

Adjuvánskombináció-kiszzerelések

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi 3-O-deacilált-mono-foszforil-lipid A vagy monofoszforil-lipid A és ezek származékainak vagy analógjainak alkalmazása egy citokinnel vagy limfokinnel, előnyösen granulocita/makrofág kolónia-stimuláló faktorra vagy interleukin-12-vel kombinációban antigén hatású készítményben, ahol az adjuvánsok kombinációja fokozza az immunválaszt egy gerinces gazdaszervezetben egy kiválasztott antigénre. A kiválasztott antigén származhat (1) patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából, vagy (2) rákos sejtből vagy tumorsejtből vagy (3) allergénből származó olyan polipeptid, peptid vagy fragmens, amely gátolja az IgE termelődését, ezáltal csökkenti az allergénre történő allergiás reakciókat, vagy (4) amiloid-peptidfehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens, hogy megelőzze vagy gyógyítsa az amiloidlerakódással jellemezhető betegséget egy gerinces gazdaszervezetben. A találmány előnyös megvalósítási módjai szerint a kiválasztott antigén HIV-vírusból, *Neisseria gonorrhoeae*-ből vagy respirációs syncytialis vírusból származhat.

A találmány szerinti megoldás alkalmas antigénkészítmények immunológiai képességének fokozására.

Endre

P02001220

10809

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

Képviselő:

Danubia

A2

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

Adjuvánskombináció-kiszerelések

A találmány tárgyát képezi 3-O-deacilált-mono-foszforil-lipid-A vagy monofoszforil-lipid-A és származékainak és analógjainak alkalmazása - citokinnel vagy limfokinnel, előnyösen granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktorról vagy interleukin-12-vel kombinációban - antigén hatású készítményben adjuvánskiszereként, gerinces gazdaszervezetben egy kiválasztott antigénre adott immunválasz erősítése érdekében.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható antigénkészítmények immunológiai képességének fokozására.

Az immunrendszer a patogének megtámadására sokféle mechanizmust alkalmaz. Immunizálás után azonban ezen mechanizmusok nem mindegyike aktiválódik szükségszerűen. Az immunizálással kialakított védő immunitás a vakcinának azon képességétől függ, hogy a patogénnel szembeni ellenállásra vagy megsemmisítésére a megfelelő immunválaszt váltja-e ki. Ez a patogéntől függően sejtközvetített és/vagy humorális immunválasz lehet.

Aktaszámunk: 95621-1846A/SG

A jelenlegi álláspont szerint a segítő ("T-helper, Th") T-sejtek szerepe az immunválaszban az, hogy a T-sejtek az általuk termelt citokinek alapján alosztályokba sorolhatók, és hogy az ezekben a sejtekben megfigyelhető különleges citokinprofil határozza meg a funkciójukat. Ez a T-sejt-modell két fő alosztályt tartalmaz: a Th-1-sejteket, amelyek az interleukin-2-t (IL-2) és az interferon-gammát termelik, amelyek mind a sejtes, mind a humorális immunválaszt serkentik, és a Th-2-sejteket, amelyek az interleukin-4-et (IL-4), az interleukin-5-öt (IL-5) és az interleukin-10-et (IL-10) termelik, amelyek a humorális immunválaszt fokozzák (1).

Gyakran kedvező egy antigén immunológiai képességének növelése, hogy erősebb immunválaszt kapjunk az immunizált szervezetben, és hogy erősítsük a gazda rezisztenciáját az antigént hordozó ágensre. Bizonyos helyzetekben kívánatos eltolni az immunválaszt a túlnyomórészt humorális (Th-2) választól egy kiegyensúlyozottabb, sejtes (Th-1) és humorális (Th-2) válasz felé.

A sejtes válaszok közé tartozik a CD8+ CTL-válasz (citotoxikus T-limfocita). Ilyen válaszok intracelluláris patogénekkal szembeni vakcinák kifejlesztésénél kívánatosak. Számos patogénnel szembeni védekezés erős nyálkahártyareakciót, magas szérumtitert, CTL kiváltását és erős sejtes választ kíván. Ezeket a válaszokat a legtöbb antigénkészítmény, például a hagyományos alegységes vakcina nem váltja ki. Ilyen patogén például a humán immundeficiencia vírus (HIV).

Szükség van tehát olyan antigén hatású készítmény-kiszerelésekre, amelyek gerinces gazdaszervezetben mind humorális, mind sejtes immunválaszt kiváltanak.

A következőkben röviden összefoglaljuk a találmányt. A találmány szerinti megoldás kidolgozásával célunk volt adjuvánskombináció-kiszerelések hasznosítása 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid-A-t (MPL™) vagy monofoszforil-lipid-A-t és/vagy származékaikat és/vagy analógjaikat tartalmazó antigén hatású készítményekben citokinekkal vagy limfokinekkal, előnyösen granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktorral (GM-CSF) vagy interleukin-12-vel (IL-12), vagy a szóban forgó citokin vagy limfokin agonistájával vagy antagonistájával kombinálva. Adjuvánsnak olyan anyagot nevezünk, amely egy immunogénnel vagy antigénnel együtt adagolva fokozza az immunválaszt. A találmány szerinti adjuvánskiszereleést egy kiválasztott antigénnel együtt adagoljuk egy antigén hatású készítményben. A találmány szerinti antigén hatású készítmények fokozzák a kiválasztott antigénre való immunválaszt a gerinces gazdaszervezetben. A kiválasztott antigén származhat (1) patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából, vagy (2) lehet rákos sejtből vagy tumorsejtből származó polipeptid, peptid vagy fragmens, vagy (3) allergénből származó olyan polipeptid, peptid vagy fragmens, amely gátolja az IgE termelődését, ezáltal csökkenti az allergénre történő allergiás reakciókat, vagy (4) amiloid-peptidfehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens, hogy megelőzze vagy gyógyítsa az amiloidlerakódással jellemezhető betegséget egy gerinces

gazdaszervezetben. A találmány egy megvalósítási módja szerint a kiválasztott antigén HIV-vírusból származik. A kiválasztott HIV-antigén lehet egy HIV-fehérje, -polipeptid, a fehérjéből származó peptid vagy fragmens. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a HIV-antigén egy specifikus peptid. A találmány más megvalósítási módjai szerint a kiválasztott antigén *Neisseria gonorrhoeae*-ből vagy respirátoros syncytialis vírusból (RSV, "respiratory syncytial virus") származik.

Az MPLTM vizes oldatban vagy stabilizált olaj a vízben emulzióban (stabil emulzió vagy SE) fordulhat elő. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az olaj a vízben emulzió szkvalént, glicerint és foszfatidilkolint tartalmaz. Az SE-kiszzerelésben az MPLTM-et az adagolás előtt citokinnel vagy limfokinnel keverjük, hogy antigén hatású készítményt nyerjünk. A citokinnek vagy a limfokinnek nem szükséges belépnie az emulzióba. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint az MPLTM SE-formában található. Az antigén hatású készítmény hígítószer vagy hordozót is tartalmazhat.

A találmány tárgyát képezik továbbá egy olyan antigén hatású készítmény képességének fokozására szolgáló eljárások, amelyben a kiválasztott antigén (1) patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származik, hogy gerinces gazdaszervezetben immunválaszt váltson ki, vagy (2) rákos sejtből vagy tumorsejtből származó rákos antigénből vagy tumorról kapcsolatos antigénből származik, hogy a gerinces gazdaszervezetben gyógyító vagy megelőző, rákellenes

hatást fejtsen ki, vagy (3) egy allergénből származik, hogy gátolja az IgE termelődését, ezáltal csökkentse az allergénre történő allergiás reakciókat, vagy (4) amiloid-peptidfehérjéből származik, hogy megelőzze vagy kezelje az amiloidlerakódással jellemezhető betegséget a gerinces gazdaszervezetben, és az antigén hatású készítmény citokin vagy limfokin kombinációjának hatékonyan, adjuváló mennyiségét tartalmazza, előnyösen MPLTM-et GM-CSF-fel vagy IL-12-vel, vagy a citokin vagy limfokin egy agonistáját vagy antagonistáját tartalmazza.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan antigén hatású készítmény képességének fokozására szolgáló eljárások, amelyben a kiválasztott antigén patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származik, hogy citotoxikus T-limfocitákat indukáljon a gerinces gazdaszervezetben, és az antigén hatású készítmény citokin vagy limfokin kombinációjának hatékonyan, adjuváló mennyiségét tartalmazza, előnyösen MPLTM-et GM-CSF-fel vagy IL-12-vel, vagy a citokin vagy limfokin egy agonistáját vagy antagonistáját tartalmazza.

A következőkben röviden ismertetjük az ábrák leírását.

Az 1. ábrán reciprok végponttitereket mutatunk be, amelyeket CFA-val vagy IFA-val (háromszögek) kiegészített, 25 µg T1SP10MN(A) (-Cys)-sel - egy 39 aminosavból álló multiepitóp peptiddel - vagy 50 µg MPLTM 2%-os stabil emulziójával (SE) (négyzetek) immunizált öt nőtény Balb/c-egér

csoportjából határoztunk meg. Az egereket a 0. napon immunizáltuk és az immunizálást a 28. napon erősítettük meg ("boost" oltás). A peptidspecifikus IgG-, IgG1- és IgG2a-titerek a 42. napon gyűjtött szérumokban határoztuk meg ELISA-módszerrel.

A 2. ábrán külön-külön az SE, az MPLTM vagy az MPLTM SE hatását mutatjuk be GM-CSF adjuváló tulajdonságaira anti-T1SP10MN(A) (-Cys) IgG-titerekben. Öt nőstény Balb/c-egert immunizáltunk 25 µg T1SP10MN(A) (-Cys)-sel a 0. napon, majd a 28. napon a jelzett adjuvánskiszerelekkel erősítettük meg az immunizálást. A CFA-val, valamint az IFA-val 1:1 arányú emulziót képeztünk a vizes peptiddel. A GM-CSF-et 10 µg/adag mennyiségben alkalmaztuk. Az MPLTM-et az egerek 50 µg végkoncentrációban kapták vizes kiszerelekben, vagy 25 µg mennyiségben 1% SE-vel stabil emulzióban. A titereket két héttel a második immunizálást követően határoztuk meg. Az adatok 5 egérből egyedileg meghatározott titereket jelentenek.

A 3. ábrán a vírusneutralizációs vizsgálat eredményeit mutatjuk be. A 0. és a 28. napon a feltüntetett kiszerelekkel immunizált egerekből a 42. napon vett, egyesített szérumokat hígítottuk (1/1600) és *in vitro* T-sejthez adaptált HIV_{MN} hígításaihoz adtuk az AA5-sejtekhez történő hozzáadás előtt. Hét napos tenyésztést követően a sejttenyészet felülszójában a vírusreplikáció jelzőjeként víruseredetű reverz-transzkriptáz jelenlétét vizsgáltuk.

A 4. ábrán T1SP10MN(A) (-Cys)-szel és különböző adjuvánskiszerezésekkel immunizált egerekből származó lépsejtek szaporodását mutatjuk be. A lépsejteket 4 napon keresztül *in vitro* stimuláltuk 3,3 µg/ml T1SP10MN(A) (-Cys)-szel. Az eredményeket a jelölt timin beépülésének változásában mutatjuk be T1SP10MN(A) (-Cys)-szel történő *in vitro* stimulációt követően a stimuláció nélküli beépüléshez viszonyítva (delta cpm).

Az 5. ábrán egerből a második immunizálást követő hetedik napon izolált lépsejtek CTL-aktivitását mutatjuk be. A lépsejteket a 0. napon és a 21. napon 1% SE-ben lévő 50 µg MPLTM-mel és 10 µg GM-CSF-fel vagy anélkül kiszerezelt 50 µg T1SP10MN(A) (-Cys)-szel immunizált, három Balb/c egerből vettük. A sejteket HIV_{MN}-CTL-epitóppeptiddel tenyésztettük hét napon keresztül. Az utolsó öt nap alatt IL-12-t adtunk a tenyészetekhez. Effektor lépsejteket adtunk a feltüntetett arányokban HIV_{MN} vagy egy másik, HIV_{IIIB}-nek jelölt sejt hatásának pulzusszerűen kitett vagy peptid nélküli, krómmal jelölt P815-sejtekhez. A százalékos CTL-aktivitást a következőképpen számoltuk:

$$\frac{\text{specifikusan felszabadult cpm} - \text{spontán felszabadult cpm}}{\text{teljes maximális cpm} - \text{spontán felszabadult cpm}} \times 100$$

teljes maximális cpm - spontán felszabadult cpm

"E:T" az effektornak a célsejthez ("target cell") viszonyított arányát jelenti

A következőkben részletesen ismertetjük a találmányt.

Az adjuvánsok, citokinek és limfokinek olyan immunmoduláló vegyületek, amelyek serkenteni és irányítani képesek az immunválasz fejlődését és profilját különböző, önmagukban gyengén immunogén antigénekkal szemben. Az adjuvánsok, citokinek és limfokinek helyes megválasztása olyan kedvező humorális és sejtes immunválaszt indukálhat, amely az adjuváns, citokin vagy limfokin hiányában nem alakulna ki. Előnyösen az adjuvánsok, citokinek és limfokinek szignifikáns mértékben hozzájárulnak a vakcinákban lévő alegység- vagy peptidantigénekkal szemben kialakuló immunválasz fokozásához. A stimuláló hatásuk a fehérjeantigénekkal szembeni, antigénspecifikus immunválaszok kifejlődése szempontjából is kedvező. Számos olyan antigén esetében, amelyek erős nyálkareakciót, magas szérumtitert, CTL indukcióját és erős sejtes reakciókat kívánnak, az adjuváns- és citokin/limfokin-kombinációk olyan ingert biztosítanak, amelyre a legtöbb antigénkészítmény nem képes.

Számos tanulmányban vizsgálták a különböző adjuváns-kiszerezéseket állati modellekben, de jelenleg az alumínium (alumínium-hidroxid vagy alumínium-foszfát) az egyetlen szabadalmaztatott adjuváns széleskörű, humán területen történő alkalmazásra. Az adjuvánsok egyik csoportja, a különböző, stabil, víz olajban vagy olaj a vízben emulziók számottevő figyelmet kaptak az immunológiai serkentő képességük miatt. Ezek a készítmények általában metabolizálható vagy inert olajok különböző kombinációiból állnak, amelyek stabilizálják és raktározzák az antigént az injekció he-

lyén. Ilyen adjuváns az inkomplett Freund-adjuváns (IFA), amely ásványi olajból, vízből és egy emulzióképző anyagból áll. A komplett Freund-adjuváns (CFA) hővel inaktivált Mycobacteriumokkal kiegészített IFA. Az ilyen típusú adjuvánsok alkalmazása esetén fellépő probléma az injekció helyével kapcsolatos irritáció, amely gyakran granulomás sérüléseket okozó, mononukleáris sejtbeszűrődés eredménye. Lehetséges adjuvánsokként tehát más vegyületeket és készereleket is vizsgálnak.

Egy ilyen vegyület a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid-A (MPLTM), amely Ribi ImmunoChem Research Inc.-től szerezhető be (Hamilton, MT). Az MPLTM leírása a 4.912.094 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban található (2), amely a kitanítás részét képezi.

Mostanában a Ribi ImmunoChem Research Inc. készített egy metabolizálható olaj a vízben készereleket, amely MPLTM-mel keverve az MPLTM SE jelű, stabilizált emulziót eredményezi. A stabilizált emulzió az MPLTM-nek szqualénolajjal, glicerinnel és foszfatidilkolinnal készült mikrofluidizációjával állítható elő. Ez a készerele GMP-minőségű, mikrofluidizált emulzió. Az 1% vagy 2% olajat tartalmazó emulziókat a következőkben leírt kísérletekben ismertettjük.

Az MPLTM SE nem okoz az injekció helyével kapcsolatos szöveti károsodást, ha szubkután vagy intramuszkulárisan Balb/c-egerekbe adagoljuk. Összehasonlítás céljából egy ugyanezeket a komponenseket, de MPLTM nélkül tartalmazó, stabilizált emulziót is készítettünk. Konkrétan, MPLTM SE

és GM-CSF adjuvánsokkal kisserelt, 40 aminosavat tartalmazó HIV-peptiddel, a T1SP10MN(A)(+Cys)-szel vagy a ciszteinben hiányos, 39 aminosavból álló T1SP10MN(A)(-Cys) peptiddel (amelyben a 40 aminosavból álló peptid 17. aminosava, a cisztein hiányzik) történő szubkután vagy intramuszkuláris immunizálás nem okozott észrevehető sejtes beszűrődést vagy szöveti rendellenességet két héttel az immunizálás után.

A találmány oltalmi körébe tartozik monofoszforil-lipid-A, az MPLTM prekursor formájának alkalmazása is, amelyet szintén a 4.912.094 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetnek (2). A találmány oltalmi körébe tartozik továbbá az MPLTM és a monofoszforil-lipid-A származékai és analógjai.

Citokineknek és limfokineknek vakcinakészítményekbe történő beépítése ígéretesnek tűnik a vakcina képességének kiterjesztése és fokozása érdekében (3). Az interleukin-12 (IL-12) citokinről kimutatták, hogy sejtközvetített immunitást vált ki és fokozza azt a segítő T-sejt-alosztálynak Th1-citokinprofil felé történő eltolásával (azaz egérmódelben IgG2-alosztály felé) (4-6). Egérben a rekombináns, egéreredetű IL-12-ről kimutatták, hogy Th1-ben domináns immunválaszprofil kialakulását segít elő (3).

Az IL-12-t sok antigénbemutató sejt, előnyösen makrofágok és monociták, termeli. Ez alapvető eleme a natív T-sejtekből Th1-sejtekké történő alakulás kiváltását. Az IL-12 termelődéséről vagy a rá való érzékenységről kimutatták, hogy fontos szerepet játszik védő Th1-szerű reakciók kifejlődésében, például parazita-fertőzések, leginkább

Leishmaniasis során (7). Az IL-12 hatásait nagymértékben az NK-sejtek és a segítő T-sejtek által termelt interferon-gamma közvetíti. Az interferon-gamma alapvető fontosságú az IgG2a-ellenanyagoknak T-függő fehérjeantigénekre történő indukciójához (8) és a T-független antigénekre történő IgG3-reakciókhoz (9). Az IL-12, amelyet eredetileg természetes "killer" (NK) sejtet stimuláló faktornak neveztek, heterodimer citokin (10). Az IL-12-fehérje rekombináns gazdaszövetekben történő expresszióját és izolálását a közzétett WO 90/05147 számú nemzetközi szabadalmi iratban ismertetik (11).

Egy másik citokin, amely adjuvánsként feltehetőleg ígéretes lehet, a GM-CSF. A GM-CSF a kolóniastimuláló faktor (CSF) egy különleges típusa. A CSF a limfokinek azon családja, amely a csontvelőben lévő őssejtek érett vérsejtek specifikus típusává történő differenciálódását indukálja. A GM-CSF makrofágokat vagy prekursor monocitákat aktivál, ezáltal nem specifikus tumorellenes aktivitást közvetít, mint ezt az 5.078.996 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetik (12), amely a leírás részét képezi. A humán GM-CSF-et kódoló nukleotidszekvenciát már leírták (12). A GM-CSF cDNS-ét tartalmazó plazmidot *E. coli*-ba transzformálták, és az American Type Culture Collectionnél (ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) 39900 letéti számon letétbe helyezték. Mint az 5.229.496 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban (13), amely a leírás részét képezi, ismertetik, a GM-CSF-gént is beépítették egy élesztőeredetű

expressziós plazmidba, és az ATCC-nél 53157 letéti számon letétbe helyezték. Továbbá, mint az 5.073.627 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban (14), amely a leírás részét képezi, ismertetik, egy olyan GM-CSF-et, amelyről glikozilációs helyeket eltávolítottak, kódoló DNS-szekvenciát letétbe helyeztek az ATCC-nél 67231 számú letéti számon.

A GM-CSF-ről kimutatták, hogy pozitívan szabályozza az antigénbemutató sejteken lévő fehérjemolekulákat, amelyekről ismert, hogy fokozzák az immunválaszt, (15), és hat az Ig kiválasztására is tisztított, egéreredetű B-sejtekben (16).

Más citokinekről vagy limfokinekről kimutatták, hogy immunmoduláló aktivitásúak, például, de nem kizárólag az interleukin-1-alfáról, -1-bétáról, -2-ről, -4-ről, -5-ről, -6-ról, -7-ről, -8-ról, -10-ről, -13-ról, -14-ről, -15-ről, -16-ról, -17-ről és -18-ról, az interferon-alfáról, -bétáról és -gammáról, a granulocita stimuláló faktorról és az alfa és béta tumornekrozis-faktorokról.

Bármilyen citokin vagy limfokin szisztémás adagolásával összefüggésben jelentőséggel bírnak a citokin vagy limfokin aktivitásával kapcsolatos biológiai következmények. Továbbá, az antigénspecifikus immunválaszok kialakulásával kapcsolatos citokin- vagy limfokinaktivitásoknak fokozódniuk kellene, ha a citokin vagy limfokin helyi koncentrációját fenntartjuk.

Korábbi vizsgálatokban a GM-CSF-et és az IL-12-t külön-külön vizsgálták, és az immunválasz különböző paramétereiben növekedést tapasztaltak.

A találmányi leírásban kimutatjuk, hogy egy antigén kombinációja egy kiválasztott citokin- vagy limfokin-adjuvánssal és a második adjuvánssal, MPLTM-mel (előnyösen stabil, metabolizálható emulzióban) növeli az antigén-specifikus immunválaszokat.

A találmány szerinti antigénkészítményekben történő részvételre kiválasztott antigének fehérjékből származó peptidek vagy polipeptidek, valamint a következők bármelyikének fragmensei: szacharidok, fehérjék, poli- vagy oligonukleotidok vagy más, makromolekuláris komponensek. A leírás szerinti értelemben a "peptid" kifejezésen legalább hat aminosav sorozatát értjük, amely legalább egy antigéndeterminánst tartalmaz, míg a "polipeptid" kifejezésen a peptidnél hosszabb molekulát értünk, amely azonban nem teljes hosszúságú fehérje. A leírás szerinti értelemben a "fragmens" kifejezésen egy teljes szacharid, fehérje, poli- vagy oligonukleotid vagy más, makromolekuláris komponens egészénél kisebb részét értjük. HIV esetében a találmány szerinti antigénkészítmények teljes hosszúságú HIV-fehérjéket is tartalmaznak.

A találmányt HIV-ből származó peptidantigéneket alkalmazó modellrendszer segítségével szemléltetjük. Ezeket a peptideket az US 5.013.548 számú (17) és az US 5.019.387 számú (18) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetik vagy ezekből származnak, amelyek a leírás részét

képezik, és itt röviden összefoglaljuk. Ezek a peptidek HIV-burokfehérje egy szakaszának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmaznak, amellyel szemben neutralizáló ellenanyagok és T-sejtválaszok indukálhatók.

A HIV humán retrovírus, amely a szerzett immunhiányos szindrómát, az AIDS-t okozza. A HIV az immunrendszer T-limfocitáit fertőzi a külső burookban lévő glikoproteinjének a T-limfociták felületén lévő CD4-molekulához (T4) történő kapcsolódásával, így módon a CD4-molekulát (T4) használva fel receptorként a T-sejtbe történő bejutáshoz és a T-sejtek fertőzésére. Az eddigi, arra vonatkozó kísérletek, hogy immunizálással HIV-fertőzésre specifikus, védő immunválaszt alakítsanak ki, kevés sikert hoztak. Számos megközelítési módot alkalmaznak annak érdekében, hogy hatékony és védő vakcinastratégiát fejlesszenek ki. Ilyenek például, HIV-ből származó antigénepitópokat expresszáló, attenuált (gyengített) és rekombináns bakteriális vektorok (19), rekombináns adenovírusok (20) vagy vakcinia vírusvektorok (21), DNS-vakcinák (22) és HIV különböző T- és B-sejtepitópjait tartalmazó szintetikus peptidek (23) alkalmazása is.

A HIV külső burok-glikoproteinjéről, a gp120-ról kimutatták, hogy neutralizáló ellenanyagokat indukál emberben. A PB1 rekombináns fehérjéről, amely a teljes gp120-molekula körülbelül egyharmadát kódolja, kimutatták, hogy a burokfehérjének azt a részét tartalmazza, amely a neutralizáló ellenanyagok termelődését váltja ki. Csimpánzokban végzett vizsgálatok szerint azonban sem az ép gp120, sem a

PB1 nem tudja neutralizáló ellenanyagok termelődését magas titerrel indukálni.

Hagyományos eljárásokkal rövid peptideket szintetizáltak, amelyek a gp120 antigéndeterminánsainak felelnek meg, és a gp120-szal szemben ellenanyag-reakciót indukáltak, amely semlegesíti a vírust és a vírussal szemben segítő T-sejtes és CTL-válaszokat indukál.

Egy ilyen peptid a C4/V3-multiepitópot tartalmazó, T1SP10MN(A) (+Cys)-nek jelölt HIV-1_{MN}-peptid, és egy ciszte-inben deletált variánsa, a T1SP10MN(A) (-Cys). Ezek a peptidek tartalmazzák a Th-, a T_{CTL}- és a B-epitópokat, de nem indukálnak CD4-kötést gátló ellenanyagokat. Korábban már kimutatták, hogy ezek a C4/V3-HIV-peptidek ígéretes je-löltek immunválaszok kiváltására, ha CFA-val vagy CFA-szerű adjuvánsokkal együtt adagolják (24-29). Ezek a peptidek olyan epitópokat tartalmaznak, amelyek CD4+ Th-sejt-válaszokat váltanak ki mind egerekben, mind humán szerve-zetben, és tartalmazzák mind az alapvető fontosságú neutra-lizáló determinánst, mind pedig egy helyet, amelyet a CD8+ CTL ismer fel mind Balb/c-egérben, mind HLA B7+ típusú, hu-mán szervezetben. A 39 aminosavból áll peptidről mostanában mutatták ki, hogy veszélytelen és immunogén HIV-vel fertő-zött betegekben (28).

A T1SP10MN(A) (+Cys) szekvenciája a következő 40 aminosavból áll:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile
His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (1. azonosítószámú szekvencia) (26).

A T1SP10MN(A) (-Cys)-t a 17. helyzetben lévő cisztein nélkül szintetizálták, és a szekvenciája a következő 39 aminosav:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His
Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (2. azonosítószámú szekvencia).

Ez a cisztein aminosav a Th-sejtek, a CTL vagy a B-sejtek által felismert, működőképes epitópokon kívül helyezkedik el. A vírusgenom különböző szakaszaiból származó, egyéb HIV-peptideket az US 5.861.243 számú (30), az US 5.932.218 számú (31), az US 5.939.074 számú (32), az US 5.993.819 számú (33), az US 6.037.135 számú (34) amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban és a közzétett, EP 671.947 számú európai közzétételi iratban ismerttetnek (35), amelyek a leírás részét képezik.

A HIV-antigén származhat egy fehérjéből, vagy lehet a fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens. A fehérje lehet glikoprotein, például gp41, gp120 vagy gp160. Egy másik lehetőségként a fehérje lehet a gag, pol, vif, rev, vpr, tat, nef vagy env gének által kódolt fehérje. Az ezekből a fehérjékből származó peptidek legalább egy

antigéndeterminánst (epitópot) tartalmaznak, legalább hat aminosav hosszúságban.

A HIV-peptidre történő immunválasz a peptidnek egy gyógyászatilag elfogadható hordozómolekulához történő kovalens kötésével (konjugálásával) fokozható. Alkalmas hordozómolekulák például a tetanusztoxin, a diftériatoxin, a kürtőscsiga ("keyhole limpet") hemocianinja és más, a HIV gp120-glikoproteinje T-sejt-epitópjának megfelelő peptidek.

Úgy gondoljuk, hogy HIV-vel szembeni sikeres vakcinastratégiának HIV-re nyálkahártya-immunitást, valamint megfelelő CTL-választ kell kiváltania. A közelmúltban egereken T1SP10MN(A) multiepitóp-peptiddel és egy nyálkahártya-adjuvánssal, koleratoxinnal végzett kísérletben kimutatták, hogy intranazális immunizáció neutralizáló szérum IgG1-ellenanyagok termelődését váltotta ki (36). Egy ezt követő vizsgálatban, amelyben szintén HIV-V3-hurokpeptideket alkalmaztak, nyálkahártyában szintetizált IgA-ellenanyag indukcióját és erős sejtközvetített válaszokat, például peptidspecifikus CTL-t tapasztaltak (37). A szisztémás és neutralizáló ellenanyagok magas titerének funkcionális szerepe a megelőzésben vagy a HIV-fertőzött egyedek stabilizálásában még nem ismert, de a vírusspecifikus ellenanyag magas titere feltehetőleg a vírus terjedésének megelőzésében játszik fontos szerepet.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint egy, MPLTM-et tartalmazó, stabil, olaj a vízben emulziót szerelünk ki, amelyet azután IL-12- vagy GM-CSF-citokinekkal keverünk. A következőkben bemutatott adatok

szemléltetik, hogy ezek a kombinációk HIV-neutralizáló szérumellenanyagok magas titerét eredményezik. Az MPLTM SE és a GM-CSF kombinációja antigénspecifikus IgG- és IgA-ellenanyagok magas titerét váltja ki immunizált, nőstény egerek vaginájában. Az egereknek akár MPLTM SE-vel, akár GM-CSF-fel kisserelt T1SP10MN(A)-peptidekkel történő immunizálása erős, sejtes immunválaszt vált ki, amely fokozott antigénspecifikus sejtszaporodással és citokineknek a tenyészetbe történő kiválasztásával, valamint peptid-specifikus CTL-válaszokkal jellemezhető.

Általában MPLTM-nek vagy MPLTM SE-nek GM-CSF-fel vagy IL-12-vel és egy választott fehérjével vagy peptiddel történő antigén/adjuváns kisserelése antigénspecifikus és vírust neutralizáló ellenanyag magas titerét indukálja, az IgG-alosztály arányában szignifikáns eltolódást eredményez a komplementkötő IgG-ellenanyagok nagyobb aránya felé (egerekben az IgG2a javára), citokinek magasabb szintű termelését és mononukleáris sejtekből sejtproliferációt eredményez az *in vitro* antigénstimulációra válaszul. Ezek a tulajdonságok nem figyelhetők meg az antigénnek és az SE-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő kissereléseivel MPLTM hiányában. A találmány szerinti kisserelések kedvező sejtes immunválaszokat is kiváltanak, amelyek CTL indukciójával jellemezhetők.

Az MPLTM SE előnye, hogy ez a kisserelés nem okoz granulomás felhalmozódást és gyulladást az injekciózás helyén, ilyen injekciós helyhez kapcsolódó reakciók a víz

olajban vagy olaj a vízben adjuvánskiszerezésekre jellemző-
ek.

Azt a képességet, hogy helyi granulomás gyulladás
nélkül fokozott immunválasz váltható ki az MPLTM serkentő
hatásai révén GM-CSF-fel vagy IL-12-vel kombinációban, még
nem írták le egyetlen más, jelenleg HIV kezelésére alkalma-
zott adjuvánskiszerezésre sem.

Vizsgálatsorozatot végeztünk, hogy összehasonlítsuk
az MPLTM (akár SE-vel együtt, akár nélküle) plusz GM-CSF-et
vagy IL-12-t MPLTM-mel, SE-vel, GM-CSF-fel, IL-12-vel vagy
CFA/IFA-val egyedileg vagy egy HIV-peptiddel együtt. Az
eredmények összefoglalója a következőkben található, ame-
lyet még részletesebb tárgyalás követ.

Az első kísérletben MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel kisse-
zelt C4/V3-HIV-peptiddel, T1SP10MN(A) (-Cys)-szel szubkután
immunizált Balb/c-egerekben a szérum IgG-titere több mint
10⁷ már két immunizálás után. Az ellenanyag-reakció HIV-
neutralizáló, és szignifikáns növekedés volt tapasztalható
a peptidspecifikus IgG1-, IgG2a- és IgG2b-ellenanyag-
titerekben is. A peptiddel tenyészetben stimulált lépsejtek
magasabb szinten bocsátottak ki IL-4-et, IL-5-öt és inter-
feron-gammát. Összefoglalva, ezek az adatok kiegyensúlyo-
zott Th1/Th2-típusú reakció indukcióját jelzik. Az MPLTM
SE-vel és GM-CSF-fel immunizált egerek vaginális öblítő-
folyadékában T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus IgG- és IgA-
ellenanyagokat lehetett kimutatni. Ezek az adatok azt mu-
tatják, hogy MPLTM SE és GM-CSF kombinációja egy HIV-
peptidantigénnel kedvező immunválaszprofilt indukál.

Ebben az első kísérletben a T1SP10MN(A) (-Cys) HIV-peptiddel és egy SE-tartalmú adjuvánskiszerelessel, vagy GM-CSF-fel immunizált Balb/c-egerekben peptidspecifikus IgG-ellenanyag-titer termelődött (1. táblázat). Szekvalénből, glicerinnél és emulzióképző anyagból (foszfátidilkolin) álló, olaj a vízben stabil emulzióról (SE) kimutatták, hogy növeli a peptidspecifikus IgG-titeret, ha T1SP10MN(A) (-Cys)-szel keverik. Az SE-vel kiserelt, 25:g T1SP10MN(A) (-Cys)-szel történő immunizálással előállított IgG-titeret másodlagos reakciótiteret indukáltak, amely körülbelül egyötöde volt a peptiddel és CFA-val immunizált, és IFA-ban lévő peptiddel megerősített ("boosted") egerekben kiváltott reakciónak. A CFA/IFA-val kiserelt vakcinát kapó egerekben jellemzően T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus IgG-titeret fejlődtek ki az elsődleges immunizálás hatására. Összehasonlítási célokból egereket csak 25:g T1SP10MN(A) (-Cys)-peptiddel is immunizáltunk.

Az MPLTM vizes és SE kisereléseit összehasonlítottuk egerek Freund-adjuvánsokkal vagy IL-12- és GM-CSF-citokinekkal történő immunizálásával kiváltott válaszokkal. Az IL-12-vel kevert T1SP10MN(A) (-Cys)-t kapó egerekben általában nem termelődött peptidspecifikus ellenanyag-titer több ismételt vizsgálatban. Ezzel szemben a GM-CSF-et vagy MPLTM SE-t T1SP10MN(A) (-Cys)-szel kapó egerek alacsony, de könnyen kimutatható IgG-ellenanyag-titeret állítottak elő. Az MPLTM SE-t és T1SP10MN(A) (-Cys)-peptidet tartalmazó kiserelésekhez IL-12 vagy GM-CSF hozzáadása szignifikánsan magasabb IgG-titeret eredményezett az immunizálást köve-

tően. Egerek MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel kombinációban történő immunizálása reprodukálhatóan magasabb másodlagos választitereket eredményezett, mint bármilyen más, vizsgált kissereléssel immunizált egerekben meghatározott titerek. A peptidspecifikus IgG-titerek magasabbak voltak, mint a Freund-adjuvánsokkal kisserelt akár 125 µg T1SP10MN(A)(-Cys)-szel immunizált egerekben kialakult titerek.

A HIV-specifikus immunválasz kedvező tulajdonsága, hogy egyensúlyt tart a sejtes és humorális komponensek között. Bizonyos immunglobulin izotípus-alosztályok kapcsolatba hozhatók a segítő T-sejtek alosztálytípusainak eltolódásával akár Th1, akár Th2 túlsúlya felé. Az ezen segítő T-sejt-alosztályok által kiválasztott citokinekről kimutatták, hogy IgG-alosztályok váltását irányítják. Az IgG-alosztály végponttitereit két héttel a második immunizálást követően gyűjtött, egyesített szérumokból határoztuk meg (2. táblázat). Az egereknek csak T1SP10MN(A)(-Cys)-szel, vagy akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel együtt történő kisserelésével végzett immunizálása egyáltalán nem, vagy csak alacsony IgG-alosztály-titert eredményezett több, ismételt kísérletben. IgG3-Ellenanyagokat ELISA-módszerrel nem lehetett kimutatni. A CFA-val emulziót képezett T1SP10MN(A)(-Cys)-szel immunizált és IFA-val megerősített egerek csoportjában túlnyomórészt T1SP10MN(A)(-Cys)-re specifikus IgG1-ellenanyag-válasz fejlődött ki. A peptidnek SE-vel, MPLTM SE-vel, MPLTM SE-vel és IL-12-vel vagy MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel történő kisserelései szintén magas IgG1-ellenanyag-titereket váltottak ki. Az SE-vel kisserelt vak-

cinákat kapó egerekben ismételten szignifikáns IgG1-, viszont nem szignifikáns IgG2a- vagy IgG2b-titerek lehetett kimutatni. Az MPLTM-nek az SE-kiszereelésbe történő bevétele magasabb, T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus IgG2a- és IgG2b-ellenanyag-titerek eredményezett. Akár IL-12-nek, akár GM-CSF-nek MPLTM SE-vel és T1SP10MN(A) (-Cys)-szel együtt történő kiszerelése eltolódást eredményez az IgG1:IgG2a ellenanyag-titer-arányokban. Citokin nélkül az MPLTM SE-vel kiszereelt vakcinák hasonló IgG1- és IgG2a-titerek indukáltak. Mind az IL-12, mind a GM-CSF növelte a peptidspecifikus IgG2a relatív szérumkoncentrációját. Továbbá, MPLTM SE és GM-CSF kombinációja szintén szignifikánsan növelte a T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus IgG2b-ellenanyag-titerek (47-szeres az MPLTM SE-vel és 74-szeres az SE-vel összehasonlítva). Az MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel T1SP10MN(A) (-Cys)-peptiddel együtt immunizált egerekben kialakult titerek következetesen a legmagasabbak voltak bármilyen vakcinát kapó csoporttal összehasonlítva.

Annak vizsgálatára, hogy a T1SP10MN(A) (-Cys)-szel, MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel immunizált egerek egyesített szérumából mért magas titerek a csoportban lévő egyedi egerekre is reprezentatívak-e, a csoporton belüli egerek egyedi titereit összehasonlítottuk a Freund-adjuvánssal kiszereelt peptiddel immunizált egerekből mért titerekkel (1. ábra). Kiderült, hogy az egyedi IgG-, IgG1- és IgG2a-szérumtiterek átlaga hasonló volt az egyesített szérumból mért titerekhez (az adatokat nem mutatjuk). A T1SP10MN(A) (-Cys)-nek MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel együtt történő kiszere-

lése szignifikánsan magasabb IgG-, IgG1- és IgG2a-titerek eredményezett a CFA/IFA-val immunizált egerek ellenanyagtitereinél. Minden, MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel kiegészített peptiddel immunizált egérben magasabb IgG-ellenanyag-titer indukálódott, mint a CFA/IFA-kiszerezéssel immunizált egerekben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy MPLTM SE-nek GM-CSF-fel történő kombinációja kedvező ellenanyagválasz-profil alakít ki, amelyet peptidspecifikus ellenanyag magas titere és kedvező IgG-alosztályeloszlás jellemez. Ez a kiszerezés valamennyi alkalmazott vakcinakiszerezés közül rendszeresen a legmagasabb, T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus titert váltotta ki.

Összehasonlítottuk a vizes MPLTM-mel, SE-vel vagy MPLTM SE-vel kiegészített GM-CSF-fel immunizált egerek T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-titereit, hogy meghatározzuk a GM-CSF adjuvánskiegészítőként való hatását (2. ábra). Az eredmények szerint MPLTM SE kombinációja GM-CSF-fel és peptiddel ezen előnyös megvalósítási mód szerint egyedülállóan magas ellenanyagtitert indukál. Az MPLTM GM-CSF-fel együtt a CFA/IFA-hoz hasonló titert váltott ki. Az MPLTM és a GM-CSF adjuváns hatása tehát szinergisztikus, ha együtt szereljük ki, és ahol az MPLTM akár vizes formában van jelen, akár stabil emulzióként.

Ezután a T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus ellenanyag-titerek mérték egerek egyesített vaginális öblítőfolyadékában négy héttel a második immunizálást követően (3. táblázat). Az MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel együtt immunizált egerekben mind IgA-, mind IgG-ellenanyagok magas

titerét tapasztaltuk. A más kiszerezésekkel immunizált egerekből származó vaginális öblítőfolyadékban ellenanyag-titerek rutinszerűen nem lehetett kimutatni. Mivel az IgG-nek IgA-hoz viszonyított aránya vaginális öblítésnél az IgG-nek kedvez, és mivel sIgA-szintet nem mutattunk ki, levonható az a következtetés, hogy a vaginális öblítőfolyadékban kimutatott IgA-ellenanyag helyileg szintetizálódott a nyálkahártyaszövetekben. Valószínű, hogy a mért IgA- és IgG-titerek a vaginális nyálkahártyához képest disztálisan elhelyezkedő plazmasejtek által kiválasztott immunglobulin eredménye.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy MPLTM SE-vel és akár IL-12-vel, akár GM-CSF-fel kombinációban kiszerezelt HIV-peptiddel, a T1SP10MN(A)(-Cys)-szel immunizált egerekben magas a peptidspecifikus szérumellenanyag titere.

Annak eldöntésére, hogy ez az ellenanyag-titer funkcionálisan hatékony-e, vizsgáltuk a szérumnak azt a képességét, hogy gátolja-e sejtek HIV egy laboratóriumi törzsével *in vitro* történő fertőzését. A vizsgálatnál a megfelelő HIV-törzzsel fertőzött sejtek tenyészetének felülúszójában a vírus által kiválasztott reverz-transzkriptáz-aktivitást mértük. Mind az MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel, mind az MPLTM SE-vel és IL-12-vel immunizált egerekből származó szérum szignifikánsan csökkentette a vírus fertőzőképességét (3. ábra). A maximális víruseredetű reverz-transzkriptáz-aktivitás 9481 egységtől 10411 egységig terjedt. Az ezzel a kiszerezéssel immunizált egerekből származó szérum gátolta a vírus replikációját. Még a vírus 1/20 hígításában is az

MPL™ SE-vel és GM-CSF-fel T1SP10MN(A) (-Cys)-szel együtt immunizált egerekből származó szérumok a vírus replikációját körülbelül ötven százalékkal csökkentették. A szérum neutralizációs titerét erre a kisserelésre 1600-nál nagyobbak határoztuk meg összehasonlítva az MPL™ SE, IL-12 és HIV-peptid kissereléssel immunizált egerekből nyert szérumnál mért 71 értékkel.

Ezekből az egerekből a szérum anti-T1SP10MN(A) (-Cys)-titere hasonló volt (bár valamennyire magasabb), mint az egerek CFA-val és IFA-val történő immunizálásával kiváltott titerek. A CFA/IFA-val emulziót képezett T1SP10MN(A) (-Cys)-szel immunizált egerekből származó szérumok nem mutattak HIV-neutralizáló aktivitást ebben a vizsgálatban. A peptiddel és MPL™ SE és GM-CSF kombinációjának adjuvánsként történő alkalmazásával immunizált egerekből származó szérumok neutralizáló aktivitása magasabb volt, mint bármilyen más szérumé. Azonos hígításokban az MPL™ SE plusz GM-CSF-fel és a HIV-peptiddel immunizált egerekből származó szérumok a vírus nagyobb koncentrációit neutralizálták, mint a más vakcinakissereléseket kapó egerekből származó szérumok.

A HIV-peptidre specifikus lépsejtek szaporodását is mértük tenyészetben. A T1SP10MN(A) (-Cys)-re történő sejtes reakcióképesség méréseként lépsejteket *in vitro* tenyésztettünk peptiddel vagy kontrollfehérjékkal. A vizsgálatban az osztódó sejtek DNS-ébe beépült ³H-timidint mértük (4. táblázat). Az adjuváns nélkül immunizált egerekből származó lépsejtektől eltérően az SE-vel kisserelt T1SP10MN(A) (-

Cys)-szel immunizált egerekből származó lépsejtek erősen szaporodtak a peptid hatására. A vakcinát kapó egerekből származó lépsejtek tenyészetben nem reagáltak irreleváns antigénre (lizozim) vagy antigén nélküli stimulációra. Mindegyik csoport hasonlóan reagált ConA mitogénnel történő stimulációra. A legtöbb csoportban nem tapasztaltunk antigénspecifikus, dóziszfüggő szaporodást. A peptid mindhárom dózisában a legnagyobb mértékű szaporodást az MPLTM SE-vel együtt kisserelt GM-CSF-fel immunizált egerek csoportjánál figyeltük meg. A legkisebb mértékű szaporodást a CFA/IFA-val vagy IL-12 plusz HIV-peptiddel kisserelt vakcinákkal immunizált egerek csoportjából származó lépsejteknél mértük. A peptiddel és akár SE-vel, akár GM-CSF-fel immunizált egerekből származó lépsejtek a tenyészetben hasonló mértékben építették be a timidint. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy HIV-peptidnek MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel történő együttes kisserelése indukálja a legjobban egéreredetű lépsejtek szaporodását az *in vitro* antigénbemutatás hatására.

Tenyésztett lépsejtek azon képességét vizsgáltuk, hogy IL-4-citokint (5. táblázat) és interferon-gammát (6. táblázat) választanak ki a tenyészet felülúszójába. Ezeket a citokineket mértük a tenyészet felülúszójában, amelyet három és hat nappal az antigénnel vagy mitogénnel történő *in vitro* stimulációt követően vettünk vizsgálat alá. Az IL-4, egy 2-típusú segítő T-sejttel kapcsolatos citokin mérése azt mutatta, hogy ConA mitogénnel történő stimulációt követően a 3. napon valamennyi csoport kimutatható szinten ter-

melt IL-4-et, azonban csak az MPLTM SE-vel vagy MPLTM SE plusz GM-CSF-fel immunizált egerek állítottak elő IL-4-et peptidstimulációt követően. Csak az MPLTM SE plusz GM-CSF-fel és T1SP10MN(A)(-Cys)-szel immunizált egerek választottak ki a tenyészetbe kimutatható szinten IL-4-et a lépsejtek stimulálására alkalmazott valamennyi peptiddózisnál. A tenyészet hatodik napján a peptiddal és MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel együtt immunizált egerekből származó lépsejtek magasabb szinten szecernáltak IL-4-et, mint amilyen a peptiddal és MPLTM SE-vel, MPLTM SE plusz IL-12-vel vagy SE-vel immunizált egerekből kimutatható IL-4 szintje volt. Az IL-4 szintje még a tenyészetben ConA-val stimulált sejtek által kiválasztott IL-4 szintjénél is magasabb volt. Az MPLTM SE plusz GM-CSF-fel immunizált egerekből származó, tenyésztett lépsejtek IL-5-öt (egy másik 2-típusú, segítő T-sejttel kapcsolatos citokin) is kimutatható szinten választottak ki a tenyészetbe a T1SP10MN(A)(-Cys)-szel történő stimulációt követő hatodik napon (az adatokat nem mutatjuk). Egyetlen más csoportból származó lépsejtek sem termeltek IL-5-öt ezekben a tenyészetekben.

Tenyészetben ConA-val történő három napos stimulációt követően valamennyi egércsoportból származó lépsejtek kimutatható szinten szecernáltak interferon-gammát a tenyészetbe (6. táblázat). Csak MPLTM SE-vel vagy MPLTM SE plusz GM-CSF-fel immunizált egerekből származó sejtek termeltek kimutatható szinten interferon-gammát a HIV-peptiddal történő három napos stimulációt követően. A tenyészet hat napos stimulációjának végére magasabb interferon-gamma koncentrá-

ció alakult ki mind ConA, mind a peptid hatására. Jelentős volt az MPLTM SE-vel vagy MPLTM SE plusz GM-CSF-fel immunizált egerekből származó lépsejtek tenyészetének felülúszójában mért interferon-gamma-szint. Az ebből a két csoportból származó lépsejtek számottevően magasabb koncentrációban választottak ki interferon-gammát a tenyészet felülúszójába, mint a peptiddel és MPLTM SE plusz IL-12-vel vagy SE-vel együtt immunizált egerekből származó lépsejtek.

Az első kísérlet eredményei azt mutatják, hogy MPLTM-nek egy stabil, olaj a vízben emulzióba történő bevétele, majd az emulziónak a T1SP10MN(A) (-Cys) HIV-peptiddel és GM-CSF-fel történő kombinálása neutralizáló ellenanyagok termelődését váltja ki. Továbbá, a GM-CSF-nek MPLTM SE-vel és egy vakcinaantigénnel történő együttes kisserelése IL-4-nek, IL-5-nek és interferon-gammának a tenyészet felülúszójába fokozott szinten történő kiválasztását eredményezi, valamint az immunizáló antigénnel tenyészetben stimulált lépsejtek szaporodását fokozza. A vizsgált vakcinakisserelések közül ez a kisserelés indukálja a legmagasabb IgG-, IgG2a- és IgG2b-titereket. Csak MPLTM SE és GM-CSF peptiddel történő kombinációjával immunizált egerek csoportjában lehetett IgG- és IgA-titereket kimutatni a vaginális öblítőfolyadékban több ismételt kísérlet során következetesen. Az MPLTM SE, az IL-12 és a peptid kombinációja IgG1 és IgG2a fokozott szintjét, fokozott vírusneutralizációt, fokozott lépsejtszaporodást és IL-4 és interferon-gamma szekrécióját eredményezi.

Az egerek HIV-peptiddel kisserelt, bármilyen egyetlen adjuvánssal történő immunizálása sem alakított ki neutralizáló ellenanyag-termeléssel járó immunválaszt.

Gyakran megfigyelhető volt, hogy egerek T1SP10MN(A) (-Cys)-szel, MPL™ SE-vel vagy MPL™-mel vizes kisserelésben történő immunizálása magas ellenanyagtitert biztosított. Ezek a kisserelések azonban reprodukálhatóan nem váltottak ki olyan immunválaszt, amelyre vaginális ellenanyagtitert és neutralizáló ellenanyagtitert (vagy erős CTL-válasz, mint ezt a következőkben a 8. kísérletnél ismertetjük) jellemző. Adott esetben MPL™ vagy MPL™ SE a peptiddel kombinálva mérhető mennyiségű IgA- és IgG-titert váltott ki a vaginális öblítőfolyadékban. Néhány vizsgálatban a vakcinakisserelésben akár IL-12-nek, akár GM-CSF-nek MPL™-hez történő hozzáadása hasonló titereket eredményezett, mint amely CFA/IFA-val vagy bármilyen, citokinnel együtt lévő vagy citokin nélküli MPL™ SE kissereléssel immunizált egerekben érhető el. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy az MPL™ stabil emulzió formája (SE) nem szükséges a HIV-peptidre specifikus antiszérum magas titeréhez. Az SE-hordozóhoz GM-CSF hozzáadása növekedést okoz a peptid-specifikus titerekben a csak SE-vel, vagy SE-vel és IL-12-vel immunizált egerekkel összehasonlítva. Általában azonban a magas IgG2a- és IgG2b-ellenanyag-titerek a peptidnek MPL™ SE-vel és GM-CSF-fel történő kisserelésétől függtek. Érdeemes megjegyezni, hogy ez a kisserelés hasonló IgG-titert váltott ki, mint amely más kisserelésekkel, például CFA/IFA és peptid, történő immunizálással alakítható ki. Az

MPL™ SE-nek GM-CSF-fel és peptiddel történő kombinálása volt az egyetlen olyan kísérlet, amelynél mind magas titerű neutralizáló ellenanyag, mind CTL indukcióját ki tudtuk mutatni (8. kísérlet). Az MPL™ SE és a peptid mellett az IL-12 alkalmazása szintén kedvező immunválasz-profilot indukál. Az eredmények azt mutatják, hogy MPL™ SE-nek GM-CSF- vagy IL-12-citokinekkal történő együttes kísérlete minőségi különbséget eredményez az ellenanyag-reakcióban a CFA és IFA-val történő immunizálással összehasonlítva. Ez a különbség valószínűleg a magasabb IgG2a- és IgG2b-szinteknek tulajdonítható.

A második kísérletben az első, Balb/c-egert és HIV-peptidet alkalmazó kísérlet menetét követtük kis módosításokkal. Az MPL™-et vizes formában is adagoltuk citokinnel vagy citokin nélkül.

A Balb/c-egerek adjuváns nélküli T1SP10MN(A) (-Cys) HIV-peptiddel történő immunizálása nem indukált szignifikáns ellenanyagtitert. Ezzel szemben a peptidantigénnek különböző adjuváns/citokin anyagokkal történő kombinációja magas ellenanyagtitert eredményezett két immunizálást követően.

Peptiddel és IL-12-vel vagy csak SE-vel történő immunizálás az adjuváns nélkül történő immunizálás esetén megfigyelhető titerekhez hasonló titert indukált (7. táblázat). A GM-CSF-fel együtt kísérletelt peptidet kapó egerekben csak mérsékelten emelkedett a titer. A CFA/IFA-t tartalmazó vakcinát kapó egerekkel összehasonlítva a mikrofluidizált MPL™ SE hasonló peptidspecifikus titer kifejlődését ered-

ményezte. A CFA/IFA-vakcinát kapó egerekkel összehasonlítva az MPLTM SE peptidspecifikus IgG2a magasabb szintjét indukálta. Az alkalmazott immunizálási körülmények kihathatnak a megfigyelt ellenanyagtiterekre. Az egereknek (vizes) MPLTM-mel kisserelt peptiddel történő immunizálása peptid-specifikus ellenanyag magas szintű termelődését váltotta ki. GM-CSF-nek vagy IL-12-nek ehhez a kissereléshez történő hozzáadása 10⁶-nál magasabb titert eredményezett. Egy HIV-peptidnek MPLTM-mel és IL-12- vagy GM-CSF-citokinekkal történő kombinációja a peptidre specifikus ellenanyag magas titerét indukálta.

A csak peptiddel és akár MPLTM-mel és IL-12-vel, akár MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel immunizált egerek csoportjában fejlődött ki vaginális öblítőfolyadékból kimutatható ellenanyag viszonylag magas titere (8. táblázat). Valóban csak az MPLTM-mel és IL-12-vel és a peptiddel együtt immunizált egerek csoportjában termelődött peptidspecifikus IgA.

Tenyészetben a lépsejtek szaporodási képességét a peptiddel történő *in vitro* stimuláció hatására beépült timidin mennyiségével határoztuk meg. A 9. táblázat adatait oly módon adjuk meg, hogy normalizáljuk a szaporodást a maximális szaporodásra standardizálva, amelyet ConA-val történő stimulációval határoztunk meg. Az MPLTM SE-vel akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel együtt immunizált, valamint a csak GM-CSF-fel immunizált egerekből származó lépsejteknél peptiddel kapcsolatos szaporodás csak alacsony szinten volt tapasztalható. Ezzel szemben az MPLTM-mel és GM-CSF-fel

kombinált peptiddel immunizált egerekből származó lépsejtek szignifikáns szaporodást mutattak.

Az *in vitro* tenyésztett lépsejtekből származó citokintermelődést is mértük. IL-4 esetében csak az MPLTM SE-vel GM-CSF-fel és T1SP10MN(A)(-Cys)-szel együtt immunizált egerek szecernáltak megfelelő szinten IL-4-et peptiddel történő stimuláció hatására (10. táblázat). Interferon-gamma esetében, az MPLTM SE-vel és akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel együtt, vagy vizes MPLTM-mel és GM-CSF-fel vagy IL-12-vel együtt immunizált egerekben termelődött ebből a citokinből kimutatható mennyiség a tenyészet felülúszójába (11. táblázat).

A GM-CSF- vagy IL-12-citokineknek MPLTM-mel vagy MPLTM SE-vel történő kombinációja tehát a peptidantigénre specifikus ellenanyag magas titerét indukálja. A titerek hasonlóak, mint az egerekben peptiddel és CFA/IFA-val történő immunizálással kapható titerek. Az eredmények azt mutatják, hogy ezek a készítmények váltják ki a legerősebb szaporodási reakciót tenyészetben lévő lépsejtekben, valamint lépsejtek olyan populációját alakítják ki, amelyek a legmagasabb szinten választják ki az interferon-gammát peptidstimuláció hatására.

Ennek a második kísérletnek az eredményei azt mutatják, hogy T1SP10MN(A)(-Cys)-nek MPLTM-mel és GM-CSF- vagy IL-12-citokinekkel történő együttes kisserelése hasonló vagy jobb immunválaszprofilt eredményez, mint amely peptiddel és CFA-val immunizált, és peptiddel és IFA-val megerősített immunizálást kapó egerekben fejlődik ki.

Két héttel a második immunizálást követően az injekciós hely szövettani vizsgálata alapján a mikrofluidizált MPLTM SE-vel immunizált egerekben nem alakult ki vagy nem maradt fent mononukleáris sejtbeszűrődés a bőrben. A hematoxinilin/eosinnal festett szövetek hasonlóan néztek ki, mint az adjuvánst nem kapókból származó szövetek. Ezzel szemben az adjuvánsként CFA-val és IFA-val (víz olajban emulzió) immunizált Balb/c-egerekben ezen a területen a mononukleáris sejtek nagymértékben felhalmozódtak. Az MPLTM SE-t GM-CSF-fel és peptiddel együtt kapó egerekben mononukleáris sejtek észlelhető, de nem számottevő növekedését tapasztaltuk az MPLTM SE-t GM-CSF nélkül kapókkal összehasonlítva. A csak GM-CSF-fel és peptiddel immunizált egerekből származó szöveteket nem vizsgáltuk.

A harmadik kísérletben a második kísérlet menetét követjük, de Balb/c-egerek helyett Swiss-Webster-egereket alkalmaztunk. Swiss-Webster-egereket alkalmaztunk az adjuvánst a HIV-peptidantigénnel történő kölcsönhatásának kiértékelésére, ahol az MHC-re korlátozott segítő T-sejtepitóp nem befolyásolja az immunválaszt. A Swiss-Webster-egerek vérfrissített egértörzs, és mint ilyen, sejt vizsgálatokat nem végeztünk. Ebben a kísérletben csak a HIV-peptid elleni, reciprok IgG-végponttitert és a vaginális öblítőfolyadékban az IgG- és IgA-ellenanyagok reciprok végponttitereit mértük. Mint a 12. és 13. táblázatokban látható, a reakcióprofil az első és a második kísérletben, a Balb/c-egerekkel kapott eredményekhez hasonló.

A negyedik kísérletet a második kísérlethez hasonlóan végeztük Balb/c-egerekkel, kis változtatásokkal. Mint a 14. táblázatban bemutatjuk, az MPLTM-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő adjuvánskiszserelése észrevehetően magasabb IgG GMT-választ váltott ki, mint az MPLTM egyedül. A 15. táblázatban bemutatjuk, hogy az MPLTM SE-nek GM-CSF-fel együtt történő adjuvánskiszserelése szignifikáns IgG2b-alosztály-reakciót váltott ki. Az MPLTM-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő adjuvánskiszserelése kimutathatóan magasabb IgG2a-alosztály-reakciót indukált, mint az MPLTM egyedül, míg az MPLTM SE-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő kiszserelése magasabb IgG2a-alosztály-reakciót váltott ki, mint az MPLTM egyedül. Mint a 16. táblázatban bemutatjuk, az MPLTM-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő adjuvánskiszserelése észrevehetően magasabb IgG-titert eredményezett a vaginális öblítőfolyadékban, mint az MPLTM egyedül. Végül, mint a 4. ábrán látható, az MPLTM-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő adjuvánskiszserelése, valamint az MPLTM SE-nek akár GM-CSF-fel, akár IL-12-vel történő adjuvánskiszserelése a lépsejtek nagyobb mértékű szaporodását indukálták, mint az MPLTM, illetve az MPLTM SE egyedül.

Az ötödik kísérletben a második kísérlet menetét követtük kis változtatásokkal Balb/c-egerek alkalmazásával. Ebben a kísérletben nem használtunk IL-12-t az adjuvánskiszserelésekben. A 17. táblázatban látható, hogy mind MPLTM-et, mind GM-CSF-et tartalmazó adjuvánskiszserelések észlelhetően magasabb IgG2a- és IgG2b-válaszokat váltottak

ki, mint csak az MPLTM. Továbbá, a mind MPLTM-et, mind GM-CSF-et tartalmazó adjuvánskiszerelek számottevően magasabb reakciót adtak valamennyi IgG-alosztályra, mint az MPLTM egyedül.

A hatodik kísérletben a második kísérlet menetét követtük Balb/c-egerek alkalmazásával, kis módosításokkal, ebben a kísérletben IL-12-t nem alkalmaztunk az adjuvánskiszerelekben. A HIV-peptid 40 aminosav hosszúságú volt, mivel a 17. helyzetben egy ciszteint is tartalmazott. A 18. táblázatban látható, hogy a mind MPLTM SE-t, mind GM-CSF-et tartalmazó adjuvánskiszerelek szignifikánsan magasabb szintű reakciót váltottak ki valamennyi IgG-alosztálynál, mint MPLTM egyedül és valamennyi alosztálynál kimutathatóan magasabb reakciót eredményezett, mint az MPLTM SE egyedül.

A hetedik kísérletben a hatodik kísérlet menetét követtük Balb/c-egerek alkalmazásával, kis módosításokkal, ebben a kísérletben IL-12-t nem alkalmaztunk az adjuvánskiszerelekben. A 19. táblázatban látható, hogy a mind MPLTM SE-t, mind GM-CSF-et tartalmazó adjuvánskiszerelek észrevehetően magasabb szintű reakciót váltottak ki valamennyi IgG-alosztálynál, mint csak az MPLTM SE, valamint a mind MPLTM-et, mind GM-CSF-et tartalmazó adjuvánskiszerelek észlelhetően magasabb reakciót váltottak ki valamennyi IgG-alosztálynál, mint az MPLTM egyedül.

A nyolcadik kísérletben a funkcionális sejtközvetített immunitás mérésére a multiepitóp T1SP10MN(A)(+Cys)-peptiddel együtt kiserelt MPLTM SE-vel vagy MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel immunizált egerekből származó lépsejtek azon ké-

pességét vizsgáltuk, hogy HIV_{MN}-specifikus CTL-válaszokat vált-e ki.

Az 5. ábrán látható, hogy MPLTM SE-vel vagy MPLTM SE plusz GM-CSF-fel immunizált egerekből származó lépsejtek alacsony aktivitást mutatnak a jelöletlen vagy IIIB CTL-epitóppal pulzusszerűen jelölt célsejtek felé. Az MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel együtt kiszerelt T1SP10MN(A)(+Cys)-szel immunizált egerekből származó lépsejtek jó HIV_{MN}-specifikus CTL-aktivitást indukáltak egyetlen immunizálást követően. A célsejt HIV_{MN}-specifikus, CTL-közvetítette lízise számottevően fokozódott, ha hét nappal a második immunizálást követően mértük (5. ábra). Más kísérletekben az adjuváns nélkül immunizált egereknél nem alakult ki CTL-reakció. Vizes MPLTM-mel és peptiddel immunizált egerekben alacsony (<30%) peptidspecifikus CTL-reakciót tapasztaltunk.

A HIV-vel szembeni, immunogén készítmények lehetséges hatékonyságának kiértékelését nehezíti, hogy HIV-vel fertőzött nem humán emlősökben AIDS-szerű tünetek nem fejlődnek ki. Egy lehetséges állati modellben nem alakul ki a HIV által okozott, humán szervezetre jellemző tünetegyüttes. Szerencsére a majomimmunodeficiencia-vírussal (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) - amely HIV közeli rokona - fertőzött nem humán emlősökben AIDS-szerű tünetek kifejlődnek.

Ez lehetővé teszi SIV-antigének kiértékelését nem humán emlősökben. A SIV-antigén lehet fehérje, a fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens. A fehérje lehet glikoprotein, például gp41, gp120 vagy gp160. Egy másik lehetőségként a fehérje lehet például a gag, pol, vif, rev,

vpr, *tat*, *nef* vagy *env* gének által kódolt fehérje. Az ezekből a fehérjékből származó peptidek legalább egy, legalább hat aminosav hosszúságú antigéndeterminánst (epitópot) tartalmaznak.

A HIV-hez hasonlóan, multiepitóp SIV-peptidek alkalmazhatók nem humán emlősökben. Vizsgálatot végeztünk arra vonatkozólag, hogy különböző peptidek MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel kombinációban CTL-választ váltanak-e ki. Makákó majmokat (*Rhesus macacus*) szubkután immunizáltunk a 0., 4., 8. és 18. héten MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel a következő három peptid közül valamelyikkel együtt (lásd 20. táblázat):

1) Mindegyik peptid tartalmazott egy Mamu A*01-re korlátozott CTL-epitópot, a következők szerint:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (3. azonosítószámú szekvencia) (gag) (38, 39)

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (4. azonosítószámú szekvencia) (pol) (40)

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (5. azonosítószámú szekvencia) (env) (40)

2) Egy másik lehetőségként ezen három peptid mindegyike közös T-helper-epitóphoz van kötve, amelynek a következő a szekvenciája:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala (6. azonosítószámú szekvencia) (41 alapján)

A három peptidnek tehát a következő a szekvenciája:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln
Met (7. azonosítószámú szekvencia)

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu
Val (8. azonosítószámú szekvencia)

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln
Ile (9. azonosítószámú szekvencia)

Minden második héten vért vettünk, amelyet heparinnal kezeltünk és a perifériás vér mononukleáris sejtek CTL-válaszát vizsgáltuk ^{51}Cr -felszabadulási vizsgálattal, friss perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC, "peripheral blood mononuclear cell") és tenyésztett PBMC tetramer-festésével. A friss PBMC tetramerfestése és a citolitikus pusztulás ^{51}Cr -felszabadulással nem mutatott ki semmilyen aktivitást. Makákó majmok MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel kiszereelt, Mamu A*01-re korlátozott Th/CTL-peptidkeverékkel történő immunizálásával tetramer-pozitív, CD8-pozitív T-sejteket lehetett kimutatni. A 21-24. táblázatokban közölt eredményeket az adott peptiddel 11 napon keresztül tenyésztett PBMC-ben kimutatott pozitív, tetramer-pozitív CD8+ (21-23. táblázatok) vagy CD4+ (24. táblázat) T-sejtek százalékában mutatjuk be.

Összefoglalva, mind a négy Mamu A*01-re pozitív állapotban, amelyeket a CTL-epitópokkal akár Th-epitópokkal együtt (Rh55, Rh142) akár nélküle (Rh73, Rh80) immunizál-

tunk, akár gag-ra, pol-ra, akár env-re specifikus CD8-pozitív, tetramer-pozitív sejteket lehetett kimutatni. Az elvárásainknak megfelelően tetramer-pozitív CD8-sejteket nem mutattunk ki Mamu A*01-re negatív állatokban (Rh41, Rh47). SIV gag-ra és env-re specifikus immunválaszok az alapozó immunizálás után is kimutathatók, míg a pol-specifikus tetramer-pozitivitás csak megerősítő immunizálás után tapasztalható. Mivel a 18. héten kapott, végső, megerősítő adag a választ nem erősítette tovább, a 14. hét utáni adatokat nem mutatjuk be a 21-24. táblázatokban.

Összefoglalva, makákó majmok (*Rhesus macacus*) immunizálása Mamu A*01-re korlátozott Th/SIV gag, pol és env CTL-epitóp-peptidkeverékkel, amelyet adjuvánsként MPLTM SE-vel és humán GM-CSF-fel egészítünk ki, sejtes reakciókat váltott ki, mint ezt az érzékeny és specifikus tetramer-vizsgálat bizonyítja.

Neisseria gonorrhoeae porin B fehérjéjét, amely PIB-fehérjeként is ismeretes, rekombináns módon expresszálták (42, amely a leírás részét képezi) és lehetséges antigénnek tartják *Neisseria gonorrhoeae* okozta fertőzés megelőzésére és kezelésére.

Vizsgálatsorozatot végeztünk, hogy összehasonlítsuk MPLTM (akár SE-vel, akár nélküle) plusz GM-CSF-et vagy IL-12-t csak MPLTM-mel (akár SE-vel, akár nélküle) *Neisseria gonorrhoeae* porin B fehérjéjének egy olyan módosított változatával együtt immunizálva, amelyben az aminoterminális végen 16 aminosav egy fágból származik, amelyet a porin B

fehérje érett formája követ. Az eredmények összefoglalását az alábbiakban adjuk közre.

Az első kísérletben a rekombináns porin B fehérjével szubkután, fartőben immunizált Swiss-Webster-egerek antigénspecifikus ellenanyagot állítottak elő, amely azt mutatja, hogy a porin B fehérje antigénként használható. A GM-CSF-nek MPLTM-hez és porin B fehérjéhez történő hozzáadása növelte a szérumban az IgG- és IgG2a-ellenanyagok titerét a csak MPLTM-et és porin B fehérjét kapókkal összehasonlítva (lásd 25. és 26. táblázatok).

A második kísérletben a porin B fehérjével plusz IL-12-vel és MPLTM-mel vagy MPLTM SE-vel szubkután, fartőben immunizált Swiss-Webster-egerekben magasabb antigénspecifikus ellenanyag-titer (előnyösen IgG) alakult ki a porin B fehérjét plusz MPLTM-et vagy MPLTM SE-t kapókkal összehasonlítva. Magasabb titereket tapasztaltunk mind az első, mind a második immunizálást követően. A kísérletekbe IL-12 bevétele a vaginális öblítőfolyadékban az IgG-titert körülbelül tízszeresére növelte (27. táblázat).

Humán respirátoros syncytialis vírus (RSV, "respiratory syncytial virus") tisztított, natív fúziós (F) fehérjéje a natív, dimér formában lehetséges antigénjelölt az RSV által okozott fertőzések megelőzésére (43, amely a leírás részét képezi).

Vizsgálatsorozatot végeztünk, hogy összehasonlítsuk MPLTM (akár SE-vel, akár nélküle) plusz GM-CSF-et vagy IL-12-t MPLTM-mel (akár SE-vel, akár nélküle), alumínium-foszfáttal vagy StimulonTM QS-21-gyel külön-külön és RSV

tisztított, natív F-fehérjéjével együtt. Az eredmények összefoglalását az alábbiakban adjuk közre.

Az első kísérletben a natív RSV F-fehérjével intramuszkulárisan immunizált Balb/c-egerek antigénspecifikus ellenanyagot termeltek, amely azt mutatja, hogy az F-fehérje lehetséges antigénjelölt. GM-CSF-nek MPLTM-hez történő hozzáadása magasabb végponttitereket eredményezett az F-fehérjével szemben, mint csak az MPLTM egyedül mind az első, mind a második immunizálást követően (lásd 28. táblázat), valamint erősebb sejtes választ indukált lépsejtek *in vitro* stimulálására, mint az MPLTM egyedül (lásd 29. táblázat). A GM-CSF-nek MPLTM SE-hez történő hozzáadása az F-fehérjére fokozottabb elsődleges IgG-választ eredményezett, mint csak az MPLTM SE (lásd 28. táblázat).

A második kísérletben az első kísérlet menetét ismételtük meg. A GM-CSF-nek MPLTM-hez történő hozzáadása az F-fehérjére magasabb végponttitert eredményezett, mint csak az MPLTM mind az első, mind a második immunizálást követően (lásd 30. táblázat). GM-CSF-nek MPLTM SE-hez történő hozzáadása az F-fehérjére magasabb végponttitert eredményezett, mint csak az MPLTM SE mind az első, mind a második immunizálást követően (lásd 30. táblázat). GM-CSF-nek F-fehérje plusz MPLTM vagy MPLTM SE kiegészítésekhez történő hozzáadása nagyobb százalékban indukált RSV-specifikus CTL-aktivitást a lépsejteknél, mint az olyan készítmények, amelyekben nem volt GM-CSF, mint ez az immunizált egerek lépsejtjeinél kimutatható volt (lásd, 31. táblázat).

A harmadik kísérletben IL-12-vel helyettesítettük a GM-CSF-et. Az IL-12-nek MPLTM-mel történő együttes kiszerezése magasabb IgG-titereket eredményezett az első immunizálást követően összehasonlítva az F-fehérjének csak az MPLTM-mel történő beadásakor kapott titerekkel (lásd 32. táblázat). Azonban IL-12-nek MPLTM-hez vagy MPLTM SE-hez történő hozzáadásának nem volt hatása az effektor sejtek *in vitro* stimulációját követően mért RSV-specifikus CTL-aktivitásra (lásd, 33. táblázat).

Vizsgálatot végeztünk, hogy összehasonlítsuk csak MPLTM-et egyedül (akár SE-vel, akár nélküle) MPLTM plusz GM-CSF-fel influenzavírus NP-fehérjével (nukleokapszid) együtt. Nem állt rendelkezésre elegendő mennyiségű NP az ellenanyagtiterek mérésére. Az NP-peptiddel, adjuvánssal vagy anélkül immunizált egerekben a lépsejtek antigénstimulációra történő reakcióját 14 nappal az utolsó immunizálást követően vizsgáltuk. A GM-CSF-nek az MPLTM-et vagy MPLTM SE-t tartalmazó kiszerezésekbe történő felvétele a CTL-aktivitás erőteljes csökkenését eredményezte (az adatokat nem mutatjuk).

Nem világos, hogy miért kaptuk ezeket az eltérő eredményeket. Lehet, hogy a vizsgálat elvégzése közben léptek fel technikai problémák.

A találmány szerinti antigén hatású készítmények befolyásolják az immunreakciót a gerinces gazdaszervezet ellenanyagválaszának és sejtközvetített immunitásának serkentésével egy patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származó, kiválasztott antigént és citokinnel

vagy limfokinnel, előnyösen GM-CSF-fel vagy IL-12-vel kombinált MPLTM (vizes vagy stabil emulzió formában) hatékonyan adjuváló mennyiségét tartalmazó antigén hatású készítmény adagolását követően. Más citokinekről és limfokinekről is kimutatták, hogy immunmoduláló hatásuk van, például, de nem kizárólag az interleukin-1 α -ról, interleukin-1 β -ról, -2-ről, -4-ről, -5-ről, -6-ról, -7-ről, -8-ról, -10-ről, -13-ról, -14-ről, -15-ről, -16-ról, -17-ről és -18-ról, az interferon-alfáról, -bétáról és -gammáról, a granulocita kolóniastimuláló faktorról és a tumornekrózis-faktor alfáról és bétáról.

Az említett citokinek vagy limfokinek agonistái és antagonistái szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. A leírás szerinti értelemben az "agonista" kifejezésen olyan molekulát értünk, amely serkenti a citokinek vagy limfokinek aktivitását vagy hozzájuk hasonló módon működik. Ilyen agonista például a citokinek vagy limfokinek utánzata. A leírás szerinti értelemben az "antagonista" kifejezésen olyan molekulát értünk, amely gátolja vagy megakadályozza a citokinek vagy limfokinek aktivitását. Ilyen antagonisták például a szolubilis IL-4-receptor és a szolubilis TNF-receptor.

A leírás szerinti értelemben a "hatékonyan adjuváló mennyiség" kifejezésen a leírásban ismertetett adjuvánsok kombinációjának olyan adagját értjük, amely gerinces gazdaszervezetben fokozott immunválasz kiváltására alkalmas. Az adott dózis függ a gazdaszervezet korától, súlyától és egészségügyi állapotától, valamint az adagolás módjától és

az antigéntől. Egy előnyös megvalósítási mód szerint az adjuvánsok kombinációjában MPLTM-et alkalmazunk 1-100 µg/adag mennyiségben. Szakember könnyen megállapíthat megfelelő adagokat. A találmány szerinti antigén hatású készítmények immunológiailag elfogadható hígítószerekkel vagy hordozókkal elegyíthetők egy hagyományos módszer szerint, hogy injektálható, folyékony oldatokat vagy szuszpenziókat kapjunk.

A találmány szerinti antigén hatású készítmények humán vagy nem humán gerinces szervezetnek adagolhatók sokféle módon, például, de nem kizárólag intranasalisan, orálisan, vaginalisan, rectalisan, parenteralisan, intradermalisan, transdermalisan [lásd pl., WO 98/20734 számú nemzetközi bejelentés (44), amely a leírás részét képezi], intramuszkulárisan, intraperitonealisan, szubkután, intravénásan és intraarterialisan. Az antigén hatású készítmény antigénkomponensének vagy -komponenseinek mennyisége részben az antigén fajtájától, részben a gazdaszervezet korától, súlyától és egészségügyi állapotától, valamint az adagolás módjától függ. Még egyszer megjegyezzük, hogy szakember könnyen meghatározhat alkalmas adagokat. Előnyös, bár nem szükséges, hogy az antigén és az adjuvánsok kombinációja egyidőben legyen adagolva. Az adagok számát és az antigén hatású készítmény adagolásának módját szakember szintén könnyen meghatározhatja. Bizonyos esetekben az adjuvánsok kombinációjának adjuvánstulajdonságai révén csökkenthető a szükséges adagok száma vagy az adagolási időszak tartama.

A találmány szerinti adjuvánsok kombinációi megfelelőek patogén mikroorganizmusok széles köréből, például vírusokból, baktériumokból, gombákból vagy humán vagy nem humán gerinces szervezeteket fertőző parazita mikroorganizmusokból, vagy rákos sejtből vagy tumorsejtből származó, sokféle antigént tartalmazó, antigén hatású készítményekben történő alkalmazásra. Az antigén tartalmazhat fehérjékből származó peptideket vagy polipeptideket, valamint a következők bármelyikének fragmenseit: szacharidok, fehérjék, poli- és oligonukleotidok, rákos vagy tumorsejtek, allergének, amiloid-peptidfehérje vagy más, makromolekuláris komponensek. Bizonyos esetekben egynél több antigén is lehet az antigén hatású készítményben.

A találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó, kívánatos, víruseredetű vakcinák például, de nem kizárólag humán immundeficiencia vírus, Simian immundeficiencia vírus, respirátoros syncytialis vírus, parainfluenzavírus 1-3 típusa, influenzavírus, *Herpes simplex* vírus, humán citomegalovírus, hepatitis A vírus, hepatitis B vírus, hepatitis C vírus, humán papillomavírus, poliovírus, rotavírus, calicivírus, kanyaróvírus, mumpszvírus, rubeolavírus, adenovírus, veszettségvírus, kutyafélék szopornyicavírusa, marhavészvírus, koronavírus, parvovírus, fertőző rhinotracheitis vírus, macskafélék leukémiavírusa, macskafélék fertőző peritonitis vírusa, madarak fertőző bursabetegség vírusa, Newcastle-betegség vírusa, Marek-féle betegség vírusa, disznó légzőszervi és reprodukzív szindróma vírusa, ló arteritis vírusa és különböző encephalitis vírusa.

sok okozta betegség megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló vakcinák.

A találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó, kívánatos, bakteriális vakcinák például, de nem kizárólag *Haemophilus influenzae* (mind a típusos, mind a nem típusos), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* - *Mycobacterium intracellulare* komplex, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* és *Mycoplasma gallisepticum* okozta betegség megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló vakcinák.

A találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó, kívánatos, gombapatogének elleni vakcinák például, de nem kizárólag *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* és *Histoplasma* okozta betegség megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló vakcinák.

A találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó, kívánatos, paraziták elleni vakcinák például, de nem kizárólag *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* és *Pneumocystis carinii* okozta betegség megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló vakcinák.

Gerinces gazdaszervezetben gyógyászati vagy megelőző rákellenes hatást kiváltó, kívánatos, a találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó vakcinák például rákantigént vagy tumorról kapcsolatos antigént alkalmaznak, például, de nem kizárólag prosztatára specifikus antigént, carcinoembrionális antigént, MUC-1-et, Her2-t, CA-125-öt és MAGE-3-at.

Gerinces gazdaszervezetben allergénekre történő reakciót befolyásolni képes, kívánatos, a találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó vakcinák például egy allergént vagy ennek fragmensét tartalmazó vakcinák. Ilyen allergéneket ismertetnek az 5.830.877 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban (45) és a közzétett, WO 99/51259 számú nemzetközi közzétételi iratban (46), amelyek a leírás részét képezik, ilyenek például a pollen, rovarméreg, állati méregek, gombaspórák és drogok (például penicillin). A vakcinák gátolják az IgE-ellenanyagok, az allergiás reakciók ismert okozójának termelődését.

Gerinces gazdaszervezetben amiloidlerakódással járó betegség megelőzésére vagy kezelésére szolgáló, kívánatos, a találmány szerinti adjuvánskombinációkat tartalmazó vakcinák például amiloid-peptidfehérje (APP) részeit tartalma-

zó vakcinák. Ezt a betegséget másképpen Alzheimer-betegségnek, amiloidózisnak vagy amiloidogén betegségnek is nevezik. A β -amiloid-peptid ($A\beta$ -peptidnek is nevezik) az APP 42 aminosavból álló fragmense, amely az APP β - és λ -szekretáz enzimekkel történő feldolgozásából származik, és a szekvenciája a következő:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
(10. azonosítószámú szekvencia)

Egyes betegekben az amiloidlerakódás aggregált $A\beta$ -peptid formájában történik. Meglepő módon azt tapasztalták, hogy izolált $A\beta$ -peptid adagolása immunválaszt vált ki az amiloidlerakódás $A\beta$ -peptid-komponensével szemben gerinces gazdaszervezetben (47). A találmány szerinti vakcinák tehát a találmány szerinti adjuvánskombinációkat és $A\beta$ -peptidet, valamint az $A\beta$ -peptid fragmenseit és az $A\beta$ -peptiddel szembeni ellenanyagokat vagy ezek fragmenseit tartalmazzák. Az $A\beta$ -peptid egy ilyen fragmense 28 aminosavból álló peptid, amelynek a szekvenciája a következő (48):

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
(11. azonosítószámú szekvencia).

HIV és SIV esetében az antigén hatású készítmények legalább egy fehérjét, a fehérjéből származó peptidet vagy fragmenst tartalmaznak. Bizonyos esetekben több HIV- vagy SIV-fehérje, -polipeptid, -peptid és/vagy -fragmens található az antigén hatású készítményben.

A találmány szerinti adjuvánskombináció-kiszerezések polinukleotid-vakcinákban (DNS-vakcinákként is ismertek) is alkalmazhatók adjuvánsként. Ilyen vakcinák tartalmazhatnak továbbá segítő anyagokat, például bupivicaint [lásd, 5.593.972 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat (49), amely a leírás részét képezi].

A találmány jobb megértése kedvéért a következő példákat mutatjuk be. A példák csak a szemléltetést szolgálják, és nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

PÉLDÁK

1. kísérlet: Balb/c-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

1. példa

Anyagok és módszerek

Állatok

A nőstény, 7-9 hetes Balb/c-egereket Taconic Farms, Inc.-től szereztük be (Germantown, NY). Az egereket a laboratóriumi állatok gondozásának akkreditálásáért felelős amerikai társaság (American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care) által jóváhagyott körülmények között tartottuk. Az egereket a vizsgálatok megkezdése előtt egy hétig akklimatizáltattuk.

Peptidek

A multiepitóp HIV-1_{MN}-peptid, a T1SP10MN(A) (-Cys) szekvenciája a következő:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His

Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (2. azonosítószámú szekvencia). Ezt a peptidet korábban már leírták (28, 29), és HIV-1 gp120_{MN}-ből származó szekvenciákat tartalmaz, amelyek mind egerekben, mind humán szervezetekben CD4+ Th-sejtválaszokat váltanak ki, egy lényeges, neutralizáló determinánst és egy, Balb/c-egerekben CD8+ CTL által felismert helyet tartalmaz. A peptidet Dr. R. Searce (Duke University, Durham, NC) bocsátotta rendelkezésünkre. A CTL-vizsgálathoz a HIV-1-_{IIIB} V3-hurkában lévő CTL-epitópnak megfelelő peptidet [Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile (12. azonosítószámú szekvencia), H-2D^d-re korlátozott] vagy a HIV-1-_{MN}-ben lévő CTL-epitópnak megfelelő peptidet [Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr (13. azonosítószámú szekvencia), H-2D^d-re korlátozott] Genosys Biotechnologies Inc.-től szereztük be (The Woodlands, TX). A peptideket steril vízben oldottuk és felhasználás előtt megfelelő pufferekben vagy a sejtenyészet tápközegében hígítottuk.

Adjuvánsok

Valamennyi, MPLTM-et tartalmazó adjuvánskészítményt Ribi Immunochem Research, Inc.-től szereztük be (Hamilton, MT). Az MPLTM-et vizes kisserelésben készítettük trietanolamin (Sigma, St. Louis, MO) alkalmazásával. Az oldást követően az MPLTM-et a gyártó útmutatása szerint szonikáltuk, hogy opálos/tiszta oldatot nyerjünk, amit aztán szűrővel sterilizáltunk. Az MPLTM SE előre kisserelt, szkvalén alapú, olaj a vízben emulzió (1-2% olaj), amelynek MPLTM-koncentrációja 0-2500 µg/ml között van. Az alumínium-foszfátot helyben állítottuk elő. A komplett Freund-

adjuvánst (CFA) és az inkomplett Freund-adjuvánst (IFA) Difco Laboratoriestól vásároltuk (Detroit, MI). A T1SP10MN(A)-peptidekkel és a Freund-adjuvánssokkal 1:1 arányú emulziót képeztünk két összekapcsolt fecskendő segítségével. A rekombináns úton expresszált, egérereredetű IL-12-t Genetics Institute-től szereztük be (Cambridge, MA). A rekombináns, egérereredetű GM-CSF-et R&D Systems (Minneapolis, MN) állítja elő és Immunex (Seattle, WA) szállítja, vagy Biosource Internationaltól vásároltuk (Camarillo, CA) hordozótól mentes, liofilizált porként.

Immunizálások

Az egereket fartőben, szubkután immunizáltuk összesen 0,2 ml térfogatban, amelyet a farok két oldalán egyenlően osztottunk el. Az immunizálásokat változó, a következőkben feltüntetett időközökben végeztük. Az antigént és a citokineket foszfáttal pufferelt sóoldatban hígítottuk a megfelelő koncentrációig, és az immunizálás előtt kevesebb, mint 16 órával szereltük ki az adjuvánssokkal steril körülmények között. A vakcinákat enyhe keveréssel homogenizáltuk és 4°C-on tároltuk. A kiszerezéseket közvetlenül az immunizálás előtt vortexszel összekevertük.

Mintavétel

Az állatokat az első immunizálás előtt és a feltüntetett időpontokban véreztettük. Szérumot az egyedi egerekből vizsgáltunk, vagy összegyűjtve a csoporton belüli egerek egyesített szérumát vizsgáltuk. A vaginaöblítést altatott egereken végeztük az ellenanyagszint kiértékelése céljából. Az öblítést 75:1 arányú RPMI-10-nek nőstény egerek vaginá-

jába történő becsepegtetésével végeztük 200:1 pipettával. A vaginát a folyadék többszöri becsepegtetésével és leszívásával mostuk ki, majd az öblítőfolyadékot 10:1-ben FBS-hez adtuk. A vaginális öblítőfolyadékot egyesítve vizsgáltuk.

Sejtkészítmények

A szaporodási vizsgálatokhoz és az *in vitro* citokinmérésekhez az egerekből a feltüntetett időpontokban lépsejteket vettünk. Egyedülálló sejtekből álló sejtszuspenziót készítettünk 3-5 egér egyesített mintájából az eredményekben ismertetettek szerint. A szaporodási és a citokinvizsgálatokhoz a sejteket kerek aljú, 96-lyukú sejtenyésző lemezekben szuszpendáltuk, amelyeket előtte egy éjszakán keresztül HIV-peptid-antigénekkal, kontrollfehérjével vagy csak RPMI-10-zel borítottunk. A lépsejteket 5×10^5 sejt/lyuk mennyiségben vittük a lyukakba 2x töménységű tenyésző tápközeg alkalmazásával. A citokinvizsgálathoz három vagy hat nappal a tenyészet indítása után gyűjtöttünk felülúszót a sejtenyészetből, három lyukból. Közvetlenül a felülúszó kivétele után a tenyészetekhez ^3H -timidint adtunk 18-24 órán keresztül, majd a sejtszaporodás mennyiségi kiértékelése céljából összegyűjtöttük.

Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat

A HIV-peptidre specifikus ellenanyagok és alosztályok eloszlásának vizsgálatára a peptidet karbonát-pufferben (15 mM nátrium-karbonát, 35 mM nátrium-hidrogénfoszfát, pH 9,6) vagy PBS-ben szuszpendáltuk 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban, és 96-lyukú mikrotiterlemezekre vittük (Nunc) 100:1 mennyiségben. Egy éjszakán keresztül 37°C-on történő inkubációt követően

a lemezeket mostuk, majd szobahőmérsékleten, 2-4 órán keresztül blokkoltuk (0,1% zselatin/PBS). Az ELISA-lemezeket mosó pufferrel (PBS, 0,1% TweenTM20) mostuk a sorozatban kihígított szérum hozzáadása előtt (PBS, 0,1% zselatin, 0,05% TweenTM20, 0,02% nátrium-azid). Négy órás inkubációt követően a lemezeket mostuk, és biotinált izotípus/alosztály-ellenanyagok megfelelő hígításait adtuk a lyukakhoz, majd egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. A lyukakat mostuk és sztreptavidinnek kapcsolt torma-peroxidázzal inkubáltuk. Az inkubációt követően a lyukakat mostuk és a színreakciót ABTS-sel fejlesztettük ki. A lemezeket 405 nm-nél olvastuk le. A titereket kontrollszérummal standardizáltuk.

Citokinvizsgálatnál a sejttenyészetek felülúszóját adtuk a BVD6-11B11-gyel (IL-4-ellenanyag) vagy R4-6A2-vel (interferon-gamma mérésénél) borított lyukakhoz. Inkubációt és mosást követően a lyukakban biotinnal jelölt BVD6-24G2-vel (IL-4-nél) vagy XMG 1.2-vel (interferon-gammánál) fejlesztettük ki a reakciót. A citokin koncentrációját rekombináns, egéreredetű interferon-gammával vagy interleukin-4-gyel készült standardgörbével határoztuk meg. Valamennyi citokinreagenst Pharmingentől vásároltuk (San Diego, CA).

HIV-1_{MN} neutralizációs vizsgálatok

A neutralizációs vizsgálatokat Dr. Thomas Matthews laboratóriumában végeztük Duke Egyetemen. Röviden összefoglalva, kódolt szérumot kaptunk a laboratóriumi HIV-1_{MN} vírusizolátum neutralizálására (NIH). A vizsgálatot alapve-

tően a korábban leírtak szerint végeztük (25). A vizsgálati szérum hígításait kis mennyiségekben szétosztottuk a 96-lyukú mikrotiterlemez lyukaiba (25:1/lyuk). Mindegyik lyukhoz azonos mennyiségű, sorozatban hígított vírustörzset adtunk. Inkubációt követően a vírus/ellenanyag keveréket AA5-célsejtekhez adtuk. A sejteket 96-lyukú mikrotiterlemezekben tenyésztettük minden második nap friss tápközeg hozzáadásával. Hét nappal a fertőzést követően a vírusreplikáció és a sikeres fertőzés vagy a fertőzés gátlásának mértékeként a víruseredetű reverz-transzkriptáz jelenlétét értékeltük a felülúszókban.

2. példa

T1SP10MN(A) elleni IgG-ellenanyag reciprok végponttitere

HIV-Peptidre specifikus IgG-ellenanyag reciprok végponttiterét egyesített szérumból (n=5 Balb/c) mértük az első immunizálást követően a feltüntetett időpontokban. Az egereket fartőben, szubkután immunizáltuk 25 µg T1SP10MN(A) (-Cys)-szel - hacsak más nincs feltüntetve - a 0. és a 27. napon. A Freund-adjuvánsokat kapó egerekben az immunizálást CFA-ban emulziót képzett peptiddel kezdtük, majd IFA-val erősítettük meg. Az MPLTM SE-t adagonként 2% szkvalénolajat és 50 µg MPLTM-et tartalmazó emulzióban adtuk. Az SE szkvalént, glicerint és emulzióképző anyagot tartalmazó, olaj a vízben emulziós hordozó. A rekombináns, egéreredetű IL-12-t 50 ng/egér dózisban adagoltuk. A rekombináns, egéreredetű GM-CSF-et 10 µg/egér dózisban adagoltuk. Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-ellenanyag reciprok
végponttitere

Adjuváns	μg HIV-peptid	Végponttiterek		
		4. hét	6. hét	8.hét
Nincs	25	< 100	< 100	< 100
CFA/IFA	25	23998	137683	313200
rIL-12	25	< 100	< 100	< 100
GM-CSF	25	< 100	17579	12537
SE	25	< 100	171923	76479
MPL™ SE	25	< 100	104331	79021
MPL™ SE + rIL-12	25	< 100	1313330	631688
MPL™ SE + GM-CSF	25	14,824	>10000000	3752870

3. példa

T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-alosztály reciprok
végponttitere

A reciprok IgG-alosztály-végponttitereket egyesített szérumokból (n=5 Balb/c) mértük hat héttel az első és két héttel a második immunizálást követően. Az egereket fartőben, szubkután immunizáltuk 25 μg peptiddel, hacsak más nincs feltüntetve. A Freund-adjuvánszt kapó egerekben az immunizálást komplett Freund-adjuvánsban emulziót képzett

peptiddel kezdtük, majd inkomplett Freund-adjuvánssal erősítettük meg a negyedik és hatodik héten. Az MPLTM SE-t adagonként 2% szkvalénolajat és 50 µg MPLTM-et tartalmazó emulzióban adtuk. Az SE szkvalént, glicerint és emulzióképző anyagot tartalmazó, olaj a vízben emulziós hordozó. A rekombináns, egérreredetű IL-12-t 50 ng/egér dózisban adagoltuk. A rekombináns, egérreredetű GM-CSF-et 10 µg/egér dózisban adagoltuk. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-alosztály reciprok
végponttitere

Adjuváns	µg HIV-peptid	Végponttiterek		
		IgG1	IgG2a	IgG2b
Nincs	25	< 100	< 100	< 100
CFA/IFA	25	29907	143	798
rIL-12 (.05)	25	< 100	< 100	< 100
GM-CSF (10)	25	1783	< 100	< 100
SE (2%)	25	74293	< 100	3331
MPL TM (50) SE (2%)	25	11441	10176	5280
MPL TM (50) SE (2%) + rIL-12 (.05)	25	169278	27161	2303
MPL TM (50) SE (2%) + GM-CSF (10)	25	3494862	954707	245828

4. példaVaginális öblítőfolyadék T1SP10MN(A) (-Cys) elleni
IgG- és IgA-ellenanyag-titere

Vaginális, peptid elleni IgG- és IgA-ellenanyag-titerekét két héttel az utolsó immunizálást követően nyert öblítőfolyadékból mértük. Öt Balb/c nőtény egeret immunizáltunk 25 µg T1SP10MN(A) (-Cys)-szel és a feltüntetett adjuvánskiszerezésekkel a 0., 28. és 42. napokon. A vaginális ellenanyagtitereket egyesített öblítőfolyadékból mértük. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázatVaginális öblítőfolyadék T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG- és
IgA-ellenanyag-titerei

Adjuváns	IgG	IgA
Nincs	< 20	< 20
CFA/IFA	20	< 20
rIL-12 (,05)	< 20	< 20
GM-CSF (10)	< 20	< 20
MPL TM (50) SE (2%)	< 20	< 20
MPL TM (50) SE (2%) + rIL-12 (,05)	24	< 20
MPL TM (50) SE (2%) + GM-CSF (10)	1125	113
SE (2%)	< 20	< 20

5. példa

Lépsejtek szaporodása

A T1SP10MN(A) (-Cys)-peptiddel és különböző adjuváns-kiszerezésekkel immunizált egerekből származó lépsejtek szaporodását mértük. Öt Balb/c nőstény egeret immunizáltunk 25 µg T1SP10MN(A) (-Cys)-szel és a feltüntetett adjuvánsokkal a 0. és 28. napokon. A lépsejtekből tenyészetet készítettünk az 56. napon, és 96 órával később ³H-timidin beépülésének mérésére összegyűjtöttük a sejteket. Egereket immunizáltunk 50 ng IL-12-vel, 10 µg GM-CSF-fel, 50 µg MPLTM-mel vizes kiszerezésben vagy 2% SE-vel stabil emulzióban. Az adatokat delta cpm értékekként adjuk meg a stimuláció nélküli tenyészetben szaporodott sejtek szaporodási értékével összehasonlítva. A háttér stimulációs értékek <800 cpm. Az eredményeket a 4. táblázatban mutatjuk be.

4. táblázat

Lépsejtek szaporodása

Adjuváns	Antigén			ConA 1 µg/ml	Lízosim 30 µg/ml	Tápközeg 0 µg/ml
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml			
Nincs	2065	2373	801	50019	628	-
CFA/IFA	1236	878	641	53781	-	-
IL-12	809	692	308	42612	-	-
GM-CSF	25821	19784	14249	55578	-	-
MPL™ SE	46275	41675	40998	45443	413	-
MPL™ SE + IL-12	26560	19907	9600	38989	934	-
MPL™ SE + GM-CSF	74909	66257	62798	37775	366	-
SE	31327	23396	20480	66949	-	-

6. példa

Lépsejtek IL-4-kiválasztása

Vizsgáltuk 25 μg T1SP10MN(A)(-Cys)-szel stimulált lépsejtek által a tenyészetbe kiválasztott interleukin-4 mennyiségét. Öt Balb/c nőstény egérből vett lépsejtekből egyesített készletet alakítottunk ki és a feltüntetett antigénstimulusokkal tenyésztettük (50 ng IL-12, 10 μg GM-CSF, 50 μg MPLTM a jelölés szerint) akár három, akár hat napon keresztül. Az interleukin-4-szinteket ELISA-val határoztuk meg és ismert koncentrációjú standardhoz hasonlítottuk. Az üres lyukak azt mutatják, hogy ezekből a tenyészetekből interleukin-4-et a vizsgálattal nem lehetett kimutatni. A kimutatási érzékenység alsó határa 22 egység/ml. Az eredményeket az 5. táblázatban mutatjuk be.

5. táblázat

Lépsejtek IL-4-kiválasztása

Három napos tenyészetek:

	Antigén					
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml	ConA 1 µg/ml	Lizozim 30 µg/ml	Tápközeg 0 µg/ml
Adjuváns						
Nincs				149		
CFA/IFA				156		
IL-12				156		
GM-CSF				159		
MPL™ SE	297	79	90	134		
MPL™ SE + IL-12				77		
MPL™ SE + GM-CSF	142	151	102	146		
SE				197		

5. tábla (folytatása)

Lépsejtek IL-4-kiválasztása

Hat napos tenyészet:

	Antigén						
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml	ConA 1 µg/ml			
Adjuváns							
Nincs					124		
CFA/IFA					204		
IL-12					146		
GM-CSF					143		
MPL™ SE	163	96	57		63		
MPL™ SE + IL-12	55				76		
MPL™ SE + GM-CSF	511	457	204		76		
SE	41		36		88		

7. példaLépsejtek interferon-gamma-kiválasztása

Vizsgáltuk 25 µg T1SP10MN(A)(-Cys)-szel stimulált lépsejtek által a tenyészetbe kiválasztott interferon-gamma mennyiségét. Öt Balb/c nőstény egérből vett lépsejtekből egyesített készletet alakítottunk ki és a feltüntetett antigénstimulusokkal tenyésztettük (ugyanaz, mint a 6. példában) akár három, akár hat napon keresztül. Az interferon-gamma-szinteket ELISA-val határoztuk meg és ismert koncentrációjú standardhoz hasonlítottuk. Az üres lyukak azt mutatják, hogy ezekből a tenyészetekből interferon-gammát a vizsgálattal nem lehetett kimutatni. A kimutatási érzékenység alsó határa 4 pikogramm/ml. Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

Lépsejtek interferon-gamma-kiválasztása

Három napos tenyészetek:

	Antigén					
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml			
Adjuváns				ConA 1 µg/ml	Lizozim 30 µg/ml	Tápközeg 0 µg/ml
Nincs				23,0		
CFA/IFA				5,0		
IL-12				5,9		
GM-CSF				17,6		
MPL™ SE	6,6	4,2	4,3	18,2		
MPL™ SE + IL-12				9,2		
MPL™ SE + GM-CSF	11,5	5,1	5,3	14,6		
SE				8		

6. tábla (folytatása)

Lépsejtek interferon-gamma-kiválasztása

Hat napos tenyészet:

	Antigén					
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml	ConA 1 µg/ml	Lizozim 30 µg/ml	Tápközeg 0 µg/ml
Adjuváns						
Nincs				71,8		
CFA/IFA				15,9		
IL-12				8,4		
GM-CSF				7,3		
MPL™ SE	190,1	51,5	319,0	187,3		
MPL™ SE + IL-12	18,0	15,6	42,0	83,4		12,7
MPL™ SE + GM-CSF	62,2	20,2	39,2	134,7		
SE	13,3			54,6		

2. kísérlet

Balb/c-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

8. példa

Anyagok és módszerek

Állatok

Hét-kilenc hetes, nőtény Balb/c-egereket alkalmaztunk az előzőekben ismertetett 1. példa szerint.

Peptidek

Az 1. példában ismertetett HIV-1-MN-peptidet, a T1SP10MN(A)-t alkalmaztuk. A peptidet 1 mg/ml koncentrációban sóoldatban oldottuk fel.

Adjuvánsok

Az 1. példában ismertetett adjuvánsokat alkalmaztuk azzal a kivétellel, hogy bizonyos esetekben az MPLTM-et a stabil emulziós forma helyett vizes kisserelésben alkalmaztuk.

Immunizálások

Az egereket fartőben, szubkután immunizáltuk összesen 0,2 ml teljes térfogatban, amelyet egyenlően osztottunk el a farok két oldalán. Az immunizálásokat a 0. és 21. napokon végeztük 25 µg HIV-peptiddel és a feltüntetett mennyiségű adjuvánsokkal. A CFA/IFA-t kapó egerek a 0. napon CFA-t kaptak és a 21. napon IFA-t. A hígításokat és a keveréseket az 1. példában ismertetettek szerint végeztük.

Mintavétel

Az állatokból a mintavételt az 1. példa módszere szerint végeztük, minden immunizálás előtt egy nappal és a második immunizálást követő 14 nappal.

Sejtkészítmények

A sejtkészítményeket az 1. példa módszere szerint állítottuk elő és kezeltük.

Enzimmel kapcsolt immunoszorbens vizsgálat

Az ELISA-vizsgálatokat az 1. példa módszere szerint végeztük.

HIV-1_{MN}-neutralizációs vizsgálat

A neutralizációs vizsgálatokat a Duke Egyetemen végeztük az 1. példában ismertettek szerint.

9. példa

Reciprok, T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-végponttiterek

A reciprok, peptid elleni IgG-végponttitereket mind az egyes egerekből geometriai középarány számításával (GMT, "geometric means titer"), mind pedig egyesített szérumokból (n=5 Balb/c) határoztuk meg, amelyeket 14 nappal a második immunizálást követően vettünk. Az IgG1- és IgG2a-alosztályok végponttitereit egyesített szérumokból határoztuk meg. A Freund-adjuvánst kapó egerekben 25 µg, CFA-ban emulziót képezett peptiddel kezdtük az immunizálást és IFA-val erősítettük meg. Az MPLTM SE-t adagonként 1% szkvalénolajat és 50 µg MPLTM-et tartalmazó emulzió formájában adtuk. A vizes MPLTM-et adagonként 50 µg mennyiségben adtuk az egereknek. A rekombináns, egéreredetű IL-12-t 40 ng/egér adagban alkalmaztuk. A rekombináns, egéreredetű GM-CSF-et 10

µg/egér adagban használtuk. Az eredményeket a 7. táblázatban mutatjuk be.

7. táblázat

Reciprok, T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-végponttiterek

Adjuváns µg/adag	Végponttiterek			
	IgG (egyesített)	IgG (GMT)	IgG1 (egyesített)	IgG2a (egye- sített)
Nincs	< 1000	720	< 1000	< 1000
CFA/IFA	72387	135740	126433	9023
MPL™ SE	183802	197808	162480	98342
SE	2426	6029	1859	< 1000
MPL™ SE + GM-CSF	148139	133171	103298	50415
MPL™ SE + rIL-12	182852	611076	6610	111662
GM-CSF	27333	1756	14538	4864
rIL-12	< 1000	500	< 1000	< 1000
MPL™	219705	241918	134428	7127
MPL™ + GM-CSF	946695	1101449	545444	12291
MPL™ + rIL-12	377972	2378702	204334	12795

10. példa

Reciprok, T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-alosztály-
végponttiterek

A vaginális öblítőfolyadék HIV-peptidre specifikus IgG- és IgA-ellenanyagai reciprok végponttitereit egyesített szérumokból (n=5 Balb/c) mértük 15 nappal a második immunizálást követően. Az egereket a 9. példa szerint immunizáltuk. Az MPL™ SE-t adagonként 1% szkvalénolajat és 50 µg MPL™-et tartalmazó emulzió formájában adtuk. A vizes MPL™-et adagonként 50 µg mennyiségben adtuk az egereknek. A rekombináns, egéreredetű IL-12-t 40 ng/egér adagban alkalmaztuk. A rekombináns, egéreredetű GM-CSF-et 10 µg/egér adagban használtuk. Az eredményeket a 8. táblázatban mutatjuk be.

8. táblázat

Reciprok, T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG- és IgA-ellenanyagok
végponttiterei

Adjuvánsok	Végponttiterek	
	IgG	IgA
Nincs	< 10	< 10
CFA/IFA	< 10	< 10
MPL™ SE (1%)	32	< 10
SE	< 10	< 10
MPL™ SE (1%) + GM-CSF	129	< 10
MPL™ SE (1%) + IL-12	40	< 10
GM-CSF	26	< 10
rIL-12	< 10	< 10
MPL™	< 10	< 10
MPL™ + GM-CSF	< 10	< 10
MPL™ + IL-12	260	197

11. példaLépsejtek szaporodása

Vizsgáltuk lépsejtek T1SP10MN(A) (-Cys)-szel és különböző adjuvánskiszerezésekkel (ugyanazok, mint a 10. példában) *in vitro* történő stimulációjának hatását a szaporodásukra. A sejteket összesen 96 órán keresztül tenyésztettük. Az utolsó 18 órára ³H-timidint adtunk a tenyészetekhez. Az adatokat a tenyészetben ConA-val stimulált sejtekre normalizált szaporodási indexként adjuk meg: [(átlagos cpm az

antigénre/átlagos cpm ConA-ra) - (átlagos cpm tápközegre/átlagos cpm ConA-ra)] x 100. Ilyen módon a tápközegben szaporodott sejtek háttérét jelentő szaporodási értéke 0. Az eredményeket a 9. táblázatban mutatjuk be. Azokat a szaporodási értékeket, amelyek kisebbek a nem stimulált tenyészetben szaporodott sejteknél mért értékeknél zárójelbe tettük.

9. táblázat

Lépsejtek szaporodása

Adjuváns	Antigén				ConA 5 µg/ml	Lizozim 10 µg/ml
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml			
Nincs	0,1	0,2	0,1		98,3	0,4
CFA/IFA	2,0	0,8	0,4		98,0	0,9
MPL™ SE	0,7	0,4	(0,2)		99,2	0,4
SE	0,5	0,3	0,1		99,0	0,4
MPL™ SE + GM-CSF	4,3	2,7	2,3		99,1	0,8
MPL™ SE + IL-12	6,6	4,9	(1,3)		83,8	17,4
GM-CSF	6,8	2,7	1,6		99,0	0,1
IL-12	0,2	0,2	0,5		99,1	0,2
MPL™	1,0	1,4	0,5		99,2	0,4
MPL™ + GM-CSF	27,5	19,2	13,3		97,5	0,5
MPL™ + IL-12	2,3	1,5	1,3		99,4	(0,0)

12. példa

Lépsejtek IL-4-kiválasztása

Vizsgáltuk T1SP10MN(A) (-Cys)-szel stimulált lépsejtek által a tenyészetbe kiválasztott interleukin-4 mennyiségét. A sejteket összesen 96 órán keresztül tenyésztettük. A sejttenyészetek felülúszójában az IL-4-et ELISA-módszerrel mértük. Az értékeket 10 µg nem immunogén fehérjével (lizozimmal) stimulált sejtek felülúszójából meghatározott értékek kivonása után ábrázoltuk. Az eredményeket a 10. táblázatban adjuk meg pg/ml koncentrációban. A lizozimmal történő stimulációval kapott értékek kivonása után kapott, kimutatási szint alatti értékeket "nd"-vel jelöljük. Az alkalmazott adjuvánsok: 40 ng IL-12, 10 µg GM-CSF és 50 µg MPL™.

10. táblázat

Lépsejtek IL-4-kiválasztása

Adjuváns	Antigén			
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml	Con A 5 µg/ml
Nincs	nd	nd	nd	336
CFA/IFA	nd	nd	nd	117
MPL™ SE	nd	nd	nd	187
SE	nd	nd	nd	450
MPL™ SE + GM-CSF	40	42	24	214
MPL™ SE + IL-12	5	nd	nd	266
GM-CSF	nd	9	36	226
IL-12	nd	nd	15	411
MPL™	5	nd	17	286
MPL™ + GM-CSF	nd	nd	nd	241
MPL™ + IL-12	nd	nd	nd	65

13. példaLépsejtek interferon-gamma-kiválasztása

Vizsgáltuk T1SP10MN(A) (-Cys)-szel stimulált lépsejtek által a tenyészetbe kiválasztott interferon-gamma mennyiségét. A sejteket összesen 96 órán keresztül tenyésztettük. A sejttenyészetek felülúszójában az interferon-gamma-szintet ELISA-módszerrel mértük. Az értékeket 10 µg lizozimmal stimulált sejtek felülúszójából meghatározott értékek kivonása után ábrázoltuk. Az eredményeket a 11. táblázatban adjuk meg egység/ml koncentrációban. A lizozimmal történő stimulációval kapott értékek kivonása után kapott, kimutatási szint alatti értékeket "nd"-vel jelöljük. Az alkalmazott adjuvánsok ugyanazok, mint a 12. példában.

11. táblázatLépsejtek interferon-gamma-kiválasztása

Adjuváns	Antigén			
	HIV-peptid 10 µg/ml	HIV-peptid 3,3 µg/ml	HIV-peptid 1,1 µg/ml	Con A 5 µg/ml
Nincs	nd	nd	1	189
CFA/IFA	nd	nd	3	193
MPL TM SE	2	nd	nd	170
SE	nd	nd	nd	130
MPL TM SE + GM-CSF	12	3	5	138
MPL TM SE + IL-12	23	8	9	168
GM-CSF	2	3	4	167
IL-12	4	2	41	179
MPL TM	5	nd	nd	203
MPL TM + GM- CSF	nd	20	19	31
MPL TM + IL-12	10	4	3	51

3. kísérlet

Swiss-Webster-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

A 2. kísérlet módszerét követtük azzal a különbséggel, hogy Balb/c-egerek helyett Swiss-Webster-egereket alkalmaztunk. Ebben a kísérletben csak a peptid elleni, reciprok IgG-végponttitert és vaginális öblítőfolyadék reciprok IgG- és IgA-ellenanyag-titereit mértük.

14. példa

HIV-peptid elleni, reciprok IgG-végponttiter

A T1SP10MN(A) (-Cys) elleni, reciprok IgG-végponttitereket a második immunizálást követő 14. napon a Swiss-Webster-egerekből egyedenként mért adatok középértékeként (GMT) határoztuk meg. Az IgG1- és IgG2a-alosztályok végponttitereit egyesített szérumokból határoztuk meg. A Freund-adjuvánst kapó egereknél az immunizálást CFA-val emulziót képzett peptiddel kezdtük és IFA-val erősítettük meg. Az MPL™ SE-t adagonként 1% szkvalénolajat és 50 µg MPL™-et tartalmazó emulzióban adtuk. A vizes MPL™-et 50 µg/adag mennyiségben adtuk. A rekombináns, egéreredetű IL-12-t 40 ng/egér adagban adtuk. A rekombináns, egéreredetű GM-CSF-et 10 µg/egér adagban adtuk. Az eredményeket a 12. táblázatban mutatjuk be.

12. táblázatHIV-peptid elleni, reciprok IgG-végponttiter

Adjuváns	Végponttiterek		
	IgG (GMT)	IgG1 (egyesített)	IgG2a (egyesített)
Nincs	500	< 1000	< 1000
CFA/IFA	9038	62358	54053
MPL TM SE	15831	3835	8872
SE	625	< 1000	< 1000
MPL TM SE + GM-CSF	1374	< 1000	1328
MPL TM SE + rIL-12	6142	< 1000	2170
GM-CSF	500	< 1000	< 1000
rIL-12	500	< 1000	< 1000
MPL TM	1960	< 1000	< 1000
MPL TM + GM-CSF	58211	35724	37959
MPL TM + rIL-12	5489	8535	17769

15. példaHIV-peptid elleni, reciprok IgG-alosztály-végpont-titerek

A vaginális öblítőfolyadék HIV-peptidre specifikus IgG- és IgA-ellenanyagai reciprok végponttitereit egyesített szérumokból (n=5 Swiss-Webster) mértük 15 nappal a második immunizálást követően. Az egereket a 14. példa szerint immunizáltuk. Az MPLTM SE-t adagonként 1% szkvalénolajat és 50 µg MPLTM-et tartalmazó emulzió formájában ad-

tuk. A vizes MPLTM-et adagonként 50 µg mennyiségben adtuk az egereknek. A rekombináns, egéreredetű IL-12-t 40 ng/egér adagban alkalmaztuk. A rekombináns, egéreredetű GM-CSF-et 10 µg/egér adagban használtuk. Az eredményeket a 13. táblázatban mutatjuk be.

13. táblázat

Reciprok, HIV-peptid elleni IgG- és IgA-ellenanyagok
végponttiterei

Adjuvánsok	Végponttiterek	
	IgG	IgA
Nincs	< 10	< 10
CFA/IFA	118	< 10
MPL TM SE (1%)	< 10	< 10
SE	< 10	< 10
MPL TM SE (1%) + GM-CSF	< 10	< 10
MPL TM SE (1%) + IL-12	< 10	< 10
GM-CSF	< 10	< 10
rIL-12	< 10	< 10
MPL TM	< 10	< 10
MPL TM + GM-CSF	25	< 10
MPL TM + IL-12	< 10	< 10

4. kísérlet

Balb/c-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

A 2. kísérlet szerinti módszert követtük azzal a kivétellel, hogy az egereket a 0. és a 28. napokon immunizáltuk és a szerológiai vizsgálatokhoz a 0., 27. és 41. napokon vettünk vérmintát. A CFA/IFA-kiszerelésnél a 0. napon CFA-val kezdtük és a 28. napon IFA-val folytattuk az immunizálást. Az MPLTM SE-t 50 µg MPLTM-mel és 2% SE-vel szereltük ki, míg 50 ng IL-12-t és 10 µg GM-CSF-et alkalmaztunk.

16. példa

HIV-peptid elleni, reciprok IgG-végponttiterek

A T1SP10MN(A) (-Cys) elleni, reciprok IgG-végponttitereket az egerekből egyedenként mértük és középértéket (GMT) számoltunk (n=5 Balb/c) 41 nappal az első és 13 nappal a második immunizálást követően. Az eredményeket a 14. táblázatban mutatjuk be. A 0. napi egyedi titerek mind 50-nél kisebbek voltak. A (nincs adat) jelölés azt jelenti, hogy az állat elpusztult a kísérlet befejezése előtt. Az "SD (standard deviation)" jelentése átlagos eltérés.

14. táblázat

T1SP10MN(A) (-Cys)-re specifikus IgG-szérumtiterek egyedi értékei és középértékei

Adjuváns	1. egér	2. egér	3. egér	4. egér	5. egér	GMT	SD
CFA/IFA	2806160	4856380	148038	172947	972484	805599	2025740
IL-12	594	50	50	50	50	82	243
GM-CSF	50	50	50	50	50	50	0
SE	11469	(n.a.)	5519	12620	50	2514	5813
SE + IL-12	38042	8030	35081	50	37932	7271	18320
SE + GM-CSF	485985	223518	63377	38050	1857860	217494	761374
MPL™	50	151846	249054	436378	1246470	63452	490091
MPL™ + IL-12	1855170	1117800	1255290	692219	7001540	1660297	2614417
MPL™ + GM-CSF	115527	1049310	301636	316223	736959	385568	380380
MPL™ SE	904947	5805010	291382	346835	354449	716000	2396968
MPL™ SE + IL-12	244171	8545550	455380	377697	1095650	829707	3593727
MPL™ SE + GM-CSF	3016000	724940	1718590	1483990	28259	691033	1124414

0000

17. példa

Reciprok, HIV-peptid elleni IgG-alosztály-végpont-
titerek

A reciprok, peptid elleni IgG-alosztály-végpont-
titereket egyesített szérumokból (n=5 Balb/c) mértük 41
nappal az első és 13 nappal a második immunizálást követő-
en. Az eredményeket a 15. táblázatban mutatjuk be.

15. táblázat

Reciprok, T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG-alosztályok
végponttiterei

Adjuvánsok	Végponttiterek		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
CFA/IFA	359238	122107	155877
IL-12	< 100	< 100	< 100
GM-CSF	5514	< 100	< 100
SE	5011	< 100	< 100
SE + IL-12	7331	< 100	< 100
SE + GM-CSF	67111	< 100	< 100
MPL TM	33544	212	< 100
MPL TM + IL-12	608163	6019	< 100
MPL TM + GM-CSF	114959	8000	< 100
MPL TM SE	142404	29141	1564
MPL TM SE + IL-12	164866	34439	558
MPL TM SE + GM-CSF	274241	33843	29965

18. példaVaginális öblítőfolyadék HIV-peptid elleni IgG- és IgA-ellenanyag-titerei

A vaginális, peptid elleni IgG- és IgA-ellenanyag-titerek az öblítőfolyadékból mértük 41 nappal az első és 13 nappal a második immunizálást követően. Az eredményeket a 16. táblázatban mutatjuk be.

16. táblázatVaginális öblítőfolyadék T1SP10MN(A) (-Cys) elleni IgG- és IgA-ellenanyag-titerei

Adjuváns	IgG	IgA
CFA/IFA	464	13
IL-12	< 10	< 10
GM-CSF	< 10	< 10
SE	< 10	< 10
SE + IL-12	< 10	< 10
SE + GM-CSF	32	14
MPL TM	12	< 10
MPL TM + IL-12	643	44
MPL TM + GM-CSF	211	65
MPL TM SE	153	16
MPL TM SE + IL-12	88	30
MPL TM SE + GM-CSF	190	53

19. példa

Lépsejtek szaporodása

Vizsgáltuk T1SP10MN(A) (-Cys)-szel és különböző adjuvánskiszerezésekkel immunizált egerekből származó lépsejtek szaporodását. A lépsejteket *in vitro* stimuláltuk négy napon keresztül 3,3 µg/ml T1SP10MN(A) (-Cys)-szel. Az eredményeket a 4. ábrán mutatjuk be a jelölt timidinnek 3,3 µg/ml T1SP10MN(A) (-Cys)-szel történő *in vitro* stimulálás hatására történő beépülésének stimulálás nélküli beépüléséhez viszonyított változásában (delta cpm).

5. kísérlet

Balb/c-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

A 2. kísérlet szerinti módszert alkalmaztuk azzal a különbséggel, hogy az egereket szubkután immunizáltuk a 0. és 22. napokon, és a 42. napon vettünk vért a szerológiai vizsgálatokhoz. Az MPLTM SE-t 50 µg MPLTM-mel és 1% SE-vel szereltük ki, míg GM-CSF-ből 10 µg-ot alkalmaztunk.

20. példa

Reciprok, HIV-peptid elleni IgG-végponttiterek

A peptid elleni IgG-alosztályok reciprok végponttitereit egyesített szérumokból (n=5 Balb/c) mértük 42 nappal az első és 13 nappal a második immunizálást követően. A középértékeket és az átlagos eltérést is meghatároztunk IgG-re. Az eredményeket a 17. táblázatban mutatjuk be.

17. táblázat

Reciprok, T1SP10MN(A) (-Cys)elleni IgG-végponttiterek

Adjuváns	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG GMT	SD
Nincs	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	-
CFA/IFA	390931	144564	33137	13134	741966	834567
GM-CSF	11639	3815	< 1000	< 1000	5133	32762
SE	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	-
SE + GM-CSF	84965	55998	< 1000	< 1000	28247	165628
MPL™	2635118	1314771	9688	13716	2032441	5638450
MPL™ + GM-CSF	835218	322441	26976	35697	1133423	881331
MPL™ SE	1577357	642436	113917	45025	1450821	5876690
MPL™ SE + GM-CSF	6598573	1212160	238440	214570	6418920	2925687

6. kísérlet

Balb/c-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

A 2. kísérlet szerinti vizsgálati módszert alkalmaztuk azzal a különbséggel, hogy a HIV-peptid a 17. aminosavpozícióban egy ciszteint tartalmaz, és az egereket (n=3 Balb/c) szubkután immunizáltuk a 0. és 21. napokon, és a -1. napon (az első immunizálás előtti napon), a 13., a 20. és a 28. napokon vettünk vért szerológiai vizsgálat céljára. Az MPLTM SE-t 50 µg MPLTM-mel és 1% SE-vel szereltük ki, míg GM-CSF-ből 10 µg-ot alkalmaztunk. A T1SP10MN(A) (+Cys) HIV-peptid (26) a 17. helyzetben egy cisztein aminosavat tartalmaz és így 40 aminosavból áll. A T1SP10MN(A) (+Cys)-t Genosys Biotechnológiestől vásároltuk (The Woodlands, TX).

21. példa

Reciprok, T1SP10MN(A) elleni IgG-végponttiterek

A reciprok, T1SP10MN(A) elleni IgG-végponttitereket az egerekből egyedenként mértük 28 nappal az első immunizálást követően, valamint kiszámoltuk a középértéküket (n=3 Balb/c). Az eredményeket a 18. táblázatban mutatjuk be.

18. táblázat

MPL™ SE + GM-CSF hatása HIV-peptiddel (+Cys) kiváltott IgG-reakcióra

Adjuváns	IgG	GMT	IgG1	GMT	IgG2a	GMT	IgG2b	GMT
MPL™ SE + GM-CSF	14275585	8942480	2097104	1437319	251235	239615	210746	210178
	13618523		2484849		225253		296429	
	3678324		569823		243103		148621	
MPL™ SE	1913110	5206349	644377	990194	22557	114913	23141	70632
	11405649		1937492		152430		127600	
	6467553		777643		441326		119338	
MPL™	91728	350486	23249	84978	500	2859	500	2906
	5296663		155199		1628		1102	
	886156		170071		28722		44531	
Nincs	<500	-	<500	-	<500	-	<500	-
	<500		<500		<500		<500	
	<500		<500		<500		<500	

7. kísérletBalb/c-egerek immunizálása HIV-peptiddel és különböző adjuvánsokkal

A 6. kísérlet szerinti vizsgálati módszert alkalmaztuk azzal a kivétellel, hogy az egereket (n=3 Balb/c) szubkután immunizáltuk a 0. és 32. napokon, és a 38. napon vettünk vért szerológiai vizsgálat céljára. Az MPLTM SE-t 50 µg MPLTM-mel és 1% SE-vel szereltük ki, míg GM-CSF-ből 10 µg-ot alkalmaztunk.

22. példaReciprok, HIV-peptid elleni IgG-végponttiterek

A reciprok, T1SP10MN(A)(+Cys) elleni IgG-végponttitereket az egerekből egyedenként mértük 38 nappal az első immunizálást követően, valamint meghatároztuk a középértéket is (n=3 Balb/c). Az eredményeket a 19. táblázatban mutatjuk be.

19. táblázat

MPL™ SE + GM-CSF hatása HIV-peptiddel (+Cys) kiváltott IgG-reakcióra

Adjuváns	IgG	GMT	IgG1	GMT	IgG2a	GMT	IgG2b	GMT
MPL™ SE + GM-CSF	4144648	4782117	922507	1090760	115290	328097	74130	64521
	5055375	+/-	985180	+/-	629615	+/-	76257	+/-
	5219387	472745	1427916	224940	486563	216753	47515	13077
MPL™ SE	736325	559033	288659	293160	58506	103260	33047	27180
	696393	+/-	809341	+/-	244559	+/-	46703	+/-
	340712	177831	107844	297378	76951	83698	13010	13837
MPL™ +GM-CSF	444774	1367343	146146	611040	3342	8546	2155	7067
	3993897	+/-	3568062	+/-	17469	+/-	14130	+/-
	1439116	1494876	437511	1549005	10691	5769	11590	5152
MPL™	404755	442259	148818	115544	11874	3429	9685	4980

	446952	+/-	90380	+/-	1674	+/-	3605	+/-
	478163	30080	114686	23969	2028	4727	3538	2882
SE	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	< 1000		< 1000		< 1000		< 1000	
	1214		< 1000		< 1000		< 1000	
Nincs	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	< 1000		< 1000		< 1000		< 1000	
	< 1000		< 1000		< 1000		< 1000	

8. kísérlet

CTL-vizsgálat Balb/c-egerekben

A 6. kísérlet szerinti módszert követtük az egerek immunizálása tekintetében. Az egerekből izolált lépsejtek CTL-aktivitását hét nappal a második immunizálást követően mértük. Az MPLTM SE-t 50 µg MPLTM-mel 1% SE-ben szereltük ki 10 µg GM-CSF-fel vagy anélkül és 50 µg T1SP10MN(A) (+Cys)-szel.

23. példa

CTL-vizsgálat Balb/c-egerekben

A CTL-vizsgálathoz a lépsejteket az egerekből 14 nappal az első és hét nappal a második immunizálást követően vettük ki. Alapvetően a korábban már ismertetett eljárást követtük (34). Röviden, csoportonként három egér vörösvérsejtektől mentesített lépsejtjeit egyesítettük. A lép effektor sejtjeit (4×10^6 /ml) 24-lyukú tenyésztő lemezekén hét napon keresztül újrástimuláltuk 1,5-2 ml térfogatban 1 µg/ml "MN" vagy "IIIB", 10-meres CTL-epitóp-peptiddel. Mindkét CTL-epitóp H-2D^d-re korlátozott. A tenyészetekhez 10 U/ml rekombináns, egéreredetű IL-2-t (Biosource) adtunk a tenyésztés utolsó öt napjára. A citotoxikus aktivitás vizsgálatához a P815-sejteket Cr⁵¹-gyel jelöltük és pulzus-szerűen 5 µg/ml peptid (IIIB vagy MN) hatásának tettük ki négy órán keresztül, majd a tenyésztett, effektor lépsejtekhez adtuk. Az effektor háromszoros hígításait alkalmaztuk a célsejthez képest, 100:1-től 3,7:1-ig. A százalékos CTL-aktivitást a krómfelszabadulás százalékában számoltuk a következő egyenlet alkalmazásával: [(specifikus krómfelsza-

badulás - spontán krómfelszabadulás)/(maximális krómfelszabadulás - spontán krómfelszabadulás)] x 100. A króm felszabadulását 6 órás inkubációt követően értékeltük. Az átlagos, spontán krómfelszabadulás mindig kevesebb volt a maximális felszabadulás 15%-ánál. Az eredményeket a 28. naptól kezdve az 5. ábrán mutatjuk be.

9. kísérlet

Makákó majmok (*Rhesus macaques*) immunizálása különböző SIV-peptidekkel és adjuvánsokkal

Az MPLTM SE és GM-CSF adjuvánskiszerezésnek antigénspecifikus CTL-választ kiváltó képességét *Rhesus* makákó majmokban (*Macaca mulatta*) vizsgáltuk. Ebben a kísérletben az adjuvánskiszerezést három különböző, Mamu A*01-re korlátozott CTL-epitópból (egy-egy gag, pol és env) álló, trivalens immunogén peptiddel vizsgáltuk, amelyek mindegyikét kémiaiilag szintetizálták SIV env-ből származó véletlenszerű T-helper-epitóppal vagy anélkül, Dr. Barton Haynes laboratóriumában, Duke Egyetemen.

A Mamu A*01-re korlátozott CTL-epitópot tartalmazó peptidek a következők:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (3. azonosítószámú szekvencia) (gag)

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (4. azonosítószámú szekvencia) (pol)

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (5. azonosítószámú szekvencia) (env)

Ezen CTL-epitópok mindegyikét a következő szekvenciájú T-helper-epitóphoz is kapcsoltuk:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala (6. azonosítószámú szekvencia)

A három multiepitóp peptid szekvenciája tehát a következő:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln
Met (7. azonosítószámú szekvencia)

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu
Val (8. azonosítószámú szekvencia)

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln
Ile (9. azonosítószámú szekvencia)

A CTL-vizsgálatot Mamu A*01-re korlátozott tetramer-
festési vizsgálattal végeztük Dr. Norman Letvin laboratóri-
umában (Harvard Medical School).

Állatok, adagok és immunogének

A HLA-A-val homológ molekulát, Mamu A*01-et és
DR β 0201-altípust expresszáló *Rhesus macacust* PCR-rel azono-
sítottuk, és New Iberiában (LA) lévő csapatban tartottuk.

A vizsgálatban három, két-két fiatal *Rhesus macacusból* (*Macaca mulatta*) álló csoportot alkalmaztunk, amelyeket a 20. táblázatban ismertetünk. Az 1. csoportba két Mamu A*01-re pozitív, DR β 0201-re negatív állat, az Rh73 és Rh80 tartozott. Ezek az állatok a trivalens Mamu A*01-re korlátozott SIV gag, env és pol CTL-epitóppeptideket (rövid peptidkeverék) kapták MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel együtt. A 2. csoport két Mamu A*01-re pozitív, DR β 0201-re pozitív

makákó majomból állt, amelyek a Th/SIVCTL gag, pol és env epitóppeptideket kapták (hosszú peptidkeverék) MPLTM SE-vel és GM-CSF-fel együtt. A 3. csoportba két Mamu A*01-re negatív, DR β 0201-re pozitív állat tartozott, amelyeket a Th/SIVCTL gag, pol és env peptidekkel (hosszú peptidkeverék) oltottunk be. A 20. táblázatban mutatjuk be a csoportokat az alkalmazott HLA-típus és immunogén peptidek szerint.

20. táblázat
Állatok, dózisok és immunogének

Csoport	Állat száma	HLA-típus	Immunogén peptid
1	Rh73 Rh80	Mamu A*01 + DR β 0201 -	CTL/SIV gag p11C (3. asz.sz.) CTL/SIV pol p68A (4. asz.sz.) CTL/SIV env p41A (5. asz.sz.) 0,75 mg mindegyik peptidből
2	Rh55 Rh142	Mamu A*01 + DR β 0201 +	Th1/CTL/SIV gag p11C (7. asz.sz.) Th1/CTL/SIV pol p68A (8. asz.sz.) Th1/CTL/SIV env p41A (9. asz.sz.) 2,4 mg mindegyik peptidből
3	Rh41 Rh47	Mamu A*01 - DR β 0201 +	Th1/CTL/SIV gag p11C (7. asz.sz.) Th1/CTL/SIV pol p68A (8. asz.sz.) Th1/CTL/SIV env p41A (9. asz.sz.) 2,4 mg mindegyik peptidből

asz.sz.: azonosítószámú szekvencia

Valamennyi csoportot szubkután immunizáltuk 50 μ g, 1% olajban lévő MPLTM SE-vel és 250 μ g humán GM-CSF-fel kiegészítve, megfelelő peptidkeverék 1 ml-ével a 0., 4. és 8. héten. Az MPLTM SE adagját 125 μ g-ra növeltük 1% olajban a

18. heti immunizáláskor. Valamennyi csoportnál 2,4 mg hosszú peptidet és 0,75 mg rövid peptidet oldottunk fel 900 μ l desztillált, ionmentesített vízben. A peptidoldatokat alkalmaztuk azután a humán GM-CSF feloldására, majd 100 μ l MPLTM SE kiszerezést adtunk hozzá.

24. példa

CTL-vizsgálat *Rhesus macacus*-ben

Az állatokból minden második héten vért vettünk, és a heparinizált vérben vizsgáltuk a Mamu A*01-re korlátozott CTL-reakciót friss és tenyésztett perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) tetramerfestésével. A PBMC-t vagy p11c-vel, p68A-val, p41A-val vagy p46-tal stimuláltuk a 0. napon, majd IL-12 jelenlétében tenyésztettük és a 11. napon vizsgáltuk. Hagyományos ⁵¹Cr-felszabadulási vizsgálatot is végeztünk tenyésztett PBMC-sejteken (50).

A tetramervizsgálatot a következőképpen hajtottuk végre. A gag-ból származó p11c jelű, a pol-ból származó p68A jelű vagy az env-ből származó p41A jelű epitópeptideket a tisztított, biotinált Mamu A*01-gyel inkubáltuk β 2-mikroglobulin jelenlétében, majd avidinhoz kapcsoltuk és PE-hez (phycoerythrin) konjugáltuk. Ezzel a tetramerrel festettük azután a makakó majmok CD8+ sejtjeinek p11c-, p68A- vagy p41A-epitópjait felismerő T-sejt-receptorait. A domináns env p46-epitópot körülvevő, különböző DR β 0201-tetramer lehetővé teszi azon CD4+ sejtek festését, amelyek specifikusan a p46 Th-epitópot ismerik fel. Az eredményeket a 21-24. táblázatokban mutatjuk be.

	Rh142	0,2	0,6	0,2	1,0	1,8	0,3	2,3	1,2
3. csop.	Rh41	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3
	Rh47	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	

23. táblázat

P41A/SIV env tetramer-pozitív CD8+ sejtek százaléka

	Hetek	0	2	4	6	8	9	10	14
1. csop.	Rh73	0,8	3,5	2,5	2,0	3,5	1,7	1,5	1,6
	Rh80	0,2	0,2	3,4	0,5	0,1	0,0	0,2	0,2
2. csop.	Rh55	0,2	1,1	0,4	0,6	0,4	0,2	0,1	0,6
	Rh142	0,3	0,5	0,4	0,6	0,3	0,3	0,2	0,4
3. csop.	Rh41	0	0,2	0,1		0,3	0,0	0,0	0,2
	Rh47	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2

24. táblázat

P46/SIV T-helper DR β 0201 tetramer-pozitív CD4+ sejtek
százaléka

	Hetek	0	2	4	6	8	9	10	14
1.	Rh73			0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
csop.									
	Rh80			0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
2.	Rh55			0,2	0,5	0,7	0,4	0,3	0,3
csop.									
	Rh142			0,2	0,9	0,6	1,0	0,6	0,5
3.	Rh41					0,6	0,4	0,3	0,3
csop.									
	Rh47					1,2	0,8	1,6	1,2

10. kísérlet

Swiss-Webster-egerek immunizálása Neisseria
gonorrhoeae porin B fehérjéjével és különböző adjuvánssokkal

A vérfrissített Swiss-Webster-egereket öt csoportba osztottunk, minden csoportban tíz egérrel. Mindegyik csoport 1 μ g rekombináns porin B fehérjét kapott (az FA1090-törzsből az aminoterminális végen egy fágból származó 16 aminosavval, amelyet a porin B fehérje érett formája követ). Az első csoport tagjai nem kaptak adjuvánst, a második csoport 50 μ g MPLTM-et kapott, a harmadik csoport MPLTM-

et és 5 µg GM-CSF-et kapott, a negyedik csoport 25 µg MPLTM SE-t, az ötödik csoport MPLTM SE-t és 5 µg GM-CSF-et kapott. Az egereket szubkután immunizáltuk a fartőnél összesen 0,2 ml térfogatban, amelyet egyenlően osztottunk szét a fartő/farok tövének mindkét oldalán. Az immunizálásokat a 0. és a 4. héten végeztük.

25. példa

Reciprok, porin B fehérje elleni IgG-alosztály-végponttiterek

Az egerektől minden immunizálás előtti napon és az utolsó immunizálást követő 13. napon vettünk vért. A szérumokat a csoportokon belüli egerek egyesített mintáiból vizsgáltuk. A reciprok, porin B fehérje elleni IgG-alosztály-titereket egyesített szérumokból mértük (n=10 Swiss-Webster) a vaginális öblítőfolyadékból a 3. és 6. héten. Az eredményeket a 25. táblázatban mutatjuk be. Valamennyi 0. napi, immunizálás előtti titer 50-nél kevesebb volt.

25. táblázat

Reciprok, porin B fehérje elleni IgG-alosztály végponttiterek

Adjuváns	3. hét			6. hét		
	IgG	IgG1	IgG2a	Ig	IgG1	IgG2a
Nincs	4146	531	293	157203	4467	9782
MPL™	3381	171	318	431529	23465	20422
MPL™ + GM-CSF	7895	50	980	790193	2478	82690
MPL™ SE	135016	297	13339	3945614	10805	342322
MPL™ SE + GM-CSF	106008	725	8772	3304231	31920	201787

A 6. héten meghatároztuk az egyedi egerekből mért, rekombináns porin B fehérjével szembeni IgG-titerek középértékét. Az eredményeket a 26. táblázatban mutatjuk be.

26. táblázat
Egyedi IgG-titerek

Adjuváns	Középérték	Átlagos eltérés
Nincs	100089	63467
MPL™	217114	451611
MPL™ + GM-CSF	649801	353863
MPL™ SE	1917908	1478357
MPL™ SE + GM-CSF	2144567	858184

11. kísérlet

Swiss-Webster-egerek immunizálása *Neisseria gonorrhoeae* porin B fehérjével és különböző adjuvánssokkal

A vérfrissített Swiss-Webster-egereket hat csoportra osztottuk, minden csoportban öt-öt egérrel. Mindegyik csoport 1 µg rekombináns porin B fehérjét kapott (FA1090-törzsből az aminoterminális végen egy fágból származó 16 aminosavval, amelyet a porin B fehérje érett formája követ). Az első csoport tagjai nem kaptak adjuvánst (a fehérjét PBS-ben szereltük ki), a második csoport tagjai 40 ng IL-12-t, a harmadik csoport 50 µg MPL™-et, a negyedik csoport MPL™-et és 40 ng IL-12-t kapott, az ötödik csoport 25 µg MPL™ SE-t, a hatodik csoport MPL™ SE-t és 40 ng IL-12-t

kapott. Az egereket szubkután immunizáltuk a fartőben összesen 0,2 ml térfogatban. Az immunizálásokat a 0. és 4. héten végeztük.

26. példa

Reciprok, porin B fehérje elleni IgG-alosztály-végponttiterek és vaginális öblítőfolyadék IgG- és IgA-titerei

Az egerekből minden immunizálás előtti napon és 13 nappal az utolsó immunizálást követően vettünk vért. A szérumokat a csoportokon belüli egerek egyesített mintáiból vizsgáltuk. A reciprok, porin B fehérje elleni IgG-alosztály-titereket egyesített szérumokból mértük ($n=5$ Swiss-Webster) a vaginális öblítőfolyadékból a 3. és 6. héten. Az eredményeket a 27. táblázatban mutatjuk be. Valamennyi 0. napi, immunizálás előtti titer 50-nél kevesebb volt. A vaginális öblítőfolyadékból történő vizsgálatnál a kiindulási hígítás $1/5$ volt.

27. táblázat

Reciprok, porin B fehérje elleni IgG-alosztály-végponttiterek és vaginális öblítőfolyadék

IgG- és IgA-titerei

Adjuváns	3. hét			6. hét			Vaginális mosás	
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgA
Nincs	9084	1872	2872	408944	8314	64500	80	5
IL-12	7266	2578	2071	571325	6278	58552	93	5
MPL™	5656	500	1925	265127	76640	60910	54	5
MPL™ + IL-12	28274	1442	11348	3747987	120112	44997	88	5
MPL™ SE	53056	8543	17550	5133154	513236	622514	338	5
MPL™ SE + IL-12	757133	5622	33259	10935000	210478	471552	3036	5

12. kísérlet

Balb/c-egerek immunizálása respirátoros syncytialis vírus F fehérjéjével és különböző adjuvánsokkal

A Balb/c-egereket hét csoportba osztottuk, mindegyik csoportba öt-öt egeret. Mindegyik csoport 3 µg tisztított, natív humán respirátoros syncytialis vírus (RSV) F fehérjét kapta (dimér formában). Az első csoport tagjai nem kaptak adjuvánst (a fehérjét PBS-ben szereltük ki), a második csoport 100 µg alumínium-foszfátot kapott (alum), a harmadik csoport 20 µg StimulonTM QS-21-et kapott (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA), a negyedik csoport 50 µg MPLTM-et kapott, az ötödik csoport MPLTM-et és 5 µg GM-CSF-et kapott, a hatodik csoport 25 µg MPLTM SE-t, a hetedik csoport MPLTM SE-t és 5 µg GM-CSF-et kapott. Az egereket intramuszkulárisan immunizáltuk összesen 0,2 ml térfogatban a felső combon. Az immunizálások a 0. és 4. héten történtek.

27. példa

Reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztályok végponttiterei

Az egerektől minden immunizálás előtti napon és az utolsó immunizálást követő 13. napon vettünk vért. A szérumokat a csoportokon belüli egerek egyesített mintájából vizsgáltuk. A reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztályok titereit egyesített szérumokból mértük (n=5 Balb/c). Az eredményeket a 28. táblázatban mutatjuk be. Valamennyi 0. napi, immunizálás előtti titer 50-nél kevesebb volt.

28. táblázat

Reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztályok végponttiterei

Adjuváns	3. hét			6. hét		
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Nincs	18452	3698	319	539156	3119905	80855
Alum	66710	35839	4321	5417001	3226833	291474
Stimulon™ QS-21	313665	150988	176080	12113156	2902521	4324004
MPL™	124197	28134	11882	3310838	900863	1057108
MPL™ + GM- CSF	419873	91649	65453	10343803	753890	688554
MPL™ SE	374992	44115	147366	19333189	1493284	6314264
MPL™ SE + GM-CSF	1748272	51966	267265	30816193	1716850	2641258

28. példaLépsejtek szaporodása

Vizsgáltuk lépsejtek 2,5 µg/ml RSV F fehérjével és különböző adjuvánskiszerezésekkel (ugyanaz, mint a 27. példában) *in vitro* történő stimulálásának hatását a lépsejtek szaporodására. A lépsejteket a második immunizálást követő 14. napon vettük ki az egerekből, és 5×10^5 sejt sűrűségben tenyészetet indítottunk. A sejteket összesen 96 órán keresztül tenyésztettük. Az utolsó 18 órára ^3H -timidint adtunk a tenyészetekhez. Az adatokat a tenyészetben ConA-val stimulált sejtekre normalizált szaporodási indexként fejezzük ki: $[(\text{átlagos cpm antigénre}/\text{átlagos cpm ConA-ra}) - (\text{átlagos cpm tápközegre}/\text{átlagos cpm ConA-ra})] \times 100$. Ennek eredményeképpen a tápközegben tenyésztett sejtek szaporodásának háttérértéke nulla. Az eredményeket a 29. táblázatban mutatjuk be.

29. táblázatLépsejtek szaporodása

Adjuváns	Normalizált szaporodási index
Nincs	18,1
Alum	13,1
Stimulon TM QS-21	0,8
MPL TM	0,4
MPL TM + GM-CSF	20,0
MPL TM SE	17,8
MPL TM SE + GM-CSF	16,3

13. kísérlet

Balb/c-egerek immunizálása respirátoros syncytialis vírus F fehérjéjével és különböző adjuvánsokkal

A 12. kísérlet szerinti vizsgálati módszert ismételtük meg (immunizálások a 0. és 4. héten történtek RSV F fehérjével adjuváns nélkül vagy különböző adjuvánsokkal).

29. példa

Reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztály-végpont-titerek

Az egerektől minden immunizálás előtti és az utolsó immunizálást követő 13. napon vettünk vért. A szérumot a csoportokon belüli egerek egyesített mintájából mértük. A reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztály-titereket egyesített szérumokból mértük (n=5 Balb/c). Az eredményeket a 30. táblázatban mutatjuk be. Valamennyi 0. napi, immunizálás előtti titer 50-nél kevesebb volt.

30. táblázat

Reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztályok végponttitere

Adjuváns	3. hét			6. hét		
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Nincs	6442	2808	713	5195059	963203	38791
Alum	128695	36841	1975	4285993	567972	27668
Stimulon TM QS-21	528036	296292	176703	37221721	1823402	1724319
MPL TM	104702	21930	61253	6153833	1384927	955685
MPL TM + GM- CSF	262128	79888	55249	21054796	3412710	2070305
MPL TM SE	184246	47194	180932	31731335	4376601	6406591
MPL TM SE + GM-CSF	375575	70422	289542	27079086	2124043	6341497

30. példaLépsejtek CTL-aktivitása

Lépsejtek RSV F fehérjével és a feltüntetett adjuvánsokkal történő immunizálása hatására kialakuló CTL-aktivitását (citotoxikus L-limfociták aktivitását) két héttel az utolsó immunizálást követően értékeltük. Az adatokat RSV-vel fertőzött célsejtekkel tenyésztett lépsejtek százalékos specifikus CTL-aktivitásaként adjuk meg 33:1 effektor célsejt aránynál. A százalékos specifikus CTL-aktivitást a 24. példa szerint határoztuk meg, az RSV-vel fertőzött célsejtekre specifikus aktivitásértékből kivonva a nem fertőzött célsejtekkel szembeni CTL-aktivitás értékét. Naiv lépsejteket RSV-vel fertőztünk 1,5 MOI-értékkel (fertőzési multiplicitás, "multiplicity of infection") két órán keresztül *in vitro* stimulátorsejtek forrásaként. Az immunizált egerek lépéből származó reagáló ("responder") sejteket 5:1 arányban adtuk a stimulátor sejtekhez és hat napon keresztül tenyésztettük. Az 5. napon a célsejteket (Balb/c MHC-H-2d-sejtvonal) RSV-vel fertőztük 10-es MOI-értékkel két órán keresztül, és egy éjszakán keresztül inkubáltuk. A 6. napon a fertőzött és nem fertőzött sejteket begyűjtöttük és ^{51}Cr hatásának tettük ki, pulzusszerűen. Ezután *in vitro* effektorsejteket adtunk a célsejtekhez 100:1-től 3:1-ig terjedő E:T arányban. A króm felszabadulását négy órás inkubációt követően mértük. Az eredményeket a 31. táblázatban mutatjuk be.

31. táblázatLépsejtek CTL-aktivitása

Adjuváns	Százalékos CTL-aktivitás
Nincs	1
Alum	4
Stimulon TM QS-21	53
MPL TM	6
MPL TM + GM-CSF	15
MPL TM SE	30
MPL TM SE + GM-CSF	36

14. kísérletBalb/c-egerek immunizálása respirátoros syncytialis vírus F fehérjéjével és különböző adjuvánsokkal

A Balb/c-egereket hat csoportba osztottuk, csoportonként öt-öt egérrel. Mindegyik csoport 3 µg tisztított, natív RSV F fehérjét kapott (dimer formában). Az első csoport nem kapott adjuvánst (a fehérjét PBS-ben szereltük ki), a második csoport 40 ng IL-12-t kapott, a harmadik csoport 50 µg MPLTM-et, a negyedik csoport MPLTM-et és 40 ng IL-12-t, az ötödik csoport 25 µg MPLTM SE-t, a hatodik csoport MPLTM SE-t és 40 ng IL-12-t kapott. Az egereket szubkután immunizáltuk összesen 0,2 ml térfogatban a fartőnél, a farok két oldalán két, egyforma adagban elosztva. Az immunizálásokat a 0. és a 4. héten végeztük.

31. példaReciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztályok
végponttiterei

Az egerektől minden immunizálás előtt és az utolsó immunizálást követő 13. napon vettünk vért. A szérumot a csoportokon belüli egerek egyesített mintáiból mértük. A reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztály-titerekét egyesített szérumokból mértük (n=5 Balb/c). Az eredményeket a 32. táblázatban mutatjuk be. Valamennyi 0. napi, immunizálás előtti titer 50-nél kevesebb volt.

32. táblázat

Reciprok, RSV F fehérje elleni IgG-alosztályok végponttiterei

Adjuváns	3. hét			6. hét		
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Nincs	5332	12925	500	2381899	977782	76226
IL-12	13557	3442	500	4459059	1345099	65951
MPL™	26179	55767	8397	3467097	402128	170252
MPL™ + IL-12	186516	22321	10800	1546443	420322	253465
MPL™ SE	1708358	53608	144876	9075480	565403	1000459
MPL™ SE + IL-12	329050	15788	69794	10935000	386639	1284274

32. példaLépsejtek CTL-aktivitása

Lépsejtek RSV F fehérjével és a feltüntetett adjuvánsokkal történő immunizálása hatására kialakuló CTL-aktivitását (citotoxikus L-limfociták aktivitását) két héttel az utolsó immunizálást követően értékeltük. Az adatokat RSV-vel fertőzött célsejtekkel tenyésztett lépsejtek százalékos specifikus CTL-aktivitásként adjuk meg 33:1 effektor célsejt aránynál. A százalékos specifikus CTL-aktivitást a 24. példa szerint határoztuk meg, az RSV-vel fertőzött célsejtekre specifikus aktivitásértékből kivonva a nem fertőzött célsejtekkel szembeni CTL-aktivitás értékét. Naiv lépsejteket RSV-vel fertőztünk 1,5 MOI-értékkel két órán keresztül *in vitro* stimulátorsejtek forrásaként. Az immunizált egerek lépéből származó reagáló ("responder") sejteket 5:1 arányban adtuk a stimulátor sejtekhez és hat napon keresztül tenyésztettük. Az 5. napon a célsejteket (Balb/c MHC-H-2d-sejtvonal) RSV-vel fertőztük 10-es MOI-értékkel két órán keresztül, és egy éjszakán keresztül inkubáltuk. A 6. napon a fertőzött és nem fertőzött sejteket begyűjtöttük és ^{51}Cr hatásának tettük ki, pulzusszerűen. Ezután *in vitro* effektorsejteket adtunk a célsejtekhez 100:1-től 3:1-ig terjedő E:T arányban. A króm felszabadulását négy órás inkubációt követően mértük. Az eredményeket a 33. táblázatban mutatjuk be.

33. táblázatLépsejtek CTL-aktivitása

Adjuváns	Százalékos CTL-aktivitás
Nincs	6
IL-12	22
MPL TM	15
MPL TM + IL-12	13
MPL TM SE	33
MPL TM SE + IL-12	28

15. kísérletBalb/c-egerek immunizálása influenzavírus nukleokapszid fehérjéjével és különböző adjuvánsokkal

A Balb/c-egereket hat csoportba osztottuk, mindegyik csoportba öt-öt egeret. Mindegyik csoport 1 µg, A/dorn/307/72-törzsből származó, influenzavírus NP-fehérjét (nukleokapszid) kapott. [kontrollcsoportok] Az első csoport tagjai nem kaptak adjuvánst (a peptidet PBS-ben szereltük ki), a második csoport 100 µg alumínium-foszfátot kapott (alum), a harmadik csoport 50 µg MPLTM-et kapott, a negyedik csoport MPLTM-et és 5 µg GM-CSF-et kapott, az ötödik csoport 25 µg MPLTM SE-t, a hatodik csoport MPLTM SE-t és 5 µg GM-CSF-et kapott. Az egereket szubkután immunizáltuk összesen 0,2 ml térfogatban a fartőben. Az immunizálásokat a 0. és 4. héten végeztük.

33. példa

Lépsejtek CTL-aktivitása

Lépsejtek influenza NP-peptiddel és a feltüntetett adjuvánsokkal történő immunizálása hatására kialakuló CTL-aktivitását két héttel az utolsó immunizálást követően értékeltük. A mérést a 32. példa szerinti módszerrel végeztük peptid hatásának pulzusszerűen kitett p815-célsejtekkel [a peptid hatásának pulzusszerűen kitett p815-célsejtekkel [a peptid az NP 147-155 aminosavainak felel meg, és a szekvenciája a következő: Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val (14. azonosítószámú szekvencia)]. A GM-CSF-nek az MPLTM-et vagy MPLTM SE-t tartalmazó készítményekbe történő bevétele a CTL-aktivitás jelentős csökkenését eredményezte (az adatokat nem mutatjuk).

HIVATKOZÁSOK

1. Mosmann, T.R., et al., J. Immunol., 136, 2348-2357 (1986).
2. U.S. Patent Number 4,912,094.
3. Ahlers, J.D., et al., J. Immunol., 158, 3947-3958 (1997).
4. Scharton-Kersten, T., et al., J. Immunol. 154. 5320-5330 (1995).
5. Ghalib, H.W., et al., J. 154, 4623-4629 (1995).
6. Murray, H.W., and Hariprashad, J., . J. Exp. Med. 181. 387-391 (1995).
7. U.S. Patent Number 5,571,515.
8. Finkelman, F.D., and Holmes, J., Ann. Rev. Immunol., B, 303-333 (1990).
9. Snapper, C.M., et al., J. Exp. Med. 175. 1367-1371 (1992).
10. Kobayashi, M., et al., J. Exp. Med. 170. 827-845 (1989).
11. Published International Patent Application Number WO 90/05147.
12. U.S. Patent Number 5,078,996.
13. U.S. Patent Number 5,229,496.
14. U.S. Patent Number 5,073,627.
15. Alderson, M.R., et al., J. exp. Med. 178, 669-674 (1993).
16. Snapper, C.M., et al., Immunol., 154, 5842-5850 (1995).
17. U.S. Patent Number 5,013,548.

18. U.S. Patent Number 5,019,387.
19. Charbit, A., et al., Vaccine, 11, 1221-1228 (1993).
20. Natuk, R.J., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 9, 395-404 (1993) .
21. Johnson, R.P., et al., J. Virol., 68. 3145-3153 (1994).
22. Fuller, D.H., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 10, 1433-1441 (1994).
23. Berzofsky, J.A., et al., J. Clin. Invest., 88, 876-884 (1991).
24. Palker, T.J., et al., J. Immunol., 142, 3612-3619 (1989).
25. Hart, M.K., et al., J. Immunol., 145. 2677-2685 (1990).
26. Haynes, B.F., et al., J. Immunol., 151, 1646-1653 (1993).
27. Hart, M.K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9448-9452 (1991).
28. Bartlett, J.A., et al., AIDS, 12, 1291-1300 (1998).
29. Haynes, B.F., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 11, 211-221 (1998) .
30. U.S. Patent Number 5,861,243.
31. U.S. Patent Number 5,932,218.
32. U.S. Patent Number 5,939,074.
33. U.S. Patent Number 5,993,819.
34. U.S. Patent Number 6,037,135.
35. Published European Patent Application Number 671,947.
36. Staats, H.F., et al., J. Immunol., 157, 462-472 (1996).
37. Porgador, A., et al., J. Immunol., 158, 834-841 (1997).

38. Alien, T.M., et al., J. Immunol., 160, 6062-6071 (1998).
39. Miller, H.D., et al., J. Immunol., 147, 320-329 (1991).
40. Egan, M.A., et al., J. Virol., 73, 5466 (1999) .
41. Hart, M.K., J. Immunol., 145, 2677-2685 (1990).
42. U.S. Patent Number 5,736,361.
43. U.S. Patent Number 5,223,254.
44. Published International Patent Application Number WO
98/20734.
45. U.S. Patent Number 5,830,877.
46. Published International Patent Application Number WO
99/51259.
47. Published International Patent Application Number WO
99/27944.
48. U.S. Patent Number 4,666,829.
49. U.S. Patent Number 5,593,972.
50. Kuroda, M.J., et al., J. Exp. Med., 187, 1373-1381
(1998).

SZEKVENCIALISTA

(210) 1
 (211) 40
 (212) PRT
 (213) *Humán immundeficiencia-vírus*

(400) 1
 Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 1 5 10 15
 Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile his Ile Gly Pro
 20 25 30
 Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
 35 40

(210) 2
 (211) 39
 (212) PRT
 (213) *Humán immundeficiencia-vírus*

(400) 2
 Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly
 20 25 30
 Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys
 35

(210) 3
(211) 9
(212) PRT
(213) *Majomimmunodeficiencia-virus*

(400) 3

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met

1 5

(210) 4
(211) 9
(212) PRT
(213) *Majomimmunodeficiencia-virus*

(400) 4

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val

1 5

(210) 5
(211) 9
(212) PRT
(213) *Majomimmunodeficiencia-virus*

(400) 5

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile

1 5

(210) 6
(211) 20
(212) PRT
(213) *Majomimmundeficiencia-virus*

(400) 6

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala

1 5 10 15

(210) 7
(211) 29
(212) PRT
(213) *Majomimmundeficiencia-virus*

(400) 7

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala

1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met

20 25

(210) 8
(211) 29
(212) PRT
(213) *Majomimmundeficiencia-virus*

(400) 8

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala

1 5 10 15

Pro Thr Lyxs Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val

20 25

(210) 9

(211) 29

(212) PRT

(213) *Majomimmundeficiencia-vírus*

(400) 9

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala

1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile

20 25

(210) 10

(211) 42

(212) PRT

(213) *ismeretlen élőlény*

(220)

(223) Az ismeretlen élőlény leírása: humán amiloid
peptid protein

(400) 10

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

(210) 11

(211) 28

(212) PRT

(213) ismeretlen élőlény

(220)

(223) Az ismeretlen élőlény leírása: humán amiloid
peptid protein

(400) 11

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

20 25

(210) 12

(211) 10

(212) PRT

(213) Humán immundeficiencia-vírus

(400) 12

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile

1 5 10

(210) 13

(211) 10

(212) PRT

(213) *Humán inmunodeficiencia-virus*

(400) 13

Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr

1 5 10

(210) 14

(211) 9

(212) PRT

(213) *influenza virus*

(400) 14

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val

1 5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antigén hatású készítmény, amely egy patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából, vagy rákos vagy tumoros sejtből, vagy egy allergénből, vagy amiloid-peptidfehérjéből származó, kiválasztott antigént és a következők, (1) 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A vagy monofoszforil-lipid A és/vagy ezek származékai és/vagy analógjai, és (2) egy citokin vagy limfokin, vagy a citokin vagy limfokin agonistája vagy antagonistája, kombinációjának hatékonyan adjuváló mennyiségét tartalmazza, és ahol az adjuvánsok kombinációja fokozni képes az immunválaszt egy gerinces gazdaszervezetben az antigénre.

2. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben az antigén egy fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens.

3. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

4. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor vagy interleukin-12.

5. A 4. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor.

6. Az 5. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

7. A 6. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin interleukin-12.

8. A 7. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

9. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amely továbbá hígítószer vagy hordozót is tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

11. Eljárás egy patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származó, kiválasztott antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gerinces gazdaszervezetben immunválaszt váltson ki, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk a gazdaszervezetnek.

12. Eljárás egy patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származó, kiválasztott antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gerinces gazdaszervezetben immunválaszt váltson ki, azzal jellemezve, hogy a 9. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk a gazdaszervezetnek.

13. Eljárás egy patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származó, kiválasztott antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, azzal jellemezve, hogy az 1.

igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk a gazdaszervezetnek.

14. Eljárás egy patogén vírusból, baktériumból, gombából vagy parazitából származó, kiválasztott antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, *azzal jellemezve*, hogy a 9. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk a gazdaszervezetnek.

15. Eljárás rákos sejtből vagy tumorsejtből származó, kiválasztott rákantigént vagy tumorral kapcsolatos antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gyógyászati vagy megelőző, rákellenes hatást váltson ki gerinces gazdaszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek a rákos sejtből vagy tumorsejtből származó, kiválasztott rákantigént vagy tumorral kapcsolatos antigént tartalmazó, antigén hatású készítményt és a következők, (1) 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A vagy monofoszforil-lipid A és/vagy ezek származékai és/vagy analógjai, és (2) egy citokin vagy limfokin, vagy a citokin vagy limfokin agonistája vagy antagonistája, kombinációjának hatékony adjuváló mennyiségét tartalmazó készítményt adagoljuk.

16. Eljárás egy kiválasztott allergént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gerinces gazdaszervezetben az allergiás választ mérsékelje, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek az allergént tartalmazó antigén hatású készítményt és a követ-

kezők, (1) 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A vagy monofoszforil-lipid A és/vagy ezek származékai és/vagy analógjai, és (2) egy citokin vagy limfokin, vagy a citokin vagy limfokin agonistája vagy antagonistája, kombinációjának hatékony adjuváló mennyiségét tartalmazó készítményt adagoljuk.

17. Eljárás antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy gerinces gazdaszervezetben amiloidlerakódással jellemezhető betegséget megelőzzön vagy kezelésére alkalmazható legyen, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek amiloid-peptidfehérjéből származó polipeptidet, peptidet vagy fragmenst vagy ezzel szembeni ellenanyagot és a következők, (1) 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A vagy monofoszforil-lipid A és/vagy ezek származékai és/vagy analógjai, és (2) egy citokin vagy limfokin, vagy a citokin vagy limfokin agonistája vagy antagonistája, hatékony adjuváló mennyiségét tartalmazó készítményt adagoljuk.

18. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén humán immundeficiencia vírusból (HIV) származik.

19. A 18. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott HIV-antigén egy HIV-fehérje, a fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens.

20. A 19. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigének a következő aminosavszekvenciájú HIV-peptidek:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile
His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (1. azono-
sítószámú szekvencia), vagy

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg
Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (2.
azonosítószámú szekvencia).

21. A 18. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

22. A 18. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor vagy interleukin-12.

23. A 22. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor.

24. A 23. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

25. A 22. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin interleukin-12.

26. A 25. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

27. A 18. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amely továbbá hígítószeret vagy hordozót is tartalmaz.

28. A 27. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

29. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén Simian immundeficiencia vírus (SIV).

30. A 29. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott SIV-antigén egy SIV-fehérje, a fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens.

31. A 30. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén a következő aminosavszekvenciájú SIV-peptidek bármelyike:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (3. azonosítószámú szekvencia), Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (4. azonosítószámú szekvencia), Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (5. azonosítószámú szekvencia), Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (7. azonosítószámú szekvencia), Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (8. azonosítószámú szekvencia) és Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (9. azonosítószámú szekvencia).

32. A 29. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

33. A 29. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor vagy interleukin-12.

34. A 33. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor.

35. A 34. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

36. A 33. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin interleukin-12.

37. A 36. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

38. A 29. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amely továbbá hígítószer vagy hordozót is tartalmaz.

39. A 38. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

40. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén *Neisseria gonorrhoeae*-ből származik.

41. A 40. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott *Neisseria gonorrhoeae* antigén egy *Neisseria gonorrhoeae*-ből származó fehérje, a fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens.

42. A 41. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén *Neisseria gonorrhoeae* porin B fehérjéje.

43. A 40. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

44. A 40. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor vagy interleukin-12.

45. A 44. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor.

46. A 45. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

47. A 44. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin interleukin-12.

48. A 47. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

49. A 40. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amely továbbá hígítószer vagy hordozót is tartalmaz.

50. A 49. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

51. Az 1. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén humán respirátoros syncytialis vírus (RSV).

52. Az 51. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott RSV-antigén egy RSV-fehérje, a fehérjéből származó polipeptid, peptid vagy fragmens.

53. Az 52. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a kiválasztott antigén RSV fúziós (F) fehérjéje.

54. Az 51. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

55. Az 51. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor vagy interleukin-12.

56. Az 55. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin granulocita/makrofág kolóniastimuláló faktor.

57. Az 56. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

58. Az 55. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a citokin vagy limfokin interleukin-12.

59. Az 58. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

60. Az 51. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amely továbbá hígítószer vagy hordozót is tartalmaz.

61. A 60. igénypont szerinti, antigén hatású készítmény, amelyben a 3-O-deacilált-monofoszforil-lipid A stabil, olaj a vízben emulzió formájában van.

62. Eljárás HIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek a 18. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

63. Eljárás HIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek a 27. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

64. A 63. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy HIV-antigénként a következő aminosavszekvenciájú HIV-peptidet alkalmazzuk:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile
His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (1. azonosítószámú szekvencia).

65. A 63. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy HIV-antigénként a következő aminosavszekvenciájú HIV-peptidet alkalmazzuk:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His
Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (2. azonosítószámú szekvencia).

66. Eljárás HIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon,

azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 18. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

67. Eljárás HIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 27. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

68. A 67. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy HIV-antigénként a következő aminosavszekvenciájú HIV-peptidet alkalmazzuk:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Cys Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile
His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (1. azonosítósza-
mú szekvencia).

69. A 67. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy HIV-antigénként a következő aminosavszekvenciájú HIV-peptidet alkalmazzuk:

Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala
Met Tyr Ala Thr Arg Pro Asn Tyr Asn Lys Arg Lys Arg Ile His
Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys (2. azonosító-
számú szekvencia).

70. Eljárás SIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 29. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

71. Eljárás SIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 38. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

72. A 71. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy SIV-antigénként a következő aminosavszekvenciájú SIV-peptidek bármelyikét alkalmazzuk:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (3. azonosítószámú szekvencia), Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (4. azonosítószámú szekvencia), Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (5. azonosítószámú szekvencia), Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (7. azonosítószámú szekvencia), Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (8. azonosítószámú szekvencia) és Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (9. azonosítószámú szekvencia).

73. Eljárás SIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 29. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

74. Eljárás SIV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 38. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

75. A 74. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy SIV-antigénként a következő aminosavszekvenciájú SIV-peptidek bármelyikét alkalmazzuk:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (3. azonosítószámú szekvencia), Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (4. azonosítószámú szekvencia), Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (5. azonosítószámú szekvencia), Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (7. azonosítószámú szekvencia), Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (8. azonosítószámú szekvencia) és Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (9. azonosítószámú szekvencia).

76. Eljárás *Neisseria gonorrhoeae*-ből származó antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 40. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

77. Eljárás *Neisseria gonorrhoeae*ből származó antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 49. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

78. A 77. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Neisseria gonorrhoeae* antigénjeként *Neisseria gonorrhoeae* porin B fehérjéjét alkalmazzuk.

79. Eljárás *Neisseria gonorrhoeae*ből származó antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 40. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

80. Eljárás *Neisseria gonorrhoeae*ből származó antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, azzal jellemezve, hogy a gazdaszervezetnek a 49. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

81. A 80. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Neisseria gonorrhoeae* antigénjeként *Neisseria gonorrhoeae* porin B fehérjéjét alkalmazzuk.

82. Eljárás humán respirátoros syncytialis vírus (RSV) antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, azzal jellemezve, hogy a gazda-

szervezetnek az 51. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

83. Eljárás RSV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy immunválaszt váltson ki egy gerinces gazdaszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek a 60. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

84. A 83. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy RSV-antigénként RSV fúziós (F) fehérjéjét alkalmazzuk.

85. Eljárás RSV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek az 51. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

86. Eljárás RSV-antigént tartalmazó, antigén hatású készítmény azon képességének fokozására, hogy egy gerinces gazdaszervezetben citotoxikus T-limfocitákat indukáljon, *azzal jellemezve*, hogy a gazdaszervezetnek a 60. igénypont szerinti, antigén hatású készítményt adagoljuk.

87. A 86. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy RSV-antigénként RSV fúziós (F) fehérjéjét alkalmazzuk.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivőjelölt

Földes

P02001220

PCT/US00/13156

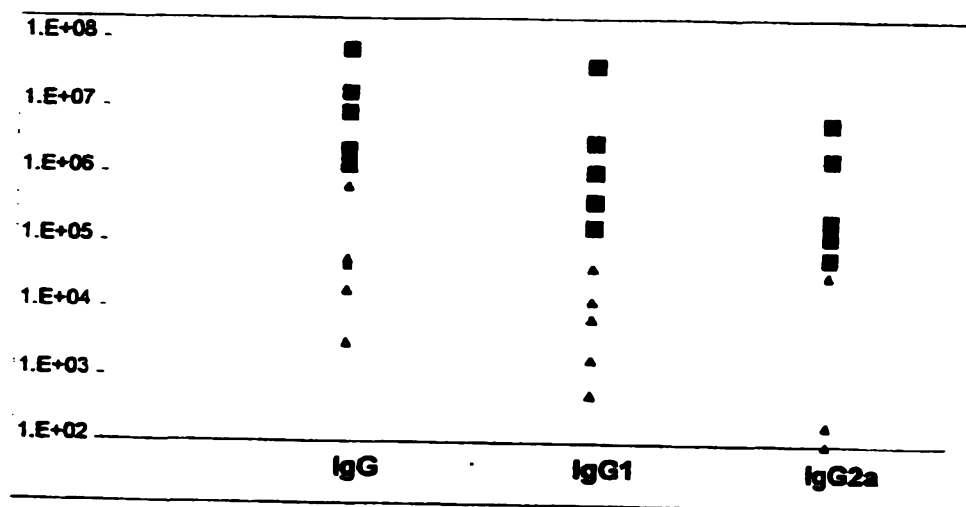
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A2

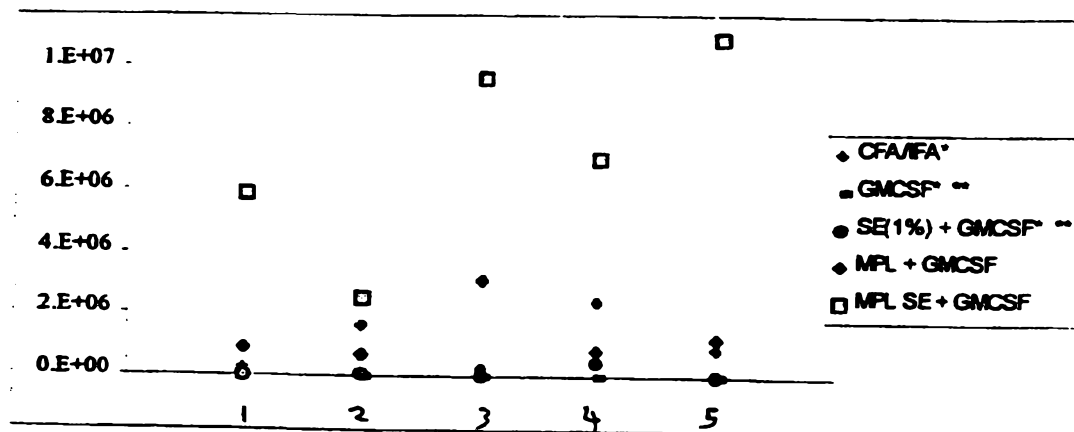
10809

1/5

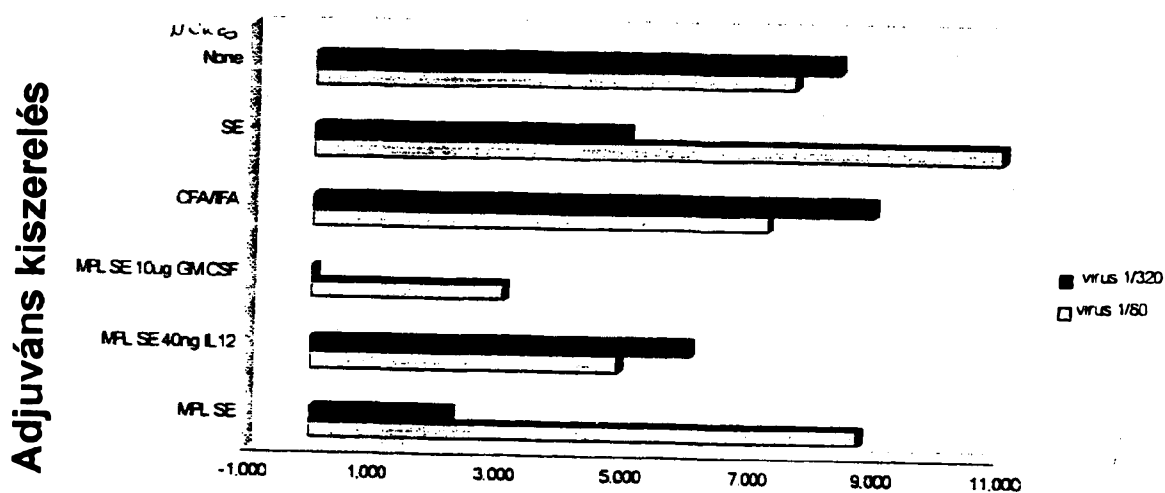
1. ábra



2. ábra

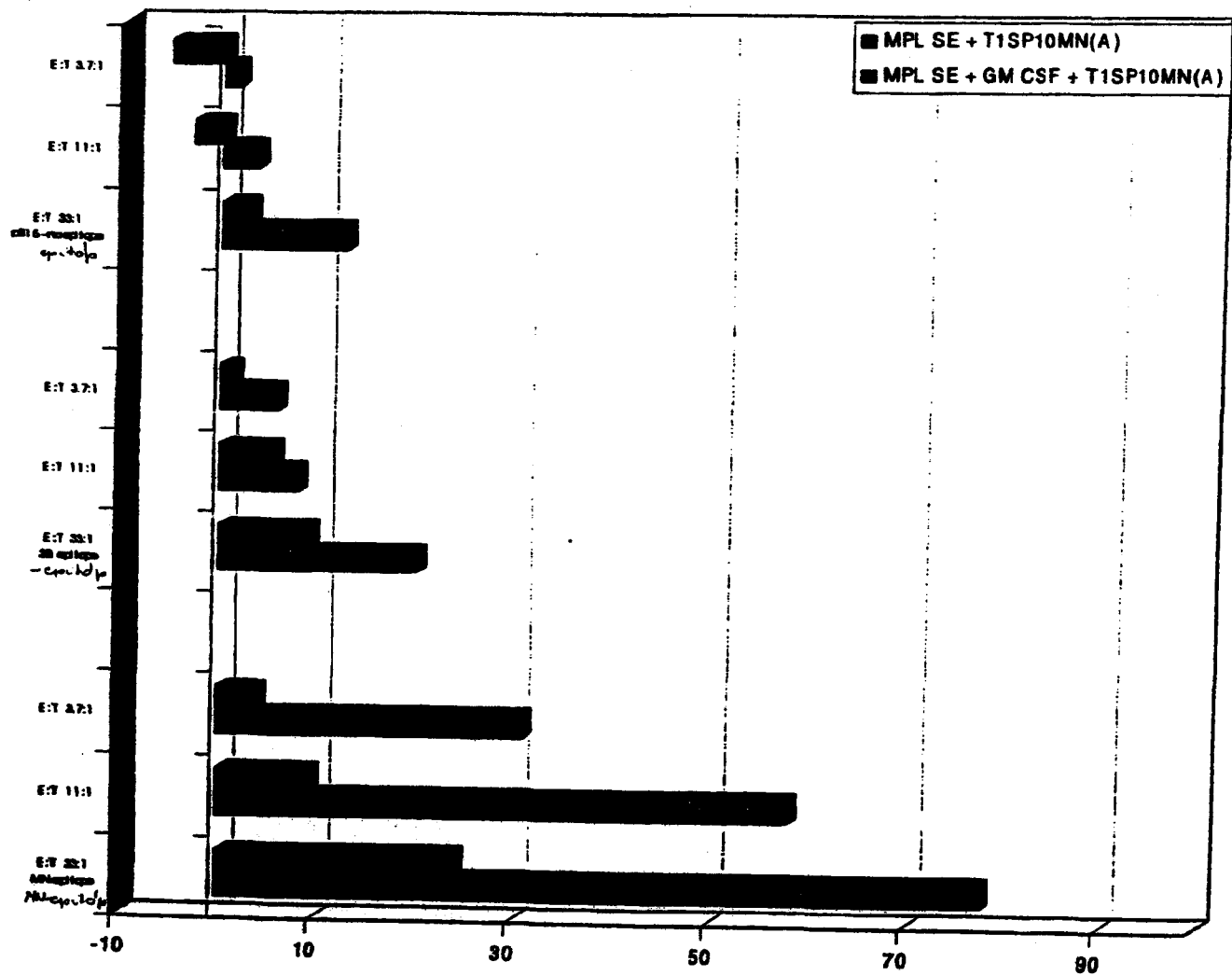


3. ábra



Reverz-transzkriptáz-egységek

5. ábra



CTL-vizsgálat százalékban