

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Očkování proti HIV infekci

(bakalářská práce)

Studijní obor: Zdravotní laborant

Hradec Králové, 7. 5. 2010

Lenka Marková

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum

podpis

Abstrakt:

Autor: Lenka Marková

Název práce: Očkování proti HIV infekci

Konzultant: Mgr. Klára Konečná

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra biologických a lékařských věd

Bakalářská práce s názvem „Očkování proti HIV infekci“ se zabývá základní strukturou viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) a jeho imunologickými vlastnostmi. Krátce pojednává o přenosu viru a příznacích HIV infekce a nemoci AIDS (syndrom získané imunitní nedostatečnosti). Pojednává o typech vakcín, které se běžně používají při očkování a také o vakcínách, které přicházejí v úvahu v otázce očkování proti HIV. Zmiňují se zde problémy s vývojem vakcín a popisuje několik klinických pokusů a jejich výsledky.

Abstract:

Author: Lenka Marková

The title: Vaccination against HIV infection

Tutor: Mgr. Klára Konečná

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
department of biological and medical sciences

The bachelor study titled „Vaccination against HIV infection“ inquires into the basic structure of the human immunodeficiency virus (HIV) and its immunological features. Shortly discusses the transfer of the virus and the symptoms of HIV infection and the AIDS disease (syndrome of inquired immune deficiency). It also discusses of commonly used vaccinations, and considers vaccines in respect of HIV. The study also discusses some problems linked to vaccine development and describes some clinical experiments and results.

Souhrn :

Virus HIV je dlouhodobou hrozbou lidstva. Odhaduje se, že je ve světě 33 miliónů infikovaných osob. Pandemie HIV/AIDS je tedy globálním problémem s výrazným socio-ekonomickým dopadem. Nejúčinnější obranou proti šíření onemocnění vyvolané virem HIV je bezesporu očkování.

Virus HIV je obalený RNA virus, který se dále dělí na dva typy, HIV-1 a HIV-2. Organizace genomu tohoto viru je obdobná ostatním retrovirům. V genomu jsou obsaženy jak geny kódující strukturní proteiny, tak i přídavné geny unikátní pro virus HIV.

Primárně jsou virem HIV napadány CD4 T-lymfocyty, do kterých virus vstupuje po vazbě virového gp 120 na CD4 povrchovou molekulu T-lymfocytů. Po akutní fázi infekce, která vede k výraznému snížení počtu virových částic z krve velmi rychle nastupuje fáze chronická, při které viry perzistují v hostitelských buňkách.

Imunitní pochody vedoucí ke kontrole infekce virem HIV nejsou zcela objasněny. Klíčovou roli ve vytváření imunitní odpovědi sehrávají CD8 T-lymfocyty a dendritické buňky. Zdá se, že humorální imunitní odpověď sehrává minoritní roli v kontrole HIV infekce.

U infikovaných osob byl virus nalezen v různých koncentracích v biologických tělních tekutinách jako je krev, sperma, vaginální sekret, mateřské mléko, sliny, či slzy. K nákaze dochází hlavně sexuálním stykem s infikovaným člověkem, při sdílení injekčních jehel narkomanů s HIV pozitivní osobou, anebo také dochází k přenosu HIV infekce z matky na dítě během těhotenství, při porodu nebo kojení.

V této práci jsou blíže zmíněny některé kandidátní vakcíny jako: AIDSVax, V 520, VCR, či ALVAC HIV a klinické studie se závěry a poznatky, které výzkum kandidátních vakcín přinesl.

Summary :

The HIV virus has long been a threat to mankind. On the world is approximately 33 millions infected people. The pandemy of HIV/AIDS is global problem and the most effective defence against spread of HIV is vaccination.

The HIV virus belongs to the RNA group of viruses and is further subdivided into types HIV-1 and HIV-2. The organization of the genom is similar to other retroviruses. In the genom are genes coding the structural proteins and also genes unique for HIV virus.

Primary the HIV virus invade the T-lymphocytes. The bind of gp120 on the virus and CD4 surface molecule on the T-lymphocytes evoke entry of the virus to the cell. For acute phase of the infection is typic depletion of virus particles in the blood. After this phase gets on the chronical phase and the viruses are persisting in the host cells.

The key role in the immune response play CD8 T-lymphocytes and dendritic cells. It seems that humoral immune response is minor in control of HIV infection.

In infected people was the virus found in various concentration. It was found in the blood, sperm, vaginal secret, breast milk, saliva and tears. The infection is evoke mainly by the sexual contact with infected person, between drug users if they use the needle with the infected person and also the infection can be spread from mother to the child in pregnancy, during delivery or breastfeeding.

In this study there are introduced some candidate vaccines, for example: AIDSVax, V520, VCR, and ALVAC HIV, and cinical studies with experiments and results.

Obsah:

Přehled používaných zkratk	9
1. Úvod	13
2. Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus) – HIV	15
2.1 Základy virologie a imunologie viru lidské imunitní nedostatečnosti	15
2.2 Přenos viru lidské imunitní nedostatečnosti a rizikové faktory	19
2.3 Klinické příznaky neléčené infekce vyvolané virem lidské imunitní nedostatečnosti	20
2.3.1 Primární infekce	20
2.3.2 Chronická infekce	22
2.3.3 Klinický syndrom získaného imunodeficitu	23
3. Imunitní systém a virus lidské imunitní nedostatečnosti	24
3.1 Buněčná imunita v kontrole infekce virem lidské imunitní nedostatečnosti	26
3.1.1 CD8 T-lymfocyty	26
3.1.2 CD4 T-lymfocyty	28
3.1.3 B-lymfocyty	28
3.1.4 Dendritické buňky	29
3.2 Humorální imunitní odpověď	31
4. Vstup viru HIV do hostitelské buňky	32
5. Rozdělení vakcín	35
5.1 Živé celulární vakcíny	35
5.2 Inaktivované celulární vakcíny	35
5.3 Subjednotkové (acelulární) vakcíny	36
5.3.1 Konjugované vakcíny	37
5.3.2 DNA plazmidové vakcíny	37
5.3.3 Rekombinantní vektorové vakcíny	39
6. Kandidátní vakcíny proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti	41

6.1 Zvířecí modely pro testování účinnosti kandidátních vakcín	43
6.2 Inhibice vstupu viru lidské imunitní nedostatečnosti do buněk pomocí protilátek	44
6.3 Nové návrhy vakcín	46
6.4 Preventivní a terapeutické vakcíny proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti	47
6.4.1. Preventivní vakcíny	47
6.4.2. Terapeutické vakcíny	47
6.5 Trendy a poznatky v T-lymfocytárních vakcínách proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti	48
6.6 Vakcíny proti onemocnění virem lidské imunitní nedostatečnosti v klinických pokusech	49
6.6.1 Vakcína AIDSVax	50
6.6.2 Vakcína V 520 – studie STEP, Phambili	50
6.6.3 VRC vakcína – studie PAVE 100, HVTN 505	53
6.6.4 Vakcína ALVAC HIV, AIDSVax B/E – studie RV 144	54
7. Závěr	55
Použitá literatura	56
Použité weblinky	69

Přehled používaných zkratk:

AD5 – adenovirus typu 5

rAD5 – rekombinantní adenovirus typu 5

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného imunodeficitu

AIDSVax – název testované kandidátní profylaktické vakcíny, rekombinantní forma glykoproteinu 120 (gp120) vyvinuté společností VaxGen, USA

AIDSVax B/E - název testované kandidátní profylaktické bivalentní vakcíny vyvinuté společností VaxGen, USA

ALVAC HIV - název testované kandidátní subcelulární vakcíny , rekombinantní vakcína, využívající jako vektor canarypox virus, obsahující množství genů HIV-1, vyvinuté společností Aventis Pasteur of Lyon, Francie

APC – Antigen presenting cell, antigen prezentující buňka

BCG – Bacillus Calmette-Guérin, atenuované *Mycobacterium bovis*

CCR5 – C-C chemokinový receptor typu 5

CD – cluster of designation, CD buněčný znak, povrchový marker buněk

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CTL – cytotoxické T-lymfocyty

CXCR4 – CXC chemokinový receptor typu 4

DC – dendritic cell, dendritická buňka

DC-SIGN – dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, povrchová molekula dendritické buňky lektinové rodiny označovaná také jako CD209

DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

cDNA – complementary deoxyribonucleic acid, komplementární deoxyribonukleová kyselina

EBV – Epstein-Barr virus, virus Epstein – Barrové

FAD – Food and Drug Administration

FasL – Fas ligand

F105 – neutralizační lidská monoklonální protilátka vážící se k CD4 vazebnému místu glykoproteinu 120

Gp – glykoprotein

GRID - gay-related immune deficiency syndrome, syndrom imunitní deficiencie spojený s homosexuály

HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy, vysoce aktivní antiretrovirová terapie

HIV – Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti

HLA – human leukocyte antigen, hlavní histokompatibilní komplex u lidí

HTLV III – Human T-cell Lymphotropic Virus type III, lidský T-lymfocytární lymfotropní virus typu III

HVTN – HIV Vaccine Trials Network, společnost zabývající se vývojem efektivní a bezpečné HIV vakcíny

HVTN 502 – HIV Vaccine Trials Network 502, název studie testované vakcíny obsahující rekombinantní adenovirus typu 5 jako vektor a geny HIV-1, sponzorované společností Merck, HVTN a NIAID-NIH

HVTN 505 – HIV Vaccine Trials Network 505, název studie testované vakcíny využívající rekombinantní bázi DNA posílenou adenovirem typu 5, vyvinuté společností Vaccine Research Center v National Institutes of Health

IL – interleukin

IgG1 – imunoglobulin třídy G, podtřídy 1

Imunoglobulin b12 – neutralizační lidská monoklonální protilátka třídy IgG1

LAV – Lymphadenopathy Associated Virus, virus spojený s lymfadenopatií

LTR – Long Terminal Repeat, regulační region, opakující se koncové části DNA, charakteristické pro retroviry a retrotransposony

MERCK – společnost pro vývoj vakcín

MERCK V520 - název testované kandidátní trivalentní vakcíny obsahující tři rekombinantní HIV geny, s použitím adenovirového vektoru

MHC – Major Histocompatibility Complex, hlavní histokompatibilní komplex

MIP – Macrophage Inflammatory Protein, prozánětlivý protein makrofágů

MVA – Modified Vaccinia Virus Ankara, modifikovaný virus vakcinie Ankara, vakcína proti neštovicím

rMVA – recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara, rekombinantní modifikovaný virus vakcinie Ankara

NIAID – National Institute for Allergy and Infectious Diseases

NIH – National Institute of Health

PAVE - Partnership for AIDS Vaccine Evaluation, organizace zapojená do vývoje HIV/AIDS preventivní vakcíny

PAVE 100 –název testované klinické vakcinační studie, využívající kombinaci imunizace, nejprve DNA, poté podporující vektor, vakcína vyvinuta ve Vaccine Research Center

PCR – Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

Phambili – název testované klinické vakcinační studie, využívající vakcínu HVTN 502, probíhající v Jižní Africe

PIC – Pre-Integration Complex, preintegrační komplex, nukleoproteinový komplex genetického materiálu viru a proteinů hostitelských buněk

p7 – protein 7, nukleokapsidový protein v jádře viru HIV

p17 – protein 17, matrixový protein přítomný mezi jádrem a obalem viru HIV a na povrchu HIV viru

p24 – protein 24, antigen přítomný na povrchu HIV viru

RANTES – chemokin, chemotaktický cytokin

RNA – Ribonucleic Acid, ribonukleová kyselina

mRNA – messenger RNA, mediátorová (informační) RNA

siRNA – small interfering RNA, malá interferující RNA, uplatňuje se při RNA interferenci, expresi genu

ssRNA – single stranded RNA, jednovláknová RNA

RV 144 - název testované klinické vakcinační studie, využívající kombinaci vakcín ALVAC HIV a AIDSVAX B/E

SIV – Simian Immunodeficiency Virus, opičí imunodeficitní virus

SHIV – zkřížený virus SIV a HIV který nese geny HIV-1 v SIV genomickém základu

SIV/HIV-1 – Simian Immunodeficiency Virus (SIV)/Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1), chimerický virus SIV/HIV-1

SOCS – Supressor Of Cytokine Signaling, negativní regulátor cytokinové signalizace, molekula na dendritických buňkách, která potlačuje signalizaci cytokinů

STEP - název testované klinické vakcinační studie, využívající vakcínu HVTN 502, probíhající v USA

TAR – Tat-Responsive element, transaktivační region

TCR – T-Cell Receptor, buněčný receptor T-lymfocytů

VRC – Vaccine Research center, centrum pro vývoj vakcín

V4, V5 – variabilní determinanty tvořící gp12

V520 - název testované kandidátní trivalentní vakcíny obsahující tři rekombinantní HIV geny, s použitím adenovirového vektoru

Z13 - neutralizační lidská monoklonální protilátka vážící se ke glykoproteinu 41 viru HIV

2F5 – neutralizační lidská monoklonální protilátka vážící se ke glykoproteinu 41 viru HIV

2G12 – neutralizační lidská monoklonální protilátka vážící se ke glykoproteinu 120 viru (gp120) HIV

4E10 – neutralizační lidská monoklonální protilátka vážící se ke glykoproteinu 41 (gp41) viru HIV

1. Úvod

Neúprosnému celosvětovému šíření viru HIV a zničujícím klinickým důsledkům nemoci AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného imunodeficitu) lze nejučinněji předcházet aktivní imunizací, tj. očkováním. Důležitost dostupnosti protektivní vakcíny proti HIV infekci byla vyjádřena, mimo jiné, na plenárním zasedání Světové konference o AIDS v Torontu, roku 2006, kde bylo vysloveno sdělení: „Prevence je stále nejlepší strategií v boji proti AIDS, neboť na rozdíl od terapie, nemá žádné vedlejší účinky!“ [1].

Přesto, i přes závažnost onemocnění AIDS a skutečnost, že je tomu téměř třicet let od objevení původce onemocnění, doposud není protektivní vakcína proti tomuto velice závažnému a smrtelnému virovému onemocnění dostupná [2].

Syndrom získaného imunodeficitu byl poprvé popsán u homosexuálního muže v San Franciscu a nazván jako „syndrom imunitní deficience spojený s homosexuály“ (GRID, gay-related immune deficiency syndrome). V roce 1981 byla nemoc přejmenována na AIDS a bylo popsáno a publikováno několik typických příznaků nemoci. V průběhu dvou let po objevu AIDS byl izolován virus v laboratoři vědeckého týmu Luc Montagniera od osoby s lymfadenopatií, a byl nazván LAV virem (lymphadenopathy – associated virus). Další dvě skupiny oznámily izolaci retroviru od pacienta s AIDS, první nazvala virus jako HTLV III a druhá popsala podobu s LAV. V roce 1986 byly tyto viry přejmenovány na lidský imunodeficitní virus HIV (human immunodeficiency virus) [3].

Tato bakalářská práce se zabývá dlouhodobě aktuální problematikou HIV vakcín, biologií HIV infekce a obsahuje shrnující vědomosti týkající se imunologických vlastností HIV viru a jejich důsledky pro vývoj vakcín. Dále jsou v této práci zmíněny kandidátní HIV vakcíny, klinické studie těchto vakcín a jejich hodnocení.

Cílem této práce je přehledně přiblížit a sumarizovat dostupné informace týkající se uvedené problematiky. Primárním cílem této práce není podrobně se věnovat všem proběhlým a probíhajícím preklinickým a klinickým studiím a kandidátním vakcínám, neboť řada informací je dostupná v nedostatečné míře a tato práce by svým rozsahem výrazně přesahovala podobu bakalářské práce.

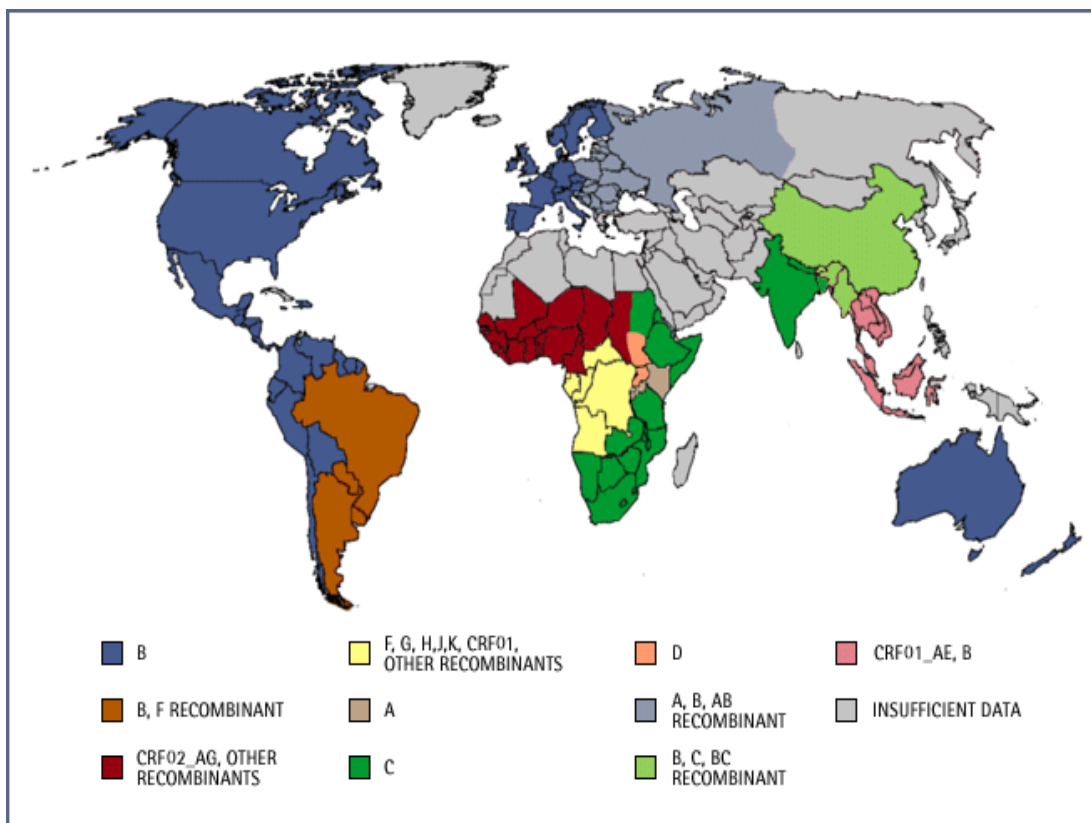
2. Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human immunodeficiency virus) – HIV

2.1 Základy virologie a imunologie viru lidské imunitní nedostatečnosti

HIV virus je obaleným RNA virem, patřícím dle Baltimorské klasifikace virů do skupiny VI (ssRNA viry s reverzní transkriptázou), do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretroviridae*, rodu *Lentivirus*. HIV virus je dále dělen na typ HIV-1 a HIV-2 [4].

Typ HIV-1 je klasifikován do tří skupin založených na sekvencích genů *gag* a *env*: skupina O (outlier – odlehlá), M (main – hlavní) a N (non O/ non M). Skupina M je převažující a odpovědná za pandemii a je dále rozdělena na devět rozdílných subtypů: A až D, F až H, J a K. Různé subtypy se nachází v různých částech světa (Obrázek č. 1) [5]. Virus HIV je stejně jako všechny retroviry diploidní – každá virová částice obsahuje dva řetězce RNA schopné replikace. Pokud infikovaná buňka přijme současně dva rozdílné proviry, může být z každého proviru převzata jedna RNA a vznikne heterozygotní virion. Tento nově vzniklý virion infikuje další buňku a nově syntetizovaná retrovirová sekvence DNA je rekombinantní [6].

HIV-2 byl poprvé izolován od pacientů s AIDS z Východní Afriky. Infekce HIV-2 virem, která převládá v zemích Východní Afriky, je spojena s pomalejším sexuálním rozšiřováním a sníženou rychlostí rozvoje onemocnění, v porovnání s HIV-1 infekcí. Důvod pomalejšího rozvoje zůstává neznámý [7]. Bylo popsáno šest subtypů HIV-2, převládají hlavně subtypy A a B [8].

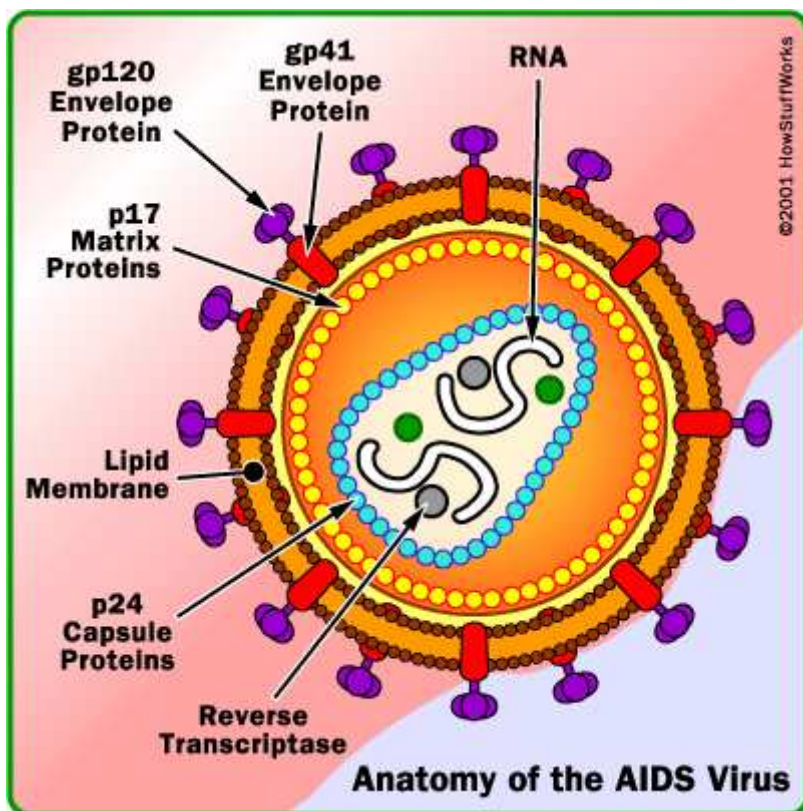


Obrázek č. 1: Geografická distribuce subtypů viru HIV-1, datováno k roku 2003

Legenda: Recombinant – rekombinant; Other recombinants – ostatní rekombinanty; insufficient data – nedostatečnost dat

HIV – 1 Global Distribution, *Frontline: The age of AIDS*, 2003, převzato z: <http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html> [9].

Virová částice obaleného retroviru HIV má sférický tvar a v průměru velikost 10^{-4} milimetru. Jádro viru je tvořeno dvouspirálovou RNA a enzymy reverzní transkriptázou, integrázou a proteázou. V jádru je dále přítomen protein p7, tzv. „nukleokapsidový protein“. Mezi jádrem a obalem je přítomen protein p17, tzv. „matrix protein“. Celé jádro je pokryto proteinovým obalem složeným z proteinu p24 a p17. To vše je dále obklopeno obalem tvořeným lipidovou dvojrůstvou, do kterého jsou zanořeny glykoproteiny gp41 a gp120 (Obrázek č. 2) [10].



Obrázek č. 2: Struktura HIV viru

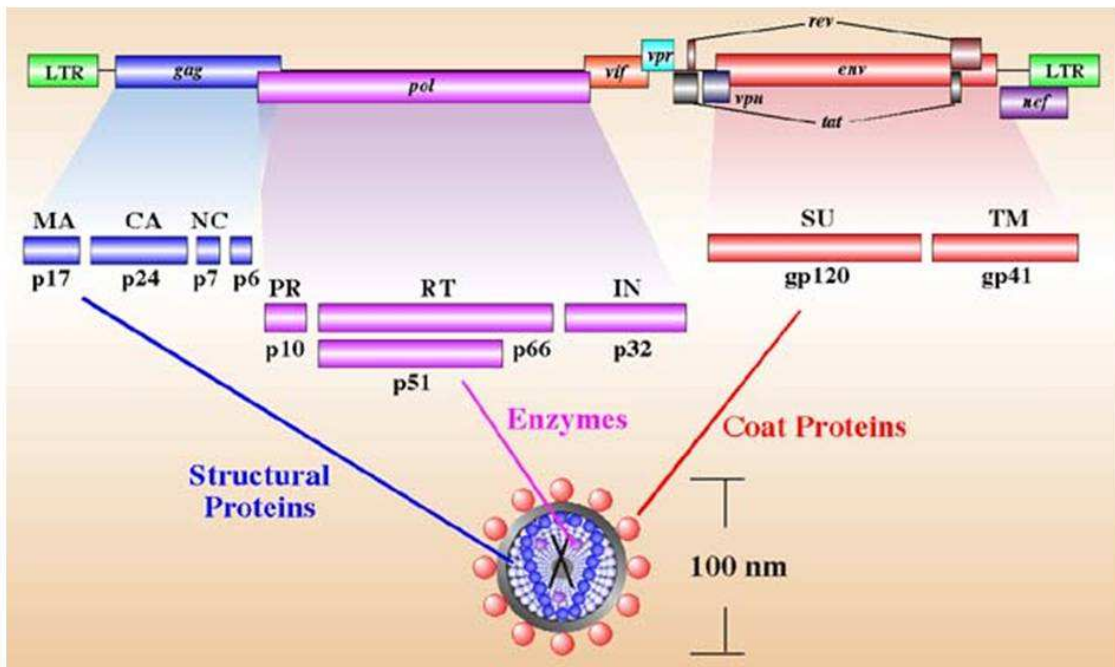
Legenda: Envelope protein – obalový protein; Capsule proteins – pouzderné proteiny; Lipid membrane – lipidová membrána; Matrix proteins- proteiny matrixu; Reverse transcriptase – reverzní transkriptáza; Anatomy of the AIDS Virus – anatomie viru AIDS

Anatomy of the AIDS Virus, How stuff works, převzato z: <http://static.howstuffworks.com/gif/aids-hiv-anatomy.gif> [11].

Genom viru HIV-1 se skládá ze dvou identických jednovláknových RNA, přičemž jedna je přibližně 9,2 kilobází dlouhá. Oba konce jsou ohraničeny opakujícími se sekvencemi nazývanými LTR (long terminal repeats). HIV geny jsou lokalizovány v centrální části provirové DNA a kódují minimálně devět proteinů. Tyto proteiny jsou rozděleny do tří tříd:

1. Hlavní strukturální proteiny: Gag, Pol a Env
2. Regulační proteiny: Tat a Rev

3. Doplnující proteiny: Vpu, Vpr, Vif a Nef (Vpx – pro HIV – 2). (Obrázek č. 3, Tabulka č. 1) [12].



Obrázek č. 3: Organizace genomu viru HIV-1

Legenda: LTR – Long terminal repeat, regulační region; geny: gag, pol, vif, vpr, vpu, tat, env, nef, rev; MA - matrix protein, matrixový protein; CA - capsid protein, kapsidový protein; NC – nucleocapsid protein, nukleokapsidový protein; PR – protease, proteáza; RT – reverse transcriptase, reverzní transkriptáza; IN – integrase, integráza; SU – surface unit, povrchová jednotka; TM - trans-membrane protein, transmembránový protein; structural proteins - strukturní proteiny; enzymes – enzymy, coat proteins – povrchové proteiny

Human Immunodeficiency virus (HIV), Genomic organization, Stanford University, převzato z:

<http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV-1b.jpg> [13].

Protein	Velikost (kDa)	Funkce
Tat	p14	transkripční aktivátor
Rev	p19	regulace exprese virové mRNA
Nef	p27	pleiotropní efekt, může zvýšit, nebo někdy snížit virovou replikaci
Vif	p23	zvyšuje virovou infektivitu a přenos z buňky do buňky
Vpr	p15	pomáhá virové replikaci; transaktivace
Vpu	p16	pomáhá uvolnění viru z infikovaných T-lymfocytů
Vpx	p15	pomáhá virové infektivě

Tabulka č. 1: Proteiny HIV a jejich funkce

J. A. LEVY, HIV Pathogenesis: Knowledge Gained after Two Decades of Research, Advances in Dental Research, 19 (1): 10-6, 2006 [3].

2.2 Přenos viru lidské imunitní nedostatečnosti a rizikové faktory

Virus HIV může být nalezen v různých koncentracích v krvi, spermatu, vaginálním sekretu, mateřském mléce, slinách a slzách. V slzách a slinách se nachází ve velmi nízkém množství a nejsou žádné informace o přenosu tímto způsobem. K nákaze HIV dochází hlavně sexuálním stykem s infikovaným člověkem, ale také vzájemným používáním jehel mezi narkomany. Zdravotníci mohou být infikováni poraněním jehlou s infikovanou krví. K nákaze transfuzí infikované krve nebo krevních derivátů dnes již téměř nedochází, protože dárci krve podléhají povinnému screeningu na HIV infekci [14].

Přenos HIV viru přes genitální a rektální trakt vedl k intenzivnímu studiu slizniční imunitní odpovědi na HIV a vývoji vakcíny podávané lokálně. Přenos přes intaktní sliznici dutiny ústní nebyl dokumentován. Zdá se, že sliznice dutiny ústní poskytuje protektivní typ imunity, který může být nadřazený dalším slizničním místům. Dutina ústní je zřídka místem přenosu HIV viru. Třebaže testy PCR vychází u HIV pozitivních osob pozitivní na přítomnost HIV RNA,

zřídka kdy vychází pozitivní kultivační test prokazující přítomnost infekčního viru [15].

Dále je tu velice důležitý přenos infekce z HIV pozitivní matky na dítě během těhotenství, porodu a kojení. Toto je hlavní způsob, jak mohou být děti infikovány HIV. Přenos může nastat prenatálně během těhotenství, perinatálně během porodu a postnatálně kojením. Při absenci specifických zásahů, se rodí přibližně 1/3 infikovaných dětí HIV pozitivním matkám. Tyto specifické zásahy, zahrnující prenatální HIV poradenství a testování, antiretrovirovou léčbu a vyvarování se kojení, mohou v rozvinutých zemích snížit přenos HIV z matky na dítě o přibližně 2 % . V mnoha rozvojových zemích samozřejmě toto poradenství není dostupné a jsou zde používány levnější a méně efektivní antivirotika [16]. Nicméně pokud se nedodrží správné zásady, nemusí k tomuto snížení dojít. Následným kojením se může zvýšit celkové riziko přenosu až o 15 – 25 % [17].

AIDS je známý svým daleko rychlejším vývojem u dětí než u dospělých. Mezi dětmi infikovanými HIV se buď před, nebo krátce po narození objeví přibližně během jednoho roku jeden ze čtyř projevů AIDS. Tento rychlý postup může být důsledkem rozdílného poměru T-lymfocytů u plodu a novorozenců ve srovnání s dospělými [18].

2.3 Klinické příznaky neléčené infekce vyvolané virem lidské imunitní nedostatečnosti

2.3.1 Primární infekce

Primární infekce je definována jako časové období mezi počátkem infekce HIV a tvorbou specifických protilátek. V přibližně 50 % případů zůstává primární infekce bez příznaků, zatímco u 50 % pacientů se vyvíjí příznaky

připomínající chřipku v prvních čtyřech týdnech po infekci. Během primární infekce je titr viru v periferní krvi extrémně vysoký – až 10^8 RNA kopií na jeden ml plazmy. Výrazně se snižuje počet CD4 T-lymfocytů. Nápor specifické buněčné imunitní odpovědi a následná syntéza HIV-1 specifických protilátek vede ke snížení plazmatické virové nálože a k přechodu do chronicity [19].

Symptomatická primární HIV infekce je charakterizována rozmanitými klinickými příznaky. Protože pacienti s primární infekcí produkují pouze protilátky proti HIV, rozpoznání příznaků u rizikových lidí může napovědět až průkaz specifických protilátek nebo průkaz přítomnosti virů v krevních vzorcích. Diagnostikování primární infekce může snížit další přenos HIV a umožnit zahájení časně léčby [20].

HIV infekce má zpočátku příznaky podobné mononukleóze. Hlavními příznaky primární HIV infekce jsou lymfocytopenické a neuropatické projevy. U pacientů se většinou projevuje onemocnění s prudkým nástupem, charakterizované horečkou, apatií, malátností, svalovými bolestmi, bolestí hlavy, krku a dalšími příznaky. Přibližně u 70 % nakažených se vyskytuje lymfadenopatie, hlavně v prvních týdnech onemocnění. Nejvíce jsou většinou postiženy lymfatické uzliny krční, v podpaží a zátylku. Byl popsán také výskyt atypických lymfocytů spolu s CD8 lymfocytózou, což se vyskytuje také u nemocných s infekční mononukleózou způsobenou virem Epstein-Barrové (EBV). Doba od nákazy HIV virem po nástup akutních klinických příznaků je většinou 2 - 4 týdny a onemocnění trvá 1 – 2 týdny. Sérologické testy na HIV a EBV dokáží určit přesnou diagnózu [21]. Průkaz HIV-1 protilátek je v časně fázi infekce nesměrodatné (v důsledku sérologického okna), diagnostikování nemoci je závislé pouze na průkazu virového antigenu p24, nebo na průkazu HIV-1 RNA. Testy na průkaz virového antigenu p24 mají lepší specifitu a jsou levnější, sensitivity těchto testů má ale určité hranice. Oproti tomu testy na průkaz HIV-1 RNA jsou více sensitivní, dávají ale více falešně pozitivních výsledků a jsou dražší. Rozpoznání primární HIV infekce je velmi důležité.

Specifické CD4 T-lymfocyty, které nejlépe odpovídají na HIV jsou ničeny virem a tím dochází k neustálému poškozování schopnosti imunitního systému kontrolovat infekci. Antiretrovirová léčba v této fázi infekce nabízí jedinečnou možnost ochránit imunitní systém [22].

Neléčená HIV infekce u lidí je charakterizovaná značným úbytkem skupiny CD4 T-lymfocytů. V akutní fázi virus přednostně a účinně napadá HIV specifické a paměťové CD4 T-lymfocyty, které se vyskytují ve slizničních tkáních. Studie makaků infikovaných SIV infekcí ukazují vydatné ztráty paměťových CD4 T-lymfocytů ve střevě, což zahrnuje většinu celkového množství tělesných CD4 T-lymfocytů. Studie HIV infikovaných lidí rovněž potvrzují toto pozorování. Následně za tímto velkým systémovým útokem, neléčené onemocnění vstoupí do chronické fáze, ve které jsou zbylé CD4 T-lymfocyty pomalu odbourávány v časovém měřítku až několika let. Co způsobuje tyto pomalé ztráty není jasné [23].

2.3.2 Chronická infekce

Po akutní fázi HIV infekce nastupuje chronická fáze. V případě, že není nastolena léčba, trvá toto období v průměru okolo deseti let [24]. Chronická fáze je klinicky latentní, tj. bez příznaků. Přesto, každý den dochází k produkci bilionu virových částic. Během této periody dochází také k progresivní ztrátě CD4 T-lymfocytů. V tomto období dochází v průměru ke ztrátě 50-90 CD4 T-lymfocytů/ μ l krve každý rok [25].

Doposud není objasněný molekulární mechanismus který ovlivňuje, zda dojde k přerušení nebo k pokračování replikačního cyklu. Jsou známy dvě formy latence HIV-1, labilní preintegrační forma a stabilní postintegrační forma. HIV-1 latence se objevuje během HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy – vysoce aktivní antiretrovirová terapie), která účinně redukuje virémii v plazmě k nedekovatelným hodnotám. V současnosti reprezentuje HIV-1 latence hlavní bariéru při virové eradikaci [19].

V této fázi infekce nemají jedinci s HIV virem v těle téměř žádné příznaky. Toto období trvá od několika let po desetiletí. Virová replikace v tomto období stále pokračuje a nadále funguje rázná a účinná imunitní odpověď proti viru. Při neléčené infekci je v tomto období stálá virová nálož v plazmě a dochází k neustálému snižování počtu CD4 T-lymfocytů. Nejvhodnější je, pokud je antiretrovirová léčba zahájena v počátcích tohoto období. Pokud je tato léčba zahájena později, dochází k nižší odpovědi na terapii a k menší obnově imunity [26].

2.3.3 Klinický syndrom získaného imunodeficitu

Poslední stadium HIV infekce je manifestní AIDS (acquired immunodeficiency syndrome, syndrom získaného imunodeficitu), v současné době neodvratně smrtelné. U pacienta se objevují některé infekce typické pro AIDS – jedná se o oportunní infekce (objevující se při imunitním oslabení organismu). Velmi časté jsou infekce vyvolané běžnými patogeny, dále nádory (např. Kaposiho sarkom a primární lymfom mozku), kožní a anorektální karcinomy. Asi 60 % pacientů trpí HIV encefalopatií, která vzniká přímým působením HIV na centrální nervovou soustavu (může se projevit demencí, poruchami paměti a soustředění, depresemi). Z hematologického hlediska se vyskytuje lymfopenie a trombocytopenie [27].

Definice AIDS v CDC centru (Centres for Disease Control and Prevention) z roku 1986 a revidovaná v roce 1993 je založena na určitých klinických příznacích, infekcích a malignitách spojených s HIV infekcí. Zároveň může být AIDS definován poklesem CD4 T-lymfocytů pod 200/μl nebo <14% ze všech lymfocytů i při absenci uvedených příznaků. V této nové klasifikaci CDC centra jsou jedinci rozděleni do tří kategorií: kategorie A zahrnuje pacienty s asymptomatickou HIV infekcí, dlouhotrvající celkovou lymfadenopatií a akutní (primární) HIV infekcí. Kategorie B se skládá z pacientů majících symptomatická kritéria nespádajících pod AIDS, ale majících předpoklad

imunodeficiencie. A lidé, kteří mají počet CD4 T-lymfocytů menší než 200/μl, nebo mají jakoukoliv nemoc, uvedenou v seznamu CDC centra, spadají do kategorie C. Tato nová klasifikace je více objektivní a pokud bude užívána mezinárodně, může nabídnout lepší porovnávání studia a léčby HIV infikovaných lidí [28].

3. Imunitní systém a virus lidské imunitní nedostatečnosti

V průběhu HIV onemocnění sehrává úlohu komplexní soustava mnohofaktoriálních imunopatogenetických mechanismů. Po primární infekci dochází k rozsáhlé diseminaci viru v organismu hostitele, především v lymfatické tkáni. Během časně viremické fáze je virus polapený folikulárními dendritickými buňkami v lymfoidních tkáních. Viry zachycené těmito buňkami se stávají zdrojem infekce pro CD4 T-lymfocyty, které jsou lokalizovány v lymfatické tkáni, nebo jí migrují [29].

Nástup prudké imunitní odezvy vede ke znatelnému snížení počtu virových částic v krvi [30]. Až na výjimky, virus je kompletně eliminován z těla a nastupuje fáze chronické perzistentní virové replikace. Tento přechod z akutní do chronické fáze s perzistentní replikací je naprosto unikátní mezi virovými infekcemi u lidí (u ostatních virových infekcí dochází po krátké době k usmrcení hostitele, likvidaci virové zátěže, nebo k přechodu do latentní fáze).

Pozoruhodným rysem HIV infekce je typický trvalý pokles CD4 T-lymfocytů v periferní krvi. V neposlední řadě k nedostatku těchto buněk přispívá také infekce progenitorových buněk kostní dřeně a infekce thymu, která vede k nedostatečné obnově počtu imunokompetentních buněk. U některých nemocných také dochází k velkému zvýšení skupiny CD8 T-lymfocytů. Toto zvýšení je projevem imunitní odpovědi na HIV, které je důležité pro kontrolu průběhu HIV infekce [31].

Proces interakce HIV a složek imunitního systému je velice komplikovaný. Význam různých imunitních pochodů vedoucích ke kontrole této

infekce je objasněn jen částečně. I když mezi infikovanými osobami jsou značné rozdíly ve virové náloži a imunitními reakcemi, první známkou HIV specifické imunitní reakce je vzestup HIV-specifických CD8 T-lymfocytů. Efekt protilátkové reakce je snižován rychlými genetickými změnami proteinového virového obalu, které umožňují viru uniknout detekci a současně inhibici cirkulujícími protilátkami.

Po dosažení rovnovážného stavu, CD8 T-lymfocyty stále snižují hladinu HIV, ale jejich účinnost postupně klesá. Navození „rovnovážného stavu“ je ve skupině neléčených osob předzvěstí dalšího průběhu nemoci.

Zvláštností infekce HIV je, že už na počátku infekce vzniká skupina latentně infikovaných, klidových CD4 T-lymfocytů.

V podstatě u všech pacientů dojde k trvalé infekci, která zpravidla neúprosně pokračuje, ač v celém průběhu nákazy je infikovaná jen malá část vnímavých buněk.

Ve skutečnosti nikdy nedojde u infikované osoby k vymizení HIV z těla. Ani po dlouhodobé antiretrovirové terapii, která sníží virémii pod prokazatelnou hladinu (méně než 50 kopií RNA/ml), není infekce HIV eradikovaná. Tuto perzistenci viru dokazuje trvalé obnovování počtu HIV infikovaných buněk. Krátká doba, ve které je možné eradikovat HIV a zabránit vzniku perzistentní infekce, končí vznikem skupiny latentně infikovaných buněk. Tento jev infekce HIV je zcela odlišný od téměř všech jiných virových infekcí, u nichž počáteční replikace nevede ke vzniku trvalého ložiska infekce.

Klasický vývoj vakcinace proti HIV je tedy velkým problémem. Obvykle má očkování chránit před onemocněním, má vést k eradikaci mikroba, i když proběhnou počáteční kroky replikace viru [32].

3.1 Buněčná imunita v kontrole infekce virem lidské imunitní nedostatečnosti

Buněčná imunitní odpověď je především zprostředkována pomocí cytotoxických T-lymfocytů (CTL), buněk majících na svém povrchu CD8 znak a pomocných T-lymfocytů (buňky s povrchovým CD4 znakem).

3.1.1 CD8 T-lymfocyty

HIV-1 specifické CD8 T-lymfocyty sehrávají klíčovou roli v kontrole replikace HIV-1 viru. Význam této ochranné funkce je podpořen řadou studií, které soustřeďují pozornost na HIV infikované osoby, vliv deplece v T-lymfocytární populaci a na SIV infikované opice makak rhesus. Anti-HIV CTL buněčná odpověď je zaměřena na omezený počet epitopů, i když počet potencionálních epitopů je vysoký. Některé epitopy vzbuzují silnou imunodominantní odpověď, některé slabou, subdominantní, sotva detekovatelnou odpověď a další jsou prokazatelné pouze při absenci dominantních epitopů. Imunodominance v antivirové imunitní odpovědi vychází z kombinace faktorů které zahrnují: schopnost zpracování a prezentace antigenu, stabilitu a počet komplexů peptid-MHC a vhodný repertoár TCR receptorů na T-lymfocytech. Je zde předpoklad, že imunitní odpověď může ovlivňovat i podobnost mezi HIV a lidskými proteiny, respektive mezi virovými peptidy a peptidy hostitele. Tato podobnost by ve výsledku omezila reaktivitu CTL na určité virové epitopy. Imunitní odezva CTL by mohla být optimalizována překonáním těchto imunodominantních vzorů [33].

CTL inhibují HIV replikaci jak přímo, rozpoznáním a zabitím infikovaných buněk, tak nepřímo, produkcí rozpustných chemokinových antivirových faktorů. Zabíjení infikovaných buněk virem pomocí CTL nastává přímým kontaktem, kterým povrchové receptory T-lymfocytů rozpoznávají epitopy HIV proteinu navázaného na hlavní histokompatibilní komplex třídy I (MHC I) na povrchu

infikovaných hostitelských buněk. Po této interakci CTL uvolňuje enzymy, které zabíjí infikované buňky [34]. Pokud CTL reagují přímo proti určitým epitopům Gag proteinu, onemocnění postupuje pomaleji, než když reagují s ostatními epitopy. Kromě toho, CTL také po vazbě na HIV-1 virem infikované buňky uvolňují antivirové rozpustné faktory, jako jsou molekuly RANTES (označované za HIV imunosupresivní faktor) [35], MIP-1-alfa a MIP-1-beta (macrophage inflammatory protein; tyto proteiny jsou označovány za hlavní HIV imunosupresivní faktor). Tyto rozpustné faktory inhibují vstup viru do hostitelské buňky tím, že se váží na CCR5, koreceptor důležitý pro vstup HIV viru do buňky [36].

Po počáteční infekci dochází k rychlému vzniku specifické buněčné imunitní odpovědi, zprostředkované CD8 cytotoxickými T-lymfocyty (CTL), která má za následek prudký a spontánní pokles virémie HIV. Je více mechanismů prostřednictvím kterých CTL mohou inhibovat replikaci HIV viru v hostitelské buňce. Jeden z nejzásadnějších mechanismů spočívá ve vazbě specifického receptoru těchto buněk (TCR) na virové peptidy prezentované povrchovými molekulami HLA na povrchu antigen prezentujících buněk (APC). CD8 T-lymfocyty po vazbě působí cytolyticky na cílové APC buňky, které jsou zdrojem virionů [37].

Navzdory poměrně vysokému výskytu HIV specifických CD8 T-lymfocytů u jedinců infikovaných HIV je zřídka dosaženo trvalého potlačení virové replikace. Důvod je především ten, že dochází k vývoji virové únikové mutace, která umožňuje infikovaným buňkám uniknout před CTL [38]. U HIV-1 infekce také dochází k poškozování funkční aktivity CD8 T-lymfocytů během vývoje z raného do chronického stádia infekce. Toto funkční poškozování je považováno za jeden z hlavních důvodů neschopnosti hostitele se „očistit“ od perzistující virové infekce [39]. CD8 T-lymfocyty mohou být dysfunkční např. sníženou lytickou aktivitou, slabou proliferační funkcí a sníženou expresí klíčových signálních molekul zprostředkovávající aktivaci TCR. To může být následek trvalé expozice velkému množství virových antigenů, či přímého ohrožení virovými toxickými produkty, nebo to může mít souvislost s nedostatkem CD4 T-lymfocytů [40].

Další faktor, který významně ovlivňuje průběh HIV infekce je genetika hostitele [19].

3.1.2 CD4 T-lymfocyty

Charakteristickým rysem HIV infekce je ztráta CD4 T-lymfocytů v periferní krvi, lymfoidních orgánech a slizničních tkáních. Protože CD4 T-lymfocyty hrají hlavní roli v imunitní ochraně proti téměř všem patogenům, HIV pozitivní pacienti jsou vystaveni různým oportunním infekcím. Navzdory desetiletí intenzivního výzkumu, mechanismus zásadního úbytku CD4 T-lymfocytů zůstává stále v debatách [41].

Zjevný důvod imunitního defektu u HIV je pokles CD4 T-lymfocytů, proto stanovení počtu těchto buněk je nejdůležitější laboratorní ukazatel postupu onemocnění. Střední počet CD4 T-lymfocytů klesá z normální hodnoty okolo 1000 buněk/ μ l krve na množství 200 buněk/ μ l krve, což je množství definující nemoc AIDS. Rozlišujeme tři skupiny HIV infikovaných lidí: přenašeč, HIV pozitivní bez AIDS a lidé diagnostikovaní s AIDS. Po počáteční infekci dochází v prvních měsících ke snížení CD4 T-lymfocytů o 200-300 buněk/ μ l krve, poté se klesání sníží na přibližně 50 – 90 buněk za rok [25].

3.1.3 B-lymfocyty

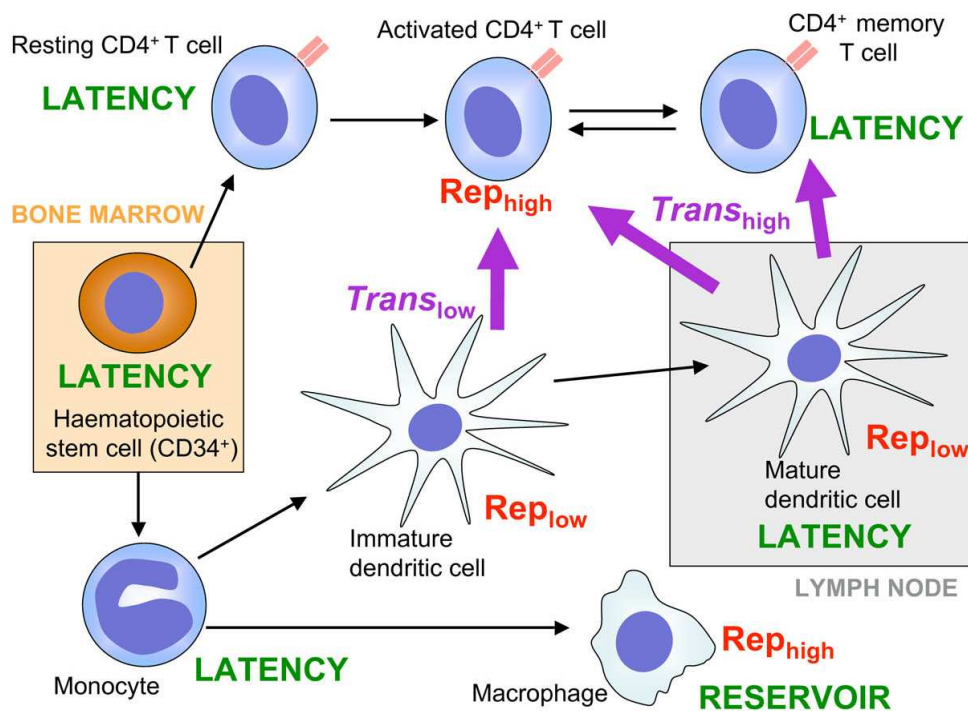
HIV onemocnění je spojeno s abnormalitami všech populací lymfocytů, včetně B-lymfocytů. Stálá HIV replikace je spojena se zvýšenou imunitní aktivací, která je patrná také u B-lymfocytů jako hypergamaglobulinémie, polyklonální B-lymfocytární aktivace, spuštění terminální diferenciací B-lymfocytů, zvýšené množství autoprotilátek a vyšší frekvence B-lymfocytárních malignit. CD4 T-lymfocytární lymfopenie a zvýšená hladina IL-7 v séru u HIV infikovaných lidí s pokročilým onemocněním je spojena

s výskytem nezralých B-lymfocytů. Je zde také spojitost s úbytkem CD27 paměťových B-lymfocytů. Celkový efekt neléčené HIV infekce na populaci B-lymfocytů se projevuje sníženou schopností proliferace, sníženou reakcí na nové antigeny a sníženou schopností vytvářet antigen specifické paměťové B-lymfocyty [42].

3.1.4 Dendritické buňky

Klíčovými hráči ve vytváření imunitní odpovědi jsou dendritické buňky (DC). Většina těchto buněk exprimuje na svém povrchu molekuly DC - SIGN, což jsou molekuly lektinové rodiny typu C, které mohou zachytit HIV přes jeho Env protein. Vazba následně vede k proniknutí viru do dendritických buněk, k destrukci viru (a prezentaci antigenu MHC molekulami) nebo k infekci těchto buněk. Infekce zralých DC buněk vede k nízkému stupni produkce viru. Infikovaná DC buňka produkující virové částice je zdrojem infekce pro CD4 T-lymfocyt v rámci procesu tzv. „*cis*-infekce“. Dále může dojít k infekci CD4 T-lymfocytů přenosem viru z dendritických buněk v rámci procesu zvaného „*trans*-infekce“. V rámci tohoto procesu není DC sama o sobě infikována. Trans-infekce spočívá v přenosu celé virové částice (virionu) z DC do CD4 T-lymfocytů prostřednictvím tzv. „virové synapse“, tj. přenos je zajištěn po přímé interakci CD4 T-lymfocytu s DC. Dendritické buňky pak působí jako „Trojský kůň“ v přenášení virů do aktivovaných T-lymfocytů [43, 44].

Dalším rezervoárem latentních virů jsou paměťové CD4 T-lymfocyty, monocyty, či makrofágy v lymfatických uzlinách (Obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Buněčný rezervoár HIV viru – lokace míst virové replikace a latence

Legenda: resting $CD4^+$ T cell – klidový $CD4$ T-lymfocyt; activated $CD4^+$ T cell – aktivovaný $CD4$ T-lymfocyt; $CD4^+$ memory cell – $CD4$ paměťová buňka; LATENCY – latence; Rep_{high} – vysoký replikační obrat HIV; Rep_{low} – nízký replikační obrat HIV; BONE MARROW – kostní dřeň; Haematopoietic stem cell ($CD34^+$) – hematopoetická pluripotentní kmenová buňka; monocyte – monocyt; macrophage – makrofág; Immature dendritic cell – nevyzrálá dendritická buňka; Mature dendritic cell – vyzrálá dendritická buňka; LYMPH NODE – lymfatická uzlina; $Trans_{low}$ – nízký obrat trans-infekce; $Trans_{high}$ – vysoký obrat trans-infekce

C. M. COLEMAN, L. WU, HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs, *Retrovirology*, 1, 2009 [44].

3.2 Humorální imunitní odpověď

Akutní fáze infekce vyvolaná virem HIV je spojena s ostrou imunitní odpovědí na HIV antigeny. Ačkoliv dochází k indukci tvorby vysoké hladiny neutralizačních protilátek, virová inhibiční aktivita těchto protilátek není silná. Příčinou toho, že dochází k rychlé virové rezistenci na neutralizační aktivitu těchto protilátek, je nahrazení senzitivních virů populací virů rezistentních. U virů rezistentních, tj. unikajících imunitnímu dozoru zprostředkovanému neutralizačními protilátkami, dochází k mutacím v *env* genu, které primárně vedou ke změnám v N-vázané glykosylaci, k tvorbě „glykanového štítu“ na obalu viru. Tento glykanový štít zabraňuje vazbě neutralizačních protilátek, ale neomezuje vazbu viru na receptory hostitelských buněk. [45].

Zdá se, že příspěvek specifické humorální imunitní odpovědi sehrává minoritní roli v kontrole HIV-1 infekce. Vazba neutralizujících protilátek na virové částice zprostředkovává inkorporaci a destrukci virionu fagocyty. Antivirová aktivita neutralizujících protilátek proti HIV-1 gp120 je často také přemožena kompletním přemístěním citlivého viru, nebo mutací vedoucí k získání konformačních změn v gp120 [46].

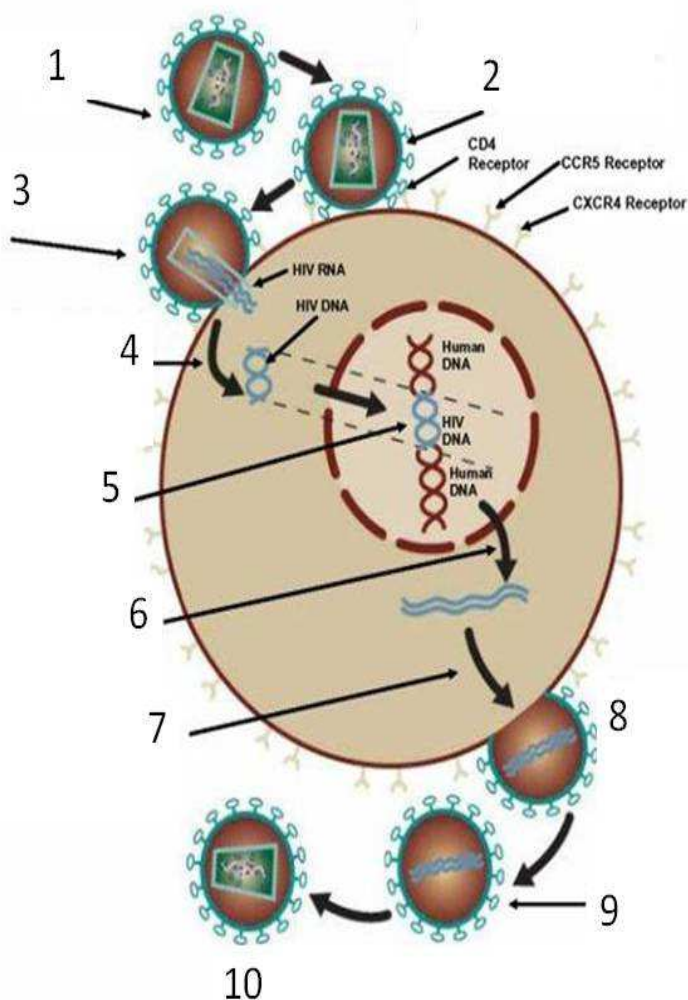
HIV-1 povrchové glykoproteiny jsou prezentovány jako trimery gp120 a gp41 na povrchu infekčních virových částic. Volné glykoproteiny gp120 mohou být rozděleny do tří antigenních podob: neutralizační, tichá a non-neutralizační. Neutralizační povrch váže většinu známých neutralizačních protilátek, zatímco non-neutralizační tvář gp120 je rozpoznávána protilátkami, které se váží na epitopy gp120, jež nejsou odkryté v souvislosti s funkčním trimerem. Tichá podoba gp120 je složena z V4 a V5 variabilních determinant, které jsou silně glykosylovány a tudíž jsou slabě imunogenní [47].

4. Vstup viru HIV do hostitelské buňky

Porozumění patogenezi HIV infekce je nezbytné nejen pro vývoj antiretrovirotik, ale i pro konstrukci vakcín.

Vstup HIV do hostitelské buňky začíná navázáním virové částice (virionu) na buněčný povrch hostitelské buňky. Interakce je zprostředkována kontaktem extracelulární domény proteinu gp120 a receptoru hostitelské buňky, povrchové molekuly CD4 [48]. Počáteční vazba na CD4 odhaluje další část *Env* trimeru, který se potom váže na koreceptor, obvykle je to chemokinový receptor CXCR4 nebo CCR5 (Obrázek č.5) [49]. Tato koreceptorová vazba způsobuje, že se trimer gp41 otevře a „nabodne“ lipidovou dvojvrstvu membrány cílové buňky. Poté se vlásenkovitá doména gp41 svine dohromady, aby spojila virus a membránu buňky a tím drží obě částice pohromadě a umožňuje následnou fúzi viru. Virus obsahuje kopie virového genetického materiálu a Pol proteiny (reverzní transkriptázu), které prostupují cytoplazmatickou membránou hostitelských buněk (Obrázek č.6). Reverzní transkripce je kopírování virového genetického materiálu z RNA do DNA [50]. Preintegrační komplex (PIC), složený z kopie DNA (cDNA) a množství virových a hostitelských proteinů potom prostoupí do jádra cílové buňky, kde virový enzym integráza zprostředkuje vložení cDNA do hostitelské DNA [51]. Výsledný integrovaný DNA virus (zvaný také provirus, jako odlišení od virionu) může zůstat skrytý hodiny až roky než dojde k transkripci (přepis DNA na RNA) [52]. Transkripce virového genomu je pod komplexní kontrolou proteinů, zahrnující Tat a buněčné DNA transkripční faktory [53]. Transport přepsané virové RNA z jádra závisí na počtu hostitelských a virových součástí, včetně Rev. Přepsaná virová RNA může být transportovaná z jádra v jeho celé délce, a slouží jako genetický materiál pro nové viriony, nebo může být částečně nebo plně stočená. Nestočená, částečně nebo plně stočená varianta virové RNA řídí syntézu různých virových proteinů v buněčných ribozomech. Nové virové částice jsou shromážděny v plazmatické membráně a zahrnují Gag podjednotky, Pol, Nef, Env, Vpr a virovou RNA [54]. HIV proteáza štěpí virové proteiny do funkčních

strukturálních a enzymatických částí. Gag protein působí na pučení vyzrálých virionů z plazmatické membrány a Nef protein podporuje replikaci v buněčném okolí tím, že inhibuje imunologickou odpověď buňky na HIV a zabraňuje smrti infikované buňky apoptózou. [55].

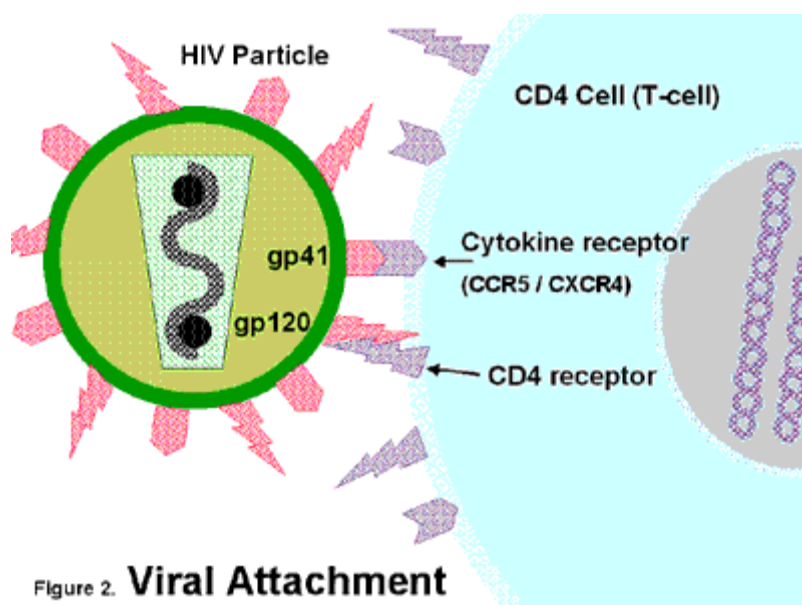


Obrázek č. 5: Replikační cyklus viru HIV

Legenda: 1 – volný virus; 2 – Vazba a fúze viru: virus se váže na CD4 molekulu a na jeden ze dvou koreceptorů (buď CCR5 nebo CXCR4), molekuly receptoru jsou běžně na buněčném povrchu hostitelské buňky, poté virus fúzuje s hostitelskou buňkou; 3 – Infekce: Virus penetruje do hostitelské buňky, obsah je vyloučen do buňky; 4 – Reverzní transkripce: jednovláknová virová RNA je konvertována do dvojitě vláknové DNA prostřednictvím enzymu, reverzní transkriptázy; 5 – Integrace: virová DNA je kombinována s DNA hostitelské

buňky pomocí integrázy; 6 – Transkripce: Jakmile se infikovaná buňka dělí, virová DNA je „přečtena“ a vytvoří se dlouhý řetězec proteinů; 7 – Sestavení proteinových řetězců; 8 – Pučení: nevyzrálý virus je uvolněn z buňky, dochází k obalení viru částí buněčné membrány hostitelské buňky; 9 – Nevyzrálý virus je uvolňován z hostitelské buňky; Maturace: proteinové řetězce v nové virové částici jsou sestříhány proteázou do individuálních proteinů

HIV replication, IRSC Faculty Departments, převzato z: <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/images/HIV%20replication.jpg> [56].



Obrázek č. 6: Přichycení viru HIV k hostitelské buňce, CD4 T-lymfocytu
 Legenda: HIV Particle – HIV částice; CD4 Cell (T-Cell) – CD4 buňka (T-lymfocyt); Cytokine receptor – cytokinový receptor; CCR5 – C-C chemokinový receptor typu 5; CXCR4 - CXC chemokinový receptor typu 4; gp41 – glykoprotein o molekulové hmotnosti 41 kDa; gp120 – glykoprotein o molekulové hmotnosti 120 kDa

D. PIERIBONE, *The HIV Life Cycle*, Acria – AIDS Community Research Initiative of America, 12(1), 2002/2003, převzato z: <http://www.thebody.com/content/art14193.html> [57].

5. Rozdělení vakcín

Vědci používají mnoho postupů k vytvoření vakcín proti mikrobům. Tento výběr většinou vychází ze základní informace o mikrobu, hlavně jakým způsobem dochází k patogenezi onemocnění a jak na to odpovídá imunitní systém.

Vakcíny jsou kategorizovány dle různých parametrů, rozlišují se například: vakcíny jednoduché, kombinované, celulórní, subjednotkové, konjugované, živé, inaktivované, DNA a rekombinantní vektorové vakcíny [58].

5.1 Živé celulórní vakcíny

Živé, oslabené vakcíny obsahují tzv. atenuované mikroorganismy, které byly zbaveny své patogenicity v laboratořích. Protože jsou tyto očkovací látky nejvíce podobné přirozené infekci, nejlépe „učí“ imunitní systém. Zajistí dostatečně silnou buněčnou a protilátkovou odpověď, takže často navodí dlouhodobou imunitu po podání pouhých dvou dávek. Nevýhodou těchto vakcín je, že mikrobi mají stále zachovanou možnost dělení, nebo mutací, takže se mohou zvrátit ve virulentní formu a způsobit onemocnění. Navíc lidé, kteří mají poškozený nebo oslabený imunitní systém, například protože podstoupili chemoterapii, nebo mají HIV infekci, nemohou být touto vakcínou očkováni. V dnešní době, vzhledem k porozumění imunologických vlastností a možnostem využití molekulárně-biologických technik, lze vytvořit bezpečnější živé, atenuované vakcíny [59].

5.2 Inaktivované celulórní vakcíny

Inaktivované očkovací látky jsou vytvořené usmrcením mikroba, způsobujícího onemocnění, chemikáliemi, teplem, nebo radiací. Tyto vakcíny jsou stabilnější a bezpečnější, než očkovací látky obsahující živé, atenuované

mikroby. Mrtví mikrobi nemohou podlehnout mutacím, které by mohly opět způsobit onemocnění. Navíc nevyžadují uchovávání v chladnu a mohou být lehce transportovány v lyofilizované formě, čímž se stávají přístupné pro lidi v rozvojových zemích. Většina inaktivovaných vakcín ale stimuluje slabší imunitní odpověď než živé vakcíny, tudíž je nutné buď zvýšení koncentrace imunogenu v očkovací látce, nebo je potřeba podávat více imunizačních dávek, aby byla zajištěna dostatečná imunita. Toto je nevýhoda v oblastech, kde lidé nemají pravidelný přístup do zdravotnického střediska a nemohou proto získat podporující dávku včas. Většina těchto vakcín se proto připravuje s minerálním nosičem, který zvyšuje poločas retence imunogenu a tím zvyšuje imunitní odpověď [58].

5.3 Subjednotkové (acelulární) vakcíny

Místo celého mikroba, obsahují tyto vakcíny pouze antigeny, které nejlépe stimulují imunitní systém. V některých případech mohou být použity pouze velmi specifické části antigenu – epitopy – které jsou rozpoznávány specifickými protilátkami nebo T-lymfocyty. Protože obsahují pouze jeden základní antigen a ne další molekuly, možnost nežádoucí reakce se tím snižuje. Tyto vakcíny se mohou skládat z jednoho až dvaceti, ale i více antigenů. Samozřejmě identifikace, který antigen nejlépe stimuluje imunitní systém, je složitý, čas zabírající proces.

Vědci využívají dva způsoby přípravy. Jednak mohou kultivovat mikroby v laboratoři a poté použít chemikálie a získat tím důležité antigeny, nebo vyrobí antigenní molekuly z mikrobů použitím rekombinantní DNA technologie. Vakcíny vyrobené druhým způsobem jsou označovány jako „rekombinantní podjednotkové vakcíny“.

Antigeny jsou se obvykle adsorbovány na biologické vektory, aby se zvýšil jejich retenční poločas. Vektor většinou působí na buněčné membrány imunitních buněk a tím přispívá k imunizaci, aktivuje produkci některých

cytokinů, přepravuje imunizující složky do cytosolu hostitelské buňky a stimuluje obvykle CD4 T-lymfocyty [58].

Mezi subjednotkové (acelulární) vakcíny lze zařadit všechny vakcíny, které neobsahují celý mikroorganismus, ale pouze jeho část, či části jako jsou např. konjugované vakcíny, epitopové vakcíny či DNA vakcíny.

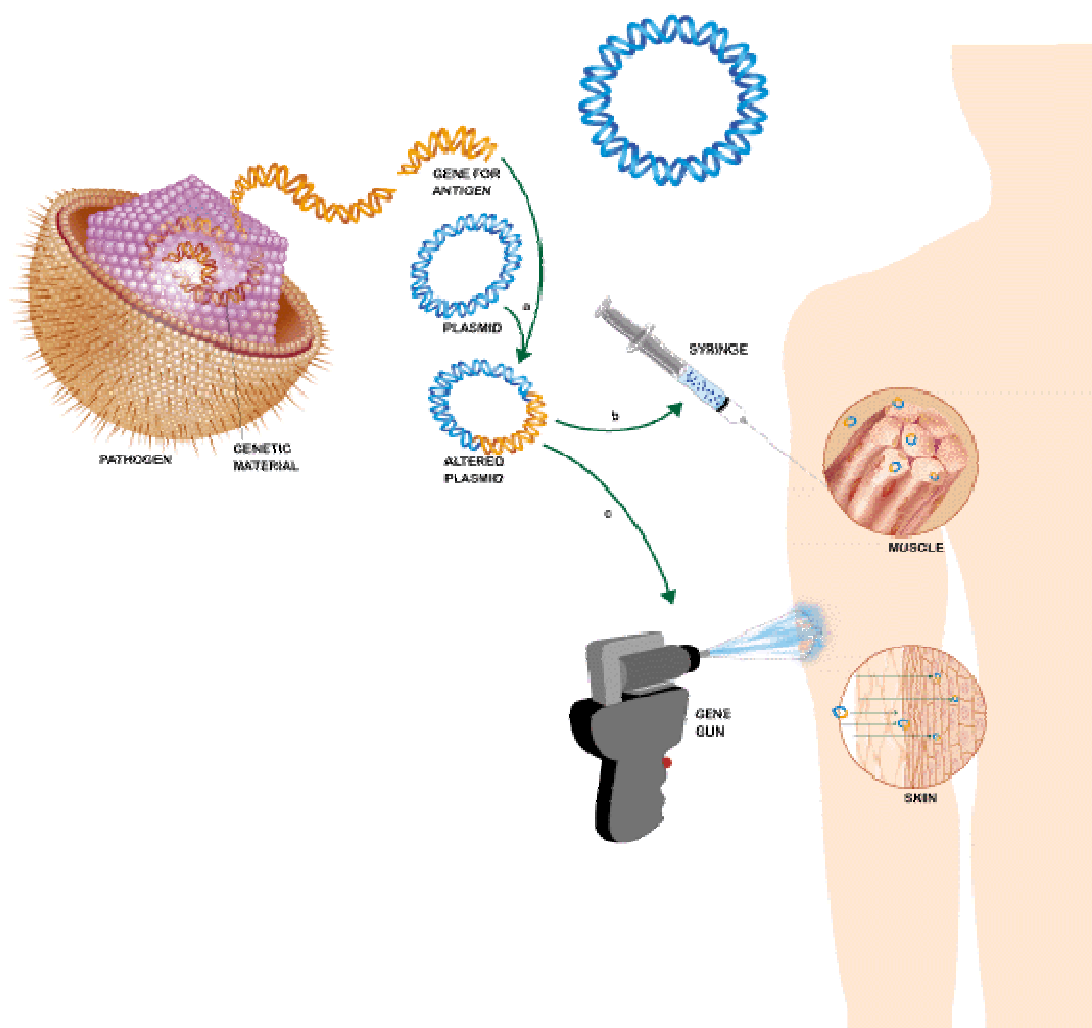
5.3.1 Konjugované vakcíny

Konstrukce tohoto typu vakcíny se využívá v případě, že protektivní imunogen je polysacharid, nebo polypeptid a sám o sobě se chová jako haptén (nevyvolává dostatečnou imunitní odpověď). Protektivní imunogen je tedy konjugován (vázan) na nosič, kterým je nejčastěji protein (inaktivovaný bakteriální toxin). Tento „konjugát“ je již dostatečně imunogenní a indukuje imunitní T-lymfocytární odezvu. [60].

5.3.2 DNA plazmidové vakcíny

V nedávné době začaly být k dispozici vakcíny, které využívají „nahou“ DNA. DNA vakcíny se obvykle skládají z plazmidových vektorů (získaných z bakterií), které obsahují různorodé geny. Při optimalizaci účinnosti DNA vakcíny je velmi důležité vzít v úvahu výběr vhodného plazmidového vektoru [61]. Očkovací látky, které jsou vytvořené touto DNA technologií stimulují buněčně zprostředkovanou antigenně specifickou imunitu. Princip je takový, že z proteinů syntetizovaných v tělesných buňkách se tvoří peptidy, které se spojují s MHC molekulami I. třídy a jsou jimi prezentovány CD8 T-lymfocytům. Ve vakcíně je plazmid, který obsahuje konkrétní antigen, rozpuštěný v solném roztoku a injikovaný do čtyřhlavého svalu, případně do kůže (Obrázek č. 7). Svalové buňky adsorbují DNA a antigen v ní exprimovaný. Ten je zpracovaný v buňkách na malé fragmenty a jeho peptidy jsou vystaveny povrchovými buněčnými molekulami MHC I. Tento způsob prezentace antigenů je potřebný

pro stimulaci imunity zprostředkované T-lymfocyty. S DNA vakcínami je velmi snadná manipulace, jsou více stabilní a lépe se s nimi manipuluje než s purifikovanými proteiny. Různé proteiny vyžadují rozdílný způsob purifikace, ale tyto plazmidy, bez ohledu které sekvence kódují, jsou připravovány těmi samými procedurami. Plazmidová DNA je velmi stabilní, což je výhodné, jelikož může být skladována při teplotě okolí. To umožňuje dodávání stabilních vakcín do rozvojových zemí [62].



Obrázek č. 7: Schematický náčrt technologie přípravy a aplikace DNA plazmidové vakcíny

Genetický materiál z patogenního mikroorganismu je extrahován a „vnesen“ na plazmid. Plazmid je aplikován do hostitele buď injekčně (do svalů), nebo tzv.

„gene gun“ technologií kdy plazmid je vázán na mikročástice těžkého kovu a aplikován na kůži

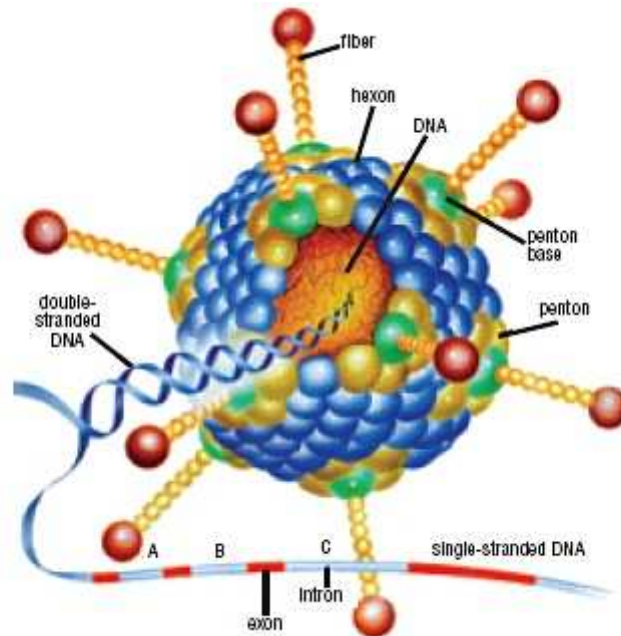
Legenda: *Pathogen* – patogen; *Genetic material* – genetický materiál; *Gene for antigen* – geny kódující antigeny; *plasmid*- plazmid; *Altered plasmid* – plazmid s vneseným genem kódující antigen patogenu; *Syringe* – injekční stříkačka; *Gene gun* – „genová zbraň“, pistole pro aplikaci DNA; *Muscle* – sval; *Skin* - kůže

Making DNA vaccine, převzato z:

http://www.immune.org.nz/site_resources/Making_DNA_vaccine.gif [63].

5.3.3 Rekombinantní vektorové vakcíny

Tyto experimentální vakcíny jsou podobné očkovacím látkám využívajících DNA, ale používají vektor (nosič) v podobě oslabeného viru nebo bakterie k zavedení mikrobiální DNA do tělesných buněk. Jako vektor slouží právě virus nebo bakterie. Nosičský virus poté „donášší“ mikrobiální DNA do buňky. Tím je dosaženo přirozeného napodobení přirozené infekce a je lépe stimulován imunitní systém. Obvyklými vektory jsou například: viry vakcinie, adenoviry, rhinoviry, BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*, atenuované *Mycobacterium bovis*), *Salmonella* sp. (Obrázek č. 8). Jako vektor mohou být použity také ve virulenci oslabené bakterie. V případě použití bakterií jako vektoru, je nesena genetická informace dalšího mikrobu na jejich povrchu [58].



Obrázek č. 8: Virová částice adenoviru

Adenoviry jsou neobalené DNA viry s ikosahedrální symetrií. Virová kapsida je tvořena 240 „hexon“ proteiny (označené modře) a 12 „penton base“ proteiny (označené zeleně). Je rozpoznáváno 51 sérotypů a některé z nich jsou používány jako virové vektory, např. sérotyp Ad5, Ad35, Ad26.

Legenda: Fiber – vlákno; double-stranded DNA – dvoušroubovicová DNA; single-stranded DNA – jednovláknová DNA;

K. J. KRESGE, *And the winner is...HIV Treatment and Prevention*, IAVI Report, 11(1), 2007, převzato z: <http://www.iavireport.org/archives/2007/pages/iavi-report-11%281%29-and-the-winner.aspx> [64].

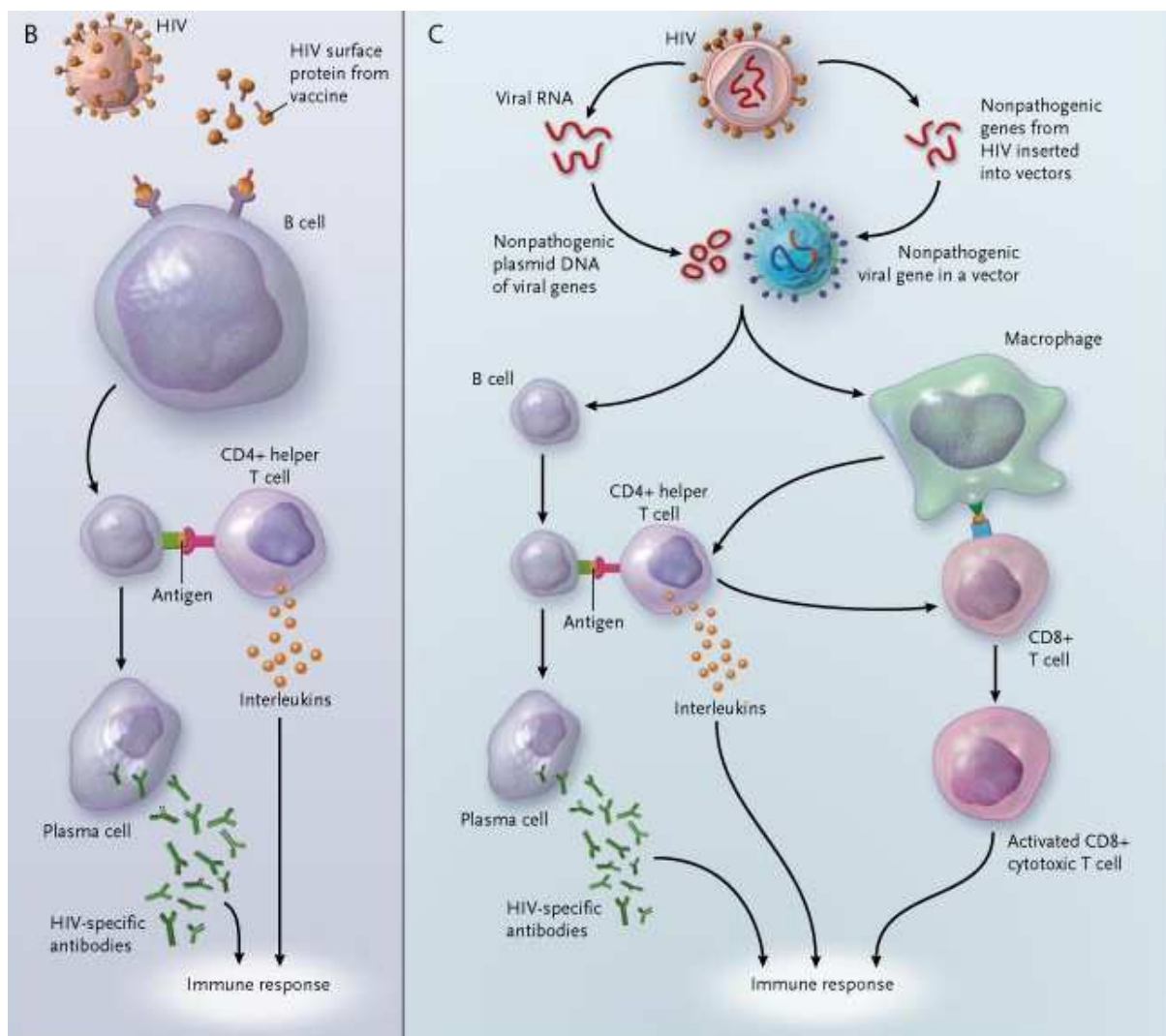
6. Kandidátní vakcíny proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti

HIV je považováno za velmi nepříjemného nepřítele. Zaprvé – HIV stejně jako všechny retroviry rychle reverzně transkribuje a integruje se do hostitelské DNA, což je předností pro dlouhodobou infekci. Zadruhé – HIV infekce velmi rychle vyřazuje imunitní odpovědi hostitele požadované pro účinnost vakcín a kontrolu virové replikace. A třetí hrozivá výzva při vývoji vakcín je kontinuálně se měnící antigenní variace u HIV [65].

Antigenní rozmanitost HIV-1 obíhajícího v populaci je velká, a je tedy potřeba vyvinout vakcínu, která bude schopná vyvolat trvalou imunitu na různé HIV-1 druhy.

Zatímco mutační změny jsou pozorovány ve všech virových proteinech, největší rozdílnost je lokalizována na virových obalových glykoproteinech hlavně v části Env. Aminokyselinová sekvence v Env se může lišit v 15 % v rámci jednoho subtypu a až 35 % mezi obaly různých subtypů [66]. Narůstá počet nových cirkulujících rekombinantních forem, což způsobuje hroživou globální variaci v HIV kmenech, která přečnává ostatní patogeny, jako např. virus chřipky [67]. Tato výrazná antigenní proměnlivost je jedna velká překážka čelící vývoji HIV vakcín. Proto by tedy efektivní HIV vakcína měla překonat změny vyvolané rozdílnostmi v uspořádání HIV [66].

Kandidátní vakcíny, které měly za úkol vyvolat obranné protilátkami zprostředkované imunitní reakce, se ve druhé fázi klinických pokusů ukázaly jako neúčinné. Proto se současné HIV vakcinační pokusy zaměřují na cytotoxické T-lymfocyty. Tyto kandidátní vakcíny mají podobu subcelulárních vakcín, ve kterých se využívá vektorů v podobě plazmidů, nebo virových vektorů (Obrázek č. 9) [65].



Obrázek č. 9: Schematický nákras mechanismů typů potenciálních HIV vakcín;

Panel B: schéma mechanismu působení subjednotkové vakcíny obsahující syntetické proteiny;

Panel C: využití vektorů v podobě plazmidu a nepatogenních virových vektorů.

Legenda: HIV – human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti; B cell – B-lymfocyt; CD4⁺ helper T cell – CD4 pomocný T-lymfocyt (buňka); Interleukins – interleukiny; Plasma cell – plazmatická buňka; HIV-specific antibodies – HIV-specifické protilátky; Immune response – imunitní odpověď; viral RNA – virová RNA; Nonpathogenic genes from HIV inserted into vectors – nepatogenní geny z HIV vnesené do vektoru; Nonpathogenic plasmid DNA of viral genes – nepatogenní plazmid DNA

virových genů; Nonpathogenic viral gene in a vector – nepatogenní virové geny ve vektoru; Macrophage – makrofág; CD8⁺ T cell – CD8 T-lymfocyt (buňka); Activated cytotoxic T cell – aktivované cytotoxické T-lymfocyty.

Převzato z: H. MARKEL, The Search for Effective HIV Vaccines, The New England Journal of Medicine, 353(8): 753-7, 2005 [68].

6.1 Zvířecí modely pro testování účinnosti kandidátních vakcín

Zvířecí modely mohou hrát klíčovou roli ve vedení preklinického vývoje vakcíny, včetně studia bezpečnosti, toxicity a imunogenicity. Vhodný model může také poskytnout možnost vykonávat preklinické testy úspěšnosti vakcíny [69].

Protože je zde velmi vysoká podobnost mezi imunitním systémem makaků a lidí a HIV a SIV, jako model infekce byli zvoleni právě primáti makak rhesus (*Macaca mulatta*) [70]. Preklinické testy úspěšnosti HIV vakcíny jsou obvykle prováděny vystavením makaků opičímu imunodeficitnímu viru (SIV), který je velmi příbuzný s HIV. Nicméně množství virového inokula SIV použitelné k infekci makaků daleko převyšuje množství HIV, kterému jsou vystaveni lidé. Zvířata jsou vystavena infekční dávkou 10x až 100x a 50 % zvířat je poté infekčních. Tyto nadměrné dávky nemusí poskytovat realistické preklinické testy úspěšnosti vakcín [69].

V dalším zajímavém modelu se využívá „zkříženého“ viru SIV/HIV (SHIV), který nese a exprimuje HIV-1 geny *env*, *tat* a *rev* v SIV genomickém základu. Tento SHIV může u makaků vytvářet vysoce patogenní SHIV derivace, které vyvolávají u zvířat masivní pokles CD4 T-lymfocytů během několika týdnů a eventuelně vedou k AIDS. Ve vakcinačních studiích u makaků bylo dosaženo ochrany před vysoce patogenním SIV nebo SHIV pouze po vakcíně s živými oslabenými SIV typy s odstraněnými geny jako jsou *nef*, *vpr* nebo *vpx*. Pozoruhodná síla a trvání protektivní imunity poskytnuté imunizací s oslabeným

SIV typem s odstraněným *nef* u makaků pobízí ke studiu přirozené imunitní odpovědi zahrnuté v této ochraně [71].

6.2 Inhibice vstupu viru lidské imunitní nedostatečnosti do buněk pomocí protilátek

Úspěšnost vakcín proti virovým infekcím spočívá ve vytvoření ochranného množství antivirových protilátek. Stejně tak i první generace kandidátních vakcín proti HIV byla připravena tak, aby byla vytvořena protilátková odpověď. Bohužel studie odhalily, že skoro všechny vakcínou navozené protilátky selhaly v zajištění ochrany proti HIV [72].

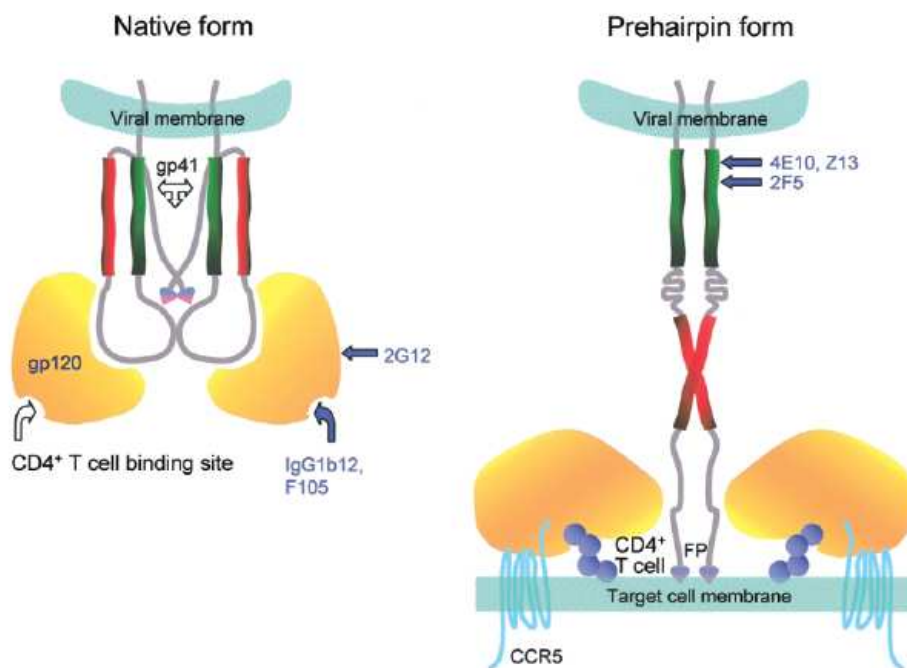
DNA vakcinace pomocí antigenů gp120 HIV-1 byla více efektivní ve vyvolávání neutralizujících protilátek proti HIV-1 primárním izolátům, než vyvolalo očkování pouze rekombinantním proteinem gp120 [73]. Přirozená HIV-1 infekce většinou vyvolá silnou protilátkovou odpověď proti virovému povrchovému proteinu Env. Nicméně je pozorována pouze slabá heterologní neutralizace v séru u většiny HIV pozitivních pacientů.

Virus HIV používá množství úskoků, jak uniknout „neutralizačnímu nátlaku“ od hostitele. Jeden z nich spočívá ve velké variabilitě Env virového proteinu, která dovoluje viru uniknout před neutralizačními protilátkami [74]. Epitopy zakryté variabilními smyčkami, vysoký stupeň glykosylace a kvartérní interakce vycházející z trimerizace Env hrají v únikových mechanismech viru rozhodující roli [75].

Navzdory tomuto bylo identifikováno několik široce neutralizačních protilátek. Dvě z nich, 2G12 a imunoglobulin b12 (IgG1b12) rozpoznávají gp120, povrchovou podjednotku Env. Jiné široce neutralizující protilátky 2F5, Z13, 4E10 se váží na membránový region gp41 [76].

Pouze 2G12 váže specifické sacharidové epitopy na vysoce glykosylovaném nečinném povrchu gp120 [47]. Protilátky 2F5 a 4E10 rozpoznávají lineární epitopy na gp41 (Obrázek č. 10). Studie in vitro zaměřené

na neutralizační aktivitu těchto monoklonálních protilátek poukázaly na schopnost neutralizace virů subtypů A, B, C a D a stejně tak na schopnost zajistit antivirovou protekci u neonatálních makaků [77].



Obrázek č. 10: Schéma odhalující místa působení neutralizačních protilátkových epitopů na gp120 a gp41 (ukázka na nativní formě a na pozměněné formě)

Legenda: Native form – nativní forma; Viral membrane – virová membrána; CD4⁺ T cell binding site – vazebné místo pro CD4 povrchovou strukturu T-lymfocytů; gp120 – glykoprotein 120; gp41 – glykoprotein 41; 2G12, IgG1b12, F105, 4E10, Z13, 2F5 – označení monoklonálních protilátek; Prehairpin form – přetočená, pozměněná forma; CD4⁺ T cell – CD4 povrchová struktura T-lymfocytu; CCR5 - C-C chemokinový receptor typu 5

A. DUERR, J. N. WASSERHEIT, L. COREY, HIV Vaccines: New Frontiers in Vaccine Development, *Clinical Infectious Diseases*, 43(4): 500-11, 2006, převzato z: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.1086/505979> [65].

6.3 Nové návrhy vakcín

Vývoj HIV vakcíny se zdá být „během na dlouhé trati“. Rostoucí poznatky výzkumu ukazují, že hostitelská přirozená imunita má hlavní, ačkoli většinou nedostatečnou roli v zabraňování HIV infekce. Jedna cesta, jak docílit efektivní imunitní odpovědi a zabránit nebo kontrolovat HIV infekci spočívá ve využití dendritických buněk k modulaci imunitního systému. DC buňky působí na přirozenou i získanou imunitu proti virové infekci pomocí produkovaných cytokinů a zpracováním a prezentací antigenů T-lymfocytům. Molekuly, které pomáhají ovládat dendritické buňky mohou pomoci kontrolovat nejen HIV specifické CD8 cytotoxické T-lymfocyty a CD4 pomocné T-lymfocyty, ale také protilátkovou odpověď. Předpokládá se, že molekula, která potlačuje signalizaci cytokinů u dendritických buněk, SOCS1 (SOCS – supressor of cytokine signaling), oslabuje také buněčnou signalizaci u HIV-1 infekce. Signalizace pomocí SOCS1 u myší nejen že kontroluje produkci cytokinů jako je IL-12 dendritickými buňkami, ale také sehrává důležitou roli v regulaci anti-HIV imunitní odpovědi.

Schopnost HIV DNA vakcíny je jednoznačně zvýšena souběžnou imunizací se SOCS1 malou interferující RNA (siRNA). Tento objev naznačuje, že vyvážená paměťová humorální a buněčná odpověď proti HIV může být způsobena SOCS1 utlumenými dendritickými buňkami a SOCS-siRNA DNA. Tato SOCS1 utlumující strategie může pomoci zlepšit účinnost terapeutické a preventivní vakcíny proti HIV a vakcín proti onemocněním vyvolaným jinými patogeny. Pokud bude tato strategie použita s vhodnými HIV imunogeny a vektory, vakcinace může poskytnout nový přístup vedoucí ke zvýšení slabé protektivní imunitní odpovědi, na základě širší a silnější odpovědi nejen proti dominantním epitopům, ale také proti slabě imunogenním, nebo skrytým epitopům [78].

6.4 Preventivní a terapeutické vakcíny proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti

6.4.1 Preventivní vakcíny

Tyto vakcíny jsou navrženy tak, aby ochránily HIV negativní lidi před infekcí a onemocněním. V současnosti není dostupná vakcína, která by zabránila HIV infekci, je zde ovšem neustávající pracovní nasazení řady výzkumných pracovníků s cílem takovou vakcínu vyvinout. Cílem je vynalézt očkovací látku, která ochrání lidstvo před HIV infekcí, nebo alespoň zmenší pravděpodobnost získání HIV nebo AIDS, pokud je člověk vystaven viru.

V současnosti není zatím dostupná preventivní vakcína, která by byla schválena organizací Food and Drug Administration (FDA), nicméně výzkum v této oblasti je již ve fázi klinických pokusů [79].

6.4.2 Terapeutické vakcíny

Terapeutické vakcíny, také známé jako léčebné vakcíny, by měly posloužit k léčbě HIV infikovaných lidí. Vakcína má být uzpůsobena tak, aby posilovala lidskou imunitní odpověď na HIV, která poskytne lepší kontrolu nad infekcí.

Vědečtí výzkumníci doufají, že terapeutická vakcína bude schopná posílit anti-HIV imunitní odpověď, díky které se lidé s HIV infekcí nebudou muset spoléhat pouze na antiretrovirové léky nyní užívané k léčbě HIV infekce [80].

6.5 Trendy a poznatky v T-lymfocytárních vakcínách proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti

Imunizace založená na DNA vakcínách spočívá v imunitní odpovědi na exprimovaný antigen (protein), která následuje po zavedení vektoru nesoucího DNA kódujícího polypeptidové sekvence. V plazmidové DNA vakcíně je kódován požadovaný antigen, který je poté vystaven příslušnými imunitními buňkami [81]. Tyto vakcíny mají schopnost vyvolat jak CD4 tak CD8 T-lymfocytární odpověď a jsou považovány jako obzvláště prospěšné ve vytváření HIV-1 vakcín [82].

Bylo demonstrováno, že Gag, Nef a Env virové proteiny vyvolávají převážně T-buněčnou imunitní odpověď. Nedávné studie, zaměřené na efektivnost imunizace prostřednictvím Env v DNA-rMVA (rekombinantní modifikovaný virus vakcinie Ankara) odhalily, že Gag-Pol-Env imunizace byla mnohem účinnější před následnou infekcí než samotná Gag-Pol imunizace [83]. Gag-Pol imunizace byla účinná v kontrole infekce u pouze 7 z 12 zvířat, zatímco Gag-Pol-Env vakcinace inhibovala virovou replikaci u 23 ze 24 zvířat, což poukazuje na rozhodující roli Env.

V další nedávné studii využívající infekčního SIV modelu makaků byla použita multiplazmidová DNA vakcína obsahující Gag-Pol/Env-Rev. V této studii bylo demonstrováno dosažení větší ochrany před ztrátou CD4 T-lymfocytů a nižší virovou plazmatickou náloží u imunizovaných makaků v porovnání se skupinou kontrolních zvířat. Tato studie dokládá důležitost začlenění více antigenů HIV-1 při konstrukci DNA vakcíny [84].

Kvalita imunitní odpovědi indukované pomocí DNA vakcín je závislá také na místě aplikace DNA, expresi a vlastnostech kódovaného antigenu. Intravenózní hydrodynamická injekce s DNA kódující povrchový HIV-1 antigen vyústí ve vysoký stupeň exprese HIV-1 povrchového antigenu v játrech. Byla srovnávána efektivita po aplikaci DNA vakcíny intranazální, podkožní, intramuskulární a intraslezinní cestou s aplikací vakcíny hydrodynamickou cestou. Bylo zjištěno, že hydrodynamický způsob vakcinace navozuje tvorbu

čtyřicetkrát vyšší hladiny specifických protilátek proti HIV-1 povrchovému antigenu oproti jiným způsobům podání vakcíny. Hydrodynamická vakcína o množství 1 µg DNA indukuje vyšší imunitní odpověď než vakcína o množství 100 µg DNA podané intramuskulárně. Toto dokazuje, že DNA vakcíny vstupující do tkání s vysokou proteosyntetickou aktivitou, jako jsou játra, způsobují zvýšenou imunitní odpověď [85].

Jedna z nejvíce efektivních strategií vyvolávajících HIV-specifickou imunitu je heterologní zesílený režim DNA vakcinace následovaný aplikací vakcíny s virovým vektorem. V tomto režimu dochází k navození silnější imunitní odpovědi cytotoxických T-lymfocytů. HIV DNA vakcínu lze efektivně posílit pomocí rekombinantního viru vakcinie (jako je rekombinantní modifikovaný virus vakcinie Ankara, MVA), nebo pomocí replikačně deficitního rekombinantního adenoviru. MVA je velmi oslabený virus vakcinie, který ztratil schopnost se replikovat v buňkách primátů a může být tudíž považován za bezpečnou vakcínu. Ve studiích porovnávajících vakcínu obsahující SIV gag v nosiči rekombinantního MVA a rekombinantního adenovirového vektoru u makaků s indukovanou infekcí SIV, se jevila více efektivní ve vyvolání dlouhotrvající CD8 odpovědi a protekci proti virovým změnám DNA vakcína, obsahující rekombinantní adenovirový vektor [86].

6.6 Vakcíny proti onemocnění vyvolaném virem lidské imunitní nedostatečnosti v klinických pokusech

Současné kandidátní vakcíny nejsou schopny vyvolat indukci tvorby neutralizujících protilátek proti většině v lidské populaci obíhajících virových typů a tudíž uvedení vakcíny vyvolávající tvorbu ochranné protilátkové odpovědi zůstává hlavní prioritou při vývoji HIV-1 vakcíny [87].

6.6.1 Vakcína AIDSVax

V únoru 2003, po více než desetiletí práce, tým vědců z biotechnologické společnosti VaxGen oznámil výsledky III. fáze klinického hodnocení vakcíny AIDSVax. Navzdory velkým nadějím, jejich produkt AIDSVax, který obsahoval syntetické monomerní glykoproteiny gp120, nezabránil HIV infekci. Byl to frustrující neúspěch pro výzkum HIV vakcíny. Ačkoliv AIDSVax selhal v poskytování ochrany proti infekci, jeho neúspěch obsahoval několik rozhodujících ponaučení: struktura vnějšího HIV obalu se liší od struktury monomerního gp120 a vnější membrána HIV skrývá své epitopy různými způsoby, které geneticky sestrojené proteiny nemohou úspěšně napodobit [68].

6.6.2 Vakcína V520 – studie STEP, Phambili

Vakcína V520 byla testována v rámci studie zvané STEP (nebo také známé pod označením HVTN 502, nebo Merck V520) a v rámci studie zvané Phambili. V této vakcíně se používá jako vektor rekombinantní adenovirus typu 5 (rAD5). Vakcína zahrnuje tři rAD5 vektory nesoucí *gag*, *pol* a *nef* kódované sekvence (Obrázek č. 11) [88]. Vakcína byla vyvinuta proti HIV subtypu B, který je nejběžnější v Americe. Byla prokázána zkřížená imunogenicita se subtypem C, který se vyskytuje v jižní Africe [89].

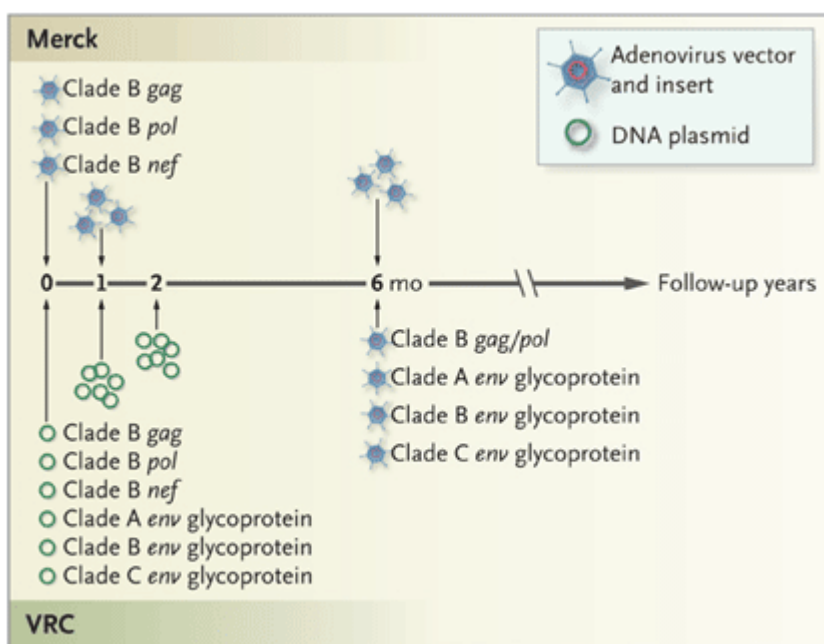
Předpokládá se účinek jak preventivní, tak účinek vedoucí k významnému snížení virové nálože v organismu hostitele [88].

Všechny tři vakcinační antigeny, použité v této vakcíně, jsou intracelulární proteiny, které obvykle nejsou exprimovány na povrchu HIV infikovaných buněk, ani na částicích HIV. Na základě této skutečnosti nebylo záměrem indukovat tvorbu specifických neutralizačních protilátek, ale vakcína měla především indukovat silnou cytotoxickou odpověď zprostředkovanou cytotoxickými T-lymfocyty. Volba adenovirového vektoru vycházela z poznatku

pozorovaného u modelů primátů. Adenovirový vektor vakcíny indukuje u většiny vakcín významnou HIV specifickou odpověď cytotoxických T-lymfocytů [90].

Vakcína byla hodnocena ve dvou studiích s dobrovolníky, kteří byli HIV negativní, ale ve vysokém riziku nákazy. Studie byly finančně podpořeny jak společností Merck, dále HVTN (HIV Vaccine Trials Network) a NIAD-NIH (National Institute for Allergy and Infectious Disease - National Institutes of Health). V pokusu STEP bylo naimunizováno téměř 3000 zdravých neinfikovaných dobrovolníků. Tato zkouška proběhla, aby se otestovala schopnost vakcíny snížit infekci a virovou nálož v očkováných jedincích, kteří nebyli nikdy infikováni. Každý dobrovolník obdržel tři injekce s třemi rAD5 vektory (*gag*, *pol* a *nef*), poslední 2 injekce s 6 měsíční pauzou. To samé vakcinační schéma bylo použito v Jižní Africe ve studii Phambili.

V září 2007 byla studie STEP zastavena poté, co bylo zjištěno, že vakcína nezabraňuje HIV infekci, ani nesnižuje množství viru u těch, kteří byli infikováni. V říjnu byla studie Phambili, které se zúčastnilo pouze 801 osob, také zastavena [91].



Obrázek č. 11: Složení vakcíny a časové schéma očkování vakcínou V520 vyvinutou společností Merck a vakcínou vyvinutou společností NIH-National Institutes of Health

Pro vyvoj vakcíny společností Merck byl využit jako vektor adenovirus typu 5 obsahující buď gag, pol, nebo nef gen viru HIV. Tato vakcína byla podávána v časových intervalech 0, 1 a 6 měsíců.

Pro „Vaccine Research Center“ (VRC) byla volena směs šesti DNA plazmidů obsahujících buď gag, pol, nef, nebo env gen viru HIV. Tato vakcína byla podávána v časových intervalech 0, 1, 2 měsíce a v 6tém měsíci byl podán vektor adenoviru obsahující gag/pol, nebo env gen viru HIV.

Legenda: Clade – subtyp; gag, pol, nef, env – geny viru HIV; glycoprotein – glykoprotein; mo- month, měsíc; Adenovirus vector and insert – adenovirový vektor a inzertovaný/vložený genetický materiál; Merck – společnost Merck; VCR – Vaccine Research Center – vakcinační výzkumné centrum

R. STEINBROOK, *One Step Forward, Two Steps Back - Will There Ever Be an HIV Vaccine?*, *The New England Journal of Medicine*, 357(26), 2007 [91].

6.6.3 VRC vakcína – studie PAVE 100, HVTN 505

V rámci studie PAVE 100 předložené společností National Institute of Health (NIH) měla být testována vakcína VRC (Vaccine Research Center), (Obrázek č. 11 – demonstrace složení a časového schéma). Vakcína VRC obsahuje jak plazmidový vektor, tak i vektor v podobě rekombinantního adenoviru typu 5. Vakcína měla indukovat imunitní odpověď proti proteínům (gag, pol, nef, env) různých subtypů viru HIV [92].

Nakonec National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) došla k rozhodnutí rozsáhlou klinickou studií PAVE 100 zrušit. K tomuto rozhodnutí přispěly především výsledky studie STEP, které poukázaly na to, že větší počet HIV infekcí byl odhalen u skupiny dobrovolníků, kteří byli očkovaní vakcínou V520 oproti skupině, ve které bylo podáváno placebo. Vedení NIAID uvedlo, že je třeba více základních výzkumů a testů na zvířatech předtím, než bude vakcína podávána [93, 94].

Další studie, ve které byla testována vakcína VRC (vakcinační režim s plazmidovou DNA, imunitní odezva posílena adenovirem typu 5) byla nazvaná HVTN 505 a byla navržena ve Vaccine Research Centre - National Institutes of Health. Výsledky této studie by měly přispět k lepšímu porozumění imunitní odezvy zprostředkované T-lymfocyty a vývoji T-lymfocytární vakcíny.

HVTN 505 je výzkumná studie vytvořená k odpovědi jedné specifické otázky: Může DNA/rAd5 vakcinační režim významně snížit virovou nálož u jedinců, kteří jsou infikováni HIV? Samozřejmě nižší virová nálož oddaluje symptomy lidského AIDS. Takže HIV vakcína, která snižuje virovou nálož může zpozdit počátek nemoci, i když nezabrání infekci. Nižší virová nálož může také snížit riziko přenosu viru na ostatní [95].

Plazmidová DNA s inkorporovanými virovými geny má primárně za úkol „informovat“ imunitní systém a adenovirový vektor s geny viru HIV má především za úkol „boosterovat“, čili posílit imunitní odpověď. Tato strategie očkování většinou navodí různé typy imunitních odpovědí ve srovnání s vakcinačním režimem, kde je použit pouze jeden typ vakcíny.

Pro klinickou studii HVTN 505 jsou nabíráni HIV negativní homosexuální muži (studie by měla zahrnovat celkový počet 1350 mužů), ve věku 18-45 let žijících na území USA. Zapisování dobrovolníků začalo dne 24.8.2009 [96, 97].

6.6.4 Vakcína ALVAC HIV, AIDSVax B/E – studie RV144

Studie RV144, která probíhala v Thajsku, začala v roce 2003 a zúčastnilo se jí 16 402 na začátku HIV negativních mužů a žen ve věku 18-30 let. Vakcinovaná skupina byla nejprve očkována vakcínou známou jako ALVAC HIV (vCP1521; Sanofi Pasteur) a poté byla podána boosterující dávka AIDSVax B/E (gp120; Genetech/Vaxgen).

Vakcína ALVAC HIV obsahuje virový vektor, který nese tři geny HIV (*env*, *gag*, *pol*). Virovým vektorem je „canarypox“ virus, ptačí virus, který není schopen replikace v člověku. Vakcína AIDSVax B/E je složena z geneticky připraveného gp120 viru HIV. Obě geneticky připravené vakcíny nesou geny od HIV typů převládajících v Jihovýchodní Asii. Vakcinační nebo placebo injekce byly podávány v 6-ti měsíčních periodách. Účastníci byli poté sledováni další 3 roky a každých 6 měsíců testováni na HIV [98].

Výsledky studie byly prezentovány v září roku 2009. Uváděné závěry byly pro mnoho badatelů překvapující. Zatímco klinická a laboratorní data předchozí podobné kandidátní vakcíny (AIDSVAX B/E) poukazovala na neúspěch, výsledky studie RV144 poukazovaly na úspěšnost v podobě snížení počtu o 31% HIV infikovaných ve skupině, ve které dobrovolníkům byla podána vakcína oproti skupině, ve které bylo podáváno placebo. Ovšem někteří vědci diskutují, zda výsledky jsou skutečně statisticky relevantní. Výsledky byly o to překvapující, že bylo předchozími studiemi prokázáno, že vakcinační vektor „canarypox“ viru nebyl dostatečně imunogenní [99, 100, 101].

Dále se ukázalo, že vakcína nemá účinek na snížení počtu virů v krvi u lidí, kteří již byli infikováni. Vakcína vyvolávala tvorbu jen velmi malého množství protilátek [101].

Třebaže by se mohlo zdát, že bylo dosaženo jen malého stupně účinnosti, znamená to velký krok dopředu pro vývoj HIV vakcín [102, 103].

7. Závěr

Neúprosná situace pandemie HIV/AIDS vyvíjí tlak na řadu vědeckých týmů, které se v problematice HIV angažují. Potřeba, ba dokonce nezbytnost dostupnosti protektivní vakcíny odráží i fakt, že se zvýšilo financování výzkumu. To se odrazilo i na počtu kandidátních vakcín v klinických pokusech, který se zvýšil na dvojnásobek [104].

Každá nová studie je součástí velké mozaiky badatelských úsilí, které jsou navrženy tak, aby podaly jasnější obrázek o cestě vedoucí k vytvoření efektivní vakcíny.

Závěrem pro demonstraci nejbližších výhledů do budoucnosti dvou předních odborníků na problematiku HIV vakcín cituji Margaret I. Johnston a Anthony S. Fauci: „Nemusíme být schopni vytvořit HIV vakcínu, která je vysoce efektivní v klasickém smyslu úspěšných virových vakcín. Pokud se tak stane, bude to odrážet enormní vědecké úsilí“ [105].

Použitá literatura:

1. Detailně o AIDS - Nové strategie v prevenci AIDS, <http://www.aids-hiv.cz/>.
2. N. L. LETVIN, Strategies for an HIV vaccine, The Journal of Clinical Investigation 110(1): 15-20, 2002.
3. J. A. LEVY, HIV Pathogenesis: Knowledge Gained after Two Decades of Research, Advances in Dental Research, 19 (1): 10-6, 2006.
4. Virus Classification – Baltimore classification, Wikipedia – the free encyclopedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Virus_classification#Baltimore_classification.
5. A. PANDIT, S. SINHA, Using genomic signatures for HIV-1 sub-typing, BMC Bioinformatics, 11 Suppl 1:S26, 2010.
6. D. S. BURKE, Recombination in HIV: An Important Viral Evolutionary Strategy, Emerging Infectious Diseases, 3(3): 253-9, 1997.
7. A. MÖRNER, Å. BJÖRNDAL, J. ALBERT, V. N. KEWALRAMANI, D. R. LITTMAN, R. INOUE, R. THORSTENSSON, E. M. FENYÖ, E. BJÖRLING, Primary Human, Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates, Like HIV-1 Isolates, Frequently Use CCR5 but Show Promiscuity in Coreceptor Usage, Journal of Virology, 73(3): 2343-9, 1999.
8. F. DAMOND, D. DESCAMPS, I. FARFARA, J. N. TELLES, S. PUYEO, P. CAMPA, A. LEPRE^TRE, S. MATHERON, F. BRUN-VEZINET, F. SIMON, Quantification of Proviral Load of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Subtypes A and B Using Real-Time PCR, Journal of Clinical Microbiology, 39(12): 4264-8, 2001.
9. HIV – 1 Global Distribution, Frontline: The age of AIDS, 2003, převzato z: <http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html>.
10. L. RATNER, W. HASELTINE, R. PATARCA, K. J. LIVAK, B. STARCICH, S. F. JOSEPHS, E. R. DORAN, J. A. RAFALSKI, E. A. WHITEHORN, K. BAUMEISTER, L. IVANOFF, S. R. PETTEWAY Jr., M. L. PEARSON, J. A. LAUTENBERGER, T. S. PAPAS, J. GHAYEB, N.

- T. CHANG, R. C. GALLO, F. WONG-STAAAL, Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV – III, Nature, 313, 1985.
11. Anatomy of the AIDS Virus, How stuff works, převzato z: <http://static.howstuffworks.com/gif/aids-hiv-anatomy.gif>.
 12. R. GALLO, F. WONG-STAAAL, L. MONTAGNIER, W. A. HASELTINE, M. YOSHIDA, HIV/HTLV gene nomenclature, Nature, 933(6173): 504, 1988, převzato z: T. J. HOPE, D. TRONO, Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2000.
 13. Humman Immunodeficiency virus (HIV), Genomic organization, Stanford University, převzato z: <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV-1b.jpg>.
 14. HIV and Its Transmission, Centers for Disease Control and Prevention, 1999.
 15. F. X. LÜ, R. S. JACOBSON, Oral Mucosal Immunity and HIV/SIV infection, Journal of Dental Research 86(3), 2007.
 16. J. J. KWIEK, V. MWAPASA, D. A. MILNER Jr., A. P. ALKER, W. C. MILLER, E. TADESSE, M. E. MOLYNEUX, S. J. ROGERSON, S. R. MESHNICK, Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi, Plos Medicine, 3(1): e10, 2006, převzato z: Placental Microtransfusion Associated with Increased HIV Transmission from Mother to Child, PLOS Medicine, 3(1), 2006.
 17. H. COOVADIA, Antiretroviral Agents — How Best to Protect Infants from HIV and Save Their Mothers from AIDS, The New England Journal of Medicine, 351(3): 289-92, 2004.
 18. Natural History of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. The European Collaborative Study, Pediatrics, 94 (6 pt 1): 815-19, 1994, převzato z: S. G. KITCHEN, Y. D. KORIN, M. D. ROTH, A. LANDAY, J. A. ZACK, Induced Expression of CD4 receptor allows HIV infection, QIAGEN news, 3, 1999.
 19. S. SIERRA, B. KUPFER, R. KAISER, Basics of the Virology of HIV - 1 and its replication, Journal of Clinical Virology, 34(4), 2005.

20. J. O. KAHN, B. D. WALKER, Acute human immunodeficiency virus type 1 infection, *The New England of Journal Medicine*, 339(1): 33-9, 1998, převzato z: E. S. DAAR, S. LITTLE, J. PITT, J. SANTANGELO, P. HO, N. HARAWA, P. KERNDT, J. V. GIORGI, J. BAI, P. GAUT, D. D. RICHMAN, S. MANDEL, S. NICHOLS, *Diagnosis of Primary HIV-1 Infection*, *Annals of Internal Medicine*, 134(1), 2001.
21. B. TINDALL, D. A. COOPER, Primary HIV infection : host responses and intervention strategies, *AIDS : Official Journal of the International AIDS Society*, 5(1): 1-14, 1991.
22. F. M. HECHT, M. P. BUSCH, B. RAWAL, M. WEBB, E. ROSENBERG, M. SWANSON, M. CHESNEY, J. ANDERSON, J. LEVY, J. O. KAHN, Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection, *AIDS : Official Journal of the International AIDS Society*, 16(8): 1119-29, 2002.
23. A. YATES, J. STARK, N. KLEIN, R. ANTIA, R. CALLARD, Understanding the Slow Depletion of Memory CD4+ T Cells in HIV Infection. *PLOS Medicine*, 4(5): e 177, 2007.
24. P. BACCHETTI, A. R. MOSS, Incubation period of AIDS in San Francisco, *Nature*, 338(6212), 1989, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease*, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.
25. A. N. PHILLIPS, CD4 lymphocyte depletion prior to the development of AIDS, *AIDS*, 6(7), 1992, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease*, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.
26. D. D. HO, T. MOUDGIL, M. ALAM, Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons, *The New England of Journal Medicine*, 321(24): 1621-5, 1989, převzato z: N. J. BENNETT, F. B. ROSE, *HIV Disease*, Emedicine, 2009.
27. T. FUČÍKOVÁ, J. BARTŮŇKOVÁ, J. LITZMAN, P. PANZNER, *Základy klinické imunologie*, ISBN: 80-90067-4-3, nakladatel: RDI' PRESS, 1994.

28. K. G. CASTRO, J. W. WARD, L. SLUTSKER, J. W. BUEHLER, H. W. JAFFE, R. L. BERKELMAN, 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults, Centers for Disease Control and Prevention, 42(16), 1992.
29. A. S. FAUCI, Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy, *Science*, 262(5136), 1993.
30. J. T. SAFRIT, C. A. ANDREWS, T. ZHU, D. D. HO, R. A. KOUP, Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope, *Journal of Experimental Medicine*, 179(2), 1994.
31. A. S. FAUCI, G. PANTALEO, S. STANLEY, D. WEISSMAN, Immunopathogenic Mechanisms of HIV Infection, *Annals of Internal Medicine*, 124(7): 654-63, 1996.
32. M. I. JOHNSTON, A. S. FAUCI, An HIV Vaccine - Evolving Concepts, *The New England Journal of Medicine*, 356(20): 2073-81, 2007.
33. M. ROLLAND, D. C. NICKLE, W. DENG, N. FRAHM, Ch. BRANDER, G. H. LEARN, D. HECKERMAN, N. JOJIC, V. JOJIC, B. D. WALKER, J. I. MULLINS, Recognition of HIV-1 Peptides by Host CTL is Related to HIV-1 Similarity to Human Proteins, *PLOS ONE*, 2(9), 2007.
34. A. J. McMICHAEL, S. L. ROWLAND-JONES, Cellular Immune responses to HIV, *Nature*, 410, 2001.
35. L. WAGNER, O. O. YANG, E. A. GARCIA-ZEPEDA, Y. GE, S. A. KALAMS, B. D. WALKER, M. S. PASTERNAK, A. D. LUSTER, Beta Chemokines are released from HIV-1 specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans, *Nature*, 391(6670), 1998.
36. C. M. WALKER, D. J. MOODY, D. P. STITES, J. A. LEVY, CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication, *Science*, 234(4783), 1986.

- 37.** R. A. KOUP, J. T. SAFRIT, Y. CAO, C. A. ANDREWS, G. McLEOD, W. BORKOWSKY, C. FARTHING, D. D. HO, Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome, *Journal of Virology*, 68(7): 4650-5, 1994, převzato z: M. M. LEDERMAN, B. RODRIGUEZ, S. SIEG, *Immunopathogenesis of HIV Infection. HIV in Site*, University of California, San Francisco, 2006.
- 38.** R. E. PHILIPS, S. ROWLAND-JONES, D. F. NIXON, F. M. GOTCH, J. P. EDWARDS, A. O. OGUNLESI, J. G. ELVIN, J. A. ROTHBARD, C. R. BANGHAM, C. R. RIZZA, Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition, *Nature*, 354(6353): 453-9, 1991, převzato z: M. M. LEDERMAN, B. RODRIGUEZ, S. SIEG, *Immunopathogenesis of HIV Infection. HIV in Site*, University of California, San Francisco, 2006.
- 39.** H. STREECK, Z. L. BRUMME, M. ANASTARIO, K. W. COHEN, J. S. JOLIN, A. MEIER, Ch. J. BRUMME, E. S. ROSENBERG, G. ALTER, T. M. ALLEN, B. D. WALKER, M. ALTFELD, Antigen Load and Viral Sequence Diversification Determine the Functional Profile of HIV-1-Specific CD8+ T Cells, *PLOS Medicine*, 5(5), 2008.
- 40.** V. APPAY, D. F. NIXON, S. M. DONAHOE, G. M. GILLESPIE, T. DONG, A. KING, G. S. OGG, H. M. SPIEGEL, C. CONLON, C. A. SPINA, D. V. HAVLIR, D. D. RICHMAN, A. WATERS, P. EASTERBROOK, A. J. McMICHAEL, S. L. ROWLAND-JONES, HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function, *The Journal of Experimental Medicine*, 192(1), 2000, převzato z: M. M. LEDERMAN, B. RODRIGUEZ, S. SIEG, *Immunopathogenesis of HIV Infection, HIV in Site*, University of California, San Francisco, 2006.
- 41.** R. J. DE BOER, Time Scales of CD4+ T Cell Depletion in HIV Infection, *PLOS Medicine*, 4(5), 2007.

42. S. MOIR, A. S. FAUCI, Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(1), 2008.
43. W. HUISMAN, B. E. E. MARTINA, G. F. RIMMELZWAAN, R. A. GRUTERS, A. D. M. E. OSTERHAUS, Vaccine-induced enhancement of viral infections, *Vaccine*, 27(4): 505-12, 2009.
44. C. M. COLEMAN, L. WU, HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs, *Retrovirology*, 1, 2009.
45. X. WEI, J. M. DECKER, S. WANG, H. HUI, J. C. KAPPES, X. WU, J. F. SALAZAR-GONZALEZ, M. G. SALAZAR, J. M. KILBY, M. S. SAAG, N. L. KOMAROVA, M. A. NOWAK, B. H. HAHN, P. D. KWONG, G. M. SHAW, Antibody neutralization and escape by HIV-1, *Nature*, 422(6929):307-12, 2003, převzato z: M. M. LEDERMAN, B. RODRIGUEZ, S. SIEG, *Immunopathogenesis of HIV Infection*. HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.
46. T. WRIN, L. CRAWFORD, L. SAWYER, P. WEBER, H. W. SHEPPARD, C. V. HANSON, Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus, *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 7(3), 1994.
47. A. TRKOLA, M. PURTSCHER, T. MUSTER, C. BALLAUN, A. BUCHACHER, N. SULLIVAN, K. SRINIVASAN, J. SODROSKI, J. P. MOORE, H. KATINGER, Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1, *Journal of Virology*, 70(2): 1100-8, 1996, převzato z: S. PHOGAT, R. T. WYATT, G. B. KARLSSON HEDESTAM, Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular target, *Journal of Internal Medicine*, 262(1), 2007.
48. P. D. KWONG, R. WYATT, J. ROBINSON, R. W. SWEET, J. SODROSKI, W. A. HENDRICKSON, Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature*, 393(6686): 648-59, 1998, převzato z: C. B. HARE,

Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.

49. G. SCARLATTI, E. TRESOLDI, A. BJÖRNDAL, R. FREDRIKSSON, C. COLOGNESI, H. K. DENG, M. S. MALNATI, A. PLEBANI, A. G. SICCARDI, D. R. LITTMAN, E. M. FENYÖ, P. LUSSO, In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression, *Nature Medicine*, 3(11): 1259-65, 1997, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.*
50. D. C. CHAN, P. S. KIM, HIV entry and its inhibition, *Cell*, 93(5), 1998, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.*
51. M. D. MILLER, C. M. FARNET, F. D. BUSHMAN, Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition, *Journal of Virology*, 71(7): 5382-90, 1997, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.*
52. M. ADAMS, L. SHARMEEN, J. KIMPTON, J. M. ROMEO, J. V. GARCIA, B. M. PETERLIN, M. GROUDINE, M. EMERMAN, Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(9): 3862-6, 1994, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.*
53. P. WEI, M. E. GARBER, S. M. FANG, W. H. FISCHER, K. A. JONES, A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA, *Cell*, 92(4): 451-62, 1998, převzato z: C. B. HARE, *Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.*
54. C. ZIMMERMAN, K. C. KLEIN, P. K. KISER, A. R. SINGH, B. L. FIRESTEIN, S. C. RIBA, J. R. LINGAPPA, Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids, *Nature*, 415(6867):

- 88-92, 2002, převzato z: C. B. HARE, Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.
55. A. L. GREENWAY, D. A. McPHEE, K. ALLEN, R. JOHNSTONE, G. HOLLOWAY, J. MILLS, A. AZAD, S. SANKOVICH, P. LAMBERT, Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis, Journal of Virology, 76(6): 2692-702, 2002, převzato z: : C. B. HARE, Clinical Overview of HIV Disease, HIV in Site, University of California, San Francisco, 2006.
 56. HIV replication, IRSC Faculty Departments, převzato z: <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/images/HIV%20replication.jpg>.
 57. D. PIERIBONE, The HIV Life Cycle, Acria – AIDS Community Research Initiative of America, 12(1), 2002/2003, převzato z: <http://www.thebody.com/content/art14193.html>.
 58. Vaccines : Types of vaccines, National Institutes of Health : National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2008.
 59. A. DETMER, J. GLENTING, Live bacterial vaccines - a review and identification of potential hazards, Microbial Cell Factories, 2006.
 60. M. PETRÁŠ, Vakcíny neboli očkovací látky, 2007.
 61. H. S. GARMORY, K. A. BROWN, R. W. TITBALL, DNA vaccines: improving expressions of antigens, Genetic Vaccines and Therapy, 1(1): 2, 2003.
 62. P. L. FELGNER, DNA vaccines, Current Biology, 8(16), 1998.
 63. Making DNA vaccine, převzato z: http://www.immune.org.nz/site_resources/Making_DNA_vaccine.gif.
 64. K. J. KRESGE, And the winner is...HIV Treatment and Prevention, IAVI Report, 11(1), 2007, převzato z: <http://www.iavireport.org/archives/2007/pages/iavi-report-11%281%29-and-the-winner.aspx>.
 65. A. DUERR, J. N. WASSERHEIT, L. COREY, HIV Vaccines: New Frontiers in Vaccine Development, Clinical Infectious Diseases, 43(4):

500-11, 2006, převzato z:
<http://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.1086/505979>.

66. S. P. MCBURNEY, T. M. ROSS, Viral sequence diversity: challenges for AIDS vaccine designs, *Expert Review of Vaccines*, 7(9): 1405-17, 2008.
67. B. KORBER, B. GASCHEN, K. YUSIM, R. THAKALLAPALLY, C. KESMIR, V. DETOURS, Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation, *British Medical Bulletin*, 58. 19-42, 2001, převzato z: A. DUERR, J. N. WASSERHEIT, L. COREY, HIV Vaccines: New Frontiers in Vaccine Development, *Clinical Infectious Diseases*, 43(4): 500-11, 2006.
68. H. MARKEL, The Search for Effective HIV Vaccines, *The New England Journal of Medicine*, 353(8): 753-7, 2005.
69. Modeling HIV Vaccine Strategy in Animals, *PLOS Medicine* 2(8), 2005.
70. C. L. MAGNES, P. C. FELLIN, M. J. THOMAS, M. J. KORTH, M. B. AGY, S. C. PROLL, M. FITZGIBBON, C. A. SCHERER, D. G. MINER, M. G. KATZE, S. P. IADONATO, Analysis of the *Macaca mulatta* transcriptome and the sequence divergence between *Macaca* and human, *Genome Biology*, 6(7), 2005.
71. M. GIRARD, A. HABEL, Ch. CHANEL, New prospects for the development of a vaccine against human immunodeficiency virus type 1. An overview, *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie*, 1999.
72. H. HORTON, C. HAVENAR – DAUGHTON, D. LEE, E. MOORE, J. CAO, J. McNEVIN, T. ANDRUS, H. ZHU, A. RUBIN, T. ZHU, C. CELUM, M. J. McELRATH, Induction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T-Cell Responses in HIV Vaccine Trial Participants Who Subsequently Acquire HIV-1 Infection, *Journal of Virology*, 80(19), 2006.
73. M. VAINE, S. WANG, E. T. CROOKS, P. JIANG, D. C. MONTEFIORI, J. BINLEY, S. LU, Improved Induction of Antibodies against Key Neutralizing Epitopes by Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 DNA Prime-Protein Boost Vaccination Compared to gp120 Protein-Only Vaccination, *Journal of Virology*, 82(15), 2008.

- 74.** X. WEI, J. M. DECKER, S. WANG, H. HUI, J. C. KAPPES, X. WU, J. F. SALAZAR-GONZALEZ, M. G. SALAZAR, J. M. KILBY, M. S. SAAG, N. L. KOMAROVA, M. A. NOWAK, B. H. HAHN, P. D. KWONG, G. M. SHAW, Antibody neutralization and escape by HIV-1, *Nature*, 422(6929):307-12, 2003, převzato z: M. VAINE, S. WANG, E. T. CROOKS, P. JIANG, D. C. MONTEFIORI, J. BINLEY, S. LU, Improved Induction of Antibodies against Key Neutralizing Epitopes by Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 DNA Prime-Protein Boost Vaccination Compared to gp120 Protein-Only Vaccination, *Journal of Virology*, 82(15), 2008.
- 75.** R. PANTOPHLET, D. R. BURTON, GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies, *Annual Review of Immunology*, 24: 739-69, 2006, převzato z: M. VAINE, S. WANG, E. T. CROOKS, P. JIANG, D. C. MONTEFIORI, J. BINLEY, S. LU, Improved Induction of Antibodies against Key Neutralizing Epitopes by Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 DNA Prime-Protein Boost Vaccination Compared to gp120 Protein-Only Vaccination, *Journal of Virology*, 82(15), 2008.
- 76.** T. MUSTER, F. STEINDL, M. PURTSCHER, A. TRKOLA, A. KLIMA, G. HIMMLER, F. RÜKER, H. KATINGER, A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1, *Journal of Virology*, 67(11), 1993, převzato z: M. VAINE, S. WANG, E. T. CROOKS, P. JIANG, D. C. MONTEFIORI, J. BINLEY, S. LU, Improved Induction of Antibodies against Key Neutralizing Epitopes by Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 DNA Prime-Protein Boost Vaccination Compared to gp120 Protein-Only Vaccination, *Journal of Virology*, 82(15), 2008.
- 77.** F. FERRANTELLI, R. M. RUPRECHT, Neutralizing antibodies against HIV: back in the major leagues?, *Current Opinion in Immunology*, 14(4): 495-502, 2002, převzato z: A. DUERR, J. N. WASSERHEIT, L. COREY, HIV Vaccines: New Frontiers in Vaccine Development, *Clinical Infectious Diseases*, 43(4): 500-11, 2006.

- 78.** X. T. SONG, K. EVEL-KABLER, L. ROLLINS, M. ALDRICH, F. GAO, X. F. HUANG, S. Y. CHEN, An alternative and effective HIV vaccination approach based on inhibition of antigen presentation attenuators in dendritic cells, *PLOS Medicine*, 3(1), 2006.
- 79.** Preventive HIV Vaccines, *AIDS info*, 2006.
- 80.** Therapeutic HIV Vaccines, *AIDS info*, 2006.
- 81.** C. D. TANG, M. DeVIT, S. A. JOHNSTON, Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, *Nature*, 356(6365): 152-4, 1992, převzato z: M. GIRI, K. E. UGEN, D. B. WEINER, DNA vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Past Decade, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 2004.
- 82.** M. GIRI, K. E. UGEN, D. B. WEINER, DNA vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Past Decade, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 2004.
- 83.** R. R. AMARA, J. M. SMITH, S. I. STAPRANS, D. C. MONTEFIORI, F. VILLINGER, J. D. ALTMAN, S. P. O'NEIL, N. L. KOZYR, Y. XU, L. S. WYATT, P. L. EARL, J. G. HERNDON, J. M. McNICHOLL, H. M. McCLURE, B. MOSS, H. L. ROBINSON, Critical role of Env as well as Gag-Pol in control of simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge by a DNA prime/recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine, *Journal of Virology*, 76(12): 6138-46, 2002, převzato z: M. GIRI, K. E. UGEN, D. B. WEINER, DNA vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Past Decade, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 2004.
- 84.** K. MUTHUMANI, M. BAGARAZZI, D. CONWAY, D. S. HWANG, K. MANSON, R. CICCARELLI, Z. ISRAEL, D. C. MONTEFIORI, K. UGEN, N. MILLER, J. KIM, J. BOYER, D. B. WEINER, A Gag-Pol/Env-Rev SIV239 DNA Vaccine improves CD4 counts and reduce viral loads after pathogenic intrarectal SIV(mac)251 challenge in rhesus macaques, *Vaccine*, 21(7-8): 629-37, 2003, převzato z: M. GIRI, K. E. UGEN, D. B. WEINER, DNA vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Past Decade, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 2004.

85. M. RASKA, Z. MOLDOVEANU, J. NOVAK, Z. HEL, J. BOZJA, R. W. COMPANS, Ch. YANG, J. MESTECKY, Delivery of DNA HIV-1 Vaccine to the Liver Induces High and Long-lasting Humoral Immune Responses, *Vaccine*, 26(12): 1541-51, 2008.
86. J. A. BERZOFSKY, J. D. AHLERS, J. JANIK, J. MORRIS, S. OH, M. TERABE, I. M. BELYAKOV, Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections, *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 2004.
87. D. MONTEFIORI, Q. SATTENTAU, J. FLORES, J. ESPARZA, J. MASCOLA, Antibody-Based HIV-1 Vaccines: Recent Developments and Future Directions : A summary report from a Global HIV Vaccine Enterprise Working Group, *PLOS Medicine*, 4(12), 2007.
88. E. IACCINO, M. SCHIAVONE, G. FIUME, I. QUINTO, G. SCALA, The aftermath of the Merck's HIV vaccine trial, *Retrovirology*, 2008.
89. A. JOHNSON, MERCK announces failure of V520HIV vaccine candidate, *The AIDS Pandemic*, 2007.
90. K. ÜBERLA, HIV Vaccine Development in the Aftermath of the STEP Study: Re – Focus on Occult HIV Infection?, *PLOS Pathogens*, 4(8), 2008.
91. R. STEINBROOK, One Step Forward, Two Steps Back - Will There Ever Be an HIV Vaccine?, *The New England Journal of Medicine*, 357(26), 2007.
92. Making sense of the PAVE 100 debate: A tool for HIV prevention advocates, *AIDS vaccine Advocacy Coalition*, 2008.
93. K. HONEY, HIV vaccine trial no longer PAVES the way, *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 2008.
94. NIAID Will Not Move Forward With The Pave 100 HIV Vaccine Trial : VRC vaccine regimen under consideration for a smaller, more focused study, *NIH News*, 2008.
95. The HVTN 505 Study : Its Role in Helping Fight AIDS, *HIV Vaccine Trials Network*, 2008.

- 96.** Questions and Answers : The HVTN 505 HIV Vaccine Regimen Study, 2009.
- 97.** HVTN 505 HIV Vaccine Study Begins Enrolling Volunteers, National Institutes of Health : National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2009.
- 98.** L.HIGHLEYMAN, Phase 3 Study in Thailand Shows First Evidence that HIV Vaccine Can Reduce Rate of Infection, HIV and Hepatitis, 2009.
- 99.** R. DOLIN, HIV Vaccine Trial Results - An Opening for Further Research, The New England Journal of Medicine, 2009.
- 100.** Průlom: vakcína snižuje riziko nákazy AIDS, Zdravotnické noviny, 2009.
- 101.** Experimental AIDS Vaccine Delivers Good News : Thai trial is first test in humans to show vaccine can work against HIV, Medline Plus, 2009.
- 102.** Frequently asked questions regarding the RV144 Phase III HIV Vaccine Trial, U.S. Military HIV Research Program, 2009.
- 103.** S. MAYOR, HIV vaccine reduces infection rate by a third, study shows, BMJ, 2009.
- 104.** P. A. NEWMAN, N. DUAN, L. KAKINAMI, K. ROBERTS, What can HIV vaccine trials teach us about future HIV vaccine dissemination?, Vaccine 26(20), 2008.
- 105.** M. I. JOHNSTON, A. S. FAUCI, An HIV Vaccine - Challenges and Prospects, The New England Journal of Medicine : Perspective, 359(9), 2008.

Použité weblinky:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.hivandhepatitis.com/>

<http://www.bmj.com/>

<http://hivinsite.ucsf.edu/>

<http://www.jci.org/>

<http://www.annals.org/>

<http://www.cdc.gov/>

<http://content.nejm.org/>

<http://www.plosmedicine.org/home.action>

<http://www.plosone.org/home.action>

<http://www.plospathogens.org/home.action>

<http://www1.qiagen.com/>

<http://www.jacionline.org/>

<http://www.lww.com/>

<http://emedicine.medscape.com/>

<http://www.cell.com/current-biology>

http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page

<http://www.hivresearch.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

<http://www3.niaid.nih.gov/>

<http://www.hvtn.org/>

<http://www.nih.gov/>

<http://www.avac.org/>

<http://www.retrovirology.com/>

<http://cmr.asm.org/>

<http://jvi.asm.org/>

<http://www.thelancet.com/>

<http://www.medimmunol.com/>

<http://www.aidsinfo.nih.gov/>

<http://www.gvt-journal.com/>

<http://www.jimmunol.org/>

<http://microbialcellfactories.com/>

<http://www.vakciny.cz/>