

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

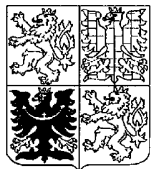
1999 - 2766

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.02.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.02.1997 12.03.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/037854 1997/9705040**

(33) Země priority: **US GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2000**
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/02293**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/34640**

(71) Přihlašovatel:

MERCK & CO., INC., Rahway, NJ,
US;

(72) Původce:

Shiver John W., Rahway, NJ, US;
Davies Mary-Ellen M., Rahway, NJ, US;
Freed Daniel C., Rahway, NJ, US;
Liu Margaret A., Rahway, NJ, US;
Perry Helen C., Rahway, NJ, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

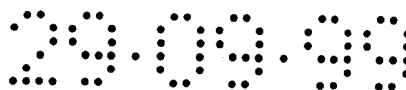
(54) Název přihlášky vynálezu:

Syntetické GAG geny HIV

(57) Anotace:

Syntetické molekuly DNA kódující gag geny HIV a modifikace gag genů HIV. Kodóny syntetických molekul jsou kodóny upřednostňované plánovanou hostitelskou buňkou. Syntetické molekuly mohou být použity jako polynukleotidové vakcíny, které umožňují účinnou imunoprophylaxi proti infekci HIV prostřednictvím stimulace tvorby neutralizačních protilátek a vyvoláním buňkami zprostředkované imunity.

CZ 1999 - 2766 A3



PV 2466-99

~~Gyoss~~

Syntetické GAG geny HIV

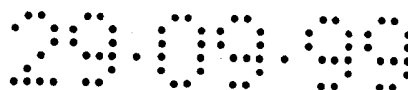
Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká vakcín proti viru HIV.

Dosavadní stav techniky

Virus lidské imunodeficience 1 (HIV-1) je etiologickým agens lidského syndromu získané imunodeficience (AIDS) a příbuzných onemocnění. HIV-1 je RNA virus náležící do rodiny retrovirů a má 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' organizaci, která je vlastní všem retrovirům. Kromě toho obsahuje HIV-1 mnoho genů s regulační nebo neznámou funkcí, jako jsou například tat a rev geny. Env gen koduje glykoprotein virového obalu, který je translatován jako 160-kDa prekursor (gp160) a potom je štěpen buněčnou proteasou za vzniku 120 kDa obalového glykoproteinu (gp120) a transmembránového 41 kDa obalového glykoproteinu (gp41). Gp120 a gp41 zůstávají v asociaci a jsou přítomny na virových částicích a na povrchu buněk infikovaných HIV. Gp120 se váže na CD4 receptor, který je přítomen na povrchu pomocných T-lymfocytů, makrofágů a jiných cílových buněk. Po navázání gp120 na CD4 způsobí gp41 fúzi, která je odpovědná za vstup viru.

Infekce začíná tehdy, když se gp120 na virové částici naváže na CD4 receptor na povrchu T4 lymfocytů nebo jiných cílových buněk. Navázaný virus splývá s cílovou buňkou a reversně transkribuje svůj RNA genom do dvouřetězcové DNA buňky. Virová DNA je inkorporována do genetického materiálu v buněčném jádru, kde virová DNA řídí produkci nové virové RNA, virových proteinů a nových virových částic. Nové částice jsou vyloučeny z membrány cílových buněk a infikují další buňky.

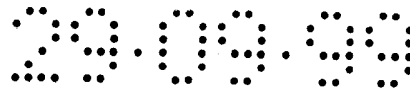


Destrukce T4 lymfocytů, které jsou zásadní pro imunitní odpověď, je hlavní příčinou progresivní imunitní dysfunkce, která je hlavním znakem infekce HIV. Ztráta cílových buněk vážným způsobem narušuje schopnost imunitního systému vyhledávat většinu invadujících patogenů, ale nejvýrazněji je narušena obrana proti virům, houbám, parazitům a některým bakteriím, zejména mykobakteriím.

HIV-1 usmrcuje buňky, které infikuje, replikací, únikem z buněk a poškozením buněčné membrány. HIV-1 může usmrtit cílové buňky nepřímo prostřednictvím gp120, který je přítomen na povrchu infikovaných buněk. Protože CD4 receptor na T buňkách má silnou afinitu pro gp120, mohou se zdravé buňky exprimující CD4 receptor vázat na gp120 a mohou fuzovat s infikovanými buňkami za vzniku syncytia.

HIV-1 může také vyvolat normální buněčnou imunitní odpověď proti infikovaným buňkám. S nebo bez pomoci antibiotik mohou cytotoxické buňky imunitního systému destruovat infikované buňky, které mají na svém povrchu přítomny virové proteiny. Nakonec, volné gag a gp120 proteiny mohou cirkulovat v krvi jedinců infikovaných HIV-1. Volný gp120 protein se může vázat na CD4 receptor neinfikovaných buněk, čím budou tyto buňky považovány za infikované a bude proti nim vyvolána imunitní odpověď.

Infekce HIV-1 je téměř vždy fatální a v současné době nejsou známá žádná vyléčení infekce HIV-1. Účinné vakciny pro prevenci infekce HIV-1 nejsou dosud dostupné. Vzhledem k nebezpečí zvrhnutí nebo infekce nebude pravděpodobně ve vakcině použit živý atenuovaný virus. Většina podjednotkových vakcin nebyla úspěšná v prevenci infekce HIV-1. Terapie infekce HIV-1, ačkoliv prodlužuje život některých infikovaných osob, má zavažné



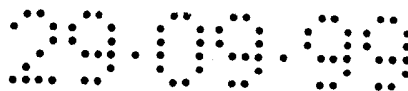
nežádoucí účinky. Existuje proto potřeba účinných terapeutických a vakcinačních prostředků pro léčbu této letální infekce.

Vakcinace je účinnou formou prevence onemocnění a byla úspěšně ověřena pro několik typů virových infekcí. Určení způsobů pro presentaci antigenů HIV-1 lidskému imunitnímu systému tak, aby se vyvolala protektivní humorální a protilátková odpověď, je obtížné. Doposud nebyly pokusy o vyrobení účinné vakciny proti HIV úspěšné. U pacientů s AIDS je volný virus přítomen pouze v nízkých koncentracích. Přenos HIV-1 je zesílen interakcemi buňka-buňka a tvorbou syncytií. Proto jsou protilátky namířené proti volnému viru nebo virovým podjednotkám obvykle neúčinné v eliminaci buněk infikovaných virem.

Vakciny využívají schopnost organismu "zapamatovat si" antigen. Po prvním kontaktu s daným antigenem tvoří imunitní systém buňky, které si imunologicky zapamatují antigen po dobu svého života. Další expozice antigenu stimuluje imunitní odpověď a vede k eliminaci nebo inaktivaci patogenu.

Imunitní systém odstraňuje patogeny dvěma způsoby: protilátkovou a buňkami zprostředkovanou odpovědí. V protilátkové odpovědi tvoří lymfocyty specifické protilátky, které se váží na antigen a tak inaktivují patogen. Buňkami zprostředkované odpovědi se účastní cytotoxické a pomocné T lymfocyty, které specificky útočí a destruuji infikované buňky.

Vývoj vakcin proti HIV-1 viru má ty problémy, že HIV-1 infikuje stejné buňky, které vakcína potřebuje pro aktivaci imunitního systému (t.j. T4 lymfocyty). Bylo by výhodné vyvinout vakcínu, která by inaktivovala HIV před narušením imunitního

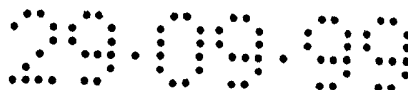


systému. Zejména výhodný typ vakciny proti HIV by vyvolával anti-HIV imunitní odpověď, která by rozpoznávala varianty HIV a která by působila u HIV-pozitivních jedinců v počátku infekce.

Hlavním problémem vývoje vakcin proti virům, zejména proti těm virům, které mají vysokou rychlost mutací, jako je virus lidské imunodeficiencie, a u kterých je žádoucí vyvolání neutralizační a protektivní imunitní odpovědi, je diversita proteinů virového obalu mezi různými izoláty nebo kmeny viru. Protože cytotoxické T-lymfocyty (CTL) u myši i lidí jsou schopné rozpoznání epitopů odvozených od konzervativních vnitřních virových proteinů a proto se považují za významné v imunitní odpovědi proti virům, byly provedeny pokusy o vývoj CTL vakcin schopných vyvolat heterologní ochranu proti různým virovým kmenům.

Je známo, že CD8+ CTL usmrcují virem infikované buňky tehdy, když jejich T receptory rozpoznají virové peptidy asociované s MHC molekulami I třídy. Virové peptidy jsou odvozené od endogenně syntetizovaných virových proteinů, bez ohledu na lokalizaci proteinu nebo na jeho funkce ve viru. Proto může rozpoznání epitopů konzervativních virových proteinů CTL vyvolat mezidruhovou ochranu. Peptidy schopné asociace s MHC třídou pro rozpoznání CTL pocházejí z proteinů, které jsou přítomny v nebo které procházejí skrz cytoplasmu nebo endoplasmatické retikulum. Obecně, exogenní proteiny, které vstupují do buněk procesem endosomálního zpracování (jak je tomu v případě antigenů prezentovaných pomocí molekul MHC třída II), nejsou účinné při vyvolání odpovědi CD8+ CTL.

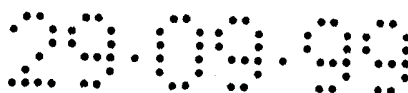
Většina pokusů o vyvolání CTL odpovědi využívala replikujících se vektorů pro produkci proteinového antigenu v buňce nebo byla zaměřena na vložení peptidů do cytosolu. Tyto



přístupy mají omezení, která mohou limitovat jejich použití jako vakcín. Retrovirové vektory mají omezení ve velikosti a struktuře polypeptidů, které mohou být exprivovány jako fúsní proteiny a zároveň v udržování schopnosti replikace rekombinantního viru, a účinnost vektorů jako je vakcinie pro další imunizace může být ohrožena imunitní odpovědí proti vektoru samotnému. Také mají virové vektory a modifikované patogeny vlastní rizika, která mohou být překážkou jejich použití u lidí. Dále, výběr peptidových epitopů pro presentaci je závislý na struktuře MHC antigenů jedince a proto může mít peptidová vakcína omezenou účinnost z důvodů diversity MHC haplotypů v populaci.

Benvenisty, N. a Reshef, L. (PNAS 83: 9551 - 9555 (1986)) popisuje, že DNA srážená CaCl_2 , která je podána myším intraperitoneálně (i.p.), intravenosně (i.v.) nebo intramuskulárně (i.m.) může být exprivována. I.m. injekce DNA expresních vektorů bez srážení CaCl_2 u myší vede k vychytávání DNA ve svalových buňkách a k expresi proteinu kodovaného DNA. Plasmidy byly udržovány episomálně a nereplikovaly se. Potom byla setrvalá exprese pozorována po i.m. injekci v kosterním svalu krysy, ryb a primátů a v srdečním svalu krysy. Technika pro použití nukleových kyselin jako terapeutických činidel byla popsána v WO 90/11092 (4.10.1990), ve kterém jsou holé nukleotidy použity pro vakcinaci u obratlovců.

Pro úspěšné provedení techniky není nutné, aby byla imunizace provedena intramuskulárně. Vložení zlatých mikroprojektilů potažených DNA kodující lidský růstový hormon (HGH) do kůže myší vede k produkci anti-HGH protilátek u myší. Tryskový injektor byl použit pro transfekci kůže, svalů, tuku a prsní žlázy u živých zvířat. Byly popsány různé techniky pro přenos nukleových kyselin. Zhu et al. (Science 261: 209 - 211,



9.7.1993) popisuje, že intravenosní injekce DNA:kationtového liposomového komplexu u myši vede k systémové expresi klonovaného transgenu. Ulmer et al. (Science 259: 1745 - 1749 (1993)) popisuje heterologní ochranu před infekcí chřipkovým virem při použití intramuskulární injekce DNA kodující proteiny chřipkového viru.

Potřeba specifických terapeutických a profylaktických činidel schopných vyvolání požadované imunitní odpovědi proti patogenům a nádorovým antigenům je splněna v předkládaném vynálezu. Výhodou tohoto terapeutického přístupu je schopnost indukovat imunitní odpověď T-buněk, která může bránit infekcím nebo onemocněním způsobeným i takovými kmeny virů, které jsou heterologní ke kmenu, ze kterého byl získán gen pro antigen. Toto je zejména výhodné při léčbě infekcí HIV, protože o tomto viru je známo, že rychle mutuje a bylo identifikováno mnoho virulentních izolátů (viz například LaRosa et al., Science 249: 932 - 935 (1990), který identifikuje 245 jednotlivých izolátů HIV). Vzhledem k této známé diversitě se výzkumníci pokusili generovat CTL peptidovou imunizací. Takahashi et al (Science 255: 333 - 336 (1992)) popisuje indukci široce mezikmenově reaktivních cytotoxických T buněk rozpoznávajících obalovou (gp160) determinantu HIV. Nicméně, tito pracovníci poznali obtížnost v dosažení skutečně mezikmenově reaktivní CTL odpovědi a naznačili, že existuje dichotomie mezi primární stimulací a restimulací T buněk, která je velmi striktní a vyvoláním efektorových funkcí, včetně cytotoxicity, u již stimulovaných CTL.

Wang et al. popisuje vyvolání imunitní odpovědi proti HIV u myši za použití intramuskulární inokulace klonovaným genomovým (nesestřiženým) genem HIV. Nicméně, hladina imunitních odpovědí dosažených v této studii byla velmi nízká. Kromě toho, v práci

od Wang et al. využívá DNA konstrukt pouze genomovou část Tat/rev-gp160-Tat/rev kodující sekvence HIV. Jak je podrobněji popsáno dále, toto je suboptimální systém pro získání vysoké hladiny exprese gp160. Tento systém je také potenciálně nebezpečný, neboť exprese Tat přispívá k progresi Kaposiho sarkomu.

WO 93/17706 popisuje způsob pro vakcinaci zvířat proti virům, ve kterém jsou nosiče potaženy genovým konstruktem a potažené částice jsou akcelerovány do zvířecích buněk. Pro HIV bylo navrženo použití v podstatě celého genomu, bez dlouhých koncových repetitivních sekvencí. Tato metoda představuje významná rizika pro příjemce. Obecně se předpokládá, že konstrukt HIV by měl obsahovat méně než 50% HIV genomu pro zajištění bezpečnosti vakciny; toto zajišťuje eliminaci enzymatických a regulačních proteinů viru, z nichž mnohé mají neznámou nebo špatně známou funkci. Tak je stále přítomno mnoho problémů při vývoji použitelných lidských HIV vakcin za použití technologie přenosu genů.

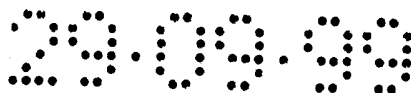
Předkládaný vynález předpokládá použití jakýchkoliv známých technik pro vnesení polynukleotidů do živých tkání za účelem indukce proteinů. Nicméně, předkládaný vynález poskytuje nový imunogen pro vnesení HIV a jiných proteinů do dráhy pro zpracování antigenu pro účinné vyvolání CTL a protilátek specifických pro HIV. Farmaceutický prostředek je použitelný jako vakcína pro vyvolání jak buněčné, tak protilátkové anti-HIV a HIV-neutralizující odpovědi. V předkládaném vynálezu jsou problémy uvedené výše vyřešeny tak, že jsou poskytnuty polynukleotidové imunogeny, které po vnesení do živočicha indukují účinnou expresi HIV proteinů a epitopů bez rizik asociovaných s takovými technikami. Takto vyvolané imunitní odpovědi jsou účinné v rozpoznávání HIV, v inhibici replikace

HIV, v identifikaci a usmrcení buněk infikovaných HIV a jsou zkříženě reaktivní pro mnoho kmenů HIV.

Pořadí kodonů v organismech je vysoce specifické a liší se mezi organismy. Tato informace je použita pro konstrukci a expresi alterovaných nebo syntetických genů, které mají požadovanou translační účinnost, které se použijí pro určení protein-kodujících regionů genomu, pro vnesení míst pro translační pauzy do heterologních genů a pro zajištění vztahu nebo evolučního původu nukleotidových sekvencí.

Expresi cizorodých heterologních genů v transformovaných organismech je v současné době běžná. Velké množství savčích genů, včetně například myších a lidských genů, bylo úspěšně insertováno do jednobuněčných organismů. Standardní techniky obsahují vnesení cizorodého genu, který má být exprimován, do vektoru jako je plasmid nebo fág a využití tohoto vektoru pro inserci genu do organismu. Přirozené promotory pro takové geny jsou běžně nahrazeny silnými promotory kompatibilními s hostitelem, do které je gen insertován. Sekvencování proteinů umožňuje hodnocení aminokyselinových sekvencí i malých množství přirozeného proteinu. Z těchto aminokyselinových sekvencí může být odvozena DNA sekvence kodující tyto proteiny. Syntéza DNA je také rychle se vyvíjejícím oborem a syntetické geny odpovídající těmto odvozeným DNA sekvencím mohou být snadno vyrobeny.

I přes přibývající znalosti expresních systémů a rekombinantní DNA zůstávají při pokusech o expresi cizorodých nebo syntetických genů v organismu významné překážky. Mnoho nativních, aktivních proteinů je například při expresi v cizím hostiteli glykosylováno jiným způsobem, než je přirozený způsob. Z tohoto důvodu jsou pro expresi mnoha savčích genů výhodnější eukaryotičtí hostitelé jako jsou například kvasinky, než



bakteriální hostitelé. Problém glykosylace je předmětem výzkumu.

Jiným problémem je málo poznán. Často je translace syntetického genu, i když je navázán na silný promotor, mnohem méně účinná, než je předpokládáno. Stejná skutečnost platí často pro exogenní geny cizorodé pro expresní organismus. I tehdy, je-li gen transkribován dostatečně účinně, takže je možno získat dostatečná množství produktu translace, je protein často inaktivní nebo se jiným způsobem ve svých vlastnostech liší od přirozeného proteinu.

Je známo, že poslední uvedený problém je často způsoben jiným skládáním proteinu v odlišných organismech. Řešení tohoto problému není známo a mechanismy kontrolující skládání proteinů jsou málo známé.

Předpokládá se, že problémy související s účinností translace jsou ve vztahu s účinky kontextu kodonů. Protein kodující regiony genů ve všech organismech jsou předmětem mnoha funkčních omezení, z nichž některá závisí na požadavcích nutných pro správnou funkci proteinu, stejně jako na vhodných start a stop signálech pro translaci. Nicméně, několik rysů protein-kodujících regionů bylo objeveno a není snadné pochopit jejich přesnou funkci. Dvě důležité třídy takových vlastností jsou ty, které souvisejí s využitím kodonů a ty, které souvisejí s kontextem kodonů.

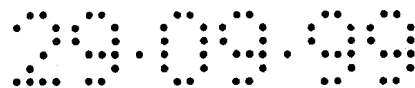
Je známo, že využití kodonů je vysoce variabilní a že se významně liší mezi různými organismy. Bylo dokázáno, že charakter využití kodonů souvisí s relativním množstvím izoakceptorů tRNA. Geny kodující proteiny přítomné ve velmi malých versus velmi velkých množstvích vykazují rozdíly v preferencích kodonů. Možnost, že variabilita ve využití kodonů

mění rychlost elongace peptidu, byla brána v úvahu. Ačkoliv jsou rozdíly ve využití kodonů spojeny s rozdíly v rychlosti translace, přímé účinky volby kodonu na translaci je obtížné prokázat. Jiné navržené techniky charakterizované využitím kodonů zahrnují maximalizaci spolehlivosti translace a optimalizaci kinetické účinnosti syntézy proteinů.

S výjimkou náhodného využití kodonů jsou shromažďovány důkazy, že párování kodon/antikodon je ovlivněno sekvencemi mimo kodon samotný, kdy tento jev se nazývá "kontext kodonů". Existuje silný vliv sousedních nukleotidů na účinnost suprese nesmyslnými kodony, stejně jako chybnými kodony. Je jasné, že nadbytek supresorové aktivity v přirozených populacích bakterií, stejně jako využití "terminačních" kodonů pro kodování selenocysteinu a fosfoserinu vyžadují, aby byla terminace závislá na kontextu. Podobné účinky kontextu byly prokázány při ovlivnění spolehlivosti translace, stejně jako účinnosti iniciace translace.

Statistické analýzy protein - kodujících regionů *E. coli* dokázaly jinou manifestaci "kontextu kodonů". Přítomnost určitého kodonu v určité pozici silně ovlivňuje frekvenci výskytu určitých nukleotidů v sousedních kodonech a tento kontext se významně liší pro geny exprivované silně a slabě. Ačkoliv byl objeven účinek kontextu, je prediktivní hodnota statistických pravidel týkajících se preferovaných nukleotidů sousedících s kodony relativně nízká. Toto limituje použitelnost takových dat pro preferenci nukleotidů ve výběru kodonů pro dosažení požadované účinnosti translace.

Pokrok ve vybavení pro automatizované sekvencování nukleotidů zajistil dostupnost velkého množství dat pro sekvenci mnoha organismů. Pochopení takových dat představuje značný problém.



Například, je významné identifikovat kodující regiony genomu tak, aby odpovídala genetická sekvence proteinové sekvenci. Dále je zkoumán původ genomu některých organismů. Je známo, že genomy některých organismů mají smíšený původ. Některé sekvence, které jsou virového původu, jsou nyní stabilně inkorporovány do genomu eukaryotických organismů. Virové sekvence samotné mohou pocházet z jiných, nepříbuzných druhů. Pochopení původu genu může být významné pro stanovení správných analogií mezi příbuznými geny a jejich translačními produkty.

Existuje potřeba lepšího pochopení vlivu kontextu kodonů na translaci a potřeba technik pro určení vhodných kodonů pro jakýkoliv požadovaný translační efekt. Jsou také potřeba metody pro určení kodujících regionů genomu ze sekvence nukleotidů. Jsou také potřeba metody pro kontrolu skládání proteinu a pro zajištění správného složení cizorodého genu po expresi v hostiteli. Geny pozměněné nebo konstruované tak, aby měly požadovanou translační účinnost, budou značně významné.

Jiným aspektem technik rekombinantní DNA pro expresi průmyslově a farmaceuticky významných proteinů v mikroorganismech je fenomen "preferance kodonů". Ačkoliv bylo výše uvedeno, že existující mechanismus pro genovou expresi v geneticky transformované hostitelské buňce bude fungovat tak, že bude tvořen požadovaný produkt, úroveň exprese v mikroorganismu bude různá, podle specifických použitých alternativních forem genetického kodu specifického pro aminokyseliny v insertovaném exogenním genu. "Tripletový" kodon ze čtyř možných nukleotidových bazí může existovat v 64 variantách. Protože tyto varianty nesou informaci pouze pro 20 různých aminokyselin (stejně jako pro zahájení a ukončení transkripce), mohou být některé aminokyseliny kodovány více než jedním kodonem. Některé aminokyseliny mají až šest "násobných", alternativních kodonů,

zatímco jiné mají jediný kodon. Z ne zcela jasných důvodů nejsou alternativní kodony uniformně přítomny v endogenní DNA různých typů buněk a zdá se, že existuje variabilní přirozená hierarchie nebo "preference" určitých kodonů v určitých typech buněk.

Například, aminokyselina leucin je určena jakýmkoliv ze 6 DNA kodonů CTA, CTC, CTG, CTT, TTA a TTG (které odpovídají, v příslušném pořadí, mRNA kodonům CUA, CUC, CUG, CUU, UUA a UUG). Vyčerpávající analýza frekvence kodonů v genomu pro mikroorganismy ukázala, že endogenní DNA *E. coli* nejčastěji obsahuje CTG kodon pro leucin, zatímco DNA kvasinek a plísní nejčastěji obsahuje TTA kodon pro leucin. Podle této hierarchie se soudí, že pravděpodobnost získání silné exprese polypeptidu bohatého na leucin v *E. coli* bude v nějakém rozsahu záviset na frekvenci použití kodonu. Například, gen bohatý na TTA kodony bude pravděpodobně slaběji exprivován v *E. coli*, zatímco gen bohatý na CTG bude pravděpodobně v *E. coli* exprivován silně. Podobně, pokud jsou plánovaným hostitelem pro expresi polypeptidu bohatého na leucin kvasinky, bude výhodným kodonem v insertované DNA kodon TTA.

Významy fenomenu preference kodonu na techniky rekombinantní DNA jsou jasné a fenomen může vysvětlit mnoho předešlých selhání při dosažení silné exprese exogenních genů v úspěšně transformovaných hostitelských organismech - v insertovaném genu může být přítomen méně "preferovaný" kodon a expresní mechanismy hostitelské buňky mohou fungovat neúčinně. Tento fenomen naznačuje, že syntetické geny, které byly navrženy tak, aby obsahovaly preferované kodony plánovaného hostitele, jsou výhodnou formou genetického materiálu pro provozování technik rekombinantní DNA.

Diversita funkce, která je typická pro eukaryotické buňky,

závisí na strukturální diferenciaci jejich membránových vazeb. Pro vytvoření a udržení takových struktur musí být proteiny transportovány z místa syntézy v endoplasmatickém retikulu na předem určená místa v buňce. Tento přenos vyžaduje přepravní proteiny obsahující signály pro třídění, které jsou rozpoznávány molekulárními mechanismy odpovědnými za selekci proteinů, které jsou umístěny v klíčových místech přenosových drah. Třídění probíhá pro většinu proteinů pouze jednou, protože jejich umístění, kde provádějí svou funkci, je permanentní.

Udržování intracelulární integrity závisí částečně na selektivním třídění a přesném transportu proteinů na jejich správná umístění. V průběhu posledních let byl důkladně studován molekulární mechanismus pro zaměření a lokalizaci proteinů. Na proteinech byly stanoveny definované motivy sekvence, které fungují jako "sekvence označující umístění". Vedoucí nebo signální peptidy, jako jsou například ty, které jsou odvozeny od aktivačního proteinu tkáňově specifického plasminogenu, tPA, slouží pro transport proteinu do buněčné sekreční dráhy prostřednictvím endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu. Bylo objeveno mnoho signálních sekvencí, které jsou asociovány s cytoplasmatickými doménami membránových proteinů jako jsou di-leucinové aminokyselinové motivy nebo tyrosinové sekvence, které mohou směřovat proteiny do lysozomálních kompartmentů. Pro HIV závisí transport a vylučování virových částic z buněk na myristoylaci glycinu číslo 2 na amino-konci gag.

Podstata vynálezu

Vynález obsahuje syntetické molekuly DNA kodující HIV gag a modifikace HIV gag. Kodony syntetických molekul obsahují preferované kodony plánovaných hostitelských buněk. Syntetické molekuly představují výhodné formy cizorodého genetického

materiálu. Syntetické molekuly mohou být použity jako polynukleotidová vakcína, která vyvolává účinnou imunoprofylaxi proti infekci HIV prostřednictvím neutralizačních protilátek a buňkami zprostředkované imunity. Předkládaný vynález poskytuje polynukleotidy, které při přímém vložení do obratlovců, včetně savců jako jsou primáti a lidé, in vivo, indukují expresi kodovaných proteinů ve zvířeti.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr.1 ukazuje relativní expresi gag a tPA gag v transfektované buněčné linii 293 po transfekci DNA pro gag HIV.

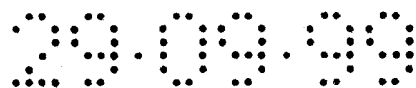
Obr. 2 ukazuje sérovou anti-gag odpověď u myši po vakcinaci optimalizovanou HIV gag a tPA-gag DNA.

Obr. 3 ukazuje anti-gag CTL odpovědi splenocytů od myši po vakcinaci optimalizovanou HIV gag a tPA-gag DNA.

Obr. 4 ukazuje sekreci cytokinů specifickou pro gag antigen pro splenocyty od myši po vakcinaci optimalizovanou HIV gag a tPA-gag DNA.

Obr. 5 ukazuje anti-HIV gag CTL pro myši vakcinované HIV p55 gag DNA.

Vynález poskytuje syntetické molekuly DNA kodující HIV gag a syntetické molekuly DNA kodující modifikované formy HIV gag. Kodony syntetických molekul jsou navrženy tak, že obsahují preferované kodony plánovaných hostitelských buněk. Syntetické molekuly mohou být použity jako polynukleotidová vakcína, která vyvolává účinnou imunoprofylaxi proti infekci HIV



prostřednictvím neutralizačních protilátek a buňkami zprostředkované imunity. Syntetické molekuly mohou být použity jako imunogenní prostředek. Předkládaný vynález poskytuje polynukleotidy, které při přímém vložení do obratlovců, včetně savců jako jsou primáti a lidé, in vivo indukují expresi kodovaných proteinů ve zvířeti.

Jak je zde použit, znamená termín "polynukleotid" nukleovou kyselinu, která obsahuje základní regulační elementy, takže je schopna po vložení do živých buněk obratlovců řízení buněčných mechanismů, které produkují produkty translace kodované geny obsaženými v polynukleotidu. V jednom provedení vynálezu je polynukleotid polydeoxyribonukleová kyselina obsahující alespoň jeden HIV gen, který je operativně navázán na transkripční promotor. V jiném provedení vynálezu obsahuje polynukleotidová vakcína (PNV) polyribonukleovou kyselinu kodující alespoň jeden HIV gen, který je schopen translace v aparátu eukaryotické buňky (v ribosomech, tRNA a jiných transkripčních faktorech). Pokud se protein kodovaný polynukleotidem vyskytuje u zvířete pouze při patologických stavech (t.j. jedná se o heterologní protein), jako jsou například proteiny asociované s virem lidské imunodeficiency (HIV), etiologickým agens syndromu získané imunodeficiency (AIDS), tak je imunitní systém zvířete aktivován ke spuštění protektivní imunitní odpovědi. Protože jsou tyto exogenní proteiny produkovány tkáněmi zvířete, jsou zpracovány hlavním histokompatibilním systémem (MHC) způsobem, který je analogický s aktuální infekcí příbuzným organismem (HIV). Důsledkem je - jak je uvedeno v předkládaném vynálezu - indukce imunitní odpovědi proti příbuznému.

V souladu s tím připravili vynálezci nukleové kyseliny, které po vložení do biologického systému indukují expresi HIV proteinů a epitopů. Indukovaná protilátková odpověď je jak specifická pro

exprivovaný HIV protein, tak neutralizuje HIV. Kromě toho jsou indukovány cytotoxické T-lymfocyty, které specificky rozpoznávají a ničí buňky infikované HIV.

Předkládaný vynález obsahuje metodu pro použití polynukleotidu, který po vložení do savčí tkáně indukuje expresi určitého genového produktu v jednotlivé buňce in vivo. Předkládaný vynález obsahuje různá provedení, která nevyžadují mnohotné manipulace s rev dependentními HIV geny pro získání rev-independentních genů. Rev-independentní expresní systém, který je zde popsán, je použitelný jako takový a je to systém pro demonstraci exprese jednoho požadovaného genu-produktu v jedné buňce in vivo.

Protože mnoho aplikací předkládaného vynálezu je v oblasti vakcinace proti virovým infekcím, jsou polynukleotidy často označovány jako polynukleotidová vakcína, neboli PNV. To neznamena, že další možnosti použití takových polynukleotidů, v imunitní stimulaci a v protinádorové terapii, jsou mimo rozsah předkládaného vynálezu.

V jednom provedení předkládaného vynálezu je gen kodující HIV genový produkt vložen do expresního vektoru. Vektor obsahuje transkripční promotor rozpoznávaný eukaryotickou RNA polymerasou a transkripční terminator na konci kodující sekvence HIV genu. Ve výhodném provedení je promotorem cytomegalovirový promotor se sekvencí intronu A (CMV-intA), ačkoliv odborníků v oboru je známo mnoho dalších protmotorů, jako je například silný imunoglobulinový promotor nebo promotory jiných eukaryotických genů, které mohou být použity. Výhodnou transkripční terminační sekvencí je terminační sekvence hovězího růstového hormonu. Zejména výhodná je kombinace CMVintA-BGH terminační sekvence.

Pro usnadnění přípravy polynukleotidů v prokaryotických buňkách obsahuje expresní vektor také výhodně marker resistance na antibiotika pod transkripční kontrolou prokaryotického promotoru, takže exprese resistance na antibiotikum neprobíhá v eukaryotických buňkách. Mohou být použity geny resistance na ampicilin, geny resistance na neomycin a jiné farmaceuticky přijatelné markery resistance na antibiotika. Pro usnadnění vysoké hladiny produkce polynukleotidu fermentací v prokaryotickém organismu je výhodné, aby vektor obsahoval prokaryotický element rozpoznávající počátek replikace a aby měl velký počet kopií. Tyto výhody splňuje mnoho komerčně dostupných prokaryotických klonovacích vektorů. Je žádoucí, aby byly odstraněny neesenciální DNA sekvence. Je také žádoucí, aby vektor nebyl schopen replikace v eukaryotických buňkách. Toto minimalizuje riziko integrace sekvencí polynukleotidové vakciny do genomu příjemce. Tkáňově specifické promotory nebo zesilovače transkripce mohou být použity tehdy, je-li žádoucí omezení exprese na určitý typ tkáně.

V jednom provedení je použit expresní vektor pnRSV, ve kterém je jako promotor použita dlouhá terminální repetitivní sekvence (LTR) viru Rousova sarkomu (RSV). V jiném provedení je použit V1, mutovaný pBR322 vektor, do kterého byly klonovány CMV promotor a BGH transkripční terminační sekvence. V jiném provedení byly kombinovány V1 a pUC19, za vzniku expresního vektoru označeného V1J. Do V1J nebo jiného vhodného expresního vektoru je klonován HIV gen, jako je například gp120, gp41, gp160, gag, pol, env, nebo jakýkoliv jiný gen HIV, který může indukovat imunitní odpověď proti HIV. V jiném provedení byl gen pro resistenci na ampicilin odstraněn z V1J a byl nahrazen genem resistance na neomycin za vzniku V1J-neo, do kterého byly klonovány různé geny HIV pro použití v předkládaném vynálezu. V jiném provedení je vektorem V1Jns, který je stejný jako V1Jneo s

tou výjimkou, že jedinečné SfiI restriční místo bylo vloženo do jedinečného KpnI místa v pozici 2114 V1Jneo. Incidence SfiI míst v lidské genomové DNA je velmi nízká (přibližně 1 místo na 100000 bazí). Proto tento vektor umožňuje podrobné sledování integrace expresního vektoru do DNA hostitele, trávením extrahované genomové DNA SfiI. V dalším provedení je vektorem V1R. V tomto vektoru bylo co možná nejvíce neesenciální DNA "vystřiženo" z vektoru za vzniku vysoce kompaktního vektoru. Tento vektor je derivátem V1Jns. Tento vektor umožňuje použití větších insertů, s menším rizikem toho, že budou kodovány nežádoucí sekvence a s optimalizací vychytávání buňkami.

V jednom provedení předkládaného vynálezu jsou inkorporovány geny kodující HIV gag z laboratorně adaptovaných kmenů HIV jako je IIIB nebo CAM-1. Odborníkům v oboru bude jasné, že při použití genů z jiných kmenů, než je HIV-1 nebo HIV-2, které mají analogické funkce jako geny z HIV-1, se předpokládá, že vyvolají imunitní odpovědi analogické odpovědím popsaným pro konstrukty z HIV-1. Klonování a metody zpracování pro získání takových genů jsou odborníkům v oboru známé.

Sekvence mnoha genů mnoha HIV kmenů jsou v současnosti veřejně dostupné v GENBANK a takové primární, polní izoláty HIV jsou dostupné od National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), který má kontrakt s Quality Biological, Inc., (7581 Lindberg Drive, Gaithersburg, Maryland 20879). Takové kmeny jsou také dostupné od Světové zdravotnické organizace (WHO) (Network for HIV Isolation and Characterization, Vaccine Development Unit, Office of Research, Global Programme on AIDS, CH-1211 Geneva 27, Switzerland). Z této práce bude odborníkům v oboru jasné, že jedním využitím předkládaného vynálezu je systém pro in vivo a in vitro testování a analýzy, které umožní korelaci diversity sekvence HIV se serologií HIV neutralizace,

peptidovým přesahem, který se někdy nazývá pro-sekvencí. Pro proteiny určené buď pro sekreci do extracelulárního media, nebo pro membránu, směřuje tato signální sekvence, která je obvykle hydrofobní, protein do endoplasmatického retikula, ze kterého je přesunut do určeného místa.

Termín "intron" označuje část DNA uvnitř genu, která nekoduje aminokyseliny v produktu genu. Prekursorová RNA intronu je excidována a není proto transkribována do mRNA, ani není translatována na protein.

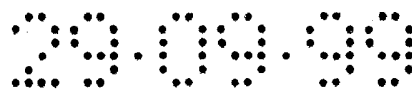
Termín "kazeta" označuje sekvenci podle předkládaného vynálezu, která obsahuje sekvenci nukleové kyseliny, která má být exprivována. Kazeta se podobá pásce. Každá kazeta obsahuje vlastní sekvenci. Při záměně kazety exprivuje vektor jinou sekvenci. Díky restrikčním místům na 5' a 3' koncích může být kazeta snadno insertována, odstraněna nebo nahrazena jinou kazetou.

Termín "3' netranslatovaný region" nebo "3'UTR" označuje sekvenci na 3' konci strukturálního genu, která je obvykle transkribována s genem. Tento 3'UTR obvykle obsahuje poly A sekvenci. Ačkoliv je 3'UTR transkribován z DNA, je excidován před translací na protein.

Termín "nekodující region" nebo "NCR" označuje region sousedící s 3'UTR regionem strukturálního genu. NCR region obsahuje transkripční terminační signál.

Termín "restrikční místo" označuje specifické místo sekvence pro štěpení restrikčními endonukleasami.

Termín "vektor" označuje některé prostředky, pomocí kterých



mohou být fragmenty DNA vloženy do hostitelského organismu nebo do tkáně hostitele. Existují různé typy vektorů včetně plasmidů, bakteriofágů a kosmidů.

Termín "účinné množství" označuje dostatečné množství PNV, které po injikování produkuje odpovídající hladiny polypeptidu. Odborníkům v oboru bude jasné, že toto množství se může velmi lišit.

Pro popis předkládaného vynálezu je uveden dosavadní stav znalostí o HIV. Virus lidské imunodeficiency (HIV) má genom skládající se z ribonukleové kyseliny. Tento RNA genom musí být reversně transkribován způsobem v oboru známým pro vznik cDNA kopií pro klonování a manipulaci za použití zde uvedených metod. Na každém konci genomu je dlouhá koncová repetitivní sekvence, která působí jako promotor. Mezi těmito konci koduje genom v různých čtecích rámcích gag-pol-env jako hlavní genové produkty: gag je skupinově specifický antigen; pol je reversní transkriptasa nebo polymerasa; v tomto regionu, v jiném čtecím rámci, je také kodována virová proteasa, která je odpovědná za postranslační zpracování, například gp160 na gp120 a gp41; env je obalový protein; vif je infekční faktor virionu; rev je regulátor exprese virionového proteinu; nef je negativní regulační faktor; vpu je faktor produktivity virionu "u"; tat je trans-aktivátor transkripce; vpr je virový protein r. Funkce všech těchto prvků je popsána.

V jednom provedení předkládaného vynálezu je gen kodující HIV gag protein přímo navázán na transkripční promotor. Nicméně, exprese gag je potlačena za absence rev díky chybění exportu nesestřižených genů z jádra. Pro pochopení tohoto systému musí být podrobněji popsán životní cyklus HIV.



V životním cyklu HIV je po infikování hostitelské buňky RNA genom HIV reversně transkribován do provirové DNA, která se integruje do genomové DNA hostitele jako jediná transkripční jednotka. LTR obsahuje promotor, který transkribuje HIV geny v 5' - 3' směru (gag, pol, env), za vzniku nesestřiženého transkriptu celého genomu. Nesestřižený transkript působí jako mRNA, ze které jsou translatovány gag a pol, zatímco pro translaci env kodovaných genů musí proběhnout omezený sestřih. Pro expresi produktu regulačního genu rev musí proběhnout více než jeden sestřih, protože v genomu se, jak je uvedeno na obr. 1, rev a env překrývají. Pro transkripci env musí být ukončena transkripce rev a naopak. Kromě toho, přítomnost rev je nutná pro export nesestřižené RNA z jádra. Aby rev působil tímto způsobem, musí být na transkriptu přítomen rev reaktivní element (RRE) (Malim et al., Nature 338: 254 - 257 (1989)).

V polynukleotidové vakcině podle předkládaného vynálezu je obligatorní sestřih určitých HIV genů eliminován tím, že jsou poskytnuty plně sestřižené geny (t.j. je poskytnut kompletní otevřený čtecí rámec pro požadovaný genový produkt bez potřeby přesmyku v čtecích rámcích nebo eliminace nekodujících regionů; odborníkům v oboru je jasné, že při sestřihu určitého genu existuje určitá nejistota v přesné výsledné sekvenci; nicméně pokud se získá funkční kodující sekvence, je tato nejistota přijatelná). Tak je v jednom provedení celá kodující sekvence pro gag sestřižena tak, že není nutná žádná intermitentní exprese žádného genu.

Duální humorální a buněčná imunitní odpověď vyvolaná způsobem podle předkládaného vynálezu je zejména významná pro inhibici HIV infekce, vzhledem ke schopnosti mutace HIV v populaci, stejně jako u infikovaných jedinců. Pro výrobu účinné ochranné vakciny proti HIV je žádoucí vyvolání jak multivalentní



protilátkové odpovědi například proti gp160 (env je přibližně z 80% konzervován mezi různými HIV-1, kmenech "clade B", které jsou prevalentními kmeny v populaci v USA), základnímu neutralizačnímu cíly na HIV, tak vyvolání tvorby cytotoxických T buněk reaktivních s konzervativní částí gp160 a vnitřními virovými proteiny kodovanými gag. Vyrobili jsme HIV vakcinu obsahující gp160 geny vybrané z běžných laboratorních kmenů; z převládajících, primárních virových izolátů zjištěných v infikované populaci; z mutovaných gp160 navržených tak, aby demaskovaly zkříženě reaktivní epitopy pro neutralizační protilátku; a z jiných reprezentativních HIV genů jako jsou gag a pol geny (asi 95% konzervace mezi HIV izoláty).

Téměř všichni seropozitivní pacienti, jejichž nemoc nepostupuje směrem k imunodeficitnímu stavu, mají anti-gag CTL a přibližně 60% těchto pacientů má mezikmenové, gp160 specifické CTL. Množství HIV specifických CTL zjišťovaných u infikovaných jedinců, kteří se dostali do stavu známého jako AIDS, je nicméně mnohem nižší, což ukazuje na význam našich zjištění, že je možno indukovat mezikmenové CTL odpovědi.

Imunitní odpovědi indukované env a gag polynukleotidovými vakcinačními prostředky jsou prokázány na myších a na primátech. Sledování produkce protilátek proti env u myší umožňuje potvrzení toho, že daný konstrukt je vhodným způsobem imunogenní, t.j. že velká část vakcinovaných zvířat vykazuje protilátkovou odpověď. Myši jsou také nejjednodušším zvířecím modelem vhodným pro testování indukce CTL pomocí konstruktů a jsou proto použity pro hodnocení toho, zda je určitý konstrukt schopen vyvolat takovou aktivitu. Opice (kočkodani, makakové rhesus, šimpanzi) jsou dalším druhem náležitým k primátům, který je možno použít pro hodnocení protilátek na větších zvířatech jiných než hlodavcích. Tyto druhy jsou také upřednostňovány před



myšmi pro testy neutralizačních schopností antiséra z důvodů vysokých hladin endogenních neutralizačních aktivit proti retrovirům pozorovaným v séru myší. Tato data prokazují, že naše vakciny mají dostatečnou imunogenicitu pro dosažení ochrany v pokusech na modelu infekce šimpanzů virem HIV₁, na základě známých protektivních koncentrací neutralizačních protilátek pro tento systém. Nicméně, nově stanovená a přijímaná definice ochrany se ve vědecké komunitě posouvá od "sterilizační imunity", která označuje kompletní ochranu před infekcí HIV, k prevenci onemocnění. Mezi koreláty tohoto cíle patří redukovaný titr viru v krvi, jak je měřen PCR, aktivitou HIV reverzní transkriptasy, infektivitou vzorků séra, ELISA test na koncentraci p24 nebo jiných antigenů HIV v krvi, zvýšená koncentrace CD4+ T-buněk a prodloužené přežívání (viz například Cohen, J. Science 262: 1820 - 1821, 1993, pro diskusy o definici účinnosti anti-HIV vakciny). Imunogeny podle předkládaného vynálezu také vyvolávají neutralizační imunitní odpovědi proti infekčním (klinickým, primárním polním) izolátům HIV.

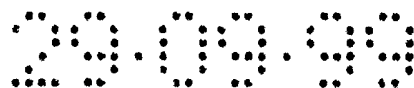
ELISA test se použije k určení toho, zda jsou optimalizované vektory gag vakciny exprivující buď secernovaný tPA-gag nebo nativní gag účinné v indukci gag-specifických protilátek. Počáteční in vitro charakterizace gag exprese vyvolané našimi vakcinačními vektory je provedena imunoblotovou analýzou buněčných lyzátů transfektovaných optimalizovaným gag. Tato data potvrdí a kvantifikují gag expresi za použití anti-HIV antiséra pro vizualizaci gag exprese v transfektovaných buňkách.

Vyvolání CTL odpovědí. Virové proteiny, které jsou syntetizovány v buňkách, vyvolávají MHC-1 restrihované CTL odpovědi. Každý z těchto proteinů vyvolává CTL u seropozitivních pacientů. Naše vakciny jsou také schopné vyvolat CTL u myší a makaků rhesus. Imunogenetické charakteristiky myších kmenů jsou

vhodné pro takový výzkum, jak je prokázáno pro virus chřipky NP (viz Ulmer et al., Science 259: 1745 - 1749, 1993). Několik epitopů bylo definováno pro HIV proteiny env, rev, nef a gag (Frankel, F.R. et al., J. Immunol. 155: 4775 - 4782 (1995)) u Balb/c myši, což usnadňuje kultury CTL in vitro a testy cytotoxicity. Alternativně může být použit celý gen kodující gp160, gp120, pol nebo gag. Pro další přehled v této oblasti viz HIV Molecular Immunology Database 1995, Korber et al., vyd., Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA. Efektorová funkce T-buněk, jako je například cytotoxicita, sekrece cytokinů pro aktivaci B-buněk a/nebo mobilizace nebo stimulace makrofágů a neutrofilů, je spojena se zralým fenotypem T-buněk.

Měření T_H aktivity. Kultury buněk sleziny od vakcinovaných zvířat se testují na opakovanou reakci na specifické antigeny za přidání rekombinantních proteinů nebo peptidových epitopů. Aktivace T buněk takovými antigeny, presentovanými antigen-presentujícími buňkami sleziny, APC, je sledována podle proliferace těchto kultur nebo podle produkce cytokinů. Charakter produkce cytokinů také umožňuje klasifikaci odpovědi T_H buněk jako typ 1 nebo jako typ 2. Protože se zdá, že převládající T_{H2} odpověď koreluje s vyloučením buněčné imunity u imunokompromitovaných seropozitivních pacientů, je možné definovat typ odpovědi, který je způsoben určitou PNV u pacienta, což umožňuje manipulování s výslednou imunitní odpovědí.

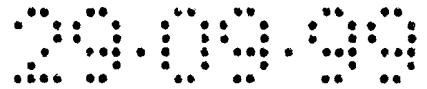
Podle výše uvedených imunologických studií se předpokládá, že naše vakciny jsou účinné u obratlovců v prevenci infekce virulentním HIV. Tyto studie jsou provedeny na modelu HIV_{IIIB}/šimpanz po dostatečné vakcinaci těchto zvířat PNV konstruktem, nebo směsí PNV konstruktů skládající se z gp160IIIB, gagIIIB, nefIIIB a revIIIB. Pro tento účel se použije



kmen IIIB, protože byl stanoven titr letální dávky viru tohoto kmenu pro šimpanze. Nicméně, některé studie navrhují použití jakéhokoliv kmenu HIV a epitopů specifických nebo heterologních k uvedenému kmenu. Druhým modelem vakcinace/infekce, kromě šimpanzího modelu, je scid-hu PBL myší model. Tento model umožňuje testování lidského lymfocytárního imunitního systému a naší vakciny s následnou infekcí HIV na myším hostiteli. Tento systém je výhodný, protože je snadno adaptován na použití s jakýmkoliv kmenem HIV a umožňuje získání důkazů pro ochranu proti více kmenům primárních polních izolátů HIV. Třetí model infekce využívá hybridních HIV/SIV virů (SHIV), z nichž některé infikují opice makak rhesus a vedou k imunodeficienci končící smrtí (viz Li, J. et al., J. AIDS 5: 639 - 646, 1992). Vakcinace opic makak rhesus naší polynukleotidovou vakcinou je protektivní proti následné infekci letální dávkou SHIV.

Existuje mnoho bakteriálních a virových genů, které nevyužívají kodony, které jsou optimalizované pro expresi savčích buňkách. Jedním z důvodů je skutečnost, že tyto mikroorganismy obsahují své vlastní polymerasy nebo obsahují specifické proteiny a nebo faktory pro usnadnění transkripce/translace svých genových produktů. Pro bakterie může existovat různý relativní nadbytek specifických tRNA. Je jasné, že in vivo exprese takových genů v DNA vakcině je významně odlišná.

Representativní složky konstruktů zahrnují (ale nejsou omezeny na): HIV env, HIV gag, HIV pol, HIV rev, HIV vpr a HIV nef; geny kodující antigeny exprivované patogeny jinými než je HIV, jako je například, ale bez omezení, nukleoprotein, hemagglutinin, matrix, neuraminidasa a jiné antigenní proteiny chřipkového viru; geny lidského herpes simplex viru; geny lidských papilomavirů; antigeny mykobakterium tuberculosis;

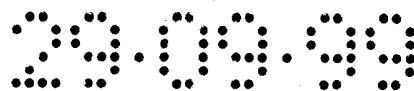


antigeny viru hepatitidy A, B a C.

Protektivní účinnost polynukleotidových HIV imunogenů proti následné infekci virem je prokázána imunizací za použití nereplikovatelné plasmidové DNA podle předkládaného vynálezu. Tento postup je výhodný, protože není obsaženo infekční agens, není vyžadováno složení viru a je umožněna selekce determinanty. Dále, protože je sekvence gag a proteasy a několika dalších produktů virových genů konzervována mezi různými kmeny HIV, je možná ochrana před následnou infekcí virulentním kmenem HIV, který je homologní ke kmenu, ze které byl získán klonovaný gen, stejně jako před infekcí heterologním kmenem.

Vynález nabízí prostředek pro indukci mezikmenové protektivní imunity bez potřeby samoreplikujících se agens nebo pomocných činidel. Kromě toho, imunizace polynukleotidy podle předkládaného vynálezu má mnoho výhod. Tento postup pro vakcinaci lze použít pro nádory, stejně jako pro infekční agens, protože CD8+ CTL odpověď je významná pro oba patofyziologické procesy (K. Tanaka et al., Annu. Rev. Immunol. 6: 359 (1988)). Tak může být vyvolání imunitní odpovědi proti proteinu, který je zásadní pro transformační proces, účinným prostředkem pro ochranu před nádory nebo pro imunoterapii. Vyvolání vysokého titru protilátek proti exprimovaným proteinům po injekci virového proteinu a DNA pro lidský růstový hormon naznačuje, že to je snadný a vysoce účinný prostředek pro výrobu vakcin založených na protilátkách, buď samostatně nebo v kombinaci s vakcinami založenými na indukci cytotoxických T-lymfocytů namířených proti konzervativním antigenům.

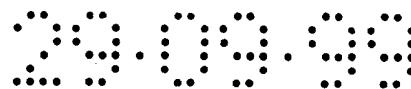
Produkce a přečištění DNA konstruktů je snadnější než tradiční způsoby přečištění proteinů, což usnadňuje výrobu kombinovaných vakcin. Tak mohou být připraveny konstrukty



rev/gp160 DNA. Tato skutečnost může být důsledkem známých cytotoxických účinků rev, stejně jako vyšší obtížnosti dosažení rev funkce v myotubulech obsahujících stovky jader (pro expresi gag nebo env proteinu potřebuje být rev protein ve stejném jádru jako rev-dependentní transkript). Nicméně, je možné získat rev-independentní expresi za použití vybraných modifikací env genu.

Obecně naše vakciny využívají primární HIV (IIIB, MN nebo CAM-1) env a gag geny pro optimalizaci exprese v našem generalizovaném vakcinačním vektoru, V1Jns, který obsahuje CMV bezprostřední-časný promotor (IE), BGH polyadenylační místo a pUK skelet. Pro env může být dosaženo různé účinnosti rev-independentní exprese, podle velikosti použitého genového segmentu (například gp120 vs. gp160), náhradou přirozeného sekrečního vedoucího peptidu za sekreční vedoucí peptid z genu pro tkáňově specifický plasminogenný aktivátor (tPA) a expresí vzniklého chimerického genu pod kontrolou CMVIE promotoru s intronem A CMV.

Jak bylo uvedeno výše, považujeme realizaci následujících prvků za zásadní pro maximalizaci úspěchu tohoto programu: (1) přípravu vektorů založených na env, které jsou schopné vyvolat silnější tvorbu neutralizačních protilátek u primátů; (2) přípravu gag a env vektorů, které vyvolají silné odpovědi T-lymfocytů jak jsou charakterizovány CTL a efektorovými funkcemi "helperů" u primátů; (3) použití env a gag genů z klinicky relevantních kmenů HIV-1 ve vakcinách podle předkládaného vynálezu a charakterizace imunologických odpovědí, zejména neutralizace primárních izolátů, kterou vyvolají; (4) demonstraci ochrany na zvířecím modelu jako je model šimpanz/HIV (IIIB) nebo makak rhesus/SHIV, za použití vhodných optimalizovaných vakcin; a (5) určení trvání imunitních



odpovědí, které je vhodné pro klinické použití. Významný pokrok byl učiněn v realizaci první tří bodů a pokračují pokusy, které mají určit, zda současné vakcinační konstrukty pro gp160 a gag zlepší počáteční výsledky.

Příklad 2: Vektory pro výrobu vakcíny

A. Expresní vektor V1Jneo

Je nutné dostranit amp^r gen pro antibiotickou selekci bakterií nesoucích V1J, protože ampicilin nemůže být použit ve fermentačních nádobách pro průmyslovou výrobu. amp^r gen z pUC skeletu V1J se odstraní trávením restriktivními enzymy SspI a Eam1105I. Zbytek plasmidu se přečistí elektroforesou na agarosovém gelu, tupě se zakončí T4 DNA polymerasou a potom se zpracuje telecí střevní alkalickou fosfatasou. Komerčně dostupný kan^r gen, odvozený z transposonu 903 a obsažený v plasmidu pUC4K, se exciduje pomocí restriktivního enzymu PstI, přečistí se elektroforesou na agarosovém gelu, tupě se zakončí T4 DNA polymerasou. Tento fragment se liguje s V1J skeletem a získají se plasmidy s kan^r genem v jakékoliv orientaci, které se označí V1Jneo č. 1 až 3. Každý z těchto plasmidů se ověří restriktivní analýzou a DNA sekvencováním spojovacích regionů. Zjistilo se, že každý z těchto plasmidů produkuje stejné množství plasmidu jako V1J. Expresse heterologních genových produktů je pro tyto V1Jne vektory také srovnatelná s V1J. Jako expresní konstrukt jsme vybrali V1Jneo#3, který je zde dále označen jako V1Jneo, který obsahuje kan^r gen ve stejné orientaci jako amp^r gen ve V1J.

B. Expresní vektor V1Jns

SfiI místo se přidá k V1Jneo pro usnadnění integračních studií. Komerčně dostupný SfiI linker o délce 13 párů bazí (New

England Biolabs) se přidá v KpnI místě uvnitř BGH sekvence vektoru. V1Jneo se linearizuje KpnI, přečistí se na gelu, tupě se zakončí pomocí T4 DNA polymerasy a liguje se na tupě zakončený SfiI linker. Klonální izoláty se vyberou podle restričního mapování a ověří se sekvencováním za použití linkeru. Nový vektor se označí V1Jns. Expres heterologních genů ve V1Jns (s SfiI) je srovnatelná s expresí stejných genů ve V1Jne (s KpnI).

C. V1Jns-tPA

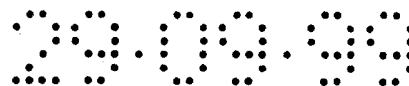
Pro získání heterologní vedoucí peptidové sekvence pro secernované a/nebo membránové proteiny je V1Jn modifikován tak, aby obsahoval vedoucí sekvenci lidského tkáňově specifického plasminogenového aktivátoru (tPA). Dva syntetické komplementární oligomery jsou tepelně zpracovány a jsou ligovány do V1Jn, který se tráví BglII. Tyto oligomery mají přesahující baze, které jsou vhodné pro ligaci do sekvencí štěpených BglII. Po ligaci je "upstream" BglII místo zrušeno, zatímco "downstream" místo pro BglII je zachováno pro následné ligace. Oba spoje, stejně jako celá tPA vedoucí sekvence, jsou ověřeny DNA sekvencováním. Dále, pro přizpůsobení našemu konvenčnímu optimalizovanému vektoru V1Jns (= V1Jneo s SfiI místem) se SfiI restriční místo umístí v KpnI místě uvnitř BGH terminačního regionu V1Jn-tPA pomocí tupého zakončení KpnI místa T4 DNA polymerasou a potom ligací SfiI linkeru (katalogové č. 1138, New England Biolabs). Tato modifikace se ověří restričním trávením a elektroforesou na agarosovém gelu.

D. Příprava vektoru V1R

V další snaze o optimalizaci našeho základního vektoru pro vakcinaci se připraví derivát V1Jns, který se označí jako V1R.

Cílem konstrukce tohoto vektoru je získání vakcinačního vektoru minimální velikosti, t.j. bez zbytečných DNA sekvencí, který si zachová celkově optimalizované expresní charakteristiky heterologního genu a vysoký plasmidový výtěžek, který je dosažen při použití V1J a V1Jns. Z literatury, stejně jako z pokusů, jsme určili, že (1) regiony v pUC skeletu obsahující element rozpoznávající počátek replikace *E. coli*, mohou být odstraněny bez ovlivnění plasmidového výtěžku z bakterie; (2) 3'-region *kan^r* genu po kanamycinovém otevřeném čtecím rámci může být odstraněn, pokud je místo něj insertován bakteriální terminator; a (3) -300 bp z 3'-poloviny BGL terminatoru může být odstraněno bez ovlivnění jeho regulační funkce (po původním KpnI restriktivním místě uvnitř BGH elementu).

V1R se připraví za použití PCR pro syntezu tří segmentů DNA z V1Nns, které představují CMVintA promotor/BGH terminátor, element rozpoznávající počátek replikace a elementy resistance na kanamycin, v příslušném pořadí. Restriktivní místa jedinečná pro každý segment se přidávají ke každému segmentu za použití PCR oligomerů: SspI a XhoI pro CMVintA/BGH; EcoRV a BamHI pro *kan^r* gen; a BclI a SalI pro *ori^r*. Tato restriktivní místa byla vybrána proto, že umožňují přímou ligaci každého segmentu získaného PCR bez následné ztráty každého místa: EcoRV a SspI ponechávají tupě zakončené DNA, které jsou kompatibilní pro ligaci, zatímco BamHI a BclI ponechávají komplementární přesahující konce, stejně jako SalI a XhoI. Po získání těchto segmentů PCR se každý segment tráví vhodnými restriktivními enzymy uvedenými výše a potom se segmenty ligují v jedné reakční směsi obsahující všechny tři segmenty DNA. 5'-konec *ori^r* je navržen tak, že obsahuje T2 rho-independentní terminační sekvenci, která je normálně přítomná v tomto regionu, takže poskytuje ukončovací informaci pro gen resistance na kanamycin. Ligovaný produkt se ověří restriktivním trávením (> 8 enzymů) a DNA sekvencováním spojů. DNA



plasmidový výtěžek a heterologní exprese při použití virových genů ve V1R je stejná jako při použití V1Jns. Čistá redukce velikosti vektoru je 1346 bp (V1Jns = 4,86 kb; V1R = 3,52 kb).

Příklad 3: Návrh syntetických genových segmentů pro zvýšení exprese gag genu

Genové segmenty se přemění na sekvence mající identické translatované sekvence, ale využívající alternativní kodony, jak je to definováno v R.Lathe, J. Mol. Biol. svazek 183, str. 1 - 12 (1985), "Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid Sequence Data: Theoretical and Practical Considerations". Metoda pro zvýšení exprese gag genových segmentů HIV, která je popsána dále, je založena na naší hypotéze, že známá nemožnost účinné exprese tohoto genu v savčích buňkách je důsledkem celkového složení transkriptu. Tak je možno za použití alternativních kodonů kodujících stejnou proteinovou sekvencí odstranit překážky exprese gag. Nahrazení specifických kodonů může být provedeno následujících způsobem:

1. Identifikuje se umístění kodonů pro správný čtecí rámec.
2. Srovnají se přirozené kodony s pozorovanou frekvencí v lidských genech.
3. Pokud kodony neodpovídají nejčastějším používaným kodonům, provede se náhrada za optimální kodon pro vysoce účinnou expresi v lidských buňkách.
4. Tento postup se opakuje, dokud není nahrazen celý genový segment.
5. Nová genová sekvence se prověří na přítomnost nežádoucích

sekvencí vytvořených touto náhradou kodonů (jako je například sekvence "ATTTA", neúmyslně vytvořených rozpoznávacích míst pro sestřih intronů, nežádoucích sekvencí pro restriční enzymy, atd.) a provede se záměna takovými kodony, které eliminují tyto sekvence.

6. Sestaví se segmenty syntetického genu a testuje se zlepšená exprese.

Tato metoda se použije pro výrobu nových syntetických genových segmentů pro HIV gag, za vzniku genu, který obsahuje pouze optimální kodony pro expresi. Ačkoliv výše uvedený postup je souhrnem naší techniky pro návrh genů obsahujících optimalizované kodony pro DNA vakciny, je zřejmé, že podobně účinné vakciny nebo geny se zvýšenou expresí mohou být získány při použití drobných změn postupu nebo drobných změn sekvence.

Příklad 4

I. Konstrukt pro HIV gag vakcinu

Následuje úplný otevřený čtecí rámeček pro HIV-1 (CAM-1) gag obsahující optimální kodony:

```

1  AGATCTACCA TGGGTGCTAG GGCTTCTGTG CTGTCTGGTG GTGAGCTGGA
51  CAAGTGGGAG AAGATCAGGC TGAGGCCTGG TGGCAAGAAG AAGTACAAGC
101 TAAAGCACAT TGTGTGGGCC TCCAGGGAGC TGGAGAGGTT TGCTGTGAAC
151 CCTGGCCTGC TGGAGACCTC TGAGGGGTGC AGGCAGATCC TGGGCCAGCT
201 CCAGCCCTCC CTGCAAACAG GCTCTGAGGA GCTGAGGTCC CTGTACAACA
251 CAGTGGCTAC CCTGTACTGT GTGCACCAGA AGATTGATGT GAAGGACACC
301 AAGGAGGCCC TGGAGAAGAT TGAGGAGGAG CAGAACAAGT CCAAGAAGAA

```

351 GGCCCAGCAG GCTGCTGCTG GCACAGGCAA CTCCAGCCAG GTGTCCCAGA
401 ACTACCCCAT TGTGCAGAAC CTCCAGGGCC AGATGGTGCA CCAGGCCATC
451 TCCCCCGGA CCTGAATGC CTGGGTGAAG GTGGTGGAGG AGAAGGCCTT
501 CTCCCCTGAG GTGATCCCCA TGTTCTCTGC CCTGTCTGAG GGTGCCACCC
551 CCCAGGACCT GAACACCATG CTGAACACAG TGGGGGGCCA TCAGGCTGCC
601 ATGCAGATGC TGAAGGAGAC CATCAATGAG GAGGCTGCTG AGTGGGACAG
651 GCTGCATCCT GTGCACGCTG GCCCCATTGC CCCCAGCCAG ATGAGGGAGC
701 CCAGGGGCTC TGACATTGCT GGCACCACCT CCACCCTCCA GGAGCAGATT
751 GGCTGGATGA CCAACAACCC CCCCATCCCT GTGGGGGAAA TCTACAAGAG
801 GTGGATCATC CTGGGCCTGA ACAAGATTGT GAGGATGTAC TCCCCACCT
851 CCATCCTGGA CATCAGGCAG GGCCCCAAGG AGCCCTTCAG GGACTIONTGT
901 GACAGGTTCT ACAAGACCCT GAGGGCTGAG CAGGCCTCCC AGGAGGTGAA
951 GAACTGGATG ACAGAGACCC TGCTGGTGCA GAATGCCAAC CCTGACTGCA
1001 AGACCATCCT GAAGGCCCTG GGCCCTGCTG CCACCCTGGA GGAGATGATG
1051 ACAGCCTGCC AGGGGGTGGG GGGCCCTGGT CACAAGGCCA GGGTCTGGCC
1101 TGAGGCCATG TCCCAGGTGA CCAACTCCGC CACCATCATG ATGCAGAGGG
1151 GCAACTTCAG GAACCAGAGG AAGACAGTGA AGTGCTTCAA CTGTGGCAAG
1201 GTGGGCCACA TTGCCAAGAA CTGTAGGGCC CCCAGGAAGA AGGGCTGCTG
1251 GAAGTGTGGC AAGGAGGGCC ACCAGATGAA GGACTIONTCAA GAGAGGCAGG
1301 CCAACTTCCT GGGCAAATC TGGCCCTCCC ACAAGGGCAG GCCTGGCAAC
1351 TTCCTCCAGT CCAGGCCTGA GCCCACAGCC CCTCCCGAGG AGTCCTTCAG
1401 GTTTGGGGAG GAGAAGACCA CCCCAGCCA GAAGCAGGAG CCCATTGACA
1451 AGGAGCTGTA CCCCCTGGCC TCCCTGAGGT CCCTGTTTGG CAACGACCCC
1501 TCCTCCAGT AAAATAAAGC CCGGGCAGAT CT
(SEQ ID NO:1)

Příklad 5: In vitro exprese gag vakciny

In vitro exprese těchto konstruktů se testuje na transfektovaných buňkách lidského rhabdomyosarkomu (RD) nebo na 293 buňkách. Kvantitativní hodnocení gag z transfektovaných 293 buněk ukazuje, že vektory V1Jns-opt-gag a V1Jns-tPA-opt-gag produkují secernovaný gag.

Příklad 6: Test na HIV-gag cytotoxické T-lymfocyty

Zde uvedený způsob ilustruje test, který se použije pro vakcinované myši. V podstatě stejný test může být použit pro primáty s tou výjimkou, že musí být vytvořena linie autologních B buněk, které se použijí jako cílové buňky pro každé zvíře. To se provede pro lidi za použití viru Epstein-Barrové a pro opice makak rhesus za použití herpes B viru.

Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) se získají buď z čerstvě odebrané krve, nebo ze sleziny, pomocí Ficoll-Hypaque centrifugace pro separaci erytrocytů od bílých krvinek. U myši mohou být použity také lymfatické uzliny. Efektorové CTL mohou být připraveny z PBMC buď in vitro kultivací s IL-2 (20 U/ml) a konkavalinem A (2 μ g/ml) po dobu 6 - 12 dnů, nebo za použití specifického antigenu a stejného počtu ozářených antigen-presentujících buněk. Specifickým antigenem mohou být buď syntetické peptidy (obvykle velikosti 9 - 15 aminokyselin), které jsou známé epitopy pro CTL rozpoznávání MHC haplotypu použitých zvířat, nebo konstrukty viru vakcinie zpracované tak, aby exprivovaly vhodný antigen. Cílovými buňkami mohou být buď syngenní buněčné linie, nebo buněčné linie s upraveným MHC haplotypem, které se zpracují tak, aby presentovaly vhodný antigen, jak je popsáno pro in vitro stimulaci CTL. Pro Balb/c myši se pro restimulaci CTL in vitro použije gag peptid, jak jej



popisuje Paterson (J. Immunol., 1995), v koncentraci 10 μM , za použití ozářených syngenních splenocytů a tento peptid může být použit pro senzibilizaci cílových buněk během testu cytotoxicity v koncentraci 1 - 10 μM při inkubaci při 37 °C po dobu 2 hodin před testem. Pro tyto myši s MHC haplotypem H-2^d jsou vhodnými cílovými buňkami buňky myši mastocytární buněčné linie P815. Antigenem senzibilizované cílové buňky se naplní $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$, který se uvolňuje z vnitřku cílových buněk po usmrcení CTL, inkubací cílových buněk po dobu 1 - 2 hodin při 37 °C (0,2 mCi na 5×10^6 buněk), po které následuje několik promytí cílových buněk. CTL populace se smísí s cílovými buňkami v různých poměrech cílových buněk k efektorovým buňkám, například v poměru 100:1, 50:1, 25:1, atd., vytvoří se společné pelety a provede se inkubace při 37 °C po dobu 4 - 6 hodin před odběrem supernatantů, ve kterých se potom stanoví radioaktivita gamma kamerou. Cytotoxicita se potom určí jako procento z celkového množství radioaktivity, která se může uvolnit z cílových buněk (které se určí reakcí s 0,2% Triton X-100), od kterého se odečte radioaktivita, která se samovolně uvolní z cílových buněk.

Příklad 7: Test na protilátky specifické pro HIV gag

ELISA test se použije pro detekci protilátek vytvořených proti HIV, za použití specifického rekombinantního p24 proteinu jako antigenního substrátu. 96-jamková mikrotitrační plotna se potáhne při 4 °C přes noc rekombinantním antigenem v koncentraci 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v roztoku PBS (fosfatem pufovaného salinického roztoku) za použití 50 $\mu\text{g}/\text{jamku}$ na plotnách za mírného třepání. Antigenem jsou rekombinantní p24 gag (Intracell). Plotny se čtyřikrát propláchnou promývacím pufrům (PBS/0,05% Tween 20) a potom se přidá blokovací pufr v množství 200 $\mu\text{g}/\text{jamku}$ (1% Carnation mléčný roztok v PBS/0,05% Tween 20) na dobu 1 hodiny při teplotě okolí za mírného třepání. Pre-sérum a imunitní sérum se ředí

v blokovacím pufru v požadovaných ředěních a do každé jamky se přidá 100 μ l. Plotny se inkubují po dobu 1 hodiny při teplotě okolí s mírným třepáním a potom se čtyřikrát promyjí promývacím pufrům. Potom se do každého vzorku přidá sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (anti-rhesus Ig, Southern Biotechnology Associates; anti-myší a anti-králičí Ig, Jackson Immuno Research) ředěná 1:2000 v blokovacím pufru v množství 100 μ l na jamku a provede se inkubace po dobu 1 hodiny při teplotě okolí za mírného třepání. Plotny se čtyřikrát promyjí promývacím pufrům a potom se vyvíjejí za přidání 100 μ l/jamku roztoku o-fenylendiaminu (o-PD, Calbiochem) v koncentraci 1 mg/ml ve 100 mM citratového pufru při pH 4,5. Absorbance se odečítá při 450 nm jak kineticky (prvních deset minut reakce), tak v 10 a ve 30 minutě (Thermo-max čtečka mikroploten, Molecular Devices).

Příklad 8: Test proliferace T buněk

Získají se PBMC a testují se na obnovené odpovědi na specifický antigen podle proliferace PBMC populace. Proliferace je sledována za použití ^3H -thymidinu, který je přidán do buněčných kultur na dobu posledních 18 až 24 hodin před odečítáním buněk. Přístroj pro sklizení buněk zachycuje DNA obsahující izotop na filtrech, pokud proběhla proliferace, zatímco buňky v klidové fázi neinkorporují izotop, který není zachycen na filtrech ve volné formě. Jak pro hlodavce, tak pro primáty je 4×10^5 buněk umístěno na 96-jamkovou mikrotitrační plotnu v celkem 200 μ l kompletního media (RPMI/10% fetální telecí sérum). Pozadí proliferační odpovědi se určí za použití PBMC a media samotného a nespecifické odpovědi jsou vyvolány za použití lektinů jako je fytohemagglutinin (PHA) nebo konkavalin A (ConA) v koncentracích 1 - 5 μ g/ml a slouží jako pozitivní kontrola. Specifickými antigeny jsou známé peptidové epitopy,

přečištěný protein nebo inaktivovaný virus. Koncentrace antigenů jsou v rozmezí od 1 do 10 μM pro peptidy a od 1 do 10 $\mu\text{g/ml}$ pro protein. Proliferace indukovaná lektinem vrcholí 3. až 5. den inkubace buněčné kultury, zatímco proliferace indukovaná antigenem vrcholí 5. až 7. den. Specifická proliferace probíhá tehdy, pokud je získaná radioaktivita alespoň trojnásobně vyšší, než je radioaktivita pozadí a je často uváděna jako poměr k pozadí neboli stimulační index (SI).

Příklad 9

Strategie, které jsme použili, jsou navrženy pro indukci jak cytotoxických T lymfocytů (CTL), tak pro indukci neutralizačních protilátek k HIV, primárně zaměřených na produkty HIV gag genu (konzervovaný z přibližně 95%) a env genu (gp160 nebo gp120; konzervovaný z 70 - 80%). gp160 obsahuje pouze známé epitopy pro neutralizační protilátky na HIV, zatímco význam anti-env a anti-gag CTL odpovědí je zdůrazněn známou asociací nástupu těchto mechanismů buněčné imunity s odstraněním primární viremie po infekci, ke které dochází před nástupem neutralizačních protilátek (Koup et al., J. Virol. 68: 4650 (1994)), stejně jako známou úlohou CTL v udržování stavu bez projevu onemocnění. Ačkoliv je dobře známa genetická diversita HIV, doufáme, že získáme větší šíři neutralizačních protilátek díky použití několika reprezentativních env genů získaných z klinických izolátů a díky použití gp41 (který je konzervován z přibližně 90% a který obsahuje konzervovanější neutralizační epitop 2F5), a zároveň by měl vysoce konzervovaný gag gen vyvolávat mezikmenovou CTL odpověď. Protože tato vakcinační strategie vyvolává jak silnou protilátkovou, tak buněčnou imunitu proti HIV (u primátů jiných než lidí), má tento postup jedinečné výhody ve srovnání s jinými vakcinačními strategiemi proti HIV.



A. Vývoj HIV-1 gag polynukleotidové vakcíny

Na základě našich pokusů s expresí HIV env genu využívajících geny složené z optimálních kodonů pro expresi u lidí je navržen a syntetizován syntetický p55 gag gen (opt gag), který obsahuje optimální kodony díky přibližně 350 silentním mutacím (celkem 1500 nukleotidů) a který je klonován do V1R. Také je konstruována druhá forma opt gag vektoru, který obsahuje sekvenci kodující tPA signální peptid na NH₂-konci, který je podobný peptidu popsanému výše pro HIV env a který také eliminuje jadernou lokalizaci motivu sekvence umístěného v této pozici v přirozeném genu. Tato modifikace byla navržena pro testování toho, zda alterace normálního intracelulárního přenosu pro gag ER/Golgiho sekreční dráhou mění imunogenicitu gag DNA vakcíny. Přidání tPA vedoucího peptidu ke gag vede k mnohem vyšší úrovni sekrece gag a secernovaný protein migruje jako forma s vyšší molekulovou hmotností ve srovnání s přirozeným gag. Tato skutečnost naznačuje, že existuje posttranslační modifikace, pravděpodobně glykosylace, která je důsledkem modifikace tPA vedoucím peptidem.

Myši, které byly imunizovány jedním ze dvou optimalizovaných p55 gag konstruktů (V1R-opt gag ± tPA vedoucí sekvence) nebo V1R-gag (přirozený gen) se testují na CTL odpovědi proti gag po jedné injekci (vakcinační dávky 10, 3,3 nebo 1 μg/myš). Vysoké hladiny anti-gag CTL byly vyvolány oběma V1R-opt gag DNA při všech dávkách, s nejvyšším specifickým zabíjením pro V1R-tPA-opt gag (přibližně 85% @ E/T = 3 při dávce 1 μg). Srovnání křivek cytotoxicity pro všechny dávky DNA prokazuje, že vakcinace V1R-tPA-opt gag vyvolává 100-násobně vyšší CTL odpovědi než vakcinace V1R-gag (přirozeným typem). Celkově vykazovala imunitní odpověď pro tři vakcinační skupiny stejné relativní účinnosti pro CTL, T-helperovou a protilátkou odpověď (od



nejsilnější k nejslabší odpovědi): V1R-tPA-opt gag > V1R-opt gag > V1R gag (přirozený typ). Celkově jsou CTL odpovědi, protilátkové odpovědi a odpovědi T_H buněk mnohem vyšší pro opt gag konstrukty, zejména pokud jsou opatřeny tPA vedoucí sekvencí.

Příklad 10: Způsob léčby

Jedinci, který potřebuje terapeutickou nebo profylaktickou imunizaci proti infekci virem lidské imunodeficiencie, je injekčně podána HIV DNA kodující celé nebo části env, gag nebo pol genů nebo jejich kombinaci. Injekční podání může být subkutání, intramuskulární nebo intradermální. HIV DNA může být použita jako primární činidlo pro imunitní odpověď, nebo může být použita pro dosycení imunitní odpovědi. Injekce DNA může předcházet, doprovázet nebo následovat injekci farmaceutického prostředku obsahujícího inaktivovaný HIV, atenuovaný HIV, obsahujícího proteiny odvozené od HIV nebo jejich kombinace.

Příklad 11: Způsob léčby

Jedinec, který potřebuje terapeutickou nebo profylaktickou imunizaci proti infekci virem lidské imunodeficiencie, je léčen antivirovým činidlem působícím proti HIV nebo jejich kombinací. Léčenému jedinci je podána injekce farmaceutického prostředku obsahujícího DNA HIV podle předkládaného vynálezu.



PV 2766-99
67018

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Syntetický polynukleotid obsahující DNA sekvenci kodující protein jiného než savčího původu nebo jeho fragment, ve kterém DNA sekvence obsahuje kodony optimalizované pro expresi v savčím hostiteli.

2. Polynukleotid podle nároku 1, kde protein je vybrán ze skupiny skládající se z proteinů HIV, proteinů HSV, proteinů HAV, proteinů HBV, proteinů HCV, proteinů HPV, proteinů HSV, proteinů Plasmodií, proteinů Mykobakterií, proteinů Borrelií proteinů rotavirů.

3. Polynukleotid podle nároku 1, kde proteinem je protein HIV.

4. Polynukleotid podle nároku 3, který má následující sekvenci DNA:

```

1  AGATCTACCA TGGGTGCTAG GGCTTCTGTG CTGTCTGGTG GTGAGCTGGA
51  CAAGTGGGAG AAGATCAGGC TGAGGCCTGG TGGCAAGAAG AAGTACAAGC
101 TAAAGCACAT TGTGTGGGCC TCCAGGGAGC TGGAGAGGTT TGCTGTGAAC
151 CCTGGCCTGC TGGAGACCTC TGAGGGGTGC AGGCAGATCC TGGGCCAGCT
201 CCAGCCCTCC CTGCAAACAG GCTCTGAGGA GCTGAGGTCC CTGTACAACA
251 CAGTGGCTAC CCTGTACTGT GTGCACCAGA AGATTGATGT GAAGGACACC
301 AAGGAGGCC C TGGAGAAGAT TGAGGAGGAG CAGAACAAGT CCAAGAAGAA
351 GGCCCAGCAG GCTGCTGCTG GCACAGGCAA CTCCAGCCAG GTGTCCCAGA
401 ACTACCCCAT TGTGCAGAAC CTCCAGGGCC AGATGGTGCA CCAGGCCATC
451 TCCCCCGGA CCCTGAATGC CTGGGTGAAG GTGGTGGAGG AGAAGGCCTT
501 CTCCCCTGAG GTGATCCCCA TGTTCTCTGC CCTGTCTGAG GGTGCCACCC
551 CCCAGGACCT GAACACCATG CTGAACACAG TGGGGGGCCA TCAGGCTGCC
601 ATGCAGATGC TGAAGGAGAC CATCAATGAG GAGGCTGCTG AGTGGGACAG
651 GCTGCATCCT GTGCACGCTG GCCCCATTGC CCCCAGCCAG ATGAGGGAGC
701 CCAGGGGCTC TGACATTGCT GGCACCACCT CCACCCTCCA GGAGCAGATT

```



751 GGCTGGATGA CCAACAACCC CCCCATCCCT GTGGGGGAAA TCTACAAGAG
 801 GTGGATCATC CTGGGCCTGA ACAAGATTGT GAGGATGTAC TCCCCCACCT
 851 CCATCCTGGA CATCAGGCAG GGCCCCAAGG AGCCCTTCAG GGACTATGTG
 901 GACAGTTTCT ACAAGACCCT GAGGGCTGAG CAGGCCTCCC AGGAGGTGAA
 951 GAACTGGATG ACAGAGACCC TGCTGGTGCA GAATGCCAAC CCTGACTGCA
 1001 AGACCATCCT GAAGGCCCTG GGCCCTGCTG CCACCCTGGA GGAGATGATG
 1051 ACAGCCTGCC AGGGGGTGGG GGGCCCTGGT CACAAGGCCA GGGTCTGGC
 1101 TGAGGCCATG TCCCAGGTGA CCAACTCCGC CACCATCATG ATGCAGAGGG
 1151 GCAACTTCAG GAACCAGAGG AAGACAGTGA AGTGCTTCAA CTGTGGCAAG
 1201 GTGGGCCACA TTGCCAAGAA CTGTAGGGCC CCCAGGAAGA AGGGCTGCTG
 1251 GAAGTGTGGC AAGGAGGGCC ACCAGATGAA GGACTGCAAT GAGAGGCAGG
 1301 CCAACTTCCT GGGCAAAATC TGGCCCTCCC ACAAGGGCAG GCCTGGCAAC
 1351 TTCCTCCAGT CCAGGCCTGA GCCCACAGCC CCTCCCGAGG AGTCCTTCAG
 1401 GTTTGGGGAG GAGAAGACCA CCCCCAGCCA GAAGCAGGAG CCCATTGACA
 1451 AGGAGCTGTA CCCCTGGCC TCCCTGAGGT CCCTGTTTGG CAACGACCCC
 1501 TCCTCCAGT AAAATAAAGC CCGGCAGAT CT
 (SEQ ID NO:1).

5. Polynukleotid podle nároku 3, který indukuje neutralizační protilátky pro HIV, specifickou imunitní odpověď T-buněk proti HIV nebo protektivní imunitní odpovědi po vnesení do tkání obratlovců, včetně lidských tkání, in vivo, kde polynukleotid obsahuje gen kodující produkt HIV genů gag, gag-proteasy nebo env.

6. Způsob pro indukci imunitní odpovědi u obratlovce v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vnesení 1 ng až 100 mg polynukleotidu podle nároku 1 do tkáně obratlovce.



7. Způsob podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje podání atenuovaného patogenu, usmrceného patogenu, podjednotkových vakcin, proteinových vakcin a jejich kombinací.

8. Imunogenní prostředek pro indukci imunitní odpovědi proti infekci HIV v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polynukleotid podle nároku 3 a farmaceuticky přijatelný nosič, a volitelně pomocné činidlo.

9. Způsob pro indukci imunitní odpovědi proti HIV u primáta v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vnesení polynukleotidu podle nároku 3 do tkáně uvedeného primáta a současné parenterální podání cytokinu.

10. Způsob pro indukci buněk prezentujících antigen, které stimulují proliferaci a efektorové funkce, včetně sekrece lymfokinů, cytotoxických a pomocných T-buněk, které jsou specifické pro HIV antigeny v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje vystavení buněk obratlovce in vivo působení polynukleotidu podle nároku 3.

11. Způsob léčby pacienta, který potřebuje takovou léčbu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že pacientovi je podán polynukleotid podle nároku 3 v kombinaci s antivirovým činidlem proti HIV.

12. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polynukleotid podle nároku 1.

20.09.99

PV 466-99

~~67018~~

1/5

PLASMID ▾

Slepý vzorek

p55(NCI/VIR)

p55 gag OPT

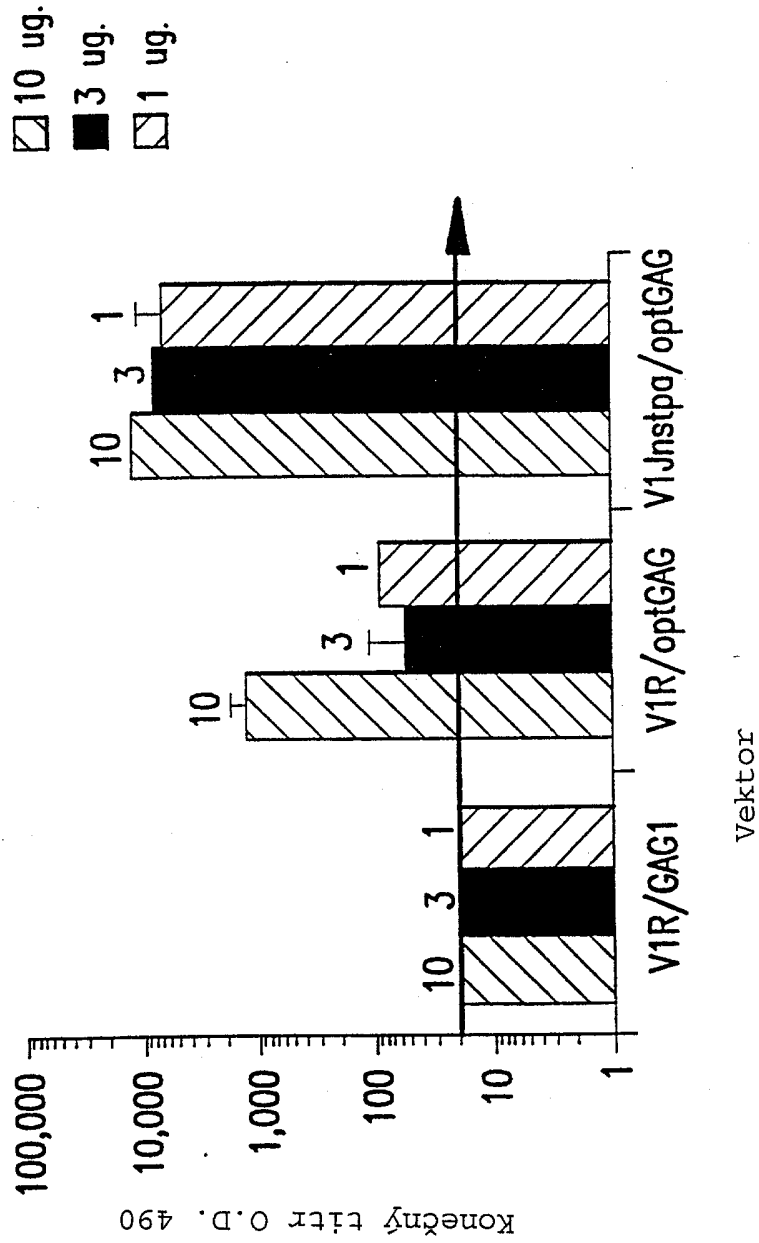
IPA-p55 gag OPT

p55 gag ▾



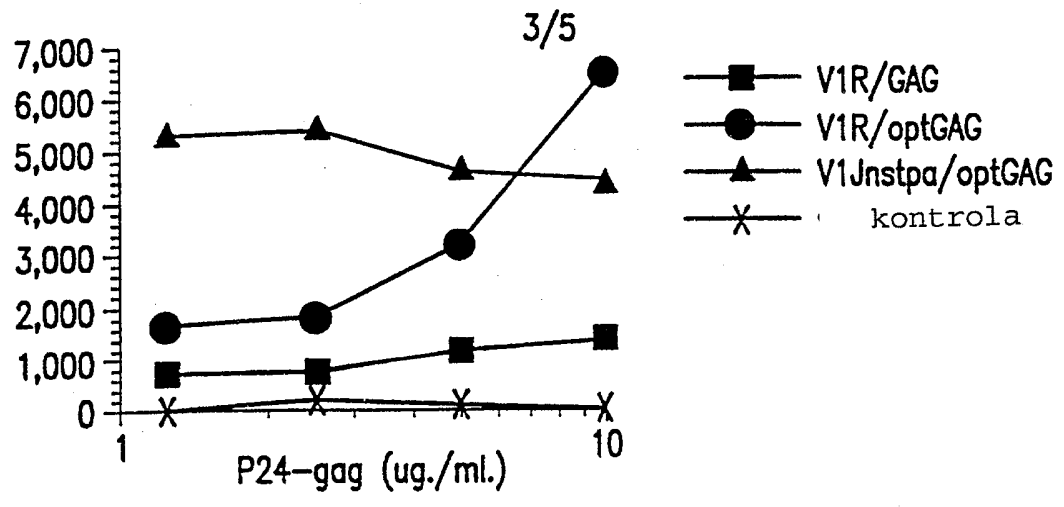
buněčné pelety

Obr. 1



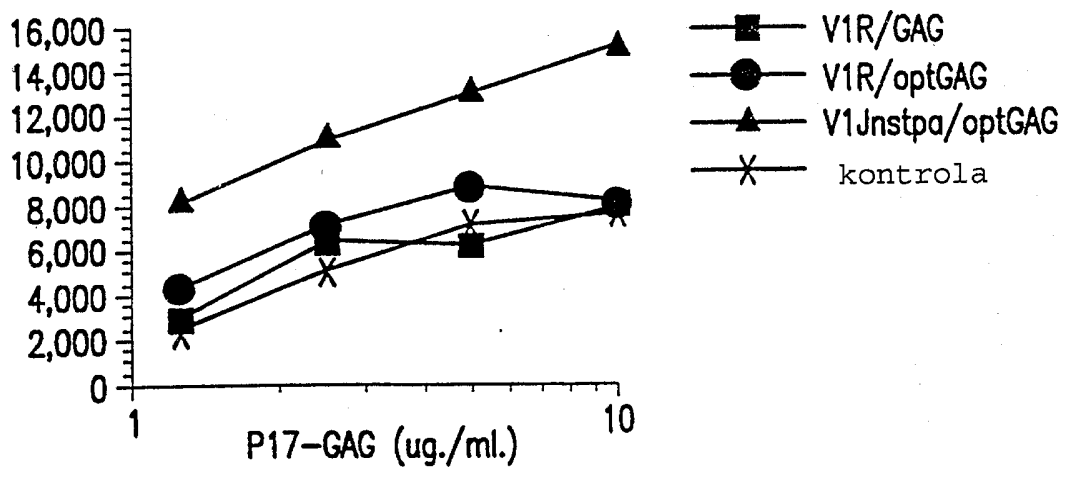
Obr. 2

Průměrná inkorporace H3 (cpm)



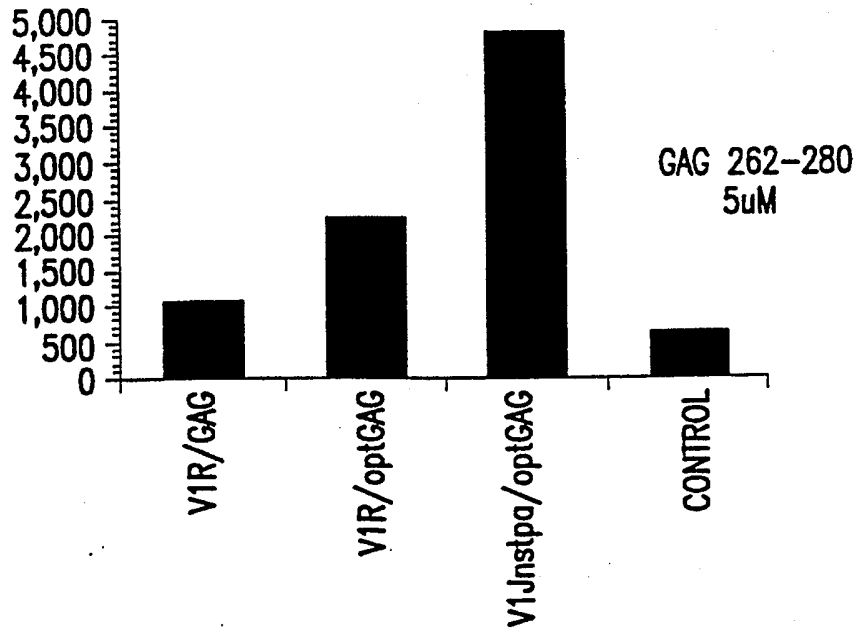
Obr. 3A

Průměrná inkorporace H3 (cpm)

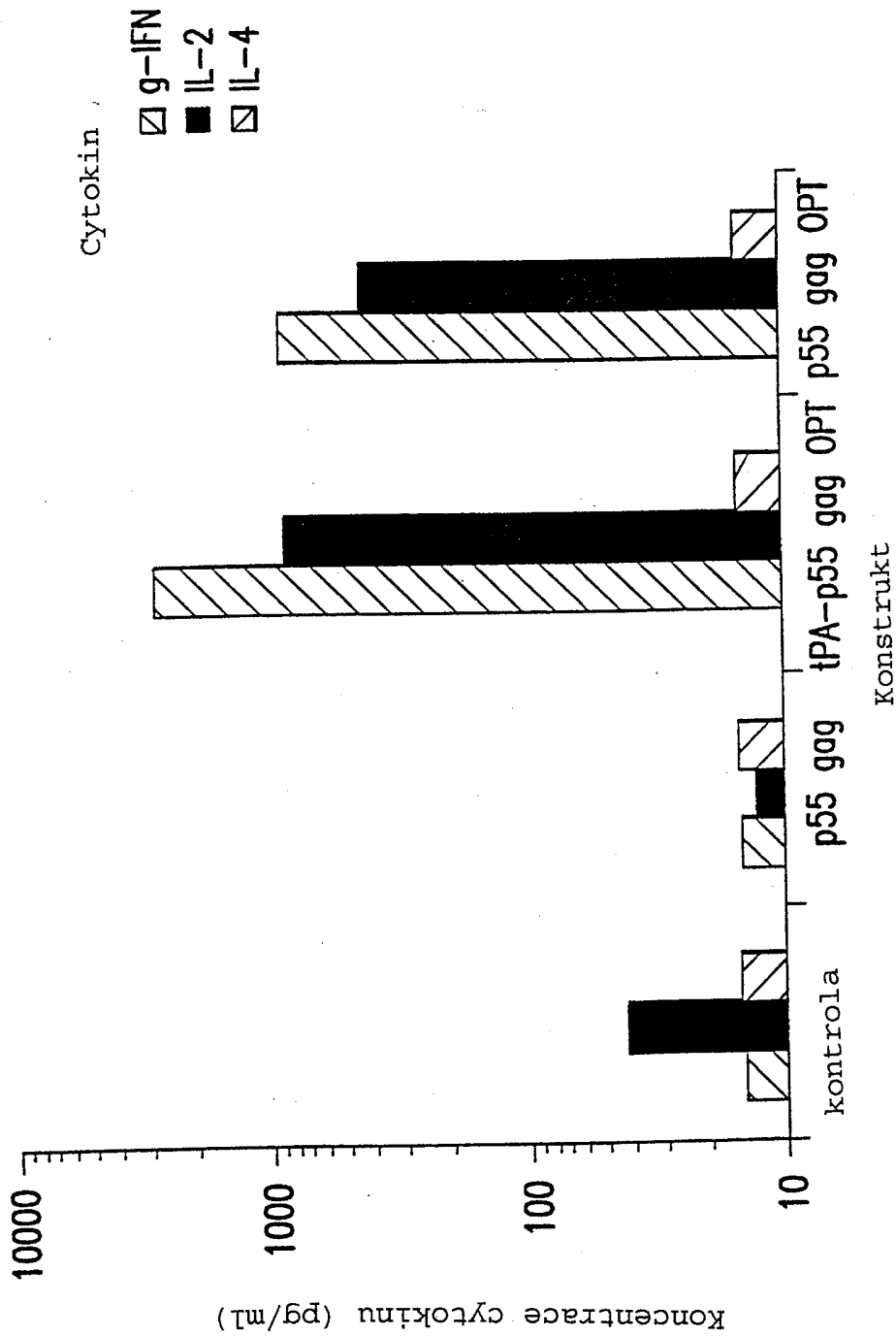


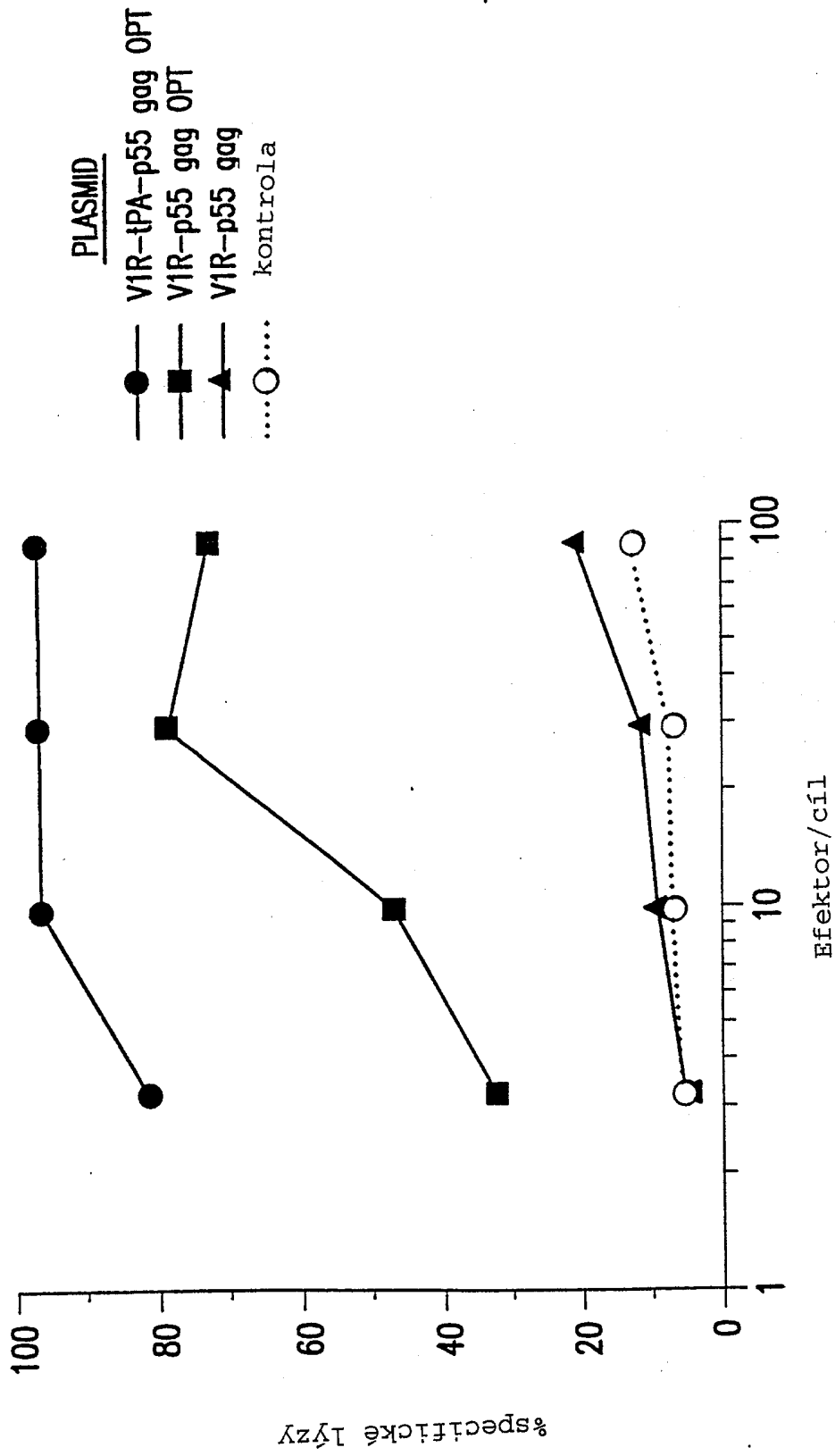
Obr. 3B

Průměrná inkorporace H3 (cpm)



Obr. 3C





Obr. 5