[19] المملكة العربية السعوديةSA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ٣٥٦
[45] تاريخ المنح: ١٤٢٦/٠٥/٠٧هـ
الموافـــق: ٢٠٠٥/٠٦/١٤م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: مريم فرانكوت، جـان-بـول بريلـز، منصف سـلاوي، ناتـالي مـاري-جوزيـف كلـود جاركون-جونسون

[73] مالك البراءة: سميثكلاين بيتشام بيولوجيكالز(أس.آيه.)
عنوانه: ٨٩ ري دو لا أنستيتيوت، ريكسنسارت، ب-١٣٣٠، بلجيكا

[74] الوكيل: سليمان إبراهيم العمار

[21] رقم الطلب: ٩٢١٢٠٤٥٩

[22] تاريخ الإيداع : ١٤١٢/١٠/١٨ هـ
الموافق : ١٩٩٢/٠٤/٢١ م

[51] التصنيف الدولي[٧] :
Int. Cl.^{7}: A61K 39/00, 39/245

[56] المراجع:

طلب أوروبي	١٣٩٤١٧	١٩٨٥/٠٥/٠٢ م
طلب أوروبي	٣٥٦٣٤٠	١٩٩٠/٠٢/٢٨ م

اسم الفاحص : وليد بن محمد الغامدي

[54] اسم الاختراع: طعم مضاد لفيروس هربس سمبلكس

[57] الملخص: يتعلق هذا الإختراع بصياغات جديدة لطعم مضـاد لفيـروس هـربس سـمبلكس (Herpes Simplex, HSV). وتتضـمن تلـك الصـياغات بروتين سكري HSV glycoprotein من النـوع gD أو شـظايا مناعيـة immunological fragments متحـدة بـدهن 3- Deacylatd Monophosphoryl Lipid A.

٩ عناصر حماية

طعم مضاد لفيروس هربس سمبلكس

الوصف الكامل

خلفية الإختراع

يتعلق هذا الإختراع بصياغات طعم جديدة وطرق تحضيرها واستخدامها علاجياً . كما يتعلق خاصة بصياغات جديدة لعلاج العدوي بفيروس هربس سمبلكس , Herpes Simplex Virus (الفيروس العشبي البسيط) ، وبنحو أخص لعلاج العدوي بفيروس هربس سمبلكس (HSV - 2) .

ان الفيروس HSV - 2 هو السبب الأول للعدوي بالفيروس هربس في الأعضاء الجنسية ، وهو يتميز مع HSV - 1 (المتسبب في عدوي الشفة بفيروس هربس) بقدرتهما على الاصابة الحادة وإحداث إصابات متأخرة ومزمنة في خلايا التجمعات العصبية neuronal ganglia بشكل أساسي .

وتقدر الإحصاءات عدد المصابين بالفيروس هربس في الأعضاء التناسلية بحوالي ٥ ملايين نسمة في الولايات المتحدة فقط ، حيث تسجل حوالي ٥٠٠٠٠٠ حالة سريرية كل عام (عدوي أولية وانتكاسية) تحدث العدوي الأولية بشكل نموذجي بعد البلوغ وتتميز بظهور مناطق مؤلمة في الجلد وتستمر لمدة تتراوح بين أسبوعين وثلاثة أسابيع . وخلال الشهور الستة التالية للعدوي الأولية ، يعاود المرض حوالي ٥٠ ٪ من المرضى الذين تم شفاؤهم . وفي كل عام قد تنتكس الحالة في حوالي ١٠ - ١٥ ٪ من المرضى . وفي المرضى غير المهتمين بالتحصين يزداد عدد الانتكاسات بالنسبة للمرضى العاديين .

ولكل من HSV - 1 و HSV - 2 عدد من المكونات الجليكو بروتينية (البروتينية السكرية) الموجودة فوق سطح الفيروس . وتعرف تلك المكونات بـــ gA و gB و gC و gD و gE ... الخ .

يوجد البروتين السكري D (الجليكو بروتين D) فوق غشاء الفيروس ، كما يوجد في السائل الخلوي للخلايا المصـــابة : (Eisenberg R.J.et al; J.of Virol 1980.35 : 428 – 435). وهـــو يتضمن ٣٩٣ حمضاً أمينياً تحتوي على ببتيد إشاري Signal Peptide ووزنها الجزيئي يتراوح حول ٦٠ kD . ومن بينها جميعا، فقد تم تمييز الغـــلاف الـــبروتيني الســـكري envelope glycoproteins الخاص بالفيروس HSV على أفضل نحو – (Cohen et al J. Virology 60 157 .166)

ومن المعروف ان تلك البروتينات السكرية تلعب دوراً مركزياً في التصاق الفيروس بالأغشية الخلوية في الجسم . كما اتضح أن البروتين السكري D يستطيع تكوين أجســاماً مضـــادة تعادليـــة neutralising antibodies في الجســم (Eing et al J . Med. Virology 127:59-65) . وبالرغم من ذلك ، فإن بمقدور الفيروس الكامن HSV - 2 أن يستعيد نشاطه ويتسبب في انتكاسة الحالة المرضية بالرغم من وجود كمية كبيرة وتركيز عالٍ من الأجســام المضـــادة التعادلية في أمصال المرضى .

أن القدرة على توليد أجسام مضادة لا تستطيع بمفردها السيطرة على المرض . ولكي يتوقف حدوث الانتكاسات يتوجب أن يقوم الطعم بتنشيط توليد الأجسام المضادة ، إضـــافة إلى تنشيط المناعة الخلوية المنقولة عبر الخلايا T . ويتـــيح هذا الاختـــراع تـــحقيق هـــذان الغرضان معاً .

وصف عام للإختراع

يوفر هذا الإختراع طُعْما يتضمن بروتين سكري D للفيروس HSV أو شظية مناعية منـــه (مقترنة مع) دهـــن 3-0-deacylated monophosphoryl lipid A(3D-MPL) والمشـــتق مـــن monophosphoryl lipid A ، مع حامل ملائم . وبشكل نموذجي فإن البروتين الســـكري D يكون من الفيروس HSV - 2 .

وقد يكون الحامل عبارة عن مستحلب زيت / ماء أوشبة alum حيث يوجد فيه 3D-MPL بكمية قدرها ١٠ ميكروجرام - ١٠٠ ميكروجرام ويفضل ٢٥ -٥٠ ميكروجرام لكل جرعة وحيث يوجد مولد الأجسام المضادة المستضد Antigen بكمية قدرها ٢-٥٠ ميكروجرام لكل جرعة .

ويمكن الحصول على 3D - MPL وفقا للطرق الموصوفة في البراءة البريطانية رقم ٢٢٢٠٢١١ (RIBI) .

الوصف التفصيلي

يجسم هذا الاختراع بروتيني سكري D لفيروس 2 - HSV مبتور (مقطوع) truncated مكون من ٣٠٨ حمضاً أمينياً ويتضمن حموضا أمينية ١ - ٣٠٦ موجودة طبيعياً في البروتين السكري بالاضافة إلى الاسباراجين Asparagine والجلوتامين Glutamine عند الطرف C للبروتين المبتور (المقطوع) الخالي من منطقة تثبيت الغشاء الخاص به . يضم ذلك الشكل من البروتين الببتيد الإشاري الذي ينفصل فينتج بروتيناً ناضجاً مكوناً من ٢٨٣ حمضاً أمينياً. ولقد وصف إنتاج ذلك البروتين في خلايا مبيض الجربوع الصيني Chinese Hamster ovary cells ، في البراءة الاوروبية E P 139 417 B لشركة Genentech.

ويفضل أن يستخدم المبتور الناضج في صياغات الطُعم الخاص بهذا الاختراع كما يرمز اليه بـ rgD2t .

وقد يكون مولّد الأجسام المضادة المستضد HSV متصلا كيميائيا أو بطريقة أخرى مع حامل خاص . والطريقة المفضلة تتضمن الربط الكيميائي مع مولد أجسام مضادة (مستضد) سطحي ضد فيروس الالتهاب الكبدي B ، خلال مجموعات سلفهيدريل sulfhydryl طليقة موجودة فوق سطح مولد الأجسام المضادة السطحي لفيروس الالتهاب الكبدي B . [انظر طلب البراءة البريطاني المذيل رقم ٩٠٢٧٦٢٣٩].

وصياغات هذا الاختراع فعالة للغاية في توليد المناعة حتي لو استخدمت بجرعات منخفضة من مولد الأجسام المضادة (قد تصل مثلا إلى نحو ٥ ميكروجرام rgD2t) .

وهي تقدم حماية ممتازة ضد العدوى الاولية كما تنشط أفضليا كلا من الاستجابتين المناعيتين، الجسمية الخاصة (الأجسام المضادة المعادلة) والاستجابة المناعية بواسطة الخلايا الوسيطة الفاعلة (DTH).

ويفضل أن تحتوي المستحلبات زيتاً غير سام في ماء، مثل الاسكوالين Squalane او الاسكوالان Squalene، ومادة استحلاب مثل التوين ٨٠ Tween 80 وحامل مائي. وقد يكون الحامل المائي على سبيل المثال هو محلول ملح فوسفات منظم.

ومن جانبٍ آخر يقدم هذا الاختراع صياغة طُعم كما وصف سلفا للإستخدام في العلاج الطبي وخاصة للإستخدام في علاج العدوي بفيروس HSV أو للوقاية منها.

ويحتوي الطعم الخاص بهذا الاختراع على كمية واقية مناعيا من HSVgD او شظية مناعية منه حيث يمكن تحضيرها بالتقنيات التقليدية .

وعموما فإن تحضير الطعم موصوف في المرجع التالي : New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al . , University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978 . كما وصف التغليف داخل أجسام دهنية ، وعلى سبيل المثال في البراءة الامريكية ٤٢٣٥٨٧٧ لـ Fullerton . كما كشف عن ربط البروتينات مع الجزيئات الكبرى، في البراءة الامريكية ٤٣٧٢٩٤٥ الخاصة بـ likhite ، والبراءة الامريكية ٤٤٧٤ ٧٥٧ Armor et al .

تختار كمية البروتين في كل جرعة من الطعم بحيث تستطيع توليد استجابة مناعية وقائية بدون أن تحدث أعراضاً ثانوية ضارة ، وذلك في الطعوم النموذجية وتلك الكمية تتنوع وفقاً لمولد الأجسام المناعية المستخدم . وعموماً فإن من المتوقع أن تتضمن كلا من تلك الجرعات ١ - ١٠٠٠ ميكروجرام من البروتين ، ويفضل ٢ - ١٠٠ ميكروجرام،

والأكثر تفضيلا ٤ - ٤٠ ميكروجرام . وبالإمكان تحديد الكمية القصوي من كل طعم بالدراسات القياسية التي تتضمن ملاحظة تركيزات الأجسام المضادة والاستجابات الأخرى في المرضي . وبعد التطعيم الأولي ، قد يُعطى المرضى جرعة منشطة في غضون ٤ أسابيع تقريبا .

وبالاضافة إلى التطعيم في الأشخاص المعرضين للعدوى بـــــ HSV ، يمكـــن اســـتخدام التركيبات الصيدلانية الخاصة بهذا الاختراع في علاج المرضي الذين يصابون بعـــدوي HSV بالعلاج المناعي .

ومن جانب آخر ، يقدم هذا الاختراع طريقة لتصنيع الطُعم وتتضـــمن مـــزج الـــبروتين السكري D لفيروس HSV - 2 او شظية مناعية منه مع حامل مثل مستحلب زيت في مـــاء او شبه و 3D - MPL .

<u>مقارنة الكفاءة المساعدة لوحدة فرعية من طعم الـــبروتين الســـكري D لفـــيروس HSV ، تكراري الارتباط :</u>

في تلك الدراسة ، تم تقييم قدرة عدة مواد مساعدة على تحسين الوقاية المناعيـــة الـــبروتين السكري D تكراري الارتباط من فيروس (HSV) من النوع ٢ (rgD2t) وذلـــك في حيوان التجربة وهو خنزير غينيا guinea .

وكانت المواد المساعدة المختبرة هـــي هيدروكســـيد الالومينيـــوم aluminium hydroxide وهيدروكسيد الالومينوم aluminium hydroxide متحدا مع دهن ٣ - مـــنزوع الاســـيل - احادي فوسفوريل أ 3- Deacyl - Monophosphoryl Lipid A و دهن ٣ - منزوع الآســـيل - احادي فوسفوريل أ 3- Deacy- Monophosphoryl Lipid A معلقا في مستحلب زيـــت في ماء .

١. وصف مولد الأجسام المضادة :

HSV rg D2t هو بروتين سكري مهندس جينياً genetically engineered مبتـــور ومولـــف recombinant حيث انتج في خلايا مبيض الجربوع الصـــيني (CHO) المحولـــة transfected (البراءة الاوروبية ٠١٣٩٤١٧)

٢. مستحضرات مساعدات مولد الأجسام المضادة Antigen - Adjuvant وجداول التطعـــيم والتحصين :

أجريت تجربتان مستقلتان لتقييم المناعة الوقائية لعدة صياغات rgD2t في نموذج خنزير غينيا guinea . وفي التجربة الأولى ، حُصّنتْ مجموعات من خنازير غينيا ثلاث مرات بجرعـــة منخفضة من مولد الأجسام المضادة (٥ ميكروجرام من rgD2t) في ٤ صـــياغات مـــواد مساعدة محضرة وفقا للوصف التالي . وعقب أسبوعين من التحصين الأخـــير ، طُعمـــت الخنازير عن طريق المهبل بـــ HSV من النوع ٢ ثم وضعت تحـــت الملاحظـــة اليوميـــة لإكتشاف ظهور وتطور العدوي بمرض HSV – 2 الأولي والإنتكاسي . وفي التجربة الثانية، قُيمت تلك الصياغات في مجموعات اكبر من الحيوانات . وقد اختبرت العوامل المـــؤثرة في كفاءة تلك الصياغات ، مثل جرعة مولد الأجسام المضادة وتركيب المواد المساعدة .

٢. ١ مستحضرات مساعدات مولد الأجسام المضادة :

حصنت خنازير غينيا في التجربة الأولي بالمستحضرات المساعدة التالية . وقد اعطيت كـــل جرعة (٥ ميكروجرام) في حجم ٢٥ر٠ مل .

٢. ١. ١. rg D2t / شبه (هيدروكسيد الألومينوم aluminium hydroxide) :

حصل على الشبه من شركة سوبرفوس Superfos (الهيدروجيل Alhydrogel، بوهيميـــت Boehimte ، سوبرفوس Superfos ، الدانمارك Denmark) . تم إدمصاص ٥ ميكروجرام من rgD2t النقـــي طـــوال الليل عند ٤° م فـــوق هيدروكســـيد الالومينيـــوم aluminium hydroxide (الشبه) المقـــابلة لـــ ٠,٢٥ مجم مكافئ من Al^{3+} في ٠,٢٥ مل من ١٥٠

ميللي مول من كلوريد الصوديوم NaCl في ١٠ ميللي مول من محلول منظم فوسفات phosphate (pH) ٦,٨ .

٢. ١. ٢. rg D2t / هيدروكسيد الالومينيوم aluminium hydroxide و 3D - MPL :

حصل على 3D - MPL من شركة ريبي اميونوكيم ريسيرش Ribi Immunochem Research, Inc. . وبعد الإدمصاص طوال الليل لـ ٥ ميكروجرام من rgD2t فوق الشبة كما وصف في ٢. ١. ١. ، اخضع مستحضر المساعد لعملية طرد مركزي ثم انتزع الرائق . وأضيف حجم مساوٍ من منظم الإدمصاص يحتوي على ١٠٠ ميكروجرام من 3D – MPL إلى rgD2t المرتبط بالشبة .

وقد وجد أن أكثر من ٩٨٪ من rgD2t مرتبطاً مع المساعد هيدروكسيد الالومينيوم aluminium hydroxide في كل من مستحضري الـ rgD2t / شبة .

٢. ١. ٣. 3D- MPL / RgD2t في مستحلب زيت في ماء (R) :

حضر مستحلب الزيت في الماء باستخدام ١٢٪ وزن / حجم من الليسيثين lecithin المضاف الى زيت الاسكوالان Squalene oil و ٠,٠٨ ٪ توين ٨٠ Tween 80. أضيف بعدئذ 3D-MPL بتركيز ١٠٠ ضعف التركيز المطلوب نهائيا . خلط ١٪ من ذلك المستحضر بعدئذ في حجم ٠,٢٥ مل مع ٥ ميكروجرام rgD2t في الطبقة المائية فحصل على ١٪ مستحلب في ماء يحتوي على ١٠٠ ميكروجرام من 3D- MPL .

استخدمت عدة صياغات مساعدة ، تم تحضيرها وفقا لما سبق وتحتوي على كميات متنوعة من rgD2t و/أو منشط مناعة immunostimulator، في التجربة الثانية . وقد أعطيت بحجم اجمالي قدره ٠,٥ مل . وفيما يلي وصف لتلك الصياغات :

rgD2t / شبه : ٥ أو ٢٠ ميكروجرام rgD2t و ٠,٥ مجم مكافئ AL^{3+} لكل جرعة مقدارها ٠,٥ مل .

<u>rgD2t / شبة و 3D- MPL :</u> ٥ أو ٢٠ ميكروجرام rgD2t و ٠,٥ مجم مكافئ AL^{3+} و ٥٠ ميكروجرام 3D- MPL لكل جرعة قدرها ٠,٥ مل .

<u>rgD2t / 3D - MPL في مستحلب زيت في ماء (R) :</u> ٥ أو ٢٠ ميكروجرام مـــن rgD2t مصاغة في مستحلب زيت / ماء ١ ٪ كما سبق وصفه في الفقرة (٣. ١. ٢.) . أحتوت الجرعة ٠,٥ مل على ٥ أو ٢٠ ميكروجرام من rgD2t و ٥٠ ميكروجرام مـــن 3D- MPL في مستحلب زيت في ماء ١ ٪ .

<u>rgD2t / 3D - MPL في مستحلب زيت / ماء (S) : حضر السواغ كما يلي :</u>

أضيف إلى محلول ملح الفوسفات phosphate المنظم (PBS) المحتوي على ٠,٤ ٪(حجم / حجم) من التوين ٨٠ Tween 80، كل من البلورونيك Pluronic L 121 ٥ ٪ والاسكوالان ١٠٪ ، ثم خلط المزيج بدقة عشر مرات في جهاز خلط دقيق (طـــراز M/110 ، شـــركة ميكروفلويديكس Microfluidics) بحيث يتضمن المستحلب الناتج الجزيئـــات الـــتي يقـــل حجمها عن ميكرون فقط .

وبعد ذلك أضيف ٥٠ ميكروجرام من 3D- MPL الي المستحلب . خلط حجم واحد مـــن ذلك المستحلب (يحتوي علي ٣D - MPL) مع حجم مساوٍ من مولد الأجسام المضـــادة (مستضدة) مزدوج التركيز ، ثم قلب سريعا لضمان امتزاج المحتويات بشكل تام . تكون المستحضر النهائي من ٠,٢ ٪ توين Tween 80 ٨٠ و ٢,٥ ٪ من البلورونيك Pluronic L 121 و ٥٪ من الاسكوالان Squalane و ٥٠ ميكروجرام من 3D- MPL و ٥ ميكروجرام او ٢٠ ميكروجرام من rgD2T في جرعة قدرها ٥ر٠ مل .

جدول التحصين (التمنيع)

حُصّنت مجموعات من إناث خنازير غينيا من سلالة هارتلي Hartley (٢٠٠ - ٢٥٠ جم) ثلاث مرات عند اليوم صفر و ٢٨ و ٩٥ بـــ ٥ ميكـــرو جـــرام و rgD2t المصـــاغ في ٤ صياغات مساعدة مختلفة .

أجري التحصين (التمنيع) تحت الجلد بحجم حقني قدره ٢٥ر٠ مل . حقنت حيوانات ضبط التجارب وفقا للنظام ذاته بالمادة المساعدة فقط او لم تحقن بشيء على الإطلاق .

حُصّنت المجموعات المختلفة كما يلي :

مجموعة ١ (العدد = ٤) : ٥ ميكروجرام rgD2t / 3D- MPL (١٠٠ ميكروجـــرام) في مستحلب (R) زيت / ماء (A) .

مجموعة ٢ (العدد = ٤) : ٥ ميكــــــــروجرام rgD2t / شَــــبَّة ± 3D- MPL (١٠٠ ميكروجرام) .

مجموعة ٣ (العدد = ٤) : ٥ ميكروجرام rgD2t / شَبَّة.

مجموعة ٤ (العدد = ٥) : شَبَّة فقط .

مجموعة ٥ (العدد = ٥) : 3D- MPL (١٠٠ ميكروجرام) فقط .

مجموعة ٦ (العدد = ٨) : لم تعالج .

سُحَبتْ عينات من دماء الحيوانات كل أسبوعين لتقييم نسبة الأجسام المضادة بمعايرة الاليزا Elisa والمعايرات المعادلة كما سيرد وصفها .

كما اختُبرَتْ الصياغات المختلفة لقدرتها علي توليد مناعة عن طريق خلايا T ، كما تـــدل عليها نسبة توليد الاستجابات الحساسة المتأخرة . وفيما يلي وصف للقراءات المستخدمة في تقييم الاستجابات المناعية الجسمية والخلوية المتولدة من الصياغات المتنوعة لـــ rgD2t .

ولكي تقارن المناعة الوقائية المتولدة بالصياغات rgD2t ، حُقنتْ كافة خنازير غينيا مهبليـــا بجرعة منشطة قدرها ١٠° وحدة مكونة للرقائق (pfu) من HSV2 ، ســلالة MS بعــد أسبوعين من التحصين الأخير . وضعت الحيوانات تحت الملاحظة اليومية وفحصت العلامات والأعراض المرضية الدالة علي العدوي الحادة وأية أعراض للأمراض الانتكاسية بسبب فيروس

الهربس . جمعت عينات من المسحات المهبلية في اليوم الخامس بعد الجرعة المنشـــطة مـــن الفيروس ثم قيس تركيز الفيروس المعدي فيها .

وفيما يلي وصف تفصيلي للنموذج التجريبي المهبلي في خنزير غينيا .

في التجربة الثانية ، قُيِّمت القدرة المناعية للصياغات التالية من rgD2t في مجموعات أكبر من الحيوانات . قورنت جرعتان من مولد الأجســام المضــادة (المستضــدات) (٥ و ٢٠ ميكروجرام) كما أختبرت عدة تركيبات من المواد المساعدة . استخدمت جرعة قــدرها ٥٠ ميكروجرام من D-MPL٣ وقورنت تأثيراها بالنسبة للجرعة ١٠٠ ميكروجــرام الــتي استخدمت من قبل .

حصنت مجموعات خنازير غينيا الاناث من سلالة هارتلي ثلاثة مرات في اليــوم ١ و ٢٨ و ٨٤ كما يلي :

مجموعة ١ (العدد ٨) : ٢٠ ميكروجرام rgD2t / 3D- MPL (١٠٠ ميكروجــرام) مستحلب زيت / ماء (R) .

مجموعة ٢ (العدد ٨) : ٥ ميكروجــرام rgD2t / 3D- MPL (١٠٠ ميكروجــرام) مستحلب زيت / ماء (R) .

مجموعة ٣ (العدد ١٠) : ٢٠ ميكروجرام rgD2t / 3D- MPL (١٠٠ ميكروجــرام) مستحلب زيت / ماء (S) .

مجموعة ٤ (لعدد ١٠) : ٥ ميكروجــرام rgD2t / 3D- MPL (٥٠ ميكروجــرام) مستحلب زيت / ماء (S) .

مجموعة ٥ (العدد ١٠) : ٢٠ ميكروجــرام rgD2t / شَــبَّة 3D- MPL ±(٥٠ ميكروجرام)

مجموعة ٦ (العدد ١٠) : ٥ ميكروجرام rgD2t / شَبَّة 3D- MPL (٥٠ ميكروجرام)

مجموعة ٧ (العدد ٤) :   شَبَّة 3D- MPL (٥٠ ميكروجرام) فقط .

مجموعة ٨ (العدد ٤) :   3D- MPL (٥٠ ميكروجرام) مستحلب زيت / ماء (R) فقط .

مجموعة ٩ (العدد ٨) :   غير معالجة .

بلغت جرعة التحصين ٠,٥ مل . حُصنت مجموعة ضبط النتائج وفقا للنظام المتبع مع المادة المساعدة فقط (المجموعتان ٧ و ٨) او لم تعالج قط (المجموعة ٩) .

حصّنت مجموعة أخيرة (المجموعة ١٠) بالشَبَّة / rgD2t - 3D - MPL في الصياغة المحتوية على ١٠٠ ميكروجرام بجرعة قدرها ٠,٢٥ مل وفقا للنظام الموصوف في التجربة الوقائية الأولى .

المجموعة (١٠ (العدد = ١٠ = ٥ ميكروجرام rgD2t / شَبَّة ± 3D – MPL (١٠٠ميكروجرام) .

أُخَذتْ عينات من دماء الحيوانات كل أسبوعين لتقييم الأجسام المضادة في كل منها بمعايرة الاليزا ELISA والتعادل كما سيلي وصفهما . جمعت نواتج الغسيل المهبلية بعد التحصين الثاني ثم عويرت لوجود الأجسام المضادة الدورية systemic antibodies الخاصة بـ Gd2t (الأجسام المضادة الدورية الخاصة بـ gD2t (الأجسام المضادة gD2t من الفصيلة IgG حقنت الخنازير الغينية بجرعات منشطة مهبليا بـ ١٠٥ pfu من HSV2 (سلالة MS) بعد أسبوعين من التحصين الأخير . وبعد الجرعة المنشطة ، وضعت الحيوانات تحت الملاحظة لفحص العلامات المرضية الدالة على العدوي الحادة (في اليوم الرابع واليوم ١٢ من الجرعة المنشطة) ولفحص أية أعراض تدل على انتكاس المرض الفيروسي (في اليوم الثالث عشر إلى اليوم التاسع والثلاثون من الجرعة المنشطة) .

٣. ١. القراءات :

أخذت عدة قراءات لتقييم الأجسام المضادة النوعية والاستجابات المنقولة بواسطة الخلايـــا ، المتولدة عن التحصين بالصياغات الخاصة بـــ rgD2t . قيمـــت القيمـــة الوقائيـــة لتلـــك الصياغات في نموذج خنزير غينا المهبلي .

٣. ١. ٣. الاليزا ELISA :

صممت معايرة الاليزا Elisa لفحص وتقييم الأجسام النوعية المضـــادة – gD في أمصـــال خنازير غينيا ونواتج غسيل المهبل باستخدام rgD2t كمولد جسم مضـــاد (مستضـــد) مغلف .

٣. ١. ١. فحص وتحديد الأجسام المضادة النوعية IgG لـــ rgD2t في الأمصال :

استخدمت محاليل مولد الأجسام المضادة المستضدات والأجسام المضـــادة (المستضـــدات) بحجم ٥٠ ميكرولتر في كل تجويف باللوحة . خفف المولد إلى تركيز نهائي ١ ميكروجرام / مل في PBS ثم تم إدمصاصه (أمتز) طوال الليل عند ٤ ° م في التجاويف الـــ ٩٦ في لوحـــة التركيزات الدقيقة Maxisorp Immuno-plate, Nunc, Denmark . وبعـــد ذلـــك غســـلت التجاويف خمـــس مرات بـــ PBS Tween ٠,١ ٪ (محلول منظم غسيل) وحُضنت لمـــدة ساعة كاملة عند ٣٧ ° م مع PBS يحتوي علي ١٪ زلال مصلي من العجـــل bovine serum albumin و ٤ ٪ من مصل عجل حديث الـــولادة newborn calf serum و ٠,١ ٪ تـــوين Tween (منظم مشبع) . أضيفت ثلاثة تخفيفات من الأمصال (بـــدءاً مـــن التخفيـــف ١٠٠/١) في منظم التشبع الي التجاويف المغلفة بـــ rg D2t ثم حُضنتْ لمدة ساعتين علـــى حرارة الغرفة . غُسلت اللوحات بعدئذ كما سلف ثم أضيف IgG المضاد للخنازير الغينيـــة المستخرج من الغنم والمرتبط بالبيوتين Biotin (IgG2 وigG1 الـــنوعيان ، ســـيروتك Serotec ، ســـوبار Sopar ، بيوشيم Biochem، بلجيكا) مخففاً ١ /٣٠٠٠ في منظم تشبع، إلى كل تجويف ثم حُضِّنَتْ اللوحة لمدة ساعة ونصف عند ٣٧ ° م . وبعد خطوة الغسيل ،

أضيف Amersham) streptavidin-biotinylated peroxidase complex ، المملكة المتحدة) مخففا ١ / ١٠٠٠ في منظم تشبع ، ثم حضنت لمدة ٣٠ دقيقة . غسلت اللوحات كما سلف ثم حضنت مع محلول من o – phenylenediamine (Sigma) و ٠,٤ ٪ فوق اكسيد الهيدروجين H_2O_2 في ٠,١ مولار من منظم السترات citrate عند pH ٤,٥ . أوقف التفاعل اللوني بعد ١٥ دقيقة بإضافة حمض الكبريت ٢ مولار ثم قريء الامتصاص الضوء عند ٤٩٢ nm .

عرف معيار الاليزا ELISA بأنه مقلوب تخفيف المصل الذي أنتج أمتصاصاً (كثافة ضوئية مقاسة عند ٤٩٢ nm مساوية لـــ ٥٠ ٪ من أقصى امتصاص ، المعيار المتوسط).

حسبت معاير الاليزا ELISA بواسطة التحليل الخطي رباعي البند بتطبيق برنامج حاسب آلي.

٣. ١. ٢. تحديد الأجسام المضادة النوعية IgG الخاصة بـــ rgD2t في نواتج الغسيل المهبلية :

عويرت نواتج غسيل المهبل أولا من حيث محتواها من I gG بالاليزا ELISA كما يلي : غُلّقت اللوحات Maxisorp المناعية طوال الليل عند ٤ °م بـــ ١ ميكروجرام / مل (٥٠ ميكرومتر في كل تجويف) من IgG المضاد للخنازير الغينية المستخرج من الماعز في صورة نقية (سيجما Sigma ، بلجيكا) مخففا في PBS . غسلت اللوحات ثم حضنت مع المنظم التشبعي كما سبق . خففت نواتج الغسيل المهبلية بالتسلسل مع تخفيضين مزدوجين (بدءا من تخفيف ١/١٠٠) في منظم تشبع ثم أضيفت إلى اللوحات . أحتوت كل لوحة علي منحني قياس لـــ IgG المستخرج من خنازير غينيا بصورة نقية (Sigma، بلجيكا) وكان التخفيف المزدوج يبدأ من ١٠٠ نانوجرام / مل .

وبعد ساعتين من التحضين عند حرارة الغرفة ، غسلت اللوحات كما سلف ثم أضيف اليها الأجسام مضادة نوعية لــ IgG 1 و IgG2 في خنازير غينيا ، مستخرجة من الغنم ومرتبط مع biotin ،(Serotec ، Sopar ، Biochem ، بلجيكا) بتركيز ١/١٠٠٠ في محلول منظم تشبع ، إلى كل تجويف ثم حضنت اللوحات لمدة ساعة ونصف عند ٣٧°م . وكانت بقية الخطوات (إضافة streptavidin-biotinylated peroxidase complex واستقراء اللون) كما سبق وصفه في (٣. ١. ١.) .

قيم التركيز الكلي لــ IgG الموجود في ناتج الغسيل المهبلي ، من المنحنى المعياري لــ IgG ، وذلك بواسطة التحليل الخطي المائل رباعي البند باستخدام برنامج حاسب آلي .

وبعد معايرة المحتوى الاجمالي لــ IgG ، اختبرت نواتج الغسيل المهبلية لوجود الأجسام المضادة IgG النوعية لــrg D2t باستخدام الاليزا ELISA ذاتها كما وصف بالنسبة لمواصفات الأجسام المضادة gD – في الأمصال . دونت النتائج علي أساس الكثافات الضوئية مقاسة عند ٤٩٢ nm لكل ٠,٥ ميكروجرام / مل من IgG الاجمالي .

٣. ٢. معايرة التعادل :

جهزت لوحة ذات ٩٦ تجويف للمعايرات التعادلية كما يلي :

حضرت تخفيفات متسلسلة مزدوجة العينات للإختبار مباشرة في لوحات ذات ٩٦ تجويف (٢٥ ميكرولتر لكل تخفيف مصلي ، في إزدواج) . أضيفت ٥٠ ميكرولتر من مخلوط يحتوي علي ٤٠٠٠ pfu من فيروس HG 52 والمساعد (تخفيف نهائي ١/١٠٠ في التجويف) إلى كل تجويف . حضنت اللوحات لمدة ساعة واحدة عند ٣٧°م . اضيف ١٠٠ ميكرولتر من معلق خلايا BHK 21 بمعدل ٤,١° خلية / مل الي كل تجويف (٤,١^٤ خلية / تجويف) . أجريت للوحات عملية طرد مركزي لمدة ٥ دقائق على سرعة ١٠٠٠ دورة / دقيقة ثم حضنت لمدة ٥ أيام عند ٣٧° م في وجود ٧ ٪ من ثاني أكسيد الكربون .

وبعد تلك الفترة انتزع وسط المزرعة بلطف ثم اضيف ١٠٠ ميكرولتر من محلول الكريستال البنفسجي cristal violet (١٠ ٪ methanol ، ٩٠ ٪ ماء ، ٠,٣ ٪ كريستال بنفسجي) إلى كل تجويف ثم حضنت اللوحات لفترة ٢٠ دقيقة على حرارة الغرفة . غسلت اللوحات بعدئذ بوفرة من الماء ثم فحصت اللوحات مجهريا لتحديد وجود الرقائق بسهولة مجهريا .

عرف التركيز التعادلي كمقلوب أعلى تخفيف مصلي لم يلاحظ به وجود أية رقائق (وقاية ١٠٠٪ من التأثير الممرض للخلايا) . ومن المهم ملاحظة التأثير الممرض للخلايا بشكل تام (تحلل ١٠٠ ٪ في الطبقة الخلوية المفردة) عند تلك النقطة في تجاويف ضبط النتائج .

الحساسية من النوع المتأخر DTH

أختبرت مختلف صياغات rg D2t كذلك لقدرتها علي توليد استجابة نوعية لخلايا T مقاسة بتوليد الاستجابات الحساسة من النوع المتأخر .

استخدمت صياغات المساعد المجهزة للتجربة الأولى في تلك الدراسة . وقد احتوت تلك المستحضرات ٥ ميكروجرام من rg D2t لكل ٠,٢٥ مل من الجرعة .

وقد كان جدول التحصين كما يلي :

التحصين الأولي primary immunization : أعطيت ٠,٢٥ مل من صياغة الطعم في العضل .

التحصين المنشط booster immunization : أعطيت ٠,٢٥ مل من صياغة الطعم في العضل بعد ٢١ يوماً .

الاختبار الجلدي : أعطيت ٠,٥ ميكروجرام من rg D2t بالجلد (في محلول ملح) بعد ٨ أيام . وقد اختبرت كافة الخنازير الغينية جلدياً بمحلول الملح لضبط النتائج .

علاوة علي ذلك فان الخنازير الغينية المستخدمة لمقارنة النتائج (حيوانات غير محصنة) قد اختبرت جلديا بـــ rgD2t . لوحظت المناطق الحمراء والملتهبة عند موضع الحقن الجلدي بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة من الحقن .

٣. ٤. النموذج المهبلي للخنزير الغيني :

وصف النموذج الخاص بخنزير غينيا للعدوي الجنسية بفيروس HSV بواسطة LR Stanberry et al (J. of Infectious Diseases 1982 146:397-403; Intervirology 1985, 24 :226-231) .

وباختصار ، فقد أعطيت خنازير غينيا جرعة منشطة قدرها 10^5 pfu من HSV2 ، سلالة MS ، بالتقطير المهبلي بعد أسبوعين من آخر تحصين . استمر تتبع الشوط المرضي بالملاحظة اليومية لظهور إصابات جلدية ظاهرية علي الأعضاء الجنسية خلال ١٢ يوم بعد جرعة التنشيط ، وتقييمها . جمعت المسحات المهبلية في اليوم الخامس بعد التنشيط بالفيروس ثم عويرت لوجود فيروس HSV 2 المعدي بالمعايرة الرقيقة . فحصت الحيوانات بعدئذ ، يومياً، لظهور إصابات فيروسية منتكسة بدءاً من اليوم ١٣ إلى اليوم ٦٠ . قيمت درجة الإصابة الفيروسية فوق الأعضاء الجنسية الخارجية باستخدام مقياس تعيين درجة الإصابة مداه من صفر إلى ٤ (صفر = لا توجد إصابة أو احمرار ؛ ٠,٥ = أحمرار ؛ ١ = بشرة ؛ ١,٥ = ≥ ٤ بثرات صغيرة ؛ ٢ = بثرات كبيرة ؛ ٢,٥ = عدة بثرات كبيرة ناتجة عن التحام البثرات كما في القياس ٢ ؛ ٣ = تزايد عدد وحجم البثرات ؛ ٣,٥ = الإصابة تغطي سطح الجلد بالكامل المناطق الجنسية ؛ ٤ = اصابة متقرحة مع التهاب) .

وقد قيمت درجة الوقاية التي تحدثها الطعوم المختلفة من rgD2t وفقا لما سيأتي ذكره من معايير أو مقاييس .

الوقاية المضادة للمرض الأولي (الايام صفر - ١٢) :

اعتبر الحيوان بأنه خال من الوقاية إذا لوحظت عليه الأعراض التالية :

- اكثر من مساحة حمراء واحدة في أي وقت .

- مساحة حمراء واحدة في أي وقت .
- مساحة حمراء واحدة ثابتة في المنطقة ذاتها لمدة ٣ أيام متوالية (مقياس إصابة ٠,٥)
- بثره واحدة او عدة بثرات (≤ مقياس إصابة ١,٠) .

الوقاية المضادة للمرض الانتكاسي (الأيام ١٣ - ٦٠) :

اعتبر الحيوان ايجابيا بالنسبة لانتكاسته بالمرض إذا سجل مقياس إصابة قدره ٠,٥ ليومين متتاليين علي الأقل او إذا لوحظ ان مقياس الإصابة قد بلغ ≥ ١,٠ في أي يوم . وقد سبقت حلقة المرض الانتكاسي بيوم خال من الإصابة او الإحمرار .

تحسب شدة الإصابة في الحيوان بأنها مجموع المقاييس المسجلة خلال العدوي الاساس (الأيام ١ - ١٢) . ويمثل حدوث الإصابة عدد الحيوانات التي تظهر عليها إصابات بمقياس ≥ ١,٠ خلال فترة الملاحظة [الايام ١ - ١٢ (المرض الأولي) أو الأيام ١٣ - ٦٠ (المرض الانتكاسي)]

٣. ٥. معايرة الفيروس في المسحات المهبلية :

جمعت المسحات المهبلية في اليوم الخامس بعد الجرعة المنشطة الفيروسية . مسح مجري المهبل بمرور مزود بـ الجينات الكالسيوم Calcium alginate في طرفه حيث رطب مسبقا بوسط إيجل القاعدي Basal Eagle المدعم بـ ٢ ٪ مصل جنين العجل و ٢ ميللي مول من L-glutamine و ١٠٠ وحدة / مل من penicillin و ١٠٠ ميكروجرام / مل من streptomycin و ١٠٠ ميكروجرام / مل من gentamycin و ١ ميكروجرام / مل من amphotericin B (وسط المسحة) .

كسرت كل مسحة ثم وضعت في أنبوب متعدد الالومر polyallomer ومعقم ١٢ × ٧٥ مم سعة ٥ مل يحتوي علي ١ مل من وسط المسحة . مزجت محتويات الانابيب بسرعة بجهـــاز المزج Vortex لإنتزاع الفيروس ثم تجميده لحين استخدامه . وللمعايرة ، تم تحضين ٦ لوحات ذات تجاويف محتوية علي ٥,١° خلية / تجويف ، طوال الليل عند ٣٧° م . تم إجراء عملية طرد مركزي للأنابيب ثم حضرّت تخفيفات متسلسلة للعينات في وسط المســـحة . وبعـــد انتـــزاع وســـط الاستـــزراع من التجاويف الستة ، نقلت ٢٠٠ ميكرولتر من كل تخفيف للعينات مكررة مرتين الى طبقات خلوية مفردة ثم حفظت لمدة ساعة واحدة عنـــد ٣٧° م. اضيفت ٤ مل من وسط الاستزراع المحتوي على ١,٥ ٪ من carboxymethylcellulose إلى كل تجويف . حضنت الـــلوحات بعدئذ لمدة يومـــين عند ٣٧° م. وبعد ذلك ، انتـــزع الوسط بلطف ثم أضيف ١ مل من محلول الكريستال البنفسجي (١٠ ٪ methanol ، ٩٠ ٪ ماء و ٠,٣ ٪ كريستال بنفسجي) إلى كل تجويف وترك لمدة ١٥ دقيقة. غسلت اللوحات تماما بعد ذلك ثم حسب عدد الرقائق. عبر عن معيار HSV2 بـــ pfu / مل .

٤. النتائج :

في التجارب الأولى ، تم تحصين مجموعات من الخنازير الغينية بجرعة منخفضة مـــن مولـــد الأجسام المضادة (مستضدات) (٥ ميكروجرام rgD2t) مصاغة في أربع صياغات مختلفة. وقد اختيرت تلك الجرعة الأقل من القصوى لكي يتم أختيار أقوي مخلوط مـــن rgD2t مـــع المادة المساعدة . يمكنه إتاحة اقصي وقاية ضد مرض HSV الأولي والانتكاسي ، عندما تتم مناولته للخنازير الغينية قبل تقطير HSV2 في المهبل (محاولات وقائية) .

٤. ١. توليد المناعة الخلطية :

كما يتضح من جدول ١ ، فقد تبين ان الاليزا ELISA في المجموعات المحصـــنة بصـــياغات rgD2t المحتوية علي 3D- MPL كمنشط مناعي ، كانت أعلى منها في المجموعة المحصنة بطعم

rgD2t / شَبَّة، وبالمثل كانت المعايير التعادلية . وقد حدثت معايير متوسطة جيده بعد ٣ تحصينات بـــ 3D – MPL / rgD2t زيت / ماء (R) أو بـــ rgD2t شَبَّة / 3D- MPL .

٤. ٢. توليو الاستجابة T الخلوية التأثيرية DTH

أوضحت نتائج الاختبار الجلدي (جدول ٢) أن rgD2t المصاغ في 3D – MPL مستحلب زيت / ماء قد ولد أقوى أستجابة DTH . كما ولدت أستجابة DTH نوعيـــة بـــــ rgD2t /شَبَّة 3D – MPL . وقد أظهرت التجارب المماثلة التي أجريت على الجرذان ان rgD2t

المرتبطة بالشَبَّة ± 3D - MPL كان شديد التأثير في توليد استجابة خلوية مؤثرة T في الجسم، علي النقيض من صياغة الشَبَّة مع rgD2t .

٤. ٣. <u>تأثير التحصين علي المرض الأولي بـــ HSV :</u>

حصنت الخنازير الغينية بجرعة منشطة مهبليا من HSV2 بعد اسبوعين من التحصين الثالث . ويتضح في شكل ١ تأثير التحصين علي المنهج المرضي والفيروسي للإصـــابة الأوليـــة بـــــ HSV2 ، كما يلخص جدول ٣ ذلك التأثير . وبالمقارنة مع مجموعات ضـــبط النتـــائج (المجموعات ٤ – ٦) التي أصبحت مصابة وأظهرت أعراض المرض الأولي ، فقد أظهرت جميع الحيوانات المحصنة بـــ rgD2t - 3D - MPL في صياغات الزيت / ماء دلائل على خلوها من المرض الفيروسي ، وفقا لتتبع الملاحظة بالنسبة للإصابات الجلدية وشدها . بالاضـــافة إلى ذلك ، فإن تلك الحيوانات لم تبد أية انتكاسات فيروسية في القناة المهبلية كما قيمـــت بالمعايرة الفيروسية المهبلية في اليوم الخامس بعد الجرعة المنشطة . وحصل علي نتائج مماثلة في المجموعة المحصنة بـــ rgD2t/ شَبَّة 3D -MPL . ولم تظهر علامات البثرات الفيروسية على تلك المجموعة من الحيوانات أثناء فترة الملاحظة (مقياس الإصابة ≥ ١,٠) . علاوة علـــي ذلك فلم تلاحظ أية انتكاسات فيروسية في المسحات المهبلية التي جمعت . وفي المقابـــل ، فقد كانت الوقاية ضعيفة في الحيوانات المحصنة بـــ rgD2t الممتز على الشَبَّة (٧٥ ٪ مـــن الاصابات الجلدية قد حدثت) .

٤ . ٤ . تأثير التحصين علي مرض HSV الانتكاسي :

النتائج موضحة في شكل ١ او ملخصة في جدول ٤ .

اعترضت التحصينات بالصياغات rgD2t المحتوية علي 3D - MPL (المجموعتان ١ و٢) تطور الأمراض الفيروسية الانتكاسية . وقد ظهرت حلقات انتكاسية أقل بدرجة جوهرية في مجموعتين بالإضافة إلى أيام أقل للإنتكاسة مقارنة بمجموعات ضبط النتائج او المجموعات المعالجة بـ rgD2t والشبَّة .

ولتقييم العوامل المؤثرة في الكفاءة والوقاية لطعوم rgD2t المحتوية علي 3D - MPL ، فقد أجريت تجارب أخرى علي عدد أكبر من الخنازير الغينية .

قورنت جرعتان من مولد المضادات (المستضدات) (٥ و ٢٠ ميكروجرام) بالاضافة الي مساعدات مختلفة. أعطيت ثلاث تحصينات في الأيام صفر و ٢٨ و ٨٤ . اخذت عينات من دماء الحيوانات كل أسبوعين لتقييم الأجسام المضادة بالاليزا ELISA والمعايرة التعادلية .

جمعت نواتج الغسل المهبلية بعد التحصين الثاني ثم اختبرت لوجود الأجسام المضادة الدورية الخاصة بـ rgD2t .

توليد المناعة الخلطية humoral immunity

بينت النتائج (جدول ٥) إن كافة الصياغات rgD2t المحتوية علي 3D - MPL قد استطاعت تنشيط الاليزا ELISA المرتفعة ومعايير التعادلية في أمصال الخنازير الغينية .

وقد كانت الاليزا ELISA المتوسطة والمعايير التعادلية المتولدة بعد ثلاثة تحصينات شديدة الشبَّة في أمصال المجموعات المحصنة بصياغات rgD2t المحتوية علي ٥ ميكروجرام او ٢٠ ميكروجرام من rgD2t . ولم ينشأ أي اختلاف جوهري في الاستجابة الخلطية المقاسة في المجموعات المحصنة بطعم rgD2t / شبَّة المحتوي علي ٥٠ ميكروجرام من 3D - MPL (المجموعة ٦) أو ١٠٠ ميكروجرام 3D – MPL (المجموعة ١٠) . ومن المهم ملاحظة

امكانية تمييز الأجسام المضادة الدورية rgD2t (فصيلة IgG) في نواتج الغسيل المهبليـــة في كافة المجموعات المحصنة . وتلك الاستجابة الموجودة في السائل المخاطي في هيئـــة اجســـام مضادة لــ rgD2t قد تلعب دورا هاما في الوقاية عن طريق تخفيض حمل الفيروس المعدي في القناة التناسلية أثناء الإصابة الأولية .

<u>تأثير التحصين علي المرض الأولي بـــ HSV</u>

أعطيت الخنازير الغينية جرعة منشطة مهبليا من HSV2 بعد أسبوعين من التحصين الثالث . وتأثير التحصين على دورة المرض والفيروس لعـــدوي HSV 2 ملخــص في جـــدول ٦ . وبالمقارنة مع مجموعات ضبط النتائج ، فقد أوضحت الحيوانات المحصنة بـــ ٥ ميكروجرام rgD2t شبَّة 3D – MPL المصاغة لتحتوي علي ٥٠ ميكرو جرام او ١٠٠ ميكروجرام مـــن 3D – MPL (المجموعتان ٦ و ١٠) ، ان الإصابة الجلديـــة كانـــت منخفضـــة جوهريـــا (الاحتمال (أ) ≥ ٠,٠٥) كما انخفضت نسبة حدوث الاصابات الجلدية .

وقد لوحظت نتائج شديدة الشبَّة في المجموعة المحصنة بـــ ٥ مـــيكروجرام مـــن مســـتحلب زيت / ماء يحتوي علي rgD2t مع 3D - MPL (المجموعة ٣) . وفي تلـــك المجموعـــات المحصنة الثلاث ، لوحظ أن الانتكاسات كانت قليلة جدا في المسحات المهبلية التي جمعت في اليوم الخامس بعد الجرعة المنشطة .

<u>تأثير التحصين علي الانتكاس بمرض HSV</u>

دونت النتائج في جدول ٦ . وبالمقارنة مع مجموعات ضبط النتائج فقد انخفضت الاصابات الجلدية كما قصرت فترة الانتكاسات جوهريا (الاحتمال (أ) ≥ ٠,٠٥) في المجموعـــات الثلاث المحصنة . كما كان لهذه المجموعات حوادث إنتكاس أقل من مجموعة ضبط النتـــائج بالمقارنة مع مجموعات ضبط النتائج .

الخلاصة

توضح النتائج التي حصل عليها من الخنازير الغينية أن التطعيم بصياغة rgDt المحتوية على 3D - MPL في مستحلب زيت في ماء أو متحدة مع هيدروكسيد الالومينيوم aluminium hydroxide ، فعال للغاية حيث يهيئ وقاية ضد المرض الأولي والانتكاسي بفيروس HSV2 عندما يعطى للخنازير الغينية قبل تعريضها للعدوي بفيروس HSV 2 . وتلك الصياغات المحتوية علي 3D - MPL / rg D2t قادرة علي تحسين الاستجابة المناعية الخلطية النوعية (الأجسام المضادة التعادلية) والاستجابة المناعية المنقولة بواسطة الخلايا المؤثرة (DTH) . وقد حصل علي تلك النتائج باستخدام جرعة منخفضة من rgD2t (٥ميكروجرام) .

٦. مناعية الصياغات rgD2t في الامراض الاولية

٦. ١. المناعية المقارنة لـ rgD2t / شبّة و rgD2t /شبّة مع 3D – MPL

قيّمت مناعية الطعوم rgD2t /شبّة و rgD2t / شبّة مع 3D – MPL في القردة الافريقية الخضراء (AGM) المعروفة باسم cercopithecus aethiops أعطيت ثلاثة تحصينات في الأشهر صفر و ١ و ٣ . قيست الاستجابة المناعية الخلطية النوعية (بالاليزا ELISA والمعايير التعادلية) والمنقولة بواسطة الخلايا المؤثرة .

٦. ١. ١. الطريقة التجريبية :

احتوت كل صياغة علي ٢٠ مجم من rgD2t و ٠,٥ مجم مكافئ من $AL^3\pm$ لكل جرعة . استخدمت جرعة قدرها ٥٠ ميكروجرام من 3D - MPL . حضنت مجموعات من قردة cercopithecus aethiops (AGM) ثلاث مرات في الأيام صفر و ٢٨ و ٨٤ تم التحصين بالحقن في العضل بجرعة ٠,٥ مل (٢٠ rgD2t) . أخذت عينات من دماء الحيوانات كل أسبوعين تقريبا لتقييم نسبة الأجسام المضادة فيها بالاليزا ELISA وبمعايرة الأجسام التعادلية . كما اختبرت الصياغتان لقدرتهما علي توليد مناعية منقولة

بخلايا T ، حسب القياس الخاص بالاستجابتين المناعيتين المتولدتين الحساسة والمتأخرة . (DTH)

أعطيت القردة جرعات مختلفة من rgD2t تحت الجلد في منطقة اسفل البطن (٢٠ و ٥ و ١ ميكروجرام) في محلول ملح بعد ١٣ يوم من التحصين الثاني . اختبرت القردة جلدياً بمحلول الملح فقط الضابط للنتائج . ولوحظت درجات الاحمرار والتقيح عند موضع الحقن الجلدي بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة .

<u>٦. ١. ٢. النتائج</u>

أ) <u>توليد المناعة الخلطية</u>

لم يتبين أي نشاط للأجسام المضادة لفيروس HSV 2 في أي من القردة قبل التحصين (البيانات غير مدونة) . وكما يتضح في جدول ٧ ، فإن كلا من الطعمين قد ولد اليزا ELISA ومعايير تعادلية بشكل جيد بعد التحصين الثاني . ولم يتم تنشيط تلك الاستجابة المناعية بتحصين ثالث في القردة المحصنة بطعم rg2Dt / شَبَّة . وفي المقابل ، فإن القردة التي اخذت تحصينا ثالثاً بطعم rgD2t / شَبَّة مع D-MPL٣ قد أصبحت ذات مناعة متزايدة وفقا للاليزا ELISA ومعيار الأجسام التعادلية بدمائها (متوسط تركيز الاليزا ١٠٠٥٦ ، متوسط التركيز التعادلي : ٩٥٠) .

II) <u>توليد المناعة المنقولة بواسطة خلايا T المؤثرة (DTH)</u>

توضح النتائج الخاصة بالاختبار الجلدي ان طعم rgD2t متحدا مع الشَبَّة / 3D - MPL كان شديد الفعالية في توليد استجابة مناعية منقولة بالخلايا T في الجسم ، وذلك على النقيض من صياغة طعم rgD2t / شَبَّة . كما لوحظت استجابة قوية DTH في كافة الحيوانات المحصنة بطعم 3D - MPL ± rgD2t وفقا لإختباراتها الجلدية بـ ٢٠ مجم rgD2t . وقد قيست الاستجابات النوعية DTH ايضا مع اقل تركيزات من rgD2t (٥,٠ و ١,٠ ميكروجرام) في غالبية القردة (٣ / ٤ بالنسبة للجرعة ٥ ميكروجرام و ٢ / ٤ للجرعة

١ ميكروجرام) . وقد ولدت تلكما الجرعتان من rgD2t استجابات اضعف وفقا للإختبار الجلدي مقارنة مع تركيز ٢٠ مجم من rgD2t .

٦. ٢. المناعية الخاصة بالصياغات rgD2t / شبَّة مع D -MPL٣ في النسانيس rhesus monkeys

قورنت المناعية الخاصة بالطعوم rgD2t / شبَّة مع 3D - MPL المحتوية علي مختلف الجرعات من rgD2t (١٠٠ ميكروجرام و ١٠ و ٥ ميكروجرام) في النسانيس .

٦. ١. ٢. الطريقة التجريبية :

احتوت كل صياغة علي ٠,٥ ميكروجرام مكافئ من Al^{3+} و ٥٠ ميكروجرام من ٣-D-MPL بكل جرعة . حصنت ثلاثة مجموعات من النسانيس (٤ نسانيس في كل مجموعة) ثلاث مرات في الأيام صفر و ٢٨ و ٧٧ ، كما يلي :

مجموعة ١ : ١٠٠ ميكروجرام rgD2t شبَّة ± 3D - MPL (٥٠ ميكروجرام)

مجموعة ٢ : ٢٠ ميكروجرام rgD2t شبَّة ± 3D - MPL (٥٠ ميكروجرام)

مجموعة ٣ : ٥ ميكروجرام rgD2t شبَّة ± 3D - MPL (٥٠ميكروجرام)

حقنت الطعوم في العضل بجرعة قدرها ١ مل . أخذت عينات من دماء الحيوانات كل أسبوعين تقريبا لتقدير الأجسام المضادة بمعايرتي الاليزا ELISA والتعادلية .

٦. ٢. ٢. توليد المناعة الخلطية

لم يتبين أي نشاط للأجسام المضادة لفيروس HSV 2 في أي من النسانيس قبل التحصين . وقد لوحظت معايير تعادلية واليزا ELISA جيدة في المجموعات الثلاثية المحصنة بـ ١٠٠ و ٢٠ و ٥ مجم من rgD2t في الشبَّة ± 3D – MPL .

(البيانات غير واردة)

٦. ٣. ١. الخلاصة

توضح النتائج التي حصل عليها من القردة الافريقية الخضراء أن التطعيم بطعم rgD2t المحتوي علي الشَبَّة و 3D - MPL قد حسّن المناعة الخلطية (الأجسام المضادة التعادليـــة) والمناعـــة المنقولة بالخلايا المؤثرة (DTH) النوعية . وبالمقارنة مع صياغة rgD2t / شَبَّة فـــإن ذلـــك الطعم هو الأقوى في توليد الأجسام المناعية التعادلية كما أنه يتسطع توليد استجابة DTH في

الجسم علي عكس الصياغة المذكورة كما توضح النتائج التي حصل عليها من النســانيس ان الصياغة rgD2t / شَبَّة ± 3D - MPL فعالة للغاية في توليد استجابة مناعية خلطية حتي ولو استخدمت بجرعة منخفضة (٥ او ٢٠ ميكرجرام rgD2t) .

٧. استنتاجات عامة

تبين النتائج التي حصل عليها في الخنازير الغينية بجلاء أن الصياغات المساعدة المحتوية علـــى 3D - MPL المعطاة في مستحلب زيت / ماء أو متحدة مع هيدروكسيد الالومينيوم ، هـــي فعالة للغاية في توليد الاستجابة المناعية الوقائية من طعم البروتين السكري HSV المولـــف في نموذج العدوي المهبلية في الخنازير الغينية ، حتي ولو استخدمت بجرعات منخفضة جداً مـــن مولدات الأجسام المضادة (المستضدات (٥ ميكروجرام rgD2t) . كما توضح بيانـــات الوقاية ان تلك الصياغات 3D - MPL / rgD2t هي أكثر فعالية في توفير الوقايـــة . وتلـــك الصياغات من 3D - MPL قادرة علي تحسين المناعية الخلطية النوعية (الأجسام التعادليـــة) والمناعية المنقولة بواسطة الخلايا المؤثرة (DTH) .

بالاضافة إلى ما تقدم ، فان الصياغة rgD2t / شبّة / 3D - MPL قد أوضحت الها قادرة علي تحسين المناعية علي مستوي الأجسام المضادة وعلي تحسين المناعية المنقولة بخلايا T المؤثرة في رتبه الأوليات ، مما يبين ان ذلك التأثير المساعد لا يقتصر فقط علي النوعيات الصغيرة من الحيوانات .

جدول ١ : الاستجابة المضادة لفيروس HSV في أمصال الخنازير الغينية المحصنة بصياغات rgD2t قبل وبعد تعرضها للعدوى الفيروسية

المجموعة	الطعم (١)		قبل العدوى (٢)		بعد العدوى (٣)	
	مولد الأجسام المضادة Antigen	المادة المساعدة Adjuvant	معيار ELISA	معيار التعادلي	معيار ELISA	معيار التعادلي
١	rgD2t	3D-MPL O/W (R)	٢٠٨٢٢ ± ٨١٢٩١	١٦٠٠	٢٤٦٤٨±٦٨٧٢٠	٧٦٥±٢٢٠٠
٢	rgD2t	3D-MPL شبّة	٣٠١٦٥±٣٩٨٩٧	±٢٠٠ ٨٠٠	١٣٠٩٣±٢٧٢٢٤	٧٦٥±١٨٠٠
٣	rgD2t	شبّة	٢٣٧٠٤±٢٠٣٤٦	٤٠٠±٦٠٠	٢٤٠٢٤±٢٨٦٢٢	٤٦١±١٣٣٣
٤	-	شبّة	< ١٠٠	< ٥٠	٨٧٨±٧٣٧	٨٥±١٤٢
٥	-	3D-MPL	< ١٠٠	< ٥٠	٢٤٤±٢٥٩	١٣٠٤±١٢٧٥
٦	غير معالجة	–	< ١٠٠	< ٥٠	١٩٤±٢٢٥	١٤١±١١٩

١) جرعة rgD2t = ٥ ميكروجرام . حصنت الحيوانات ثلاث مرات في الأيام صفر و ٢٨ و٩٥ ثم عرضت للعدوى بعد أسبوعين بواسطة $١٠^{٥}$ HSV pfu .

٢) جمعت الأمصال في اليوم السابق للعدوى (= ١٤ يوماً بعد التحصين الثالث) .

٣) جمعت الأمصال بعد أسبوعين من العدوى .

ملاحظة : Titer معيار وهو كمية أي جوهر قياسي Standard reagent لازم لتحقيق نتيجة معينة عند المعايرة .

جدول ٢ : نتائج الاختبار الجلدي (DTH) في الخنازير الغينية المحصنة بصياغات rgD2t .

الصياغة	الخنزير الغيني	القراءة بعد ٢٤ ساعة		القراءة بعد ٤٨ ساعة	
		مم E (mm)	مم E (mm)	مم E (mm)	مم I (mm)
مستحلب زيت/ماء rgD2t - 3D – MPL (R)	١	٢٠	١٥	١٤	١٠ (N)
	٢	١٥	١٠	١٠	٣
	٣	٢٠	١٧ (N)	١٥	١٢ (N)
rgD2t شبّة 3D - MPL	١	١٠	٨	١٠	٤
	٢	١٥	١٢	١٢	٣
	٣	١١	٩	١٢	صفر
شبّة ± 3D - MPL	١	صفر	صفر	صفر	صفر
	٢	صفر	صفر	صفر	صفر
	٣	صفر	صفر	صفر	صفر
غير معالج	١	صفر	صفر	صفر	صفر
	٢	صفر	صفر	صفر	صفر

حصنت الخنازير الغينية في الايام صفر و ٢١ بـ ٥ ميكروجرام من صيغة rgD2t (في العضل) ثم حقنت في الجلد بـ ٥ ميكروجرام rgD2t في محلول ملح في اليوم ٢٩ . قرئ الاختبار الجلدي بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة .

E : مادة الاحمرار في موضع الحقن الجلدي بالميللي متر .

I : درجة التقيح في موضع الحقن الجلدي بالميللي متر .

N : نخز (أوموات) الجلد عند موضع الحقن .

جدول ٣ : تأثير التحصين بصياغات rgD2t على الدور (مجرى) السريري والفيروسي clinical and virological course للعدوى بفيروس HSV 2 في الخنازير الغينية

المجموعة	الطعم (١)		حدوث الإصابات الجلدية (٢)	حدوث الإصابات الجلدية (٣)	معيار الفيروس بالمهبل (٤)
	مولد الأجسام المضادة المستضدات	المادة المساعدة			
١	rgD2t	مستحلب زيت / ماء 3D-MPL	صفر / ٤	٠,١ ± ٠,٣	صفر
٢	rgD2t	شَبَّة 3D-MPL	صفر / ٤	١ ± ٠,٤	٦,٢٥ ± ١٢,٤
٣	rgD2t	شَبَّة	٣ / ٤	٤,٤ ± ٢,٧	٣٥٧٥ ± ٦٠١٠
٤	-	شَبَّة	٥ / ٥	٦,٢ ± ٢,٦	٥٢١٦ ± ٦٢٩٥
٥	-	3D-MPL	٤ / ٥	٥,١ ± ٣,٦	٣٢٩٨ ± ٤٤٧٥
٦	غير معالجة	–	٧ / ٨	٧,٣ ± ٤,٧	٢٢١٤ ± ٤٥١٩

١) جرعة rgD2t = ٥ ميكروجرام . حصنت الحيوانات ثلاث مرات في الأيام صفر و ٢٨ و٩٥ عرضت للعدوى بعد أسبوعين بواسطة ١٠ ^٥ HSV pfu .

٢) عدد الحيوانات ذات المقياس ≤ ١ خلال الاثنى عشر يوماً من فترة ملاحظة الإصابة .

٥ ٣) مجموع مقاييس الإصابات (الأيام ١ – ١٢) في المتوسط الحسابي ± الانحراف القياسي.

٤) قمة معيار HSV (pfu / m1) في المسحات المهبلية التي جمعت بعد ٥ أيام من العدوى .

جـــدول ٤ : تأثير التحصين بصياغات rgD2t على الانتكاسة المــرضية الجنسية بفـــيروس HSV 2 في الخنازير الغينية

المجموعة	الطعم (١)		حدوث الإصابات الجلدية (٢)	فترة المرض الانتكاسي (٣)	عدد أيام الانتكاسة (٤)
	مولد الأجســام المضـــــادة المستضدات	المادة المساعدة			
١	rgD2t	مستحلب زيت / ماء 3D-MPL(R)	١ / ٤	١ ± ٢	٠,٧ ± ١,٥
٢	rgD2t	شَبَّة 3D-MPL	٢ / ٤	١ ± ٠,٨	١,٧ ± ٣,٥
٣	rgD2t	شَبَّة	٣ / ٣	٤,٣ ± ١,٥	٨,٣ ± ٥
٤	-	شَبَّة	٤ / ٥	٣,٨ ± ٣,٣	٧,٦ ± ٦,٥
٥	-	3D-MPL	٥ / ٥	٢,٦ ± ١,١	٦ ± ٤,٤
٦	غير معالجة	–	٦ / ٨	٣,٥ ± ٢,٢	٩,٩ ± ٦

١) جرعة rgD2t = ٥ ميكروجرام . حصّنت الحيوانات ثلاث مرات في الأيــام صــفر و ٢٨ و٩٥ ثم عرضت للعدوى بعد أسبوعين بواسطة $١٠^{٥}$ HSV pfu .

٢) عدد الحيوانات التي ظهرت بها اصابات مقياسها ≤ ١ خلال فترة الملاحظة (١٣ – ٦٠)

٣) سبقت إحدى فترات الانتكاسة وأعقبت بيوم لم تظهر فيه إصابات وتميزت بيومين علـــى الأقــل ظهرت فيها الحمرة (مقياس = ٠,٥) أو يوم واحد ظهرت فيه البثور (مقيــاس الاصـــابة ≤ ١) . النتائج مدونة بالمتوسط الحسابي ± الانحلاف القياسي (فترة الملاحظة : الايام ١٣ – ٦٠) .

٤) إجمالي الأيام التي أظهرت الحيوانات فيها إنتكاسة بالفيروسات ، المتوسط الحســابي ± الانحــراف القياسي (فترة الملاحظة : الأيام ١٣ – ٣٩) .

جدول ٥ : مقارنة تأثير مختلف الصياغات المساعدة على المناعية المتولدة بـــ rgD2t في الخنازير الغينية

المجموعة	الطعم		الاستجابة المضادة لفيروس HSV بعد يومين من التحصين في المصل		في الشطفات	الاستجابة المضادة لفيروس HSV بعـد ثلاثة تحصينات – التركيز السابق للعدوى (٣) في الأمصال (٤)	
	جرعـــة rgD2t	المادة المساعدة	معيار ELISA	معيار التعادلي	المهبلية (٥)	معيار ELISA	معيار التعادلي
١	٢٠ μg	مستحلب زيـت / ماء 3D-MPL (R) (٥٠ μg)	٣١٤٦٢ ± ٩٠٨٧	٨٥٠ ± ٣٩٦	٠,٧٨٠ ± ٠,٣٧٦	١٩٩٥٨ ± ١٠١٧١	٣٤٠٠ ± ١٩٩٤
٢	٥ μg	" "	٣٥٠١٥ ± ١٤٣٩٥	٤١٢ ± ٢٦٤	١,٠٠٠ ± ٠,١٧٧	٥١٦٨٨ ± ٤٠١٢٠	٤٣٤٢ ± ٣٨٧٩
٣	٢٠ μg	" (s)	١٦٧٢٠ ± ١٢٦٤١	١٣٨٠ ± ٧٥٦	٠,٧٠٠ ± ٠,٢٣٢	٣٦٦٤٧ ± ٢٤١٢٦	٤٠٨٠ ± ٢٨٨٣
٤	٥ μg	" "	١٤٩٩٢ ± ٩٨٨٥	٤٨٠ ± ٥٧١	٠,٥٧٠ ± ٠,٢٠٠	٤٥٠٢٨ ± ٢٤٢٢١	٤٥٦٠ ± ٢٥٠٢
٥	٢٠ μg	شبة 3D-MPL ٥٠ μg	١٤٤٥٢ ± ٧٤٧٦	٧٤٠ ± ٤٩٩	٠,٦٢٠ ± ٠,١٧٥	١٦٠١٥ ± ٧٨٤٦	٣٢٨٠ ± ٢٢٧٦
٦	٥ μg	" "	١٠١٧٤ ± ٤٢١٩	٤٢٠ ± ٣٠١	٠,٥٢٠ ± ٠,١٧٥	٢٠٤٨٨ ± ٩٥٦٢	٢٦٤٠ ± ١٥١٠
٧	–	" "	< ١٠٠	< ٥٠	< ٠,٠٢٠	< ١٠٠	< ٥٠
٨	–	مستحلب زيت / ماء 3D-MPL (R) (٥٠ μg)	< ١٠٠	< ٥٠	< ٠,٠٢٠	< ١٠٠	< ٥٠
٩	–	غير معالجة	< ١٠٠	< ٥٠	< ٠,٠٢٠	< ١٠٠	< ٥٠
١٠	٥ μg	شبة 3D-MPL ١٠٠ μg	٤٦٠٢ ± ٣٩٥٣	١٦٣ ± ١٥١	٠,٦٧١ ± ١,١٨٧	١٦٥٨٨ ± ٦٩٤٥	٢٥٦٠ ± ١٦٧٨

١) حصنت الحيوانات ثلاث مرات في الأيام صفر و ٢٨ و ٨٤ عرضت للعدوى بعد أسبوعين بــــ ١٠^{٥} pfu مـــن HSV.

٢) جمعت الأمصال ونواتج الغسل المهبلية بعد ١٤ يوماً بعد التحصين الثاني) .

٣) جمعت الأمصال قبل يوم واحد من العدوى (= ١٤ يوماً بعد التحصين الثالث) .

٤) القيم على صورة متوسطات حسابية ± انحرافات قياسية .

٥) تقابل الكثافة الضوئية (عند ٤٩٢ nm) لكل ٠,٥ ميكروجرام / مل من اجمالي IgG مقاساً في المعايرة القياسية المضادة لــ Gd2t ، ELISA . المتوسط الحسابي ± الانحراف القياسي .

جدول ٦ : تأثير التحصين بصياغات rgD2t على الدور (او المجرى) المرضي والفـــيروس للعدوى بفيروس HSV 2 في خنازير غينيا .

	الطعم			
	٥ ميكرو جرام rgD2t – 3D MPL زيـــت / ماء (S) المجموعة ٣	٥ ميكرو جـــرام شـــبة 3D – MPL (٥٠ ميكروجرام) المجموعة ٦	٥ ميكرو جـــرام شـــبة 3D – MPL (١٠٠ميكروجرام) المجموعة ١٠	مجموعات ضـــبط النتائج (المقارنة) ٧ و ٨ و ٩
العدوى الأولية بفيروس HSV 2				
حدوث الإصابة الجلدية (٪)	١ / ٩ ١١٪	١ / ١٠ ١٠٪	صفر/١٠ صفر٪	١٢/١٤ ٨٦٪
شدة الإصابات الجلدية	١,٢ ± ١	٠,٧ ± ٠,٧	٠,٩ ± ١	٨,٦ ± ٥,١
معايير الفيروس بالمهبل (pfu/me)	صفر	صفر	١,٥ ± ٤,٧	١,٧٧ ± ١٦٨٢
العدوى الانتكاسية بفيروس HSV 2				
وجود إصابات جلدية (٪)	٢/٩ ٢٢٪	٢/١٠ ٢٠٪	٣/١٠ ٣٠٪	١١/١٤ ٧٩٪
عدد أيام الانتكاسة	٢,٣±١	١,٦ ± ٢,١	١,٦ ± ٢,٧	٧,٣ ± ٦
عدد نوبات الانتكاسة	٠,٢ ± ٠,٤	٠,٦ ± ٠,٧	٠,٥ ± ٠,٨	١,٩ ± ١,٢

جدول التجريب : ٣ تحصينات في اليوم صفر و ٢٨ و ٨٤ .

العدوى بعد اسبوعين من التحصين الاخير بـــ ١٠° pfu من HSV 2 .

العدوى الأولية بـــ HSV 2 : (فترة الملاحظة ٤ – ١٢ يوم بعد العدوى) .

حدوث الاصابة الجلدية (٪) : عدد الحيوانات ذات البثرات (مقياس إصابة ≥ ١) .

شدة الإصابة الجلدية (٪) : مجموع مقاييس الإصابات (للأيـــام ٤ – ١٢) في المتوســـط الحســـابي ± الانحراف القياسي .

معايير الفيروس بالمهبل : معايرة الفيروس بالمهبل (pfu / مل) في المسحات المهبلية المجمعة بعد ٥ أيام من العدوى .

العدوى الانتكاسية بـــ HSV2 : (فترة الملاحظة من الأيام ١٣ - ٣٩ بعد التحصين) .

حدوث الإصابة الجلدية (٪) : (٪) بعد الحيوانات التي ظهرت بثرات (مقياس اصابة ≥ ١) .

عدد ايام الانتكاسة : الأيام الإجمالية للتجارب على الحيوانات التي ظهـــرت عليهـــا أعـــراض المـــرض الانتكاسي بالفيروس ، المتوسط الحسابي ± الانحراف القياسي . قيست الحيوانـــات على أنها إيجابية بالنسبة للمرض الانتكاسي إذا سجلت مقياس قدره ٠,٥ (حمرة) لمدة يومين متتالين على الأقل أو إذا لوحظت عليها بثرات مقياس ≥ في أي يوم .

عدد نوبات الانتكاسة : المتوسط الحسابي ± الانحراف القياسي .

جدول ٧

الاستجابة المناعية المتأخرة في القردة الافريقية الخضراء بعد تطعيمها بـــ GD2T والشَـــبَّة او GD2T معْ الشبَّة و 3D – MPL

الطعم	رقم القراءة	القراءة بعد ٢٤ ساعة				القراءة بعد ٤٨ ساعة			
		PBS	gD2t ١	gD2t ٥	gD2t ٢٠	PBS	gD2t ١	gD2t ٥	gD2t ٢٠
			ميكرو جرام				ميكرو جرام		
gD2t	JO٣٥٨	–	لم تجرى	–	–	–	لم تجرى	–	–
شبة	JO ٣٥٩	–	"	–	–	–	"	–	–
	JO٣٦٣	–	"	–	–	–	"	–	–
	JO ٣٦٤	–	"	–	–	–	"	–	–
	JO٣٦٦	–	"	–	–	–	"	–	–
gD2t	JO٣٤٨	–	–	حمرة	٤–١٢سم	–	–	I	I
شبة	JO ٣٤٩	–	حمرة١–٢ مم	٨–١٥مم	٧–٩حمرة مم	–	حمرة	I	I
3D - MPL	JO٣٧٥	–	حمرة١–٢ مم	٤ – ١٣مم	٤–٦حمرة مم	–	حمرة	I	I
	JO٥١٥	–	–	–			–		حمرة ضعيفة
مجموعات	JO٣٢٠	–	–	–	–	–	–	–	–
ضبط النتائج	JS -١٠								
المقارنة		–	–	–	–	–	–	–	–

حصنت القردة في الايام صفر و ٢٨ بـــ ٢٠ ميكروجرام من صياغة gD2t (في العضل) ثم حقنـــت في الجلد اسفل البطن بجرعات مختلفة من gD2t في محلول ملح بعد ١٣ يوم .

قرئ الاختبار الجلدي بعد ٢٤ و ٢٨ ساعة .

٥ E = احمرار في موضع الحقن الجلدي

I = تقيح عند موضع الحقن .

ND = لم يظهر

جدول ٨ : المناعية المقارنة لطعم GD٢T شبه MPL- ٣D بصياغته المختلفة في القردة الافريقية الخضراء : الاستجابات المصلية .

الطعم	رقم القرد	التحصين II 14 يوم تركيز الاليزا	التحصين II 14 يوم التركيز التعادلي	التحصين II ٢٨ يوم تركيز الاليزا	التحصين II ٥٦ يوم تركيز الاليزا	التحصين II ٥٦ يوم التركيز التعادلي	التحصين III ١٤ يوم تركيز الاليزا	التحصين III ١٤ يوم التركيز التعادلي
gD٢t شبة	JO٣٥٨	١٣٨٨	٤٠٠	٦٥٧٢	١١٣٥	٢٠٠	٢٠٥٠	٤٠٠
	JO ٣٥٩	٤٧٣١	٤٠٠	٣٢٣٢	١٨٦٦	١٠٠	٢١١٠	٢٠٠
	JO٣٦٣	١٣٧٦	٢٠٠	٢٣١٦	١٣٠٠	٥٠	١٢٠٥	٥٠
	JO ٣٦٤	٥٩١٤	١٦٠٠	٥٢٧٥	٣٧٤٠	٤٠٠	٦٣٢٣	٨٠٠
	JO٣٦٦	٢٠١٠٤	٤٠٠	٣٦٩٦	٢٥٥٠	٢٠٠	٢٣٠٢	٢٠٠
	المتوسط الحسابي	٦٩٠٢	٦٠٠	٤٢١٨	٢١١٨	١٩٠	٢٧٩٨	٣٣٠
	± الانحراف القياسي	±٨١٩٠	±٥٦٥	±١٦٩٧	±١٠٦٢	±١٣٤	±٢٠١٥	±٢٩٠
gD٢t شبة	JO٣٤٨	٧١٢٠	٢٠٠	١٠١٧٥	٤٤٩٠	٢٠٠	١١٠٨٢	٤٠٠
	JO ٣٤٩	١٤٤٣٧	١٦٠٠	١٥٤٠٩	٧٣٦١	٨٠٠	١٥٨٤٨	١٦٠٠
	JO٣٧٥	٧٩٩٠	٨٠٠	٥١٧٠	٢٩٥٣	٨٠٠	٦٧٩٧	١٦٠٠
	JO ٣٦٤	٦٥١٥	٢٠٠	٧٢٤٦	٣٦٦٠	١٠٠	٦٤٩٧	٢٠٠
	JO ٥١٥	٩٠١٥	٧٠٠	٩٥٠٠	٤٦١٦	٤٧٥	١٠٠٥٦	٩٥٠
	المتوسط الحسابي ± الانحراف القياسي	±٣٦٦٤	±٦٦٣	±٤٤٤٢	±١٩٣٤	±٣٧٧	±٤٣٩٢	±٧٥٤

احتوت كل جرعة من الطعم على ٢٠ ميكروجرام gD٢t

تركيز ELISA = متوسط المعيار، المعيار التعادلي = مقلوب أعلى تخفيف مصلي يعطي وقاية ١٠٠ ٪ ضد التاثير الممرض للخلايا .

عناصر الحماية

١ - تركيبة صياغة لقاح تتضمن بروتين سكري D (HSV glycoprotein D) ، أو جزء مناعي منه immunological fragment بالاقتران مع 3- De-O-acylated Monphosphoryl Lipid A وشبه alum.

٢ - تركيبة لقاح طبقاً لعنصر الحماية (١)، حيث يكون البروتين السكري glycoprotein (D) عبارة عن بروتين سكري glycoprotein D HSV – 2 ، أو جزء مناعي منه immunological fragment.

٣ - تركيبة لقاح طبقاً لعنصر الحماية(١) أو (٢)، حيث يكون البروتين السكري glycoprotein ناقص truncated protein .

٤ - تركيبة لقاح طبقاً لعنصر الحماية (٣)، حيث يكون البروتين الناقص يكون $HSVgD_2$، ويتم إخلائه من نطاق التثبيت الطرفي المحتوي على ذرة الكربون C terminal anchor region .

٥ - تركيبة لقاح طبقاً لأي من عناصر الحماية من (١) إلى (٤)، حيث يتم إقتران البروتين السكري glycoprotein D أو جزء مناعي منه immunological fragment. بمادة حاملة دقائقية particulate carrier.

٦ - تركيبة لقاح طبقاً لأي من عناصر الحماية من (١) إلى (٥)، حيث يتواجد دهن 3- De-O-acylated Monophosphoryl Lipid A في مدى من ١٠ ميكروجرام إلى ١٠٠ ميكروجرام للجرعة .

٧ - تركيبة لقاح طبقاً لأي من عناصر الحماية من (١) إلى (٦)، للاستخدام في

دواء

٨ - إستخدام البروتين السكري HSV glycoprotein D، أو جزء منـــاعى منـــه بالإقتران مع 3 De-O-acylated Monophosphoryl Lipid A والشبه alum في إنتاج عقار للوقاية أو العلاج من عدوى HSV.

٩ - طريقة لإنتاج لقاح طبقاً لأي من عناصر الحماية من (١) إلى (٧)، حيــث تتضمن الطريقة خلط بروتين سكري HSV glycoprotein D، أو جزء مناعي منه immunological fragments مـــع 3 De-O-acylated Monophosphoryl Lipid A والشبة alum .