

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Nové směry ve vakcinaci proti HIV

Julie Dobiášová

Školitel: RNDr. Alena Morávková Ph.D.

2009/2010

Prohlašuji, že jsem pracovala samostatně za použití materiálů uvedených v seznamu literatury.

Praha 2010

Julie Dobiášová

OBSAH

Obsah.....	3
1 Úvod.....	7
2 Retroviridae.....	8
2.1 Charakteristika skupiny	8
2.2 Struktura virionu HIV.....	10
2.3 Životní cyklus Retroviridae	11
2.4 HIV	14
3 Vakcína	16
3.1 Problémy dosavadních vakcín.....	16
3.2 Tradiční modely vakcín.....	17
3.3 Nové typy vakcín.....	20
4 Závěr	24
5 Seznam použité literatury:	26

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Získaný imunodif. syndrom
<i>Env</i>	Envelope	kóduje obalový gp120
<i>Gag</i>	Group-specific antigen	Strukturní gen
gp120	Glycoprotein 120	Glykoprotein 120
gp160	Glycoprotein 160	Glykoprotein 160
gp41	Glycoprotein 41	Glykoprotein 41
HAART	Highly Active AntiRetroviral Treatment	Antitirovirální terapie
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus lidské imunodificience
LTR	Long terminal repeat	Dlouhý opakující se konec
MAb	Monoclonal antibodies	Monoklonální protilátky
MHC	Major Histocompatibility Komplex	Hl. histokomakt. komplex
NAb	Neutralizing antibodies	Neutralizační protilátky
PCP	Pneumocystis pneumonia	Pneumocystická pneumonie
PIC	Preintegration komplex	Preintegrační komplex
<i>Pol</i>	Polymerase	Polymeráza
<i>Pro</i>	Protease	Proteáza
R	Repeat sequence	Opakující sekvence
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	Opičí imunodif. virus
SU	Surface glycoprotein	Povrchový glykoprotein
TM	Transmembrane glycoprotein	Transmembránový glykoprotein
U3	Unique sequence at 3' end of geonome	Unikátní sekvence na 3'konci
U5	Unique sequence at 5' end of geonome	Unikátní sekvence na 5'konci

ABSTRAKT

Většina dosavadních vakcín je založena na podání usmrceného viru do těla hostitele. Po vytvoření imunitní odpovědi a imunitní paměti je organismus schopen se s případnou infekcí patogenem lépe vyrovnat. V případě HIV se ovšem nedaří vyrobit vakcínu, která by byla schopna očkovaného jedince před následnou infekcí ochránit. Virus HIV napadá CD4+ buňky a ničí imunitní systém. Rychlost jeho replikace je vysoká a odolává všem dosavadním antivirotikům a také buňkám, zprostředkující imunitní odpověď. Navíc virus perzistuje v buňkách v podobě provirové DNA. Pro úspěšnou vakcinaci proti HIV je vytvářena celá řada nových vakcín a vakcinačních postupů. Jednou z možností je využití rekombinantních virových glykoproteinů, které jsou včleněny do membrány viru HIV, které by měly vyvolat v očkovaném organismu tvorbu neutralizačních protilátek. Některé nové modely vakcín se zaměřují ne na virus samotný ale na omezení HIV infekce tím, že ničí infikované buňky prostřednictvím apoptózy, nebo vylučováním cytokinů. Použití plazmidové DNA spolu s rekombinantním vektorem se zdá jako neperspektivnější možnost pro vývoj vakcíny proti HIV. Bohužel tradiční ani nové modely vakcín prozatím nezajistili kompetitivní odpověď imunitního systému proti viru HIV.

ABSTRACT

Most current vaccines are based on using whole-inactivated viruses. After creating the immune response and immune memory is organism able to cope with infection create by pathogens. In the case of HIV, however, fail to produce the vaccine, which would have been able vaccinated individual from subsequent infections protect. Virus HIV attacks CD4+ cells and destroys the immune system. Rate of his replication is high and virus HIV is resistant to existed antivirotics. And he is resistant before cells, which conveying the immune response. Moreover, the virus persists in cell in the form proviral DNA. For a successful vaccine against HIV is developed a lot of new vaccines and vaccination procedures. One way is the using recombinat viral glycoproteins, which are incorporated into the membrane of virus HIV, which should produce in the vaccinated organism production of neutralizing antibodies. Some modern models of vaccines strategies don't target the virus itself, but they target the restriction of HIV infection by destroying infected cells via apoptosis, or cytokine secretion. Using plasmid DNA cobination with recombinant vectors appear as the most perepective

opportunity to develop HIV vaccine. Unfortunately, traditional models or new models of vaccine against HIV are failing to provide a competitive response of the immune system against virus HIV.

KLÍČOVÁ SLOVA

CD4+ buňky, HIV, neutralizační protilátky, monoklonální protilátky, proteinový obal, rekombinantní vektory

KEY WORDS

CD4+ cells, HIV, neutralizing antibodies, monoclonal antibodies, envelope protein, recombinating vectors

1 ÚVOD

Vir HIV je obalený RNA vir s dvěma stejnými kopiemi RNA. Virus HIV napadá CD4+ buňky a ničí imunitní systém jedince. Až do roku 1983 se nevědělo, co způsobuje toto smrtelné onemocnění. Právě roku 1983 doktorka F. Barré-Sinoussi, společně se dvěma spolupracovníky, doktorem Jean-Claude Chermannem a Lucem Montagnierem poprvé izolovala vir HIV. Objevení viru HIV přineslo v roce 2008 doktorce F. Barré-Sinoussi, a Luceu Montagnieru Nobelovu cenu za medicínu. Pochopení životního cyklu viru a průběhu infekce je jediná možnost jak vyvinout účinnou vakcínu. Vědci se zabývají dvěma cestami vývoje-tradičními a novými modely vakcín. Design tradičních modelů vakcín je založen na podání živého, ale oslabeného viru do těla, nebo na podání rekombinantního proteinu, pro vyvolání specifické imunitní odpovědi. Moderní typy vakcín zahrnují nové genové technologie-podání plazmidové DNA, napodobování struktury obalového Env proteinu, či vakcíny založené na živém rekombinantním vektoru. Sledovanými vektory jsou hlavně Poxviry a Adenoviry, které jsou velmi dobře snášeny. Vektory Adenoviru sérotypu 5 se prozatím dostaly do nejvyššího stupně vývoje.

Tato bakalářská práce pojednává o vývoji obou designů vakcín.

2 RETROVIRIDAE

2.1 CHARAKTERISTIKA SKUPINY

Retrovirididae je různorodá skupina virů, vyskytující se u savců, ryb a jiných druhů obratlovců. Způsobují různé druhy imunodeficitních onemocnění (HIV-1, HIV-2), leukémií a závažných tumorů.

Retroviry jsou obalené RNA viry s diploidním RNA genomem tvořeným dvěma identickými kopiemi RNA. Jejich kapsida (proteinový plášť) má na svém povrchu fosfolipidovou membránu, odvozenou z hostitelské buňky. Kapsida RNA obaluje a chrání. Nukleová kyselina viru spolu s kapsidou tvoří nukleokapsid. Velikost retrovirů se pohybuje přibližně okolo 80-110 nm v průměru. Pojem *retro* označuje opačný tok genetické informace vzhledem k původnímu Crickovu (Crick, 1970) centrálnímu dogmatu, tj. z RNA do DNA. Tento děj provádí enzym překládaný z virového genomu, zvaný reverzní transkriptáza a jeho přítomnost je jedním z hlavních znaků retrovirů. Přepsaná DNA je poté zařazena do genomu hostitelské buňky, pomocí dalšího virového enzymu, integrázy (Strnad P, Haubová Š. & Ruml T. 2003).

Z hlediska různé tvorby retrovirových kapsid, rozdělujeme dva základní typy retrovirů. První typ se vyznačuje tím, že nezralá částice viru se skládá uvnitř buňky a až poté je přenesena k cytoplazmatické membráně hostitelské buňky. Druhým typem jsou retroviry, u kterých se nezralá částice skládá na cytoplazmatické membráně a současně pučí z buňky. Do této skupiny patří několik lidských patogenů, například HIV (Strnad P, Haubová Š. & Ruml, T. 2003), na který je zaměřena tato bakalářská práce.

Až do příchodu viru lidské imunodeficiency (HIV) byly nejvíce studovány retroviry, způsobující ptačí sarkom a myší leukémií.

Klasifikace virů se s postupujícím časem měnila, nyní jsou známy tyto rody: Alpharetroviruses, Betaretroviruses, a Gammaretroviruses jsou považovány za prosté retroviry, zatímco Deltaretroviruses, Epsilonretroviruses, Lentiviruses a Spumaviruses jsou považovány za složité (Fields, Virology 2007). Zástupci každého rodu, jsou uvedeni v tabulce (Tab. 1).

Retroviry vzbuzují velký zájem v molekulární biologii. Reverzní transkriptáza a integráza jsou mimořádně užitečné enzymy pro práci s nukleovými kyselinami. Reverzní transkriptáza byla rozhodující pro studium syntézy mRNA a genové regulace (Fields Virology, 2007). Dalším bodem zkoumání je jejich velká patogenita. Zvláště u viru HIV.

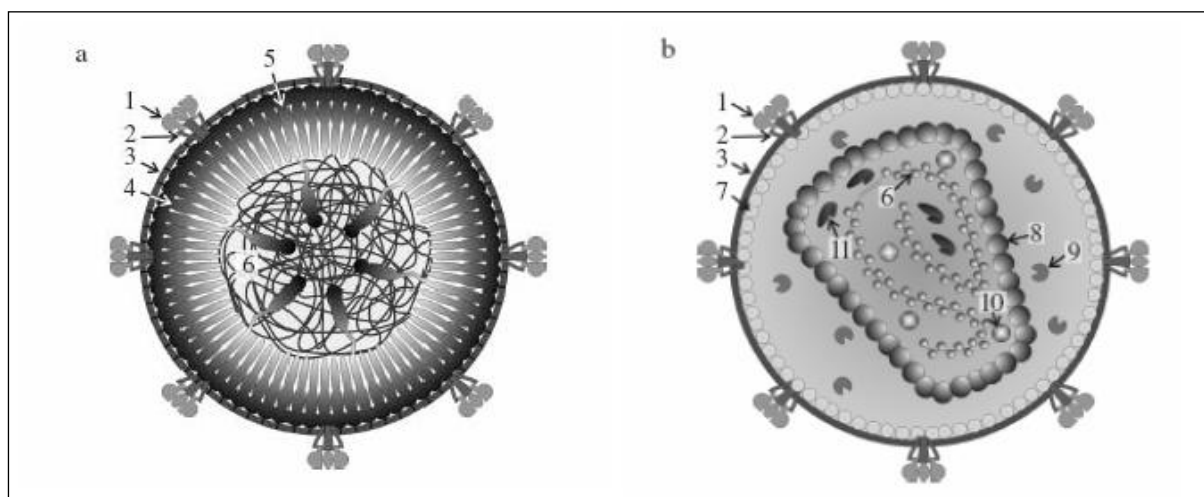
Human Immunodeficiency Virus (HIV), zprostředkovatel Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), má na svědomí velké množství životů. Z hlediska účinné prevence této pandemie je velmi důležité co nejdříve vytvořit vakcínu proti tomuto viru.

Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV) Rous sarcoma virus
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV) Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) Jaagsiekte sheep retrovirus
Gammaretrovirus	Murine leukemia viruses (MuLV) Feline leukemia virus (FeLV) Gibbon ape leukemia virus (GALV) Reticuloendotheliosis virus (REV)
Deltaretrovirus	HTLV-1, -2 Bovine leukemia virus (BLV) STLV-1, -2, -3
Epsilonretrovirus	Walleye dermal sarcoma virus Walleye epidermal hyperplasia virus 1
Lentivirus	Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) Simian immunodeficiency virus (SIV) Equine infectious anemia virus (EIAV) Feline immunodeficiency virus (FIV) Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) Visna maedi virus
Spumavirus	Human foamy virus

Tabulka 1 Řády retrovirů.
(Fields, 2007)

2.2 STRUKTURA VIRIONU HIV

Virion je částice viru schopná infikovat hostitelskou buňku a množit se v ní. V případě retrovirů obsahuje dvě identické kopie nukleové kyseliny (RNA), z tohoto hlediska je možné jej považovat za diploidní. Vnější obal virionu je tvořen fosfolipidovou membránou, která pochází z hostitelské buňky. Obal HIV je trimer heterodimeru. Každý heterodimer se skládá z povrchové podjednotky (gp120) a transmembránové podjednotky (gp41), (obr. 2), které jsou k sobě nekovalentně vázané (Duerr, 2006). Ve zralé virové částici jsou polyproteinové prekurzory (Gag, Gag-Pro a Gag-Pro-Pol), kde je polymeráza (pol), proteáza (pro) prekurzor matrixového a kapsidového proteinu (gag), rozštěpeny na jednotlivé proteiny virovou proteázou (Vogt, V.M., 1996). Jádro virionu (core) je tvořeno kapsidovým proteinem (Gag) v komplexu s virovou RNA. Tvar jádra je u různých skupin retrovirů jiný u HIV je kónický (Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G. & Fuller, S.D., 2003). Uvnitř jádra jsou mimo genomu enzymy-reversní transkriptáza, proteáza a integráza. Dále se ve virionu vyskytují virové proteiny Vif, Vpr, Tat, Nef, Rev, a Vpu (Strnad P, Haubová Š. & Ruml, T, 2003).



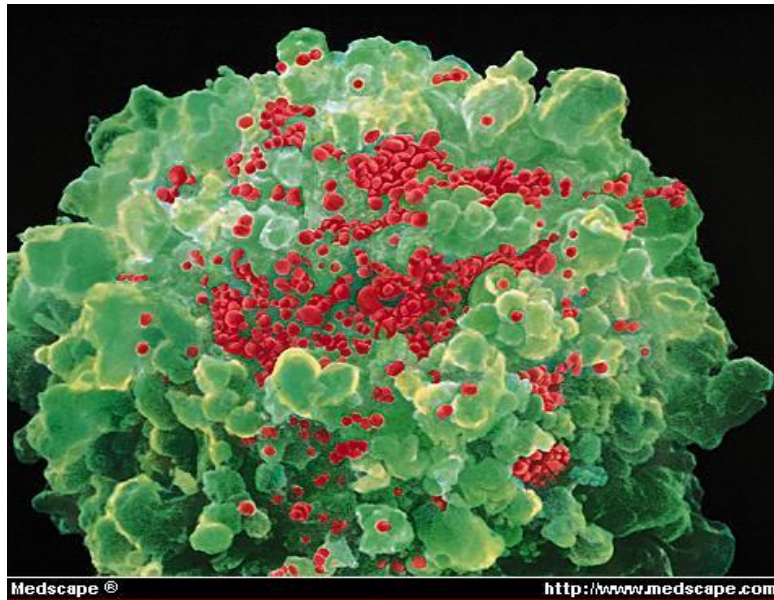
Obrázek 2

Schéma nezralé (a) a zralé (b) virové částice. 1-povrchový glykoprotein, 2-transmembránový glykoprotein, 3-dvojvrstva fosfolipidů, 4-polyproteinový prekurzor Gag, 5-prekurzor Gag-Pro-Pol, 6-genomová RNA, 7-matrixový protein, 8-core tvořené kapsidovým proteinem, 9-proteáza, 10-integráza, 11-reverzní transkriptáza

(Strnad P, Haubová Š. & Ruml, T, 2003)

2.3 ŽIVOTNÍ CYKLUS RETROVIRIDAE

Infekce začíná při adhezi obalových proteinů viru (gp120) a buněčných povrchových proteinů na receptorech CD4 (obr 3), většina kmenů HIV-1 je schopna napadnout makrofágy pomocí vazby na CCR5 koreceptor, nebo na CXCR4 (T buňky).



Obrázek 3

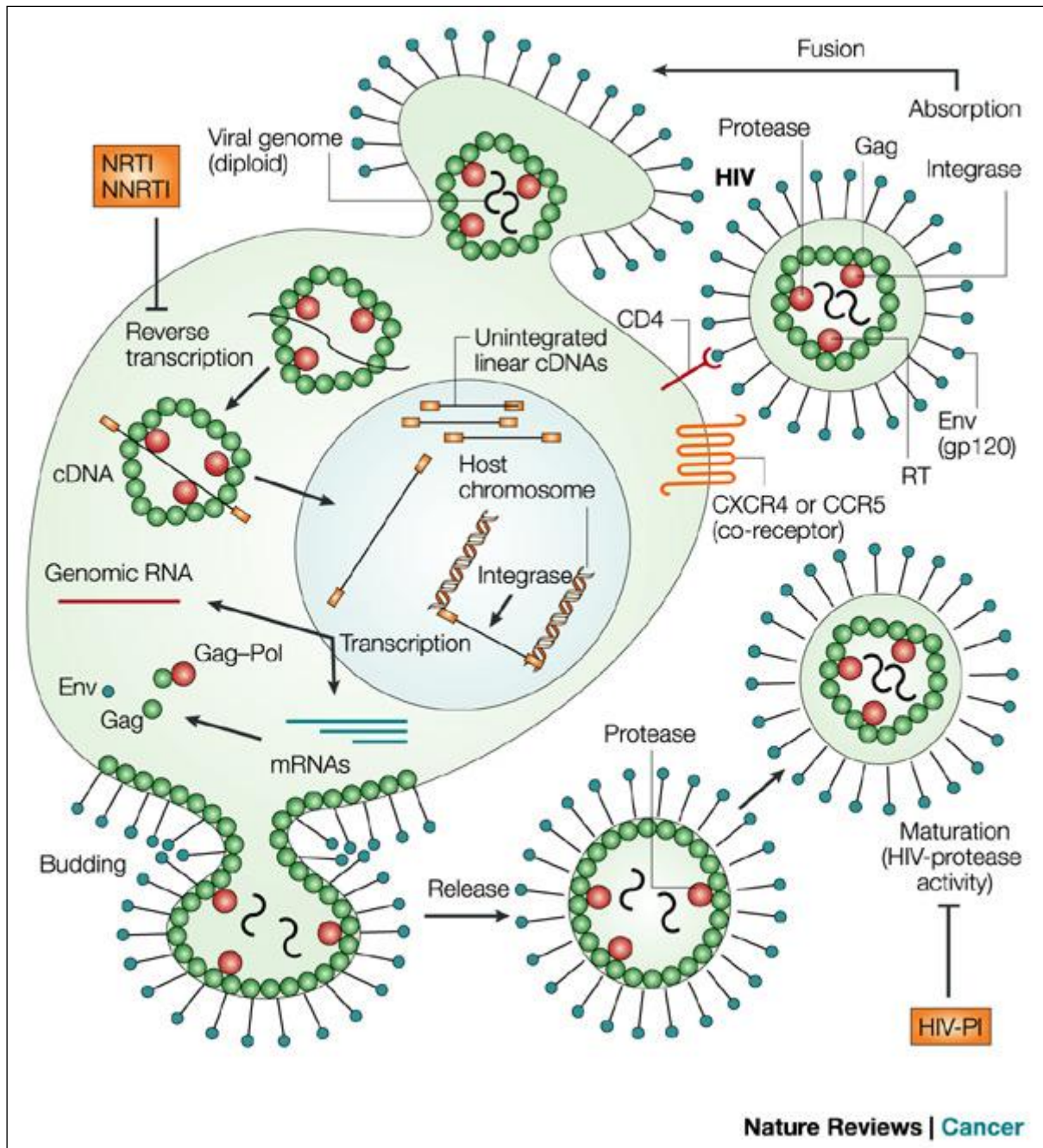
Obrázek z elektronového mikroskopu: CD4 buňka (zelená) infikované HIV (červená)
(www.medscape.com)

Po fúzi obalu s buněčnou membránou vstoupí kapsida do buňky. Genom HIV je tvořen dvěma vlákny RNA bývá kolem 10 kb dlouhý (Hahn, B. H., Shaw, G. M., Arya, S. K., Popovic, M., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. 1984) a kóduje 15 proteinů (Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R. 2005). V hostitelské buňce se dvě vlákna virové RNA přepíše do DNA pomocí reverzní transkriptázy (enzym zajišťující opačný průběh transkripce). Takto nově vzniklá dvouvláknová DNA se nazývá provirová (http://www.aidsmeds.com/articles/hiv_life_cycle_4707.shtml). Každý z konců DNA má na sobě koncovou sekvenci U3-R-U5, známou jako LTR. Vzniklá dvoušrobovice DNA je přepravována cytoplazmou k jádru hostitelské buňky v podobě preintegračního komplexu (PIC), kde jsou také proteiny (Gag a Pro) a enzym integráza. PIC pronikne skrz jaderné póry do jádra buňky a enzym integráza začlení DNA do hostinského chromozomu. Polymeráza II startuje v buňce transkripci na U3-R spojení a transkripce pokračuje ve směru k LTR. V R sekvenci se nachází polyadenylátový signál a transkripce se ukončí v R-U5 spojení. Tyto transkripty slouží jako mRNA, nebo jako progeny virů.

mRNA se skládá z *gag*, *pol* a *env* genů. Gen *Env* je překládán z mRNA v hrubém endoplazmatickém retikulu, kde probíhá glykosilace. Dále je Env protein transportován do Golgiho komplexu, kde je proteázou rozštěpen na povrchový glykoprotein (SU) a transmembránový glykoprotein (TM). Tyto glykoproteiny jsou transportovány k plazmatické membráně, kde mají za úkol zabalit do obalu nově replikovaný retrovirus.

Gag a *Pol* geny jsou přeloženy na Gag a Gag-Pol polyproteiny. Gag a Gag-Pol polyproteiny jsou syntetizovány na volných cytoplazmatických ribozomech, a každý je přepravován prostřednictvím nezávislých cest k plazmatické membráně. Gag a Gag-Pol polyproteiny se shlukují u plazmatické membrány a vytvářejí kulovitou nezralou částici, která obsahuje TM a SU glykoproteiny. Proteolytickým štěpením Gag a následnou reorganizací se vytvoří zralý virion HIV (Fields, 2007), (obr. 4).

Virus HIV patří mezi komplexní retroviry, kromě genů *gag*, *pro*, *pol* a *env* obsahuje geny pro další proteiny, které jsou translatovány ze sestřižených forem mRNA. Jsou to geny: *Vif*, který je nutný pro produkci infekčních částic v některých buněčných liniích, *Vpr* nezbytný pro replikaci viru a směrování provirové DNA do jádra, *Tat*, který se váže na specifickou strukturu u 5' konce RNA a zvyšuje produkci virové RNA, *Nef* způsobující odstranění CD4 z povrchu napadené buňky a tím brání opětné infekci, *Rev*, který se váže na specifické místo virové RNA a reguluje její sestřih a *Vpu*, integrální membránový protein, který způsobuje disociaci komplexů SU-TM-CD4 v endoplazmatickém retikulu (Strnad P, Haubová Š. & Ruml, T., 2003).



Nature Reviews | Cancer

Obrázek 4
 Životní cyklus HIV
 (Monini, 2004)

2.4 HIV

Jak již bylo výše zmíněno, vir HIV patří do čeledi Retroviridae. Virem HIV-1 se lidé poprvé infikovali přibližně před 100 lety, jeho méně známá forma HIV-2 se objevila o desetiletí později. Ovšem nemoc byla popsána poprvé v roce 1983.

Není přesně jasné, kdy se HIV virus objevil poprvé. Mezi nejrozšířenější teorie patří ta, že se HIV vyvinul, jako mutant ze SIV (Simian Immunodeficiency Virus), který byl popsán u některých podskupin šimpanzů ze západní Afriky. HIV se mezi lidskou populaci dostal snad prostřednictvím potravinového řetězce (Farrand, 2007)- kdy mezi šimpanzi docházelo ke kanibalismu a tak i šíření infekce SIV. První přenos na člověka není zaznamenán, ale soudí se, že lidé ulovili infikovaného šimpanze a přes otevřenou ránu se tento virus dostal do krevního oběhu člověka. Virus zmutoval a přizpůsobil se prostředí lidského organismu. To je možná teorie prvního přenosu HIV na člověka. Objevil se do té doby neznámý retrovirus, který je schopen zničit lidský imunitní systém a šířit se velmi rychle a bez varování.

Koncem 70. let se začal objevovat stále častěji virus, který doposud nebyl popsán. U mladých homosexuálních mužů byla diagnostikována vzácná forma rakoviny kůže-tzv. Kaposiho sarkom. V roce 1981 bylo 5 homosexuálních mužů diagnostikováno na pneumocystis pneumonie (PCP) (Moore, Richard D.; Chaisson, Richard E., 1999). Toto datum je označováno jako „začátek“ AIDS, ale spíše se jedná o začlenění HIV do podvědomí obyvatel ve Spojených státech amerických. Po další roky se HIV šířilo a nikdo přesně nevěděl jakými způsoby se tak děje. V roce 1983 se podařilo doktorkce F. Barré-Sinoussi, společně se dvěma spolupracovníky, doktorem Jean-Claude Chermannem a Lucem Montagnierem, vůbec poprvé izolovat virus HIV-1 (ve stejné době byl virus objeven v USA doktorem Gallo, a tak probíhaly debaty o prvenství). V následujících letech se bádání v této oblasti zvýšilo a virus se začíná popisovat a zkoumat. Bylo potvrzeno, že virus HIV-1 je příčinou AIDS. V roce 1985 byl objeven druhý virus, nazvaný později HIV-2. Za tento objev byla v roce 2008 udělena Nobelova cena za medicínu, kterou získala F. Barré-Sinoussi a Luc Montagnier (Cohen, Enserink, 2008).

Od roku 1983 bylo zjištěno, že se HIV šíří pomocí sexuálního styku gayů, špinavých jehel narkomanů, či přes krevní transfúze. Ovšem byly hlášeny případy i nakažených žen mimo tyto rizikové skupiny. Poté se ustanovilo, že mezi rizikové skupiny patří: sexuální aktivní jedinci, kteří při pohlavním, orální, análním styku nepoužívají žádné latexové bariery,

narkomani, používající špinavé jehly, či infikované matky, které přenesou HIV na své dítě při porodu, nebo při kojení (Farrand, 2007).

V roce 1996 byly na Mezinárodní konferenci o AIDS uvedeny novinky zahrnující informace o kombinované léčbě pomocí inhibitorů reverzní transkriptázy v kombinaci s novou skupinou léků nazývaných inhibitory proteázy. Výsledkem této léčby byl výkaz o zlepšení imunitní funkce a inhibice replikace HIV v buňkách. Ovšem radost byla předčasná. V tomto roce, také díky velké informovanosti společnosti, poprvé v USA kleslo číslo nakažených. Dosavadním pokrokem v léčbě HIV je vysoce aktivní antiretrovirální terapie (HAART). Ovšem při HAART pacienti hlásí nežádoucí účinky (průjem, diabetes), (Farrand, 2007). V roce 2005 udrželo široké používání HAART v Severní Americe a v západní a střední Evropě počet úmrtí následkem AIDS na relativně nízké úrovni (http://www.janssen-cilag.cz/bgdisplay.jhtml?itemname=hiv_treatments&product=none). I při použití této terapie však nelze docílit vyléčení pacienta, pouze jsou zmírňovány příznaky infekce a oddaluje se propuknutí AIDS.

Organizace WHO zveřejnila počty nakažených lidí za rok 2008 (obr.5). Z těchto čísel je zřejmé, že vakcína proti HIV je velmi potřebná.

SOUHRNNÝ PŘEHLED EPIDEMIE HIV/AIDS ZA ROK 2008			
Lidé žijící s HIV	Celkový počet	33,4 milionů	[31,1- 35,8 milionů]
	Dospělí	31,3 milionů	[29,2- 33,7 milionů]
	Ženy	15,7 milionů	[14,2- 17,2 milionů]
	Děti pod 15 let	2,1 milionů	[1,2-2,9 milionů]
Nově nakažených virem HIV	Celkový počet	2,7 milionů	[2,4- 3 milionů]
	Dospělí	2,3 milionů	[2,0- 2,6 milionů]
	Děti pod 15 let	430 000	[240 000- 610 000]
Počet úmrtí na AIDS	Celkový počet	2,0 milionů	[1,7- 2,4 milionů]
	Dospělí	1,7 milionů	[1,4- 2,1 milionů]
	Děti pod 15 let	280 000	[150 000- 410 000]

Obrázek 5

Počty lidí nakažených HIV/AIDS v roce 2008

(převzato z http://www.who.int/hiv/data/2009_global_summary.gif)

3 VAKCÍNA

Vývoj vakcíny proti HIV představuje pro vědce v poslední době velkou výzvu. Infikovaných lidí virem HIV neubývá a zdá se, že šíření viru může zastavit pouze účinná vakcína. Přesto, více než dvě desetiletí po prvním objevení tohoto viru je vakcína stále cíl, nikoli realita. Jedním z velmi důležitých stavebních prvků pro vývoj vakcíny, je naprosté pochopení životního cyklu a replikace viru HIV. Pro tento virus zatím selhaly všechny způsoby tradičních vakcín. Hlavním cílem v současnosti je tedy především vyvinutí nového typu vakcín a/nebo vakcinačních schémat.

Úlohou vakcíny proti HIV je indukce protilátek neutralizujících HIV virus a indukce buněčné imunity CD8+ lymfocytů.

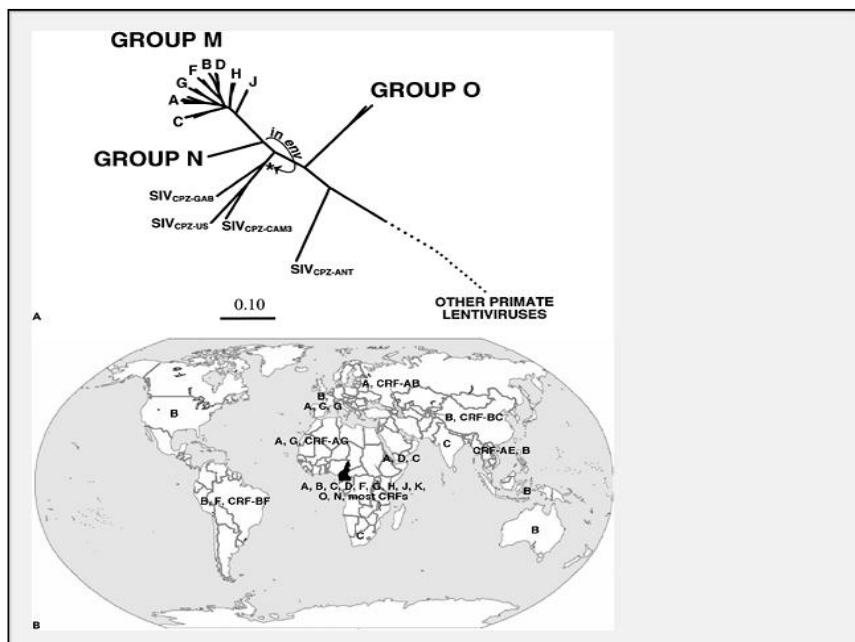
CD8+ lymfocyty mohou inhibovat replikaci HIV v CD4+ lymfocytech *in vitro* (Wella C, 2003). Přímý důkaz o významu CD8+ lymfocytů při kontrole virové infekce zaznamenala práce, zabývající se SIV u modelu makaků, kdy se opicím po podání monoklonálních protilátek zmenšil počet CD8+ lymfocytů. Poté byly infikovány virem SIV. Tato zvířata velmi rychle zemřela, detekovalo se u nich onemocnění AIDS (Shmitz, 1999). Tyto závěry ukázaly na velmi důležitou roli CD8+ (CTL) při zabránění replikace viru v buňce.

Kontrola HIV a jeho stabilního klinického stavu je spojována s vysokou úrovní virus-specifických CD4 + T lymfocytů (Rosenberg, 1997). U účinné vakcíny proti HIV se očekává, že aktivuje virus-specifické CD4 + T lymfocyty prostřednictvím CD8 + (Letvin, 2002).

3.1 PROBLÉMY DOSAVADNÍCH VAKCÍN

Problém vakcíny HIV je hlavně velká různorodost viru. V zemích západní Afriky se objevuje typ HIV-2, jeho genetická sekvence je velmi odlišná od typu HIV-1, který způsobuje onemocnění na ostatních kontinentech, navíc HIV-1 se objevuje v různých podtypech (clades), které jsou různé pro odlišné geografické regiony (obr 6). Všechny podtypy HIV-1 vyvolávají podobné onemocnění, ale globální distribuce jednotlivých podtypů se liší. To má vliv na vývoj vakcíny, (např. podtyp B, který převládá v rozvinutých zemích, kde se nachází velké farmaceutické společnosti, se vzácně vyskytuje v rozvojových zemích, které jsou vážně postiženy touto chorobou) (Bennett, 2007). Bylo by velmi obtížné a časově náročné vyvíjet pro každý podtyp jinou vakcínu, navíc je virus velmi proměnlivý a stále je zde vysoká pravděpodobnost vzniku nových typů. I jiné biologické aspekty mají vliv na vývoji vakcíny.

Virus HIV se přenáší pohlavním stykem a pomocí krve. Vakcína by měla v ideálním případě vyvolat jak imunitní odpověď na sliznici při sexuálním styku, tak i systémovou imunitní odpověď při přenosu viru přímo do krevního řečiště. Konečně a nejvíce znepokojující pro vyhlídky na vývoj účinné vakcíny proti HIV, je schopnost viru přetrvávat v buňce v podobě proviru a vysoká úroveň replikace viru, která odolává všem vyrobeným antivirotikům a také buňkám, zprostředkujícím imunitní odpověď. Na rozdíl od většiny jiných virových infekcí u lidí, virus HIV i jeho replikace nejsou imunitním systémem zcela vymýceny, proto existují obavy, že by i účinná vakcína nemusela vyhladit všechny virus a zabránit další replikaci (Letvin, 2002).



Obrázek 6
rozšíření podtypů HIV
(Fields, Virology)

3.2 TRADIČNÍ MODELY VAKCÍN

Vědci dosud objasnili principy replikace viru HIV, což je nejpodstatnější část, pro vývoj vakcíny (Letvin, 2002). Je jasné, že virus HIV má jedinečnou strukturu a životní strategii, díky níž uniká před kontrolou specifické imunity. Tradiční vakcíny jsou založeny na imunitní odpovědi a schopnosti organismu se s infekcí vyrovnat. Toto není možné nastolit u vakcíny proti HIV.

Studie na primátech potvrzují, že živé, oslabené virové vakcíny a vakcíny rekombinantních proteinů jsou neúčinné, ba naopak mohou být velmi nebezpečné, jelikož podáním oslabeného viru může dojít k infekci.

Další studie na modelech makaků navrhla, že by měl být změněn genetický materiál viru, aby virus byl stále infekční, ale s oslabenou patogenitou (Daniel, 1992). Tyto studie přinesly velké naděje. Oslabený vir se změněnou genetickou výbavou, by mohl být používán jako nová vakcína, ovšem jiné studie, tento postup vyvrátily (Baba, 1995). V další práci vědci zjistili, že mládě makaka s SIV, které bylo po dlouho dobu vystaveno očkovacím látkám se u něj onemocnění AIDS dále rozvíjelo a skončilo smrtí (Baba, 1995). Tato studie přešla od makaků k infikovaným lidem. Podařilo se izolovat virus HIV-*in vitro* a ochromit jeho patogenitu. Ovšem jako u SIV modelu makaků, u očkovaného jedince se onemocnění AIDS přesto rozvíjelo, i když mělo delší prodlevu od infekce k propuknutí choroby. Z těchto studií vycházejí závěry, že není možné oslabit replikaci viru HIV a tím zmenšit jeho patogenitu tak, aby jím bylo možné vakcinovat.

Neuspěly ani tradiční modely vakcín využívající rekombinantní proteinové obaly viru HIV (gp160 nebo gp120), které by měly vyvolat tvorbu neutralizačních protilátek. Vlastnosti obalu HIV přispívají ke schopnosti vyhnout se kontrole humorálního imunitního systému.

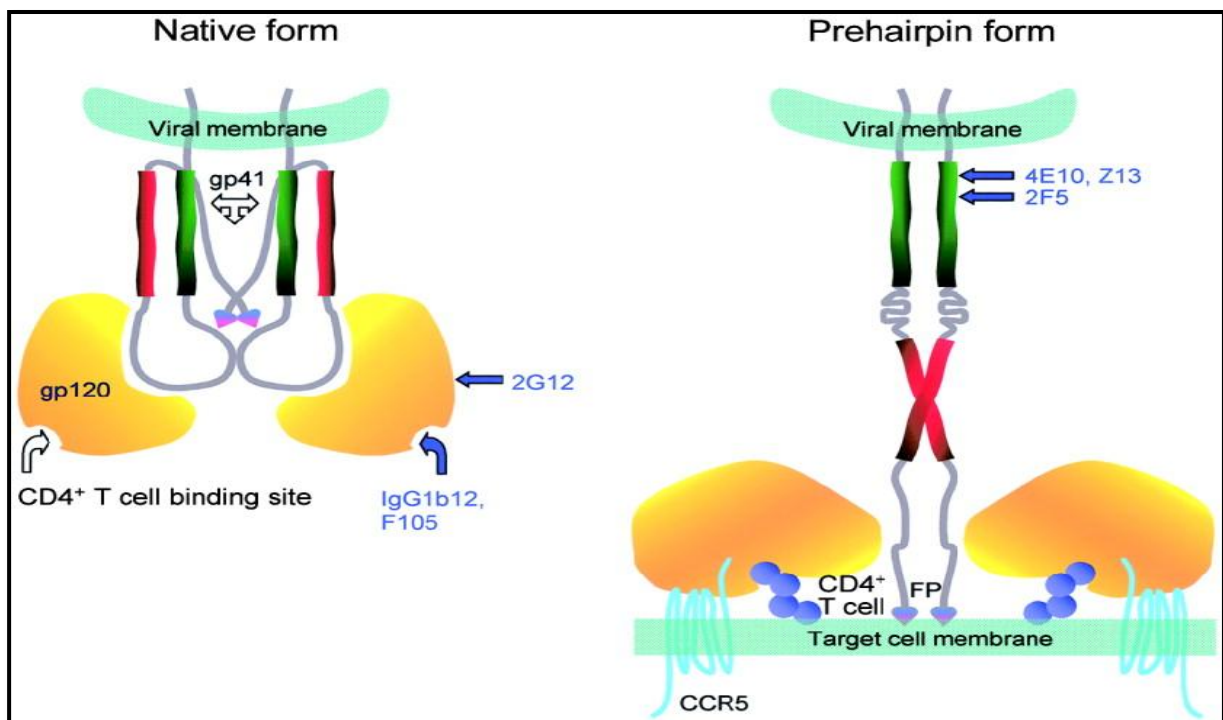
I když se podávání těchto proteinů ukázalo jako bezpečné, protilátková odpověď byla velmi nízká a omezená pouze na neutralizování primárních izolátů viru.

Protilátky vznikající při přirozené odpovědi imunity na antigen jsou polyklonální. Jsou zaměřené proti různým epitopům antigenu a tvořeny mnoha klony B lymfocytů, z hlediska svých vlastností jsou heterogenní. Naproti tomu monoklonální protilátky (mAb) jsou produktem jediného klonu B lymfocytů, jsou naprosto homogenní a přísně specifické proti jedinému epitopu. To z nich činí mimořádně vhodný nástroj přesné diagnostiky (Mascola, Montefiori, 2009). Byl vyvinut určitý počet mAb, které byly schopny neutralizovat různé podtypy HIV-1, což nasvědčuje tomu, že neutralizační protilátky mohou mít v dalších postupech velký potenciál. Z vědeckých studií, které se zaměřovaly na model makaků, je prokázáno, že podáváním neutralizačních protilátek se může zabránit infekce virem HIV, díky dosažení velké hladiny protilátek v těle (Mascola, 2000).

K pasivní imunizaci lze použít právě mAb vyrobené *in vitro*. Tyto protilátky se váží na virovou částici a blokují další infikování buněk.

Příkladem těchto protilátek jsou F105 a B12, popsané Ferrantelim a kolegy, které jsou specifické pro vazebné místo mezi CD4+ buňkami a proteinem gp120 (Ferranteli, 2002) (obr.7).

Použití těchto epitopů pro vývoj vakcíny je předmětem intenzivního studia. Monoklonální protilátka B12 má neobvyklé antigen vazebné místo, kterým se připojuje na gp120, čímž blokuje vazbu na CD4+ buňky (Garber, 2004). Další protilátky, 2F5 a 5E10 se zaměřují na vazbu gp41 s cílovou buňkou. Díky nim může být omezena rychlost fúze viru do buňky (Garber, 2004, Buton, 2004). Pochopení toho, jak správně vyvíjet imunogeny, které mohou napodobovat účinky těchto monoklonálních protilátek a které vyvolají produkci účinných neutralizačních protilátek proti široké škále cirkulujících kmenů HIV, zůstává výzvou (Duerr, 2006).



Obrázek 7

Umístění epitopů neutralizačních protilátek na gp120 gp41

(Ferranteli, 2002)

Tradiční modely vakcín jsou založené na technologii oslabeného viru, neporušeného mrtvého viru a na proteinové podjednotce. Ovšem tyto postupy jsou osvědčeny pro vývoj vakcíny naprosto jiných virů, než je HIV. V případě HIV tradiční vakcíny selhávají a nejsou schopny vyvolat dostatečnou imunitní odpověď, a to jak tvorbu neutralizačních protilátek (NAb), tak i efektivní odpověď u CD8+ T lymfocytů (Buton, 2004).

3.3 NOVÉ TYPY VAKCÍN

Jak již bylo zmíněno, tradiční modely vakcín zřejmě nejsou cestou pro vývoj vakcíny proti HIV. Proto se vědci snaží nacházet jiné strategie, které zahrnují především moderní genové technologie, mezi něž patří plasmidové DNA vakcíny a živé rekombinantní vektory, které jsou tvořeny, aby nesly HIV-1 antigeny.

Plasmidová DNA vakcína je velice perspektivním typem, díky své jednoduchosti a všestrannosti. V současnosti je ovšem je nutné aplikovat relativně větší dávky DNA vakcíny pro vyvolání detekovatelné odpovědi (Casimiro 2003, Graham 2006). Je proto nutné vyvinout ještě pomocné látky pro tyto DNA vakcíny tak, aby bylo možno snížit genovou dávku. Při očkování malých laboratorních zvířat a opic bylo prokázáno, že naočkovaná plasmidová DNA vakcína exprimuje virové proteiny, které vyvolávají humorální a buněčnou imunitní odpověď (Nchinda, 2008). Další práce ukázala, že tato imunogenita může být zvýšena pomocí plazmidů s pomocnými látkami nebo cytokiny (Liu, 2008). Velkou výhodou této vakcíny je její schopnost zprostředkování buněčné imunitní odpovědi (Egan, 2000). Použitečnost této vakcíny pro člověka stále zůstává otevřenou otázkou, zejména kvůli vysokým dávkám DNA vakcíny. Jednou z možností, jak tuto nevýhodu zvrátit, je bimodální typ vakcíny, kde se plasmidová DNA využije pro primární imunizaci a živý rekombinantní vektor se využije pro další posílení imunity („boost“) (Amara, 2001).

Tato vakcínová teorie se musí vyzkoušet na dobrovolnících, jelikož imonogenita živých vektorů může být omezena, již existující imunitou vůči těmto vektorovým organismům. Proto by se plasmidová DNA vakcína nemusela prokázat u lidí imunogenní odpověď, jako u myší a opic.

Jak ze studií vyplývá, mezi nejúčinnější vakcíny patří použití DNA plazmidu a živých rekombinantních vektorů. Živé rekombinantní vektory vznikají tak, že geny, které kódují proteiny HIV-1 jsou vkládány do různých genomů virů a bakterií (obr. 8). Pokud se tyto rekombinantní organismy dostanou do buňky hostitele a infikují ji, hostitel je schopen vyvinout adekvátní imunitní odpověď. Podmínkou samozřejmě je, aby infekce samotným vektorem nevyvolala žádné klinické onemocnění a byla dobře snášena (Letvin, Barouch, Monteforri, 2002).

Používané rekombinantní vektory jsou oslabené, nebo nemají možnost replikovat se, především je to adenovirus (Luckav 2007) a poxvirus (Amara 2001). Jiné virové vektory jsou založeny na virus vezikulární stomatidy (VSV), adeno-asociated virus (AAV), venezuelskou encefalitudu koní (VEE), herpes simplex virus (HSV) a virus spalniček. Dále se zkoumají i

bakteriální a mykobakteriální vektory, jako je na příklad Salmonella, Listerie a Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-vakcína proti tuberkulóze (Letvin,2002).

V dnešní době se největší pozornost zaměřuje na vektory na bázi poxvirů a adenovirů (Duer, 2006), přičemž zejména poxvirus patří mezi vektory, které jsou celosvětově velmi dobře hodnoceny.

První pokusy s virem vaccinie, obsahujícím antigeny SIV u modelů makaků a antigeny HIV u lidských subjektů, ukázaly schopnost této vakcíny vyvolat buněčnou imunitní odpověď (Shen, 1991). Ovšem obavy z možnosti šíření vaccinie v oblastech většího výskytu imunodeficientních jedinců, vedly k vytvoření více oslabených vektorů poxviru (Redfield, 1987). Modifikovaná vakcína viru Ankara (MVA) je silně oslabený virus vaccinie, který ztratil schopnost replikace v buňkách primátů a proto může být považován za bezpečnou vakcínu (Berzofski, 2004).

Mezi důležitou charakteristiku MVA patří, že je *in vivo* velmi oslabená, jak je doloženo u několika zvířecích modelů (Guerra, 2010). Použitím živého zobrazení *in vivo*, se ukázalo, že když se u myši naočkuje MVA různými cestami, lze virovou expresi detekovat po dobu 24h (Gómez, 2007). V lidských buňkách se MVA replikuje efektivně, ale není schopna vytvořit infekční virové částice (Gallego-Gómez, 2004).

Sekvenováním tohoto viru se ukázalo, že došlo ke ztrátě asi 30 kB na obou koncích virového genomu, včetně několika genů, které neutralizovaly hostitelské imunitní obranné mechanismy (Antoine, 1998). Tyto dalece virového genomu mají podíl na omezení replikace MVA a mohou vysvětlit změny v buněčných signálech, které se spouštějí v průběhu virové infekce (Guerra, 2010). Použitím microarray analýzy vědci ukázali, že MVA infekce lidských nezralých dendritických buněk (DC), vedla k indukci řady buněčných genů, které se podílejí na vrozené imunitní odpovědi. Jsou to hlavně geny pro interferon beta (IFN- β), RIG-I, MDA-5 a Toll-like receptory (TLRs) (Guerra, 2007).

Další klinické studie byly prováděny s MVA rekombinanty exprimujícími HIV-1 antigeny a to buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými vektory, které ukazují velikou škálu imunitní odpovědi na HIV (Gudmundsdotter, 2009). Vědci prokázali v programu EuroVacc, že MVA vektory exprimující HIV-1 antigeny Env/Gag-Pol-Nef aktivují u laboratorních myší specifickou imunitní odpověď proti HIV-1 antigenům (Gómez, 2007).

Imunitní odpověď se zvýší při použití DNA vektoru exprimujícího HIV antigeny, tyto imunitní reakce byly převážně typu Th 1 (Gómez, 2007). Podáním vektorů exprimující Env z

HIV-1 a Gag-Pol-Nef se u testovaných makaků zjistilo, že imunitní reakce vyvolaná kombinací DNA/MVA byla ovlivněna CD8+ odpovědí (Mooij, 2008).

Klinická fáze studie se vakcíny MVA se zdravými lidskými dobrovolníky se provádí ve Španělsku a výsledky budou známy koncem roku 2010. Ovšem díky výše zmíněným závěrům se ukazuje, že by mohl být velký přínos pro vývoj vakcíny proti HIV použití MVA vektorů (Guerra, 2010).

Mezi dalšími studovanými vektory je Canarypox. Pět různých struktur vektorů Canarypox, které obsahují geny HIV-1 podtypů B a E bylo testováno na více než 1500 subjektech. Vektory byly velmi dobře snášeny (Duerr, 2006).

Pod bezpečnostním dohledem byli testováni dobrovolníci, kterým byl naočkován rekombinantní vektor Canarypox, kterému se podařilo vyvolat až u 70% očkovaných HIV-1 specifickou odpověď. Dalším úspěchem bylo zjištění, že u 29% očkovaných se objevila také HIV-1 specifická CTL odpověď. Výhodou Canarypox je také zjištění, že vyvolává CTL odpověď u různých podtypů HIV-1 (Ferrari, 1997), což se zatím žádné vakcíně nepovedlo.

Nejnovější generace canarypox (ALVAC-HIV vCp1452), kóduje gp120, Gag protein a část Pol. Také obsahuje sekvenci kódující bílkoviny vaccinie (Davies, 1993), které inhibují apoptózu a prodlužují expresi proteinů v lidských buňkách (Fang, 2001). vCP1452 demonstruje efektivní expresi proteinů, což je pokrok oproti předchozím vektorům generace canarypox, vCP205 0.9 (Russell, 2007)

Adenovirus je další studovaný rekombinantní vektor. Tyto vektory byly původně vyvinuty pro genovou terapii. U malých laboratorních zvířat jsou vysoce imunogenní. Používají se k posílení primární imunitní odpovědi, kterou zprostředkovává plazmidová DNA. Tomuto vektoru se podařilo vyvolat imunitní odpověď proti viru Ebola (Sullivan, 2000).

Vektory Adenoviru sérotypu 5 (Ad5) se používají v klinických studiích jako základ vakcíny k navození humorální imunitní odpovědi. Imunitní reakce vyvolaná očkovacími látkami Ad5, však může být zmírněna v důsledku pre-existující Ad5 imunity (Gabitzch, 2009).

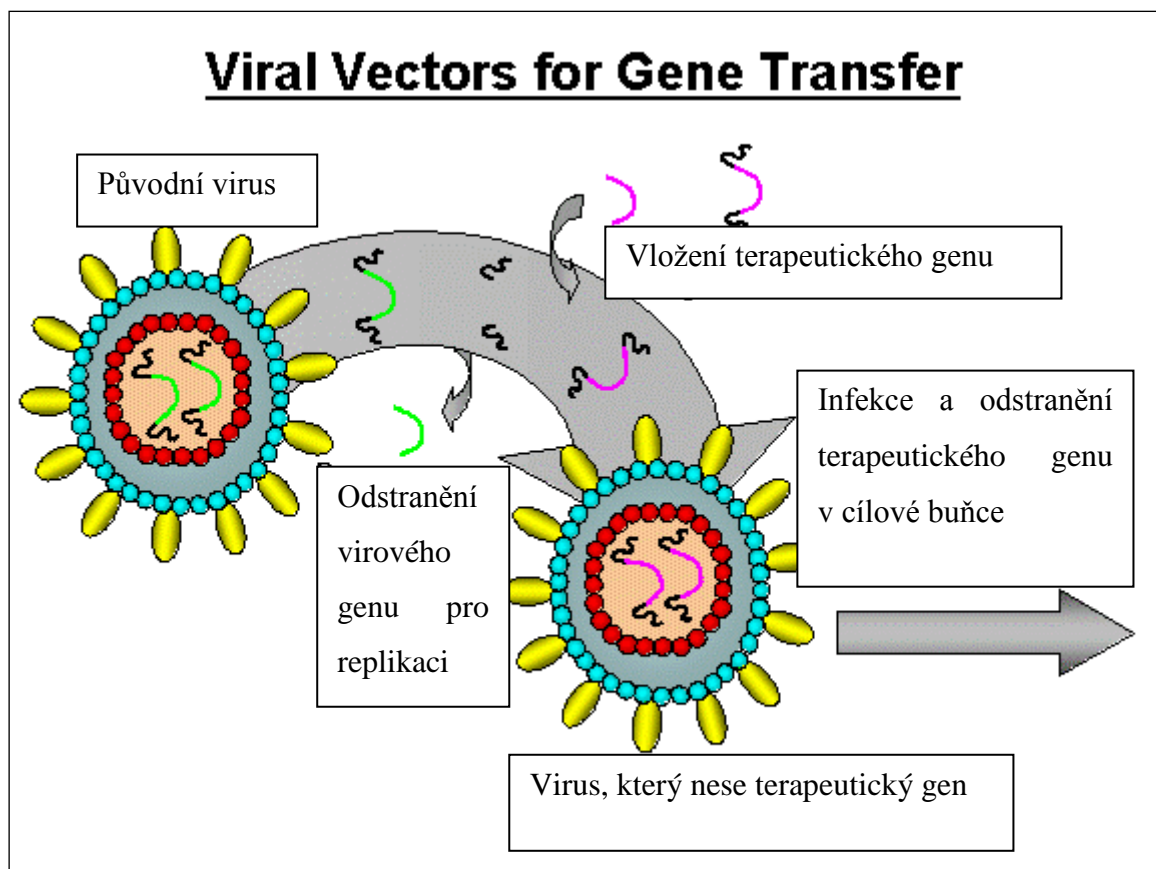
Vakcína obsahující vektor Ad5 by mohla vyvolat adekvátní imunitní odpověď na virus HIV. Vakcína, která je vytvořena pomocí Ad5, izolovaného od nižších druhů primátů. Takovéto viry nejsou přirozenými lidskými patogeny.

V pokročilé fázi klinického vývoje jsou dva produkty Ad5. První, který je vyráběný společností Merck, je směs 3 adenovirů, z nichž každý obsahuje kodon optimalizované geny *gag*, *pol* nebo *nef* HIV podtypu B. Vektory Adenoviru Merck, které obsahují osamocené *gag*

gen, nebo trojvaznou látku s geny *gag*, *pol* a *nef*, vyvolávají u makaků silnou CTL odpověď (Casimiro, 2003).

Druhá Ad5 kandidátní vakcína je vyráběná National Institute of Health's VRC. Je to směs 4 Adenovirů. Obsahuje geny *gag-pol* HIV podtypu B. Další tři Adenoviry obsahují geny pro obalové proteiny HIV podtypu A, B, nebo C. Tato vakcína by měla opět vyvolávat humorální a buněčnou odpověď, zejména pokud je aplikována spolu s DNA vakcínou (Seman, 2005).

Oba tyto přístupy jsou stále ve stádiu studia na zvířecích modelech (makaci).



Obrázek 8

Virové vektory

<http://huehueteotl.wordpress.com/2009/05/19/gene-transfer-technology-for-hiv-vaccine/>

Mezi bakteriální vektory, které si v této době zaslouží pozornost, jsou oslabené *Mycobacterium Bacille, Calmette-Guerin (BCG)* a některé oslabené střevní bakterie, které jsou patogenní (Letvin, 2002). Bakteriální vektory jsou navrženy tak, aby vyvolaly, zatím u opic, potřebnou virus-specifickou CTL odpověď (Yasutomi, 1993). Oslabené střevní bakterie,

jsou dalšími zkoumanými vektory. Používají se na sliznici trávicího traktu s úmyslem vyvolání slizniční imunitní reakce, specifické pro virové bílkoviny (Hone, 1996). Ovšem tyto studie vzbuzují menší zájem, než ostatní modely moderních typů vakcín.

Dalším typem nových modelů vakcín jsou imunogenní látky, které by mohly napodobovat strukturu obalového proteinu Env a byly schopny vyvolat protilátkovou odpověď. Je velmi náročné vytvořit správně složený oligomerní Env imunogen. Mezi první kandidáty patřil imunogen, který byl vyroben z neporušeného produktu genu *env* (Earl, 2001).

Nedávné pokroky pochopení procesu infekce HIV ukazují, že obaly viru prochází v průběhu virové fúze do buněčné membrány, řadou stereotypních konformačních změn. Současné pokusy se zabývají vytvořením imunogenní podjednotky, která by napodobovala všechny konformační změny obalu HIV. Výsledkem by mělo být vyvolání účinných protilátek, které by se vázaly na odlišné typy obalů.

Zpracování takové imunogenní vakcíny proti HIV by byl dramatický odklon od běžné vakcíny, tvořené virovou podjednotkou (Letvin, 2002). Jelikož by se jednalo o nový směr vývoje vakcíny, nezaměřené na podání oslabeného viru nebo rekombinantního vektoru, ale na napodobení části viru, která by byla schopna vyvolat tvorbu protilátek.

Přestože konečná konfigurace účinné vakcíny proti HIV zůstává nejasná, stále se setkáváme s větší shodou názorů, že budeme potřebovat více než jeden typ možné vakcíny. Proto se výzkum nasměřoval na vývoj bimodálního typu vakcíny, zmíněném výše.

Existuje mnoho studií a pokusů pro vývoj vakcíny proti HIV, ovšem jak se zdá jak tradiční modely, tak ani moderní designy vakcín, nezaznamenaly očekávaný výstup. Vyvolání neutralizačních protilátek a ohlídání vstupu viru do buňky pomocí humorálního imunitního systému

Závratná čísla nakažených lidí HIV volají po urgentní potřebě nové vakcíny.

4 ZÁVĚR

Doposud se nepodařilo vyvinout účinnou vakcínu proti HIV. Ovšem některé typy vakcín jsou v prvotních klinických studiích účinnější, než ostatní. Například použití DNA vakcíny spolu s rekombinantními vektory jiných druhů virů se zdá být vhodným směrem pro vývoj vakcíny. MVA patří v poslední době mezi nezkoumanějšími vektory. Má řadu výhod v lidských buňkách se replikuje efektivně, ale není schopna vytvořit infekční virové částice. Klinické studie, které se provádí s MVA rekombinanty, kteří exprimují HIV-1 antigeny

ukazují velkou škálu imunitní odpovědi na HIV. To je veliký pokrok ve vývoji, protože cílem účinné vakcíny je vyvolání imunitní odpovědi na virus, který vstoupí do hostitele.

Pro boj s HIV nemáme doposud mnoho zbraní. Důležitá je proto prevence a znalost způsobu přenosu z člověka na člověka. Pro přenos viru HIV je určující jeho přítomnost v krvi a sekretech pohlavního ústrojí nakažených osob. Sexuální přenos patří mezi nejčastější cesty šíření této infekce. Proto je důležité používání latexových bariér při sexuálním styku. Významnou roli při šíření infekce HIV mají také injekční toxikomani. U této skupiny lidí se i přes velkou snahu stále nedaří eliminovat parenterální přenos HIV infekce.

Vývoj vakcíny proti HIV je na vysoké úrovni, některé vakcíny se zkoušejí již na lidských dobrovolnících. Ovšem vakcína i přes všechno úsilí vědců zůstává vysoko vytyčeným cílem. Proto prevence je stále jedinou možností ochrany před virem HIV.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

Amara RR, et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*, 2001;292:69–74.

Antoine, G., F. Scheiflinger, F. Dorner, and F. G. Falkner. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 1998. 244:365–396.

Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O’Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma H-K, Grimm BD, Hulsey ML, Mc-Clure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. Control of a mucosal challenge and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by a multiprotein DNA/ MVA vaccine. *Science*, 2001. 292:69–74.

Baba, TW, et al. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science*, 1995. 267:1820-1825.

Barouch H. Dan, Challenges in the Development of an HIV-1 Vaccine: *Nature*. 2008 October 2; 455(7213): 613–619.

Berman, PW, et al. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature*, 1990. 345:622-625.

Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G. & Fuller, S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO Journal*, 2003. 22, 1707-1715.

Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature Immunology*, 2004; 5:233–6.

Davies MV, Chang HW, Jacobs BL, et al. The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *Journal of Virology*, 1993. 67:1688–1692.

Dennis R Burton, Ronald C Desrosiers, Robert W Doms, Wayne C Koff, Peter D Kwong, John P Moore, Gary J Nabel, Joseph Sodroski, Ian A Wilson & Richard T Watt, HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem, *Nature Immunology* 5, 2004. 233 – 236.

Casimiro DR, et al. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *Journal of Virology*, 2003;77:6305–13.

Clin J., Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections, *Journal of clinical Investigation.*, 2004. 114(4): 450-462 .

Cohen John and Martin Enserink, Nobel prize in physiology or medicine: HIV, HPV Researches Honored, But One Scientist Is Left Out, *Science* 10, October 2008: Vol. 322. no. 5899, pp. 174 – 175.

Crick Francis: Central dogma of molecular biology, *Nature*, August 8, 1970. vol.227.

Daniel, MD, Kirchhoff, F, Czajak, SC, Sehgal, PK, Desrosiers, RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science*, 1992. 258:1938-1941.

Duerr Ann, Judith N. Wasserheit, and Lawrence Corey, HIV Vaccines: New Frontiers in Vaccine Development, *Clinical Infectious Diseases*, 2006;43:500–511.

Earl PL, Sugiura W, Montefiori DC, Broder CC, Lee SA, Wild C, Lifson J, Moss B. Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140. *Journal of Virology*, 2001.75:645–53

Egan, MA, et al. Simian immunodeficiency virus (SIV) *gag* DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *Journal of Virology*, 2000. 74:7485-7495.

Egan MA, ChariniWA, Kuroda MJ, Voss G, Schmitz JE, Racz P, Tenner-Racz K, Manson K, Wyand M, Lifton MA, Nickerson CE, Fu T-M, Shiver JW, Letvin NL. Simian immunodeficiency virus (SIV) *gag* DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *Journal of Virology*, 2000. 74:7485–95

Fang ZY, Limbach K, Tartaglia J, et al. Expression of vaccinia E3L and K3L genes by a novel recombinant canarypox HIV vaccine vector enhances HIV-1 pseudovirion production and inhibits apoptosis in human cells. *Virology*, 2001;291:272–284.

Fauci Anthony S., 25 years of HIV, *Nature* 453, 15 May 2008. 289-290.

Ferrantelli F, Ruprecht RM. Neutralizing antibodies against HIV: back in the major leagues? *Current Opinion in Immunology*, 2002;14:495–502.

Ferrari G, Humphrey W, McElrath MJ, Excler J-L, Duliege A-M, Clements ML, Corey LC, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proceedings of the National Academy of Science*.1997. USA 4:1396–1401.

Fields, *Virology*, 5th Edition, 2007.

Gabitzsch ES, Y Xu, LH Yoshida, JP Balint, A Amalfitano and FR Jones, Novel adenovirus type 5 vaccine platform induces cellular immunity against HIV-1 Gag, Pol, Nef despite the presence of Ad5 immunity, *Retrovirology*, 2009, 6(Suppl 3):P367doi:10.1186/1742-4690-6-S3-P367.

Gallego-Go´mez, J. C., C. Risco, D. Rodríguez, P. Cabezas, S. Guerra, J. L. Carrascosa, and M. Esteban. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *Journal of Virology*, 2003. 77:10606–10622.

Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infectious Diseases*, 2004;4:397–413.

Go´mez, C. E., J. L. Najera, E. Domingo-Gil, L. Ochoa-Callejero, G. Gonzalez-Aseguinolaza, and M. Esteban. Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *Journal of general Virology*, 2007. 88:2473–2478.

Gómez, C. E., J. L. Najera, E. P. Jimenez, V. Jimenez, R. Wagner, M. Graf, M. J. Frachette, P. Liljestrom, G. Pantaleo, and M. Esteban. Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine*, 2007. 25:2863–2885.

Graham BS, et al. Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 DNA Candidate Vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 2006;194:1650–60.

Guerra Susana, Jose Manuel Gonzalez, Nuria Climent, Hugh Reyburn, Luis A. Lopez-Fernandez, Jose L. Najera, Carmen E. Gómez, Felipe García, Jose M. Gatell, Teresa Gallart, and Mariano Esteban, Selective Induction of Host Genes by MVA-B, a Candidate Vaccine against HIV/AIDS, *Journal of virology*, Aug. 2010, p. 8141–8152.

Guerra, S., J. L. Najera, J. M. Gonzalez, L. A. Lopez-Fernandez, N. Climent, J. M. Gatell, T. Gallart, and M. Esteban. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *Journal of Virology*, 2007. 81:8707–8721.

Gudmundsdotter, L., C. Nilsson, A. Brave, B. Hejdeman, P. Earl, B. Moss, M. Robb, J. Cox, N. Michael, M. Marovich, G. Biberfeld, E. Sandstrom, and B. Wahren. Recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) effectively boosts DNA-primed HIV-specific immune responses in humans despite preexisting vaccinia immunity. *Vaccine*, 2009. 27:4468–4474.

Hahn, B. H., Shaw, G. M., Arya, S. K., Popovic, M., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature*, 1984 312,166–169.

Harari A, et al. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *The Journal of experimental medicine*, 2008;205:63–77.

Hone DM, Wu S, Powell RJ, Pascual DW, Van Cott J, McGhee J, Fouts TR, Tuskan RG, Lewis GK. Optimization of live oral Salmonella-HIV-1 vaccine vectors for the induction of HIV-specific mucosal and systemic immune responses. *Journal of Biotechnology*, 1996. 44:203–7.

Hu S-L, Fultz PN, McClure HM, Eichberg, JW, Thomas EK, Zarling J, Singhal, MC, Kosowski SG, Swenson RB, Anderson, DC, Todaro G. Effect of immunization with a vaccinia-HIV env recombinant on HIV infection of chimpanzees. *Nature*, 1987 328:721–23.

Hu S-L, Abrams K, Barber GN, Moran P, Zarling JM, Langlois AJ, Kuller L, Morton WR, Benveniste RE. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glykoprotein gp160. *Science*, 1992. 255:456–59.

John B. Carter and Venetia A Saunders: *Virology: Principles and Applications* (2007).

Luckay A, et al. Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *Journal of Virology*, 2007;81:5257–69.

Liu J, Kjekken R, Mathiesen I, Barouch DH. Recruitment of antigen-presenting cells to the site of inoculation and augmentation of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccine immunogenicity by in vivo electroporation. *Journal of virology*, 2008;82:5643–9.

Mascola, JR, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000. 6:207-210

Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, et al. Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *Journal of Virology*, 1999. 73:4009–18.

Mascola R. John and David C. Montefiori, The Role of Antibodies in HIV Vaccines, *Annual Review of Immunology*, 2010. 28:413–44.

Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *Journal of General Virology*, 1991. 72:1031–38.

Mooij, P., S. S. Balla-Jhagjhoorsingh, G. Koopman, N. Beenhakker, P. van Haften, I. Baak, I. G. Nieuwenhuis, I. Kondova, R. Wagner, H. Wolf, C. E. Go´mez, J. L. Najera, V. Jimenez, M. Esteban, and J. L. Heeney. Differential CD4₊ versus CD8₊ T-cell responses elicited by different poxvi-
VOL. 84, 2010 SELECTIVE INDUCTION OF HOST GENES BY MVA-B 8151 virus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *Journal of Virology*, 2008. 82:2975–2988.

Moore, Richard D.; Chaisson, Richard E, Natural history of HIV infection in the_era of combination antiretroviral therapy, *AIDS*: 1 October 1999. Volume 13, Issue 14, pp 1933-1942.

Monini Paolo, Cecilia Sgadari, Elena Toschi, Giovanni Barillari & Barbara Ensoli, HIV life cycle, *Nature Reviews Cancer* 4, November 2004. 861-875 .

Nchinda Godwin, Janelle Kuroiwa, Margarita Oks, Christine Trumpfheller, Chae Gyu Park, Yaoxing Huang,³ Drew Hannaman, Sarah J. Schlesinger, Olga Mizenina, Michel C. Nussenzweig Klaus Überla, and Ralph M. Steinman, The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells, *Journal of Clinical Investigation.*, 2008 April 1. 118(4): 1427–1436.

Norman L. Letvin Volume 110, Issue 1. *Journal of Clinical Investigation*, 2002. 110(1): 15-27.

Norman L. Letvin, Dan H. Barouch¹, and David C. Montefiori. Prospects for valine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annual Review of Immunology*, April 2002, Vol. 20.

Ott, D.E. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Reviews in Medical Virology*, 2002. 12, 359-374.

Redfield RR, Wright DC, James WD, Jones TS, Brown C, Burke DS. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *New England Journal of Medicine*, 1987; 316:673–6.

Reimann, KA, et al. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate *env* causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *Journal of Virology*, 1996. 70:6922-6928.

Rosenberg, ES, et al. Vigorous HIV-1–specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, 1997. 278:1447-1450.

Russell Nina D., MD, Barney S. Graham, MD, PhD, Michael C. Keefer, MD, M. Juliana McElrath, MD, PhD, Steve G. Self, PhD, Kent J. Weinhold, PhD, David C. Montefiori, PhD, Guido Ferrari, PhD, Helen Horton, PhD, Georgia D. Tomaras, PhD, Sanjay Gurunathan, MD, Lynn Baglyos, Sharon E. Frey, MD, Mark J. Mulligan, MD, Clayton D. Harro, MD, Susan P. Buchbinder, MD, Lindsey R. Baden, MD, William A. Blattner, MD, Beryl A. Koblin, PhD, Lawrence Corey, MD, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases HIV Vaccine Trials Network, Phase 2 Study of an HIV-1 Canarypox Vaccine (vCP1452) Alone and in Combination With rgp120

Negative Results Fail to Trigger a Phase 3 Correlates Trial, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrom*, 2007 February 1; 44(2): 203–212.

Seaman MS, Xu L, Beaudry K, et al. Multiclade human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *Journal of Virology*, 2005; 79:2956–63.

Schmitz, JE, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*, 1999. 283:857-860.

Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R, Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*, 2005. 34, 233–244.

Singh Mahender, No vaccine against HIV yet-are we not perfectly equipped?, *Virology Journal* 2006, 3:60.

Shen L, Chen ZW, Miller MD, et al. Recombinant virus valine-induced SIV specific CD8⁺cytotoxic T lymphocytes. *Science*, 1991;252:440–3.

Strnad P, Haubová Š. & Ruml,T. Genom retrovirů a fyziologická funkce jeho produktů *Chemické listy* 97, (2003).

Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, 2000. 30:605–9.

Stevceva Lilijana, Victor Yoon, Daphne Anasasiades and Mark C. Poznaňský, Immune response to HIV gp120 that facilitate viral escape, *Current HIV Research*, 2007, 5, 47-54 47.

Thushan I. De Silva, Matthew Cotten and Satan L. Rolland-Jones, HIV-2: the forgotten AIDS virus, *Elsevier Ltd.*, October 2008. DOI:10.1016/j.tim2008.09.003, 27.

Vasudev R. Rao, Andrew R.Sas, Elišek A. Eugenik, Nagadenhalli B. Siddappa, Heather Bimonte-Nelson, Joan W. Berman, Udaykumar Ranga, William R. Tyor, Vinařka R. Prasat, HIV-1 clade-specific differences in induction of neuropathogenesis, *Journal of Neuroscience*, 1 October 2008, 28(40):10010-10016.

Vogt, V.M. Proteolytic processing and particle maturation. *Current topics in microbiology and Immunology*, 1996. 214, 95-131.

Yasutomi Y, Reimann KA, Lord CI, Miller MD, Letvin NL. Simian immunodeficiency virus specific CD8C lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *Journal of Virology*, 1993. 7:1707–11.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=rv&part=A314>

http://www.aidsmeds.com/articles/hiv_life_cycle_4707.shtml

http://www.janssen-cilag.cz/bgdisplay.jhtml?itemname=hiv_treatments&product=none

http://www.who.int/hiv/data/2009_global_summary.gif

<http://huehueteotl.wordpress.com/2009/05/19/gene-transfer-technology-for-hiv-vaccine/>