

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 925590 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 925590

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 37/02
C07K 7/08

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 09.12.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 09.12.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 12.06.1993

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

11.12.1991 US 805105

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •American Home Products Corporation, Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Hung, Paul Porwen, Bryn Mawr, PA 19010, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Lee, Shaw-Guang Lin, Villanova, PA 19085, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Kalyan, Narender Kumar, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Spesifisten immunogeenien ekspressio virusantigeeneja käyttäen

Expression av specifika immunogener genom användning av virusantigener

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

VR 2347 ATCC

VR 2348 ATCC

Spesifisten immunogeenien ekspressio virusantigeeneja käyttäen

Keksinnön alue

5 Tämä keksintö koskee influenssaviruksen hemagglutiniinin (HA) kimeerisiä proteiineja, joita voidaan käyttää rokotteina viruksia, patogeenisiä bakteereita ja muita antigeeneja, kuten syöpäkudokselle spesifisiä, allergisille responsseille spesifisiä ja niiden kaltaisia antigeeneja vastaan. Näitä kimeerisiä proteiineja voidaan käyttää myös sellaisten antigeenien aiheuttamien oireiden hoitamiseksi ja sellaisten antigeenien tai niille sukua olevien vasta-aineiden tunnistamiseksi. Sellaisia proteiineja koodittavat nukleotidisekvenssit esitetään myös.

15 Vieraat epitoopit, kuten ihmisen immuunipuutosviruksen epitoopit, insertoidaan HA-proteiinin antigeenisiiin kohtiin ja nämä kimeeriset proteiinit kykenevät indusoimaan spesifiset immuuniresponssit insertoitua epitooppia vastaan.

20 Keksinnön tausta

Monia lähestymistapoja käytetään rokotteiden valmistuksessa. Virustauksille nämä menetelmät sisältävät inaktivoitujen virusten, elävien virusten, elävien rekombinanttivirusten, virusproteiinien, virusproteiinien alayksikköjen ja niiden kaltaisten, käytön.

25 Kuitenkin monien rokotetyyppien menestys on rajoitettu, osittain johtuen voimakkaasta geneettisestä variaatiosta yhdestä organismin kannasta tai isolaatista toiseen. Lisäksi, ihmisen tai eläimen antigeenit, jotka ottavat osaa patogeenisiin, se on IgE allergisissa reaktioissa, kasvaintantigeenit, jne., eivät tuota hyödyllisiä immuuniresponsseja samassa eläinlajissa, josta ne ovat peräisin ja niitä voidaan jopa käsitellä omina proteiineina eikä antigeeneina.

Kuitenkin, on toivottavaa käyttää pieniä peptidisekvenssejä tai epitooppeja (se on, antigeenisia determinantteja), jotka edustavat tietyn antigeenin biologista funktiota, immunogeeneina jopa homologisessa eläinlajissa. Teoriassa näitä peptidejä voidaan käyttää saamaan aikaan immuuniresponssi, kun ne injektoidaan eläimiin. Käytännössä kuitenkin nämä peptidit eivät ole usein hyviä immunogeeneja, koska ne ovat tavallisesti pieniä eivätkä tarjoa itseään edullisesti immuunisysteemille.

Esimerkki sellaisesta huonosti immunogeenisestä peptidistä on ihmisen immuunipuutosviruksen (HIV) ulkovaippaglykoproteiinin (gp120) toinen konservoitunut domeeni. Sen on havaittu olevan tärkeä HI-viruksen infektiivisyydelle ja vasta-aineiden neutralisaatiolle. *Science*, 26.2.1988, 1021. Tätä aluetta (aminohapot 254 - 274) vastaan tehty antiseerumi voi neutraloida kolme eri HI-virusisolaattia in vitro ilman, että se vaikuttaa viruksen sitoutumiseen T-solureseptoriin tai CD4-positiivisiin soluihin. Konservoituneen domeenin uskotaan olevan kriittinen sitoutumisen jälkeisessä tapahtumassa, jonka aikana virus tunkeutuu soluun, ja voi olla mahdollinen kohde vasta-aineneutralisaatiolle. Kuitenkin on havaittu, että tämä domeeni on immunogeenisesti suhteellisen "hiljainen", kun se tarjotaan immuunisysteemille luonnollisen HI-virusinfektion yhteydessä. Tämän kaltainen immunogeeninen hiljaisuus viihjaa, että epitooppi voi olla peittyneenä esimerkiksi proteiinin konfiguraation johdosta.

Lisää yksityiskohtia HI-virusantigeeneista voidaan löytää julkaisuista Rusche et al., "Antibodies that Inhibit Fusion of Human Immunodeficiency Virus-infected Cells Bind a 24 Amino Acid Sequence of the Viral Envelope, gp120," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 3198 - 3202, toukokuu 1988; Bolognesi, "Progress in Vaccine Development Against SIV and HIV," *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 3: 390 - 394, Raven Press, Ltd., New

York, 1990; Wain-Hobson, "Nucleotide Sequence of the AIDS Virus, LAV," Cell, 40: 9 - 17, tammikuu 1985; ja Ho et al., "Second Conserved Domain of gp120 Is Important for HIV Infectivity and Antibody Neutralization," Science, 5 239: 1021 - 1023, 26.2.1988.

Yksi tapa tehostaa epitooppipeptidien immunogeenisuutta on niiden koon, ja sen vuoksi niiden tunnistettavuuden, suurentaminen liittämällä ne jollain tavalla fuusioproteiineihin, makromolekyyleihin tai adjuvantteihin.

10 Colbere-Gerapin et al. ovat julkaisseet tyypin 3 polioviruksen (Sabin-kanta) insertiomutanttien valmistuksen, jossa insertoidaan lisäaminohapposekvenssejä (tri- tai heksapeptidejä) kapsidiproteiinin VP1 neutralisaatio-kohtaan 1. Colbere-Gerapin et al., "Addition of a Foreign
15 Oligopeptide to the Major Capsid Protein of Poliovirus," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8668 - 8672, marraskuu 1989.

Evans et al. ovat julkaisseet polioviruksen kimeerisen antigeenisen proteiinin rakentamisen ja karakterisoinnin, joka proteiini sisältää ihmisen immuunipuutosvirustyyppin 1 (HIV-1) membraanin läpi menevän glykoproteiinin (gp41) epitoopin. Kanin antiseerumin, joka saatiin aikaan elävän polio/HIV-kimeerin ihon alaisella injektioilla, osoitettiin neutraloivan laajasti useita amerikkalaisia ja afrikkalaisia HIV-1-isolaatteja. Evans et al., "An
25 Engineered Poliovirus Chimera Elicits Broadly Reactive HIV-1 Neutralizing Antibodies," Nature, 339: 385 - 388, 1.6.1989. Elävien virusvektoreiden, kuten polioviruksen, käyttö aiheuttaa kuitenkin ongelmia käytännössä siten, että seerumin vasta-aineet voivat estää rekombinanttiviruksen replikaation kehossa. Lisäksi, elävillä virusvektoreilla on tiukat rajoitukset insertin koon suhteen ja niissä on rajoitettu määrä insertiokohtia.

30 Wu et al. ovat julkaisseet synteettisten oligonukleotidien, jotka vastaavat S-antigeenin (122 - 137) ja
35

pre-S₂-antigeenin (120 - 145) aminohappotähteitä, jotka ovat hepatiitti B -viruksen pinta-antigeneja, insertion lukuraamiin kloonatun Salmonella-flagelliinigeenin hyper-varioivalle alueelle. Elävällä rekombinanttibakteerilla

5 immunisoidut eläimet kehittivät vasta-aineita, jotka olivat spesifisiä hepatiitti B -virusepitoopeille ELISA-menetelmällä tunnistettuna. Wu et al., "Expression of Immunogenic Epitopes of Hepatitis B Surface Antigen with Hybrid Flagellin Proteins by a Vaccine Strain of Salmonella," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 4726 - 4730, kesäkuu

10 1989. Immuuniresponssi oli heikko, lyhytikäinen ja aleni nopeasti immunisoinnin jälkeen.

Michel et al. ovat julkaisseet eri HIV-vaippafragmenttien insertion hepatiitti B -viruksen pinta-antigeeniin.

15 Kanien immunisointi näillä fuusioproteiineilla tuotti neutraloivia vasta-aineita. Michel et al., "Induction of Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Neutralizing Antibodies in Rabbits Immunized with Recombinant HIV-Hepatitis B Surface Antigen Particles," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7957 - 7961, 1988.

20

Samalla tavalla on havaittu, että histamiinin vapautumista rotan syöttösoluista voidaan inhiboida sekä in vitro että in vivo immunisoimalla ihmisen peptidi-proteiini-konjugaatilla. Stanworth et al., "Allergy Treatment

25 with a Peptide Vaccine," The Lancet, 336: 1279 - 1281, 7.10.1990. Katso myös Stanworth et al., "The Role of High and Low Affinity IgE Receptors in Cell Signalling Processes," Molecular Biology, 27 (12): 1291 - 1296, 1990.

Monoklonaalisia vasta-aineita (mAb) on myös käytetty laajasti passiiviseen immunisointiin ja diagnosti-

30 siin tarkoituksiin infektiivisten tai patologisten tilojen, kuten kasvaintigeenien läsnäolon, tunnistukseen. Kuitenkin, halutun spesifyyden sisältävän monoklonaalisen vasta-aineen tuotto on työlästä ja ei ennustettavissa olevaa.

35 Monoklonaalisen vasta-aineen spesifisyyden määrittä-

miseksi tarvitaan useita sokkoseulontoja ja testejä, jotka sisältävät päällekkäin menevien peptidien ryhmän. Joskus toiminnallinen epitooppi ei ehkä ole immunodominantissa asennossa niin, että antigeeni tuottaisi sitä aluetta vastaan monoklonaalisen vasta-aineen.

Näin ollen on olemassa tarve rokotteista, diagnostisista aineista ja terapeuttisista aineista, jotka voivat hyödyntää keksinnön mukaisten antigeenisten determinanttien tai epitooppien mahdollista immunogeenisuutta.

10 Keksinnön yhteenveto

Nyt on keksitty kimeeriset proteiinit, jotka ovat immunogeenisiä ja sisältävät influenssa A -viruksen HA-proteiinin, jossa on insertoituna vieras epitooppi. Nisäkkäiden immunisaatio näillä rekombinantti- tai synteettisillä kimeerisillä proteiineilla johtaa peptidispezifisten vasta-aineiden muodostumiseen. Immuuniresponssin muodostuminen näillä kimeerisillä proteiineilla on pitkäaikainen kestäen esimerkiksi yli kuusi kuukautta. Näitä kimeerisiä proteiineja tai vastaavia vasta-aineita voidaan myös käyttää diagnostisina työvälineinä ja immunoterapiassa patologisten tilojen infektoita vastaan kuin myös jälkialtistustapauksissa, kuten vahingossa sattuneissa neulanpistoissa sairaaloissa.

DNA-fragmentit, jotka koodittavat kimeerisiä HA-proteiineja, on myös keksitty. Nämä fragmentit sisältävät nukleotidisekvenssin, joka on oleellisesti sama kuin se, joka koodittaa influenssa A -viruksen HA-pintaproteiinia, jossa on viisi immunodominanttia antigeenikohtaa. Keksinnön mukaisesti nukleotidisekvenssi, joka on oleellisesti sama kuin se, joka koodittaa vierasta epitooppia, insertoidaan nukleotidisekvenssiin, joka koodittaa ainakin yhtä antigeenikohdista.

On myös suunniteltu peptidit, jotka sisältävät oleellisesti saman aminohapposekvenssin kuin influenssa A -viruksen HA-pintaproteiini, jossa on viisi immunodomi-

nanttia antigeenikohtaa, jossa aminohapposekvenssi, joka on oleellisesti sama kuin vieras epitooppi, insertoidaan ainakin yhden immunodominantin antigeenikohdan aminohapposekvenssiin.

5 Näitä proteiineja voidaan antaa tehokkaina määrinä tarpeessa oleville nisäkkäille (mukaanlukien ihmiset) eri patologisten tilojen hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi. Lisäksi näitä peptidejä tai vastaavia vasta-aineita voidaan käyttää nisäkkään eri antigeeneille tapahtuneen altistuksen tunnistamiseksi, suositeltavasti verestä tai sen fraktiosta. Yllä olevia peptidejä sisältävät rokotteet, yllä olevia DNA-fragmentteja sisältävät ekspressiovektorit, erikoisesti bakulovirusvektorit, ja transformoidut mikro-organismi-isännät kuuluvat kaikki esillä olevaan keksintöön.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on kaavio influenssa A -viruksen HA-proteiinista.

20 Kuvio 2 on kaavamainen esitys esimerkkinä olevan HIV-epitoopin insertiosta HA-geeniin muodostamalla ApaI-kohta HA-geenin nukleotidikohdalle 498 (vastaa aminohappoa 139).

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

25 Tämä keksintö koskee uusien DNA-molekyylien ja peptidien synteesiä, ekspressiota ja käyttöä, ja DNA-molekyyliä ja peptidejä itseään, jotka käsittävät epitoopin, joka on insertoitu influenssaviruksen HA-pintaproteiiniin.

A. Influenssaviruksen HA-proteiini

30 Influenssa A -viruksen HA-pintaproteiini on toinen influenssa A -viruksen kahdesta pintaproteiinista. Neuraminidaasi (NA) on toinen. HA on viruksen pääasiallinen pintaglykoproteiini ja on se antigeeni, jota vastaan neutraloivat vasta-aineet suunnataan. HA on myös vastuussa viruksen kiinnittymisestä solureseptoreihin ja sen vuoksi on vastuussa virusinfektion aloituksesta. Influenssa A

-virus aiheuttaa säännöllisiä epidemioita johtuen viruksen voimakkaasta antigeenivariaatiosta. Nämä variaatiot johtuvat aminohappomuutoksista HA-proteiinin pääasiallisissa antigeenikohdissa.

5 Eri influenssakantojen eri HA-geenit on kloonattu ja kaikki ovat sopivia käytettäessä esillä olevaa keksintöä. Erikoinen huomio on kiinnitetty kannan A/WSN/33 HA-geeniin. Tämä geeni on 1775 nukleotidin pituinen ja koodittaa 565 aminohappoa. Hiti et al., Virology, 111: 10 113 - 124, 1981.

Nukleotidisekvenssin perusteella ennustetun aminohapposekvenssin analyysi osoittaa signaaliptidin (17 aminohappotähdettä) läsnäolon, joka katkaistaan pois HA-proteiinin eritysprosessin aikana. Kypsässä HA-proteiinissa on kaksi alayksikköä, HA1 (325 tähdettä) ja HA2 (222 tähdettä), joita yhdistää yksi arginiinitähde, joka katkaistaan pois kypsymisen aikana niin, että saadaan kaksijuosteinen HA-proteiini. C-pään aminohapposekvenssi (512 - 15 530) on erittäin hydrofobinen ja luultavasti muodostaa HA-proteiinin membraanin lävistävän alueen. Proteiinissa on seitsemän mahdollista glykosylaatiokohtaa. HA-proteiini esiintyy trimeerinä ja muodostuu pääasiallisesti kahdesta erillisestä rakenteellisesta alueesta, α -heliksien säiemäisestä keräsystemistä, joka ulottuu 76 Å membraanista 20 ja antiparalleelin β -tason globulaarisesta alueesta, joka sisältää reseptorin sitoutumiskohdan ja variaabelit antigeenikohdat sijoittuneina tämän varren huipulle.

25 Vertailu muiden influenssavirusten alatyyppejen kanssa osoittaa, että monet sekvenssijaksot, sisältäen 30 kaikki kysteiniinit, ovat konservoituneita kaikissa kannoissa. Tämä vihjaa, että HA-proteiinin perusrakennetta tarvitaan sen toiminnalliseen aktiivisuuteen. HA2-proteiinin aminohapposekvenssi on konservoituneempi kuin HA1-proteiinin ja kantojen väliset variaatiot johtuvat muutoksista

HA1-sekvensseissä. Hiti et al., Virology, 111: 113 - 124, 1981; Wiley et al., Nature, 289: 373 - 378, 1981.

HA-proteiinin kolmiulotteisen rakenteen ovat kuvanneet Wilson et al., Nature, 289: 366 - 373, 1981 (katso
 5 kuvio 1). Siinä on viisi antigeenistä kohtaa, A, B, C, D ja E, jotka ympäröivät reseptorin sitoutumiskohtaa, joka on läsnä koverana taskuna. Influenssaviruskannan A/WSN/33 HA-proteiinissa vastaavien viiden antigeenisen kohdan sijainnit tunnistetaan seuraavasti. Kohta A (aminohapot
 10 136 - 142) on ulostyöntyvä silmukka-alue. Kohta B (aminohapot 183 - 192) on alue, jossa on ulkopuolisia tähteitä α -heliksissä. Kohta C on mutka tertiaarisessa rakenteessa kysteini 42 ja kysteini 274 välisessä disulfididisidoksessa. Kohta D on peittynyt alue alayksikköjen välisellä pinnalla ulottuen aminohappojen 197 - 216 yli ja kohta E on
 15 aminohapot 52 - 74. Ainakin yksi aminohapposubstituutio kussakin viidessä antigeenisessä kohdassa tunnutaan tarvittavan uusien epideemisten influenssakantojen muodostumiseksi. Lisäksi vasta-aineiden, jotka on suunnattu näitä
 20 viittä antigeenistä kohtaa vastaan, on havaittu neutraloivan viruksen infektiivisyyden. Uskotaan, että kohta A, johtuen sen luoksepäästäväyydestä, sopii hyvin korkean aktiivisuuden sisältävälle neutraloivalle vasta-aineelle. Wiley et al., Nature, 289: 373 - 378, 1981; Wiley et al.,
 25 Ann. Rev. Biochem., 56: 365 - 394, 1987.

Esillä olevassa keksinnössä HA-proteiinia käytetään molekyylinä, jolla kuljetetaan ei-HA- tai vieraita epitoppeja. Insertio HA-proteiiniin tapahtuu suositeltavasti yhteen tai useampaan näistä viidestä antigeenisestä
 30 alueesta ja suositeltavimmin A alueeseen. Lisäksi suositeltava insertiokohta on alue, jonka määrittelevät aminohapot 183 - 192.

B. Vieraiden epitoppien esimerkit

Esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoiset vieraat
 35 epitopit sisältävät alan asiantuntijan tunteman minkä

tahansa epitoopin, joka on muu kuin HA-proteiinin epitooppi. Peptidi- ja nukleotidisekvenssit, jotka ovat oleellisesti samoja kuin ne, jotka vastaavat luonnollisesti esiintyvää epitooppia, ovat yhtä hyvin käyttökelpoisia esillä olevassa keksinnössä.

Esimerkit vieraista epitoopeista sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, virusepitoopit (kuten HIV-1-epitoopit, hepatiitti B -epitoopit, hepatiitti C -epitoopit, retrovirusepitoopit ja Herpes simplex -virusepitoopit), bakteeriproteiiniepitoopit, IgE-effektorikohdan epitoopit (jotka vaikuttavat osaltaan allergioihin), SP10-epitoopin (raskausantigeeni), kasvainepitoopit sisältäen rintasyöpäepitoopit, ja mitkä tahansa muut antigeeniset epitoopit, joilla on patologista tärkeyttä kuin myös niiden neutraloivat proteiinit tai niiden immunogeeniset osat.

Termin "immunogeeninen osa" on tarkoitettu sisältävän sellaiset proteiiniolosat, jotka ovat immunogeenisiä kaikissa olosuhteissa sisältäen ne, jotka ovat immunogeenisesti hiljaisia ennen insertiota, mutta jotka tulevat immunogeenisiksi tai antigeenisiksi, kun ne fuusioidaan HA-proteiiniin. Menetelmät sellaisten peptidien tai epitooppien tunnistamiseksi tunnetaan. Chou et al., Biochemistry, 13: 222 - 245, 1974; Holper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 3824 - 3828, 1981.

Termi "oleellisesti sama kuin" sisältää identtiset nukleotidi- tai aminohapposekvenssit kuin myös sekvenssit, joita on modifioitu biologisilla, geneettisillä tai kliinisillä menetelmillä, jotka sekvenssit sisältävät oleellisesti saman biologisen aktiivisuuden. Nukleotidisekvenssin tapauksessa biologinen aktiivisuus voi olla esimerkiksi kyky koodittaa epitooppia, joka saa aikaan vastaavan vasta-aineen kehittymisen. Aminohapposekvenssin tapauksessa kyky saada aikaan vastaava vasta-aineen muodostus on yksi esimerkki. Sellainen aktiivisuus testataan alan asiantuntijan tuntemilla menetelmillä, jotka sisältävät,

mutta eivät ole rajoitettuja, immunofluoresenssi-, ELISA-, Western blottaus-, autoradiografia- ja niiden kaltaiset menetelmät.

1. HIV-epitoopit

5 Yksi vieraan epitoopin ryhmä, joka insertoidaan keksinnön mukaisesti HA-proteiiniin, on HIV-1-viruksen epitooppi-ryhmä. HIV aiheuttaa hankitun immuunipuutosyöndrooman (AIDS). HIV-1-viruksen genomi koodittaa kolmea viruksen rakenneproteiinia kolmella alueella, gag-alueella, 10 pol-alueella ja env- tai viruksen vaippa-alueella. Gag-alue tuottaa viruksen ytimen proteiineja.

Pääasialliset ydinproteiinit syntetisoidaan aluksi esiasteproteiinina p55. Proteiini p55 prosessoidaan sen jälkeen proteiineiksi p17, p24 ja p15 (p9 ja p6) viruksen proteaasin, jota koodittaa pol-alue, toimesta. Gag-esiasteproteiinin on ajateltu sisältävän kriittisen roolin viruspartikkelien kokoamisessa plasmamembraanilla. Gheysen et al., Cell, 59: 103 - 112, 1989. Kuten useimmat retrovirusten gag-proteiinit, p55 (ja p17 prosessoinnin jälkeen) 15 myristyloidaan sen N-päähän.

Proteiini p24 on läsnä HI-viruksen sisemmässä ytimessä. Proteiini p17 tuntuu olevan sijoittuneena lipidi-membraanin sisäpuolella ja p15, johtuen sen erittäin emäksisestä luonteesta, on luultavasti liittynään HIV-genomiin. Proteiini p24 on yksi niistä HIV-proteiineista, jotka 25 tunnistetaan varhain AIDS-potilailla, ja vasta-aineet proteiineja p24 ja p17 vastaan ovat läsnä kaikilla AIDS-potilailla. Ajatellaan, että ydinproteiinit, se on gag, voivat muodostaa soluvälitteisen immunitetin.

30 HIV-1-viruksen pol-alue koodittaa käänteistranskriptaasi-, proteaasi- ja endonukleasiproteiineja.

Env-alue transkriptoi vaippaproteiinia gp160, joka prosessoidaan proteiineiksi gp120 ja gp41. Pääasiallisin vaippaproteiini, gp120, sijaitsee viruspartikkelin ulkopinnalla "piikkeinä" ja membraanin läpi menevä proteiini 35

gp41 sisältää membraaniankkurisekvenssin ja toimii kiinnityskohtana proteiinille gp120 HIV-1-viruksen pinnalla. Proteiini gp120 sisältää T-solureseptorin (CD4) sitoutumiskohdan kuin myös pääasialliset kohdat, jotka neutraloivat vasta-aineet tunnistavat.

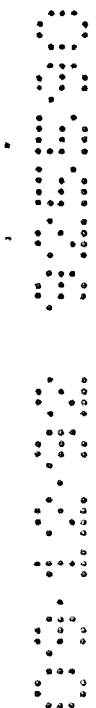
Rekombinanttiproteiinit gp120 tai gp160 saavat aikaan matalan tiitterin sisältäviä neutraloivia vasta-aineita toistuvien injektoiden jälkeen. HI-viruksen pääasiallinen neutraloiva determinantti sijaitsee proteiinin gp120 V3-silmukan (aminohapot 303 - 338) hypervarioivalla alueella. Tämän peptidin muodostamat vasta-aineet ovat virusvarianttispesifisiä. Javaherian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6768 - 6772, 1989.

Ryhmä antigeenisesti erilaisia HI-virusia on eritetty samasta infektoituneesta potilaasta. Nukleotidisekvenssianalyysi on myös osoittanut, että HIV-1-isolaattien joukossa on huomattavaa variaatiota. Nämä variaatiot tuntuvat keskittyvän proteiiniin gp120 ja sallivat sen, että virus välttää useimmat immuunivalvontamekanismit. Useimmat ennustetuista proteiinin gp120 antigeenisistä epitoopeista on löydetty alueilta, joissa on korkea sekvenssivariaatio, ja ne on erittäin konservoituneiden alueiden välissä. Modrow et al., J. Virology, 61: 570 - 578, 1987. Gag- ja pol-sekvensseissä ei ole erittäin variaabeleita alueita.

Useita lähestymistapoja on käytetty AIDS-rokotteen tuottamiseksi, esim. inaktivoitua virusta, elävää rekombinanttivirusta, viruksen alayksikköproteiineja, jne. Näillä on tähän mennessä ollut rajoitettu menestys, osittain johtuen geneettisestä variaatiosta yhdestä HIV-isolaatista toiseen. Uskotaan todellakin, että noin 25 % vain aminohapoista voi mutatoitua. HI-viruksen konservoituneet alueet on havaittu "immunogeenisesti hiljaisiksi", kun ne on viety immuunisysteemiin proteiinin gp120 yhteydessä, joka tulos on päinvastainen mitä tulee niiden immunogeenisuuteen, kun niitä käytetään synteettisinä oligo-

peptideinä, kuten yllä on selitetty. HI-viruksen konser-
voituneet alueet sisältävät epitoopit, jotka ovat tyypil-
lisesti immunogeenisesti hiljaisia, voivat tulla immuno-
geenisiksi, kun ne insertoidaan yhteen tai useampaan
5 HA-proteiinin antigeeniseen kohtaan keksinnön mukaisesti.

Useat HIV-epitoopit, jotka ovat käyttökelpoisia
esillä olevassa keksinnössä, on lueteltu alla olevassa
taulukossa 1:



Taulukko 1
HIV-epitoopit

	Peptidi ^A	Sijainti	Huomautukset
5	1. T 20 E 2. T 16 G	env255-274 env255-270	Env-proteiinin toinen konser- toitunut alue; tuottaa neut- raloivia vasta-aineita
10	3. D 18 S	env gp41 735-752	Erittäin hydrofiilinen; neutraloi useita HIV-1-kan- toja, inhiboi solusitkosten muodostumista.
15	4. G 20 E	protease active site	Erittäin konservoitunut kai- kissa HIV-kannoissa
20	5. K 27 R 6. E 14 Q	env403-429 env414-427	CD4:ää sitova domeeni: immuno- geenisesti hiljainen; konser- voitunut; peptidiä vastaan tuotettu vasta-aine on neut- raloiva
25	7. N 22 G	env307-330	Pääasiallinen immunodominantti epitooppi, mutta erittäin va- riaabeli; sekvenssi HIGPGRAFY tuottaa neutraloivia vasta- aineita.
30	8. p17 9. p24	gag86-115 gag281-305	Konservoitunut; tuottaa T-so- luresponssin.

^A Peptidit on nimetty niin, että ne osoittavat peptidin koon ja sen peptidin ensimmäisen ja viimeisen aminohapon. Yhtä lukuunottamatta kaikki epitoopit ovat virusproteiinien konservoituneelta alueelta. Yksi epitooppi, N22G, vastaa proteiinin gp120 hypervariaabelia aluetta, jota kutsutaan V3-silmukaksi.

2. IgE-epitoopit

Toinen sopiva epitooppi keksinnössä käytettäväksi on osa IgE-immunoglobuliinia, joka on läsnä matalina konsentraatioina veressä. IgE koostuu kahdesta ketjusta, ras-
kaasta ja kevyestä ketjusta. IgE on pieni osa seerumin

kokonaisimmunoglobuliineista ja se välittää välittömiä hypersensitiivisyystyypppejä, jotka ovat vastuussa allergisista reaktiosta sisältäen, mutta ei rajoittuen, heinänuhan, astman, ruoka- ja lääkeallergiat ja niiden kaltaiset. IgE-molekyylin roolia allergisen responssin alulle panijana tutkittiin synteettisillä rotan ϵ - tai raskasketjupeptideillä ja anti-peptidi-vasta-aineilla. Stanworth et al., Molecular Immunology, 21: 1183 - 1190, 1984; Stanworth et al., Molecular Immunology, 27: 1291 - 1296, 1990. Veressä kiertävä IgE sitoutuu korkea-affiniseen IgE Fc -reseptoriin (Fc ϵ RI), jota ekspressoidaan syöttösolujen ja basofiilien pinnalle. IgE-välitteisessä responssissa reseptoriin sitoutuneen IgE-molekyylin ristisitoutuminen multivalentin allergeenin toimesta johtaa allaolevien Fc ϵ RI-reseptorien aggregoitumiseen, joka puolestaan saa aikaan histamiinin ja muiden allergisen responssin kemiallisten modulaattorien vapautumisen. Toistuva altistus allergeenille johtaa kohonneeseen spesifisen IgE-molekyylin tuottoon ja sen kautta kohonneisiin, ja joskus kuolemaan johtaviin, allergisiin responsseihin. Monoklonaaliset ja polyklonaaliset vasta-aineet ovat voimakkaita allergeeneja johtuen niiden kyvystä ristisitoa IgE-molekyyliin sitoutunut reseptori.

IgE sitoutuu myös matala-affiiniseen IgE Fc -reseptoriin (Fc ϵ RII), joka on läsnä B- ja T-soluissa. Tämän reseptorin, joka tunnetaan myös nimellä CD23, uskotaan esittävän tärkeätä roolia IgE-molekyylin synteessissä B-soluissa.

Havaittiin, että reseptoriin sitoutumisesta vastuussa olevat kohdat ja efektoriaktiivisuuskohta sijaitsevat eri osissa IgE-molekyyliä. Kun sitoutumiskohta sijaitsee IgE-molekyylin CH3- ja CH4-domeeneissa kummassakin, efektori- tai aloituskohta sijaitsee CH4-domeenissa. Aloituskohdan peptidille on ominaista N-pään kationinen "pää", jonka kolme aminohappoa erottaa hydrofiilisesta

hännästä. Tutkimus on osoittanut, että tämä peptidi välittää immunologisen aloitussignaalin syöttösoluissa responsina allergeenialtistukselle. Stanworth et al., Lancet, 336: 1279 - 1281, 1990. Tämän peptidin aminohapposekvenssi on: Lys-Thr-Lys-Gly-Ser-Gly-Phe-Phe-Val-Phe ja se vastaa ihmisen IgE-raskasketjun aminohappoja 497 - 506. Se voidaan syntetisoida kahdesta komplementaarisesta oligonukleotidista:

5 K T K G S G F F V F
10 5' AAA ACC AAG GGA TCA GGA TTC TTT GTA TTC GGG GCC 3'
CCGG TTT TGG TTC CCT AGT CCT AAG AAA CAT AAG CC

StyI

ApaI

Tämä epitooppi löydetään nukleotidisekvenssistä, joka koodittaa peptidiä H22V, jonka aminohapposekvenssi on HSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEV. Tämä peptidi voidaan syntetisoida nukleotidisekvenssistä:

15 ApaI H S T T Q P R K T K
 CAC AGT ACT ACA CAG CCC CGC AAA ACC AAG
CCGG GTG TCA TGA TGT GTC GGG GCG TTT TGG TTC
20 G S G F F V F S R L E V
GGA TCA GGA TTC TTT GTA TTC TCA CGC CTA GAG GTG GCC
CCT AGT CCT AAG AAA CAT AAG AGT GCG GAT CTC CA

C. Kimeerinen HA-peptidi

Esillä olevan keksinnön mukaisia kimeerisiä HA-peptidejä voidaan käyttää rokotteina peptidispesifisten vasta-aineiden tuottoa varten, jotka vasta-aineet muodostavat seoksen, jossa on eri spesifisyyksiä siinä peptidissä olevia useita sekvenssejä vastaan. Nämä vasta-aineet sisältävät korkean affiniteetin ja ovat sopivia diagnostiikkaan kuin myös immunoterapiaan. Esillä olevan keksinnön piiriin kuuluvia peptidejä voidaan myös antaa profylaktisesti infektion ehkäisemiseksi. Antaminen rokotteena tai immunoterapiaa varten voi tapahtua millä tahansa alan asiantuntijan tuntemalla tavalla sisältäen, mutta ei rajoittuen, suun kautta, peräsuolen kautta, nenän kautta, posken kaut-

ta tai parenteraalisen annon. Rokotteet tai immunotera-
piassa käytettävät farmaseuttiset koostumukset voivat myös
sisältää minkä tahansa farmaseuttisesti hyväksyttävän kan-
tajan tai adjuvantin, jota alalla yleisesti käytetään.

5 Yksi tai useampi epitooppi voidaan insertoida mihin
tahansa HA-kimeeriin niin, että saadaan di-, tri-, tetra-
tai pentavalentti HA-kimeeri. Epitooppi kussakin insertio-
kohdassa voi olla sama tai eri. Jos epitooppi on sama,
havaitaan suuresti kohonnut vasta-aineresponssi verrattuna
10 monovalenttiin HA-kimeeriin. Jos epitooppi on erilainen,
tuloksena on monen vasta-aineen muodostama responssi.
Enemmän kuin yksi kopio yhtä epitoopia ja yksi tai useampi
kopio muita epitooppeja voidaan myös insertoida niin, että
saadaan kohonnut vasta-aineresponssi ja monen vasta-aineen
15 muodostama responssi. Yksi tämän lähestymistavan sovellu-
tus on monirokotteen suunnittelu, jota voidaan käyttää
rokotettaessa useita tauteja tai tautikantoja vastaan sa-
malla kertaa.

 Peptidin tehokas määrä kussakin sovellutuksessa
20 voidaan määrittää alan asiantuntijan tuntemin keinoin.
Optimiannos voidaan määrittää esimerkiksi käyttäen esillä
olevan keksinnön mukaisten aktiivisten aineiden sarjalai-
mennettuja valmisteita yhdessä sopivan testimenetelmän
kanssa. Vaihtoehtoisesti voidaan saada aikaan annosten
25 matriisi ja antotiheys ja koehenkilöiden ryhmät voidaan
jakaa kullekin matriisin osalle optimiolosuhteiden määrit-
tämiseksi.

 Rokotteessa kimeeriset HA-epitooppiantigeenit se-
koitetaan hyvin adjuvantin, se on Syntex-adjuvantin tai
30 alunan, kanssa ja noin 1 - 100 µg injektoidaan isäntään.
Isännälle voidaan antaa tehosteannoksia tietyin väliajoin,
se on joka neljäs viikko, kunnes saadaan aikaan korkea-
tiitterinen vasta-aine peptidiä vastaan. Useampi kuin yksi
samanlainen tai erilainen HA-epitooppiproteiini voidaan
35 yhdistää yhteen rokotteeseen. Rokotteen valmistus sisältää

tyypillisesti vaiheen, jossa HA-geeni, jossa on vieraat epitooppisekvenssit, kuten HIV-epitooppisekvenssi, insertoidaan sopivaan ekspressiovektoriin. Uutta proteiinia ekspressoidaan kudosiseläimessä ja kimeerinen proteiini eristetään. Sitten sopivat eläimet rokotetaan.

Esillä olevan keksinnön mukaiset HA-epitooppiantigeenit ovat sopivia myös antigeenialtistuksen tai virusinfektion diagnosoimiseksi. ELISA on yleisimmin käytetty menetelmä infektoivien virusantigeenien läsnäolon tunnistamiseksi veressä, kuten on kuvattu teoksessa Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Son, 1989. Mikrotiitterilevyn kuopat päällystetään tyypillisesti peptidispesifisillä (nappaavilla) vasta-aineilla, jonka jälkeen inkuboidaan virusantigeenia sisältävän seerumin kanssa. Sitoutumaton antigeeni pestään pois ja lisätään eri antigeeni, joka on konjugoitu tunnistettavaan aineeseen, kuten piparjuuriperoksidaasientsyymiin. Entsyymien läsnäolo tunnistetaan sitten esim. antamalla reagoida perussubstraatin kanssa.

Esillä olevan keksinnön mukaisia kimeerisiä HA-epitooppiproteiineja vastaan suunnattuja vasta-aineita voidaan käyttää näissä diagnostisissa menetelmissä ja diagnostisissa käyttöpakkausissa. Erikoisesti seulonta on tehokasta käyttäen yllä kuvattuja HA-HIV-epitooppeja ja HA-hepatiitti B tai C -epitooppeja vastaan suunnattuja vasta-aineita.

Samalla tavalla voidaan testata vasta-aineiden läsnäolo altistamalla epäiltävä näyte, kuten veri tai sen fraktio, esillä olevan keksinnön mukaisille kimeerisille antigeeneille.

Esillä olevan keksinnön mukaisia kimeerisiä HA-epitooppiproteiineja voidaan käyttää myös immunoterapiassa. Esimerkiksi patogeenispesifiset tai neutraloivat vastaaineet muodostetaan esillä olevan keksinnön mukaisia HA-epitooppiproteiineja vastaan infektion tai taudin kulun

pysäyttämiseksi tapauksissa, joissa potilas on jo altistunut infektiolle. Tämä sisältää passiivisen immunisaation, koska infektoivaa ainetta vastaan olevia neutraloivia vasta-aineita sisältäviä immunoglobuliineja voidaan
 5 käyttää infektion hillitsemiseksi tai säätelemikseksi. Esimerkit passiivisesta immunisaatiosta sisältävät immuunisoinnin vesikauhua vastaan eläimissä ja ihmisissä, gram-negatiivisten bakteerien aiheuttaman septisen sokkisyndrooman hoidon monoklonaalisilla vasta-aineilla ja immuunisoinnin HI-virusta vastaan.
 10

Esillä olevan keksinnön mukaisia kimeerisiä proteiineja koodittavat genomit voidaan insertoida ekspressiovektorisysteemeihin. Sopivat ekspressiovektorit sisältävät BP-virukseen (härän papilloomavirus) perustuvan
 15 ekspressiovektorin, dihydrofolaattireduktaasille (dhfr) sukua olevan vektorin, adenovirusvektorin tai vacciniavirusvektorin. Huomio kiinnitetään erikoisesti bakulovirus-ekspressiosysteemeihin, kuten Autographa californica -tumapolyhedroosiviruksella (AcMnPV) infektoituihin hyönteissoluihin, kuten Spodoptera frugiperda -soluihin (Sf9).
 20

Infektion aikana bakulovirus muodostaa suuria määriä polyhedroniproteiinia, joka saa aikaan okklusiokappaleiden muodostumisen, jotka sulkevat viruksen sisäänsä. Polyhedronigeenin ei ole osoitettu olevan välttämätön viruksen infektiolle tai replikaatiolle. Tämän geenin deleetio saa aikaan okklusionegatiivisen viruksen. Rekombinanttibakulovirus tuotetaan homologisella rekombinaatiolla siirtovektorin ja villityypin DNA:n välillä. Siirtovektori (esim. pVL941) sisältää viruksen DNA-osan, joka sisältää
 25 polyhedronipromoottorin (katso esimerkki 3). Ekspressoitava geeni insertoidaan promoottorisekvenssin alavirtaan.
 30

Ekspressiovektorissa oleva insertoitu geeni voidaan antaa elävänä virusrokotteena, kuten adenovirus- tai vacciniavirusrokotteena. Sitä voidaan myös ekspressoida

suurina määrinä transformoimalla sopiva isäntä, kuten E. coli, ja puhdistamalla.

Kaikki nukleotidisekvenssit, peptidit ja niitä sisältävät koostumukset voidaan valmistaa yhdistelmä-DNA-menetelmillä tai synteettisesti.

Suosittelavien suoritustapojen kuvaukset

Seuraavat esimerkit toimivat kuvaten keksintöä. HA-geenin nukleotidi- ja aminohapposekvenssien numerointi on julkaisun Hiti et al., Virology, 111: 113 - 124, 1989, mukainen. HA-geeni on peräisin ihmisen influenssaviruskanasta A/WSN/33. Tavanomaiset yhdistelmä-DNA-menetelmät entsyymaattisia reaktioita, plasmidi-DNA:n valmistusta, kohdennettua mutageneesiä, bakteeri- ja nisäkässolutransformaatioita, jne., varten tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti tai kuten on kuvattu teoksessa Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Kaikki osat ja prosentit on annettu painon mukaan ellei muuta ole mainittu.

Esimerkit 1 - 7 kuvaavat insertiokohdan muodostusta HA-geenin antigeeniseen kohtaan A, johon vieraat epitoopit insertoidaan kimeeristen proteiinien muodostamiseksi. Esimerkki 8 kuvaa, että samanlaista strategiaa käyttäen on mahdollista muodostaa insertiokohdat toisiin tunnettuihin HA-geenin antigeenisiin kohtiin. Sitten vieraat epitoopit insertoidaan mihin tahansa juuri muodostettuihin HA-geenin kohtiin. Erikoisesti esimerkki 8 kuvaa yksittäisen restriktiokohdan BglII muodostuksen HA-geenin aminohappokohtiin 184/185, joka on osa antigeenista kohtaa B. Esimerkki 9 esittää useiden HA-insertiokohtien käytön.

Esimerkki 1

HA-ekspressiovektorin rakentaminen

Tässä viitataan kuvioon 2. Plasmidi pHAX (jota kutsutaan myös nimellä plasmidi pSV-HA julkaisussa Hartman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 233 - 237, 1982), jossa on täydellinen HA-geenin koodittava sekvenssi, di-

gestoitiin BamHI-entsyymillä 1,75 kiloemäksen fragmentin eristämiseksi. Tämä HA-proteiinia koodittava fragmentti insertoitiin sitten plasmidin pTZ19R (Pharmacia, Inc.) BamHI-kohtaan rekombinanttikloonin ptZ19HA saamiseksi.

5 Yksijuosteinen DNA, joka sisälsi HA-sekvenssin positiivisen juosteen sekvenssinä, eristettiin käyttäen plasmidia ptZ19HA. Baldari et al., Gene, 35: 27 - 32, 1985. Tätä DNA:ta käytettiin suoritettaessa oligonukleotidivälitteinen kohdennettu mutageneesi käyttäen seuraavaa
10 oligonukleotidia: 5'-TCT GTA AAA ACT GCT TTT TCG GGC CCT ATG GGA GCA TGA TAC-3' (# 972). Tämä oligonukleotidi vastaa HA-geenin nukleotideja 480 - 518 niin, että keskelle on insertoitu ApaI-kohta (GGGCCC). Mutatointi tällä oligonukleotidilla ja E. coli JM109 -solujen transformaatio
15 suoritettiin julkaistujen raporttien mukaisesti. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, sivut 15 - 51, 1989. Yhden kloonin, ptZHA139-15, havaittiin sisältävän juuri valmistetun ApaI-kohdan aminohapossa gly 139, joka korvasi aminohapot ala-arg samalla, kun loppuosa sekvenssiä pysyi samana. Tämä vahvistettiin tämän alueen
20 DNA-sekvenssoinnilla.

Esimerkki 2

Proteiiniepitoppien insertointi

Tässä viitataan jälleen kuvioon 2. Eri peptidejä
25 koodittavat komplementaariset oligomeerit syntetisoitiin fosfotriesterimenetelmällä. Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 5765, 1978. Ekvimolaariset konsentraatiot komplementaarisia oligomeerejä sekoitettiin niin, että saatiin kaksijuosteinen oligomeeri, jonka päissä oli ApaI-sekvenssit.
30 Ennen ligaatiota oligomeerit fosforyloitiin 5'-päähän ATP:llä ja T4 DNA kinaasilla valmistajan ohjeiden mukaisesti (Pharmacia, Inc.). Noin 10 µg plasmidia ptZHA139-15 digestoitiin ApaI-entsyymillä ja defosforyloitiin bakteerin alkaalisella fosfataasilla. Sambrook et al.,
35 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989. Noin

100 ng ApaI-entsyymillä katkaistua plasmidia ja 1 µg oligonukleotideja ligoitiin kukin erikseen ja käytettiin transformoitaessa *E. coli* -solut. Bakteripesäkkeet seulottiin käyttäen in situ hybridisaatiota radioaktiivisiksi leimatuilla oligomeereillä. Mahdolliset insertin sisältävät rekombinanttikloonit sekvensoitiin sitten inserttien oikean orientaation kuin myös oikeiden lukuraamien määrittämiseksi. Kutakin taulukon 1 ja kuvion 2 yhdeksästä HIV-epitopista käytettiin.

Esimerkki 3

Rekombinanttibakuloviruksen rakentaminen

Käyttäen standardeja yhdistelmä-DNA-menetelmiä (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989), 1,75 kiloemäksen pituiset kimeeriset HA- tai HA/HIV-epitoppegeenit, joiden päissä oli BamHI-sekvenssit, insertoitiin kukin erikseen AcMNP-viruksesta peräisin olevaan siirtovektoriin pVL941 (saatu tohtori Max D. Summers'ltä, ja kuvattu teoksessa A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas A & M University, College Station, TX, 1988). Heterologisen proteiinigeenin ekspressio on polyhedronipromoottorin transkriptiosäätelyn alainen. Rekombinanttibakulovirus, joka sisälsi halutun geenin, muodostettiin transfektoimalla yhtäaikaan villityyppiviruksen AcMNPV DNA (1 µg) ja rekombinanttisiirtoplasmidin DNA (2 µg) Sf9-soluihin käyttäen kalsiumfosfaattisaostusmenetelmää. Smith, G.E. et al., Mol. Cell. Biol., 3: 2156 - 2165, 1983. Kuusi vuorokautta myöhemmin viljelyalusta, joka sisälsi villityypin ja rekombinanttibakuloviruksia, kerättiin ja rekombinanttivirukset tunnistettiin rajoittavalla laimennusmenetelmällä hybridisoiden srajalaimennetulla viruksella infektoidujen Sf9-solujen ³²P-leimatun HA-geenin kanssa 96-kuoppaisella levyllä. Germann et al., J. Biol. Chem., 264: 7814 - 7824, 1989. Suoritettiin kolmesta viiteen hybridisaatioseulontakierrosta puhtaasti okklusionegatiivi-

sen (polyhedroninegatiivisen) viruksen saamiseksi, kuten kanta AcHA-N22G, joka koodittaa HA-N22G-proteiinia. Tätä virusta kasvatettiin Sf9-soluissa.

Sf9-solut ympättiin tiheytenä noin 7×10^7 solua per T-150-pullo (150 cm^2). Vaihtoehtoisesti Sf9-soluja kasvatettiin suspensioviljelmänä pyörivässä pullossa tiheyteen $2 - 3 \times 10^6$ solua/ml. Solut infektoitiin rekombinanttiviruksella viruksen määrän suhteen isäntään (MOI) ollessa infektiossa 5 - 10. Kolme - neljä vuorokautta myöhemmin, kun HA-kimeerien ekspressio oli suurimmillaan, solut kerättiin. Kun oli pesty PBS:llä, solut uutettiin 1 % detergenttiseoksella, joka sisälsi yhtä suuret määrät Triton X-100:aa ja deoksikolaattia, membraaniin sitoutuneiden HA-proteiinin tai HA-kimeerien eristämiseksi. Koska HA on glykoproteiini, se puhdistettiin osittain antamalla uutoksen kulkea lektiini-Sepharose 4B -affiniteettipylvään läpi (lektiini oli peräisin Lens culinaris -kannasta, Sigma Chem. Co. - St. Louis, MO). Osittain puhdistettuja HA-kimeerejä käytettiin immunisoimaan eläimet (marsut) niiden immunogeenitehokkuuden arvioimiseksi.

Esimerkki 4

HA- ja kimeeristen HA/HIV-proteiinien biologiset ominaisuudet

Korkeatiitterisiä (10^9 pfu/ml) rekombinanttiviruksia käytettiin infektoimaan juuri maljatut Sf9-solut, jotka kolme vuorokautta aikaisemmin oli kerätty ja prosessoitu rekombinanttiproteiinin eristämiseksi esimerkin 3 menetelmän mukaisesti. Rekombinanttiproteiinit käsittivät noin 10 - 20 % solun kokonaisproteiineista arvioituna geelin coomassie blue -värjäyksellä. Noin 2 - 10 % rekombinanttiproteiineista oli uutettavissa detergentillä ja luultavasti edustivat luonnollista muotoa. Jäljelle jäänyt osa oli liukenematonta proteiinia, joka varastoitui solun sisälle. HA- ja kimeeriset HA-HIV-proteiinit syntetisoitiin triplettirintamina. Alempi rintama (noin 55 kD) edusti

glykolysoimatonta muotoa, koska infektoitujen solujen käsittely tunikamysiinillä, joka on glykosylaation inhibiittori, tuotti ainoastaan tämän proteiininrintaman. Ylemmät kaksi rintamaa (68 kD ja 66 kD) luultavasti edustivat eri glykosylaatioprosessointivaiheita. Kun HA-rekombinanttibakuloviruksella infektoidut solut uutettiin detergentillä, ainoastaan 66 kD proteiininrintama oli uutettavissa, joka vihjasi, että tämä proteiini on membraaniin liittynyt ja luultavasti edustaa luonnollista HA-muotoa.

Suoritettiin immunofluoresenssi kanin anti-influenssa-seerumilla (A/WSN/33) ja fluoreskeinilla konjugoitulla toisella vasta-aineella, vuohen anti-kani IgG:lla. Posse, Virus Res., 5: 43 - 59, 1986. Rekombinanttiviruksilla infektoidut solut osoittivat vahvan membraanifluoresenssin. Valeinfektoidut ja villityypillä infektoidut solut eivät osoittaneet mitään fluoresenssia.

Rekombinanttibakuloviruksella infektoitujen Sf9-solujen biologiset aktiivisuudet testattiin hemadsorptiolla ja hemagglutinaatiolla käyttäen 1 % kanan RBC:tä. Posse, Virus Res., 5: 43 - 59, 1986. Kun solut, jotka oli infektoitu HA-rekombinanttibakuloviruksella, osoittivat merkittävän hemadsorption, muut solut, jotka oli infektoitu villityypin bakulovirusta tai HA-HIV-kimeereitä (N22G, D18S ja T16G) koodittavilla rekombinanttibakuloviruksilla, eivät osoittaneet mitään aktiivisuutta tässä testissä. Samanlaiset tulokset saatiin, kun hemagglutinaatio suoritettiin käyttäen soludetergenttiuutoksia. Nämä tulokset osoittivat, että HIV-epitoopin insertio HA-proteiiniin vaikutti reseptorin sitoutumiskohtaan, joka välittää HA-proteiinin biologista aktiivisuutta. HA-proteiinin reseptorin sitoutumiskohta on läsnä lähellä antigeenista kohtaa A, johon epitoopit selektiivisesti insertoititiin (kuvio 1).

Esimerkki 5

Kimeerisillä HA-HIV-proteiineilla injektoidujen marsujen immuuniresponssi

20 - 30 T150-pullossa olevat Sf9-solut infektoitiin HA-N22G- ja HA-D18S-proteiineja koodittavilla rekombinant-tibakuloviruksilla, jotka valmistettiin esimerkin 3 menetelmän mukaisesti, MOI-arvon ollessa 10. Solut kerättiin 72 tuntia infektion jälkeen, pestiin kolme kertaa PBS:llä ja prosessoitiin puhdistusta varten. Osittain puhdistettuja HA- ja kimeerisiä HA-proteiineja käytettiin immunoisoimaan marsut. Tehosteinjektiot annettiin neljän viikon välein. Seerumi kerättiin kahden viikon kuluttua kustakin injektioista.

Seerumin tehokkuus määritettiin hemagglutinaation inhibitiotestillä (HI), joka määrittää antiseerumin kyvyn inhiboida hemagglutinaatioreaktio, joka esiintyy käytettäessä 4 yksikköä HA-rekombinanttiproteiinia ja 1 % kanan RBC:tä. Kaikki seerumit laimennettiin ensin 1:10 ja käsiteltiin kaoliinilla (100 mg/ml per millilitra) luonnollisten inhibiittorien poistamiseksi. Kaoliinikäsittely ei vaikuta vasta-ainetiitteriin.

Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Toisen injektion jälkeen kaikkien HA-rekombinantti- tai kimeerisiä HA-HIV-proteiineja vastaan olevien seerumien HI-tiitterit vaihtelivat välillä 160 N22G:lle ja 5120 D18S:lle. Kontrolliseerumien, joissa ei ollut yhtään anti-geenia, tiitteri oli 20.

Kolmannen injektion jälkeen kaikilla eläimillä tapahtui lisätehostuminen HI-tiitterissä. Eläimet, jotka immunisoitiin raa'alla plasmamembraanilla, joka valmistettiin rekombinanttibakuloviruksella AcHA-N22G infektoiduista soluista, tuottivat myös HI-tiitterin, joka oli 60 - 80. HI-tiitteriä 40 tai enemmän pidetään suojaavana influenssainfektiota vastaan ihmisrokotuksessa.

Kun yllä oleva koe toistettiin heterologisen influenssakannan (A+ Taiwan) HA-proteiinin kanssa, mitään neutralisaatiota ei havaittu. Tämä osoittaa, että bakulovirukset tai ekspressoidut HA-antigeenit kykenivät indusoimaan kannalle spesifisten neutraloivien vasta-aineiden tuoton. Lisäksi, HA-D18S- ja HA-N22G-proteiineja vastaan olevien antiseerumien osoitettiin sisältävän vasta-aineita, jotka olivat reaktiivisia HIV gp160-proteiinin kanssa Western blottaus -menetelmällä osoitettuna. HA-N22G-immunisaation tulokset on kuvattu taulukossa 3.

Epitooppi N22G vastaa HI-viruksen gp160-proteiinin pääasiallista neutraloivaa domeenia ja tämä on näin ollen pääkohde rokotteen kehittämiseksi. Javaherian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6762 - 6772, 1989. Eläinkokeet toistettiin käyttäen HA-rekombinantti- tai HA-N22G-proteiinia. Eläimet immunisoitiin aluksi osittain puhdistetulla valmisteella, joka sisälsi 1 - 2 µg HA- tai kimeeristä proteiinia, ja sitten annettiin tehosteannos kolme kertaa. Vasta-aineiden tuotto insertoitua peptidiä N22G vastaan määritettiin (I) anti-peptidi (N22G) ELISA-menetelmällä, (II) Western blottaus -menetelmällä käyttäen gp160-vaippaproteiinia ja (III) in vitro neutralisaatiotestillä (esitetty taulukossa 3). Toisen (2°) ja kolmannen (3°) tehosteannoksen jälkeen eläimet osoittivat spesifisten korkeatiitteristen vasta-aineiden tuoton kaikissa kolmessa testissä. Kuten odotettiin, HA-proteiinilla immunisoidut eläimet eivät osoittaneet mitään aktiivisuutta näissä testeissä. Neutraloivan vasta-aineen tuotto HI-virusinfektiota vastaan eläimissä, jotka immunisoitiin HA-N22G-proteiinilla, on erityisen mielenkiintoista.

Taulukko 2

Marsun seerumin hemagglutinaation inhibitiotititit (HI), joka seerumi kerättiin kaksi viikkoa toisen (2°) ja kolmannen (3°) injektion jälkeen

5	Antigeeni	Marsu	Kaoliini	HAI-tiitteri	
				2°	3°
10	HA	A	+	1280	10240
		B	+	1280	2560
	N22G	C	+	160	- ^a
		D	+	160	-
	D18S	E	+	5120	10240
		F	+	640	3790
	Ei mitään ^b	9	+	20	40
		10	+	20	60
	N22G raakamembraanit raakapelletti	11	+	80	N.D. ^c
		12	+	60	N.D.
15	Influenssa WSN	Kani 313	+	5120	
			-	5120	

20 ^a Molemmat eläimet kuolivat verenoton aikana.

^b Normaalin seerumin HI-tiitteri ilman kaoliinikäsittelyä on 320.

^c N.D. = ei määritetty.

Taulukko 3

Marsujen, jotka immunisoitiin HA- ja HA-N22G-proteiineilla (HIVMN V3-silmukan aminohapot 307 - 330), serologiset analyysit (käytettiin kahta eläintä per ryhmä)

5

10

15

Testit	HA			HA-N22G		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
HA-neutralisaatio-tiitteri (HI)	1280 1280	2560 2560	2560 5120	160 160	640 1280	2560 1280
HA ELISA -tiitteri	10 ⁶ 10 ⁶	3x10 ⁵ 3x10 ⁵	3x10 ⁵ 1x10 ⁶	3x10 ⁵ 3x10 ⁵	3x10 ⁵ 1x10 ⁵	1x10 ⁵ 1x10 ⁴
Anti-peptidi (N22G) ELISA	- -	- -	- -	300 300	30,000 10,000	30,000 10,000
anti-env (blottaus)	- -	- -	- -	N.D. N.D.	20,000)1,000	>20,000 20,000
Neutraloivien vasta-aineiden tiitteri (tehty NIH:ssa)	- -	- -	- -	<10 <10	40 20	>810 475

- = negatiivinen.

N.D. = ei tehty.

20

Esimerkki 6

HA-IgE-epitoopin (HA-K10F) valmistus

HA-rekombinanttigeenin kloonausta bakulovirusiirtovektoriin pBL1 (Vialard et al., J. Virology, 69: 37 - 50, 1990) helpotettiin modifioimalla päissä olevia restriktiokohtia. Noin 2 µg plasmidia ptZHA-139-15 digestoitii BamHI-entsyymillä 1,75 kiloemäksen DNA-fragmentin eristämiseksi. Sen jälkeen, kun päät täytettiin DNA polymeraasin Klenow-fragmentilla ja deoksinukleotiditrifosfaateilla (dNTP), tämä fragmentti insertoitii plasmidiin pGEM-9Zf(-)(Promega Biotec - Madison, WI), joka oli katkaistu HindIII-entsyymillä ja jonka päät oli täytetty niin, että saatiin plasmidi pHA.NheI. Tästä plasmidista irrotettiin HA- tai kimeeriset HA-geenit 1,75 kiloemäksen DNA-fragmenttina digestoiden SpeI- ja XbaI-entsyymeillä.

25

30

Noin 1 µg plasmidin pHA.NheI DNA:ta digestoitiin ApaI-entsyymillä ja sitten defosforyloitiin bakteerin alkaalisella fosfataasilla. Syntetisoitiin kaksi komplementaarista oligonukleotidia, jotka koodittavat K10F-peptidiä:

K T K G S G F F V F

5' AAA ACC AAG GGA TCA GGA TTC TTT GTA TTC GGG GCC 3'

CCGG TTT TGG TTC CCT AGT CCT AAG AAA CAT AAG CC

StyI

ApaI

10 Ekvimolaariset määrät kahta oligomeeriä sekoitettiin ja fosforyloitiin käyttäen T4 polynukleotidikinaasia ja ATP:tä. Noin 0,1 µg defosforyloitua vektoria ja 1 µg kaksijuosteista oligomeeriä ligoitiin ja sitten käytettiin transformoimaan *E. coli* MM294 -solut.

15 Valmistettiin pikaeristykset 12 kloonista ja digestoitiin StyI-entsyymillä insertoitujen oligomeerien läsnäolon seulomiseksi. Yhden kloonin, pHA.Nhe-hIgE-11, havaittiin sisältävän insertoidun nukleotidisekvenssin oikeassa koodittavassa sekvenssissä. Nukleotidisekvenssointi vahvisti,

20 että oikea sekvenssi oli halutussa kohdassa. Noin 10 µg tätä plasmidia digestoitiin yhtä aikaa SpeI- ja XbaI-entsyymeillä 1,8 kiloemäksen DNA-fragmentin eristämiseksi.

25 Noin 10 µg bakulovirussiirtovektoria pBlueBac (pBL1 - Invitrogen Corp. - San Diego, CA) digestoitiin NheI-entsyymillä ja defosforyloitiin BAP-entsyymillä. Suurin piirtein samat moolimäärät NheI-entsyymillä katkaistua vektoria ja 1,8 kiloemäksen DNA-fragmenttia ligoitiin ja sitten ligaatioseosta käytettiin transformoimaan *E. coli*

30 MM294 -solut. 12 kloonia valittiin plasmidin pikaeristykseen. Yhden kloonin, pBL-HA-K10F-5-2, tunnistettiin sisältävän HA.K10F-geenin oikeassa orientaatioissa.

35 Rekombinanttibakuloviruksen saamiseksi noin 1 µg villityypin viruksen AcMNPV DNA:ta ja 2 µg rekombinanttsiirtovektoria pBL-HA-K10F-5-2 käytettiin transfektoimaan

Sf9-hyönteissolut käyttäen kalsiumfosfaattisaostusmenetelmää. Summers et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas A & M University, College Station, TX, 1988. Rekombinanttibakulovirus muodostettiin homologisella rekombinaatiolla siirtovektorin ja villityypin viruksen DNA:n välillä. Kuusi vuorokautta transfektion jälkeen kerättiin alusta, joka sisälsi villityypin ja rekombinanttiviruksen seoksen. Alustaa käytettiin sarjalaimennosten (10^{-3} - 10^{-6}) jälkeen infektoimaan juuri maljatut Sf9-solut 100 mm petrimaljoilla, jotka sitten päällystettiin agarosilla, joka sisälsi β -galaktosidaasin substraattia, X-gal:ia. Rekombinantti-virus, jonka läsnäolon osoitti siniset plakit, lisäpuhdistettiin useilla plakkipuhdistuskierroksilla. Vialard et al., J. Virology, 69: 37 - 50, 1990. Tämä rekombinanttibakulovirus nimettiin ACHA.K10F:ksi. Kimeerisen HAK10F-proteiinin ekspressio määritettiin infektoitujen Sf9-solujen proteiinien Western blot -analyysillä käyttäen peptidiä vastaan suunnattuja kanin vasta-aineita. Sen jälkeen, kun oli kasvatettu suuren mittakaavan tuotannossa ja puhdistettu, kimeeriä käytettiin rokotteenä.

Esimerkki 7

HA-IgE-epitoopin (HA-H22V) valmistus

Peptidiä H22V koodittava nukleotidisekvenssi insertoitiin HA-geeniin, jota sitten ekspressoitiin bakulovirusekspressiosysteemeissä esimerkin 6 mukaisella menetelmällä. Syntetisoitiin kaksi komplementaarista oligonukleotidia:

```

ApaI  H   S   T   T   Q   P   R   K   T   K
      CAC AGT ACT ACA CAG CCC CGC AAA ACC AAG
CCGG  GTG TCA TGA TGT GTC GGG GCG TTT TGG TTC
      G   S   G   F   F   V   F   S   R   L   E   V
GGA   TCA GGA TTC TTT GTA TTC TCA CGC CTA GAG GTG GCC
CCT   AGT CCT AAG AAA CAT AAG AGT GCG GAT CTC CA

```

Kaksijuosteinen oligomeeri insertoituiin plasmidin pHA.NheI
 ApaI-kohtaan niin, että saatiin rekombinanttiplasmidi
 pHA-Nhe-H22V. Yllä mainitusta plasmidista saatu 1,8 ki-
 loemäksen pituinen SpeI/XbaI-DNA-fragmentti insertoituiin
 5 plasmidin pBL1 NheI-kohtaan niin, että saatiin rekombi-
 nanttisiirtovektori pBL-HA-H22V-1. Tämän plasmidin ja
 AcMNPV DNA:n homologisella rekombinaatiolla saatiin rekombi-
 nanttibakulovirus AcHA-H22V. Tämä rekombinanttibakulovi-
 rus injektoiduna Sf9-soluihin ekspressoitui kimeeristä
 10 HA-H22V-proteiinia, jota puhdistuksen jälkeen voidaan
 käyttää rokotteenä.

Esimerkki 8

HA-ekspressiovektorin rakentaminen, johon on muo-
 dostettu insertiokohta kohtiin B, C, D ja E

15 Käyttäen rekombinanttiplasmidia ptZ19HA, jossa on
 HA-geeni, valmistettiin yksijuosteinen DNA. Baldari et
 al., Gene, 35: 27 - 32, 1985. Tätä DNA:ta käytettiin suo-
 ritettaessa kohdennettu mutageneesi seuraavalla oligomee-
 rillä: 5' ACT CTG TTG CTC AGA TCT GCT GGA CGG GTG ATG AAC
 20 3'. Tämä oligonukleotidi vastaa HA-geenin nukleotideja
 615 - 650 (aminohapot 178 - 189) niin, että oligonukleo-
 tidin keskelle on insertoitu BglII-restriktiokohta
 (AGAT-CT). Mutageneesi tällä oligonukleotidilla ja E. coli
 JM109 -solujen transformaatio suoritettiin julkaistun ra-
 portin mukaisesti, Sambrook et al., Molecular Cloning, A
 25 Laboratory Manual, sivut 15 - 51, 1989. Yhden kloonin,
 ptZHA184-1, havaittiin sisältävän juuri muodostetun BglII-
 kohdan. Tämä varmistettiin tämän alueen DNA-sekvenssoin-
 nilla. Mutageneesi johti ser 184 ja asp 185 tähteiden sub-
 30 stituutioihin arg- ja ser-tähteillä, vastaavassa järjes-
 tyksessä, muun sekvenssiosan pysyessä muuttumattomana.

Esimerkki 9

Useita insertiokohtia sisältävän HA-ekspressiovek-
 torin rakentaminen

35 Muodostettiin kaksi insertiokohtaa, yksi HA-prote-
 iinin kumpaankin antigeeniseen kohtaan A ja B, joihin kak-

si samaa tai eri epitooppia voidaan insertoida. Rekombinanttiplasmidi ptZHA139-15, joka on kuvattu esimerkissä 1, sisältää HA-geenin, johon yksittäinen ApaI-restriktiokohta on muodostettu sekvenssiin, joka vastaa antigeenista kohtaa A. Tästä plasmidista valmistettua yksijuosteista DNA:ta käytettiin mutagenisoitaessa esimerkin 8 mukaisella oligomeerisekvenssillä, joka oli suunniteltu muodostamaan yksittäinen BglII-tunnistusekvenssi kohtaan B. Yhden kloonin, pHA139/184, havaittiin sisältävän molemmat juuri muodostetut ApaI- ja BglII-kohdat, joiden läsnäolo varmistettiin asianmukaisten alueiden DNA-sekvensoinnilla. Sit-
 5 taa A. Tästä plasmidista valmistettua yksijuosteista
 10 DNA:ta käytettiin mutagenisoitaessa esimerkin 8 mukaisella
 oligomeerisekvenssillä, joka oli suunniteltu muodostamaan
 yksittäinen BglII-tunnistusekvenssi kohtaan B. Yhden
 kloonin, pHA139/184, havaittiin sisältävän molemmat juuri
 muodostetut ApaI- ja BglII-kohdat, joiden läsnäolo varmis-
 tettiin asianmukaisten alueiden DNA-sekvensoinnilla. Sit-
 ten sama tai eri vieras epitooppi insertoidaan mihin ta-
 hansa tunnettuun HA-proteiinin antigeeniseen kohtaan.

Esimerkin 9 menetelmä voidaan yhtä hyvin laajentaa
 15 sisältämään yksittäisten lisärestriktiokohtien muodostuk-
 sen alueille, jotka vastaavat HA-proteiinin antigeenisia
 kohtia C, D ja/tai E. Tässä mainittujen yksittäisten res-
 triktiokohtien on tarkoitettu sisältävän kohdat, jotka
 eivät ole läsnä HA- tai plasmidin ptZ19R-sekvensseissä.
 20 ApaI- ja BglII-kohtien lisäksi muut esimerkit yksittäisis-
 tä restriktiokohdista ovat AflII, AvrII, BclII, NheI,
 XhoI, jne.

Esimerkki 10

25 Passiivinen immunisointi anti-N22G-vasta-aineilla HI-virusinfektion estämiseksi

Passiivinen immunisointi on käyttökelpoinen tapauk-
 sissa, jossa henkilö on joutunut vahingossa alttiiksi in-
 fektoituneelle verelle tai mille tahansa verestä peräisin
 oleville osille. Sovellutus on myös käyttökelpoinen HI-vi-
 30 ruksen äidistä sikiöön tapahtuvaan siirtymiseen. HIV-1
 V3-silmukalle (N22G) spesifisten vasta-aineiden anto voisi
 ehkäistä infektion synnyn. Berzofsky et al., "Approaches
 and Issues in the Development of Vaccines Against HIV," J.
Acquired Immune Deficiency Syndromes, 4: 451 - 459, 1991.

Suurten N22G-peptidille spesifisten vasta-aineiden määrän saamiseksi suuret eläimet (esim. hevoset) immunsoidaan useilla injektioilla, kunnes korkeatiitteriset neutraloivat vasta-aineet HIV-1-virusta vastaan saadaan aikaan, kuten on kuvattu esimerkissä 5 ja taulukossa 3. Eläimistä otetaan verta seerumin saamiseksi, joka sitten ajetaan Proteiini A Agarose -affiniteettipylvään läpi IgG-fraktion rikastamiseksi valmistajan ohjeiden mukaisesti (GIBCO BRL, Life Technology, Inc., Gaithersburg, MD). IgG-fraktio sisältää HIV-1-virukselle spesifiset vasta-

aineet. Sopivaan kantajaan formuloitua IgG:tä injektoidaan sopiva määrä henkilöihin, joiden epäillään olleen alttiina HIV-1-virukselle. Injektion annosmäärä ja ajoitus määritetään ihmisillä suoritettavilla kliinisisillä kokeilla.

Yllä mainitut patentit, julkaisut ja koemenetelmät on liitetty tähän viitteiksi.

Alan asiantuntijoille tulee mieleen monia variaatioita esillä olevaan keksintöön yllä olevan yksityiskoh-
taisen kuvauksen perusteella ja ne kuuluvat keksintöön ja
liitettuihin patenttivaatimuksiin.

Tässä patenttihakemuksessa esitetty rokote esittää profylaktisen suojauksen virus-, bakteeri- ja kasvaintigeenimateriaalien aiheuttamalle infektiolle niin, että se saa isännän kehittämään neutraloivia vasta-aineita vierasta hyökkääjää vastaan, joka ehkäisee taudin lisäkehitymisen. Esimerkiksi marsussa kehitetty vasta-aine, kuten yllä on osoitettu, neutraloi (tappaa) tunkeutuvan HI-viruksen ennen kuin se tulee soluun sisään ja asettuu sinne. Se, että tämän keksinnön mukaiset antigeeniset polypeptidit toimivat HA-geeniin sisällytettyinä vieraiden epitoppien antigeeneina voidaan osoittaa esimerkiksi antamalla HI-virusta vastaan tehdyn ihmisen monoklonaalisen vasta-
aineen reagoida tämän keksinnön mukaisten modifioitujen HA-HIV-yhdisteiden kanssa.

Eri adjuvantteja voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten antigeenisten polypeptidien kanssa sisältäen Syntex-adjuvantin, alunan (0,2 % puskuroidussa vesipohjaisessa liuoksessa), immunostimuloivan kompleksin (ISCOM),
 5 tetanus-toksoidin, difteria-toksoidin, glykoside Quit A -adjuvantin (Spikoside, Iscotec AB)(Morein et al., Nature, 308: 457 - 460, 1984), laimeassa öljyemulsiossa MF 59 olevan muramyylidipeptidi-johdannaisen (MTP-PE) ja suositeltavasti kolesteryylisukkinaattiin (CHS) perustuvan liposomin (WO 90/01 947, 8.3.1990; WO 90/1 948, 8.3.1990 ja
 10 US 4 721 612).

Rokotteet valmistetaan tavanomaisesti sekoittamalla antigeeninen polypeptidi adjuvantin kanssa ympäröivässä lämpötilassa.

15 Nämä rokotteet, riippuen niiden formulaatiosta, voidaan antaa potilaalle, jolla on infektioriski, suun kautta, parenteraalisesti, peräsuolen kautta, nenän kautta tai suositeltavasti lihaksen sisäisellä injeksiolla. Tehokas annos tulee olemaan välillä 1 - noin 500 µg, tavallisesti 5 - 300 µg ja luultavasti välillä 15 - 100 µg, yksittäisenä tai useana annoksena. Tehosteannoksia voidaan
 20 käyttää halutun neutraloivan vasta-ainetiitterin aikaansaamiseksi (300 HI-viruksen tapauksessa). Taudista riippuen tehoste voidaan antaa noin yhden vuoden kuluttua.

25 Läpi tämän patenttihakemuksen spesifisiin epitoopeihin on viitattu joko osoittamalla päissä olevat aminohapot ja aminohapposekvenssin pituus, kuten N22G-peptidin tapauksessa, jossa N-pään aminohappo on Asn, C-pään aminohappo on Gly ja sekvenssi on pituudeltaan 22 aminohappoa,
 30 tai yleisillä sekvenssien nimillä niin kuin ne on esitetty kirjallisuudessa, kuten gpl60- ja gpl20-proteiinien tapauksissa.

HA-proteiinin ainakin yhteen antigeeniseen kohtaan tehty insertio on aminohapposekvenssi, joka on pituudeltaan suositeltavasti ainakin 12 aminohappoa.
 35

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä rokotteen valmistamiseksi virus-, bak-
teeri- tai muuta antigeenia vastaan, t u n n e t t u sii-
5 tä, että peptidi, joka sisältää aminohapposekvenssin, joka
on oleellisesti sama kuin influenssa A -viruksen HA-pinta-
proteiinin sekvenssi, jossa on viisi immunodominanttia
antigeenista kohtaa, mainitun peptidin sisältäessä insert-
tinä ainakin yhdessä mainitussa antigeenisessä kohdassa
10 aminohapposekvenssin, joka on oleellisesti sama kuin mai-
nittua virusta, patogeenista bakteeria tai muuta antige-
nia toiminnallisesti edustavan vieraan epitoopin sekvens-
si, yhdistetään tai liitetään adjuvantin kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
15 t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeninen kohta
on HA-proteiinin A-alue.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että mainittu antigeeninen kohta vastaa
HA-proteiinin aminohappoja 183 - 192.

20 4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen
menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu insertio
on ainakin 12 aminohappoyksikön pituinen aminohapposek-
venssi.

25 5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen
menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vieras epitooppi
on viruksen epitooppi, IgE-effektorikohdan epitooppi, bak-
teeriproteiinin epitooppi, kasvainepitooppi tai SP10-epi-
tooppi.

30 6. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen
menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vieras epitooppi
on HIV-epitooppi.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että epitooppi on T20E, T16G, D18S,
G20E, K27R, E14Q, N22G, P17, P24, gp160 tai gp120.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adjuvantti on Syntex-adjuvantti tai aluna.

5 t u siitä, että peptidi sisältää aminohapposekvenssin, joka on oleellisesti sama kuin influenssa A -viruksen HA-pintaproteiinin sekvenssi, jossa on viisi immunodominant-tia antigeenista kohtaa, mainitun peptidin sisältäessä inserttinä ainakin yhdessä mainitussa antigeenisessä koh-
10 dassa aminohapposekvenssin, joka on oleellisesti sama kuin vieraan epitoopin sekvenssi, joka menetelmä sisältää vaiheet, joissa rakennetaan yhdistelmä-DNA-menetelmillä replikoituva ekspressiovektori, joka sisältää mainittua peptidiä koodittavan DNA-sekvenssin, transformoidaan sopivat
15 isäntäsolut mainitulla ekspressiovektorilla ja saadaan transformoidut isäntäsolut, viljellään transformoituja isäntäsoluja mainitun peptidin ekspressoimiseksi ja otetaan mainittu peptidi talteen.

20 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu antigeeninen kohta on HA-proteiinin A-alue.

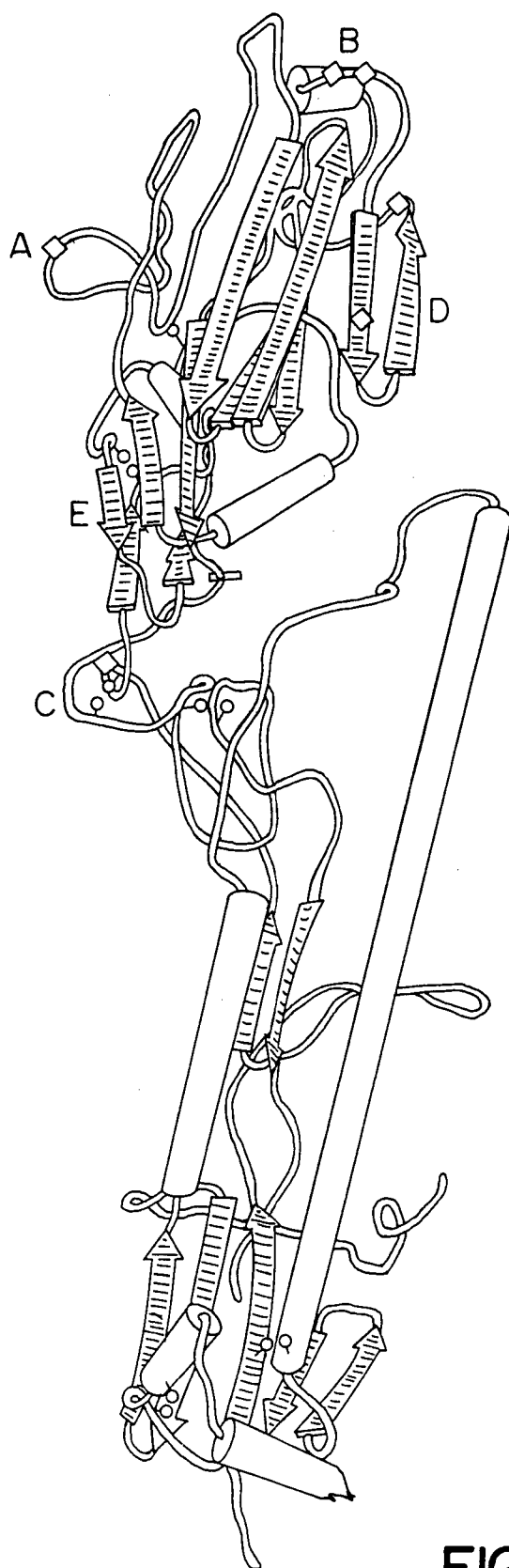
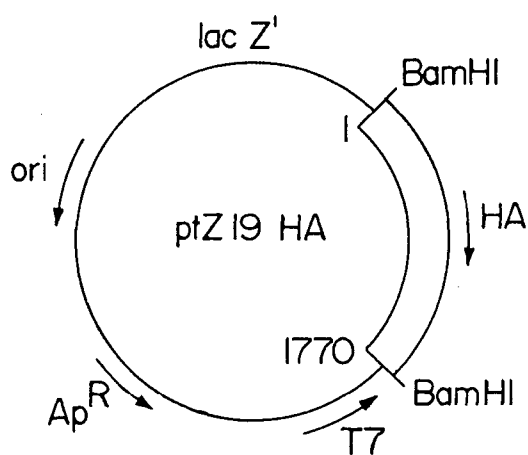
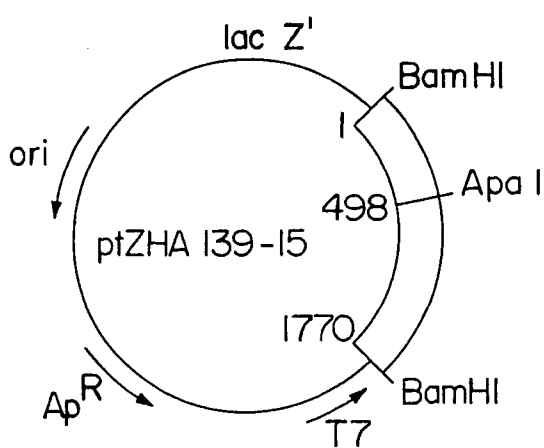


FIG. 1



-YKSIJUOSTEISEN DNA:N VALMISTUS

-MUTAGENISOINTI OLIGOLLA #972



-ApaI, BAP

-HIV-EPITOOPPIEN OLIGOMEERIDUP-
LEKSIEN INSERTOINTI

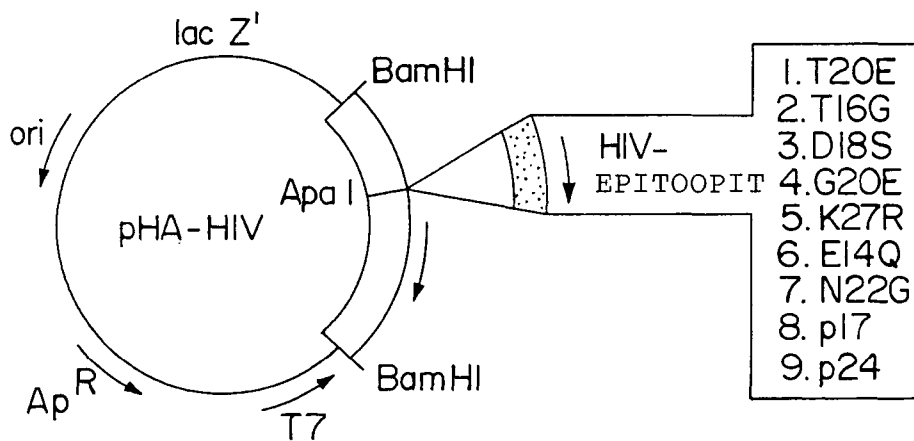


FIG. 2