



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76406

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 39/39

A61K 39/00

A61K 39/002

A61K 39/02

A61K 39/12

A61K 39/35

A61K 35/12

A61K 38/20

A61K 38/17

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

**(54) АНТИГЕННА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ АНТИГЕН ТА АД'ЮВАНТНУ КОМБІНАЦІЮ З 3-О-ДЕЗАЦИЛОВАНОГО МОНОФОСФОРИЛОВАНОГО ЛІПІДУ А АБО МОНОФОСФОРИЛОВАНОГО ЛІПІДУ А ТА GM-CSF АБО IL-12, ТА ЗАСТОСУВАННЯ ВКАЗАНОЇ АД'ЮВАНТНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПОСИЛЕННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ХРЕБЕТНИХ ТВАРИН**

1

2

(21) 2001128558

(22) 12.05.2000

(24) 15.08.2006

(86) PCT/US00/13156, 12.05.2000

(31) 60/133,963

(32) 13.05.1999

(33) US

(46) 01.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Хейджен Майкл, US

(73) УАЙТ ХОЛДІНГЗ КОРПОРЕЙШН, US

(56) WO A 9857659, 23.12.98.

WO A 9927944, 10.06.99.

Jeffrey D. et al.: "Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to Hiv-1 vaccine constructs : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes", Journal of immunology, vol. 158, 1997, p. 3947-3958.

WO A 9529700, 09.11.95.

WO A 9856415, 17.12.98.

WO A 9728273, 07.08.97.

WO A 9817799, 30.04.98.

US A 5776468, 07.07.98.

US A 5762943, 09.06.98.

WO A 9116819, 14.11.91.

Vaslin B. et al.: "Induction of humoral and cellular immunity to simian immunodeficiency virus: What are the requirements for protection?", Vaccine, vol. 12, no. 12, 1994, pages 1132-140, XP002153339, ISSN: 0264-410X.

WO A 9902132, 21.01.99.

WO A 9912565, 18.03.99.

**(57)** 1. Антигенна композиція, що містить антиген, вибраний з групи, що включає патогенні віруси, бактерії, гриби, паразитичні організми, антигени

пухлинних клітин, в тому числі злоякісних, і ефективну кількість ад'ювантної комбінації з 3-О-дезацілового монофосфорилового ліпиду А або монофосфорилового ліпиду А у комбінації з GM-CSF або IL-12, що посилює імунну відповідь на вказаний антиген у хребетної тварини.

2. Антигенна композиція за п.1, де вибраний антиген являє собою антиген вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ).

3. Антигенна композиція за п.1, де вибраний антиген являє собою антиген вірусу імунодефіциту мавпи (ВІМ).

4. Антигенна композиція за п.1, де вибраний антиген являє собою Neisseria gonorrhoeae.

5. Антигенна композиція за п.1, де вибраний антиген являє собою антиген людського респіраторно-синцитіального вірусу (RSV).

6. Антигенна композиція, що містить антиген, вибраний з групи, що включає алерген або поліпептид, пептид або фрагмент амілоїдного білка і ефективну кількість ад'ювантної комбінації з 3-О-дезацілового монофосфорилового ліпиду А або монофосфорилового ліпиду А у комбінації з GM-CSF або IL-12, що посилює імунну відповідь на вказаний антиген у хребетної тварини.

7. Антигенна композиція за будь-яким з пп.1-6, яка додатково містить розріджувач або носій.

8. Застосування ефективної кількості ад'ювантної комбінації з 3-О-дезацілового монофосфорилового ліпиду А або монофосфорилового ліпиду А у комбінації з GM-CSF або IL-12 для приготування антигенної композиції, яка містить антиген, вибраний з групи, що включає патогенні віруси, бактерії, гриби або паразитичні організми, причому дана ад'ювантна комбінація посилює імунну відповідь

(13) C2

(11) 76406

(19) UA

на вказаний антиген у хребетної тварини.

9. Застосування за п.8, де імунна відповідь визначається цитоксичними Т-лімфоцитами.

10. Застосування за п.8 або 9, де вказаний антиген являє собою антиген ВІЛ.

11. Застосування за п.8 або 9, де вказаний антиген являє собою антиген ВІМ.

12. Застосування за п.8 або 9, де вказаний антиген являє собою антиген *Neisseria gonorrhoeae*.

13. Застосування за п.8 або 9, де вказаний антиген являє собою антиген RSV людини.

14. Застосування ефективної кількості ад'ювантної комбінації з 3-О-дезацильованого монофосфорилованого ліпиду А або монофосфорилованого ліпиду А у комбінації з GM-CSF або IL-12 для приготування антигенної композиції для лікування або профілактики раку у хребетної тварини, що містить антиген пухлинних клітин, в тому числі злоякісних.

15. Застосування ефективної кількості ад'ювантної комбінації з 3-О-дезацильованого монофосфорилованого ліпиду А або монофосфорилованого ліпиду А у комбінації з GM-CSF або IL-12 для приготування антигенної композиції, яка містить вибраний алерген, причому дана ад'ювантна комбінація посилює здатність організму хребетного послаблювати реакцію на вказаний алерген.

16. Застосування ефективної кількості ад'ювантної комбінації з 3-О-дезацильованого монофосфорилованого ліпиду А або монофосфорилованого ліпиду А у комбінації з GM-CSF або IL-12 для приготування антигенної композиції для лікування або профілактики захворювання, яке характеризується відкладенням амілоїдного білка в організмі хребетного хазяїна, що містить поліпептид, пептид або фрагмент амілоїдного білка або антитіло проти нього.

Даний винахід відноситься до застосування 3-О-дезацильованого монофосфорилованого ліпиду А або монофосфорилованого ліпиду А і їх похідних і аналогів в комбінації з цитокином або лімфокином, зокрема, з гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором або інтерлейкіном-12, як ад'ювантною композицією в антигенній композиції для посилення імунної відповіді у хребетного господаря на вибраний антиген.

Імунна система використовує різноманітні механізми для боротьби з патогенами. Однак не всі ці механізми обов'язково активуються після імунізації. Захисний імунітет, що викликається імунізацією, залежить від здатності вакцини індукувати відповідну імунну відповідь для опору або знищення патогену. В залежності від виду патогену це може вимагати клітинної і/або гуморальної імунної відповіді.

Сучасне уявлення про роль Т-хелперних клітин в імунній відповіді полягає в тому, що Т-клітини можуть бути поділені на субпопуляції по цитокинам, які вони продукують, і цей індивідуальний цитокиновий профіль, що спостерігається у таких клітин, визначає їх функцію. Дана Т-клітинна модель включає дві головні субпопуляції: клітини TH-1, які продукують інтерлейкін-2 (IL-2) і гамма-інтерферон, що посилюють як клітинну, так і гуморальну (антитільну) імунні відповіді; і клітини TH-2, які продукують інтерлейкін-4, інтерлейкін-5 і інтерлейкін-10 (IL-4, IL-5 і IL-10, відповідно), що посилюють гуморальні імунні відповіді [бібліографічне посилання 1].

Часто бажано посилити імуногенну ефективність антигенна для отримання більш сильної імунної відповіді в імунізованому організмі і посилити стійкість господаря до агента, несучого антиген. У деяких випадках, бажано змінити імунну відповідь від переважаючої гуморальної відповіді (TH-2) на більш збалансовану клітинну (TH-1) і гуморальну (TH-2) відповідь.

Клітинна відповідь включає індукцію відповіді, опосередкованої CD8+CTL (цитотоксичними Т-лімфоцитами). Така відповідь бажана при розробці

вакцин проти внутрішньоклітинних патогенів. Захист проти різноманітних патогенів вимагає сильних імунних відповідей слизової оболонки, високих сироваткових титрів, індукції CTL і сильних клітинних відповідей. Такі відповіді не індукуються більшістю антигенних препаратів, включаючи традиційні субодичні вакцини. Одним з таких патогенів є вірус імунодефіциту людини (ВІЛ).

Таким чином, існує потреба в розробці складів антигенних композицій, які здатні індукувати як гуморальну, так і клітинну імунні відповіді у хребетного господаря.

Відповідно, метою даного винаходу є використання ад'ювантних комбінованих композицій в складі антигенних композицій, що містять 3-О-дезацильований монофосфорилований ліпід А (MPL™) або монофосфорилований ліпід А і їх похідні і аналоги в комбінації з цитокином або лімфокином, зокрема, гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим фактором (GM-CSF) або інтерлейкіном (IL-12), або агоністом або антагоністом вказаного цитокіна або лімфокіна. Ад'ювант являє собою речовину, яка посилює імунну відповідь при спільному введенні з імуногеном або антигеном. Ад'ювантна композиція по даному винаходу вводиться разом з вибраним антигеном в антигенній композиції. Антигенні композиції по даному винаходу посилюють імунну відповідь у хребетного господаря на вибраний антиген. Вибраний антиген може бути поліпептидом, пептидом або фрагментом, отриманим [1] з патогенного вірусу, бактерії, гриба або паразита, або [2] із злоякісної клітини або пухлинної клітини або [3] з алергену, який впливає на продукцію IgE, для ослаблення алергічних реакцій на алерген або [4] з амілоїдного пептидного білка для профілактики або лікування захворювання, яке характеризується відкладенням амілоїда у хребетного господаря. У першому втіленні винаходу, вибраний антиген є антигеном ВІЛ. Вибраний антиген ВІЛ може бути білком ВІЛ, поліпептидом, пептидом або фрагментом, отриманим з вказаного білка. У конкретному втіленні винаходу, антиген ВІЛ являє

собою специфічний пептид. В інших втіленнях винаходу, вибраний антиген є антигеном *Neisseria gonorrhoeae* або респіраторного синцитіального вірусу.

MPL™ може знаходитися у вигляді водного розчину або у вигляді стабілізованої емульсії "масло у воді" (стабільна емульсія, або CE). У переважному втіленні винаходу, емульсія "масло у воді" містить сквален, гліцерин і фосфатидилхолін. У CE композиції MPL™ є змішаним з цитокином або лімфокином з утворенням антигенної композиції до введення. Цитокін або лімфокін не обов'язково додають в емульсію. У переважному втіленні винаходу, MPL™ знаходиться в формі CE. Антигенна композиція, крім того, може включати в себе роздмувач або носій.

Винахід також відноситься до способів підвищення здатності антигенної композиції, що містить вибраний антиген з [1] антигена патогенного вірусу, бактерії, гриба або паразита індукувати імунну відповідь у хребетного господаря, або з [2] антигена злоякісної клітини або з асоційованого з пухлинною антигена злоякісної або пухлинної клітини, викликати терапевтичний або профілактичний протираковий ефект у хребетного господаря, або з [3] алергену, який впливає на продукцію IgE, ослаблювати алергічні реакції на алерген, або з [4] антигена амілоїдного білка для профілактики або лікування захворювання, що характеризується відкладенням амілоїда, у хребетного господаря, введенням ефективної ад'ювантної (що посилює) кількості в комбінації з цитокином або лімфокином, зокрема, MPL™ з GM-CSF або IL-12, або агоністом або антагоністом вказаного цитокіна або лімфокіна.

Винахід, крім того, відноситься до способів підвищення здатності антигенної композиції, що містить антиген, вибраний з антигена патогенного вірусу, бактерії, гриба або паразита, активувати цитотоксичні Т-лімфоцити у хребетного господаря шляхом введення ефективної ад'ювантної (що посилює) кількості в комбінації з цитокином або лімфокином, зокрема, MPL™ з GM-CSF або IL-12, або агоністом або антагоністом вказаного цитокіна або лімфокіна.

На Фіг.1 зображені реципрокні кінцеві точки титрувань, визначені у груп з п'яти самиць мишей Balb/c, імунізованих 25мкг TISP10MN(A)(-Cys), мультіепітопним пептидом з 39 амінокислот, в складі з CFA або IFA (трикутники), або 50мкг 2% стабільною емульсією (CE) MPL™ (квадрати). Мишей

імунізували на 0 день і повторно імунізували на 28 день. Титри пептид-специфічних IgG, IgG1 і IgG2a визначали в сироватках, зібраних на 42 день з допомогою ELISA.

На Фіг.2 проілюстрований ефект одного CE, один MPL™ або CE MPL™ на посилення впливу GM-CSF на титри анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG. Групи з п'яти самиць Balb/c імунізували 25мкг TISP10MN (A) (-Cys) в 0 день і повторно імунізували на 28 день вказаними ад'ювантними композиціями. CFA і IFA емульгували у водному розчині пептиду у відношенні 1:1. GM-CSF використали в концентрації 10мкг/доза. MPL™ вводили мишам у вигляді водної композиції в кінцевій концентрації 50мкг або як компонент стабільної емульсії в концентрації 25мкг с 1% CE. Титри визначали через дві тижні після повторної імунізації. Дані являють собою окремі титри, визначені у п'яти мишей.

На Фіг.3 приведені результати аналізу вірусної нейтралізації. Об'єднану сироватку, взятую на 42 день у мишей, імунізованих на 0 і 28 дні вказаними композиціями, розбавляли (1/1600) і додавали до розведень HIV<sub>MN</sub> адаптованих Т-клітин перед додаванням до клітин AA5 *in vitro*. Через сім днів культивування, супернатант клітинної культури аналізували на зворотну транскриптазу вірусу як індикатора вірусної реплікації.

На Фіг.4 проілюстрована проліферація клітин селезінки мишей, імунізованих TISP10MN (A; i; -Cys) і різними ад'ювантними композиціями. Клітини селезінки стимулювали *in vitro* 3,3мкг/мл TISP10MN(A)(-Cys) протягом чотирьох днів. Результати показані як зміна впровадження міченого тимідину в результаті *in vitro* стимуляції TISP10MN(A)(-Cys) відносно впровадження при відсутності стимуляції (різниця кількості імпульсів на хвилину).

На Фіг.5 показана активність CTL з селезінки, виділених у мишей через сім днів після повторної імунізації. Клітини селезінки збирали у груп з трьох мишей Balb/c, імунізованих на 0 і 21 дні 50мкг TISP10MN(A) (-Cys) включеним в композицію з 50мкг MPL™ в 1% CE з або без 10мкг GM-CSF. Клітини культивували з пептидом HIV<sub>MN</sub>, що містить епітоп CTL, протягом семи днів. Протягом останніх п'яти днів в культуру додавали IL-2. Ефекторні клітини селезінки додавали до мічених хромом клітинам P815, імпульсно-міченим HIV<sub>MN</sub>, іншим штамам, позначеним як HIV<sub>MN</sub>, або без пептиду, у вказаних пропорціях. Процент активності CTL розраховували як:

$$\frac{\text{специфічне випромінювання (імп/хв.)} - \text{спонтанне випромінювання (імп/хв.)}}{\text{загальний максимум (імп/хв.)} - \text{спонтанне випромінювання (імп/хв.)}} \times 100$$

«Е:Т» означає відношення ефекторних клітин до мічених.

Ад'юванти, цитокини і лімфокини являють собою імунно-модуючі сполуки, які володіють здатністю посилювати і направляти розвиток і профіль імунних відповідей на різні антигени, які самі по собі є слабкими імуногенами. Правильний вибір ад'ювантів, цитокінів або лімфокінів може індукувати сильну гуморальну і клітинну імунні відповіді, які не розвинулися б за відсутності ад'юванта, ци-

токіна або лімфокіна. Зокрема, ад'юванти, цитокини і лімфокини мають значні ефекти посилення імунної відповіді на субодичні і пептидні антигени у вакцинах. Їх стимулююча активність також корисна при розвитку антигенспецифічних імунних відповідей проти білкових антигенів. Для різних антигенів, проти яких потрібне створення сильних імунних відповідей слизової оболонки, високих сироваткових титрів, індукція CTL і сильні клітинні відповіді, комбінації ад'юванта і цитокіна/лімфокіна

забезпечують стимули, які не забезпечуються більшістю антигенних препаратів.

У множині досліджень оцінювали різні ад'ювантні композиції на тваринних моделях, але в цей час єдиним ад'ювантом, дозволеним для широкого використання на людях, є алюм (гідроксид алюмінію або фосфат алюмінію). Одна група ад'ювантів, стабільних емульсій, що містять різні комбінації «вода в маслі» і «масло у воді», привернула значну увагу внаслідок своєї імунопотенціювальної здатності. Ці композиції, як правило, включають різні комбінації метаболізованих або інертних масел, чия дія полягає в стабілізації і депонуванні антигенів в місці введення. Одним з таких ад'ювантів є неповний ад'ювант Фройнда (IFA), який включає мінеральне масло, воду і емульгатор. Повний ад'ювант Фройнда (CFA) являє собою IFA з додаванням убитих нагріванням мікобактерій. Особливою проблемою при використанні цих типів ад'ювантів є подразнення в місці введення, часто в результаті інфільтрації мононуклеарними клітинами, що приводить до утворення гранулематозних осередків. Отже, як можливі ад'юванти досліджуються інші сполуки і композиції.

Однією з таких сполук є 3-О-дезацильований монофосфорильований ліпід А (MPL™), розповсюджуваний Ribi ImmunoChem Research Inc. (Hamilton, MT). MPL™ [описаний в патенті США №4912094 (2)], який включений сюди як посилення.

Нещодавно, Ribi ImmunoChem Research Inc. розробила метаболізовану композицію «масло-в-воді», яка при об'єднанні з MPL™, приводить до утворення стабілізованої емульсії, позначеної як CE MPL™. Стабільну емульсію отримували шляхом мікророздідування MPL™ маслом сквалену, гліцерином і фосфатидилхоліном. Ця композиція являє собою характерну мікророзділену емульсію категорії GMP. Емульсії, що містять 1 або 2% масла описані в експериментах нижче.

Підшкірне або внутрішньом'язове введення CE MPL™ мишам Balb/c не приводило до тканинної патології, що визначається в місці введення. У порівняльних цілях також отримували стабільну емульсію що містить ті ж самі компоненти, але без MPL™. Конкретно, підшкірна або внутрішньом'язова імунізація пептидом B1L TISP10MN(A)(+Cys) з 40 амінокислот або пептидом з видаленим цистеїном TISP10MN(A)(-Cys) з 39 амінокислот (відсутність цистеїнового залишку в положенні 17 40-амінокислотного пептиду (+Cys)) включеним в композицію з ад'ювантом CE MPL™ і GM-CSF, не приводила до інфільтрації, що визначається, або до тканинних порушень через два тижні після імунізації.

Також даний винахід відноситься до застосування монофосфорильованого ліпіда А, попередника MPL™, який також [описаний в патенті США №4912094 (2)]. Крім того, даний винахід відноситься до похідних і аналогів MPL™ і монофосфорильованого ліпіда А.

Введення цитокінів і лімфокінів у вакцинні композиції свідчить про розширення і підвищення потенціалу вакцини [3]. Було показано, що цитокін інтерлейкін-12 (IL-12) стимулює і посилює клітинний імунітет шляхом зсуву розмноження субпопу-

ляції Т-хелперних клітин у бік TH1 цитокінового профілю (тобто, підкласу IgG2 на моделі миші) [4-6]. На мишах було показано, що рекомбінантний мишацій IL-12 посилює перевагу TH-1 профілю імунної відповіді [3].

IL-12 продукується різноманітними антиген-презентуючими клітинами, переважно макрофагами і моноцитами. Він є ключовим елементом індукції TH1 клітин з нативних Т-клітин. Було показано, що продукція IL-12 або властивість відповідати на нього є ключовими при розвитку захисних TH1-подібних відповідей, наприклад, при паразитарних інвазіях, особливо при лейшманіозі [7]. Ефекти IL-12 опосередковані у великій мірі гамма-інтерфероном, продукованим NK-клітинами і Т-хелперними клітинами. Гамма-інтерферон є ключовим для індукції антитіл IgG2a проти Т-залежних білкових антигенів [8] і HgG3-відповідей на Т-незалежні антигени [9]. IL-12, спочатку названий як стимулюючий фактор натуральних кілерів, представляє собою гетеродимерний цитокін [10]. Експресія і виділення білка IL-12 з рекомбінантних клітин-господарів [описані в опублікованій міжнародній патентній заявці WO 90/05147 (11)].

Іншим цитокіном, який є потенційним ад'ювантом, є GM-CSF. GM-CSF являє собою особливий вигляд колонієстимулюючого фактора (CSF). CSF являють собою сімейство лімфокінів, які індукують диференціювання клітин-попередників в кістковому мозку в конкретні типи зрілих клітин крові. Як [описано в патенті США №5078996 (12)], який включений сюди як посилення, GM-CSF активує макрофаги або попередники-моноцити для опосередкування неспецифічної протипухлинної активності. Була описана нуклеотидна послідовність, що кодує ген GM-CSF людини [12]. Плазмідною, що містить кДНК GM-CSF, трансформували E.coli і депонували в Американській колекції типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, під номером 39900. Як [описано в патенті США №5229496 (13)], який включений сюди як посилення, ген GM-CSF також був вставлений в дріжджову експресуючу плазмиду і депонований в ATCC під номером 53157. Крім того, як [описано в патенті США №5073627 (14)], який включений сюди як посилення, послідовність ДНК, що кодує GM-CSF з видаленими сайтами глікозилювання, була депонована в ATCC під номером 67231.

Показано, що GM-CSF позитивно регулює білкові молекули на антиген-презентуючих клітинах, що явно посилюють імунні відповіді [15] і що впливають на секрецію Ig в фракційно-очищених В-клітинах мишей (16).

Показано, що інші цитокіни або лімфокіни, включаючи, але не обмежуючись ними, інтерлейкіни 1-альфа, 1-бета, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 і 18, альфа-, бета- і гамма-інтерферони, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор і фактори некрозу пухлини альфа і бета, мають імуномодулюючу активність.

При системному введенні будь-якого цитокіна або лімфокіна необхідно враховувати біологічні наслідки, пов'язані з активністю цитокіна або лімфокіна. Крім того, ефекти цитокіна або лімфокіна, пов'язані з розвитком антигенспецифічних імунних

У цей час передбачається, що успішна стратегія вакцинації проти ВІЛ повинна викликати імунітет слизової оболонки на ВІЛ, також як і сильну відповідь CTL. У недавньому дослідженні на мишах, використовуючи мультіепітопний пептид TISP10MN(A) і холерний токсин як ад'ювант для відповіді слизової оболонки було показано, що

інтраназальна імунізація індукує нейтралізуючі сироваткові антитіла IgG1 [36]. Подальше дослідження, також при використанні пептидів петлі V3 ВІЛ, виявило індукцію синтезу антитіл IgA в слизовій і сильні клітинні відповіді, включаючи відповідь пептид-специфічних CTL [37]. Функціональна роль високих титрів системних і нейтралізуючих антитіл в профілактиці або стабілізації ВІЛ-інфекції невідома, хоч вважається, що високі титри вірус-специфічного антитіла важливі для запобігання поширенню вірусу.

У переважному втіленні винаходу отримували стабільну емульсію «масло у воді», утримуючу MPL™, яку потім змішували з цитокінами IL-12 або GM-CSF. Дані, представлені нижче, демонструють, що ці комбінації приводять до напрацювання високих титрів ВІЛ-нейтралізуючих сироваткових антитіл. Комбінація CE MPL™ і GM-CSF індукує напрацювання високих титрів антиген-специфічних антитіл IgG і IgA в зведенні піхви в імунізованих самиць мишей. Імунізація мишей будь-яким з пептидів TISP10MN(A), включених в композицію з CE MPL™ і GM-CSF, індукувала сильну клітинну імунну відповідь, судячи з посиленої антиген-специфічної клітинної проліферації і секреції цитокінів в культурі, а також, індукції пептид-специфічних відповідей CTL.

Звичайно антиген/ад'ювантна композиція MPL™ або CE MPL™, комбінована з GM-CSF або IL-12, і вибраним білком або пептидом, індукує напрацювання високих титрів антиген-специфічних і вірус-нейтралізуючих антитіл, істотна зміна в співвідношенні в підкласі IgG у бік більшої частки компонент-зв'язуючих антитіл IgG (у мишей в бік IgG2a), посилення продукції цитокінів і клітинної проліферації мононуклеарних клітин у відповідь на антигенну стимуляцію *in vitro*. Ці властивості не спостерігалися у композицій з антигена і CE у відсутність MPL™, або з GM-CSF або IL-12, або без них. Композиції по даному винаходу також індукують сильні клітинні відповіді, судячи з індукції CTL.

Корисною властивістю CE MPL™ є те, що композиція не індукує гранулематозне скупчення і запалення в місці введення; такі реакції в місці введення звичайно викликаються ад'ювантними композиціями «вода в маслі» або «масло у воді».

Здатність індукувати посилену імунну відповідь за допомогою стимулюючих ефектів MPL™ в поєднанні з GM-CSF або IL-12 у відсутність місцевого гранулематозного запалення не повідомлялася для інших ад'ювантних композицій, що пропонуються в цей час для лікування ВІЛ.

Проводилися ряд досліджень для порівняння MPL™ (або з CE, або без неї) плюс GM-CSF або IL-12 з кожним з MPL™, CE, GM-CSF, IL-12 або CFA/IFA окремо або разом з пептидом ВІЛ. Результати будуть коротко представлені з більш докладним обговоренням надалі.

У першому експерименті, миші Balb/c, підшкірно імунізовані пептидом TISP10MN(A)(-Cys) ВІЛ, що містить C4/V3, включеним в композицію з MPL™ CE і GM-CSF, виявляли сироваткові титри IgG вище за 10<sup>7</sup> лише після двох ін'єкцій. Гуморальна відповідь була ВІЛ-нейтралізуючою і характеризувалася істотним збільшенням титрів пептид-специфічних антитіл IgG1, IgG2a і IgG2b. Клітини

селезінки, простимульовані в культурі пептидом, секретували підвищені кількості IL-4, IL-5 і гамма-інтерферону. Разом ці результати свідчать про індукцію збалансованої відповіді типу TH-1/TH-2. У промивних рідинах піхви мишей, імунізованих CE MPL™ і GM-CSF, напрацьовувалися антитіла IgG і IgA, специфічні по відношенню до TISP10MN(A)(-Cys). Ці результати показують, що комбінація CE MPL™ і GM-CSF з пептидним антигеном ВІЛ приводить до індукції сприятливого профілю імунної відповіді.

У цьому першому експерименті, миші Balb/c, імунізовані пептидом TISP10MN(A)(-Cys) ВІЛ і CE-утримуючою ад'ювантною композицією або GM-CSF, виявляли титри пептидспецифічних антитіл IgG (таблиця 1). Стабільна емульсія (CE) «масло у воді», що складається з сквалену, гліцерину і емульгатора (фосфатидилхоліну), виявляла здатність збільшувати титри пептидспецифічних IgG при змішуванні з TISP10MN(A)(-Cys). Титри IgG, індуковані імунізацією 25мкг TISP10MN(A)(-Cys), включеного в композицію з CE, індукували титри повторної відповіді, які були рівні приблизно одній п'ятій таких, індукованих у мишей, імунізованих пептидом і CFA і повторно імунізованих пептидом в IFA. Реципієнти вакцини з CFA/IFA звичайно у відповідь на первинну імунізацію формували TISP10MN(A)(-Cys)-специфічні титри IgG. Для порівняння, мишей імунізували тільки 25мкг пептиду TISP10MN(A)(-Cys).

Водні і CE композиції MPL™ порівнювали по відповідях, що індукуються при імунізації мишей з ад'ювантами Фройнда або цитокінами IL-12 і GM-CSF. Реципієнти TISP10MN(A)(-Cys), змішаного з IL-12, як правило, не виявляли титри пептидспецифічних антитіл в декількох повторних дослідженнях. Навпаки, реципієнти GM-CSF або CE MPL™ плюс TISP10MN(A)(-Cys) виявляли низькі, але такі, що легко виявляються титри антитіл IgG. У відповідь на імунізацію композицією, що містить CE MPL™ разом з пептидом TISP10MN(A)(-Cys), з додаванням IL-12 або GM-CSF, індукувалися значно більш високі титри IgG. Дійсно, імунізація мишей поєднанням CE MPL™ і GM-CSF давала титри повторної відповіді, які були відповідно більшими за такі, визначені у мишей, імунізованих будь-якою іншою дослідженою композицією. Титри пептидспецифічних IgG були вищими від таких у мишей, імунізованих навіть 125мкг TISP10MN(A)(-Cys), включених у композицію з ад'ювантами Фройнда.

Бажаємою особливістю ВІЛ-специфічної імунної відповіді є баланс між клітинним і гуморальним компонентами. Встановлений взаємозв'язок індивідуальних підкласів ізотипів імуноглобуліну зі зсувом субпопуляції Т-хелперних клітин у бік переважання або TH-1, або TH-2. Цитокіни, секретовані кожною з цих субпопуляцій Т-хелперних клітин, виявляли активність в напрямі перемикавання підкласів IgG. Кінцеві точки титрувань підкласу IgG визначали з об'єднаних сироваток, зібраних через два тижні після другої імунізації (таблиця 2). Імунізація мишей тільки одним TISP10MN(A)(-Cys) або в складі або з GM-CSF, або з IL-12, приводила до відсутності або низьких титрів підкласу IgG в декількох повторних дослідженнях. Антитіла IgG3 не

були виявлені з допомогою ELISA. У групах мишей, імунованих TISP10MN(A)(-Cys), емульгованим в CFA, і повторно імунованих IFA, розвивалася переважно гуморальна IgG1 імунна відповідь, специфічна для TISP10MN(A) (-Cys). Композиції пептиду з CE, CE MPL™, CE MPL™+IL-12 або CE MPL™+GM-CSF, також індукували високі титри антитіла IgG1. Реципієнти, вакциновані CE композицією, неодноразово демонстрували високі титри IgG1 при невисоких титрах IgG2a або IgG2b. Включення MPL™ в CE композиції приводило до збільшення TISP10MN(A)(-Cys)-специфічних титрів антитіл IgG2a і IgG2b. Включення або IL-12, або GM-CSF в CE MPL™ і TISP10MN(A)(-Cys) приводило до зсуву відношення титрів антитіл IgG1:IgG2a. Без цитокінів вакцинна композиція CE MPL™ викликала схожі титри IgG1 і IgG2a. Як IL-12, так і GM-CSF збільшували відносні сироваткові концентрації пептид-специфічного IgG2a. Крім того, комбінація CE MPL™ і GM-CSF також спричинила істотне збільшення титрів антитіл IgG2b, специфічних для TISP10MN(A) (-Cys) (47-кратне в порівнянні з CE MPL™ і 74-кратне в порівнянні з CE). Титри, що напрацьовуються у мишей, імунованих CE MPL™ і GM-CSF, разом з пептидом TISP10MN(A)(-Cys), були погоджені найвищими в будь-якій групі вакцинованих реципієнтів.

Визначення високих титрів, виміряних в об'єднаних сироватках мишей, імунованих TISP10MN(A)(-Cys), MPL™ CE і GM-CSF, були характерними для окремих мишей в межах групи, титри окремих мишей в межах цієї групи порівнювали з такими у мишей, імунованих пептидом з ад'ювантом Фройнда (на Фіг.1). Було показано, що в середньому окремі сироваткові титри IgG, IgG1 і IgG2a були схожі з титрами, виміряними в об'єднаних сироватках (дані не показані). Співкомпозиція TISP10MN(A) (-Cys) з CE MPL™ і GM-CSF приводить до значного збільшення титрів IgG, IgG1 і IgG2a в порівнянні з титрами, індукованими у мишей, імунованих CFA/IFA. Всі миші, імуновані CE MPL™ і GM-CSF включеним в композицію з пептидом, індукували більш високі титри антитіл IgG чим, ті, які вимірювали у мишей, імунованих композицією CFA/IFA. Ці результати показали, що комбінація CE MPL™ з GM-CSF генерує відповідний профіль гуморальної імунної відповіді, що визначається високими титрами пептид-специфічних антитіл, і відповідний розподіл підкласів IgG. Ця композиція звичайно індукує самі високі TISP10MN(A)(-Cys)-специфічні титри будь-якої композиції вакцини, що використовується.

Проводили порівняння титрів IgG анти-TISP10MN(A)(-Cys) у мишей, імунованих GM-CSF, включеним в композицію із водним MPL™, CE або CE MPL™, для визначення ефектів GM-CSF як додаткового ад'юванта (на Фіг.2). Результати показали, що в цьому окремому втіленні комбінація CE MPL з GM-CSF і пептидом є унікальною для індукції високого титру антитіл. MPL™ плюс GM-CSF демонстрував титри порівнянні з CFA/IFA. Таким чином, ад'ювантні властивості MPL™ і GM-CSF, виглядають синергічними, коли знаходяться в загальному складі, де MPL™ знаходиться або у водній формі, або у вигляді стабільної емульсії.

Потім вимірювали TISP10MN(A)(-Cys)-

специфічні титри антитіл в об'єднаних промивних рідинах піхви, отриманих у мишей через чотири тижні після другої імунізації (таблиця 3). У мишей, імунованих CE MPL™ плюс GM-CSF, формувалися високі титри антитіл IgA і IgG. Титри антитіл у вагінальній промивній рідині, отриманій у мишей, імунованих іншими композиціями, звичайно не виявлялися. Оскільки відношення IgG до IgA у вагінальній промивній рідині зсунуте в бік IgG, і оскільки IgA не був вимірюваний, неможливо зробити висновок про те, що антитіло IgA, виявлене у вагінальній промивній рідині, є локально таким, що синтезується слизовою оболонкою. Дійсно, ймовірно, що виявлені титри IgA і IgG є результатом транссудативної імуноглобулінової секреції плазматичних клітин, розташованих на периферії слизової оболонки піхви.

Ці результати показують, що миші, імуновані пептидом B1L TISP10MN(A) (-Cys) включеним в композицію з CE MPL™ в комбінації з або IL-12, або GM-CSF, мали високі титри пептид-специфічних сироваткових антитіл.

Щоб оцінити, чи були ці титри антитіл функціонально ефективними, сироватку аналізували на її здатність інгібувати інфекцію клітин *in vitro* за допомогою лабораторного штаму B1L. Аналіз вимірював активність зворотної транскриптази вірусу, яка знижувалася в супернатанті культури клітин, інфікованих відповідним штамом B1L. Сироватка мишей, імунованих CE MPL™ і GM-CSF, або CE MPL™ і IL-12, в обох випадках значно зменшувала вірусну інфективність (на Фіг.3). Максимальні одиниці зворотної транскриптази вірусу знаходилися в області від 9481 до 10411. Сироватка мишей, імунованих тією ж композицією, інгібувала вірусну реплікацію. Навіть при розведенні вірусу тільки 1/20, сироватка мишей, імунованих CE MPL™ і GM-CSF разом з TISP10MN(A)(-Cys), інгібувала вірусну реплікацію приблизно на п'ятдесят процентів. Титри нейтралізуючої сироватки цієї композиції визначали як більше ніж 1600, в порівнянні з 71 для сироватки, отриманої від мишей, імунованих композицією CE MPL™, IL-12 і пептидом B1L.

Титри анти-TISP10MN(A)(-Cys) сироватки з цих груп мишей були схожі (хоч і трохи вище) з тими, які були викликані у мишей, імунованих CFA і IFA. Сироватки мишей, імунованих TISP10MN(A)(-Cys), емульгованих з CFA/IFA, не демонстрували B1L-нейтралізацію в цьому аналізі. Сироватки мишей, імунованих пептидом і комбінацією CE MPL™ плюс GM-CSF як ад'ювант, демонстрували більшу нейтралізуючу активність, чим будь-які інші сироватки. При еквівалентному розведенні, сироватки мишей, імунованих CE MPL™ плюс GM-CSF і пептидом B1L, нейтралізували більш високі концентрації вірусу, чим сироватки реципієнтів інших вакцинних композицій.

Потім вимірювали B1L-пептидспецифічну проліферацію в культурі клітин селезінки. Для вимірювання клітинної реактивності на TISP10MN(A)(-Cys), клітини селезінки культивували *in vitro* з пептидом або контрольними білками. У аналізі вимірювали включення <sup>3</sup>H-тимідину в ДНК клітин, що діляться (таблиця 4). На відміну від клітин селезінки мишей, імунованих без ад'юванта, клітини селезінки мишей, імунованих TISP10MN(A) (-Cys)

включеним в композицію з СЕ, активно проліферували у відповідь на пептид. Клітини селезінки вакцинованих реципієнтів не відповідали в культурі на нерелевантний антиген (лізозим) або на безантигенну стимуляцію. На стимуляцію мітогеном ConA всі групи відповідали однаково. У межах більшості груп проліферативна відповідь залежала від вказаної антигенспецифічної дози. Всі три дози давали саму високу міру проліферації в групах мишей, імунізованих GM-CSF, включеним в композицію з СЕ MPL™. Самі низькі проліферативні відповіді були отримані у клітин селезінки груп мишей, імунізованих вакцинами з CFA/IFA або IL-12, включеним в композицію з пептидом ВІЛ. Клітини селезінки мишей, імунізованих пептидом і або СЕ, або GM-CSF, включали в себе схожі рівні тимідину в культурі. Ці результати показали, що співкомпозиції пептиду ВІЛ з СЕ MPL™ і GM-CSF забезпечують саму високу проліферативну активність клітин селезінки мишей у відповідь на *in vitro* презентований антиген.

Культивовані клітини селезінки досліджували на їх можливість секретувати цитокіни IL-4 (таблиця 5) і гамма-інтерферон (таблиця 6) в культурі супернатантів. Ці цитокіни вимірювали в культурах супернатантів, зібраних через три і шість днів *in vitro* після стимуляції антигеном або мітогеном. Вимірювання IL-4, цитокіна пов'язаного з Т-хелпером другого типу, показало, що не дивлячись на те, що всі групи продукували на 3 день рівні, що виявляються у відповідь на стимуляцію мітогеном ConA, тільки миші, імунізовані MPL™ СЕ або СЕ MPL™ плюс GM-CSF, продукували IL-4 у відповідь на стимуляцію пептидом. Тільки миші, імунізовані MPL™ СЕ плюс GM-CSF і TISP10MN(A)(-Cys), секретували в культуру рівні, що виявляються IL-4 з всіма дозами пептиду, що використовуються для стимуляції клітин селезінки. На шостий день культивування, клітини селезінки мишей, імунізованих пептидом разом з СЕ MPL™ плюс GM-CSF, секретували більш високі рівні IL-4, ніж ті, що виявляються у мишей, імунізованих пептидом разом з СЕ MPL™, СЕ MPL™ плюс IL-12 або СЕ. Рівні IL-4 були навіть вищими ніж ті, що індукуються шляхом стимуляції цих клітин ConA. Клітини селезінки мишей, що культивуються, імунізованих СЕ MPL™ плюс GM-CSF, також у відповідь на стимуляцію TISP10MN(A)(-Cys) протягом шести днів секретували в культуру рівні, що виявляються IL-5 (інший цитокін Т-хелпера другого типу (не показано)). Клітини селезінки ні від яких інших груп не продукували IL-5, що виявляється в цих культурах.

У відповідь на триденну стимуляцію культури ConA, клітини селезінки всіх груп мишей секретували рівні гамма-інтерферону, що виявляються в культурі (таблиця 6). Тільки клітини мишей, імунізованих СЕ MPL™ або СЕ MPL™ плюс GM-CSF, або СЕ MPL™ плюс GM-CSF, продукували рівні гамма-інтерферону, що виявляються, у відповідь на триденну стимуляцію пептидом ВІЛ. По завершенню шестиденної стимуляції культури спостерігалася більш високі концентрації інтерферону гамма у відповідь і на ConA, і на пептид. Важливими були рівні гамма-інтерферону, виміряні в культурі супернатантів клітин селезінки мишей, імунізованих СЕ MPL™ або СЕ MPL™ плюс GM-CSF. Клі-

тини селезінки цих двох груп реципієнтів виділяли помітно більш високі концентрації гамма-інтерферону в культурі супернатантів, ніж клітини селезінки мишей, імунізованих пептидом разом з СЕ MPL™ плюс IL-12 або СЕ.

Результати першого експерименту демонструють, що введення MPL™ в стабільну емульсію «масло у воді» і потім, поєднання емульсії з пептидом ВІЛ TISP10MN(A)(-Cys) і GM-CSF, приводили до індукції нейтралізуючих антитіл. Крім того, співкомпозиція GM-CSF разом з СЕ MPL™ і антигеном вакцини приводили до збільшення рівнів IL-4, IL-5 і гамма-інтерферону, що секретуються в супернатантах культури, і до посилення проліферативної відповіді клітин селезінки, стимульованих в культурі імунізуючим антигеном. Така композиція також індукує самий високі титри IgG, IgG2a, і IgG2b при введенні будь-якої з перелічених вище вакцинних композицій. Тільки групи мишей, імунізовані комбінацією СЕ MPL™ і GM-CSF разом з пептидом, мали титри, що виявляються IgG і IgA в промивних рідинах піхви згідно з числом повторних досліджень. Комбінація СЕ MPL™, IL-12 і пептиду також призводила до збільшення рівнів титрів IgG і IgG2a, збільшенню вірусної нейтралізації, збільшенню проліферації клітин селезінки і секреції IL-4 і гамма інтерферону.

Імунізація мишей будь-яким окремим ад'ювантом, включеним в композицію з пептидом ВІЛ, не давала імунну відповідь з виявленням нейтралізуючих антитіл.

Часто спостерігалось, що імунізація мишей TISP10MN(A)(-Cys), разом з СЕ MPL™ або MPL™ у деякій водній композиції, індукувала високі титри антитіл. Ці композиції, однак, не індукують імунну відповідь з титрами вагінальних антитіл, титрами нейтралізуючих антитіл (або сильні відповіді CTL, описані нижче в експерименті 8). Іноді, MPL™ або СЕ MPL™ в комбінації з пептидом індукували вимірні титри IgA і IgG в промивних рідинах піхви. У деяких дослідженнях, комбінація композиції вакцини MPL™ або з IL-12, або з GM-CSF, приводила до титрів, які були схожі з тими, які продукувалися мишами, імунізованими CFA/IFA, або будь-якими з композицій СЕ MPL™ з або без цитокіну. Це спостереження показує, що форма СЕ MPL™ не обов'язкова для високих титрів антисироватки, специфічної для пептиду ВІЛ. Додавання GM-CSF в СЕ носій приводило до збільшення пептид-специфічних титрів в порівнянні з мишами, імунізованими тільки СЕ або СЕ і IL-12. Звичайно, однак, індукція високих титрів антитіл IgG2a і IgG2b залежала від композиції пептиду з СЕ MPL™ і GM-CSF. Цікаво помітити, що ця композиція індукувала титри IgG, які були схожі з титрами, індукованими шляхом імунізації іншими композиціями, такими як CFA/IFA і пептид. Комбінацію СЕ MPL™ з GM-CSF і пептидом складали тільки для демонстрації індукції як високих титрів антитіл, що нейтралізуються, так і CTL (див. експеримент 8). Включення IL-12 разом з СЕ MPL™ і пептидом, також індукувало сприятливий профіль імунної відповіді. Результати показали, що співкомпозиція СЕ MPL™ і цитокінів GM-CSF або IL-12 давала якісну відмінність в гуморальній відповіді в порівнянні з імунізацією CFA і IFA. Ця відмінність, як вважають,



відноситься до підвищених рівнів IgG2a і IgG2b.

У другому експерименті використали протоколи першого експерименту з Balb/c-пептид ВІЛ, але з невеликими змінами. MPL™ також вводили у водній формі з або без цитокіну.

Імунізація мишей Balb/c пептидом ВІЛ TISP10MN(A)(-Cys) без ад'юванта не індукувала істотних титрів антитіл. Навпаки, склад пептидного антигена з різноманітними композиціями ад'ювант/цитокін приводив до індукції високих титрів антитіл після другої імунізації.

Імунізація пептидом і IL-12, або тільки CE привела до титрів, які були невідмітні від титрів, індукованих композицією без ад'юванта (таблиця 7). Реципієнти пептидної співкомпозиції з GM-CSF мали обмежені збільшення титрів. У порівнянні з реципієнтами, що отримували вакцину, що містить CFA/IFA, мікрозріджена CE MPL™ демонструвала схожі пептид-специфічні титри. У порівнянні з реципієнтами, що отримували вакцину CFA/IFA, CE MPL™ індукувала високі рівні пептид-специфічного IgG2a. Підходи, що використовуються при імунізації можуть впливати на титри антитіл, що спостерігаються. Однак, імунізація мишей MPL™ (водний) включеним в композицію з пептидом, індукувала високі титри пептид-специфічних антитіл. Додавання GM-CSF або IL-12 в цю композицію приводило до збільшення титрів більше ніж 10<sup>6</sup>. Таким чином, комбінація пептиду ВІЛ з MPL™ і цитокінами, IL-12 або GM-CSF, індукувала високі титри антитіл, специфічних для пептиду.

Тільки групи мишей, імунізовані пептидом і або MPL™, або IL-12, або MPL™ і GM-CSF, розвивали відносно високі титри антитіл, що виявляються в рідинах, отриманих з промивної рідини піхви (таблиця 8). Дійсно, тільки та група мишей, яка була імунізована MPL™ і IL-12 з пептидом, продукувала пептид-специфічний IgA.

Проліферативну здатність клітин селезінки в культурі у відповідь на *in vitro* стимуляцію пептидом визначали шляхом введення тимідину. Дані в таблиці 9 представлені таким способом, щоб нормувати проліферацію, стандартизувати по відношенню до максимальної проліферації, отриманої при стимуляції ConA. Клітини селезінки мишей, імунізованих CE MPL™ разом або з GM-CSF, або з IL-12, а також мишей, імунізованих тільки GM-CSF, демонстрували низькі рівні пептид-асоційованої проліферації. Навпаки, клітини селезінки мишей, імунізованих пептидом в комбінації з MPL™ і GM-CSF, демонстрували значну проліферацію.

Також вимірювали продукцію цитокіну культивованими *in vitro* клітинами селезінки. Для IL-4, тільки миші, імунізовані CE MPL™ в комбінації з GM-CSF і TISP10MN(A)(-Cys), секретували високі рівні IL-4 у відповідь на стимуляцію пептидом (таблиця 10). Для гамма-інтерферону, миші, імунізовані CE MPL™ і або GM-CSF, або IL-12, або водним MPL™ з GM-CSF або з IL-12, продукували рівні, що легко виявляються цього цитокіну в супернатанті культури (таблиця 11).

Таким чином, комбінація цитокінів GM-CSF або IL-12 з MPL™ або CE MPL™ індукувала високі титри антитіл, специфічних для пептидного антигена. Титри були подібні тим, які індукувалися при імунізації мишей пептидом і CFA/IFA. Дані показу-

ють, що ці комбінації також індукували самі високі проліферативні відповіді в клітинах селезінки в культурі і стимулювали популяції клітин селезінки, які секретували самі високі рівні гамма-інтерферону у відповідь на стимуляцію пептидом.

Результати цього другого експерименту показують, що співкомпозиції TISP10MN(A)(-Cys) з MPL™ і цитокінами GM-CSF або IL-12 індукують профіль імунної відповіді, подібний викликаному у мишей, імунізованих пептидом і CFA і повторно імунізованих пептидом і IFA або перевершувачий його.

Гістологічна оцінка (не показана) місця введення через два тижня після другої імунізації показала, що миші, імунізовані мікрозрідженим CE MPL™, не розвивали або не підтримували інфільтрацію мононуклеарних клітин в дермі шкіри. Забарвлені гематоксином/еозином тканини були такими ж, як отримані у реципієнтів без ад'юванта. Навпаки, миші Balb/c, імунізовані CFA і IFA як ад'юванти (емульсія «вода в маслі»), мали значне скупчення мононуклеарних клітин в цій області. Реципієнти CE MPL™ з GM-CSF і пептидом показували помітне, але мінімальне збільшення мононуклеарних клітин в порівнянні з реципієнтами CE MPL™ без GM-CSF. Тканини мишей, імунізованих тільки GM-CSF і пептидом, не досліджувалися.

Протоколи другого експерименту використали в третьому експерименті з мишами Swiss-Webster, що використовуються замість мишей Balb/c. Миші Swiss-Webster використовувалися для визначення ефектів ад'ювантов з пептидним антигеном ВІЛ, де МНС-пов'язаний Т-хелперний епітоп не впливав на імунну відповідь. Миші Swiss-Webster являють собою аутбридінговий штам мишей; і, отже, ніяких клітинних досліджень не проводили. У цьому експерименті вимірювали тільки реципрокні кінцеві точки титрування антитіл IgG проти пептиду ВІЛ і кінцеві точки титрування антитіл IgG і IgA з промивної рідини піхви. Як видно з таблиці 12 і 13, профіль відповіді був таким, що його можна зіставити з виміряним в першому і другому експерименті у мишей Balb/c.

У четвертому експерименті використовувалися протоколи другого експерименту з невеликими змінами і використовувалися миші Balb/c. Як показано в таблиці 14, ад'ювантні композиції MPL™ разом з або GM-CSF, або IL-12, викликали значно більш високі відповіді IgG GMT, чим один MPL™. Як показано в таблиці 15, ад'ювантна композиція CE MPL™ разом з GM-CSF, викликала істотну відповідь підкласу IgG2b. Ад'ювантні композиції MPL™ разом або з GM-CSF, або з IL-12, викликали помітно більш високі відповіді підкласу IgG2a, ніж один MPL™, в той час як композиції CE MPL™ разом або з GM-CSF, або з IL-12, викликали більш високі відповіді підкласу IgG2a, ніж один MPL™. Як показано в таблиці 16, ад'ювантні композиції MPL™ разом або з GM-CSF, або з IL-12, викликали помітно більш високі титри IgG у вагінальній промивній рідині, ніж один MPL™. Нарешті, як показано на Фіг.4, ад'ювантні композиції MPL™ разом або з GM-CSF, або з IL-12, також як і композиції CE MPL™ разом або з GM-CSF, або з IL-12, демонстрували більш активну проліферацію клітин селезінки, чим один MPL™ або одним CE MPL™,

відповідно.

У п'ятому експерименті використовувалися протоколи другого експерименту з невеликими змінами і використовувалися миші Balb/c; IL-12 не входив в композиції ад'юванта. Як показано в таблиці 17, композиції ад'юванта, що містять як MPL™, так і GM-CSF, викликали помітно більш високі відповіді IgG2a і IgG2b, чим один MPL™. Крім того, композиції ад'юванта, що містять як MPL™, так і GM-CSF, викликали помітно більш високі відповіді для всіх підкласів IgG, чим один MPL™.

У шостому експерименті використовувалися протоколи другого експерименту з невеликими змінами і використовувалися миші Balb/c; IL-12 не входив в композиції ад'юванта. Пептид ВІЛ являв собою 40 амінокислот через присутність цистеїну в позиції 17 амінокислоти. Як показано в таблиці 18, ад'ювантні композиції, що містять як CE MPL™, так і GM-CSF, викликали значно більш високі відповіді всіх підкласів IgG, чим один MPL™, і помітно більш високі відповіді всіх підкласів, чим один CE MPL™.

У сьомому експерименті використовувалися протоколи шостого експерименту з невеликими змінами і використовувалися миші Balb/c; IL-12 не входив в композиції ад'юванта. Як показано в таблиці 19, ад'ювантні композиції, що містять як CE MPL™, так і GM-CSF, викликали помітно більш високі відповіді для всіх підкласів IgG, чим один CE MPL™, і композиції ад'юванта, що містять як MPL™, так і GM-CSF, викликали помітно більш високі відповіді для всіх підкласів IgG, чим один MPL™.

У восьмому експерименті для вимірювання імунітету, опосередкованого функціональними клітинами, оцінювали здатність клітин селезінки мишей, імунізованих CE MPL™ або CE MPL™ плюс GM-CSF, включеним в композицію з мультіепітопним пептидом TISP10MN(A)(+Cys), генерувати відповіді HIV<sub>MN</sub>-специфічних CTL.

Як показано на малюнку 5, клітини селезінки мишей, імунізованих CE MPL™ або CE MPL™ плюс GM-CSF, демонстрували низьку активність відносно клітин-мішеней, які були або немічені, або імпульсно-мічені, з епітопом ІІВ CTL. Клітини селезінки мишей, імунізованих TISP10MN(A)(+Cys), включеним в композицію CE MPL™ і з GM-CSF, разом індукували високу активність HIV<sub>MN</sub>-специфічних CTL після одиної імунізації. HIV<sub>MN</sub>-специфічний CTL-опосередкований лізис клітин-мішеней був помітно збільшений при вимірюванні через сім днів після повторної імунізації (на Фіг.5). В окремих експериментах, миші, імунізовані без ад'юванта, не стимулювали відповіді CTL. Миші, імунізовані водним MPL™ і пептидом, генерували низькі (<30%) відповіді пептид-специфічних CTL.

Єдиною трудностю в оцінці потенційної ефективності імуногенних композицій проти ВІЛ, було те, що примати (не люди), інфіковані ВІЛ, не розвивали СНІД-подібні симптоми. Таким чином, можлива модель тварини не відтворює симптоматику людини, викликану ВІЛ. На щастя, примати (не люди), інфіковані вірусом імунодефіциту мавпи (BIM), близько родинним ВІЛ, дійсно можуть роз-

вивати СНІД-подібні симптоми.

Це дозволяє антигенам BIM бути оціненим у приматів (не людей). Антиген BIM може бути білком, поліпептидом, пептидом або фрагментом, отриманим з вказаного білка. Білок може бути глікопротеїном, таким як gp41, gp120 або gp160. Альтернативно, білок може бути білком, що кодується такими генами, як gag, pol, vif, rev, vpr, tat, nef або env. Пептиди, отримані з таких білків, містять, принаймні, одну антигенну детермінанту (епітоп) довжиною, принаймні, шість амінокислот.

Аналогічно з ВІЛ, у приматів (не людей) використовується мультіепітопні пептиди BIM. Вивчення проводилося для оцінки можливості викликати відповідь CTL різними пептидами в поєднанні з CE MPL™ і GM-CSF. Резус макаки були підшкірно імунізовані на 0, 4, 8 і 18 тижні CE MPL™ і GM-CSF, разом з будь-яким з наступних трьох пептидів (див. таблицю 20):

(1) Кожний пептид містив наступний епітоп CTL в контексті Manu A\*01:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (SEQ ID NO:3) (gag) (38,39)

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (SEQ ID NO:4) (pol) (40)

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (SEQ ID NO:5) (env) (40)

(2) Альтернативно, кожний з цих трьох пептидів був пов'язаний зі змішаним епітопом Т-хелпера, що має наступну послідовність:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala (SEQ ID NO:6) (приспосований з 41).

Таким чином, ці три пептиди мали наступні послідовності:

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 (SEQ ID NO: 7)

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 (SEQ ID NO: 8)

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 (SEQ ID NO:9)

Гепаринізовану кров збирали кожні два тижні, і мононуклеарні клітини периферичної крові аналізували на CTL за допомогою тесту з вивільненням <sup>51</sup>Cr, тетрамерного фарбування свіжих мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC) і тетрамерного фарбування культивованих PBMC. Тетрамерне фарбування свіжого PBMC і цитолітичний лізис, визначений вивільненням <sup>51</sup>Cr, не виявляли ніякої активності. Однак, імунізація резус макаки в контексті Manu A\*01 TH/CTL пептидними коктейлями включеними в композицію з CE MPL™ і GM-CSF, приводила до виявлення тетрамер-позитивних CD8+ Т-клітин. Результати, представлені в таблицях 21-24, показують, що процент позитивних, тетрамер-позитивних CD8+ (таблиці 21-23) або CD4+ (таблиця 24) Т-клітин виявляється у PBMC, культивованих з відповідним пептидом протягом 11 днів.

Загалом, всі чотири Manu A\* 01 позитивних тварин, імунізованих або епітопами CTL (Rh 55, Rh 142), або без епітопів Th (Rh 13, Rh 80), демонстрували CD8+ тетрамер-позитивні клітини, специфічні для або gag, pol, або env. Як очікувалося, ніяких тетрамер-позитивних CD8 клітин не було виявлено у Manu A\*01 негативних тварин (Rh 41, Rh47). Імунні відповіді, специфічні gag і env BIM, спостерігали після праймування, в той час як pol

специфічну тетрамер-позитивність спостерігали після повторної імунізації. Оскільки заключна повторно імунізуюча доза, що вводиться на 18 тижні, не давала подальшого підвищення відповіді, дані в таблицях 21-24 після 14 тижня не представлені.

У результаті, імунізація резус макак в контексті Маму А\*01 пептидними коктейлями, що містять Th/BIM gag, pol і env CTL-епітопи, включеними в композицію з CE MPL™ і людським GM-CSF, викликала клітинні відповіді, як було показано за допомогою чутливого і тетрамерним аналізом.

Білок порин B *Neisseria gonorrhoeae*, також відомий як РІВ білок, був рекомбінантно експресований (42, приведений тут як посилання) і є кандидатом на роль антигена для профілактики або лікування інфекцій, викликаних *Neisseria gonorrhoeae*.

Проводили ряд досліджень для порівняння MPL™ (або з, або без CE) плюс GM-CSF або IL-12, з одиночним MPL™ (або з, або без CE), разом з модифікованою формою білка порина B *Neisseria gonorrhoeae*, в якому 16 амінокислот на N-кінці є фаговими, а потім зрілою формою білка порина B. Короткий виклад результатів представлений далі.

У першому експерименті мишей Swiss-Webster підшкірно імунізували в сідничну область рекомбінантним білком порином B, що генерує титри антиген-специфічних антитіл, демонструючи, що білок порин B є життєздатним кандидатом на роль антигена. Додавання GM-CSF в MPL™ і білка порина B приводило до підвищення сироваткових титрів антитіл IgG і IgG2, в порівнянні з реципієнтами MPL™ і білка порина B (див. Таблиці 25 і 26).

У другому експерименті мишей Swiss-Webster підшкірно імунізували в сідничну область білком порином B плюс IL-12 і MPL™ або CE MPL™, що викликало більш високі титри антиген-специфічних антитіл (особливо IgG) в порівнянні з реципієнтами білка порина B плюс MPL™ або CE MPL™. Більш високі титри спостерігали після обох, як первинної, так і повторної імунізації. Введення в композицію IL-12 приводило до приблизно десятиразового збільшення титрів IgG, виміряних у вагінальній промивній рідині (див. таблиця 27).

Очищений нативний білок злиття (F) людського респіраторного синцитіального вірусу (RSV) в нативній димерній формі є кандидатом на роль антигена для профілактики інфекцій, викликаних RSV (43, включений сюди як посилання).

Проводили ряд досліджень для порівняння MPL™ (або з, або без CE) плюс GM-CSF або IL-12, з кожним з MPL™ (або з або без CE), фосфатом алюмінію або Stimulon™ QS-21 по окремоті, разом з очищеним нативним F-білком RSV. Короткий опис результатів представлений далі.

У першому експерименті миші Balb/c, внутрішньом'язово імунізовані нативним RSV F-білком, генерували титри антиген-специфічних антитіл, демонструючи, що F-білок є життєздатним кандидатом на роль антигена. Додавання GM-CSF в MPL™ індукувало підвищення кінцевих точок титрування, в порівнянні з відповіддю на F-білок одного MPL™, після як первинної, так і повторної імунізації (див. таблицю 28), а також спричинило посилення клітинної відповіді на *in vitro* стимуляцію клітин селезінки в порівнянні з одним MPL™

(див. таблицю 29). Додавання GM-CSF в CE MPL™ приводило до посилення первинної IgG відповіді на F-білок, в порівнянні з одним CE MPL™ (див. таблицю 28).

У другому експерименті використали протокол першого експерименту. Додавання GM-CSF в MPL™ індукувало більш високі кінцеві точки титрування, чим у випадку єдиного MPL™, у відповідь на F-білок після як первинної, так і повторної імунізації (див. таблицю 30). Додавання GM-CSF до CE MPL™ також спричинило збільшення кінцевих точок титрування, в порівнянні з одним CE MPL™, у відповідь на F-білок після первинної імунізації (див. Таблицю 30). Додавання GM-CSF в композиції F-білка плюс MPL™ або CE MPL™, викликало більш високий процент RSV-специфічної CTL активності селезінки, чим викликане композиціями у відсутності GM-CSF, як показано на клітинних селезінках імунізованих мишей (див. таблицю 31).

У третьому експерименті GM-CSF замінювали на IL-12. Співкомпозиція IL-12 з MPL™ викликала більш високі титри IgG після первинної імунізації, в порівнянні з введенням F-білка тільки з MPL™ (див. таблицю 32). Однак додавання IL-12 до MPL™ або CE MPL™ не мало ніякого ефекту на RSV-специфічну активність CTL, виміряну після *in vitro* стимуляції ефекторних клітин (див. таблицю 33).

Одне з досліджень проводилося для порівняння MPL™ (або з, або без CE) плюс GM-CSF і окремого MPL™ (або з, або без CE), разом з білком NP (нуклеокапсидний білок) вірусу грипу. Були недостатні кількості NP для проведення експерименту по вимірюванню титрів антитіл. Мишей, імунізованих NP пептидом разом або без ад'ювантів, аналізували на відповіді клітин селезінки при стимуляції антигеном на 14 день після остаточної імунізації. Введення GM-CSF в композиції, що містять MPL™ або CE MPL™ приводило до помітного скорочення CTL активності (дані не показані).

Незрозуміло, чому був отриманий цей аномальний результат. Можливо, були технічні проблеми при проведенні аналізу.

Антигенні композиції по даному винаходу модулюють імунну відповідь, поліпшуючи гуморальну відповідь і клітинний імунітет хребетного господаря після введення антигенної композиції, що включає вибраний антиген патогенного вірусу, гриба, бактерії або паразита, і ефективну кількість ад'юванта MPL™ (у водній або в формі стабільної емульсії), комбінована з цитокином або лімфокіном, зокрема, GM-CSF або IL-12. Інші цитокини або лімфокіни, як було показано, мають імуномодулюючу активність, включаючи, але ними не обмежуючись, інтерлейкіни 1-альфа, 1-бета, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 і 18, інтерферони альфа, бета і гамма, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор і фактор некрозу пухлини альфа і бета.

Агоністи або антагоністи вказаних цитокінів або лімфокінів також знаходяться в межах даного винаходу. Як використовується тут, "агоніст" означає молекулу, яка посилює активність або функціонує таким же чином, як вказані цитокини або лімфокіни. Прикладом такого агоніста є міметик вказаних цитокінів або лімфокінів. Як використову-

ється тут, термін "антагоніст" означає молекулу, яка інгібує або перешкоджає активності вказаних цитокінів або лімфокинів. Прикладами таких антагоністів є розчинний рецептор IL-4 і розчинний рецептор TNF.

Як використовується тут, термін "ефективна кількість ад'юванта" означає дозу комбінації ад'ювантів, описаних тут, які є відповідними для збільшення імунної відповіді у хребетних тварин. Індивідуальна доза залежить зокрема, від віку, маси і медичного стану господаря а також способу введення і антигена. У переважному втіленні, ад'ювантні комбінації MPL™ використовуються в області від 1-100мкг/доза. Відповідні дози можуть бути легко визначені фахівцями в даній області. Антигенні композиції по даному винаходу можуть також бути змішані з імунологічно прийнятними розріджувачами або носіями звичайними способами для отримання рідкого розчину для введення або суспензій.

Антигенні композиції по даному винаходу вводяться людині або іншому хребетному різними шляхами, що включають, але ними що не обмежуються, інтраназальний, пероральний, вагінальний, ректальний, парентеральний, шкіряний, кризьшкірний [див., наприклад міжнародну публікацію WO 98/20734 (44)], (яка включена тут як посилання), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревний, підшкірний, внутрішньовенний і внутрішньоартеріальний. Кількість антигенного компонента або компонентів антигенної композиції залежить зокрема, від індивідуального антигена, а також від віку, маси і медичного стану господаря, а також від способу введення. І знов, відповідні дози можуть бути легко визначені фахівцями в даній області. Переважно, хоч не обов'язково, антиген і комбінацію ад'ювантів вводять в один і той самий час. Число доз і режим дозування антигенної композиції також може бути легко визначені фахівцями в даній області. У деяких випадках, властивості ад'юванта в ад'ювантній комбінації можуть зменшувати число необхідних доз або час курсу режиму дозування.

Комбінації ад'ювантів по даному винаходу є відповідними для використання антигенних композицій, що містять широку різноманітність антигенів з широкого кола патогенних мікроорганізмів, включаючи, але ними не обмежуючись, віруси, бактерії, гриби або паразитні мікроорганізми, які інфікують людей і інших хребетних, або антигени ракових клітин або пухлинних клітин. Антигени можуть включати пептиди або поліпептиди, отримані з білків, а також фрагментів, будь-чого з перерахованих: сахариди, білки, полі- або олігонуклеотиди, ракові клітини або пухлинні клітини, алергени, ампліодний пептидний білок або інші макромолекулярні компоненти. У деяких випадках, в антигенну композицію може бути включено більше ніж один антиген.

Бажані вірусні вакцини, що містять композиції ад'юванта по даному винаходу, являють собою такі вакцини, які спрямовані на запобігання або/лікування захворювання, викликаного, але ними не обмежуючись, вірусом імунодефіциту людини, вірусом імунодефіциту мавп, респіраторним синцитіальним вірусом, вірусом парагрипу типів 1-3,

вірусом грипу, вірусом простого герпеса, людським цитомегаловірусом, вірусом гепатиту А, вірусом гепатиту В, вірусом гепатиту С, вірусом людської папіломи, поліовірусом, ротавірусом, каліковірусом, вірусом кору, вірусом свинки, вірусом краснухи, аденовірусом, вірусом сказу, вірусом собачої чуми, вірусом чуми рогаатої худоби, коронавірусом, парвовірусом, інфекційним ринотрахеальним вірусом, вірусом лейкемії кішок, вірусом інфекційного перитоніту кішок, вірусом інфекційного бурситу у птахів, вірусом хвороби Ньюкасла, вірусом хвороби Марека, вірусом респіраторного і репродуктивного синдрому у свиней, вірусом кінського артериту і різними енцефалопатичними вірусами.

Бажані бактерійні вакцини, що містять ад'ювантну композицію по даному винаходу, являють собою також вакцини, які спрямовані на запобігання і/або лікування захворювань, викликаних, але ними не обмежуючись, *Haemophilus Influenzae* (як типовий, так і нетиповий), *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 complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* і *Mycoplasma gallisepticum*.

Бажані вакцини проти грибкових патогенів, що містять ад'ювантну композицію по даному винаходу, являють собою такі вакцини, які спрямовані на запобігання і/або лікування захворювань, викликаних, але ними не обмежуючись, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* і *Histoplasma*.

Бажані вакцини проти паразитів, утримуючі ад'ювантну композицію по даному винаходу, являють собою такі вакцини, які спрямовані на запобігання і/або лікування захворювань, викликаних, але ними не обмежуючись, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* і *Pneumocystis carinii*.

Бажані вакцини, що викликають терапевтичну або профілактичну протиракову активність у хребетного господаря, які містять комбінації ад'юванта по даному винаходу, включають використання таких ракових антигенів або пухлинно-асоційованих антигенів, які включають, але ними не обмежуються, специфічний антиген простати, карцино-ембріональний антиген, MUC-1, Her2, CA-125 і MAGE-3.

Бажані вакцини для зменшення відповідей на алергени у хребетного господаря, які містять комбінації ад'юванта по даному винаходу, включають ці алергени або їх фрагмент. Приклади таких алергенів [описані в патенті США №5830877 (45) і

опублікований міжнародній патентній заявці WO 99/51259 (46)], які включені тут як посилання, і включають пилок, отрути комах, тваринну лупу, спори грибів і ліків (такі як, пеніцилін). Вакцини перешкоджають виробництву антитіл IgE, які, як відомо, викликають алергічні реакції.

Бажані вакцини для запобігання або лікування хвороби, що характеризується відкладенням амилоїда у хребетного господаря, які містять комбінації ад'юванта по винаходу, включають композиції, що містять дози цього амилоїдного пептидного білка (APP). Дана хвороба згадується під різними назвами наприклад, хвороба Альцгеймера, амилоїдоз або амилоїдна хвороба.  $\beta$ -Амилоїдний пептид (також відомий як пептид А $\beta$ ) являє собою 42 амінокислотних фрагмента APP, які утворюються при процесингу APP  $\beta$  і у секреторних ферментів, і має наступну послідовність:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gin Lys Leu Val Phe  
Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile He Gly Leu Met Val Gly Gly  
Val Val Ile Ala (SEQ ID NO:10).

У деяких пацієнтів відкладення амилоїда приймає форму агрегованого пептида А $\beta$ . Несподівано, в цей час виявлено, що введення виділеного пептида А $\beta$  стимулює імунну відповідь проти пептидного компонента А $\beta$  відкладення амилоїда хребетного господаря [47]. Таким чином, вакцини по даному винаходу включають комбінації ад'юванта по даному винаходу разом з пептидом А $\beta$ , а також фрагменти пептида А $\beta$  і антитіла до пептиду А $\beta$  або його фрагментам. Один такий фрагмент пептида А $\beta$  являє собою 28-амінокислотний пептид, що має наступну послідовність [48]:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gin Lys Leu Val Phe  
Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys (SEQ ID NO:11).

У випадку ВІЛ і ВІМ антигенні композиції включають, щонайменше, один білок, поліпептид, пептид або фрагмент, отриманий з вказаного білка. У деяких випадках, різноманітних ВІЛ або ВІМ білки, поліпептиди, пептиди і/або фрагменти включені в антигенну композицію.

Комбінації ад'ювантних композицій по даному винаходу також є відповідними для введення як ад'ювант в поліонуклеотидні вакцини (також відомі як ДНК-вакцини). Такі вакцини можуть, крім того, включати полегшуючі засоби, такі як бупивикаїн [див. патент США №5593972 (49)], який включений сюди як посилання).

Для того щоб краще зрозуміти даний винахід, пропонуються наступні приклади. Приклади приведені тільки з метою ілюстрації і не повинні розглядатися як обмеження можливостей винаходу.

#### Приклади

##### Експеримент 1

Імунізація мишей Balb/c пептидом ВІЛ і різними ад'ювантами

##### Приклад 1

##### Матеріали і Методи

##### Тварини

Самиці мишей Balb/c, у віці 7-9 тижнів, були куплені у Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY). Всі миші були взяті при схваленні American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Миші поступово акліматизувалися на новому місці протягом одного тижня до початку досліджень.

##### Пептиди

Послідовність пептиду TISP10MN(A)(-Cys) з мультіепітопом HIV-1<sub>MN</sub> являє собою:

Lys Gin Ile Ile Asn Met Trp Gin 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 (SEQ ID NO: 2).

Цей пептид був заздалегідь описаний (28,29) і містить послідовності ВІЛ-1 gp120<sub>MN</sub>, які викликають відповіді CD4<sup>+</sup>Th клітин, як у людей, так і у мишей, головний нейтралізуючий детермінант і сайт впізнання CD8<sup>+</sup> CTL у мишей Balb/c. Пептид був наданий Dr. R. Searce (Duke University, Durham, NC). Для аналізу CTL, пептиди, відповідні епітопу

CTL в V3 петлі HIV-1<sub>MN</sub> (Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile (SEQ ID NO: 12), H-2D<sup>d</sup> рестрикція) або HIV-1<sub>MN</sub> (Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr (SEQ ID NO:13), H-2D<sup>d</sup> рестрикція), були куплені у Genosys Biotechnologies Inc. (The Woodlands, TX). Перед використанням пептиди були солюбілізовані в стерилізованій воді і розбавлені у відповідних буферах або поживному середовищі для клітин.

##### Ад'юванти

Всі препарати, що містять ад'ювант MPL<sup>TM</sup>, були отримані від Ribi ImmunoChem Research, Inc. (Hamilton, MT). MPL<sup>TM</sup> готували у вигляді водної композиції з використанням триетаноламіну (Sigma, St. Louis, MO). Після солюбілізації, MPL<sup>TM</sup> руйнували ультразвуком згідно з інструкціями виробника з отриманням опалесцюючого/прозорого розчину, який стерильно відфільтровували. CE MPL<sup>TM</sup> являв собою заздалегідь приготовану на основі сквалену емульсію «масло у воді» (масло 1-2%), що мала концентрацію MPL<sup>TM</sup> в межах від 0-2500мкг/мл. Фосфат алюмінію отримували на місці. Повний ад'ювант Фройнда (CFA) і неповний ад'ювант (IFA) були куплені у Difco Laboratories, Detroit, MI. Пептиди TISP10MN(A) і ад'юванти Фройнда емульгували у відношенні 1:1, використовуючи два пов'язаних шприци. Експресований рекомбінантний мишачий IL-12 був наданий Genetics Institute (Cambridge, MA). Рекомбінантний мишачий GM-CSF був отриманий від Immunex (Seattle, WA), наданий R&D Systems (Minneapolis, MN) або був куплений у Biosource International (Camarillo, CA) у вигляді ліофілізованого порошку без носія.

##### Імунізація

Мишей підшкірно імунізували в сідничну область в повному об'ємі 0,2мл, еквівалентно розділеним на кожну сторону відносно хвоста. Імунізації проводили з різними часовими інтервалами, як визначено нижче. Антигени і цитокіни розбавляли фосфатним сольовим буфером до відповідних концентрацій і змішували з ад'ювантами менше ніж за 16 годин до імунізації, в стерильних умовах. Вакцини змішували при слабкому перемішуванні і зберігали при 4°C. Композиції змішувалися на вортексі безпосередньо перед імунізацією.

##### Отримання зразків

У тварин забирали кров до початку імунізації і вказаних часових точках. Сироватку від окремої миші аналізували і об'єднували у мишей в межах груп. Для оцінки рівнів антитіл виконували вагінальну промивну рідину на мертвих мишах. Він виконувався шляхом вливання 75:1 RPMI-10 в звід піхви самиць мишей, використовуючи 200:1 піпет-

ку. Звід промивали повторним вливанням і видавленням рідини, яку потім додавали в 10:1 FBS. Аналізували об'єднану вагінальну промивну рідину.

#### Препарати клітин

Для аналізу проліферації і аналізу цитокінів *in vitro* отримували клітини селезінки мишей в певні часові точки. При об'єднанні 3-5 мишей отримували одиничну клітинну суспензію, вказану в результатах. Для аналізу проліферації і цитокінів, клітини суспендували в круглодонних 96 лункових плашках, заздалегідь покритих протягом ночі антигенами пептиду ВІЛ, контрольними білками або тільки RPMI-10. Клітини селезінки додавали в  $5 \times 10^5$  клітин/лунка, використовуючи культуральне середовище з 2-ма добавками. Супернатанти клітинної культури збирали з трьох лунок для аналізу цитокінів через три або шість днів після введення культури.

Негайно після отримання супернатанту, культури імпульсно мітили  $^3\text{H}$ -тимідином протягом 18-24 годин і збирали для визначення кількості клітинної проліферації.

#### Ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA)

Для аналізу пептидспецифічного ВІЛ антитіла і розподілу підкласу, пептид суспендували або в карбонатному буфері (15mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH9,6) або в PBS в концентрації 1мкг/мл і вміщували на 96 лункові плашки мікропіпеткою (Nunc) в об'ємі 100:1. Після інкубації протягом ночі при 37°C, чашки промивали і блокували (0,1% желатин/PBS) при кімнатній температурі протягом 2-4 годин. Перед додаванням послідовно розведеної сироватки (PBS, желатин 0,1%, 0,05% Tween<sup>TM</sup>20, 0,02% азиду натрію) чашки для аналізу ELISA промивали буфером (PBS, 0,1% Tween<sup>TM</sup>20). Після інкубації протягом чотирьох годин, лунки промивали і додавали відповідні розведені біотинільовані антиізотипи/підкласи антитіл для інкубації при 4°C протягом ночі. Лунки промивали і культивували із стрепавідин пов'язаною пероксидазою хрому. Після інкубації, лунки промивали і виявляли ABTS. Лунки аналізували при 405nm. Титри стандартизували з використанням контрольної сироватки.

Для аналізу цитокіну, супернатант клітинної культури додавали в лунки, покриті BVD6-11B11 (у випадку анти-IL4) або R4-6A2 (у випадку гамма інтерферону). Після інкубації і промивки, лунки досліджували за допомогою біотин-міченого BVD6-24G2 (для IL4) або XMG 1,2 (для гамма інтерферону). Концентрацію цитокінів визначали, використовуючи калібрувальну криву, отриману з рекомбінантного мишачого гамма інтерферону або інтерлейкіну-4. Всі цитокінові реагенти були отримані від Pharmingen (San Diego, CA).

#### Аналізи нейтралізації HIV-1<sub>MN</sub>

Аналізи нейтралізації проводилися в лабораторії Dr. Thomas Matthews в університеті Duke. Коротко, кодова сироватка забезпечувала нейтралізацію лабораторного ізолюваного вірусу HIV-1<sub>MN</sub> (NIH). Аналіз проводили по суті так само, як описано раніше [25]. Стисло, розбавлені сироватки, що тестуються були розділені на 96-лункових тит-

раційних мікроплашках (25:1/лунка). Еквівалентний об'єм послідовно розведеного вірусного матеріалу додавали в кожну лунку. Після інкубації суміш вірус/антитіло додавали до AA5 мічених клітин. Клітини культивували в 96-лункових титраційних мікроплашках, додаючи через день свіже середовище. Через сім днів після зараження супернатант оцінювали на присутність вірусної зворотної транскриптази для вимірювання вірусної реплікації і успішного зараження або його інгібування.

#### Приклад 2

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A) IgG

Реципрокні кінцеві точки титрування антипептид ВІЛ-специфічного IgG вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c) в певні часові точки після початкової імунізації. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область 25мкг TISP10MN(A)(-Cys), якщо не визначено інакше, на 0 день і 27 день. У випадку реципієнтів ад'ювантів Фройнда, мишей праймували пептидом, емульгованим в CFA, і повторно імунізували IF A. CE MPL<sup>TM</sup> являє собою емульсію, що містить в дозі 2% масло сквалена і 50мкг MPL<sup>TM</sup>. CE являє собою транспортну емульсію «масло в воді», що містить сквален, гліцерин і емульгуючий агент. Рекомбінантний мишачий IL-12 вводився в дозі 50нг/миша. Рекомбінантний мишачий GM-CSF вводили в дозі 10мкг/миша. Результати приводяться в таблиці 1.

Таблиця 1

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG

Ад'ювант	мкг ВІЛ пептиду	Прикордонні титри		
		4 тиждень	6 тиждень	8 тиждень
без ад'юванта	25	<100	<100	<100
CFA/IFA	25	23998	137683	313200
rIL-12	25	<100	<100	<100
GM-CSF	25	<100	17579	12537
CE	25	<100	171923	76479
MPL <sup>TM</sup> CE	25	<100	104331	79021
MPL <sup>TM</sup> CE+rIL-12	25	<100	131330	631688
MPL <sup>TM</sup> CE + GM-CSF	25	14,824	>10000000	3752870

#### Приклад 3

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласів TISP10MN(A)(-Cys) IgG вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c) через шість тижнів після початкової імунізації, через два тижні після повторної імунізації. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область 25мкг пептидом, якщо не визначено інакше. У випадку реципієнтів ад'ювантів Фройнда, мишей праймували пептидом, емульгованим в повному ад'юванті Фройнда і повторно імунізували неповним ад'ювантом Фройнда на четвертий і шостий тижні. CE MPL<sup>TM</sup> являє собою емульсію, що містить в дозі 2% масло сквалена і 50мкг MPL<sup>TM</sup>. CE являє собою транспортну емульсію «масло у воді», що містить сквален, гліцерин і емульгуючий агент. Рекомбінантний мишачий IL-12 вводився в дозі 50нг/миша. Рекомбінантний мишачий GM-CSF вводили в дозі 10мкг/миша. Результати приводяться в таблиці 2.

Таблиця 2

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG

Прикордонні титри				
Ад'ювант	мкг ВІЛ пептиду	IgG1	IgG2a	IgG2b
без ад'юванту	25	<100	<100	<100
CFA/IFA	25	29907	143	798
rIL-12 (0,05)	25	<100	<100	<100
GM-CSF(10)	25	1783	<100	<100
CE (2%)	25	74293	<100	3331
MPL™ (50) CE (2%)	25	11441	10176	5280
MPL™ (50) CE + rIL-12 (2%)	25	169278	27161	2303
MPL™ + GM-CSF(2%)	25	3494862	954707	245828

## Приклад 4

Титри антитіл TISP10MN(A)(-Cys) IgG і IgA промивної рідини піхви

Титри анти-пептидних антитіл IgG і IgA вимірювали у вагінальній промивній рідині, отриманій через 2 тижні після заключної імунізації. Групу з 5 самиць мишей Balb/c імунізували 25мкг TISP10MN(A)(-Cys) і позначеними композиціями ад'юванта на 0, 28, і 42 дні. Титри антитіл визначали в об'єднаній вагінальній промивній рідині. Результати приводяться в таблиці 3.

Таблиця 3

Титри антитіл анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG і IgA промивної рідини піхви

Ад'ювант	IgG	IgA
Немає ад'юванта	<20	<20
CFA/IFA	20	<20
rIL-12 (0,05)	<20	<20
GM-CSF(10)	<20	<20
MPL™ (50) CE (2%)	<20	<20
MPL™ (50) CE + rIL-12 (2%) + rIL-12 (0,05)	24	<20
MPL™ CE + GM-CSF (2%) + GM-CSF (10)	1125	113
CE (2%)	<20	<20

## Приклад 5

## Проліферація клітин селезінки

Вимірювали проліферацію клітин селезінки мишей, імунізованих TISP10MN(A)(-Cys) і різними композиціями ад'юванта. Групи з п'яти самиць мишей Balb/c імунізували 25мкг TISP10MN(A) (-Cys) і позначеними ад'ювантами на 0 і 28 дні. Клітини селезінки вносили в культуру на 56 день і збирали для вимірювання введенного <sup>3</sup>H-тимідану через 96 годин після цього. Мишей імунізували 50нг IL-12, 10мкг GM-CSF, 50мкг MPL™ у вигляді водної суміші або у вигляді стабільної емульсії з 2% CE. Дані являють собою дельта срт значення відносно проліферуючих значень, виміряних у зростаючих клітин в культурі без стимуляції. Фоно-ві сумарні значення стимуляції були <800срт. Результати приведені в таблиці 4.

Таблиця 4 Проліферація клітин селезінки

Ад'ювант	ВІЛ пептид 10 мкг/мл	ВІЛ пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ пептид 1,1 мкг/мл	Con A 1 мкг/мл	Лізоцим 30 мкг/мл	Середовище 0 мкг/мл
Немає ад'юванта	2065	2373	801	50019	628	-
CFA/IFA	1236	878	641	53781	-	-
IL-12	809	692	308	42612	-	-
GM-CSF	25821	19784	14249	55578	-	-
MPL™CE	46275	41675	40998	45443	413	-
MPL™CE + IL-12	26560	19907	9600	38989	934	-
MPL™ CE + GM-CSF	74909	66257	62798	37775	366	-
CE	31327	23396	20480	66949	-	-

## Приклад 6

## Секреція IL-4 клітинами селезінки

Вимірювали інтерлейкін-4, секретований в культурі клітин селезінки, стимульованих 25мкг TISP10MN(A)(-Cys). Клітини селезінки збирали з п'яти самиць мишей Balb/c і культивували з позначеними антигенними стимулами (50нг IL-12, 10мкг GM-CSF, 50мкг MPL™, як визначено) протягом або трьох, або шести днів. Рівні інтерлейкіну-4 визначали за допомогою ELISA і порівнювали зі стандартом, що має відому концентрацію. Пусті осередки показували, що аналіз не виявив інтерлейкін-4 при цих умовах культивування. Нижня межа чутливості, що визначається була 22 одиниці/мл. Результати приведені в таблиці 5.

Таблиця 5 Секреція IL-4 клітинами селезінки

Триденні культури:

Ад'ювант	ВІЛ пептид 10 мкг/мл	ВІЛ пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ пептид 1,1 мкг/мл	Con A 1 мкг/мл	Лізоцим 30 мкг/мл	Середовище 0 мкг/мл
Немає ад'юванта				149		
CFA/IFA				156		
IL-12				156		
GM-CSF				159		
MPL™ CE	297	79	90	134		
MPL™ CE + IL-12				77		
MPL™ CE + GM-CSF	142	151	102	149		
CE				197		

Шестиденні культури.

Ад'ювант	ВІЛ пептид 10 мкг/мл	ВІЛ пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ пептид 1,1 мкг/мл	Con A 1 мкг/мл	Лізоцим 30 мкг/мл	Середовище 0 мкг/мл
Немає ад'юванта				124		
CFA/IFA				204		
IL-12				146		
GM-CSF				143		
MPL™ CE	163	96	57	63		
MPL™ CE + IL-12	55			76		
MPL™ CE + GM-CSF	511	457	204	76		
CE	41		36	88		

## Приклад 7

Секреція гамма-інтерферону клітинами селезінки.

Вимірювали гамма інтерферон, секретований в культурі клітин селезінки, стимульованих 25мкг TISP10MN(A)(-Cys). Клітини селезінки збирали з п'яти самиць мишей Balb/c і культивували з позначеними антигенними стимулами (такі ж, як прикладі 6) протягом або трьох, або шести днів. Рівні гамма-інтерферону визначали за допомогою ELISA і порівнювали зі стандартом, що має відому концентрацію. Пусті лунки показували, що аналіз не виявив гамма інтерферон при цих умовах культивування. Нижня межа чутливості, що визначається була 4 пікограм/мл. Результати приведені в таблиці 6.

Таблиця 6 Секреція гамма-інтерферону клітинами селезінки

Триденні культури:

Ад'ювант	Антиген					Середовище
	ВІЛ пептид 10 мкг/мл	ВІЛ пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ пептид 1,1 мкг/мл	Соп А 1 мкг/мл	Лізоцим 30 мкг/мл	
Немає ад'юванта				23,0		
CFA/IFA				5,0		
IL-12				5,9		
GM-CSF				17,6		
MPL™ CE	6,6	4,2	4,3	18,2		
MPL™ CE + IL-12				9,2		
MPL™ CE + GM-CSF	11,5	5,1	5,3	14,6		
CE				8		

Шестиденні культури:

Ад'ювант	Антигенний					Середовище Омкг/мл
	ВІЛ пептид 10 мкг/мл	ВІЛ пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ пептид 1,1 мкг/мл	Соп А 1 мкг/мл	Лізоцим 30 мкг/мл	
Немає ад'юванта				71,8		
CFA/IFA				15,9		
IL-12				8,4		
GM-CSF				7,3		
MPL™ CE	190,1	51,5	319,0	187,3		
MPL™ CE + IL-12	18,0	15,6	42,0	83,4		12,7
MPL™ CE + GM-CSF	62,2	20,2	39,2	134,7		
CE	13,3			54,6		

## Експеримент 2

Імунізація мишей Balb/c пептидом ВІЛ і різними ад'ювантами

## Приклад 8

## Матеріали і методи

## Тварини

Використовувалися самиці мишей Balb/c у віці 7-9 тижнів згідно з прикладом 1 вище.

## Пептиди

Використовували пептид HIV-1-MN TISP10MN(A), описаний в прикладі 1. Пептид регістрували в сольовому розчині з концентрацією 1мг/мл.

## Ад'юванти

Ад'юванти, що використовувалися були такими, як описані в прикладі 1, за винятком того, що в деяких випадках MPL™ використовувався у вигляді водної композиції, замість стабільної емульсійної форми.

## Імунізації

Миші були імунізовані підшкірно в сідничну область, в повному об'ємі 0,2мл, однаково розділеному на кожну сторону відносно хвоста. Імунізації пептидом ВІЛ (25мкг) проводили на 0 і 21 дні разом із означеною кількістю ад'юваната(ів). Миші, що отримували CFA/IFA, отримували CFA на 0 день і IFA на 21 день. Розбавлення і змішування проводили відповідно до описаних в прикладі 1.

## Отримання зразків

Отримання зразків у тварин проводили у відповідності до протоколу прикладу 1 за день до кожної імунізації і через 14 днів після другої імунізації

## Препарати клітин

Отримували препарати клітин проводили і контролювали відповідно до протоколу прикладу 1.

## Ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA)

ELISA проводили відповідно до протоколу прикладу 1.

## Аналіз нейтралізації HIV-1-мн

Аналізи нейтралізації знову проводили в лабораторії Університету Duke відповідно до протоколу прикладу 1.

## Приклад 9

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A)(-Cvs) IqG

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG вимірювали або як середнє геометричне окремих мишей (GMT) або в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c), отриманій через 14 днів після другої імунізації. Граничні титри підкласів IgG1 і IgG2a також вимірювали в об'єднаній сироватці. У випадку реципієнтів ад'ювантів Фройнда, мишей праймували 25мкг пептиду, емульгованого в CFA, і повторно імунізували IFA. CE MPL™ являє собою емульсію, що містить в дозі 1% масло сквалену і 50мкг MPL™. Водний MPL™ вводили в кількості 50мкг в дозі. Реконбінантний мишачий IL-12 вводили в дозі 40нг/миша. Реконбінантний мишачий GM-CSF вводили в дозі 10мкг/миша. Результати приводяться в таблиці 7.

Таблиця 7

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG

Ад'ювант мкг/доза	Граничні титри			
	IgG (загальний)	IgG (GMT)	IgG1 (загальний)	IgG2a (загальний)
без ад'юванта	<1000	720	<1000	<1000
CFA/IFA	72387	135740	126433	9023
MPL™ CE	183802	197808	162480	98342
CE	2426	6029	1859	<1000
MPL™ CE + GM-CSF	148139	133171	103298	50415
MPL™ CE + 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

## Приклад 10

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу анти-TISP10MN(A)(-Cvs) IqG

Реципрокні кінцеві точки титрування ВІЛ-пептид-специфічних IgG і IgA антитіл з промивної рідини піхви вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c) через 15 днів після повторної імунізації. Мишей імунізували так само, як описано в прикладі 9. CE MPL™ являла собою емульсію, що містить в дозі 1% масла сквалену і 50мкг MPL™. Водний MPL™ вводили в кількості 50мкг в дозі. Реконбінантний мишачий IL-12 вводили в концентрації 40нг/миша. Реконбінантний мишачий GM-CSF вводили в концентрації 10мкг/миша. Результати представлені в таблиці 8.



Таблиця 8

Реципрокні кінцеві точки титрування  
анти-TISP10MN(A)(-Cys) IgG і IgA

	Граничні титри	
	IgG	IgA
Ад'юванти		
без ад'юванта	<10	<10
CFA/IFA	<10	<10
MPL™ CE (1%)	32	<10
CE	<10	<10
MPL™ CE (1%) + GM-CSF	129	<10
MPL™ CE(1%) + rIL-12	40	<10
GM-CSF	26	<10
rIL-12	<10	<10
MPL™	<10	<10
MPL™ + GM-CSF	<10	<10
MPL™ + rIL-12	260	197

### Приклад 11

#### Проліферація клітин селезінки

Вимірювали проліферацію клітин селезінки у відповідь на стимуляції *in vitro* TISP10MN(A)(-Cys) і різними композиціями ад'юванта (тими ж, що і в прикладі 10). Клітини селезінки культивували всього протягом 96 годин. У культуру в останні 18 годин вносили <sup>3</sup>H-тимідин. Дані представлені як проліфераційний індекс, нормалізований відносно клітинної стимуляції в культурі ConA [середнє срт антигена/середнє срт CoA]-[середнє срт середовища/середнє срт ConA]×100. Як результат, клітини, культивовані в середовищі, мали фонову проліферацію рівну 0. Результати приведені в таблиці 9. Проліфераційні значення, нижче ніж клітинне зростання в культурі без стимуляції, представлені в дужках.

Таблиця 9 Проліферація клітин селезінки

Ад'ювант	ВІЛ-пептид 10 мкг/мл	ВІЛ-пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ-пептид 1,1 мкг/мл	ConA 5 мкг/мл	Лізоцим 10 мкг/мл
Без ад'юванта	0,1	0,2	0,1	98,3	0,4
CFA/IFA	2,0	0,8	0,4	98,0	0,9
CE MPL™	0,7	0,4	(0,2)	99,2	0,4
CE	0,5	0,3	0,1	99,0	0,4
CE MPL™ + GM-CSF	4,3	2,7	2,3	99,1	0,8
CSMPL™ + 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)

### Приклад 12

#### Секреція IL-4 клітинами селезінки

Вимірювали інтерлейкін-4, що секретується в культурі клітин селезінки, стимульованих TISP10MN(A)(-Cys). Загальний час культивування становив 96 годин. Супернатант клітинної культури аналізували на IL-4 за допомогою ELISA. Всі значення були отримані після віднімання із значень, визначених в супернатантах клітин, стимульованих 10мкг нерелевантного білка (лізоцима). Результати приведені в таблиці 10 в пг/мл. Результати, які були нижчими за межу виявлення після віднімання з стимульованих лізоцимом позначені як «нмв». Ад'юванти являли собою 40нг IL-12, 10мкг GM-CSF і 50мкг MPL™.

Таблиця 10

Секреція IL-4 клітинами селезінки

Ад'ювант	Антиген			
	ВІЛ-пептид 10 мкг/мл	ВІЛ-пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ-пептид 1,1 мкг/мл	ConA 5мкг/мл
без ад'юванта	HMB	HMB	HMB	336
CFA/IFA	HMB	HMB	HMB	117
CE MPL™	HMB	HMB	HMB	187
CE	HMB	HMB	HMB	450
CE MPL™ + GM-CSF	40	42	24	214
CE MPL™ + IL-12	5	HMB	HMB	266
GM-CSF	HMB	9	36	226
IL-12	HMB	HMB	15	411
MPL™	5	HMB	17	286
MPL™ + GM-CSF	HMB	HMB	HMB	241
MPL™ + IL-12	HMB	HMB	HMB	665

### Приклад 13

#### Секреція гамма-інтерферону клітинами селезінки

Вимірювали гамма-інтерферон, що секретується в культурі клітин селезінки, стимульованих TISP10MN(A)(-Cys). Загальний час культивування клітин дорівнював 96 годинам. Супернатант культури клітин аналізували на гамма-інтерферон за допомогою ELISA. Усі значення були отримані після віднімання із значень, визначених з супернатантів клітин, стимульованих 10мкг лізоциму. Результати приводяться в таблиці 11 в од./мл. Результати, які були нижчими за межу виявлення після віднімання з стимульованих лізоцимом, позначені як «нмв». Ад'юванти були ті ж, що і в прикладі 12.

Таблиця 11

Секреція гамма інтерферону клітинами селезінки

Ад'ювант	Антиген			
	ВІЛ-пептид 10 мкг/мл	ВІЛ-пептид 3,3 мкг/мл	ВІЛ-пептид 1,1 мкг/мл	ConA 5мкг/мл
без ад'юванта	HMB	HMB	1	189
CFA/IFA	HMB	HMB	3	193
CE MPL™	2	HMB	HMB	170
CE	HMB	HMB	HMB	130
CE MPL™ GM-CSF	12	3	5	138
CE MPL™ + IL-12	23	8	9	168
GM-CSF	2	3	4	167
IL-12	4	2	41	179
MPL™	5	HMB	HMB	203
MPL™ + GM-CSF	HMB	20	19	31
MPL™ + IL-12	10	4	3	51

### Експеримент 3

#### Імунізація мишей Swiss-Webster ВІЛ-пептидом і різними ад'ювантами

Використовувалися протоколи експерименту 2, крім того, що мишей Swiss-Webster використали замість мишей Balb/c. У даному експерименті вимірювали тільки реципрокні кінцеві точки титрування анти-пептидного IgG і реципрокні кінцеві точки титрування антитіл IgG і IgA з промивної рідини піхви.

### Приклад 14

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-ВІЛ-пептидного IgG Реципрокні кінцеві точки титрування TISP10MN(A)(-Cys) IgG вимірювали як середнє геометричне окремих мишей Swiss-Webster (GMT), отримане через 14 днів після другої імунізації. Граничні титри підкласів IgG1 і IgG2a також вимірювали в об'єднаній сироватці. У випадку реципієнтів ад'ювантів Фройнда, мишей праймували пептидною емульсією в CFA і повторно імунізували IFA. CE MPL™ являє собою емульсією, що містить

в дозі 1% масло сквалену і 50мкг MPL™. Водний MPL™ вводили в кількості 50мкг на дозу. Рекомбінантний мишачий IL-12 вводився в дозі 40нг/миша. Рекомбінантний мишачий GM-CSF вводили в дозі 10мкг/миша. Результати приводяться в таблиці 12.

Таблиця 12

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-B1L-пептиду IgG

Ад'ювант м кг/доза	Граничні титри		
	IgG (GMT)	IgG1 (загальний)	IgG2a (загальний)
без ад'юванта	500	<1000	<1000
CFA/IFA	9038	62358	54053
MPL™ CE	15831	3835	8872
CE	625	<1000	<1000
MPL™ CE + GM-CSF	1374	<1000	1328
MPL™ + rIL-12	6142	<1000	2170
GM-CSF	500	<1000	<1000
rIL-12	500	<1000	<1000
MPL™	1960	<1000	<1000
MPL™ + GM-CSF	58211	35724	37959
MPL™ + rIL-12	5489	8535	17769

## Приклад 15

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу анти-B1L-пептидного IgG

Реципрокні кінцеві точки титрування B1L-пептид-специфічних антитіл IgG і IgA з промивної рідини піхви вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Swiss-Webster) через 15 днів після повторної імунізації. Мишей імунізували так само як описано в прикладі 14. CE MPL™ являла собою емульсію, що містить в дозі 1% масла сквалену і 50мкг MPL™. Водний MPL™ вводився в кількості 50мкг на дозу. Рекомбінантний мишачий IL-12 вводили в кількості 40нг/миша. Рекомбінантний мишачий GM-CSF вводили в кількості 10мкг/миша. Результати представлені в таблиці 13.

Таблиця 13

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-B1L-пептидних IgG і IgA

Ад'юванти	Граничні титри	
	IgG	IgA
без ад'юванта	<10	<10
CFA/IFA	118	<10
MPL™ CE (1%)	<10	<10
CE	<10	<10
MPL™ CE (1%)+GM-CSF	<10	<10
MPL™ CE (1%) + IL-12	<10	<10
GM-CSF	<10	<10
rIL-12	<10	<10
MPL™	<10	<10
MPL™ + GM-CSF	25	<10
MPL™ + IL-12	<10	<10

## Експеримент 4

Імунізація мишей Balb/c B1L-пептидом і різними ад'ювантами

Використовували протоколи експерименту 2, за винятком того, що мишей імунізували на 0 і 28 дні і збирали у них кров для серологічної оцінки на 0, 27 і 41 день. CFA/IFA змішували з CFA на 0 день, IF A на 28 день. CE MPL™ змішували 50мкг MPL™ 2% CE, в той час як використовувалися 50нг IL-12 і 10мкг GM-CSF.

## Приклад 16

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-B1L-пептидного IgG

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A)-(Cys) IgG вимірювали для окремих

мишей і як їх середнє геометричне значення (n=5 Balb/c) через 41 днів після первинної імунізації, через 13 днів після повторної імунізації. Результати приводяться в таблиці 14. У день 0 окремі титри були все меншими 50. Позначення «немає даних» означає, що тварина померла до завершення експерименту. «СВ» означає стандартне відхилення.

Таблиця 14

Індивідуальні і геометричні середні значення сироваткових титрів IgG, специфічних для T1SP10MN(A)-(Cys)

Ад'ювант	Миша #1	Миша #2	Миша #3	Миша #4	Миша #5	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
CE	11469	[немає даних]	5519	12620	50	2514	5813
CE+ IL-12	38042	8030	35081	50	37932	7271	18320
CE + GM-CSF	485985	223518	63,377	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
CE MPL™	904947	5805010	291382	346835	354449	716000	2396968
CE MPL™ + IL-12	244171	8545550	455380	377697	1095650	829707	3593727
CE MPL™ + GM-CSF	3016000	724940	1718590	1483990	28,259	691033	1124414

Приклад 17 Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу анти-B1L-пептидних IgG

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-B1L-пептидних IgG вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c) через 41 день після початкової імунізації, через 13 днів після повторної імунізації. Результати приведені в таблиці 15.

Таблиця 15

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу анти-T1SP10MN(A)-(Cys) IgG

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

## Приклад 18

Титри анти-B1L-пептидних IgG і IgA промивної рідини піхви Титри анти-B1L-пептидних антитіл IgG і IgA промивної рідини піхви вимірювали через 41 день після початкової імунізації, через 13 днів після повторної імунізації. Результати приведені в таблиці 16.

Таблиця 16

Титри антитіл анти-T1SP10MN(A)-(Cys) IgG і IgA з промивної рідини піхви

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

## Приклад 19

## Проліферація клітин селезінки

Вимірювали проліферацію клітин селезінки мишей, імунізованих TISP10MN(A)(-Cys) і різними композиціями ад'юванта. Клітини селезінки стимулювали *in vitro* протягом чотирьох днів 3,3мкг/мл TISP10MN(A)(-Cys). Результати показані на малюнку 4, як зміна включення міченого тимідину в результаті *in vitro* стимуляції 3,3 мкг/мл TISP10MN(A)(-Cys) відносно включення у відсутності стимуляції (дельта срт).

## Експеримент 5

Імунізація мишей Balb/c ВІЛ-пептидом і різними ад'ювантами Використовували протоколи експерименту 2, за винятком того, що мишей імунізували підшкірно на 0 і 22 дні і брали кров для серологічної оцінки на 42 день. CE MPL™ отримували з 50мкг MPL™ і 1% CE, нарівні з використанням 10мкг GM-CSF.

## Приклад 20

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-ВІЛ-пептидного IgG Реципрокні кінцеві точки титрування анти-пептидних IgG вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c) через 42 дні після початкової імунізації, через 13 днів після повторної імунізації. Також для IgG вимірювали середні геометричні величини з допустимим відхиленням. Результати представлені в таблиці 17.

Таблиця 17

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-T18P10MM(A)(-Cys) IgG

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

## Експеримент 6

Імунізація мишей Balb/c ВІЛ-пептидом і різними ад'ювантами Використовували протоколи експерименту 2, за винятком того, що ВІЛ-пептид містив цистеїн в положенні 17 амінокислоти і мишей (n=3 Balb/c) імунізували підшкірно на 0 і 21 дні і збирали кров для серологічної оцінки на -1 (день перед першою імунізацією), 13, 20 і 28 дні. CE MPL™ отримували з 50мкг MPL™ і 1% CE нарівні з використанням 10мкг GM-CSF. ВІЛ-пептид

TISP10MN(A)(+Cys) (26) містить цистеїн в положенні 17 амінокислоти і являє собою в довжину 40 залишків. TISP10MN(A)(+Cys) був отриманий від Genosys Biotechnologies (The Woodlands, TX).

## Приклад 21

Реципрокні кінцеві точки титрування аНТН-TISP10MN(A) IgG Реципрокні кінцеві точки титрування аНТН-TISP10MN(A) IgG вимірювали для окремих мишей і як їх середні геометричні величини (n=3 Balb/c) через 28 днів після початкової імунізації. Результати приведені в таблиці 18.

Таблиця 18

Ефект CE MPL™ + GM-CSF на IgG відповідь на ВІЛ-пептид (+Cys)

Ад'ювант	IgG	GMT	IgG1	GMT	IgG2a	GMT	IgG2b	GMT
CE MPL™ + GM-CSF	14275585	8942480	2097104	1437319	251235	239615	210746	210178
	13618523 3878324		2484849 569823		225253 243103		296429 148621	
CE MPL™	1913110 11405649 6467553	5206349	644377 1937492 777643	990194	22557 152430 441326	114913	23141 127600 119338	70632
MPL™	91728 529663 886156	350486	23249 155199 170071	84978	500 1628 28722	2859	500 1102 44531	2906
Без ад'юванта	<500 <500 <500	-	<500 <500 <500	-	<500 <500 <500	-	<500 <500 <500	-

## Експеримент 7

Імунізація мишей Balb/c ВІЛ-пептидом і різними ад'ювантами Використовували протоколи експерименту 6, за винятком того, що мишей (n=3 Balb/c) імунізували підшкірно на 0 і 32 дні і умертвляли для серологічної оцінки на 38 день. CE MPL™ отримували з 50мкг MPL™ і 1% CE, нарівні з використанням 10мкг GM-CSF.

## Приклад 22

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-ВІЛ-пептидного IgG

Реципрокні кінцеві точки титрування анти-TISP10MN(A)(+Cys) IgG

вимірювали для окремих мишей і як їх середні геометричні величини (n=3 Balb/c) через 38 днів після початкової імунізації. Результати приведені в таблиці 19.

Таблиця 19

Ефект CE MPL™ + GM-CSF на IgG відповідь на ВІЛ-пептид (+Cys)

Ад'ювант	IgG	GMT	IgG1	GMT	IgG2a	GMT	IgG2b	GMT
MPL™ CE + GM-CSF	4,144,548 5,055,375 5,218,387	4,782,117 +/- 472,745	922,507 985,180 1,427,916	1,090,760 +/- 224,940	115,290 629,615 486,563	328,097 +/- 216,753	74,130 76,257 47,515	64,521 +/- 13,077
MPL™ CE	736,325 696,393 340,712	559,033 +/- 177,831	288,659 809,341 107,844	293,160 +/- 297,378	58,506 244,559 76,951	103,260 +/- 83,698	33,047 46,703 13,010	27,180 +/- 13,837
MPL™ + GM-CSF	444,774 3,993,897 1,439,116	1,367,343 +/- 1,494,876	146,146 3,568,062 437,511	611,040 +/- 1,549,005	3,342 17,469 10,691	8,546 +/- 5,769	2,155 14,130 11,590	7,067 +/- 5,152
MPL™	404,755 446,952 478,163	442,259 +/- 30,080	148,818 90,380 114,686	115,544 +/- 23,969	11,874 1,674 2,028	3,429 +/- 4,727	9,685 3,605 3,538	4,980 +/- 2,882
CE	<1,000 <1,000 1,214	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000
Немає	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000	<1,000 <1,000 <1,000

## Експеримент 8

## Аналіз CTL у мишей Balb/c

Імунізація мишей проводилася з використанням протоколів експерименту 6. Оцінювалася активність CTL клітин селезінки, виділених у мишей через сім днів після повторної імунізації. CE MPL™ отримували з 50мкг MPL™ і 1% CE, з або без 10мкг GM-CSF плюс 50мкг TISP10MN(A)(+Cys).

## Приклад 23

## Аналіз CTL у мишей Balb/c

Для аналізу CTL клітини селезінки виділяли у імунізованих мишей через 14 днів після первинної і через сім днів після повторної імунізації. По суті використовували раніше описаний протокол (34). Стисло, об'єднували еритроцит-виснажені клітини селезінки у трьох мишей в групі. Ефекторні клітини селезінки ( $4 \times 10^6$ /мл) повторно стимулювали в 24 лункових культуральних плашках в об'ємі 1,5-2мл протягом семи днів 1мкг/мл або «MN», або «PIB» 10мер пептидами з епітопами CTL. Обидва епітопи CTL були рестриковані H-2D<sup>d</sup>. У культури додавали 10од./мл рекомбінантного мишачого IL-2

(Biosource) протягом останніх п'яти днів культивування. Для аналізу цитотоксичної активності, P815 клітини були мічені  $\text{Cr}^{51}$  і імпульсно-мічені 5мкг/мл пептидом (IIIB або MN) протягом чотирьох годин і додані до культивованих ефекторних клітин селезінки. Використовували три розведення пропорцій ефекторні клітини - мічені клітини, від 100:1 до 3,7:1. Процент CTL активності розраховували як процент вивільнення хрому, що використовується (специфічне вивільнення хрому - спонтанне вивільнення хрому)/(максимальне вивільнення хрому - спонтанне вивільнення хрому)×100. Вивільнення хрому оцінювали після шестигодинного інкубаційного періоду. Середнє спонтанне вивільнення хрому було завжди меншим ніж 15% максимально-го випуску. Результати даних з 28 дня показані на фіг.5.

#### Експеримент 9

Імунізація резус макак різними BIM-пептидами і ад'ювантами

CE MPL™ і GM-CSF композицію ад'юванта тестували на резус макаках (*Macaca mulatto*.) на її здатність стимулювати антиген-специфічні CTL. У цьому експерименті ад'ювантну композицію тестували з тривалентним імуногенним пептидом, що містить три окремих епітопи CTL в контексті Маму А\*01 (кожний з gag, pol і env), кожний синтезується хімічно з або без змішаного BIM env епітопа Т-хелпера в лабораторії Dr. Barton Haynes, університет Duke.

Пептиди, що містять CTL епітоп в контексті Маму А\*01 були наступні:

Cys Thr Pro Tyr Asp Ile Asn Gln Met (SEQ ID NO:3) (gag)

Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val (SEQ ID NO:4) (pol)

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile (SEQ ID NO:5)(env)

Кожний з цих CTL-утримуючих епітопів був також пов'язаний з епітопом Т-хелпера, що має наступну послідовність:

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala (SEQ ID NO:6)

Таким чином, три мультіепітопних пептиди мали наступні послідовності:

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 (SEQ ID NO: 7)

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 (SEQ ID NO: 8)

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 (SEQ ID NO: 9)

Аналіз ЦТК проводили за допомогою аналізу тетрамерного ланцюга в контексті Маму А\*01 в лабораторії Dr. Norman Letvin, Harvard Medical School.

#### Тварини, дози і імуногени

Резус маками експресували HLA-A гомологічну молекулу Маму А\* 01 і був ідентифікований підтип DRβ0201 за допомогою ПЛР і вміщений в колонію New Iberia, LA.

Вивчення включало три групи з двох юних резус макак (*Macaca mulatto*), кожна описана в таблиці 20. Група 1 складалася з двох Маму А\* 01 позитивних, DR.p0201 негативних тварин Rh 73 і Rh 80. Цих тварин імунізували в контексті Маму А\*

01 пептидами, що містять епітоп BIM gag, env і епітоп pol CTL (короткий пептидний коктейль), разом з CE MPL™ і GM-CSF. Група 2 складалася з двох Маму А\*01 позитивних, DRβ0201 позитивних макак, які отримували пептиди, що містять епітопи Th/SIVCTL gag, pol і env (довгий пептидний коктейль), разом з CE MPL™ і GM-CSF. Група 3 включала двох Маму А\*01 негативних, DRβ0201 позитивних тварин, імунізованих пептидами Th/SIVCTL gag, pol і env (довгий пептидний коктейль). Таблиця 20 представляє групи по типу HLA і імуногенних пептидів, що використовуються.

Таблиця 20

Тварини, дози і імуногени

Група	Тварина #	Тип HLA	Пептидні імуногени
1	Rh 73, Rh 80	MamuA*01 +  DRβ0201 -	CTL/BIM gag p11C (SEQ ID NO:3)  CTL/BIM pol p68A (SEQ ID NO:4) CTL/BIM env p41A (SEQ ID NO:5) 0,75 мг кожного пептиду
2	Rh 55, Rh 142	Mamu A*01 + DR*β0201 +	TH-I/CTL/BIM gag p11C (SEQ ID NO:7) TH-I/CTL/BIM pol p68A (SEQ ID NO:8) TH-I/CTL/BIM env p41A (SEQ ID NO:9) 2,4 мг кожного пептиду
3	Rh 41, Rh 47	Mamu A*01 - DR*β0201 +	TH-I/CTL/BIM gag p11C (SEQ ID NO:7) TH-I/CTL/BIM pol p68A (SEQ ID NO:8) TH-I/CTL/BIM env p41A (SEQ ID NO:9) 2,4 мг кожного пептиду

Всі групи були імунізовані підшкірно 1мл відповідного пептидного коктейлю в складі з 50мкг CE MPL™ в 1% маслі і 250мкг людського GM-CSF на 0, 4 і 8 тижні. Дозу CE MPL™ збільшували до 125мкг в 1% маслі на 18 тижень імунізації. Для всіх груп, 2,4мг кожного з довгих пептидів і 0,75 мг кожного з коротких пептидів розчиняли в 900мкл дистильованої, деіонізованої води. Пептидний розчин потім використовували для розбавлення GM-CSF і додавали 100мкл композиції CE MPL™.

#### Приклад 24

##### Аналіз CTL у резус макак

У тварин збирали кров кожні два тижні і гепаринізована кров аналізувалася на CTL в контексті Маму А\*01 за допомогою тетрамерного фарбування мононуклеарних клітин (PBMC) свіжої або культивованої периферичної крові (50). PBMC стимулювали або pile, p68A, p41A, або p46 на 0 день і потім культивували в присутності IL-2 і аналізували на 11 день. Стандартний метод вивільнення  $^{51}\text{Cr}$  також проводили на культивованих PBMC (50).

##### Тетрамерний аналіз проводили таким чином:

Пептиди, що містять епітопи p11c з gag, p68A з pol або p68A з pol або p41A з env інкубували з очищеним біотинільованим Маму А\*01 в присутності β2 мікроглобуліну, потім приєднували до авідину і кон'югували з РЕ (фікоеритрин). Цей тетрамер потім використовувався для фарбування CD8+ клітин макак з Т-клітинними рецепторами, які впізнають епітопи pile, p68A або p41A. Різні DRβ0201 тетрамери утворювали петлі навколо домінуючого env p46 епітопа, що дозволяє контрастувати CD4+ клітини, які впізнають епітоп p46 Th. Результати представлені в Таблицях 21-24.

Таблиця 21

Процент P11c/BIMgag тетрамер-позитивних CD8+ клітин

Група	Тижні	0	2	4	6	8	9	10	14
Група 1	Rh 73	0,1	3,9	5,1	4,2	2,7	2,6	0,1	2,7
	Rh 80	0,1	0,4	0,1	0,6	0,2	0,2	1,4	0,2
Група 2	Rh 55	0,1	3,1	4,5	5,9	4,0	4,0	4,1	2,7
	Rh 142	0,2	4,7	2,5	5,4	3,9	3,9	2,5	4,1
Група 3	Rh 41	0	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1
	Rh 47	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1

Таблиця 22

Процент p68A/BIM CTL pol тетрамер-позитивних CD8+ клітин

Група	Тижні	0	2	4	6	8	9	10	14
Група 1	Rh 73	0,1	0,4	0,1	10,1	2,5	0,5	1,8	1,5
	Rh 80	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5	0,1	0,1	0,1
Група 2	Rh 55	0,1	1,1	1,1	5,5	5,6	1,5	11,7	6,4
	Rh 142	0,2	0,6	0,2	1,0	1,8	0,3	2,3	1,2
Група 3	Rh 41	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3
	Rh 47	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	

Таблиця 23

Процент P41A/BIM env тетрамер-позитивних CD8+ клітин

Група	Тижні	0	2	4	6	8	9	10	14
Група 1	Rh 73	0,8	3,5	2,5	2,0	3,5	1,7	1,5	1,6
	Rh 80	0,2	0,2	3,4	0,5	0,1	0,0	0,2	0,2
Група 2	Rh 55	0,2	1,1	0,4	0,6	0,4	0,2	0,1	0,6
	Rh 142	0,3	0,5	0,4	0,6	0,3	0,3	0,2	0,4
Група 3	Rh 41	0	0,2	0,1		0,3	0,0	0,0	0,2
	Rh 47	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2

Таблиця 24

Процент p46/BIM T-хелперів DRβ0201 тетрамер-позитивних CD4+ клітин

Група	Тижні	0	2	4	6	8	9	10	14
Група 1	Rh 73			0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Rh 80			0,2	0,0	0,0	0,1	U, U	0,0
Група 2	Rh 55			0,2	0,5	0,7	0,4	0,3	0,3
	Rh 142			0,2	0,9	0,6	1,0	0,6	0,5
Група 3	Rh 41					0,6	0,4	0,3	0,3
	Rh 47					1,2	0,8	1,6	1,2

## Експеримент 10

Імунізація мишей Swiss-Webster білком порином B *Neisseria gonorrhoeae* і різними ад'ювантами

Аутбрідних мишей Swiss-Webster розділяли на п'ять груп по десять мишей в кожній. Кожна група отримувала 1мкг рекомбінантного білка порина B (з ланцюжком FA1090 з 16 амінокислот на N-кінці фага, а потім зрілою формою білка порина B). Перша група не отримувала ад'ювант; друга група отримувала 50мкг MPL™; третя група отримувала MPL™ плюс 5мкг GM-CSF; четверта група отримувала 25мкг CE MPL™; п'ята група отримувала CE MPL™ SE плюс 5мкг GM-CSF. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область повним об'ємом 0,2мл, рівно розділеними на кожну сторону відносно області хвоста/хрестця. Імунізацію проводили на 0 і 4 тиждень.

## Приклад 25

Реципрокні кінцеві точки титрування IgG у відповідь на білок анти-порин B Мишей знекровлювали за день до кожної імунізації і на 13 день після остаточної імунізації. Сироватку аналізували як об'єднану від мишей в межах груп. Реципрокні кінцеві точки титрування IgG у відповідь на білок анти-порин B вимірювали в об'єднаній сироватці (n=10 Swiss-Webster) промивної рідини піхви на 3 і

6 тижні. Результати приведені в таблиці 25. Всі титри до імунізації на 0 день були нижче за 50.

Таблиця 25

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласів IgG у відповідь на анти-поринний B білок

		3-ий тиждень			6-ий тиждень	
Ад'ювант	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Без ад'юванта	4146	531	293	157203	4467	9782
MPL™	3381	171	318	431529	23465	20422
MPL™ + GM-CSF	7895	50	980	790193	2478	82690
CE MPL™	135016	297	13339	3945614	10805	342322
CE MPL™ + GM-CSF	106008	725	8772	3304231	31920	201787

Також визначали середньгеометричні окремі титри IgG на 6 тижні проти рекомбінантного білка порина B. Результати приведені в таблиці 26.

Таблиця 26

Окремі титри IgG

Ад'ювант	Середнє геометричне	Стандартна помилка
Без ад'юванта	100089	63467
MPL™	217114	451611
MPL™ + GM-CSF	649801	353863
CE MPL™	1917908	1478357
CE MPL™ + GM-CSF	2144567	858184

## Експеримент 11

Імунізація мишей Swiss-Webster білком порином B *Neisseria gonorrhoeae* і різними ад'ювантами

Аутбрідних мишей Swiss-Webster розділяли на шість груп по п'ять мишей в кожній. Кожна група отримувала 1мкг рекомбінантного білка порина B (з ланцюжком FA1090 з 16 амінокислот на N-кінці фага, а потім зрілою формою білка порина B). Перша група не отримувала ад'ювант (білок був включеним в композицію з PBS); друга група отримувала 40нг IL-12; третя група отримувала 50мкг MPL™; четверта група отримувала MPL™ плюс 40нг IL-12; п'ята група отримувала 25мкг CE MPL™; шоста група отримувала CE MPL™ SE плюс 40нг IL-12. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область повним об'ємом 0,2мл. Імунізацію проводили на 0 і 4 тиждень.

## Приклад 26

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу IgG у відповідь на білок анти-порин B і IgG і IgA з промивної рідини піхви

Мишей знекровлювали за день до кожної імунізації і на 13 день після остаточної імунізації. Сироватку аналізували як об'єднану від мишей в межах груп. Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу IgG у відповідь на білок анти-порин B вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Swiss-Webster) промивної рідини піхви і IgG і IgA вагинальних промивок на 3 тижні і 6 тижні. Результати приведені в таблиці 27. Всі титри до імунізації на 0 день були нижчими за 50. Стандартна помилка при аналізі промивної рідини піхви була 1/5.

Таблиця 27

Реципрокні кінцеві точки титрування субкласу IgG у відповідь на анти-пориновий В білок і IgG і IgA вагінальної промивної рідини

	Тижень 3			Тижень 6			Вагінальна промивка	
Ад'ювант	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgA
Без ад'юванта	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
CE MPL™	53056	8543	17550	5133154	513236	622514	338	5
CE MPL™ + IL-12	757133	5622	33259	10935000	210478	471552	3036	5

#### Експеримент 12

Імунізація мишей Balb/c білком респіраторного синціального вірусу F і різними ад'ювантами

Мишей Balb/c розділяли на сім груп з п'яти мишей в кожній. Кожна група отримувала 3мкг очищеного нативного білка людського респіраторного синціального вірусу (RSV) F (в димерній формі). Перша група не отримувала ад'ювант (білок був включеним в композицію з PBS); друга група отримувала 100мкг фосфату алюмінію (алюм); третя група отримувала 20мкг Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA); четверта група отримувала 50мкл MPL™; п'ята група отримувала MPL™ плюс 5мкг GM-CSF; шоста група отримувала 25мкг CE MPL™; сьома група отримувала CE MPL™ SE плюс 5мкг GM-CSF. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область повним об'ємом 0,2мл у верхню частину стегна. Імунізацію проводили на 0 і 4 тижень.

#### Приклад 27

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласу IgG у відповідь на білок анти-RSV F

Мишей знекровлювали за день до кожної імунізації і на 13 день після остаточної імунізації. Сироватку аналізували як об'єднану від мишей в межах груп. Граничні титри підкласів IgG реципрокні до білка анти-RSV F вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c). Результати приведені в таблиці 28. Всі титри до імунізації на 0 день були нижчими за 50.

Таблиця 28

Реципрокні кінцеві точки титрування субкласів IgG у відповідь на анти-RSV білок

	Тижень 3			Тижень 6		
Ад'ювант	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Без ад'юванта	18452	3698	319	539156	3119905	80855
Алюм	66710	35839	4321	5417001	3226833	291474
Стимулон™ QS-21	313665	150988	176080	12113156	2902521	4324004
MPL™	124197	28134	11882	3310838	900863	1057108
MPL™ + GM-CSF	419873	91649	65453	10343803	753890	688554
CE MPL™	374992	44115	147366	19333189	1493284	6314264
CE MPL™ + GM-CSF	1748272	51966	267265	30816193	1716850	2641258

#### Приклад 28

##### Проліферація клітин селезінки

Вимірювали проліферацію клітин селезінки у відповідь на стимуляцію in vitro 2,5мкг/мл білком RSV F і різними композиціями ад'юванта (ті ж самі, що і в прикладі 27). Клітини селезінки збирали на 14 день після повторної імунізації і вмішували в культуру з щільністю  $5 \times 10^5$  клітин. Клітини культивували в загальній кількості 96 годин. В останні 18 годин в культуру додавали <sup>3</sup>H-тимідин. Дані представлені як індекс проліферації нормалізованих

відносно клітин стимульованих в культурі ConA ([середнє срт антигена/середнє срт ConA])- [середнє срт середовища/середнє срт ConA] × 100. У результаті культивовані в середовищі клітини мають фонову проліферацію 0. Результати приведені в таблиці 29.

Таблиця 29

Проліферація клітин селезінки

Ад'ювант	Нормалізований індекс проліферації
Без ад'юванта	18,1
Алюм	13,1
Stimulon™ QS-21	0,8
MPL™	0,4
MPL™ + GM-CSF	20,0
CE MPL™	17,8
CE MPL™ + GM-CSF	16,3

#### Експеримент 13

Імунізація мишей Balb/c білком респіраторно-синціального вірусу F і різними ад'ювантами

Використали протокол експерименту 12 (імунізації на 0 і 4 тижні білком RSV F з або без різних ад'ювантів).

#### Приклад 29

Реципрокні кінцеві точки титрування IgG анти-RSV F у відповідь на білок

Мишей знекровлювали за день до кожної імунізації і на 13 день після остаточної імунізації. Сироватку аналізували як об'єднану від мишей в межах груп. Прикордонні титри підкласів IgG реципрокні до білку анти-RSV F вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c). Результати приведені в таблиці 30. Всі титри до імунізації на 0 день були нижчими за 50.

Таблиця 30

Реципрокні кінцеві точки титрування субкласів IgG у відповідь на анти-RSV білок

	Тижень 3			Тижень 6		
Ад'ювант	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Без ад'юванта	6442	2808	713	5195059	963203	38791
Алюм	128695	36841	1975	4285993	567972	27668
Стимулон™ QS-21	528036	296292	176703	37221721	1823402	1724319
MPL™	104702	21930	61253	6153833	1384927	955685
MPL™ + GM-CSF	262128	79888	55249	21054796	3412710	2070305
CE MPL™	184246	47194	180932	31731335	4376601	6406591
CE MPL™ + GM-CSF	375575	70422	289542	27079086	2124043	6341497

#### Приклад 30

##### Активність CTL клітини селезінки

Активність CTL (цитотоксичний Т-лімфоцит) клітини селезінки як результат імунізації білком RSV і позначені ад'ювантами оцінювали через дві тижні після закінчення імунізації. Дані представляють процент активності специфічних CTL клітин селезінки, культивованих міченими клітинами зараженими RSV, на ефективні мічені клітини у відношенні 33:1. Процент специфічної активності CTL визначали як в прикладі 24, віднімаючи активність CTL незаражених мічених клітин з активності, специфічної для мічених клітин інфікованих RSV. Нативні клітини селезінки інфікували RSV в MOI (різноманітність інфекції) в 1,5 протягом двох годин як джерело in vitro стимулюючих клітин. Відповідаючі клітини селезінки імунізованих мишей додавали до стимуляторних клітин у відношенні 5:1 і культиву-

вали протягом шести днів. На 5 день мічені клітини (Balb/C MHC-H-2d клітинна лінія) інфікували RSV в MOI 10 протягом двох годин і культивували протягом ночі. На 6 день інфіковані і неінфіковані мічені клітини збирали і імпульсно мітили  $^{51}\text{Cr}$ . Потім *in vitro* до мічених клітин додавали ефекторні клітини у відношенні Е:Т в області від 100:1 до 3:1. Вивільнення хрому вимірювали через чотири години інкубації. Результати приведені в таблиці 31.

Таблиця 31  
Активність CTL клітин селезінки

Ад'ювант	Нормалізований індекс проліферації
Без ад'юванта	1
Алюм	4
Stimulon™ QS-21	53
MPL™	6
MPL™ + GM-CSF	15
CE MPL™	30
CE MPL™ + GM-CSF	36

#### Експеримент 14

Імунізація мишей Balb/c білком респіраторного синціального вірусу F і різними ад'ювантами

Мишей Balb/c розділяли на шість груп з п'яти мишей в кожній. Кожна група отримувала Змкг очищеного нативного білка людського респіраторного синціального вірусу (RSV) F (в димерній формі). Перша група не отримувала ад'ювант (білок був включеним в композицію з PBS); друга група отримувала 40нг IL-12; третя група отримувала 50мкл MPL™; четверта група отримувала MPL™ плюс 40нг IL-12; п'ята група отримувала 25мкг CE MPL™; шоста група отримувала CE MPL™ плюс 40нг IL-12. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область повним об'ємом 0,2мл, розділяючи на рівну кількість на кожну сторону від хвоста. Імунізацію проводили на 0 і 4 тижднів.

#### Приклад 31

Реципрокні кінцеві точки титрування підкласів IgG у відповідь на білок анти-RSV F

Мишей знекровлювали за день до кожної імунізації і на 13 день після остаточної імунізації. Сироватку аналізували як об'єднану від мишей в межах груп. Гранічні титри підкласів IgG, реципрокні до білка анти-RSV F, вимірювали в об'єднаній сироватці (n=5 Balb/c). Результати приведені в таблиці 32. Всі титри до імунізації на 0 день були нижче за 50.

Таблиця 32

Реципрокні кінцеві точки титрування субкласів IgG у відповідь на анти-RSV білок

Ад'ювант	Тиждень 3			Тиждень 6		
	IgG	IgG1	IgG2a	IgG	IgG1	IgG2a
Без ад'юванта	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
CE MPL™	1708358	53608	144876	9075480	565403	1000459
CE MPL™ + IL-12	329050	15788	69794	10935000	386639	1284274

#### Приклад 32

Активність CTL клітини селезінки

Активність CTL (цитотоксичний Т-лімфоцит) клітини селезінки як результат імунізації білком-

RSV і позначених ад'ювантів оцінювали через дві тижні після заключної імунізації. Дані представляють процент активності специфічних CTL клітин селезінки, культивованих міченими клітинами зараженими RSV, на ефективні мічені клітини у відношенні 33:1. Процент специфічної активності CTL визначали як в прикладі 24, віднімаючи активність CTL незаражених мічених клітин з активності, специфічної для мічених клітин, інфікованих RSV. Наївні клітини селезінки інфікували RSV в MOI 1,5 протягом двох годин як джерело *in vitro* стимулюючих клітин. Відповідаючі клітини селезінки імунізованих мишей додавали до стимуляторних клітин у відношенні 5:1 і культивували протягом шести днів. На 5 день мічені клітини (Balb/C MHC-H-2d клітинна лінія) інфікували RSV в MOI 10 протягом двох годин і культивували протягом ночі. На 6 день інфіковані і неінфіковані мічені клітини збирали і імпульсно мітили  $^{51}\text{Cr}$ . Потім *in vitro* до мічених клітин додавали ефекторні клітини у відношенні Е:Т в області від 100:1 до 3:1. Вивільнення хрому вимірювали через чотири години інкубації. Результати приведені в таблиці 33.

Таблиця 33

Активність CTL клітин селезінки

Ад'ювант	Процент активності CTL
Без ад'юванта	6
IL-12	22
MPL™	15
MPL™ + IL-12	13
CE MPL™	33
CE MPL™ + IL-12	28

#### Експеримент 15

Імунізація мишей Balb/c нуклеокапсидним білком вірусу грипу і різними ад'ювантами

Мишей Balb/c розділяли на шість груп з п'яти мишей в кожній. Кожна група отримувала 1мкг нуклеокапсидного (NP) білка вірусу грипу з штаму A/dorn/307/72. [Дослідження груп] Перша група не отримувала ад'юванту (пептид був включеним в композицію з PBS); друга група отримувала 100мкг фосфату алюмінію; третя група отримувала 50мкл MPL™; четверта група отримувала MPL™ плюс 5мкг GM-CSF; п'ята група отримувала 25мкг CE MPL™; шоста група отримувала CE MPL™ плюс 5мкг GM-CSF. Мишей імунізували підшкірно в сідничну область повним об'ємом 0,2мл. Імунізацію проводили на 0 і 4 тижднів.

#### Приклад 33

Активність CTL клітин селезінки

Активність CTL клітин селезінки як результат імунізації NP вірусу грипу і позначених ад'ювантів оцінювали через два тижні після заключної імунізації. Оцінку проводили, використовуючи процедуру прикладу 32, використовуючи пептид-імпульсно мічені клітини р815 (пептид відповідає амінокислотам 147-155 NP і має послідовність: Thr Tyr Gin Arg Thr Arg Ala Leu Val (SEQ ID NO: 14). Включення GM-CSF в складі, що містять MPL™ або CE MPL™ приводило до помітного зниження активності CTL (дані не показані).

#### Бібліографія

1. Mossmann, T.K., et al., J.Immunol., 136, 2348-2357 (1986).



2. Патент США №4912094.
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.Immunol., 154, 4623-4629 (1995).
6. Murray, H.W. and Hariprasad, J., J. Exp. Med., 181, 387-391 (1995).
7. Патент США №5571515.
8. Finkelman, F.D. and Holmes, J., Ann. Rev. Immunol., 8, 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. Міжнародна патентна публікація №WO 90/05147.
12. Патент США №5078996.
13. Патент США №5229496.
14. Патент США №5073627.
15. Alderson, M.R., et al., J. Exp. Med., 178, 669-674 (1993).
16. Snapper, C.M., et al., J.Immunol., 154, 5842-5850 (1995).
17. Патент США №5013548.
18. Патент США №5019387.
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, P.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. P., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 11, 211-221 (1998).
30. Патент США №5861243.
31. Патент США №5932218.
32. Патент США №5939074.
33. Патент США №5993819.
34. Патент США №6037135.
35. Опублікована заявка на Європейський патент №671947.
36. Staats, H.F., et al., J.Immunol., 157, 462-472 (1996).
37. Porgador, A., et al., J.Immunol., 158, 834-841 (1997).
38. Allen, T.H., et al., J.Immunol., 160, 6062-6071 (1998).
39. Miller, M.D., et al., J.Immunol., 147, 320-329 (1991).
40. Egan, H.A., et al., J. Virol., 13, 5466 (1999).
41. Hart, U.K., J.Immunol., 145, 2677-2685

- (1990).
42. Патент США №5736361.
43. Патент США №5223254.
44. Міжнародна патентна публікація №WO 98/20734.
45. Патент США №5830877.
46. Міжнародна патентна публікація №WO 99/51259.
47. Міжнародна патентна публікація №WO 99/27944.
48. Патент США №4666829.
49. Патент США №5593972.
50. Kuroda, M.J., et al., J. Exp. Med., 187, 1373-1381 (1998).

# ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> American Cyanamid Company  
 <120> Композиції комбінованого ад'юванту  
 <130>33482-00/PCT

<140>

<160>14

<170>Patentin Ver.2.1

<210>1

<211>40

<212>PRT

<213> Вірус імунodefіциту людини

<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> Вірус імунodefіциту людини

<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> Вірус імунodefіциту мавпи

<400>3

Cys		Thr	Pro	Tyr	Asp	Ile	Asn	Gln	Met
1					5				

<210>4

<211>9

<212>PRT

<213> Вірус імунodefіциту мавпи

<400>4

Ser		Thr	Pro	Pro	Leu	Val	Arg	Leu	Val
1					5				

<210>5

<211>9

<212>PRT

<213> Вірус імунodefіциту мавпи

<400>5

Tyr		Ala	Pro	Pro	Ile	Ser	Gly	Gln	Ile
1					5				

<210>6

<211>20

<212>PRT



49

<213> Вірус імунодефіциту мавпи  
<400>6

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala

20

<210>7

<211>29

<212> PRT

<213> Вірус імунодефіциту мавпи

<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> Вірус імунодефіциту мавпи

<400>8

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala  
1 5 10 15

Pro Thr Lys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Val Arg Leu Val

20

25

<210>9

<211>29

<212>PRT

<213> Вірус імунодефіциту мавпи

<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

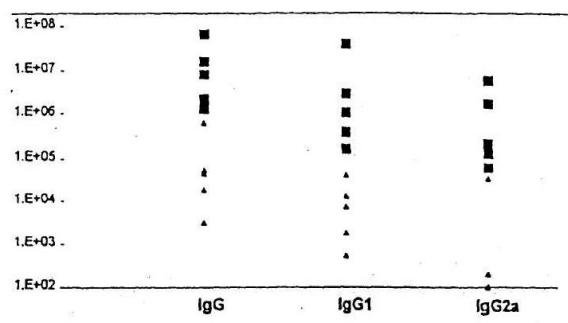
<212>PRT

<213> Невідомий організм

<220>

<223> Опис невідомого організму: людський  
пептидний амілоїдний білок

<400>10



Фиг. 1

76406

50

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> Невідомий організм

<220>

<223> Опис невідомого організму: людський  
пептидний амілоїдний білок

<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> Вірус імунодефіциту людини

<400>12

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile

1 5 10

<210>13

<211>10

<212>PRT

<213> Вірус імунодефіциту людини

<400>13

Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr

1 5 10

<210>14

<211>9

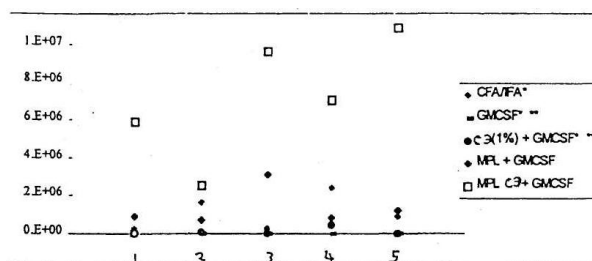
<212>PRT

<213> Вірус грипу

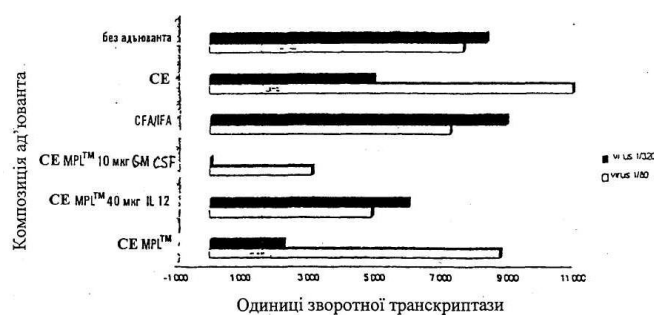
<400>14

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val

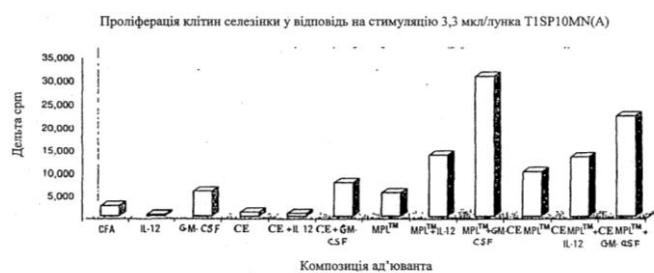
1 5



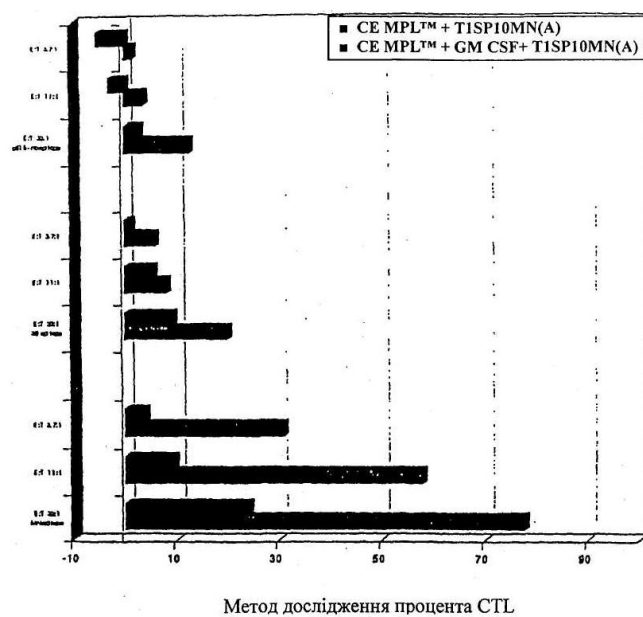
Фиг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5