

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 924080 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 924080

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 15/38
C12N 15/86

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 11.09.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 11.09.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 14.03.1993

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

13.09.1991 US 759310

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •American Cyanamid Company, One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470-8426, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Landolfi, Victoria Ann, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Figuroa, Natalie Beth, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

HSV gD2:n bakulovirusilmentämisseemi

Baculovirusexpressionssystem för HSV gD2

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

68664 ATCC

HSV-gD2:n baculovirusilmentämissysteemi

Keksinnön ala

Tämä keksintö liittyy yhdistelmä-DNA-tekniikalla
 5 tuotettuihin virusproteiineihin. Tarkemmin sanottuna tämä
 keksintö liittyy herpes simplex -viruksen tyyppin 2 (HSV2)
 glykoproteiini-D:n (gD2:n) tuottoon yhdistelmä-DNA-tek-
 niikalla hyönteisisäntäsolussa olevaa baculovirusta käyt-
 täen. Näin tuotettu gD2 on immunogeeninen ja suojaava ja
 10 se on sellaisenaan käyttökelpoinen rokotekoostumuksessa
 antamaan suojaa HSV-infektiota vastaan.

Keksinnön tausta

Herpes simplex -viruksen (HSV:n) tyyppien 1 ja 2
 aiheuttama infektio muodostaa pysyvän ja laajalle levin-
 15 neen ja potentiaalisesti vakavan terveysongelman erityi-
 sesti vastasyntyneille ja potilaille, joiden immunologi-
 sen järjestelmän toiminta on heikentynyt. Ihon lima-
 kalvojen pintojen lisäksi virusinfektio voi kohdistua
 silmiin, aivoihin, tai muihin elimiin ja on näyttöä sii-
 20 tä, että se on mahdollinen kohdunkaulansyövän aiheuttaja
 (2, 24). HSV muodostaa lisäksi piileviä infektioita, joi-
 den yhteydessä saattaa esiintyä tautitapausten uusiutumi-
 sia (30), jotka sekä psykologisessa että fyysisessä mie-
 lessä ovat samalla kiusallisia. HSV-rokotteen kehittämis-
 25 tä on vaikeuttanut virusgenomin liittyminen onkogeneesiin
 (3) ja tämä on suunnannut rokotteiden kehittämiseen koh-
 distetut ponnistelut alayksikköjen käyttöön perustuviin
 ratkaisuihin immunoprofylaktisten ja immunoterapeuttisten
 hoitomuotojen löytämiseksi.

30 Herpes simplex -viruksen glykoproteiini D (gD) on
 merkittävin ehdolla olevista ihmisille käytettäväksi aio-
 tuista rokotteista. Sekä viruksen vaippaan että infektoi-
 dun solun pintaan liittyvänä gD:llä on osoitettu olevan
 korvaamaton osuus virusinfektion varhaisissa vaiheissa
 35 (11, 9) ja sen on osoitettu toimivan ristiinreagoivan

vasta-aineen (4) ja soluvälitteisten immuunivasteiden (1, 22, 40, 47, 11, 35, 31) tärkeänä kohteena. HSV1:llä infektoiduista Vero-soluista peräsin olevan natiivin gD-preparaatin on aiemmin osoitettu antavan suojaa

5 infektointitarkoituksissa annettua HSV2-infektiota vastaan hiirissä ja marsuissa, aiheuttavan pitkäkestoisia humoraalisia ja soluvälitteisiä vasteita kädellisissä (25) ja olevan turvallista terveille seropositiivisille aikuisille annettuna (9). Glykoproteiinisaantojen opti-

10 moimiseksi ja sen mahdollisuuden välttämiseksi, että virusta tai genomien raportoituja transformoivia alueita pääsisi ruumiiseen rokotukseen käytettävän virusympin mukana, on gD:n tuotannossa käytetty useita yhdistelmä-DNA-järjestelmiä. Näihin kuuluvat bakteeri- (44), hiiva-

15 (37, 41), vaccinia- (28), nisäkäs- (36) ja baculovirus- (14) ilmentämissysteemit. Näiden systeemien tuotteissa on eläinmalleissa esiintynyt eritasoista immunogeenisyyttä. Baculovirussysteemi tarjoaa etuja, jotka ovat turvallisuus, posttranslationaalisen modifikaation hyväksyttävä

20 vastaavuus (13,15), immunogeenisyys (33, 42, 14, 34, 8) sekä mahdollisuus vieraan proteiinin huomattavien saantojen saamiseen (45, 6), baculoviruksen polyhedriini-promoottorin ohjaamana.

Tästä keksinnöstä saadaan ensimmäistä kertaa käyt-

25 töön baculoviruksessa ilmennetty herpes simplex -viruksen tyyppin 2 glykoproteiini D (bgD2) käyttäen Spodoptera frugiperda -soluja infektioalustana. Tuloksena oleva glykoproteiini on puhdistettu ja sen ominaisuuksien on osoitettu vastaavan HSV:stä peräisin olevan gD:n biokemialli-

30 sia ja immunologisia ominaisuuksia. Lisäksi tällä rokotteeksi ehdolla olevalla rokotteella immunisoiduissa hiirissä on nähty kokonaista virusta ja glykoproteiineja vastaan suunnattuja humoraalisia ja soluvälitteisiä vas-

35 teita ja rokotteet ovat antaneet suojan infektiotarkoituksissa annettua tappavaa HSV-infektiota vastaan.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö liittyy menetelmään yhdistelmä-gD2:n valmistamiseksi, joka käsittää sen, että transfektoidaan hyönteisisäntäsoluja gD2:ta vastaavan geenin sisältävällä
 5 baculoviruksen DNA:lla ja että viljellään näitä soluja sellaisissa olosuhteissa, joissa geenin ilmentyminen on mahdollista. Edullisessa sovellutusmuodossa gD2-geeni on sijoitettu baculoviruksen polyhedriinipromoottorin oh-
 jauksen alaisuuteen. Näin tuotetun glykoproteiinin on
 10 osoitettu olevan erittäin immunogeeninen ja antava suojan tappavilla HSV-annoksilla suoritettua infektiota vastaa. Tästä keksinnöstä saadaan siten myös käyttöön rokote-
 koostumuksia, jotka käsittävät tehokkaan määrän olennai-
 sesti puhdasta baculoviruksen avulla tuotettua gD2:ta
 15 yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen kanssa. Näitä koostumuksia voidaan käyttää HSV-infektion hoitamiseen tai ehkäisemiseen tarkoitettussa menetelmässä, joka käsittää sen, että annetaan isännälle tehokas määrä rokotekoostumusta.

20 Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön baculo-
 virusvektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia gD2-geenin ilmentämiseksi hyönteissoluissa, sekä hyönteissoluja, jotka on infektoitu näillä vektoreilla.

Kuvien lyhyt kuvaus

25 Kuva 1. gD2:n sijainti HSV2:n genomissa ja sen sijoittaminen baculovirus-siirtovektoriin. (A) Herpes simplex -virus tyypin 2 (kanta 12) genomi (43) on pilkot-
 tu Eco RI:llä gD2-geenin eristämiseksi 5 ke:n suuruiseen fragmenttiin. (B) gD2:n sisältävä Spe I/Xho I -fragmentti
 30 on liitetty baculovirusiirtovektorin pVL941:n ainoaan Bam HI -kohtaan suorittamalla ligaatio tasoittamattomaan päähän. Liitosjakson 5'- ja 3'- päissä olevat Spe I- ja
 Xho I -kohdat ovat hävinneet tasoittamattomaan päähän tehdyssä ligaatiossa. Kuitenkin Bam HI -kohta on säilynyt
 35 ennallaan.

Kuva 2. ngD1:n, ngD2:n ja bgD2:n SDS-PAGE-analyysi. Puhdistetuille proteiineille on suoritettu SDS-PAGE-elektroforeesi ja blottaus sähkövirralla nitro-selluloosalle. Kuvakehys A: kanava 1, moolimassa-
 5 standardit; kanava 2, puhdistettu natiivi gD1, kanava 3, puhdistettu natiivi gD2; kanava 4, puhdistettu yhdistelmä-gD2. Blotti on käsitelty immunologisilla koettimilla käyttäen kaniinin polyklonaalista anti-gD-seerumia ja visualisoitu peroksidaasileimalla varustetulla proteiini-
 10 A:lla ja 4-kloorinaftoli/H₂O₂-seoksella. Kuvakehys B: kanava 1, moolimassastandardit; kanava 2, puhdistettu yhdistelmä-gD2. Blotissa olevat proteiinivyöhykkeet on visualisoitu hopeavärjäyksellä.

Kuva 3. Baculoviruksella ilmennetyn ja natiivin gD:n ELISA-vasteet. ngD1-antigeenia (kuva 3A) ja baculoviruksessa ilmentämällä saatua gD2-antigeenia (kuva 3B) vastaan muodostuneiden ELISA-vasteiden keskiarvot viisi hiirtä käsittävistä ryhmistä. Molemmilla antigeeneilla havaittiin yleisenä suuntauksena bgD-annoksen mukainen
 20 aktiivisuuden nousu. Immunisoinnit olivat AlPO₄ (-O-); 0,1 µg bgD2 (-□-); 1,0 µg bgD2 (-■-); 5,0 µg bgD2 (-Δ-); 10 µg bgD2 (-▲-); 5,0 µg ngD2 (-▽-); 5,0 µg ngD1 (-▼-).

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tässä keksinnössä käytetään baculovirusilmentämis-
 25 systeemiä tuottamaan suuria saantoja sellaista gD2:ta, jonka rakenne muistuttaa läheisesti natiivin gD2-glykoproteiinin (ngD2) rakennetta. Useat baculovirukset, erityisesti nuclear polyhedrosis -virukset (NPV), ovat kasvatettavissa hyönteissoluviljelmässä ja ne tarjoavat
 30 käyttöön potentiaalisesti käyttökelpoisen kantajasysteemin glykoproteiinin tuottoon. Käyttökelpoisiin NP-viruksiin kuuluvat Bombyx morin NPV (BmNPV; 19) ja Autographa californican NPV (AcNPV; 39). Tässä menetelmässä käyttöön soveltuva edullinen baculovirus on AcNPV. Suorituksen aloittamiseksi eristetään gD2-jakson sisältävä

DNA-fragmentti ja tämä jatkokloonataan baculoviruksen siirtovektoriin. Selektoiduille hyönteissoluille suoritetaan tämän jälkeen rinnakkaistransfektio siirtovektorilla ja AcNPV:lla siten, että baculoviruksen genomiin saadaan 5 liitettyä gD2:ta vastaava geeni, joka korvaa viruksen polyhedriinigeenin sijoittuu polyhedriinipromoottorin ohjauksen ja säätelyn alaisuuteen. Tähän tarkoitukseen on käytettävissä useita siirtovektoreita (näitä on käsitelty esimerkiksi viitteissä 18 ja 23). Edullinen vektori on 10 sellainen, josta saadaan gD2:lla suuria ilmentymistasoja, mutta joka ei tuota polyhedriinin kanssa muodostunutta fuusioproteiinia. Tässä keksinnössä esitetyissä esimerkeissä käytetään tällaista vektoria, pVL941:tä (18). Yleensä arvellaan, että jaksot, jotka sijaitsevat välit- 15 tömästi 5'- suuntaan polyhedriinin aloituskodonista ja mahdollisesti jatkuvat tästä myötäsuuntaan, ovat tärkeitä transkriptiolle. pVL941:ssä oleva gD2-geeni on liitetty polyhedriinigeenin aloituskohdan suhteen myötäsuuntaan ja sen johtojakso on säilynyt ennallaan. Fuusioproteiinin 20 poistamiseksi polyhedriinigeenin aloituskodoni on muutettu kohdemutageneesillä ATT:ksi.

Tässä menetelmässä voidaan isäntäsoluina käyttää useita hyönteissolulinjoja. Käyttökelpoisia tässä menetelmässä ovat esimerkiksi *Mamestra brassicae* -lajin solut 25 (kuten ATCC CRL 8003) tai *Spodoptera frugiperda* -lajin solut (kuten Sf-21-solut, jotka ovat saatavilla Invitrogen-yhtiöstä, San Diego, CA tai Sf-9-solut, ATCC CRL 1711). Edullinen isäntäsolulinja on *Spodoptera frugiperda*. Yhdistelmä-baculovirusplakit tunnistetaan ja poimitaan 30 talteen polyhedriiniokklusiokappaleiden puuttumisen perusteella. Nämä plakit amplifioidaan hyönteissoluissa ja tulokseksi saadut plakit seulotaan baculovirus gD2:n (bgD2) ilmentymisen suhteen. Selektoidut plakit voidaan puhdistaa ja käyttää gD2:n ilmentämiseen myö- 35 hemmin.

Ilmentämiseen käytetty geeni voi olla mikä tahansa HSV:n geeni, jossa on immunogeenisyyteen ja suojaan vaadittavia epitooppeja. HSV-kannasta G peräisin olevan gD2:n jakson ovat julkaisseet Watson (43) ja Lasky, et al. (16). Seuraavissa esimerkeissä gD2-DNA:n lähteenä 5 käytetään HSV2-kantaa 12. Näiden kahden geenin DNA-jaksot eroavat toisistaan vähäisesti, mistä on lopulta tuloksena yhden aminohapon eroavuus muodostuneessa proteiinissa (tätä asiaa on käsitelty esimerkissä 3). Tullaan havaitsemaan, että gD2:n perusjaksossa esiintyvät vähäiset modifikaatiot ovat siedettäviä eikä niillä ole vaikutusta molekyylin immunogeenisyyteen. Menetelmässä käytetty geeni voi tämä vuoksi olla sellainen, joka nukleotiditasolla eroaa tunnetuista jakoista mutta joka geneettisen koodin 10 degeneratiivisuuden vuoksi tuottaa saman aminohappojakson, tai sellainen, joka tuottaa "piilossa pysyviä muutoksia", joissa yksi aminohappo korvautuu kemiallisilta ominaisuuksiltaan vastaavalla aminohapolla tuloksena olevan glykoproteiinin immunogeeniseen aktiivisuuteen 15 vaikuttamatta.

Tästä menetelmästä saadaan glykoproteiini, jonka näennäinen moolimassa on 57 500 daltonia, joka on likimain sama kuin ngD2:n moolimassa. Glykoproteiini otetaan talteen hajotetuista soluista ja puhdistetaan immunoaffiniteettikromatografisesti, jolla saadaan aikaan ainakin noin 90-%:nen puhdistuminen. Proteiinin identtisyys 25 varmistetaan Western-blottauksella käyttäen gD2-spesifisiä monoklonaalisia ja polyklonaalisia vasta-aineita. Aminohappojaksosta päätellyn proteiinin glykosyloitumaton moolimassa on noin 40 000, joka viittaa siihen, että tässä tapahtuu huomattavaa hiilihydraatin post-translationaalista lisäämistä. Baculoviruksella infektoiduissa hyönteissoluissa ilmenettyjen proteiinien glykosylo- 30 lotumisen on osoitettu olevan herkkää tunikamysiinille (13, 14) ja endo-H:lle (45, 15), mikä viittaa siihen,

että näissä soluissa esiintyviin glykosyloitumis-
 tapahtumiin liittyy N-ryhmien välityksellä kiinnittyvän
 runsaan mannoosin käyttö. Kuten jäljempänä esitettävistä
 esimerkeistä käy ilmi, vaikuttaa bgD2:n reagointikyky
 5 ELISA:ssa ja immunoblottauksessa ylittävän natiivien pre-
 paraattien kyvyn sitoa poly- ja monoklonaalisia vasta-
 aineita. Nämä havainnot viittaavat siihen mahdollisuu-
 teen, että baculoviruksessa ilmennetyssä glykoproteiinis-
 10 sa olevien epitooppien on aiempaa helpompi osallistua
 immunologisiin reaktioihin. Baculoviruksessa ilmennettyä
 gD2:ta vastaan suunnatun serologisen reagointikyvyn li-
 sääntyminen voi tarkoittaa sitä, että yhdistelmä-DNA-tek-
 niikalla valmistetun tuotteen tehokkuus on vasta-aineiden
 muodostumiseen johtavalta reagoivuudeltaan natiivia mate-
 15 riaalia parempi.

Puhdistettu glykoproteiini reagoi Western- tai
 täpläblottauksessa monoklonaalisten vasta-aineiden DL6,
 DL11 ja 1D3 kanssa. DL11 sitoutuu viruksesta peräisin
 olevan gD2:n ei-yhtäjaksoiseen neutraloivaan epitooppiin
 20 (29). Johtopäätöksenä on siten se, että yhdistelmä-
 rokotepreparaatti säilyttää tässä kohdassa natiivin kon-
 formaationsa. Natiivin konformaation säilyminen onkin
 liittynyt DL11:n reagoivuuteen ja sen komplementista
 riippumattomaan neutralointikykyyn (27, 46). Reagoivuus
 25 1D3 MAb:n kanssa viittaa siihen, että glykoproteiini ei
 aminopäästään ole lyhentynyt.

Baculoviruksesta peräisin olevan molekyylin saman-
 laisuus natiivin muodon suhteen vahvistettiin serologi-
 sella tutkimuksella. Immunisoiduista hiiristä peräisin
 30 olevan seerumin analyysi osoitti, että ngD1-immuniseerumi
 reagoi voimakkaasti bgD2:n kanssa. Päinvastaisessa ta-
 pauksessa bgD2-immuniseerumit sitovat sekä ngD1:tä että
 bgD2:ta jopa niinkin pienten rokoteannosten kuin 0,1 µg:n
 jälkeen. ELISA-tiitterien on havaittu nousevan bgD2-an-
 35 noksen noustessa. bgD2:lla immunisoitujen hiirien neutra-

loivien vasta-aineiden tiitterit HSV1:tä ja HSV2:ta vastaan nousevat tavallisesti annoksesta riippuvalla tavalla ja niissä on osoittautunut olevan kohonneita tiittereitä homotyyppistä virusta vastaan, vaikkakin heterotyyppiä vastaan suunnattujen tiitterien geometriset keskiarvot olivat huomattavan suuria annoksilla, jotka olivat yli 0,1 μ g bgD2:ta. Samanlaisia korkeampia tiittereitä esiintyy HSV2:ta vastaan ngD2:lla immunisoiduista hiiristä peräisin olevien seerumien kyseessä ollessa, mikä viittaa siihen, että tämä ei ole yhdistelmä-glykoproteiinilla suoritettuun immunisointiin liittyvä ainoalaatuinen ilmiö. Baculoviruksessa ilmennetty gD2 aiheuttaa HSV2:ta vastaan suunnattujen neutraloivien vasta-aineiden pitoisuuksien kohoamisen sekä ngD1:een että ngD2:een verrattuna. Myös ngD1:llä immunisoiduista hiiristä peräisin olevissa seerumeissa esiintyy kohonneita tiittereitä HSV2:ta vastaan vastaaviin HSV1-tiittereihin verrattuna. ngD1:n osalta havaittu ero on kuitenkin vaatimatonta luokkaa.

Verrattaessa bgD2-immunisointia ngD1- ja ngD2-rokotteella tehtyyn immunisointiin kokovirus- ja alayksikköantigeenejä vastaan suunnattujen ja in vitro -olosuhteissa määritettyjen lymfoproliferatiivisten vasteiden osalta on bgD2:n aikaansaamille soluvälitteisille vasteille ominaista olennaisesti tyyppispesifinen vaste kokovirusantigeenia vastaan ja bgD2-annoksen ja lymfoproliferatiivisen aktiivisuuden välinen käänteinen korrelaatio. Havaitut yhteydet rokotekonsentraation, lisääntyneen vasta-aineiden muodostumiseen johtavan reagointikyvyn ja vähentyneen lymfoproliferatiivisen aktiivisuuden välillä viittaavat siihen mahdollisuuteen, että auttaja-T-solujen alaryhmistä tapahtuisi selektiota gD-annoksen suhteen (26).

bgD2:lla suoritetusta immunisoinnista in vivo -olosuhteissa seuraa huomattavaa luokkaa olevan suojan kehittyminen polkuanturaan infektointitarkoituksissa an-

nettua tappavaa HSV2-annosta vastaan. Korkeanasteista suojaa esiintyy kaikilla annetuilla glykoproteiini-annoksilla. Suojalle HSV2:ta vastaan on ominaista sel-
 laisten oireiden vakavuuden väheneminen, joihin kuuluvat
 5 halvaantuminen ja kuolema, ja merkittävä nousu niiden
 hiirten frekvenssissä, joissa ei esiinny lainkaan infek-
 tion oireita. Vaikkakaan tässä tutkimuksessa ei määritet-
 ty piilevän HSV2-infektion frekvenssiä henkiinjääneissä
 hiirissä, olemme aiemmin osoittaneet, että hiirten immu-
 10 nisointi ngD1:lla antaa suojan sekä piilevää että primää-
 ristä HSV2-infektiota vastaan (25).

Edellä esitetyt tiedot osoittavat selvästi baculo-
 viruksessa ilmennetyn gD2:n käyttökelpoisuuden rokote-
 koostumuksessa. Olennaisesti puhtaassa (toisin sanoen
 15 ainakin noin 90-%:sesti puhtaassa) muodossa olevaa glyko-
 proteiinia tai sen immunogeenista osaa voidaan käyttää
 HSV1- ja HSV2-infektioiden ehkäisemiseen ja hoitoon.

Yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotettu glykoproteiini
 eristetään isäntäsoluista käyttäen tavanomaisia proteii-
 20 nien eristämismenetelmiä. Puhdistettu glykoproteiini yh-
 distetään tämän jälkeen mihin tahansa tavanomaisesti käy-
 tettyyn farmaseuttiseen tai farmaseuttisesti hyväksyttä-
 vään kantaja-aineeseen, kuten veteen, fysiologiseen
 suolaliuokseen, etanoliin, polyoleihin, kuten glyseroliin
 25 tai propyleeniglykoliin, tai kasviöljyihin, sekä mihin
 tahansa sopivaan rokotteissa käytettävään lisäaineeseen,
 kuten $AlPO_4$:ään ja/tai 3-dioksimonofosfonyyli-lipidi-
 A:han (3D-MPL; RIBI). Tässä keksinnössä termi "farma-
 seuttisesti hyväksyttävät kantaja-aineet" kattaa mitkä
 30 tahansa ja kaikki liuottimet, dispergointimediumit, pääl-
 lysteet, antifungaaliset aineet, isotoniset ja absorpti-
 ota viivästävät aineet ja muut näitä vastaavat aineet.
 Sitä tapausta lukuunottamatta, että jokin tavanomainen
 medium olisi yhteensopimaton aktiivisen ainesosan kanssa,
 35 voidaan tällaista ainetta ajatella käytettäväksi tässä

rokotekostumuksessa.

Sen lisäksi, että bgD2:ta käytetään yksinomaisena immunogeenisenä aineena, sitä voidaan käyttää myös muihin aktiivisiin aineisiin yhdistettynä. HSV-rokote voi esimerkiksi käsittää lisäksi muita HSV-glykoproteiineja, kuten gB1:n ja/tai gB2:n, tai siihen voidaan liittää muita infektiotauteja, kuten hepatiittia tai influenssaa, vastaan suunnattuja immunogeenisiä aineita.

Rokotekoostumukset formuloidaan käyttäen sellaista määrää bgD2:ta, että tämä on tehokas antamaan suojaa myöhemmin tapahtuvaa HSV-infektiota vastaan. Rokotekoostumusten formulointimenetelmät ovat tällä alalla tunnettuja, mikä käy ilmi esimerkiksi julkaisusta Duffy (6) tai Williams et al. (47). Käytetty glykoproteiininimäärä vaihtelee riippuen siitä, käytetäänkö adjuvanttia vai ei. Tavallisesti rokotteen yksikköannos sisältää 1 - 100 µg glykoproteiinia. Annostelu tapahtuu edullisesti parenteraalisesti, toisin sanoen ihonalaisesti, suonensisäisesti, lihaksensisäisesti tai intraperitoneaalisesti, mutta rokote voidaan vaihtoehtoisesti antaa suun kautta.

Ensimmäisen rokotuksen jälkeen annetaan edullisesti yksi tai useampi tehosterokotus.

Tässä keksinnössä käytettyjä mikro-organismeja säilytetään American Cyanamid Company -yhtiön Lederle-laboratorioiden, Pearl River, New York, kantanäytteessä. Plasmidi p941gD2C on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 9.8.1991, hakunumerolle ATCC68664.

Seuraavat tätä keksintöä rajoittamattomat esimerkit kuvaavat sitä tarkemmin.

Esimerkit

I. gD2:n ilmentäminen baculoviruksessa

A. Solut ja virus. Villityyppinen Autographa californican nuclear polyhedrosis -virus (AcNPV; E2-kanta,

ATCC VR 1344) ja baculoviruksen siirtovektori pVL941 saatiin Dr. Max Summersilta, (Texas A&M, College Station, TX). *Spodoptera frugiperda* (Sf9) -solut hankittiin talletuslaitoksesta American Type Culture Collection (ATCC CRL 1711; Rockville, MD). Villityyppistä ja yhdistelmä-baculovirusta kasvatetaan Sf9:n yksisolukerros- tai suspensioviljelmissä IPL41-mediumissa (JRH Biosciences, Lenexa, KS), joka sisältää raudalla täydennettyä 2-%:sta vasikanseerumia (Hyclone, Logan, UT), 0,1-%:sta Pluronic F68:aa, ja muita lisättyjä lipidejä (17). Herpes simplex -virus tyyppi 2 (kanta 12; HSV-12) ja HSV1-NS saatiin Dr. H. Friedmanilta, Children's Hospital, Philadelphia PA) ja ne puhdistettiin 3 kertaa plakkieristyksellä ja kasvatettiin Vero-soluviljelmissä. HSV2-186-kanta puhdistettiin samaa menettelyä noudattaen plakkipuhdistuksella ja Vero-soluissa suoritettulla kasvatuksella eläintutkimuksissa käytettäväksi.

B. Siirtovektorien konstruktio.

Yhdistelmä-baculovirus D2AC-11 ilmentää *S. frugiperda* -soluissa (Sf9) HSV2:n (kanta 12) glykoproteiini D:tä. D2Ac11 muodostetaan korvaamalla *Autographa californica* nuclear polyhedrosis -viruksen polyhedriinigeeni gD2-geenillä siten, että se joutuu polyhedriini-promoottorin ohjaamaksi ja tämän säätelyn alaiseksi. HSV2-DNA eristetään 2 litrasta HSV2:lla infektoitujen solujen lymfaattia käsittelemällä lymfaatti DEAE-Sepharose-pylväässä. DNA eluoidaan pylväältä 0,5 M NaCl:llä ja käsitellään seoksella, jossa on 40 µg/ml RNAasi A:ta, 100 µg/ml proteinaasi K:ta ja 0,4 % SDS:ää, jonka jälkeen suoritetaan useita uuttoja fenoli/kloroformi/isoamyylialkoholi-seoksella (25 : 24 : 1). DNA puhdistetaan tämän jälkeen CsCl-gradientissa tiheydessä 1,3 g/ml. Puhdistettu DNA pilkotaan Eco RI:lla ja se käsitellään HSV2-glykoproteiini D:n (gD2:n) havaitsemiseen tarkoitettulla koet-
timella käyttäen HSV1:stä peräisin olevan glyko-

proteiini-D:n (gD1) RNA-transkriptiotuotetta. Käytetään plasmidia pRE26 (saatu Dr. G.H. Cohenilta ja Dr. R.J. Eisenbergiltä, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA), joka sisältää HSV1:n gD (gD1) -geenin, joka on SP6-promoottorin ohjaama. SP6-polymeraasia käyttäen valmistetaan ³²P-CTP (410 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL) -leimalla varustettu RNA-transkriptiotuote. gD2-geeni sijaitsee Eco RI -fragmentissa, mikä on voitu osoittaa southern-blottaushybridisaation avulla. 5 ke:n suuruinen Eco RI -fragmentti (kuva 1A) puhdistetaan agarosegeelissä ja liitetään pBR322:n ainoaan Eco RI -kohtaan käyttäen teoksen Maniatis et al. (21) mukaisia menetelmiä plasmidin p322gD2 muodostamiseksi. Tämä konstruktio pilkotaan samanaikaisesti Spe I:lla ja Xho I:lla liitosjakson lyhentämiseksi sen mittaiseksi, että se päättyy 30 emästä vastasuuntaan gD2:n ATG-aloituskohdasta. Tuloksena oleva 2 ke:n suuruinen gD2:n sisältävä fragmentti puhdistetaan agarosegeelissä ja jatkokloonataan siirtovektorin pVL941 (17) ainoaan Bam HI -kohtaan käyttäen tasoittamattomiin päihin suoritettua ligaatiota. Tulokseksi saadun plasmidin p941gD2C (kuva 1B) orientaatio varmistetaan restriktiokartoituksella, Southern-blottaushybridisoinnilla ja DNA:n sekvenssoinnilla dideoksimenetelmällä käyttäen Sequenasea, joka on T7-DNA-polymeraasi (US Biochemical, Cleveland, OH).

C. Yhdistelmä-baculoviruksen muodostaminen

Sf9-soluille suoritetaan rinnakkaistransfektio 2,0 µg:lla AcNPV-DNAa:ta ja 4,0 µg p941gD2C-DNA:ta julkaisussa Summers ja Smith (38) esitetyn menetelmän mukaisella menetelmällä. Yhdistelmä-baculovirusplakit tunnistetaan mikroskooppisesti polyhedriiniokklusiokappaleiden puuttumisesta. Okklusiokappalenegatiiviset plakit poimitaan talteen ja amplifioidaan Sf9-soluissa, jotka on siirrostettu 24-kuoppaisiin levyihin. Tulokseksi saadut plakit seulotaan tämän jälkeen baculoviruksen gD2:n

(bgD2) ilmentymisen suhteen solulysaattien SDS-PAGE:lla ja western- tai täpläblottauksella käyttäen gD-spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta. Valitaan parentaaliplakki (plakki # 11) ja se puhdistetaan kolmasti plakki-
 5 eristyksellä. Tätä yhdistelmä-baculovirusta, jolle on annettu nimitys D2Ac-11, käytetään glykoproteiinin ilmentämisen jatkotutkimuksiin.

D. Sf9-lysaatin valmistus ja talteenotto

Sf9-soluja kasvatetaan perfusoiduissa suspensio-
 10 viljelmissä bioreaktoreissa (New Brunswick Scientific, Edison NJ) ja infektoidaan solutiheyteen $2 \times 10^6 - 8 \times 10^6$ solua/ml yhdistelmä-baculoviruksella käyttäen infektion multiplisiteettinä arvoa 0,1. Viljelmät otetaan talteen 44 h infektoinnin jälkeen (pi) säätämällä baculo-
 15 viruksella infektoidun Sf9-solususpension pH arvoon 7,4, käyttäen joko 0,1 N NaOH:ta tai 1,0 M EDTA:ta ennen kuin solut hajotetaan lisäämällä CHAPS-detergenttiä, jonka lopullinen konsentraatio on 60 mM.

E. Natiivin ja baculoviruksen ilmentämän proteiinin puhdistus
 20

Natiivi gD1 ja gD2 puhdistetaan HSV:llä infektoitujen Vero-solujen detergenttiuutteista aiemmin kuvatulla tavalla (25). Baculoviruksen ilmentämä gD2-glykoproteiini otetaan talteen analogisella tavalla yhdistelmä-baculo-
 25 viruksella infektoiduista Sf9-hyönteissoluista. Lyhyesti mainittuna, infektoidun Sf9-viljelmän pH säädetään neutraalille alueelle 0,1 N NaOH:lla tai 1,0 M EDTA:lla ja solujen hajotus suoritetaan lisäämällä CHAPS:ia (15 - 60 mM, solutiheydestä riippuva lopullinen konsentraatio)
 30 ja/tai muita solubilisointiaineita. Detergentillä solubilisoitu glykoproteiini selkeytetään tangentiaalivirtausultrasuodatuksella käyttäen 0,1 μ m:n suodattimia käyttäen (Sarticon Inc., East Granby, CT) tai vastaavalla menetelmällä, jonka jälkeen suoritetaan ioninvaihto-
 35 kromatografinen erottaminen käyttäen DEAE Fast

Flow -hartsia (Pharmacia, Piscataway, NJ). Ioninvaihtopylvään läpi tulleet fraktiot konsentroidaan tangentialivirtausultrasuodatuksella käyttäen 20 000 moolimassan kohdalta rajaavia suodattimia (Sarticon) ja erotetaan tämän jälkeen fraktioiksi immunoaffiniteettikromatorgragfiolla käyttäen kiinteänä faasina monoklonaalista DL6-vasta-ainetta (12, 7; saatu Dr. G.H. Cohenilta ja Dr. R.J. Eisenbergiltä), joka on kytketty aktivoituun CH-Sepharoseen (Pharmacia) valmistajan antamia ohjeita noudattaen. Puhdistettu glykoproteiini eluoidaan immunoaffiniteettimatriisista käyttäen puskuroitua NaSCN:ää (seoksen koostumus on 50 mM Tris, pH 7,4, 0,5 M NaCl, 1,5 M NaSCN ja 0,1 % NP40), dialysoidaan PBS:ää vastaan ja formuloidaan tämän jälkeen rokotteeksi. Natiivi gD1 käsitellään pelkästään formaliinilla (1 : 4000, 40 h, 37 °C). Adjuvanttina käytetään aluminiumfosfaattia (AlPO₄) määrän ollessa 500 µg/annos. Glykoproteiiniannoksen konsentraatio varmistetaan suoraan käyttäen pyroluminesenssiin perustuvaa typpianalyysia (Antek Inc., Houston, TX) ja epäsuorasti täpläblottausanalyysillä.

F. SDS-PAGE- ja Western-blottausanalyysit.

Natiivista gD1:stä, gD2:sta, ja baculoviruksen ilmentämästä gD2:sta suoritetaan SDS-PAGE ja tehdään siirto sähkövirran avulla olennaisesti Symingtonin (39) kuvaamia menetelmiä käyttäen. Nitroselluloosablottleja inkuboidaan asiaankuuluvan vasta-aineen kanssa ja anti-geeni/vasta-ainekompleksi visualisoidaan peroksidaasileimalla varusteulla proteiini-A:lla ja 4-kloorinaftolilla (Sigma Chemical Co., St. Louis MO). Käytettyihin vasta-aineisiin kuuluvat yleistyyppinen kaniinin polyklonaalinen anti-gD, monoklonaalinen vasta-aine (McAb) DL6, joka tunnistaa yhtäjaksoisen gD-epitoopin, joka sisältää aminohapot 272 - 279 (12, 7) ja monoklonaalinen vasta-aine 1D3, joka tunnistaa gD:n terminaalista päätä lähellä sijaitsevan ja aminohappojen 1 - 23

alueelle sijoittuvan lineaarisen epitoopin (28). Nitro-selluloosa-elektroblotit käsitellään vaihtoehtoisesti Aurodyellä (Amersham) kokonaisproteiinin visualisoimiseksi.

5 G. bgD2:n identtisyys ja puhtaus.

Puhdistetun yhdistelmä-proteiinin identiteetti varmistetaan Western-blottausanalyysillä käyttäen gD-spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita DL6 ja 1D3 (spesifisiä N-terminaalisiselle osalle), sekä polyklonaalista
10 anti-gD-seerumia. Kuvassa 2A on esitetty näiden kolmen tässä tutkimuksessa käytetyn proteiinin vertaileva SDS-PAGE:n Western-immunoblottaus. Natiivi gD1 muodostaa puhdistuksen jälkeen dimeerin, jota ei havaita natiivissa eikä yhdistelmä-gD2:ssa. Yhdistelmä-gD2:n moolimassa on
15 suurin piirtein sama kuin natiivin gD2:n moolimassa.

bgD2:n puhtaus varmistetaan SDS-PAGE-geelin elektroblottauksella ja tämän jälkeen suoritettavalla hopeavärjäyksellä. Yhdistelmä-gD2 kulkeutuu yhtenä proteiinikomponenttina, jonka näennäinen moolimassa on
20 57 500. Niiden komponenttien suora vastaavuus, jotka on visualisoitu vasta-ainekoettimilla ja havaittu proteiini-värjäyksellä, on yhdenmukaista sen suhteen, että glyko-proteiinin puhtaus ylittää 90 %.

II. Rokotteen antaminen ja bgD2:n immunologinen
25 reagoivuus

A. Hiiret.

Naaraspuoliset BALB/c VAF Plus (virusvasta-ainevapaat) hiiret saatiin Charles River -yhtiöstä (Wilmington, MA) käytettäväksi immunogeenisuus- ja
30 suojaustutkimuksiin ja niitä pidettiin steriloiduissa mikroisolaattoreissa.

B. gD:n formulointi ja hiirien immunisointi in vivo -tutkimuksia varten.

Natiivin gD1:n, gD2:n ja bgD2:n fraktioita, joiden
35 konsentraatiot ovat alueella 20 - 140 µg/ml, sekoitetaan

AlPO_4 :ään (2 mg/ml) ja pidetään 4 °C:ssa yön yli. Glyko-
 proteiinin konsentraatio määritetään tämän jälkeen joko
 määrittämällä kokonaistyyppipitoisuus tai suorittamalla
 täpläblottausanalyysi. Täpläblottausanalyysiin tarkoitete-
 5 tut näytteet valmistetaan kaksinkertaisina laimennoksina
 96-kuoppaisissa levyissä käyttäen laimentamiseen fosfaa-
 tilla puskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS). Stan-
 dardina käytetään rutiininomaisesti puhdistettua ja liu-
 koista glykoproteiinia. Näytteiden laimennokset pipetoi-
 10 daan täpläblottauskehikkoon (BRL, Gaithersburg, MD) ja
 absorboidaan tyhjiön avulla nitroselluloosamembraaniin.
 Kukin näyte pestään 3 x 200 μg :lla PBS:ää ja suodatin
 kuivataan ilmassa, jonka jälkeen tämä blokataan 45 minuut-
 tin ajan 3-%:sessa naudan seerumialbumiini/Tris-puskuroi-
 15 tu fysiologinen suolaliuos-seoksessa (BSA/TBS). Blotteja
 inkuboidaan tämän jälkeen 1 tunnin ajan valitun vasta-
 aineen kanssa, joka on laimennettu 1-%:sella BSA/TBS/0,05
 % Tween 20 -seoksella (TTBS). Western-blottausanalyysiin
 käytettyjen vasta-aineiden lisäksi käytetään monoklonaa-
 20 lista D111-vasta-ainetta (tämä saatiin Dr. R.S. Cohenilta
 ja Dr. R.J. Eisenbergilta), joka on ei-yhtäjaksoista epi-
 tooppia vastaan suunnattu McAb (27, 29). Tämän jälkeen
 vasta-aine poistetaan pesemällä ja suodatinta inkuboidaan
 1-%:seen BSA/TTBS-seokseen valmistetun peroksidaasi-
 25 leimalla varustetun proteiini-A:n kanssa 1 tunnin ajan.
 Suodatin pestään tämän jälkeen perusteellisesti ja inku-
 boidaan metanoliin valmistetun 4-kloorinaftoli/ H_2O_2 -subst-
 raatin kanssa. Formuloidut glykoproteiininäytteet analy-
 soidaan samalla tavoin lukuunottamatta sitä, että AlPO_4
 30 poistetaan ensin suodattimelta in situ 1 N HCl:lla
 37 °C:ssa 5 minuutin ajan.
 Glykoproteiini/ AlPO_4 /PBS-kantaliuos laimennetaan tämän
 jälkeen valittuihin annoskonsentraatioihin. Käsittely-
 ryhmät (N = 16) ovat seuraavat: AlPO_4 , 0,1 μg bgD2:ta,
 35 1,0 μg bgD2:ta, 5,0 μg bgD2:ta, 10 μg bgD2:ta, 5,0 μg

ngD2:ta ja 5,0 μ g ngD1:tä; rokottamattomien ryhmän N = 6. Lopulliset glykoproteiinkonsentraatiot varmistetaan täpläblottausanalyysillä. Ennen immunisointia käsitellään formuloidut glykoproteiinit koettimilla täpläblottausta
 5 käyttäen neutraloivan DL11-epitoopin esiintymisen osoittamiseksi. Kaikki nämä kolme glykoproteiinia sisältävät tämän epitoopin.

Kuuden viikon ikäiset hiiret immunisoidaan baculoviruksen ilmentämällä gD2:lla, joka on esiabsorboitu
 10 500 μ g:aan AlPO_4 :ää. Käytetyt annokset ovat 0,1 μ g, 1,0 μ g, 5,0 μ g ja 10,0 μ g. Kontrollit koostuivat hiiristä, jotka oli immunisoitu 5,0 μ g:lla ngD1:tä tai ngD2:ta, tai eläimistä, joille oli suoritettu valeimmunisointi pelkällä AlPO_4 :llä. Kaikille aläimille suoritettiin kaksi
 15 ihonalaista immunisointia lavan alueelle 3 viikon välein.

C. In vitro -määritykset

Kaksi viikkoa toisen immunisoinnin jälkeen poistetaan veri viidestä kunkin anosteluryhmän hiirestä nukutuksessa ja niistä poistetaan pernat rokotteeseen kohdistuvan immunologisen reagoivuuden tutkimiseksi humoraalisesta ja soluvälitteisestä vasteesta.
 20

(i) Viruksesta peräisin olevan ja baculoviruksen ilmentämän gD2:n in vivo -olosuhteissa esiintyvän vastavuuden varmistamiseksi suoritetaan ELISA-vasteiden
 25 arviointi. 96-kuoppaisia levyjä (Corning, Corning, NY), päällystetään yön yli 100 μ l:aan 0,01 M BSA:ta valmistetuilla ngD1:lla tai bgD2:lla, joiden konsentraatio on 20 ng/kuoppa. Levyt pestään ja niitä inkuboidaan 3 tuntia huoneenlämmössä 3-%:sella BSA:lla. BSA-käsittelyn jälkeen
 30 kokeessa käytetyt seerumit laimennetaan levyjen poikki kaksinkertaisia laimennoksia käyttäen liuoksessa, joka koostui TBS + 0,1-%:nen Tween 20 -seoksesta ja levyt käsitellään niiden blokkaukseksi 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. Levyt pestään 3 x PBS:llä ja inkuboidaan tämän jälkeen
 35 100 μ l:n kanssa suhteessa 1 : 500 laimennettua ja pipar-

juuriperoksidaasilla konjugoitua vuohen hiirtä vastaan valmistetun IgG:n f/(ab₂):ta (Cappel, Organon Teknika, Durham, NC), joka on valmistettu TBS:ään. Levyt kehitetään käyttäen ABTS-substraattia (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) ja kvantitoidaan 405 nm:n kohdalta käyttäen Biotek-ELISA-levyjen lukulaitetta (Winooski, VT).

Vasta-ainevasteet, jotka määritetään ELISA:lla käyttäen in vitro -antigeenina bgD2:ta, viittaavat siihen, että kaikilla immunisoiduilla hiirillä esiintyy merkittävä reagoivuus rokotetta vastaan (95-%:nen luotettavuusväli) ja että kaikissa rokotekäsittelyissä esiintyy huomattavaa nousua AlPO₄-kontrollieläimiin verrattuna (P<0,001 ANOVA:lla määritettynä). bgD2:lla immunisoiduissa hiirissä on osoitettavissa yleensä annoksesta riippuvia ELISA-tiittereitä aktiivisuuden minimi- ja maksimiarvojen vastatessa glykoproteiinitasoja 0,1 µg - 10,0 µg. Suhteen 1 : 160 ylittävissä seerumilaimennoksissa ovat tutkittavien 0,1 µg bgD2 - seerumien vasteet ngD1-antigeenin osalta merkittävästi (P<0,05 ANOVA:lla määritettynä) pienempiä kuin kaikilla muilla immunisoiduilla ryhmillä.

ELISA-vasteet ngD1-antigeenia vastaan ovat pienempiä kuin vastaavat vasteet, jotka havaitaan bgD2:n ollessa kyseessä. Tämä heijastaa todennäköisimmin pikemminkin yhdistelmä-antigeenin suurempaa sitoutumistehokkuutta natiiviin glykoproteiiniin verrattuna kuin merkittäviä eroja vasta-aineiden muodostumiseen johtavassa reagoivuudessa. ELISA-vasteet heijastavat kuitenkin DL6-täpläblottausvasteita (tuloksia ei ole esitetty), joissa McAb-reagoivuus baculoviruksessa ilmennetyn glykoproteiinin osalta on suurempi kuin natiivin gD1:n reagoivuus. Anti-ngD1:n ELISA-aktiivisuus bgD2:lla immunisoitujen hiirten osalta lisääntyi annoksesta riippuvalla tavalla. ngD1-antigeenia vastaan muodostuneen aktiivisuuden huippu

liittyy ngD1-immunisointiin, On vaikeaa verrata suoraan natiivin glykoproteiinin vsteita baculoviruksessa ilmen-

netyn gD2-hiirien vastaaviin vasteisiin, koska natiivi glykoproteiini voi sisältää pieniä määriä HSV:n protei-

5 neja, kuten gB:tä, joka voi myötävaikuttaa mitattuun ELISA-vasteeseen. Tässä yhteydessä kuitenkin 5,0 μ g ngD2, joka myös sisältää mahdollisesti pieniä määriä kontami-

noivia aineita, aiheuttaa suhteellisen pienen ELISA-vas-

teen ngD1:tä vastaan, joka on verrattavissa 0,1 μ g - 1,0

10 μ g:n bgD2-tasoihin.

(ii) Määritykset neutraloivien vasta-aineiden ha-

vaitsemiseksi

Neutralisaatiomääritykset suoritetaan aiemmin ku-

vatulla tavalla (21). Lyhyesti mainittuna, seerumit

15 lämpöinaktivoidaan 56 °C:ssa 30 minuuttia ennen määritys-

tä. Rinnakkaisia ja kaksinkertaisia sarjalaimennoksia sekoitettiin 100 pfu:hun HSV1-NS:ää tai HSV2-186:tta, jotka oli valmistettu MEM:ään, joka sisälsi 5 % FCS:ää ja 10-%:sta marsun komplementtia (Gibco, Grand Island, NY).

20 Virus-seerumiseoksia inkuboidaan 1 tunnin ajan 37 °C:ssa ja ne siirrostetaan tämän jälkeen 96-kuoppaisissa levyis-

sä kasvatettujen Vero-solujen 1-solukerrokseen. Viruksen absorption annetaan tapahtua 1 tunnin ajan (37 °C) ja seoksen päälle pipetoidaan 1-%:sta metyyliiselluloosaa.

25 Virus-, medium- ja komplementtikontrollit sisältyvät kuhunkin määritykseen. Levyjä inkuboidaan kunnes virus-

kontrollikuopissa havaitaan >50 plakkia. Levyt kiinnite-

tään tämän jälkeen 10-%:ssa formaliinissa ja plakkien määrä lasketaan. Tiitterit määritetään sen seerumi-

30 laimennuksen käänteislukuna, josta saatavan plakkien lukumäärän keskiarvo on alle 50 % siitä, mitä havaitaan viruskontrollissa.

Tulokset on esitetty taulukossa 1. Lukuunottamatta yhtä 0,1 μ g bgD2:lla neutralisoitua eläintä, voitiin kai-

35 killa immunisoiduilla hiirillä osoittamaan HSV1:tä vas-

taan muodostuneiden neutraloivien vasta-aineiden tiitteriksi 20 tai tätä suurempi arvo. HSV1:tä vastaan suunnattujen tiitterien geometrisista keskiarvoista lasketut keskiarvot (GMT1) nousevat tavallisesti annoksesta riippuvalla tavalla bgD2-hiirien osalta minimi- ja maksimi-arvojen vastatessa tasoja 0,1 μg ja 10,0 μg . Hiirissä, jotka on käsitelty 5,0 μg :lla bgD2:ta, on osoitettavissa jonkin verran alempi GMT1 (toisin sanoen 183,9) kuin mitä annosvasteen perusteella voidaan ennustaa. Tämä kuvastuu yhdestä eläimestä havaittuna suhteellisen pienenä, suuruudeltaan 40 olevana tiitterinä. Huomionarvoisia ovat bgD2-hiirten kohonneet GMT1-arvot verrattuna ngD2:ta saaneisiin eläimiin. bgD2:n annoksilla, jotka ovat alueella 1,0 - 10,0 μg , esiintyykin 2,5 - 6,0 -kertaisia GMT1-arvoja ngD2:lla suoritettuun immunisointiin verrattuna. Vastaavansuuruisia GMT1-arvoja on saatu niiden eläinten osalta, jotka ovat saaneet joko 10,0 μg bgD2:ta tai 5,0 μg ngD1:tä, mikä osoittaa yhdistelmä-preparaatin osalta hyvää ristireagoivan neutraloivan vasta-aineen aktiivisuustsoa.

GMT2-arvot ovat kohonneita kaikissa rokote-käsittelyn saaneissa ryhmissä HSV1:tä neutraloivien tiitterien suhteen. Tämä käy erityisen hyvin ilmi sen ryhmän osalta, joka oli saanut 0,1 μg bgD2:ta, jossa kohoaminen oli 24-kertaista. ngD1-tiitterit ovat olennaisesti identtisiä HSV1:n ja HSV2:n osalta suhteen GMT1/GMT2 ollessa 1,5. Suurin GMT2-arvo liittyy ryhmään, jolle oli annettu 5,0 μg bgD2:ta ja tämä on luettavissa osaksi yhden eläimen ansioksi, jolla esiintynyt tiitteri oli 10 240. Merkilläpantavaa 5,0 μg :n tasoisen bgD2:n ja 5,0 μg :n tasoisen ngD2:n osalta on sellainen suhteen GMT2/GMT1 avulla ilmaistu suhteellinen ristireaktiovaste, missä yhdistelmä-rokotteeksi ehdolla olevasta preparaatista saaduista suuremmista tiittereistä huolimatta on molempien ryhmien osalta laskettu suhteet 13,9.

Taulukko 1

bgD2-immunisoinnin vaikutus seerumin HSV:tä vastaan suunnattuihin neutraloiviin vasta-ainetiittereihin

	Käsittely	Annos	GMT-HSV1 ^a	GMT-HSV2	GMT2/GMT1
		(1 g)			
5	AlPO ₄		<20	<20	
	bgD2	0,1	23,0	557,6	24,2
	bgD2	1,0	278,8	1115,1	4,0
	bgD2	5,0	183,9	2561,9	13,9
10	bgD2	10,0.	422,6	1254,6	3,0
	ngD2	5,0	69,7	970,8	13,9
	ngD1	5,0	422,6	640,5	1,5

^a Huomautus: HSV1:tä ja HSV2:tä vastaan muodostuneiden neutraloivien vasta-ainevasteiden tiittereiden geometriset keskiarvot (GMT1 ja GMT2) saatiin yksittäisistä hiiristä käyttäen edellä kuvattua plakkimäärän vähentymiseen perustuvaa mikroneutralisaatiomääritystä.

(iii) Lymfoproliferatiiviset määritykset

Immunisoiduista tai AlPO₄:llä injektoiduista hiiristä peräisin olevia pernasoluja maljattiin solutiheydellä 2×10^5 solua/kuoppa 96-kuoppaisiin tasapohjaisiin kuoppalevyihin käyttäen Vero-mediumia ($2,5 \times 10^6$ pfu-ekvivalenttia/kuoppa), ngD1:tä (10 ng/kuoppa), bgD2:ta (20 ng/kuoppa) tai gD1-peptidiä, joka sisältää aminohapporyhmät 241 - 260 (nämä eroavat gD2:sta kahden ryhmän, ryhmien 39 ja 40 kohdalla). Lymfoproliferatiivisissa määrityksissä käytetty medium koostuu RPMI:stä (Cellgro, Mediatech, Washington, DC), joka sisältää 10-%:sta fetaalista vasikanseerumia, (Hyclone, Logan, UT) glutamiinia, HEPES:ää, NEAA:ta, pyruvaattia, β -merkaptotoetanolia ja penisilliini/streptomysiini-seosta. Kun soluja on inkuboitu 5 päivää, niille annetaan 1 μ Ci:n suuruinen pulssi [³H]-tymidiiniä (Amersham, Arlington Heights, IL) 6 tunnin ajan ja ne kootaan tämän jälkeen talteen tuikelaskentaa varten. Stimulatiokertoimet laske-

taan jakamalla kokeessa saadut CPM-arvot medium-kontrollien CPM-arvoilla.

Tulokset on esitetty taulukossa 2. Kokovirusanti-geenejä vastaan muodostuneet proliferatiiviset vasteet in vitro -olosuhteissa ovat olennaisesti tyyppispesifisiä maksimaalisen T-solujen aktivaation suhteen. ngD1:llä immunisoiduilla hiirillä on merkittävästi suuremmat vasteet HSV1-stimulukseen ($P > 0,01$) kuin kaikissa muissa ryhmissä. bgD2:lla immunisoitujen hiirten vasteille HSV2:ta ja muita stimuluksia vastaan on ominaista käänteinen annos-vaste-suhde, jossa aktiivisuuden huippu esiintyy $0,1 \mu\text{g:n}$ rokotetason kohdalla. ngD1-immuunit eläimet reagoivat in vitro -olosuhteissa suoritettuun ngD1-infektioon siten, että niillä esiintyy kaikkiin muihin ryhmiin verrattuna merkittävästi kohonnutta ^3H tymidiinin kerääntymistä soluihin ($P < 0,04$ ANOVA:lla määritettynä). Kuten ELISA-vasteiden osalta huomautettiin, ngD1-immuunit pernasolut voivat heijastaa muiden sellaisten HSV:n proteiinien esiintymistä, jotka kykenevät aikaansaamaan T-solujen blastogeneesiä. Kuten humoraalisten reaktioiden suhteen oli asianlaita, ei ngD2-immunisaatiota kuitenkaan seuraa mitään vasteen näennäistä kohoamista. Viljelmissä, jotka on stimuloitu D1-peptideillä ah:t 241 - 261, havaitaan suuremman asteista ristireagoivuutta bgD2:n ja ngD1:n välillä. Tämä gD1-peptidi eroaa julkaistusta gD2:n jaksosta kahden ryhmän kohdalla (# 246 A » P, # 257, E » D) ja se sisältää immunodominandin T_h -epitoopin (10).

Taulukko 2

gD:llä immunisoitujen ja kontrollihiirten lymfo-

proliferatiivisiä vasteita HSV-antigeenia vastaan

In vitro -stimulus (SI $\pm$ SE)

	Rokote	Annos ^b	HSV1	HSV2	ngD1	bgD2	ah:t 241-261
5	AlPO ₄	--	2,73 $\pm$ 0,60	1,26 $\pm$ 0,42	1,25 $\pm$ 0,21	0,98 $\pm$ 0,22	1,31 $\pm$ 0,26
	bgD2	0,1	3,54 $\pm$ 1,00	7,27 $\pm$ 2,83	9,08 $\pm$ 2,93	13,97 $\pm$ 5,26	10,61 $\pm$ 4,25
	bgD2	1,0	2,71 $\pm$ 0,68	4,78 $\pm$ 1,64	7,21 $\pm$ 2,54	11,46 $\pm$ 3,36	9,69 $\pm$ 2,49
	bgD2	5,0	2,40 $\pm$ 0,57	2,44 $\pm$ 0,75	5,35 $\pm$ 1,62	8,16 $\pm$ 1,37	6,09 $\pm$ 0,94
	bgD2	10,0	2,60 $\pm$ 1,01	3,56 $\pm$ 1,09	5,77 $\pm$ 2,24	10,66 $\pm$ 4,51	7,54 $\pm$ 3,13
10	ngD2	5,0	2,36 $\pm$ 0,46	3,07 $\pm$ 0,59	3,98 $\pm$ 1,05	7,61 $\pm$ 1,77	4,03 $\pm$ 0,87
	bgD1	5,0	9,02 $\pm$ 2,43	3,63 $\pm$ 1,04	18,53 $\pm$ 7,35	10,31 $\pm$ 1,65	9,15 $\pm$ 4,77

Huomautukset

^a Lymfoproliferatiiviset määritykset suoritettiin edellä
 15 kuvatulla tavalla. Esitetään stimulaatiokertoimien (SI)
 keskiarvot ja keskipoikkeamat ryhmään kuuluvista 5 eläi-
 mestä. SI = CPM_{koc}/CPM_{mediumkontrolli}.

^b Annokset ovat mikrogrammoja.

20 D. Infektointitarkoituksissa annettua HSV-infek-
 tiota vastaan muodostunut suoja.

Kaksi viikkoa toisen immunisoinnin jälkeen hiriin
 siirrostetaan ihonalaisesti (SC) 1 x 10⁶ pfu/0,03 ml HSV2
 (186):tta oikean takaraajan polkuanturaan. Hiiristä seu-
 25 rataa HSV2:teen liittyviä oireita 30 päivän ajan infek-
 tion jälkeen. Oireet arvioidaan päivittäin ja niille an-
 netaan pistemäärät seuraavasti: 0 = oireeton; 1 = turvo-
 tusta tai hiertymä; 2 = heikotusta; 3 = oikean takaraajan
 osittainen halvautuminen; 4 = oikean takaraajan täydelli-
 30 nen halvautuminen; 5 = molemminpuolinen halvautuminen; 6
 = kuolema.

Kuten taulukosta 3 käy ilmi, saavat kaikki immuni-
 soidut ryhmät huomattavan suojan infektointi-
 tarkoituksissa annettua letaalia HSV-infektiota vastaan,
 35 mikä ilmenee vähentyneestä sairastuvuudesta, vähentynees-

tä halvautumiseen johtavasta infektiosta, vähentyneestä kuolevuudesta (ottaen huomioon sen, että 11 kontrolli-
hiirestä 6 menehtyy infektiin, niin vain yksi immunisoi-
tu hiiri mistään ryhmästä kuolee; tämä eläin sai 5,0 μg
5 ngD2:ta ja se oli halvaantunut ennen kuolemaansa), ja
sellaisten eläinten kohonneista frekvensseistä, joissa ei
esiinny lainkaan havaittavia paikallisen tai systeemisen
infektion oireita. Tämä suojaava immunitetti ilmenee
vieläpä pienellä 0,1 μg :n suuruisella baculoviruksen il-
10 mentämän gD2:n annoksella, mikä viittaa korkeanasteiseen
rokotteen välityksellä syntyneeseen vastustuskykyyn homo-
tyypistä infektiota vastaan.

Taulukko 3

15 bgD2-immunisoinnin vaikutus suojaan HSV2-infektiota vas-
taan

	Rokote-käsit- tely	Annos μg	Oireiden maksimiarvo $\pm$ SE ^a	Halvautumis- frekvenssi ^b	Kuolleisuus- frekvenssi	Oireettomien frekvenssi
20	AlPO ₄	--	4,91 $\pm$ 0,37**	11/11§	6/11¶	0/11
	bgD2	0,1	1,27 $\pm$ 0,47	2/11	0/11	6/11
	bgD2	1,0	0,27 $\pm$ 0,27	1/11	0/11	10/11
	bgD2	5,0	0,45 $\pm$ 0,31	1/11	0/11	9/11
	bgD2	10,0	0,36 $\pm$ 0,24	0/11	0/11	9/11
25	ngD2	5,0	0,27 $\pm$ 0,26	1/11	1/11	10/11
	ngD1	5,0	0,64 $\pm$ 0,32	1/11	0/11	10/11

huomautukset:

30 ^a oireet määriteltiin seuraavasti 0 = oireeton; 1 = paikallista turvotusta/eryteema/hiertymä; 2
= heikkous; 3 = oikean takaraajan osittainen halvautuminen; 4 = oikean takaraajan täydellinen
halvautuminen; 5 = moleminpuolinen halvautuminen; 6 = kuolema.

^b halvautumisfrekvenssi sisältää eläimet, joissa esiintyy sekä osittaista että täydellistä toi-
mintakyvyn heikkenemistä.

** P<0,01 Fisherin tarkalla (exact) testillä määritettynä.

35 ¶ P<0,04 Fisherin tarkalla testillä määritettynä.

III. bgD2-glykoproteiinin sekvenssointi

Glykoproteiini-D2-geenin nukleotidijakso määritettiin sekvenssoimalla suoraan HSV2- (kannan 12) ja D2Ac11- (yhdistelmä-baculoviruskanta) virusten DNA. gD2-geenin
 5 limittäiset fragmentit (katso jäljempänä) amplifioidaan epäsymmetrisesti polymeraasiketjuseaktiolla (Perkin-Elmer Gene Amp PCR-testipakkaus) yksinauhaisten nauhojen valmistamiseksi ja ne sekvenssoidaan tämän jälkeen di-deoksimenetelmällä käyttäen U.S. Biochemical -yhtiön
 10 Sequenase-testipakkauksen versiota 2.0.

gD2-geenin yhdistelmäbaculoviruksessa D2Ac11 oleva nukleotidijakso on yhteensopiva HSV2 (12) -kannasta olevan parentaalisen geenin suhteen. Tätä sekvenssiä verrataan myös julkaistuun HSV2:n G-kannan jaksoon (Watson,
 15 R., Gene 26 (1983) 307 - 312).

Seuraavassa on esitetty kantojen G ja D2Ac-11 väliset emäseroavuudet. Emäs numero 268 on ATG-aloituskohdan A. Emäs numero 1449 on TAG-lopetuskohdan G.

20	Nukleotidi			Aminohappo	
	Emäksen numero	D2Ac-11	Kanta G	D2Ac-11	Kanta G
25	1000	C	T		
	1002	C	A	LEU	LEU
	1325	T	C	VAL	ALA

Nämä emäseroavuudet varmistetaan molempien nauhojen sekvenssoimmilla.

-----gD2-----
 235 <----->735
 <----->476

480<----->987

<-----800

691<----->1105

905<----->1315

5

, 1081<----->1480

Kirjallisuusviitteet

1. Blacklaws, B.A., Nash, A.A. ja G. Darby. 1987. Specificity of immune response of mice to herpes simplex virus glycoproteins B and D constitutively expressed on L cell lines. J. Gen. Virol. 68:1103-1114.
2. Cabral, G.A., Fry, D., Marciano-Cabral, F., Lumpkin, C., Mercer, L. ja D. Goperud. 1983. A herpes virus antigen in premalignant and malignant biopsies and explants. Am. J. Obstet. Gynecol. 145:79-86.
3. Cappel, R., Sprecher, S., DeCuyper, F. ja J. DeBraekeleer. 1985. Clinical efficacy of a herpes simplex virus subunit vaccine. J. Med. Virol. 16:137-145.
4. Cohen, G.H., Katze, M., Hydrean-Stern, C. ja R.J. Eisenberg. 1978. Type-common CP-1 antigen of herpes simplex virus is associated with a 59000-molecular weight envelope glycoprotein. J. Virol. 27:172-181.
5. Cohen, J., Charpilienne, A., Chilmonczyk, S. ja M.K. Estes. 1989. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. Virology. 171:131-140.
6. Duffy (ed.), 1980. Vaccine Preparation Techniques, Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey.

7. Eisenberg, R.J., Long, D., Ponce DeLeon, M., Matthews, J.T., Spear, P.G., Gibson, M.G., Lasky, L.A., Berman, P., Golum, E. ja G.H. Cohen. 1985. Localization of epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. J. Virol. 53:634-644.
8. Estes, M.K., Crawford, S.E., Penaranda, M.E., Petrie, B.L., Burns, J.W., Chan, W., Ericson, B., Smith, G.E. ja M.D. Summers. 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. J. Virol. 61:1488-1494.
9. Frenkel, L.M., Dillon, M., Garratty, E., Bryson, Y., Hackell, J., Cawein, A., Abramovitz, A., ja Mishkin, E. 1990. Abstr. A randomized double blind, placebo-controlled phase I trial of a herpes simplex virus purified glycoprotein (gD1) vaccine. The 30th ICAAC meeting, 1990.
10. Fuller, A.O. ja P.G. Spear. 1987. Anti-glycoprotein D antibodies that permit absorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion fusion at the cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:5454-5458.
11. Heber-Katz, E., Hollosi, M., Dietzschold, B., Hudecz, F. ja G.D. Fasman. 1985. The T cell response to the glycoprotein D of herpes simplex virus: the significance of antigen conformation. J. Immunol. 135:1385-1390.

12. Highlander, S.L., Sutherland, S.L., Gage, P.J., Johnson, D.C., Levine, M. ja J.C. Glorioso. 1987. Neutralizing monoclonal antibodies specific for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. J. Virol. 61:3356-3364.
13. Jarvis, D.L. and M.D. Summers. Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. Molecular and Cellular Biology. 9:214-223.
14. Krishna, S., Blacklaws, B.A., Overton, H.A., Bishop, D.H.L., ja A.A. Nash. 1989. Expression of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 in a recombinant baculovirus: Protective responses and T cell recognition of the recombinant infected cells. J. Gen. Virol. 70:1805-1814.
15. Lanford, R.E., Luckow, V., Kennedy, R.C., Dreesman, G.R., Notvall, L., ja M.D. Summers. 1989. Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. J. Virol. 63:1549-1557.
16. Lasky, L.A. ja D.J. Dowbenks. 1984. DNA sequence analysis of the type common glycoprotein D genes of herpes simplex virus types 1 and 2. DNA 3:23-29.
17. Luckow, V.A. ja M.D. Summers. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. Bio/Technology 6:47-55

18. Luckow, V.A. ja M.D. Summers. 1989. High level expression of nonfused foreign genes with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors. Virology. 170:31-39.
19. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Pugivara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315:592-594.
20. Maiorella, B., Inlow, D., Shauger, A. ja D. Harano. 1988. Large scale insect cell culture for recombinant protein production. BioTechnology. 6:1406-1410.
21. Maniatis, T., Fritsch, E.F. ja J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
22. Martin, S., Moss, B., Berman, P.W., Lasky, L.A. ja B.T. Rouse. 1987. Mechanisms of antiviral immunity induced by a vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D: cytotoxic T cells. J. Virol. 61:726-734.
23. Matsura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A. ja Bishop, D.H.L. 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. J. Gen. Virol. 68:1233-1250.

24. Melnick, J.L., Adam, E. ja W. Rawls. 1974. The causative role of herpes virus type 2 in cervical cancer. *Cancer* 34:1355-1385.
25. Mishkin, B.M., Fahey, J.R., Kino, Y., Klein, R.J., Abramovitz, A.S. ja S.J. Mento. 1991. Native herpes simplex virus glycoprotein D vaccine: immunogenicity and protection in animal models. *Vaccine*. 9:147-153.
26. Mosmann, T.R. ja R.L. Coffman. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46:111-147.
27. Muggeridge, M.L., Wu, T.T., Johnson, D.C., Glorioso, J.C., Eisenberg, R.J. ja G.H. Cohen. 1990. Antigenic and functional analysis of a neutralization site of HSV-1 glycoprotein D. *Virology*. 174:375-387.
28. Muggeridge, M.L., Roberts, S.R., Isola, V.J., Cohen, G.H. ja R.J. Eisenberg. 1990. Herpes simplex virus. pp. 459-481. In M.H.V. van Regenmortel ja A.R. Neurath (toim.) *Immunochemistry of viruses. II. The basis for serodiagnosis and vaccines*. Elsevier, New York.
29. Muggeridge, M.I., Isola, V.J., Byrn, R.A., Tucker, T.J., Minson, A.C., Glorioso, J.C., Cohen, G.H. ja R.J. Eisenberg. 1988. Antigenic analysis of a major neutralization site of herpes simplex virus glycoprotein D, using deletion mutants and monoclonal antibody-resistant mutants. *J. Virol.* 62:3274-3280

30. Nahmias, A.J. ja R.M. Coleman. 1984. The significance of herpes simplex virus infections in humans. pp. 92-102. In B.T. Roouse and C. Lopez (toim.) Immunobiology of herpes simplex virus infection, CRC Press, Boca Raton.
31. Norrild, B., Shore, S.L. ja A.J. Nahmias. 1979. Herpes simplex virus glycoproteins: participation of individual herpes simplex virus type 1 glycoprotein antigens in immunocytolysis and their correlation with previously identified glycopeptides. J. Virol. 32:741-748.
32. Paoletti, E., Lipsinskas, B.R., Samsonoff, C., Mercer, S. ja D. Panicali. 1984. Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:193-197.
33. Reid-Sanden, F.L., Sumner, J.W., Smith, J.S., Pekadu, M., Shaddock, J.H. ja W.J. Bellini. 1990. Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus. J. Clin. Microbiol. 28:858-863.
34. Schmaljohn, C.S., Parker, M.D., Ennis, W.H., Dalrymple, J.M., Collett, M.S., Suzich, J.A. ja A.L. Schmaljohn. 1989. Baculovirus expression of the M genome segment of rift valley fever virus and examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins. Virology. 170:184-192.

34. Schrier, R.D., Pizer, L.I. ja J.W. Moorhead. 1983. Type-specific delayed type hypersensitivity and protective immunity induced by isolated herpes simplex virus glycoprotein. J. Immunol. 130:1413-1418.
35. Smith, G.E., Summers, M.D. ja Fraser, M.J. 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165.
36. Stanberry, L.R., Burke, L.R. ja M.G. Myers. 1988. Herpes simplex virus glycoprotein treatment of recurrent genital herpes. J. Infect. Dis. 157:156-163.
37. Stanberry, L.R., Bernstein, D.I., Burke, R.L., Pacht, C. ja M.G. Myers. 1987. Vaccination with recombinant herpes simplex virus glycoproteins: Protection against initial and recurrent genital herpes. J. Infect. Dis. 155:914-920.
38. Summers, M.D. ja G.E. Smith. 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
39. Symington, J. 1984. Electrophoretic transfer of proteins from two-dimensional gels to sheets and their detection, pp. 127-168. In J.E. Celis and R. Bravo (toim.), Two Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications. Academic Press, NY.

40. Torseth, J.W., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Berman, P.W., Lasky, L.A., Cerini, C.P., Heilman, C.J., Kerwar, S. ja T.C. Merigan. 1987. Native and recombinant herpes simplex virus type 1 envelope proteins induce human immune T-lymphocyte responses. *J. Virol.* 61:1532-1539.
41. Valenzuela, P., Coit, D., Medina-Selby, M.A., Kuo, C.H., Van Nest, G., Burke, L.R., Bull, P., Ardea, M.S. ja P.V. Graves. 1983. Antigen engineering in yeast: Synthesis and assembly of hybrid hepatitis B surface antigen-herpes simplex 1 gD particles. *BioTechnology.* 3:323-326.
42. Wather, M.W., Brideau, R.J. ja D.R. Thomsen. 1989. Immunization of cotton rats with the human respiratory syncytial virus F glycoprotein produced using a baculovirus vector. *J. Infect. Dis.* 159:255-264.
43. Watson, R.J. 1983. DNA sequences of the herpes simplex virus type 2 glycoprotein D gene. *Gene.* 26:307-312.
44. Watson, R.J., Weis, J.H., Salstrom, J.S. ja L.W. Enquist. 1982. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*. *Science.* 218:381.
45. Wells, D.E., Vugler, L.G. ja W.J. Britt. 1990. Structural and immunological characterization of human cytomegalovirus gp55-116(gB) expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 71:873-880.

46. Wilcox, W.C., Lond, D., Sodora, D.L., Eisenberg, R.J. ja G.H. Cohen. 1988. The contribution of cysteine residues to antigenicity and extent of processing of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. J. Virol. 62:1941-1947.
47. Williams, D.A., Chase, M.W. 1967. Methods on Immunology and Immunochemistry. Volume 1. Academic Press, New York, pp. 197-237.
48. Zarling, J.M., Moran, P.A., Lasky, L.A. ja B. Moss. 1986. Herpes simplex virus (HSV) specific human T-cell clones recognize HSV glycoprotein D expressed by recombinant vaccinia virus. J. Virol. 59:506-509.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä HSV:n gD2:n tuottamiseksi yhdistelmä-DNA-tekniikalla, joka käsittää sen, että transfektoidaan hyönteisisäntäsolu baculoviruksen DNA:lla, jossa on HSV:n gD2:ta koodaava geeni, ja viljellään soluja sellaisissa olosuhteissa, joissa geenin ilmentyminen on mahdollista.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että HSV:n gD2-geeni on baculoviruksen polyhedriinipromoottorin ohjaama.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että baculovirus on Autographa californica.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että HSV:n gD2 otetaan talteen ja puhdistetaan.
5. DNA-konstruktio, joka käsittää baculoviruksen polyhedriinipromoottorin, joka on toiminnallisesti liitetty HSV gD2:ta koodaavaan geeniin.
6. Vektori, joka käsittää patenttivaatimuksen 5 mukaisen konstruktion.
7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on p941gD2C.
8. Hyönteissolu, joka sisältää patenttivaatimuksen 5 mukaisen vektorin.
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen hyönteissolu, t u n n e t t u siitä, että vektori on p941gD2C.
10. Yhdistelmä-baculovirus, joka sisältää HSVgD2:ta koodaavan geenin ja kykenee ilmentämään tätä.

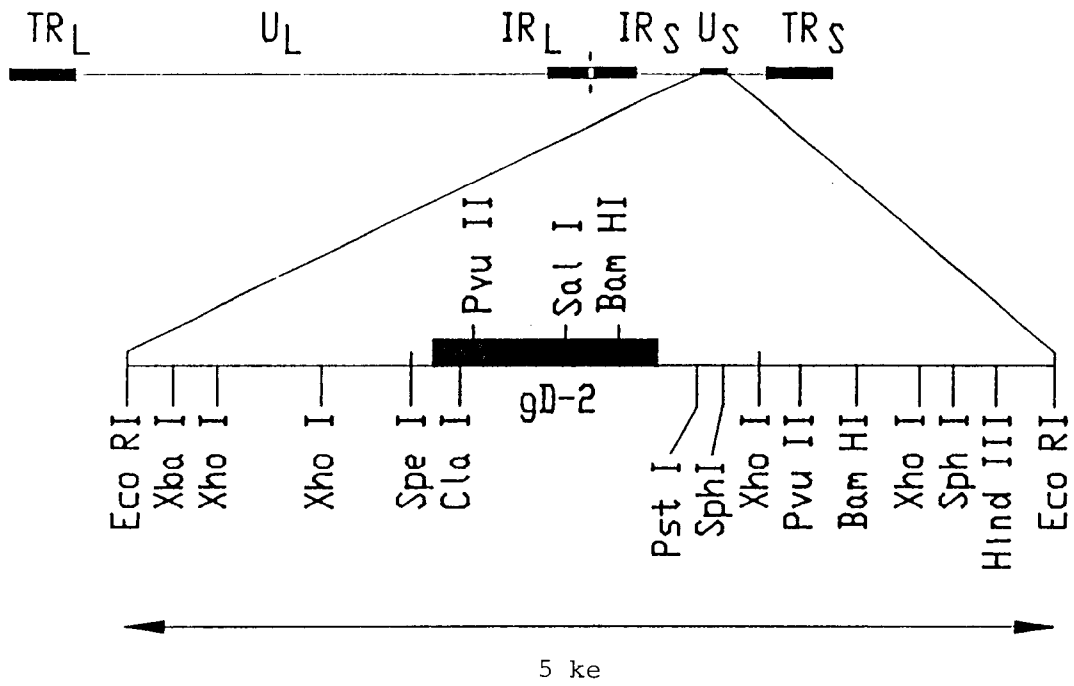


FIG.1A

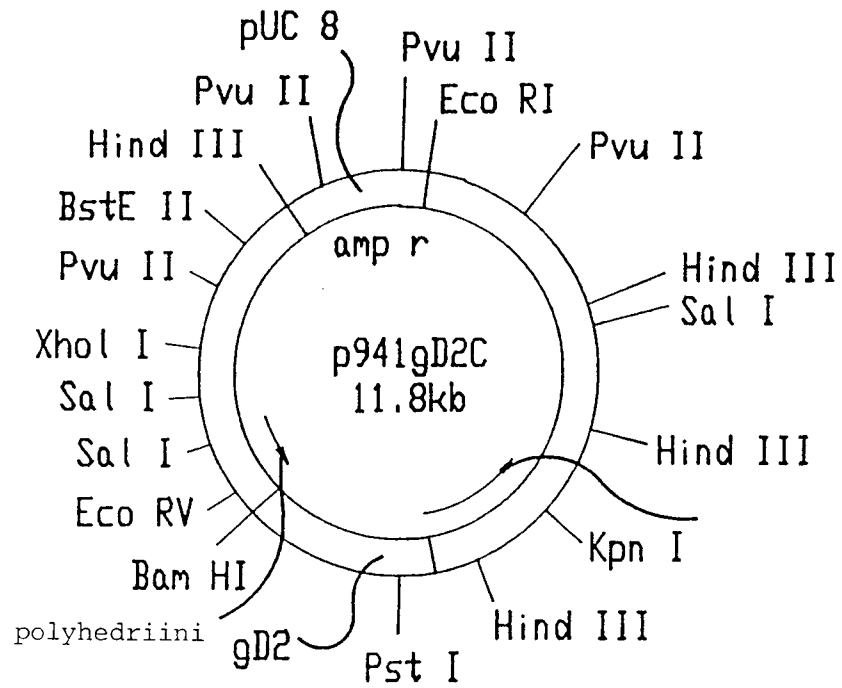


FIG.1B

FIG. 2A

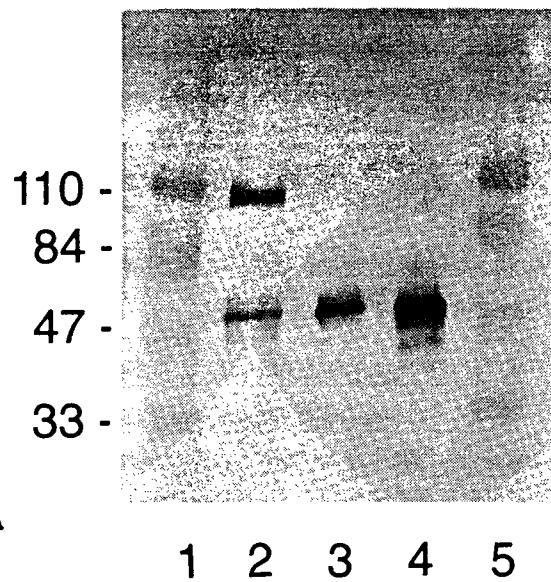
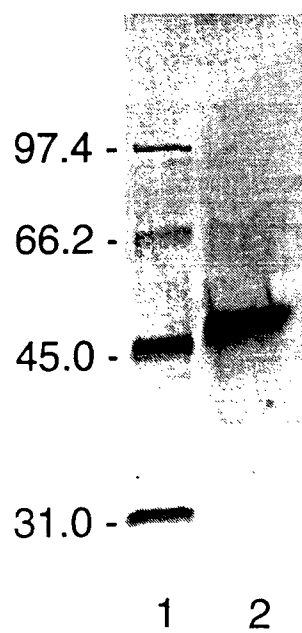


FIG. 2B



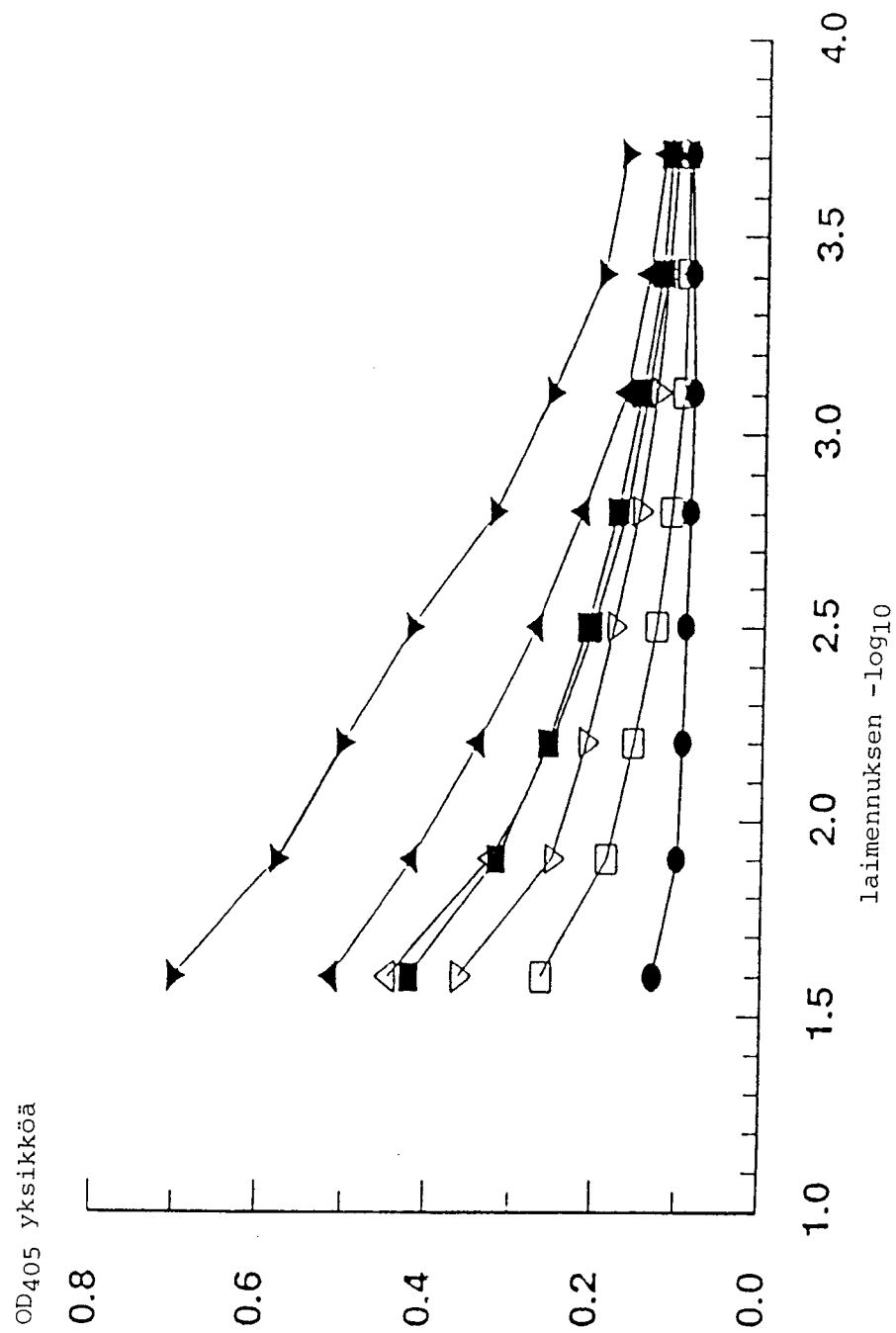


FIG.3A

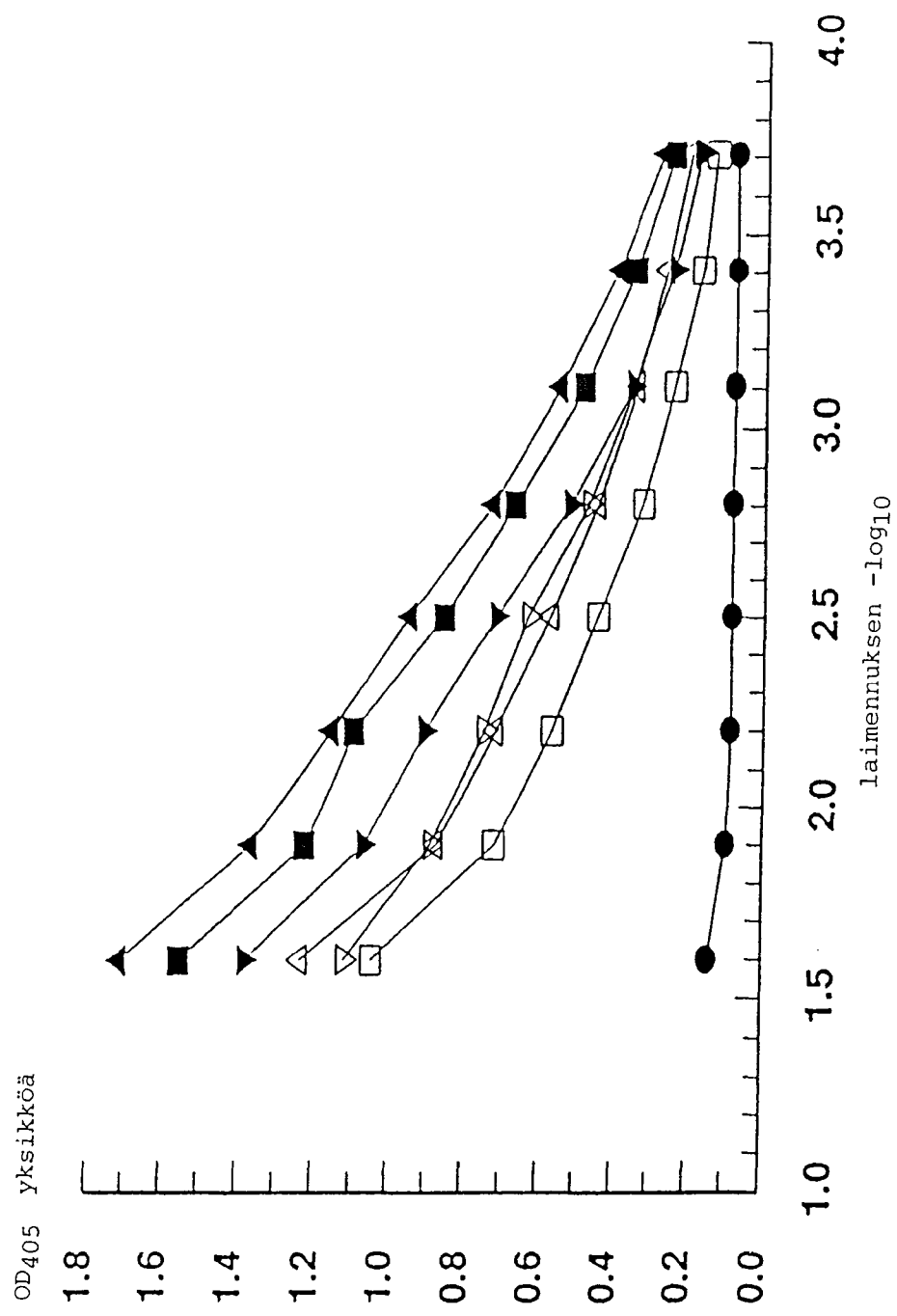


FIG.3B

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer*ei tulk.*

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

9.4.97 Aina Lindholm

Allekirjoitus