клетки на насекоми. Рекомбинантните hiv-1 протеини се пречистват, обединяват се в частици и след това се адсорбират върху алуминиево-фосфатен аджувант. Получената форма на адсорбиран рекомбинантен hiv-1 вирусен повърхностен протеин (ваксина срещу спин) е силно имуногенна при животни и отделя антитела, които се свързват към hiv-1 вирусната обвивка и неутрализират инфекциозността на вируса при тестове in vitro. Посочената ваксина срещу спин предизвиква нов хуморален и клетъчен имуен отговор у hiv инфектирани пациенти и е полезна под форма на ваксинотерапия за забавяне или предпазване от разрушаване на имунната система.

9 претенции , 0

BG 97519A

МЕТОД ЗА ИЗЛУЧАВАНЕ НА СЪСТАВ НА HIV ВАКСИНА

Това приложение се явява отчасти продължение на САЩ патент серия № 151,976, регистриран през м. февруари, 3,1988, серия № 920,197 регистриран 16. 10. 1986 /сега серия № 585,266/. Тези регистрации и цитираните тук резюмета са включени в резюмета изцяла.

ДАНИИ ЗА ИЗОБРЕГЕНИЕТО

Човешкият имунодефицитен вирус Тип-1 /HIV-1/ е ретровирус, който причинява инфекция на целия организъм с главна патология в имунната система и е етиологичен агент отговорен за Синдрома на придобита имунна недостатъчност /AIDS/. *Bazze-Sinoussi* и сътр., *Science* 224:868-871 /1983/; *Popovic* и сътр., *Science* 224: 497-500 /1984/. Клинично изолирания HIV-1 се отнася към свързания с Лимфаденопатиите вирус /*Feozino* и сътр., *Science* 225: 69-72 /1984/ и AIDS -свързания вирус /*Levy* и сътр., *Science* 225: 840-842 /1984/.

AIDS /СПИН/ стана пандемична болест и разработването на ваксина придоби главен приоритет за здравео на хората от цял свят. Висок процент от хората заразени с HIV-1, показва прогресираща загуба на имунната функция, дължаща се на изчерпване на T₄ лимфоцитите. Тези T₄ клетки, също както определени нервни клетки, имат молекула на повърхността наречена CD₄. HIV-1 разпознава молекулата CD₄ чрез рецептор намиращ се върху обвивката на вирусните частици, прониква в тези клетки и накрая /ебентуално/ ги репликира и убива.

Очаква се ефективната СПИН ваксина да предизвиква образуване на антитела, които да се свържат с обвивката на HIV-1 и да предотвратят индектирането на T₄ лимфоцитите или на други податливи клетки.

Обикновено, ваксините се дават на здрави хора преди да се

приложат на болни, като имунна пр. профилактика. Обаче, логично е да се обсъди използването на ефективна СПИН ваксина след подлагане на имунизация като имунотерапия срещу заболяването. *Salk, J., Nature* 327: 473-476 /1987/.

Широко е разпространено схващането, че обвивката на HIV-1 е най-обещаващата съставка при създаването на СПИН ваксина. *Francis и Petricciani, New Eng. J. Med.*, 1586-1559 /1985/; *Vogt и Hirsch, Reviews of Inf. Disease*, 8: 991-1000 /1986/; *Fauci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9278-9283. HIV-1 обвиващият протеин е първоначално синтезиран като гликопротеин с молекулно тегло 160,000 /гп 160/. Перкусорът гп 160 се разцепва на външен гликопротеин с молекулно тегло 120,000 /гп 120/ и трансмембранен гликопротеин с молекулно тегло 41,000 /гп 41/. Тези обвиващи протеини са основните антигени за антитела при болни от СПИН. *Barin и сътр., Science*, 228: 1094-1096 /1985/. Доказано е, че нативния HIV-1 гп 120 е имуногенен и е способен да предизвика неутрализиране на антителата при гризачи, кози, маймуните резус и шимпанзета. *Robey и сътр., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7023-7027 /1986/.

Поради много ниските нива на нативния HIV-1 обвиващ протеин в инфектираните клетки и рисковете свързани с приготвянето на СПИН ваксина от HIV-1 заразени клетки, използват се рекомбинантни D NA методи за производство на HIV-1 обвиващи антигени при получаването на СПИН ваксини. Рекомбинантната D NA технология се явява най-добрата за производството на СПИН ваксина поради възможността за получаване на големи количества сигурни и икономични имуногени. HIV-1 обвиващият протеин се изявява като генетично изменящ се рекомбинантен вирус на шарката по кравите. *Chakrabarti и сътр., Nature* 320: 535-537 /1986/;

Нил, и сътр., *Nature*, 320: 535-540 /1986/; *Kieny*, и сътр., *Biotechnology*, 4: 790-795 /1986/. Обвиващият протеин присъства и в бактериални клетки *Putney*, и сътр., *Science*, 234: 1392-1395 /1986/, в клетки на бозайници *Lasky* и сътр., *Science*, 23: 209-12 /1986/, и в клетки на насекоми. Синтетични пептиди, извлечени от аминокиселинна поредица в HIV-1 gp41 също се смятат за кандидати за СПИН ваксина. *Kennedy* и сътр., /1986/. Но, до сега не е произведена успешно СПИН ваксина, използвайки тези материали и методи.

Използването на бакуловир с носител насекомна клетка за производство на рекомбинантни HIV-1 обвиващ протеин е единият аспект на изобретението открито в САЩ патент серия № 920,197 регистриран 16.10. 1986 /сега серия № 585,266/. Вижте също серия № 151,976.

Системата бакуловир показва, че е най-полезна в производството на HIV-1 протеин и други протеини. Например, бакуловирът *Autographa californica* ядрен полихедрозов вирус /AcIPV/ е използван като носител за изразяване цялата дължина gp 160 и различни количества HIV-1 обвиващ ген в заразени клетки на *Spodoptera frugiperda* /Sf 9 клетки/. В приложенията на предшестващия патент се разкриват също стволовият ген gp 160 /рекомбинант № Ac 3046/, протеин произведен от рекомбинант Ac 3046, и пречистващата техника за Ac3046 генен продукт, която включва лещовидна лектинафинитетна хроматография и гел филтрираща хроматография. По този начин протеина gp160 се пречиства и агрегира под формата на частици, които са по-имуногенни при гризачи и примати.

Идеалната СПИН ваксина, в допълнение към изискванията за субстанциално биологически чиста и непирогенна, осигурява продължителна протекция срещу инфекция с HIV-1 след една или няколко инжекции. Това е обичайно за случаите с атенюирана ваксина. Когато

10.03.93

убити бактерии или вируси, или изолирани от тях материали, като токсини или протеини, се използват за производство на ваксина, често резултатът е лош антитяло отговор и само краткотраен имунитет. За да се избегнат или намалят тези недостатъци на ваксината, може да се добави една допълнителна съставка, наречена адювант. Адювантите са материали, които помагат за стимулиране на имунния отговор. Адювантите при обичайно използване в човешки ваксини са гелове на алуминиеви соли /алуминиев фосфат или алуминиев хидроксид/, обикновено като адювант се използва стипца.

Bomford и стр., "Адванти" *Animal Cell. Biotech.* том 2: 235-250, *Academic Press Inc.* /Лондон: 1985/.

Настоящото изобретение предлага ваксина и методи за лечение на човешкия имунодефицитен вирус /HIV/, включващи приложението на рекомбинантен HIV обвиващ протеин върху заразени или податливи индивиди. Е предпочитаните включвания, обвиващият протеин може да бъде пречистен, агрегиран и комбиниран с адювант /напр. стипца/ за ваксинна употреба.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ЧЕРТЕЖИТЕ

Детайлите на това изобретение са представени с резюме към намиращите се по-долу чертежи.

Фигура 1 илюстрира копиращата стратегия използвана за изолиране на HIV-1 обвиващ ген /обв/ от *E. coli* плазмид pNA₂. Захвърляните области са HIV-1 DNA поредица и отворените области са от копираните носители. Черната област в плазмид p1774 е създадена от синтетични олигонуклеотиди и е въведена като *SmaI-KpnI* фрагмент в *SmaI-KpnI* места в плазмид p1614. Показана е поредицата от този синтетичен олигонуклеотид.

Фигура 2 илюстрира стратегията използвана за получаването на рекомбинантен плазмен носител /p3046/, който поред се използва

за създаване на рекомбинантният бакуловирус изразяващ носителя Ас3046. Плазмидът рМ853 съдържа поредица /полетата с пресечени крихи/ от бакуловирус АсNPV от двете страни на клонираното място на позиция 4.00. Това място е единственото ограничително ендонуклеарно място за *SmaI*, *KpnI* и *EcoII*. Активаторът АсNPV полихедрин е на 5' направление от 4.00 позиция. Поредицата 5'-ТААТТААТТАА-3' е на 3' направление и има терминално препредаване и в трите прочетени структури. Плазмидът р1024 и поредицата от синтетичен олигонуклеотид е описана във Фиг. 1. Плазмидът р3046 съдържа всички от рМ853, с изключение на поредицата между *SmaI* и *EcoII*, където се вмъква HIV-1 обвиващият ген на р1774.

Фигура 3 показва нуклеотидната последователност на D NA ограничаваща Ас3046 gp160 в кодова последователност. На фиг. 4 е показана 3046 сбв. D NA последователност между +1 и +2264.

Фигурите 4а-4к показват актуалната I IIA последователност на HIV-1 обвиващ генен сегмент по-нататък със синтетичната олигонуклеотидна поредица на 5' на обвиващия ген в Ас3046 /между 3 + 1 и +2264/. Локализацията на ограничителните ендонуклеарни места се регистрират по-горе от D NA поредицата и предполагаемата аминокиселинна поредица е регистрирана над DNA поредицата. Базите са номерирани от ляво и от дясно.

Фигурите 5а-5с сравнява DNA поредицата на обвиващия ген на Ас3046 с публикуваната последователност на обвиващия ген от LAV-1. LAV-1 последователността е от горе а Ас3046 е от долу. Линия /1/ под LAV-1 поредицата показва, че последователността в Ас3046 е същата в тази позиция. Номерирането на IIIA поредицата е същото, както описаното от *Wain-Hobson* и сътр., *Cell*, 40:9-17 /1985/ за LAV-1.

Фигура 6 показва крайната точка на титрите разтворимост при ELISA метод на човешки HIV-1 антитяло позитивен серум /върха на графиката

и серум на резус маймуни /долната графика/ от животни имунизирани с гп 160 /~~LS~~ 55, KL 55/ или гп120 /AB 55, CD 55, GH55/. ELISA титрите са измерени срещу високо пречистени гп120 и гп160. Специфично свързаното антитяло е измерено с кози анти-човешки IgG IRP конюгат. Титърът е най-високата разтворимост на серума, която дава позитивен отговор в теста.

Фигура 7 е таблица обобщаваща ваксината гп160- предизвикала имунен отговор у ваксинираните серопозитивни пациенти.

Фигура 8 /А и В/ показва ваксина предизвикала антитяло отговор насочен срещу специфични HIV обвиващи епитопи.

Фигура 9 показва ваксина предизвикваща Т-клетъчен пролиферативен отговор на гп160 у ваксинирани серопозитивни пациенти.

Фигура 10 /А-С/ показва лимфоцитен пролиферативен отговор свързан с ваксинацията.

Фигура 11 е графика показваща процентната промяна на CD 4 клетките реагиращи или не реагиращи извънредно.

РЕЗЮМЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Открито е, че рекомбинантния HIV-1 гп160 обвиващ протеин /"ргп 160"/, особено когато е адсорбиран върху адювант такъв като стипца /т.е. алуминиев фосфат/ е особено полезен като сприн ваксина. Един аспект от това изобретение е AcNPV носител, имащ кодовата последователност за част от HIV-1 обвиващия ген, който обгражда аминокиселините 1-757 намерени в рекомбинантния клон № 3046. Друг аспект на изобретението е производството на този рекомбинантен HIV-1 обвиващ протеин /и самия протеин/ в клетки на насекоми- особено ргп 160 кодиран от аминокиселинната поредица 1-757 /C3046/.

Други аспекти на това изобретение включват пречистване и формиране на рекомбинантни обвиващи протеинни частици от генния продукт на рекомбинантния бакуловирус, който произвежда

3046 протеин и адсорбция на 3046 частици да агрегира на алуминият дискат.

Изобретението включва също профилактични и/или терапевтични ваксини за СПИН или HIV инфекции и методи за предпазване или лечение на СПИН или HIV инфекция.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Следните примери илюстрират изобретението без да ограничават неговия обхват.

Рекомбинантният бакуловирус *Autographa californica* ядрен полихидрозен вирус /АсЯПВ/, който съдържа стволот HIV-1 гп 160 ген кодиран за аминокиселини 1-757 на HIV обвиващия протеин /рекомбинантен Ас3046/ е описан *U.S* приложение Серия №920,197 /сега сериен № 585,260/. Клонираните етапи използвани за конструиране на рекомбинантния бакуловирус-съдържащ гени или части от гени от HIV-1 са също показани тук и включени в резюмето.

Следва пълно описание на генните инженерни етапи използвайки за създаване на Ас3046 носител. Материалите използвани включват: изиски и имунологични реагенти, получени от комерсиални ресурси. Също така има примери показващи как да се направи и използва изобретението.

Други рекомбинантни обвиващи протеини, отнасящи се колективно като ргп 160, са също предвидени и включват рекомбинантни гп 120 гп 41. Ас 46 е само един пример на носител и рекомбинантен обвиващ протеин според изобретението.

ПРИМЕР 1

Конструкция на бакуловирус рекомбинант Ас 3046 носещ кодираната HIV-1 последователност за аминокиселини 1-757

Клонирането и изразяването на чужда протеинова кодирана последователност в бакуловирус носител изисква изравняване на кодираната последователност с полихидрин активатора и нагоре в поредицата от една страна и с бакуловирус кодирана последователност от друга страна.

10.03.93

Изравняването е такова, че хомоложната рекомбинация с бакуловирусния геном довежда до прехвърляне на чужда кодирана поредица изравнена с полихидринният активатор и неактивен полихидрин ген.

Създадени са множество вмъкнати носители за употреба в HIV обвиващи ген конструкции. Вмъкнатият носител MG53 описан по-долу е създаден да поддържа АТГ препредаване на началната информация. Вмъкването на чужда поредица в този носител трябва да бъде построена така, че препредадената структура установена от началната информация ^{да} се поддържа правилно чрез чуждата поредица.

Вмъкнатият носител MG53 е конструиран от EcoRI-I ограничаващ фрагмент клон на DNA изолиран от пречистен изолиран AcMNPV / T-1/. MG53 има следните структурални черти: а/ 4000bp от поредицата в горната част на АТГ инициален кодон на генът полихедрин; б/ полилинкер вмъкнат чрез отстрани дирижирана мутагенеза, който се състои от АТГ инициален кодон на позиция на съответстващия полихедрин кодон, и ограничителни места Sma I, Kpn I, Not I и универсален стопкодон сегмент; в/ 1700 bp от поредицата простиращ се от Kpn I ограничително място /което е вътрешно на полихедрин генът/ през крайния EcoRI ограничително място на EcoRI-I клон. Фиг.2.

• ПРИМЕР 2

Създаване на бакуловирусни рекомбинанти носещи LAV обвивни кодиращи поредици

Рекомбинантен плазмид обозначен NA2 /Фиг.1/ съдържа 21.8 kb сегмент на цял HIV-1 провирус вмъкнат в pMC18. Този клон може да стане заразителен когато произведе вирус следващо превръщането на някои /определени/ човешки клетки. *Adachi* и сътр., *J.Viro.* 59: 284-291 /1986/. Цялата ген обвиваща поредица съдържаща се в NA2 произхожда от LAV вид на НГ. *Bazze-Sinoussi* /1983/.

HIV-1 обвиващият ген е изолиран и създаден както е описано по-долу и показано на Фигура 1. Обвиващият ген е първоначално изо-

от
лиран ~~вект~~ NA2 като 3846 bp EcoRI/SacI ограничаващ фрагмент и
клонирани в EcoRI/SacI ограничаващата страна pUC19. Полученият
плазмид е означен p708.

Впоследствие обвиващият ген е изолиран отново като 2800 bp
KpnI ограничаващ фрагмент и клониран в KpnI ограничаващата стра-
на на pUC18. Полученият клон е означен p1614.

KpnI ограничаващият фрагмент в p1614 съдържа лека стволова
частица на HIV обвиващия ген, така че 121bp от N-терминалната
съответстваща последователност липсва. Тази липсваща частица в
гена, която включва сигналната пептидна поредица е заместена
чрез вмъкване на двойно усукан синтетичен олигомер. Вмъкнатият
олигомер е създаден от LAV аминокиселинна поредица използвайки
предпочитана полихедрин ген кодон практика. За да се улесни по-
нататъшната манипулация, нова SmaI ограничаваща поредица се
вмъква едновременно вместо ATG първоначалния кодон. ATG инициал-
ния кодон е заместен от бакуловиррусния носител. Полученият плаз-
мид е означен като p1774.

Според фигура 2, ограничаващи фрагменти от p1774 съдържащи
кодирана последователност от различни области на HIV обвивката,
са клонирани в MCS ~~ВМЪКНАТИ НОСИТЕЛИ~~ /MCS3/ така че ATG инициален
кодон на вмъкнатия носител в структурата е кодона на обвиващия ген.
Построеният p3046 се състои от SmaI/BamHI ограничаващ фрагмент
изолиран от p1774 вмъкнат в SmaI/XbaII страната на плаз-
мидния носител pGS3. Този клон съдържа поредица кодирана за
аминокиселини 1-757 на gp160 и използва терминален кодон замес-
тен от MCS3 носителя.

ПРИМЕР 3

Приготвяне и селекция на рекомбинантен бакуловирус

HIV обвиващият ген рекомбинантен плазмид p3046 с Калциев
ацетат преципитиран с Ac⁺NPV DNA /WT- 1/ и добавен към не-
инфектирани *Spodoptera frugiperda* клетки. Тогави жолтият ген

се вмъква в AcMNPV генома чрез хомоложна рекомбинация. Рекомбинантни вируси са идентифицирани чрез негативна оклузия на морфологична плака. Такива плаки проявяват идентификационен цитопатичен ефект, но не и ядрени оклузии. Осъществяват се две допълнителни пречиствания на последователни плаки, за да се получи чист рекомбинантен вирус. Рекомбинантен вирусен DNA е анализиран за странично специфично вмъкване на HIV обвивачата последователност чрез сравняване на техните ограничаващи и хибридиращи характеристики, с широкия тип вирусен DNA.

ПРИМЕР 4

Изразяване на HIV обвивка от рекомбинантни бакуловируси в заразени клетки на насекоми.

Изразяването на HIV обвивача последователност от рекомбинантни вируси в клетки на насекоми би дало резултат в синтеза на първичен транслационен продукт. Този първоначален продукт се състои от аминокиселини транслирани от кодоните заместени от рекомбинантния носител. Резултатът е протеин съдържащ всички аминокиселини кодирани от АТС инициалния кодон на експресивния вектор в долната част на определящия сигнал върху експресивния вектор /носител/ - ~~хорхт~~ ргп 160. Първичният транслационен продукт на Ac3046 трябва да разчете Met- Pro-Gly- Arg -Val на терминала където Arg /позиция4/ е Arg на позиция 2 в оригиналния LAV клон. Met- Pro-Gly кодоните са заместени в резултат на клониращата стратегия.

ПРИМЕР 5

Нуклеотидна последователност на гликопротеина /гп/ 160 вмъкнат и фланкиращ DNA.

Нуклеотидната последователност на гп160 вмъкнат и фланкиращ DNA е определена от ограничаващи фрагменти изолирани от вирусен експресивен носител Ac3046 DNA. Последователната стратегия включва следните етапи. 3.9 ко EcoRV-Bam HI фрагмента е пречистен

чрез ограничаващо разтваряне на Ac3046 вирусен DNA. Ac3046 вирусният DNA е приготвен от екстрацелуларен вирус намиращ се в медията на клетки използвани за производство на група ваксини.

Както е показано на Фигура 2, 3.9 ко EсоPV-Ва HI фрагмента се състои от целия gp160 ген и 100 ор от горната част и около 1000 ор от долната на фланкиращата DNA. Така е определена нуклеотидната последователност на целия gp ген включвайки 100ор от горната част и 100 бр от долната на фланкиращата DNA.

Накратко, резултатите от последователността показват желана конструкция, както предполагаемите от клониращата стратегия. Последователността на gp160 е важна, както е съобщено от *Wain-Hobson* и сътр., /1985/. Последователността на 2253 бази между предполагаемата инициална транслация и определящите кодони предвижда 751 аминокиселинни кодони и 28 потенциални N-свързани въглехидратни страни. Изчисленото молекулно тегло на този rgp160, включващо захарните остатъци е приблизително 145,000.

Последователни анализи на 200 бази от фланкираща DNA показват при авилно вмъкване, както е показано на фигури 3,4,5.

ПРИМЕР 6

Аминокиселинна последователност на gp160

Използвайки стандартна автоматична *Edman* деградация и NPIС процедури е определена N- терминалната последователност на първите 15 остатъка и тя е същата като предвидената от DNA последователността. N-терминалният метионин не присъства в gp 160. Наблюдавано е, че AcNPV полихедриален протеин е също произведен без N-терминален метионин. Обобщение на действителния gp160 DNA и N-терминална протеинна последователност са определени чрез анализи на AcNPV 3046 DNA и пречистения gp160 /Табл.1/

ТАБЛИЦА 1

NAU обвиван ген в AcNPV 3046 експресивния вектор /носител/

таблица 1

IAV обвиващ ген в AcNVP3046 експресивния вектор /носител/

Остатък

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

Тези резултати са сравнени с оригиналния IAV-1 клон както следва /таблица 2/.

Таблица 2

IAV обвиващ ген в оригиналния IAV-1 клон

Остатък

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

ПРИМЕР 7

Пречистване на рекомбинант gp160

Един аспект от настоящото изобретение е процедурата за извличане и пречистване на рекомбинанта HIV-1 обвиващ протеин кодиран за Ac3046 експресивен вектор /носител/. Рекомбинантният HIV-1 обвиващ протеин gp160 е произведен в *S. frugiperda* клетки за 4-5 дни след заразяване с Ac3046. Пречистването на този рпп160 включва следните етапи:

1. Промиване на клетките
2. Клетъчен лизис
3. Гел филтрираща хроматография
4. Пентил лектин афинитетна хроматография
5. Диализа

Този пример описва пречистването на рекомбинантния gp160 от около 2×10^9 Ac3046 инфектирани клетки.

1. Промиване на клетките. Инфектираните клетки се промиват в буфер съдържащ 50 mM Трис буфер /рН 7.5/, 1 mM EDTA и 1% Тритон X-100. Клетките са ресуспендирани в този буфер, хомогенизи-

рани използвайки стандартни методи и центрофугиране при 5000 за 20 мин. Този процес се повтаря три пъти.

2. Клетъчен лизис. Промитите клетки се лизират чрез соникация в 50 mM Трис буфер /pH 8.0-8.5/ 4% деоксихолат и 1% бета меркаптоетанол. Соникацията се извършва използвайки стандартни методи. След соникация само остатъци на ядрената мембрана остават незасегнати и се премахват чрез центрофугиране при 5000 rpm за 30 минути. Супернатантът съдържащ извлечения gp160 няма цели клетки както е определено чрез наблюденията със светлинна микроскопия.

3. Гел филтрация. Гел филтрацията се извършва в 5.0 x 50 cm стъклена колона обвита с *Sephacryl resin /Pharmacia/*. Общият основен обем е около 1750 мл. За да се депирогенизира и санира колоната и свързващите тръби за период от 24 часа през колоната преминава 0.1 M NaOH. Потокът от колоната е свързан с UV поток клетки и монитор и записващо устройство */Pharmacia/* и след това е еквилибриран с 4 литра гел филтриращ буфер. Непречистеният gp160 е добавен в колоната и обработен с гел филтриращ буфер.

Колоната разделя непречистената смес на три главни UV абсорбиращи фракции. Първият пик излиза между около 500-и 700 мл вторият - между 700 и 1400 мл и третият - между 1400 и 1900 мл буфер. Същият този профил е наблюдаван при малки аналитични колони от които е определен, че първият пик е материал с молекулно тегло по- голямо или равно на 2,000,000.

Този пик е полупрозрачен вследствие концентрация на високо молекулно тегло на липиди и липидни комплекси. Този пик също съдържа от 10 до 20% gp160 извлечен от заразените клетки. Нее съмнено тази фракция на gp 160 е комплексна за себе си или други клетъчни компоненти, за да формира високо молекулно тегло на агрегатите.

Вторият голям пик се състои от преобладаване на gp160 и протеини с молекулно тегло между около 18,000 и 200,000.

Третият пик съдържа малко протеин и преобладаващата UV абсорбция се дължи на бета меркаптоетанол в пробата.

Когато вторият пик се забелязва пръв от трасирането на UV абсорбцията потокът от колоната се прилага директно върху лентил лектин колоната. Веднъж вторият пик излезъл от колоната, потокът се разрушава от лентил лектин колоната и се изхвърля като отпадък.

4. Лентил лектин . Лентил лектинният афинитетен гел медия *Lentil-Lectin-Sepharose 4B* е получен в голям обем от *Pharmacia*. Лентил лектинът е изолиран чрез афинитетна хроматография върху *Sephadex* до повече от 98% чистота и след това е имобилизиран чрез съединяване със *Sephadex 4B* използвайки цианов бромид. Матриксът съдържа около 2мг лиганд за 1мл гел. Лентил лектинната колона е 500 x 30 см стъклена колона *Pharmacia* съдържаща 125 мл лентил лектин-*Sephadex 4B* гел. Афинитетната матрица се използва отново след като е била старателно измита и възстановена чрез процедура препоръчана от заместителя. Когато гелът не се използва той се съхранява в разтвор от 0.9% NaCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, и 0.01% тимерозал. Колоната се измива и еквилибрира с 250 мл лентил лектин буфер, описан по-горе преди всяка употреба.

Непречистеният gp160 се прилага към колоната направо като се пречистен от гел филтриращата колона, описано по-горе. Веднъж непречистеният gp 160, се свързва с колоната, промива се с 800 мл лентил лектин буфер съдържащ 0.1% деоксихолат. При тези обстоятелства целият gp160 се свързва с колоната. Лентил лектин буфер плюс 0.3 M алфа- метил манозид се използва за пречистване на свързаните гликопротеини, които са мониториранни чрез UV монитор на дълги вълни 280nm.

5. Диализа. Захари и дезоксихолати се премахват чрез конвенционална диализа.

Пречистването на gp160 от 1 л инфектирани клетки може да бъде обяснено в следната таблица / Таблица 3/.

При друго приложение конвенционалната йонообменна хроматография / анионна или катионна/ може да се използва вместо гел филтрацията. Редът на етапите не е строго определен: например, гелфилтрацията или йонообменната хроматография може да бъдат след лентил лектин пречистващия етап. Според изобретенията могат да бъдат използвани и други реагенти. Например, могат да бъдат използвани други детергенти за пречистване на рекомбинантния протеин вместо дезоксихолат. Те включват нейонни детергенти като *Tween 20* /полисорбат 20/, *Tween 80*, *Lubrol* и *Triton X-100*.

ТАБЛИЦА 3- ОБОБЩЕНИЕ НА ПРЕЧИСТВАНЕТО

Пречистващ етап	Общ протеин	gp160 /мг/	%gp160 общ	Отстранени контаминанти
Еръгла клетка / <i>Pellet</i> /	1-2000	20	1-2	Средна култура
1,2,3 ^{то} промиване	250	15	6	Серум Албумин, много нуклеинови к-ни, разтворими клетъчни протеини
Гел филтрация	120	12	12	липиди, нуклеинови к-ни и агрегати с високо молекулярно тегло
Лентил Лектин	14	10	70	негликозилирани протеини
Диализа	13	9	70	захар, дезоксихолат, излишък на Трис буфер

ПРИМЕР 8

А. Събиране на частици от gp160

Според един от аспектите на настоящото изобретение е открито, че gp160 антигена може да бъде събран на частици с молекулно тегло по-голямо или равно на 2,000,000 по време на пречистването. Гликопротеинът -gp160 е извлечен от клетката като смес от 80-90% мономерен /160,000 мол. тегло/ и 10-20% полимерен /частици/. Етапът гел филтрация ~~на gp160~~ премахва съединените форми на gp160. Опити за пречистване на gp160 от тази фракция /първият пик излиза от гел филтриращата колона/ предполагат, че е комплексен с други клетъчни протеини, дори е възможна с мембранны фрагменти. Обаче, gp160 антигена във втория пик при излизането от гел филтриращата колона има молекулна маса от около 160,000-300,000 и ето защо е в преобладаваща мономерна или димерна форма.

Формирането на агрегати или полимери на gp160 настъпва по време на създаването на лентил лектин колоната. Определено е, че антигенните форми агрегират било чрез отделяне от лектин колоната в 0,5% деоксихолат, който е около 0,2% от критичната мицелна концентрация ~~XXX~~ /КМ/ за деоксихолат или gp160 е отделен от колоната в 0,1% деоксихолат.

Размера на агрегатите е измерен на FPLC *Superdex* 12 колона */Pharmacia/*. Проби от представени групи от пречистен gp160 имат размер, който е предимно еднакъв или по-голям от 2,000,000 молекулно тегло на стандартния размер син декстран.

Учението за кръстосаните връзки на *Schmalzer* и сътр., /1989/ показва, че gp160 произведен в клетките на насекоми е тетрамер от идентично представяне. То също показва, че gp160 в заразените ^{ВІВ} СНІУ клетки и вирусните частици е тетрамерен.

Така рекомбинантните gp160 частици могат да имат третични и кватернерни структури, които са подобни на тези намерени в нативния HIV gp160.

Подходяща триизмерна структура може да бъде важна за формирането на епитопи, които изискват правилно нагъване на gp160. Вероятно е че както негликозираните протеини се отстраняват от свързване с gp160 антигена по време на свързването и промиването към лентил лектин колоната, хидрофобните части на gp160 започват да формират интермолекулярни съединения. Деоксихолата вероятно не е свързан с gp160 като концентрацията може да бъде запазена над ЮНК и антигена все още да формира комплекси. Съединяването на този антиген в агрегати се явява вътрешно свойство на протеина веднъж пречистен според изобретението. Възможно е много хидрофобната N- терминална последователност представена върху gp160 да допринася за естествената възможност на този протеин да формира частици. След пречистването, gp160 комплексите могат да бъдат стерилно филтрирани през 0,2 микрона целулозен ацетатен филтър без синуификантна загуба на протеин.

Б. Анализ на образуването на частици

Анализ на пречистени gp160 частици чрез електронна микроскопия показва, че те са протеиноподобни сферични частици от 30-100nm.

Като допълнителен тест за наличието на частици пречистения gp160 е анализиран чрез гел филтрация. Около 10 микрограма gp160 са приложени към 12, FPLC гел филтрация HP 10/30 колона *Pharmacia, Lys* 1. Тази колона за първи път е калибрирана със стандартни протеинни молекулни тегла. Протеинният профил на тази колона е високо репродуцируема; разделният обем е универсално пропорционален на молекулярното тегло на протеинните стандарти. Колоната разделя мономерния протеин gp160 от полимерните форми и отхвърля сферични протеини с молекулярна маса по-голяма или равна на 2×10^6 . Когато се разбива тази колона, най-важните пречис-

тени гп160 се отделят в свободен обем и тяхното молекулно тегло е по-голямо или равно на $2 \times 10^6 / 2,000,000$.

ПРИМЕР 9

А. Адсорбция на гп160 на стипца

Ефективността на неразтворимите алуминиеви съединения като имунологични адюванти зависи от пълнотата на адсорбцията на антигените върху твърда фаза. Като част от настоящото изобретение е открито, че съединенията на стипцата могат ефективно да адсорбират гп160, но при рН, което няма да редуцира способността на гп160-стипца комплекс като имуноген. Факторите контролиращи образуването на тази стипца /алуминев фосфатен гел/ са :

1. Оптималното рН за адсорбция на антигена от стипцата е около 5.0. Установено е обаче, че гп 160 губи своята имуногенност при рН 6,2 в сравнение с рН 7,5 , така че стипцата е направена при рН $7,1 \pm 0.1$. Установено е, че при това рН 100% от гп160 се адсорбират от стипцата.

2. Йонната здравина на NaCl е представена релативно ниска и хххххххх е по-малка от 0.15 M.

3. Налице е сларен излишък на алуминиев хлорид отрязан с натриев фосфат, за да бъде осигурена липсата на свободни фосфатни йони.

4. Гликопротеин 160 антигенът е добавен към прясно образувана стипца, за да спре растежа на кристалите и да сведе до минимум размера на частиците.

Процедурата за получаване на 200 мл стипце и адсорбиране пречистен гп160 от стипцата е такава, че крайната концентрация на антигена е $4 \mu\text{g} / \text{ml}$, както е схематично изложено по-долу.

Б. Приготвяне на реагенти /200 мл общо формулирана група/

Приготвяне на следните разтвори в 100 мл стерилни, аспирген-

ни шишета или стъкленици. Смесване на солите за Разтвор 1 и Разтвор 2 и натриев хидроксид и филтриране през 0.2 микрона целулозни ацетатни филтри в 100 мл стерилни, апирегени шишета.

Разтвор 1	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.895 грама
	$\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.136 грама

Разтваряне в 40 мл вода за инжектиране /ВЗИ/, 0.2 микрона филтър

Разтвор 2	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.234 грама
-----------	---	-------------

Разтваряне в 40 мл ВЗИ, 0.2 микрона филтър

Разтвор 3	NaOH	2.0 грама
-----------	---------------	-----------

Разтваряне в 100 мл ВЗИ, 0.2 микрона филтър

Разтвор 4	Трис	1.25 грама
-----------	------	------------

Разтваряне в 100 мл ВЗИ, добавяне на 1мл към 90 мл ВЗИ, жустиране рН на 7.5 с 0.5 N HCl и вземане 100 мл с ВЗИ

Автосклавиране на разтворите за 30 минути; бавно изпускане. Схлаждане на стайна температура.

Е. Образуване на ствипа

1. Добавяне Разтвор 1 /алуминиев хлорид-натриев ацетат/ към определенния съд, използвайки 25 мл стерилни пипети. Отбелязва се обема на Разтвор 1 и се разбърква.

2. Добавяне на Разтвор 2 /натриев фосфат/ към съда, използвайки 25 мл стерилни пипети; продължава разбъркването като се образува утайка и се отбелязва обема на Разтвор 2.

3. Добавяне на 3 мл от Разтвор 3 /натриев хидроксид / и продължава разбъркването 5 минути. Взема се 0.5 мл проба и се измерва рН. Ако рН е по-малко от 7.0, добавя се 0.5 мл натриев

хидроксид, разбърква се още 5 минути и отново се определя рН. Това се повтаря докато рН стане между 7.0 и 7.2.

4. Определяне общия обем добавен към определения съд /Разтвор 1 + Разтвор 2 + Разтвор 3/, след това се добавя стерилна ВЗН до получаване 100 мл обем.

5. Веднага се добавят 8,000 микрограма от пречистен гп160 в 100 мл от 1ММ Трис рН 7.5 направо в определения съд.

6. Продължава разбъркването за минимум 20 минути, след това създадената ваксина се разпределя в стерилни ампули.

ПРИМЕР 10

Имуногенност на абсорбирания от стипца гп 160 /Специфичен А8 отговор/

Приет метод за определяне имуногенността на антиген препарата /ваксина/ е измерването на специфичен антитяло отговор у групи мишки, на които са дадени единични дози от антигена. В края на 4-та седмица от мишките се взема кръв и серумното антитяло ниво към определен антиген /обикновено антигенът използван за имунизирание на животното/ се измерва чрез стандартен антитяло тест, напр. ELISA.

Имуногеността при мишките на пречистен гп160 без адювант при рН 6.0 и рН 7,5 адсорбиран със стипца /както е списано в Пример 9/ или смесен с *Freund* пълен адювант са отбелязани по-долу /табл.4/.

Таблица 4

Група		гп160		Сероконверсия	
		ELISA			
гп160	Адювант	Група	OD ²	%	/ P/N/ ³
1 μ g	няма, рН 7,5	8702	0.140	57%	4/6
	няма, рН 6.0	8702	0.110	26%	2/7
	Стипца	8702	1.000	90%	3/10
	Стипца	8705	2.285	100%	6/6
		8604	1.108	83%	5/6

		8702	1.396	100%	7/7
0.1 <i>mg</i>		8604	0.434	67%	4/6
	Стипца	8705	1.003	67%	4/6

Мишките имунизирани с единична доза 1 микрограм gp160 антиген без добавяне на някакъв адювант, предизвикват анти тяло отговор срещу gp160 /вижте таблицата по-горе/. Много по-силен анти-тяло отговор се наблюдава при групи мишки имунизирани с 1 микрограм gp160 адсорбиран на стипца адювант. Единична доза по-малка от 0.1 микрограма gp160 смесена с пълем *Freund* или образувана със стипца е сероконвертираща по-вече или равно на 50% при имунизираните мишки. GP160 антигенът е имуногенен при мишки като неопределен антиген при pH 7.5 и при pH 6.0, но има загуба на имуногенност при по-ниски pH.

2

На мишките се взема кръв на 28 ден след имунизацията и серумът се тества при разреждане 1:10 в EII A опит срещу гел пречистения gp160. Подобни резултати са получени използвайки търговски ELISA /Genetic Systems Inc; EIA^m ELISA / опит срещу нативните HIV-1 протеини при серумно разреждане 1:400.

3

Броят на сероконвертните мишки /P/ към общия тестван брой /N/.

ПРИМЕР 11

Имуногенност на стипца абсорбирала gp160 /ELISA серумно изследване/

Гъвкавостта на пробна ваксина да предизвика имуногенен отговор е много важно биологично свойство. За да се потвърди, че стипцата ~~кърмиле~~ формулирала gp160 ваксина е имуногенна при животни и да се потвърди, че стипца адюванта повишава тази имуногенност, са извършени следните експерименти.

В деня 0, мишките /групи x 10/ се инжектират с единична доза

/ 0.5 микрограма, 1 микрограм или 5 микрограма/ само gp160, gp160 адсорбиран от стипца или gp160 в пълен *Freund* адювант /ПОА/. На 28 ден от мишките се взема кръв и серума се проверява от ELISA / 1: 10 разреждане/ за наличието на антитела към gp160.

Резултатите от серума извлечен на 28 ден са отбелязани в таблицата по-долу /Таблица 5/. Във всички групи повече от 50% от мишките показват сероконверсия. При всички дози броят на сероконверсиите и средната серумна абсорбция /OD₄₅₀ и т. при разреждане 1:10 в ELISA опита/ са по-високи от с gp160 абсорбиран от стипца, отколкото този получен при мишки имунизирани само с gp160.

Тези резултати показват, че стипца адюванта значително повишава имуногенността на gp160 антигена.

-----Таблица 5- 28 дни след инжектирането-----

	0.5 μ g доза средно		1.0 μ g доза средно		5.0 μ g доза средно	
	p/N ⁴	OD ⁵	p/N	OD	P/N	OD
gp160	9/10	.407	7/10	.699	7/10	.430
gp160/стипца/	9/10	.547	8/10	.797	10/10	1.347
gp160/ПОА/	10/10	1.130	10/10	1.967	10/10	1.317

ПРИМЕР 12

Неутрализиращи данни

HIV-1 неутрализиращи опити са приет метод за определяне дали антитяло препарат ще забави HIV-1 вирус на податливи човешки лимфоцитоклетъчни култури. Резултатите от Антисерума на животни имунизирани с gp160 е тестван в HIV-1 неутрализиращ спит и резултатите са обобщени в долната таблица /Таблица 6/.

⁴ Броят на мишките, които са сероконвертни /P/ сравнен с общия брой на тестваните /N/ на 28 ден след имунизация с 0.5

10.00.00

микрограма, 1.0 микрограм или 5 микрограма от VaxSyp HIV-1.

⁵ Средната абсорбция /OD₄₅₀/ на мишките, които са сероконвертни, както е измерена от EII A метод срещу gp160 при разреждане на серума 1:10.

Таблица 6

Животно	Идентификация	Имуноген/ адювант	Микрогр. ⁶	Неутрализиращ титър
Резус	C55	gp120/стипца	16/8/8	1:80-1:160
Резус	H55	gp120/стипца	16/8/8	1:80-1:160
Резус	I 55	gp160/стипца	16/8/8	≥ 1:80
Мишки	Пул 3	gp120/	.25/.25/.25	1:40-1:80
Мишки	Пул 8	gp160/	.1/.1/.1	1:40-1:80
G.P	Пречистен	gp160	10/10/10	1:320

Guinea pigs /гвинеийски прасета/, зайци и Резус маймуни също са имунизирани с gp160 /използвайки стипца или *Freund* като адювант/. Имунизирането на тези животни произведе добър антигенен отговор срещу HIV-1 обвиващите протеини.

ПРИМЕР 13

Имуногенност при шимпанзетата

Генетично шимпанзето е най-близко до човека и в момента е единственото животно модел за инфектиране с HIV-1. В сигурен имуногенен опит при три шимпанзета, две от тях са имунизирани с 40 микрограма или 80 микрограма gp160 ~~като адювант~~ в стипца формулирана ваксина. Всяко от животните получава реимунизация /бустер имунизация/ на 4-та седмица с 40 микрограма и 80 микрограма gp160 съответно. Контролно животно е ваксинирано в същото време с 1 мл физиологичен разтвор. Седмичните серумни проби на всяко шимпанзе

10.03.90

са анализирани за антигела към gp160 и към HIV-1 вирусните антигени използвайки три имунологични опита, ELISA опит срещу пречистен gp160 развит от _____ и търговски HIV-1 ELISA опит. Резултатите от тези анализи са описани по-долу.

A. ELISA /MS/ проучване HIV 160/

ELISA метод, *MG Search* HIV 160, *MG Search* е западена марка на *Micro Gen Sys.* в Мерилен, Кънектикът, САЩ е имуносорбентен метод срещу gp160 описан в патентно приложение *сериални №920197* /сета № 585,266/.

Серумните проби взети преди имунизацията и през единайсетте седмици следващи първоначалната имунизация са разредени в съотношение от 1:10 до 1:100,000 и след това са инкубирани с нитроцелулозни лентички на места съдържащи 100 пречистен gp160. Крайната точка на разреждане на титъра е най-високото разреждане, при което теста е положителен за анти-gp160 антигено, както е определен с конюгата кози анти-човешки *IgG*-алкална фосфатаза.

Серумните проби на контролното животно и от преимунния серум на имунизираното животно са негативни. Шимпанзето, което е получило 80 микрограма доза е позитивно при разреждане 1:100 до втората седмица, а шимпанзето, което е получила доза от 40 микрограма е положително до четвъртата седмица при разреждане 1:10. Антигено титрите към gp160 продължават да нарастват до петата седмица, по което време крайната точка на разреждане на титрите е приблизително 1:100,000 и 1:2,000,000. Антигено титърът в двете животни спада малко през 6-11-та седмици.

Този вид отговор е еднакъв качествено и количествено с антигено отговорите съвместно наблюдавани при шимпанзета, ваксини-

рани с човешка хепатит В вирусна ваксина.

Б. Търговски ELISA тест

Ясно е от *MG Serotech* HIV 160 ELISA и *Western blot* анализи на серума на имунизирани с *Max Sym* шимпанзета, че те са сероконвертни и имат антитела срещу рекомбинантния gp160. За да се определи дали те също произвеждат анти-HIV антитяло, което разпознава нативните вирусни обвиваващи протеини, преимунният серум и серумът от първата до единадесетата седмица са тествани в узаконен търговски ELISA тест кит, IAV EIATM тест кит на *Genetic System Corporation*, Сиатъл, Вашингтон. Животното ваксинирано с 80 микрограма gp160 е позитивно до втората седмица при разреждане 1:100 и продължава да показва повишаване нивото на антителата през шестата седмица. Животното имунизирано с 40 микрограма е позитивно при разреждане 1:100 до шестата седмица.

ПРИМЕР 14

Разпределение на антителата между gp120 и gp41

Важно е да се установи дали антитяло отговорите срещу gp160 у ваксинирано животно са насочени срещу gp41, gp120 или и към двете. Множество имунологични методи радиоимунопреципитация /РИП/, имуофлуоресценция /ИФ/, *Western blot* анализи /WB/ и количествена ELISA срещу три различни рекомбинантни обвиващи антигена се използват за да определят и измерят разпределението на антитела срещу различни области на HIV-1 обвиващите протеини.

Фигура 6 обобщава имунната реактивност на три различни рекомбинантни гена: /ART/ /TAB/ /1/ gp120-делта / ствол рекомбинантен HIV-1 gp120 с около 40 аминокиселини липсващи от С-терминала на молекулата /; /ART/ /TAE/ /2/ gp120 / с цяла дължина рекомбинантен HIV-1 gp120; и /ART/ /TAB/ /3/ gp160.

Човешкият серум от 50 пациенти с Позитивни HIV-1 антитела и 3 извлечени човешки серуми са силно реактивни с gp160, средно реактивни с gp120 и малко или ареактивни срещу стволския gp120. Вероятно, стволният gp120, който представлява повече от 90% от HIV-1 външния gp, съдържа протективни детерминанти. Наблюдението, в което човешки ~~ВИН~~ позитивен серум има няколко антитела към тази област на обвивката е съчетано с факта, че имунният отговор на вирусната инфекция не е напълно протективен и че човешки позитивен серум обикновено показва ниско ниво на неутрализираща активност ~~ин~~ витро.

Обратно, резус маймуните имунизирани или с gp160 имуноген, или със стволния gp120 имат антитела, които реагират бурно със стволния ~~gp120~~ ^{антиген} част на HIV-1 обвивката. Тази разлика в разпределяне на ~~разпознаващите~~ страни по вирусната обвивка и по-високите титри наблюдавани при маймуните може да обясни факта, че серума на маймуната има висок неутрализиращ титър.

Количествена оценка на имунореактивността на тези три рекомбинантни обвиващи антигени с човешки и имуноген резус серум е представен на Фигура 7. Тестуваният серум на всички маймуни има висок титър антитела срещу стволния /трункиран/ gp120 антиген /gp120-делта/ включително и тези от животни имунизирани с gp160.

Тези резултати показват, че рекомбинантният gp160 предизвиква антигенен отговор у резус маймуни, който е различен от този появяващ се често по време на естествена инфекция. Има епитопи в gp120-делта област на gp160, които са разпознати в имунизирани маймуни, но не са виждани от човешката имунна система по време на инфекция. Тези нови епитопи могат да се окажат важни за предпазване от HIV-1 и важно свойство на рекомбинантният gp160 за предпазване и лечение на HIV - инфекция.

ПРИМЕР 15

Терапевтично прилагане на ваксина

Извършен е клиничен опит с 30 HIV- серопозитивни пациенти за определяне ефектите от ваксинирането с клониран HIV gp160 /произведен в бакуловирусната система, както е описана по-горе/ върху Пациентите.

Ваксинирането с рекомбинантния gp160 води до увеличаване в gp160 HIV-специфични хуморални и клетъчни имунни отговори при 19 от 30 /63%/ HIV-серопозитивни доброволци. 14 от 15 /93%/ доброволци получили 6 дози от ваксината показват нарастване на общия gp160 антитяло. Ето защо, рекомбинантни HIV протеини /rgp41, rgp120, rgp160 и прибавените към тях смеси/ могат благоприятно да бъдат прилагани в метод за лечение на пациенти заразени с HIV.

Ефективните количества HIV протеин използвани в прилагането на изобретението, могат да бъдат определени според добре известни в областта техники, такива като тези представени по-долу. По принцип такива ефективни количества могат да варират между около 1 микрограм и около 100 микрограма за кг човешко тегло. Честотата на прилагане също може да бъде определена чрез известни средства. Предпочитано прилагане е парентерално инжектиране, т.е. интравенозно, интраперитонеално, интрамускулно, интрадермално и т.н.

А. Селекция на доброволците

Набрани са 30 доброволци с HIV инфекция. Само серопозитивните с ранен етап на HIV- инфекцията са определени като

Етап 1 или 2 /изброяните CD₄ клетки не са по-малко от 400 за повече от 3 месеца, с или без лимфаденопатия/са с необходимите качества за изследването. *Redfield*, и сътр., *New Engl. J. Med.* 314: 131-132 /1986/. Допълнителен критерий ограничаващ доброволците е възраст между 18 и 50 години, с напълно нормална кръвна кар-

тина, без следи за заболявания на органите, никаква злоупотреба с алкохол и наркотици през последните 12 месеца и такива, които не са вземали анти-ретровирусни или имуномодулиращи медикаменти. Всички пациенти са подложени два месеца на основно изследване прешесващо рандомизираното в лечебни групи. Доброволците не получават никакви анти-ретровирусни или имуномодулиращи лекарства по време на този процес.

Двадесет и шест от +0-те доброволци са мъже; 4 са жени. 14 са бели, 13-черни и 3 мулати. Средната възраст е 29 /между 18-49/. При приемането 8 доброволци са Етап 2 и 22 са в Етап /стадий/ 2. Изходния среден брой CI_4 клетки е 668 / между 388 и 1639/. Средният интервал между първоначалната диагноза и проучването е 24 месеца / между 3 и 49 месеца/.

Б.Ваксинен продукт и имунизационна таблица

Както е описано тук, тест-ваксината включва неинфектирана субединица гликопротеин извлечен от gp160 като бакуловирусен експресивен рекомбинантен протеин. Имуногенният протеин е произведен в *Lepidopteran* насекокоми клетки, биологично пречистен и абсорбиран на алуминиев фосфат за крайно формулираната ваксина.

Използват се три дози от gp160: 40 микрограма на милилитър, 160 микрограма за милилитър и 320 микрограма/мл. Инжекционният обем и за двете дози от 40 и 160 микрограма е 1 мл; 2 мл от 320 микрограма за 1 мл са използвани за получаване на 640 микрограма инжекционна доза.

Тридесетте доброволци са разпределени в шест групи с по пет във всяка. Проучени са две имунизационни таблици; Таблица А, с ваксинация на 0, 30 и 120 ден; и табл. Б, където ваксинацията е на 0, 30, 60, 120, 150, и 180 ден. Във всяка от имунизационните таблици /А или Б/ има три групи, всяка от които получава различни дози от ваксината /табл. 7/. Всички ваксинации са нап-равени интравенускулно в вентралния веноз. Продължителността на

опита е 10 месеца: два месеца основно изследване и 8 месеца оценяване след първоначалната ваксинация.

Таблица 7- Имунизационен списък

Количества на приложения гп160 / /						
Ден	0	30	60	120	150	180
<u>Списък А</u>						
Група 1	40	40		40		
Група 3	160	160		160		
Група 5	640	640		640		
<u>Списък Б</u>						
Група 2	40	40	40	160	160	160
Група 4	160	160	160	640	640	640
Група 6	640	640	640	640	640	640

В. Оценка на безопасността и токсичността

Всеки доброволец е интервюиран и прегледан на 0, 1, 2, 3, 15 и 30 ден след всяка инжекция. Доброволците са разпитвани за треска, простуда, гадене, повръщане, артралгия /болки по ставите/, миалгия /болки по мускулите/, неразположение, уртикария /обриви/, затруднено дишане, виене на свят или главоболие. Оценява се и местната реакция при инжектиране от рода на еритема, оток, сърбеж, болка, потъмняване на кожата, промяна в регионалните лимфни възли, промяна във функцията на инжектирания крайник, подкожни възловидни образувания от страна на инжекцията. Правят се също ежемесечно изследване на кръвната картина, химически анализ на серума, коагулационен профил и уринен анализ.

In vitro клетъчната имунна функция е оценена чрез Т-клетъчен фенотип / общи лимфоцити, CD₄ и CD₈ клетъчни фенотипи/, както е списана в Rickman и стр., *Clinical Immunol.* 52: 85-95, 1989; Bizz и стр., *Theguiz. Immune Defic. Syndr.*

4: 188-196, 1991/. Т-клетъчният пролиферативен отговор на митогени и контролни антигени *Candida alb.* и *tetanus* също се оценява. *Bizz* и сътр. *supra*. Ин виво клетъчната имунна функция се оценява чрез определяне хиперсензитивността на кожата тестване за контрол на антигени / паротит, тетаничен токсин, *Candida albicans* трихофитон/.

Вирусните култури от мононуклеарни клетки от периферна кръв /МПК/ и плазма са количествено определени както е описано в *Buzke* и сътр., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 3: 1159-1167, 1991. DNA полимерна верижна реакция /*Wages* и сътр., *J. Med. Virol.* 33: 58-63, 1991/ и нивото на серумния p24 антиген са определени ина монитор ин виво HIV вирусен товар.

Не е наблюдавана системна токсичност, но е отбелязана локална реактивност при 87% от пациентите /13 във всяка ваксинирана група/. Локалната реакция включва индурация, болезненост, транзиторни възловидни подкожни образувания на инжекционното място; рядко се отбелязва увеличение на регионалните лимфни възли. Никой пациент не е отказал бустерна инжекция. Не е наблюдавана разлика в честотата на локалната реакция при първата инжекция или при бустерната /реимунизация/, както и при дозировката.

Няма и следа от неблагоприятни ефекти върху имунната система както е измерано ин витро чрез митоген и антиген специфични пролиферативни отговори, ин виво чрез определяне хиперсензитивността на кожата тест отговори, или чрез акцелерация на количественото CD₄ клетъчно изчерпване. Основният брой CD₄ клетки е 716 и 605 съответно за ваксиотгсварящите и ваксинестгсварящите. Средният брой на CD₄ клетки по време на дните за изследване 180-240 е 714 и 561, съответно за ваксиотгсварящите и ваксинестгсварящи. По време на изследването на 240 дневен опит

окончателната промяна в средното количество на CD₄ клетките за ваксинотговарящите е минус 0.2%, докато при ваксинеотговарящите средното количество на CD₄ клетките клони към 7.3% /Фиг.11/. Ваксииндуцираща HIV имуногенност не е свързана с данните от и за акцелерация на CD₄ наклона у някои пациенти по време на целия опит.

За оценяване възможността за увеличаване на HIV репликацията и вирусния товар у пациенти като резултат от ваксинацията, **ин виво** вирусната активност се измерва чрез количество плазма и МПК вирусни култури, МПК DNA полимеразна верижна реакция и серумни нива на р24 антиген. Количествата култури и DNA полимеразна верижна реакция не показват промени по време на епизода. Серумния р24 антиген е незабележим при пациентите.

Б. Определяне на имуногенността

Антитела насочени срещу всички HIV протеини са измерени чрез използване и на рекомбинантно произведени вирусни генини продукти gp160, p66, p24 и на цял вирусен лизат от прототип HIV спънат MN. Технически са използвани *Western Blot*, както е описано от *Touvin* и сътр., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354 /1979/. Измерени са също антитяло отговорите на специфични обвиващи епитопи /вижте Фиг. 7/.

На Фигура 7 са подбрани епитопите 88 /аминокиселини 88-98 в gp120/ и 448C /амино киселини 448-514 в gp120/, защото се смята, че антитела насочени срещу тези области са свързани с ранния стадий на HIV инфекцията.

Епитопите 106 /аминокиселини 106-121 в gp120/, 241 /аминокиселини 241-272/, 254 /аминокиселини 254-272/, 300 /аминокиселини 300-340/, 308 /аминокиселини 308-322/, 422 /аминокиселини 422-454/ и 735 /аминокиселини 735-752/ са подбрани, заради тяхната предполагаема функционална важност. Епитопите 106 и 422 са вклю-

100393

чени задължително в CD₄ ; епитопи 241, 254, 735 са включени в група специфична неутрализация; и епитопи 300 и 308 са включени в типове-специфична неутрализация.

Епитоп 582 /аминокиселини 582-602/ е избран като контролен, защото представлява имунодоминантната обвиваща област в естествения HIV инфекция. Прочуват се допълнителни епитопи, включително 49 / аминокиселини 49-128//; и 342 /аминокиселини 342-405/.

Във Фигура 7, зашрихованата част означава документирана промяна в HIV обвивка- директен имуен отговор. Зашриховането с /=/ означава първичен хуморален отговор. Зашриховането с +/- означава вторичен хуморален отговор; -/- означава негативни анти-~~тела~~ ~~хуморални~~ на специфичния епитоп пре и постимунизация; и с +/- се означава позитивни антители на специфичен епитоп пре и постимунизация, но без количествени промяна. Зашриховането с ./ означава нов Т-клетъчен пролиферативен отговор на gp160 следващ имунизацията. Само ./ липса на клетъчен отговор към gp160; *hb* означава "high background" /не се интерпретира/; и *nd* означава "not done" -не се извършва."

Неутрализационна активност се измерва срещу три прототипа, изолирани /HIV-IIIB, RF и MN/ в синцитиум инхибиращ оценката както е описано в *Nara, Nature*, 333:469-470 /1988/ HIV специфични клетъчни отговори се измерват чрез позната лимфоцит-на пролиферация определяна технически чрез използване на gp160, p24 и бакуловирална експресивна система за контрол на прототипа *1 Bitx, supra 1.*

Д. Ваксинотговарящи и не- отговарящи

Пациентите са определени като ваксинотговарящи само ако ре-продуктивното селективно увеличение както на клетъчния, така и на хуморалния имунен отговор срещу HIV обвиващи специфични епитопи се съчетава с ваксинационните серии /Фиг.7/.

Ваксина индуцираща хуморален имунитет се дефинира като сероконверсия към HIV обвиващи специфични епитопи и / или вторичен бустер имунен отговор към обвиващи специфични епитопи. Ваксина индуцираща клетъчен имунитет се дефинира като развитието на нов, репродуктивен, свързан с ваксината, пролиферативен отговор на gp160.⁹ Пациенти, които не развиват нито хуморален, нито клетъчен пролиферативен отговор или, които развиват само хуморален или само клетъчен пролиферативен отговор към gp160 епитопи или HIV обвивка са класифицирани като не-отговарящи.

Е. Ваксина индуцираща хуморален отговор

Според Фиг.7, 19 от 30 пациенти /63%/ показват ваксининдуциращо повишаване и на gp160 HIV специфичен хуморален и на клетъчен имунен отговори. Тези 19 пациенти са класифицирани като "ваксин отговарящи". Четирима от 11-те "не-отговарящи" развиват само хуморален или клетъчен имунен отговор. Всички 7 пациенти, които не успяват да демонстрират някакъв долговим ваксининдуциращ отговор получават само 3 дози /Списък АZ. Не са долговим промени в антивезеласвързани към HIV полимераза /p36/, или структурални /p24/ гени продукти, или липса на HIV контролен антиген тетаус. У някои пациенти, липсата на анти-бакуловирусен *Lepidopteran* клетъчен контролен протеин развива епитопи.

Увеличаване на обвиващите епитопи /gp160/ се добавя у 13 пациенти чрез *Western Blot*, използвайки делни вирусен лгзат HIV-MN. Промените са отнесени към имунизационния списък. Трима от 15 пациенти /20%/ от списък А и 10 от 15 пациенти /67%/. Списък Е разкрива увеличаване на епитопите към обвиващите протеини /P=0.025 чрез точния тест на *Fisher* /. Всички 13 пациенти са сероконвертни към специфични обвиващи епитопи.

Обратно, от 10 пациенти, които са загубили сероконверсията към всеки обвиващ специфичен епитоп, никой не проявява повишаване на обвиващото антитяло чрез *Western Blot*. Останалите седем пациента, които са сероконвертни към специфични обвиващи епитопи не показват промяна в цялото вирусно обвиващо антитяло чрез *Western Blot*. Не са наблюдавани промени в антитялото насочено срещу необвиващия HIV протеин при някои пациенти.

14 от 15 пациенти /93%/ от списък Б ~~мексикански~~ /6 дози/ показват повишаване в общото gp160 антитяло, срещу само 7 от 15 пациенти /47%/ от списък А /3 дози/ / $P = 0.01$ *Fisher* /Фигура 8/.

Както е показано на Фиг. 8, преимунизационното към ~~преимикс-вакцини~~ поствакцинационното превалиране на всеки gp160 специфичен епитоп е респективно, както следва: Епитоп 49 /27 до 70%, Епитоп 88 /28 до 52%, Епитоп 106 /50 до 87%, Епитоп 214 /0 до 14%, Епитоп 254 /0 до 13%, Епитоп 300 /47 до 77%, Епитоп 308 /42 до 69%, Епитоп 342 /0 до 27%, Епитоп 422 /3 до 10%, Епитоп 448С /73 до 87% и Епитоп 735 /17 до 33%. Отбелязано е, че ваксината предизвиква сероконверсия срещу всички специфични епитопи с изключение на 582 /Фиг.7/. Антитела /сероконверсия/ насочени срещу Епитопи 241, 254 или 342 са само дословени след ваксинация.

Вторични имунни отговори са дословени към следните епитопи: 88, 106, 300, 448С и 582. Пресоблюдаването на антитяло насочено срещу епитоп 582 е 100% превакцинационно и само 1 пациент /3%/ показва вторичен имунен отговор. Структурата на ваксината предизвикала HIV антитяло към обвиващите епитопи е променлива /Фиг.7/. Первични антитяло отговори /сероконверсия/ поне към един епитоп се появяват при 20 пациенти; 14 от 15 в списък Б и 6 от 15

са рандомизирани от Списък А $P=0.005$ Fisher. /. Пациентите от Списък А са сероконвертни само към 15 от 110 /14% / потенциални епитопи, към които те нямат преимунизационен антитела. Пациентите от списък Б са сероконвертни към 60 от 129 /47% /

$P<0.0001$ Fisher. /. Сероконверсия към три или четири епитопа се появява у 9 пациенти /60% / рандомизирани от списък Б, но само 2 пациенти /13% / рандомизирани от списък А $P=0.02$ Fisher

Серумнеутрализиращата активност срещу три отделни клона /HIV-IIIB, MII и PG/ е определена на 0, 90 и 195 ден при 7 пациента. 4 от 5 ваксинотговарящи показват повишаване на неутрализиращата активност към един или повече от изолираните. Ваксинотговарящите в сравнение с не-отговарящите, показват повишение на способността за инхибиране синцитиалната формация.

Ж. Ваксина индуцира клетъчен отговор

Промените в клетъчния имунен отговор се основават на сравнение на главните пре-ваксинационни /базални/ и пост-ваксинационни лимфоцитен стимулиращ индекс /ЛСИ/.

21 от 30 пациенти /70% / развиват нов Т-клетъчен пролиферативен отговор към gp160, пост-имунизационно /Фиг.7/.

Фигура 9 илюстрира пролиферативни отговори към gp160, p24 и бакуловирсен контролен протеин в 4 типично ваксинотговарящи. За всички пациенти gp160 произвежда пролиферативно повишаване на средното базално ниво на ЛСИ от 3 на 10 /измерено чрез използване на 4 стойности следващи последната имунизация/. Обратно, не са отбелязани промени в пролиферативните отговори насочени срещу HIV p24 протеин или контролния бакуловирсен протеин.

Ваксина предизвиквала промени в средните стойности на ЛСИ за всички пациенти, за пациенти групирани в подгрупи според ваксинния отговор и за пациенти, групирани чрез имунизационен списък, което е илюстрирано на Фиг. 10.

Има значителна разлика /сигнификантна/ в премията на пролиферативния отговор към gp160 нахду ваксин-отговарящите и не-отговарящи / 0.001 Wilcoxon /. Gp160 пролиферативните отговори предизвикани в Списък В /6 дози/ са по-големи от тези в Списък А /3 дози/ / 0.10 , Wilcoxon /.

19 от 21 пациенти, които развиват пролиферативен отговор към gp160, развиват и хуморален отговор /ваксинотговарящи/. Максималният среден лимфоцитен стимулиращ индекс /ЛСИ/ към gp160 се наблюдава за всички ваксин-отговарящи и е 50:1. Но всеки ваксинален отговор е вариабилен /пик на стойностите за ЛСИ е от 3 до 171/ като представлява временна връзка на ваксинацията с големината и продължителността на клетъчните отговори към gp160 /Фиг.9/.

3. Обсъждане на резултатите

Независимо от ограничения размер на пробите при този опит, няколко са факторите, които са свързани с ваксинната имуногенност. 6 от 15 /40%/ от пациентите от списък А, спрямо 13 от 15 /87%/ от пациентите от Списък Б са ваксинотговарящи / $P=0.02$ Fisher / /Фиг.7/. От 16-те пациенти със средно базисно ниво на CD_4 измерено по-голямо от 600 за милилитър, 13 /81%/ са ваксинотговарящи, срещу 6 от 14 /43%/ пациенти, чиито средно изходно ниво на CD_4 е по-малко от 600 клетки на милилитър / $P=0.07$ Fisher /. Както е обобщено в таблица 8, многократните имунизации подобряват имуногенността, дори при пациенти с базисно ~~н~~ ниво на CD_4 по-малко от 600 клетки на милилитър. Например, 5 от 6 пациенти от Списък Б / 6 инжекции/ са ваксин-отговаряща в сравнение със само 1 от 8, които получават 3 инжекции /Списък А; $P=0.03$ Fisher / /Табл.8/

Таблица 8

gp160 ваксинен имуен отговор чрез базисно CD 4 ниво и муниационен списък

CD 4 ниво	II	Отговарящи /%/	Не-отговарящи /%/
Списък А			
600	7	5 /71%/	2 /29%/
500-600	5	1 /20%/	4 /80%/
500	3	0 /0%/	3 /100%/
субто- тален	15	6 /40%/	9 /60%/
Списък Б			
600	9	8 /89%/	1 /11%/
500-600	2	2 /100%/	0 /0%/
500	4	3 /75%/	1 /25%/
субто- тален	15	13 /87%/	2 /13%/
Общо	30	19 /63%/	11 /37%/

Терапевтичната употреба на ваксини е въведена от Пастър през XIX век за лечение на бяс. Ползата от този опит за лечението на други инфекции не е всестранно изследвана. Въпреки, че има други примери на пост-инфекциозни модификации на вирусния специфичен имунитет / такива като след преобледуване от хепатит А или ЕХ/, няма добре документиран изследвания за човек, който показва съществяването на този опит за доказана или хронична вирусна инфекция.

Изобретението предвижда вирусна специфична имунна модификация чрез активна имунизация след инфекция. HIV обвиващият ген, извлечен от gp160 ваксина увеличава вирусно специфичните хумора

и клетъчен отговори при 19 от 30 рано HIV заразени пациенти.

Това изследване количествено и качествено измерва отделните антитяло отговори към специфични HIV епитопи при естествена инфекция в сравнение с постинфекционна имунизация. По този начин, едно точно определяне на ваксината предизвикала хуморална имуногеност във вече заразени хора е отбелязано при 70% от пациентите. Например, 20 пациенти /19 ваксин-отговарящи и 1 ваксин не-отговарящ/ са сероконвертни към специфични обвиващи епитопи. Сероконверсия свързана само с ваксинация /епитопи 241, 254 и 342 / се появява при 10 пациенти.

В допълнение, вариации в хуморалните отговори към тази ваксина, характеризирани с епитоп мейпинг, позволяват проспективно да се проследят причината и ефекта от анализите на специфични антитяло отговори и позволява единствено възможност за характеризиране на потенциалните имунорегулаторни механизми, не извършени по време на естествената инфекция.

Ръпреки, че in vivo серумната неутрализираща активност е в момента неизвестна, наблюдаването повишаване на неутрализиращата активност срещу различните HIV класове /видове/- /III^Р, RF MN/ при 4 от 5 ваксин отговарящи, предполага, че пост-инфекционната имунизация предизвиква промени във функционалните антитела. Тест ваксината предизвиква повишаване на серумния неутрализиращ капацитет срещу отделни HIV видове и спомага за определянето на група специфични неутрализиращи епитопи.

В естествената HIV инфекция рядко се появява пролиферативен отговор на HIV обвиващите протеини. След имунизацията с gp160 са отбелязани специфични клетъчни пролиферативни отговори при 21 /70% / от пациентите. Причината за тази разлика не е ясна.

Възможно е новият пролиферативен отговор да е насочен срещу обвиващ епитоп / епитопи/ еднакъв с ваксината /като резултат от производствена методология на ваксина или алтернативно производство на антиген *in vivo*/. Алтернативно, противният използван в пролиферативния опит може да не стимулира първичните Т-клетъчни пролиферативни отговори срещу хомоложните *"wild type"* обвивки на естествения вирус. Забелязано е, че ваксинацията усилюва клетъчния имунен отговор на организма : избрани ваксинотговарящи показват HIV-IIIB тип цитотоксични специфични Т-клетъчни отговори следващи бустерната имунизация.

Рсе още не са ясни факторите отговорни за ваксинния имунен отговор при HIV инфектирани лица. Дори при ранна HIV инфекция, пациентите отговарят субоптимално на различни ваксини в сравнение с контролите. Пониженият отговор се свързва с ранна В-клетъчна дисрегулация и Т-клетъчна дисфункция. Ваксинният имунен отговор е свързан с базалното CD₄ клетъчно количество, на което вероятно се дължи имунологичния статус на организма и е важна детерминанта за ваксинния отговор. Имунизационният списък със специфични Т-клетъчни количествени интервали също влияе на ваксинния отговор: Списък Б /6 инжекции/ епредшестващ/ Понижаването на ваксинния отговор се наблюдава при пациенти с ниско CD₄ клетъчно количество и може да бъде подобрен с нарастване броя на ваксинациите, които предполагат по-нататъшни модификации в дозирането, режима, адювантите или формулите, което може да подобри имунния отговор. Няма доказателства за имунна специфична токсичност при лица заразени с HIV. Количествените култури, IIIA полимеразната верижна реакция и серумния антигенен опит показват повишаване *in vivo* на HIV-товара. Громяната в средното CD₄количество за отговарящи е -0.2% и -7.3% за не-отговарящи. Данните показват, че постинфекциозния имунен отговор

не е свързан с увеличаване на CD_4 деструкция и се подозира връзка с понижаване на HIV репликацията им виво.

Резултатите от ваксинацията също са сравнени с основните данни на 10 заразени, нелекувани пациенти подбрани по възраст, етническа група и базално CD_4 клетъчно количество. Средното CD_4 количество намалява до 8.7% в тази референтна група, намалява до 7.2% при пациенти определени от списък А, и се повишава до 0.6% при пациенти от Списък Б. Тези резултати показват, че постинфекциозната ваксинация с рекомбинантен HIV обвиващ протеин е възможна, и по-нататък изследването се насърчава с оглед профилактичната употреба на такива ваксини.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Метод за получаване състав на HIV ваксина включва стипца адювант и рекомбинантни HIV обвиващи протеинни частици с молекулно тегло поне около 2,000,000. Споменатият метод включва следните етапи:

а/ обработване на клетки от насекоми заразени с рекомбинантен бакуловирус; споменатият рекомбинантен бакуловирус има кодирал ген за HIV обвиващ протеин, за изразяване на рекомбинантен обвиващ протеин;

б/ възстановяване на споменатия рекомбинантен HIV обвиващ протеин от споменатите обработени клетки на насекоми;

в/изолиране и събиране на пречистени рекомбинантни HIV обвиващи протеинни частици чрез отделяне на споменатия рекомбинантен протеин от афинитетен матрикс съдържащ лентил лектин имобилизиран в гел медия; и

г/абсорбиране на споменатите пречистени рекомбинантни HIV обвиващи протеинни частици върху споменатия стипца адювант.

2. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че рекомбинантните протеинни частици включват около 757 последователни аминокиселини от споменатия HIV обвиващ протеин и в същност съдържат около 40 последователни терминални аминокиселини от споменатия протеин.

3. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че протеинните частици са сферични и имат диаметър от 30 до 100nm.

4. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че рекомбинантният ^{бакуло}вирус е вектор /носител/ Ac3046.

5. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че най-напред в етап г/ изолирания пречистен рекомбинантен протеин се подлага на димализа.

6. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че етап г/ се извършва при рН от около 7.0 до 7.2.

7. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че етап б/ включва:

/и/ промиване и хомогенизиране на културите заразени клетки на насекоми;

/ии/ разкъсване на клетките; и

/иии/ възстановяване на рекомбинантния протеин от разкъсаните клетки.

8. Методът, съгласно претенция 1, се характеризира с това, че етап в/ включва:

/и/ прилагане на възстановения протеин към споменатия афинитетен матрикс;

/ии/ промиване на матрикса с първия лентил лектин буфер; и

/иии/ отделяне на протеина от матрикса с втория лентил лектин буфер.

9. Методът, съгласно претенция 8, се характеризира с това, че първият лентил лектин буфер включва деоксихолат и вторият лентил лектин буфер включва алфа-метил манозид.