

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 013

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 3378

(22) Přihlášeno: 25.04.1996

(30) Právo přednosti:

25.04.1995 EP 1995/95201066

05.10.1995 NL 1995/1001348

(40) Zveřejněno: 15.04.1998

(Věstník č. 4/1998)

(47) Uděleno: 30.09.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 13.11.2002

(Věstník č. 11/2002)

(86) PCT číslo: PCT/EP96/01744

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 96/034105

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 N 15/30

C 12 N 15/85

C 07 K 14/445

A 61 K 39/015

(73) Majitel patentu:

RMF DICTAGENE S. A., Prilly, CH;

(72) Původce vynálezu:

Fasel Nicolas Joseph, Epalinges, CH;

Reymond Christophe Dominique, Prilly, CH;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Modifikované polypeptidy vykazující zvýšenou
imunogenitu**

(57) Anotace:

Popisuje se rekombinantní polypeptid, vykazující zvýšenou imunogenicitu a obsahující glykosylfosfatidylinositolovou strukturu. Polypeptidem je například antigen, jako je polypeptid parazita, zejména polypeptid z Plasmodium falciparum, jako je protein cirkumsporozoit (CSP). Dále se popisuje rekombinantní DNK vektor vhodný pro expresi polypeptidu, způsoby vyvolání imunitní odpovědi proti jednomu nebo více epitopů polypeptidu a způsoby produkce modifikovaných polypeptidových vakcín, které obsahují polypeptid.

CZ 291013 B6

Modifikované polypeptidy vykazující zvýšenou imunogenitu

Oblast techniky

5

Vynález se týká modifikovaných polypeptidů vykazujících zvýšenou imunogenitu, zvláště polypeptidů, které se modifikovaly lipidovou strukturou. Vynález zvláště popisuje polypeptidy parazitů, které se modifikovaly lipidovou strukturou, a přesněji protein cirkumsporozoit *Plasmodium falciparum*. Vynález se dále týká způsobu vyvolání imunní odezvy proti modifikovaným polypeptidům, způsobu, vektoru a hostitele, které jsou vhodné pro produkci polypeptidů, a vakcín, jež obsahují tyto polypeptidy.

10

Dosavadní stav techniky

15

Imunitní systém je komplex a není zcela pochopen. Způsob, kterým hostitelský imunitní systém rozeznává cizorodý imunogen, je vysvětlen pouze z části. U savců, jestliže se vystaví působení cizorodých proteinů, je imunitní odezva značně různorodá. Středem zájmu je proto libovolná metoda přípravy polypeptidů se zvýšenou imunogenitou. Tímto způsobem se dá překovat problém slabě imunogenních epitopů.

20

Jedním způsobem, jak zdokonalit vakcinaci pomocí rekombinantních proteinů, je produkce více epitopů z více jak jednoho proteinu, který pochází z jednoho nebo více infekčních agens. Tento přístup umožňuje získat levnější polyvalentní, účinnější vakcíny, které umožňují jednodušší a bezpečnější imunizační režim. Avšak takový přístup vyžaduje, že každý polypeptid se produkuje v dostatečném množství, specifický protokol pro čištění každého peptidu, který se používá k imunizaci, zabezpečení optimálního množství peptidu. Účelem imunizace je najít přístupy, kde se vyvolá silná imunitní odezva proti specifickým epitopům, zatímco imunigeny mají nízkou kvalitu nebo jsou ve směsi jiných polypeptidů, jak se může pozorovat v určitých situacích *in vivo*.

30

Nejčastěji se vyskytující kauzativní agens malárie je *Plasmodium falciparum*, který se nachází v různých formách ve hmyzích a lidských hostitelích. Při použití inaktivních forem parazitů jako vakcín určených pro savce se získaly slibné výsledky. Hlavní omezení však je skutečnost, že sporozity není možné kultivovat a musí se izolovat ze slinných žláz komárů. Za účelem získat ochranu se vylučuje použití inaktivovaného parazita jako takového.

35

Z důvodu obejít tento problém se exprimovaly v heterologních rekombinantních systémech geny kódující specifické proteiny různých forem *Plasmodia*. Tyto proteiny se s omezeným úspěchem použily jako potenciální ochranný agens hostitele. V jiném případě se v imunizační studii využily peptidy, které odpovídají definovaným oblastem antigenů, což vykazuje jistá omezení v případě takových imunizací. Protein cirkumsporozoit (CSP) je jeden z antigenů, které jsou přítomny na povrchu sporozit *Plasmodium falciparum*, které se do organismu dostávají hmyzím štípnutím. Tento protein se syntetizuje jako prekurzor polypeptidu, který se skládá z odstranitelné signální sekvence N-konce, z velké centrální repetice, která je na obou stranách lemována oblastmi, zde označenými jako oblast I a oblast II, a která obsahuje sekvence, jež jsou u různých druhů *Plasmodia* konzervativní, a z hydrofóbní domény C-konce. Opakující se doména NANP se skládá z tandemové repetice klastru aminokyselin asparagin-alanin-asparagin-prolin ((ASN-ALA-ASN-PRO)_n). Ukázalo se, že jde o účinný epitop CSP *P. falciparum*, na který reagují B-buňky. Syntetické peptidy, obsahující takovou repetici, se používají s omezeným úspěchem jako podjednotky vakcíny v imunizační studii. Mapovaly se elementy odezvy T-buněk na CSP protein vně segmentů repetice. V každém experimentu se pro imunizaci použilo velké množství čištěných antigenů.

50

55

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je poskytnout modifikované proteiny, jako jsou proteiny *Plasmodium falciparum*, které mohou vyvolat silnou imunitní odezvu i v případě, že antigeny parazity nejsou
 5 čištěny. Tento přístup je zajímavý z hlediska dalšího vývoje vakcín obsahujících celé buňky, které umožňují levnější ale účinnější imunizační režimy.

Zjistilo se, podle vynálezu, že antigen, k němuž se přidá glykosylfosfatidylinositolová kotva (GPI) vyvolá vyšší imunitní odezvu, než odpovídající antigen bez kotvy.
 10

Vynález tedy poskytuje rekombinantní polypeptidy vykazující zvýšenou imunogenitu, obsahující glykosylfosfatidylinositolovou strukturu, která slouží k vyvolání zvýšené imunitní odezvy ve srovnání s odpovídajícími polypeptidy bez kotvy. Polypeptidem může být antigen, přednost se dává antigenu parazita, jako je antigen *Plasmodium falciparum* podobný proteinu
 15 cirkumsporozoit *Plasmodium falciparum* (CSP) nebo jeho modifikovaná verze.

V popisu a v patentových nárocích používaný termín „nebo jeho modifikovaná verze“ znamená inkorporaci libovolného derivátu proteinu cirkumsporozoit, který vykazuje dostatečnou imunogenitu, aby došlo k vyvolání imunitní odezvy. Do toho termínu se zahrnují ne pouze celé
 20 proteiny, ale také fragmenty nebo jejich mutované verze.

Vynález se zde popisuje jako CSP protein *Plasmodia falciparum*. Avšak vynález není omezen pouze na tento antigen. Pro odborníka je jednoduché nahradit CSP jinými požadovatelnými antigeny, a tak získat výhodu vynálezu bez nutných experimentů.
 25

Expresí CSP se dosáhlo v heterologních rekombinantních systémech (*E. coli*, kvasinky, virus *Vaccinia*, bakulovirus, *Salmonella*, *Distyostelium discoideum*). Zjistilo se, že druhy slizovky *Distyostelium* se mohou použít jako účinný eukaryotní expresní systém pro produkci rekombinantních proteinů. Ve srovnání s jinými expresními systémy *Distyostelium* může
 30 produkovat zcela stabilní polypeptid CSP (Fasel, N., Begdadi-Rais, C., Bernard, M., Born, C., Corradin, G., and Reymond, C.D., (1992) *Gene* 111, 157–163). Tento systém se pak používá za účelem získání silnější a déle trvající imunitní ochrany, protože nese každý epitop B a T buněk.

Slizovky *Distyostelium* je organizmus vhodný pro použití při biotechnologických výrobcích. Je to volně žijící organizmus, jednoduše se kultivuje i udržuje. Kmeny rostou na vrstvě bakterií, kde čas zdvojení je 3 hodiny, v semisyntetickém médiu obsahující glukózu, pepton a kvasinkový extrakt, kde doba zdvojení je okolo 12 hodin nebo v bakteriálních suspenzích, kde dosahují
 35 vysoké hustoty (až 10^{10} buněk na litr).

Životní cyklus *Distyostelium* zahrnuje růstovou a vývojovou fázi. Vývojová fáze se spouští vyhladověním buněk a charakterizuje se agregací buněk, které se před tím vyskytovaly jednotlivě. Agregací vzniká vícebuněčný organizmus, který se pak diferencuje a produkuje se spóry. V přítomnosti bakterií nebo v bohatém médiu spóry vyklíčí, což vede k obnovení růstu. Během tohoto vývojového cyklu se produkuje difúzovatelné faktory. Nejméně jeden z nich (cAMP) tím, že se váže na svůj receptor vyvolává transkripci kazety specifických genů (Loomis, The Development Of *Distyostelium discoideum*, Acad. Press, 1982). Růstové vlastnosti a transformační kapacita *Distyostelium discoideum* umožňují expresi cizích proteinů, potom se buňky mohou levně kultivovat na bakteriích a exprese specifických proteinů se může kontrolovat vyhladověním v na živiny chudém médiu. *Distyostelium discoideum* je bezpečný, netoxický, nepatogenní volně žijící organizmus, který by se mohl uplatnit při vývoji celobuněčné vakcíny, avšak pro veterinární účely.
 40
 45
 50

Dictyostelium discoideum se pak může použít za účelem produkce modifikovaných polypeptidů podle vynálezu. Buňky se transformují vhodným vektorem, kultivují se za podmínek, které umožňují expresi a izolaci polypeptidu. Vhodný vektor zahrnuje sekvenci DNK kódující
 55

polypeptid, jehož DNK je spojena s přídatnou glykolipidovou kotevní sekvencí, která se nachází po směru jeho transkripce, a s vhodnou iniciační a terminační sekvencí. Sekvence DNK přednostně kóduje antigen parazita, jako je antigen *Plasmodium falciparum*, protein cirkumsporozyt *P. Falciparum* (CSP) nebo jeho modifikovanou verzi.

5

Řada povrchových buněčných proteinů v různých organizmech je zakotvena v membránové lipidové dvojvrstvě pomocí lykosylfosfatidylinositolové struktury (GPI). Tato komplexní struktura se syntetizuje jako prekurzor glykolipidu a v endoplazmatickém retikulu se přeměňuje na glykoproteiny. Přeměna preformované kotvy GPI na určitý polypeptid je možná pouze, je-li
10 příslušná signální sekvence (zde označovaná jako „přídavná glykolipidová kotevní sekvence“) obsažena v oblasti C–konce cílového proteinu. Ukázalo se, že signální sekvence je zahrnuta do skupiny 10 až 12 zbytků umístěné proti směru transkripce hydrofóbní sekvence C–konce. Dále se ukázalo, že v případě *Distyostelium* specifické proteiny jsou ukotveny pomocí GPI. Definovaly se determinanty sekvence C–konce pro jeden z těchto proteinů, jmenovitě kontaktní místo A
15 (Noegel, A., Gerisch, G. Stadler, J. and Westphal, M. (1986) EMBO J. 5, 1473–1476). Poté, co se kotva GPI přemění na polypeptid, může se štěpit specifickou fosfolipázou (GPI–fosfolipáza C nebo D), což vede k modifikaci hydrofóbní povahy proteinu a to se projeví odlišným dělením zvláště v detergentu, TX–114.

20 Podle vynálezu vektorová rekombinantní DNK obsahuje přídatnou glykolipidovou kotvici sekvenci, která se odvodila od kontaktního místa a *D. discoideum*.

Vynález dále popisuje způsob produkce protilátek proti jednomu nebo více epitopů polypeptidu. Tato metoda zahrnuje imunizaci vhodného hostitele (například savce) za použití polypeptidu
25 podle vynálezu a izolaci protilátek, které takto vznikají. Jako alternativní postup se může použít celé sérum. Pro imunizaci se upřednostňuje použití polypeptidu ve formě celobuněčného lyzátu hostitelských buněk exprimujících polypeptid.

Dále se vynález týká vakcíny pro imunizaci hostitele, kterým je savec. Vakcína obsahuje
30 modifikovaný polypeptid podle vynálezu v množství, které je imunoprotektivní, spolu s vhodným excipientem. Imunoprotektivní množství znamená obsah polypeptidu obsaženého v například $1-5 \times 10^7$, zejména v 2×10^7 hostitelských buněk transformovaných vektorem kódujícím polypeptid a přídatnou glykolipidovou kotvici sekvenci.

35

Popis obrázků na výkresech

Na obrázku č. 1 jsou znázorněny expresivní vektory pro protein cirkumsporozyt (CSP).

40 Část A. Přesnější popis konstrukce těchto dvou vektorů se uvádí v textu. Protein CSP, kterému chybí prvních 18 aminokyselin, se fúzoval do rámce k vedoucímu peptidu UAG z *P. falciparum* za UAA je konstrukce vektoru pEDII–CS49. Vektor pERIV–CS je odvozený z pERII (v textu), který obsahuje Tn5 neoR gen mezi promotorem aktinu 15 a terminačními sekvencemi. GPI kotvící doména proteinu CsA se umístila do rámce C. konce CSP (část B). Symboly „Diskoidin
45 I“ a „ras“ označující sekvence podporující transkripci v buňkách *Distyostelium*. Šipky ukazují na počáteční místa transkripce. Číslo I, II a III označují vysoce konzervativní domény proteinu CSP.

Část B. Ve vektoru pERIV–CS CSP hydrofóbní doména se zaměnila za posledních 49 aminokyselin proteinu CsA. Během klonování se přidal další prolin (P) mezi sekvence CSP
50 (podtrženo) a CsA.

Na obrázku č. 2 je znázorněna fosfolipidová modifikace CSP exprimovaného v buňkách *Discoideum*. Proteiny extrahované z přibližně 2×10^6 buněk se kultivovaly s jednou jednotkou (dráha 1) nebo s 5 jednotkami (dráha 5) enzymu GPI–PLD po dobu jedné hodiny. Pak se
55 separovaly do TX–114 fáze (Bordier, shora uvedeno) a analyzovaly se imunoblotem. Stabilně

transformované buňky se lyzovaly a separovaly se SDS PAGE proteiny se dále přenesly na nitrocelulóзовou membránu. CSP se identifikovalo imunodetekcí použitím (NANP)₅₀ monoklonálních protilátek Sp3E9. Molekulová hmotnost proteinu CSP (62kDa) se odhadla použitím těchto standardů: fosforyláza b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin vaječného bílku (42,7 kDa).

Význam symbolů: Aq: vodní fáze; Tx: TX-114 detergentová fáze; 0: vzorky, kde se neaplikoval enzym GPI-PLD.

10 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Úvod

15 Následující příklad popisuje produkci CSP *Plasmodium falciparum*, který se modifikuje v *Distyostelium discoideum* přidáním glykolipidové kotvy a jeho použití při imunizaci. Polypeptid se exprimoval ve slizovce *Distyostelium discoideum* fúzí vedoucího polypeptidu a přidávané glykosylfosfatidylinositolové signální sekvence (GPI) získané z kontaktního místa A *Distyostelium*.

20 Myši se imunizovaly celobuněčným lyzátem kultury *Distyostelia*, kde se exprimuje GPI modifikovaný protein. Vznikají protilátky, které rozeznávají dvě různé oblasti polypeptidu. GPI modifikované polypeptidy se mohou exprimovat v buňkách *Distyostelia*. Jak polypeptidy v izolované formě, tak buňky obsahující polypeptidy se mohou použít při imunizaci, 25 v diagnostických testech, v základních studiích nebo mají potenciál pro vakcinaci.

Příklad 2: Materiály a způsoby

30 V následujících experimentech se používá řada metod, které jsou pro odborníka v oblasti molekulární biologie, chemie proteinů a imunologie dobře známé a dostupné. Takové metody se nepopisují vždy do detailů.

Enzymy se získaly z komerčních zdrojů a používají se způsobem, který doporučuje výrobce.

35 Bakteriální média a způsobu klonování se popisují v publikaci Sambrook et al. (Molecular cloning: A Laboratory Manual, CSH press 1989).

40 Monoklonální protilátky a NANP₅₀ se získaly od F. Sinaglia (Hoffman La Roche Ald, Basel).

Příklad 3: Konstrukce plazmidů obsahující CS

Vektor pEDI-CS 49

45 Expresivní vektor pEDI-CS se skládá z vektoru pVEII (Maniak and Nelle, (1990) Nucl. Acids, Res. 18, 5375), který obsahuje elementy důležité pro rozmnožování a udržování prokaryontního hostitele (počáteční místo replikace a gen rezistence a ampicilin), a z Tn903, který nese gen pro rezistenci na neomycin zajišťující u eukaryontních buněk rezistenci na geneticin (G418) za řízení transkripční jednotky aktinu 15 z *Distyostelia*. Přítomnost promotoru Discoidin 1 umožňuje vývojové řízení exprese sekvencí orientovaných po směru transkripce a sekvence aktinu 8 zajišťují správnou terminaci RNK.

55 Při konstrukci expresního vektoru pED-CS se HaeIII/RsaI restriční fragment o velikosti 1 161 bp genu CS NF54 (Caspers, P., Genz, R., Matile, H., Pink, J. R., and Sinigaglia, F. (1989)

Mol. Biochem. Parisitol. 35, 185–189) nejdříve začlenil do Asp718/BamHI restričního místa vektoru pVEII pomocí Klenow DNK polymerázy. Dále se na DNK syntetizéru, Applied Biosystem Model 380 B, syntetizovaly oba DNK řetězce sekvence kódující vedoucí peptid kontaktního místa A (CsA) a tři další aminokyseliny. Nukleotidová sekvence syntetického vedoucího peptidu je následující:

5' -ATGTCTAGATTTTTAGTATTGATAATATTATATAATATTTTAAATAGTGCACATTCAG
CTCCAACCCAGGATCCATG-3'

Sekvence se potvrdila sekvenováním replikovatelné formy M13mp18, kam se do restričního místa SmaI začlenil fragment z tupými konci.

10 Izoloval se XbaI/BamHI restriční fragment obsahující CsA vedoucí peptid a začlenil se do XbaI/BamHI restričního místa ve vektoru za vzniku expresivního vektoru pEDII-CS. V expresivním vektoru pEDII-CS se přirozený terminační kodón UAG zaměnil za UAA terminační kodón. Tato změna proběhla tak, že velká část oblasti kódující CSP se nahradila fragmentem DNK aplikovaným za použití specifických oligonukleotidů:

15 5' amplimér (umístěný po směru transkripce sekvence vedoucího peptidu CsA, obsahuje BamHI restriční místo):

5' -ACCCAGGATACCCTTATTCCAG-3'

20 3' amplimér (odpovídající posledním kodónům genu CSP, ale obsahuje UAA terminační kodón a restriční místo SacI):

5' -AAAGCCGAGCTCTTAATTAAGGAACAAGAAGGATAAT-3'

25 Tyto oligonukleotidy nesou specifická restriční místa BamHI a SacI, která se také nacházejí ve vektoru pEDII-CS a použily se při náhradě segmentu genu CSP vektoru pEDII-CS. Při použití této strategie se získal expresivní vektor pEDII-CS49, který produkuje protein CSP s jeho původním C-terminálním polypeptidem.

Vektor pERIV-CS

30 Za účelem exprese GPI modifikované formy proteinu CSP se zkonstruoval plazmid pERIV-CS. Tento plazmid vznikl z pERIV, který sám vznikl z pERII. Jde o plazmid, který je kombinací fragmentu ras promotoru z *Distyostelium*, signálního peptidu CsA, terminační sekvence aktinu 6 a kazety neoR ve vektoru pGEM3. Za použití restričního enzymu EcoRV se z pDneo2 izolovala kazeta neoR, která zahrnuje promotor aktinu 15 z *Distyostelium*, bakteriální gen rezistance Tn903 a terminační sekvenci aktinu 15 z *Distyostelium* (Witke, W., Nellen, W., and Noegel, A.
35 (1987). EMBO J. 6, 4141–4148) a začlenila se do pGEM13 (Promega corp.). Fragment izolovaný z vektoru pERI-CS zahrnující ras promotor z *Distyostelium*–signální peptid CsA (Fasel et al., dříve uvedeno) se začlenil mezi restriční místa BamHI a EcoRI. Terminální sekvence aktinu 6 z pDneo2 se nejdříve klonovala do HindIII místa plazmidu pGEM4 (Promega corp.), aby se získalo druhé restriční místo a pak se znovu izolovala a začlenila se do BamHI restričního
40 místa, které leží vedle signálního peptidu CsA. Konstrukce obsahující terminační sekvenci aktinu 6 ve správné orientaci se nazvala pERII. Tento plazmid se štěpil enzymy EcoRV/XhoI a fragment DNK získaný amplifikací oblasti obsahující přídavnou glykosylfosfatidylinositolovou kotevní sekvenci se začlenil za použití vhodných restričních míst. Dva oligonukleotidy používané při amplifikaci mají následující sekvenci:

5' amplimér (obsahující restrikční místo EcoRV)

5' - CCCGGTACCAGGCTGATATCTCCAACTCCAACTGAAAC - 3'

3' amplimér (obsahující restrikční místo XhoI)

5' - CGGCTCGAGTTAAATTAATAAAACAAAAGAAATG - 3'

Plazmid pERIV se štěpil enzymy Asp718/EcoRV a do tohoto plazmidu se včlenila alela CSP NF54. DNK proteinu CSP, která obsahuje gen CSP, ale nezahrnuje signálního peptidu N-konce a hydrofóbní segmenty C-konce kódujících CSP, se získala amplifikací za použití následujících amplimérů:

5' amplimér (obsahující restrikční místo Asp 718)

5' CCCGGTACCATTATTCCAGGAATACCAGTGC - 3'

3' amplimér (obsahující restrikční místo HaeIII, které se může spojit s reatrickčním místem EcoRV)

5' - ATAGGCCACATTTTCCATTTTACAAATTTTTTTTTTC - 3'

Amplifikovaná DNK se po štěpení enzymy ASP178 a HaeIII začlenila mezi restrikční místa Asp718 a EcoRV plazmidu pERIV. Získaný plazmid se označil pERIV-CS.

Příklad 4: Kultivace buněk *Distyostelia*, transformace a exprese

Buňky *Distyostelia* se kultivují v míchané suspenzi v médiu HL-5 až dosáhnou hustoty 5×10^6 buněk/ml a nechají se vyhladovět v PDF (pufrovací ředící roztok) (Sussman, M. (1987) *Methods in Cell Biology* (Spudich, J. A., ed.) pp9-29, Acad. Press, Inc., Orlando, FL). Různé vektory se vnesly do buněk elektroporací a exprimující buňky se vybraly způsobem, který se popisuje v publikaci Nellen, W., and Firtel, R. A. (1985) *Gene* 39, 155-163; Howard, P.K., Ahern, K.G., and Firtel, A. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 2613-1623).

Při exprese závislé na promotoru Discoidin I se buňky *D. discoideum* vyhladověly po dobu 4 hodin v míchané suspenzi (160 ot./min.) v PDF při hustotě buněk 5×10^6 buněk/ml pokud není uvedeno jinak (Fasel et al., shora uvedeno).

V případě konstrukcí s *ras* promotorem se buňky vyhladověly po dobu 6 hodin v míchané suspenzi v PDF při hustotě buněk okolo 5×10^6 buněk/ml a transkripce se vyvolala přidáním 200 μ M cAMP a 10nM DIF (faktor vyvolávající diferenciaci) (Morris, H.R., Taylor, G.W., Massento, M.S., Jermyn, K.A. Kay, R.R. (1987), *Nature* 328, 81-814) po dobu jedné hodiny pokud není uvedeno jinak (Louvion, J.F., Scholder, J. C., Pinaud, S., and Reymond, C.D. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19, 6133-6138).

Příklad 5: Analýza proteinu

Proteiny izolované z 2×10^6 buněk (v komůrce o šířce 4 mm) se povařily a 1x ředěním Laemmli pufro po dobu 5 min., separovaly se na 10% SDS-PAGE (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Proteiny se přenesly elektropřenosem na nitrocelulózu

(imunoblot). K filtru se přidalo padesát mikrogramů na mililitr anti-NANP monoklonálních protilátek (Sp3E9) (Boulanger, N., Matile, H., and Betschart, B. (1988) Acta. Tropica 45, 55–65) a vše se inkubovalo přes noc při teplotě místnosti. Pro detekci navázaných anti-NANP protilátek se použil protein A konjugovaný s alkalickou fosfatázou a chemoluminiscenční reakce (Amersham).

Příklad 6: GPI-fosfolipázový D-test

Testovala se citlivost CSP modifikovaného pomocí GPI na GPI-fosfolipázu D (GPI-PLD). Buňky s vektorem pERIV-CS se lyzovaly v roztoku 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,1M CaCl₂, 0,08 % TX-100 ve čtyřech cyklech zmrazení a rozmrazení. K extraktu se přidalo jedna nebo pět jednotek enzymu GPI-PLD (Bohringer Mannheim) a směs se inkubovala po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C. Pak se přidal detergent TX-114 v roztoku 1xTBS obsahující 1mM EDTA tak, aby konečná koncentrace byla 1% a separovala se vodní a detergentová fáze. Vzorky se rozdělily na 10 % SDS polyakrylovém gelu a analyzovaly se imunoblotováním pomocí SP3E9 monoklonálních protilátek, jak se popisuje shora.

Příklad 7: ELISA

Sérum a monoklonální protilátky vytvořené proti N-konci (aminokyseliny 22 až 125), repetici NANP peptidu nebo C-terminálnímu (aminokyseliny 289 až 390) segmentu se testovaly ELISOU. Vinylové destičky se potáhly různými peptidy, promyly se a blokovaly 1 % BSA v roztoku PBS. Monoklonální nebo sérové protilátky se sériově naředily v roztoku 1 % BSA/PBS, který obsahuje 0,05 % Tween 20. Ředěná séra se přidala do antigenem potažených komůrek a inkubovala se po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Destičky se promyly roztokem PBS obsahujícím 0,05 % Tween 20 a přidalo se vhodné ředění specifických anti-IgG navázaných na peroxidázu. Vše se inkubovalo po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Do každé komůrky se přidalo 100 μl roztoku peroxidázového substrátu a stanovila se A410. V případě myších sér se jako poslední bod titrační křivky pro ELISU stanovilo ředění séra, které vykazuje hodnotu absorbance 2 SD větší než je průměr kontrolních myší.

Příklad 8: Imunizace zvířat a analýza antisér

Balb/c myšim se podkožní nebo intraperitoneální injekcí aplikovalo dvakrát 25 μl nebo jednou 50 μl sonikované směsi neúplného Freundova adjuvans a 2x10⁷ buněk v poměru 1:1. Po 4 týdnech se aplikace injekce zopakovala se stejným materiálem. Po 10 dnech se shromáždila séra a analyzovala se ELISOU:

Příklad 9.: Dosažené výsledky

Exprimoval se CSP modifikovaný GPI a použil se při vývoji živé vakcíny nebo diagnostického testu. Hydrofóbní terminální segment CSP (posledních 23 aminokyselin) se nahradil posledními 49 aminokyselinami kontaktního místa A (CsA) polypeptidu obsahujícího GPI kotvicí doménu (Noegel et al., dříve uvedeno) (obrázek č. 1A a B). Fúzní gen CSP/CsA se začlenil tak, aby jeho exprese byla řízena promotorem *ras* (Louvin et al., shora uvedeno, Fasel et al., shora uvedeno). Konstrukce se zavedla do buněk *D. discoideum* (pERIV-CS). Pro zjištění přítomnosti CSP na povrchu buněk s vektorem pERIV-CS (se použily anti-CSP protilátky (data nejsou publikovány). Promotor *ras* způsobil, že pouze 20 až 40 % indukovaných buněk vykazovalo expresi. Byly to ty buňky, které se diferencují na *prestalk cells* (Reymond, C.D., Gomer, R.H., Mehdy, C., and Firtel, R.A. (1984) Cell 39, 141–148).

Fúzní protein CSP/CsA produkovaný kulturou *Distyostelium discoideum* má amfifilický charakter, což se očekává od proteinu modifikovaného GPI (Bordier, C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1604–1607, Conzelmann, A., Spiazzi, A., Hyman, R., and Bron, C. (1986) EMBO J. 5, 3291–3296), protože přechází do detergentové fáze TX-114 (obrázek č. 2). Za účelem potvrzení výskytu GPI kotvy ve CSP/CsA fúzním proteinu se buňky lyzovaly ve třech cyklech mrazení a opětného rozmrazení v 0,008 % TX-100. Buněčné lyzáty se trávily po dobu jedné hodiny s 1 nebo 5 jednotkami GPI-PLD. Odstranění lipidové části fúzního proteinu CSP/CsA pomocí 5-ti jednotek GPI-PLD změnilo jeho hydrofóbní charakter a vyvolalo jeho přechod do vodní fáze (obrázek č.: 2), zatímco inkubace s jednou jednotkou enzymu měla omezený účinek. Tyto výsledky naznačují přítomnost GPI struktury v proteinu CSP exprimovaném v buňkách *Distyostelia*, což znamená, že *Distyostelium discoideum* může produkovat, zpracovat a modifikovat heterologní proteiny parazitů přidáním GPI kotvy.

Za účelem potvrzení schopnosti CSP modifikované GPI vyvolat imunitní odezvu se osum Balb/c myši podkožně nebo intraperitoneálně imunizovalo s 2×10^7 celých buněk ve směsi s Freundovým neúplným adjuvans. Deset dní po druhé injekci se analyzovala humorální imunitní odpověď pomocí testu ELISA proti syntetickým peptidům z různých oblastí CSP (Tabulka 1). Stanovily se protilátky proti imunodominantní oblasti repetice NANP, proti C-terminální neopakující se oblasti (aminokyseliny 289–390), ale ne proti N-terminálnímu syntetickému peptidu s aminokyselinami 22 až 125. Je zajímavé, že přítomnost specifických protilátek a titry protilátek nejsou ovlivněny způsobem aplikace injekce (tabulka 1).

Tabulka 1: Test ELISA sér^a myši imunizovaných buňkami s vektorem pERIV-CS s peptidy (NANP)₅₀, M1 (189–390).

Zvíře	(NANP) ₅₀ titr ELISA	M1 (289–390). titr ELISA
B (ip) ^b	1/1 000	1/900
G (sc)	1/5 000	1/900
R (ip)	1/5 000	1/900
Y (sc)	1/1 000	1/300
Y (ip)	1/5 000	1/900
W (ip)	1/1 000	1/900
kontrola ^c	<1/10	<1/10

^a séra se získala 7 dní po aplikaci jedné injekce myším Balb/c imunizovaných 2×10^7 buněk

^b myši se imunizovaly buď podkožně (sc), nebo intraperitoneálně (ip)

^c kontrolní zvíře dostalo injekci samotného neúplného Freundova adjuvans

V kontrolním experimentu se myším aplikovala injekce buněk *Distyostelium*, které exprimují CSP syntetizovaný pomocí vektoru pEDII-CS49. V tomto případě má CSP původní peptidový segment C-konce a není modifikovaný GPI kotvou. Pomocí testu ELISA se nestanovily žádné protilátky proti různým segmentům CSP (tabulka 2).

Tabulka 2: Test ELISA sér^a myši imunizovaných buňkami s vektorem pEDII-CS49 s peptidy (NANP)₅₀, M1 (289–390) a M (22–125).

Zvíře	(NANP) ₅₀ titr ELISA	M1 (289–390) titr ELISA	M2 (22–125) titr ELISA
č. 1 ^b	<1/10	<1/10	<1/10
č. 2	<1/10	<1/10	<1/10
č. 3	<1/10	<1/10	<1/10
kontrola ^c	<1/10	<1/10	<1/10

- ^a séra se získala 7 dní po aplikaci jedné injekce myším Balb/c imunizovaných 2×10^7 buněk
^b myši se imunizovaly buď podkožně (sc), nebo intraperitoneálně (ip)
^c kontrolní zvíře dostalo injekci samotného neúplného Freundova adjuvans

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Rekombinantní polypeptid se zvýšenou imunogenitou, mající navíc glykosylfosfatidyl-inositolovou skupinu, která se v přírodním polypeptidu nenachází, polypeptid vyvolává vyšší imunitní odezvu, ve srovnání s odpovídajícím polypeptidem bez glykosylfosfatidylinositolové struktury.

15

2. Polypeptid podle nároku 1, kde polypeptid je antigen.

3. Polypeptid podle nároku 2, kde antigen je polypeptid parazita.

20

4. Polypeptid podle nároku 3, kde antigen parazita je polypeptid z *Plasmodium falciparum*.

5. Polypeptid podle nároku 4, kde antigen z *Plasmodium falciparum* je protein cirkumporozoit (CSP) nebo jeho modifikované verze.

25

6. Rekombinantní DNK vektor pro expresi polypeptidu podle libovolného z nároků 1 až 5 obsahující sekvenci DNK, která kóduje polypeptid, přičemž sekvence DNK je spojena s přídatnou glykolipidovou kotevní sekvencí umístěnou po směru transkripce této sekvence, s vhodnou iniciační a terminační sekvencí transkripce a popřípadě se sekvencí vedoucího peptidu.

30

7. Rekombinantní DNK vektor podle nároku 6, kde sekvence DNK kóduje antigen parazita.

8. Rekombinantní vektor podle nároku 7, kde antigen parazita je antigen z *Plasmodium falciparum*.

35

9. Rekombinantní DNK vektor podle nároku 8, kde antigen z *Plasmodium falciparum* je protein cirkumsporozoit (CSP) nebo modifikované verze tohoto proteinu.

40

10. Rekombinantní DNK vektor podle libovolného z nároků 6 až 9, kde přídatná glykolipidová kotvicí sekvence se získá z kontaktního místa A *Disfostelium discoideum*.

11. Rekombinantní hostitelská buňka, vyznačující se tím, že obsahuje rekombinantní DNK vektor podle libovolného z nároků 6 až 10.

45

12. Rekombinantní hostitelská buňka podle nároku 11, vyznačující se tím, že hostitel je *Distyostelidový* hostitel.

13. Rekombinantní hostitelská buňka podle nároku 12, vyznačující se tím, že *Distyostelidový* hostitel je druh *Distyostelium*, zvláště *Distyostelium discoideum*.

50

14. Způsob výroby modifikovaných polypeptidů podle nároků 1 až 5, vyznačující se tím, že se vhodné hostitelské buňky transformují vhodným vektorem podle nároků 6 až 10, kultivují za podmínek, které umožňují expresi polypeptidu a popřípadě se polypeptid izoluje.

15. Vakcína, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje polypeptid podle libovolného z nároků 1 až 5 v imunoprotektivním množství spolu s vhodným ecipientem.
- 5 16. Vakcína podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že imunoprotektivní množství znamená obsah proteinu přibližně v počtu 1 až 5×10^7 , zejména v počtu 2×10^7 hostitelských buněk podle nároků 11 až 13, v jednotkové dávce.
- 10 17. Rekombinantní polypeptid podle nároků 1 až 5 pro použití k imunizaci.
- 15 18. Použití rekombinantního polypeptidu podle některého z nároků 1 až 5 pro výrobu vakcíny.

2 výkresy

Fig. 1 A

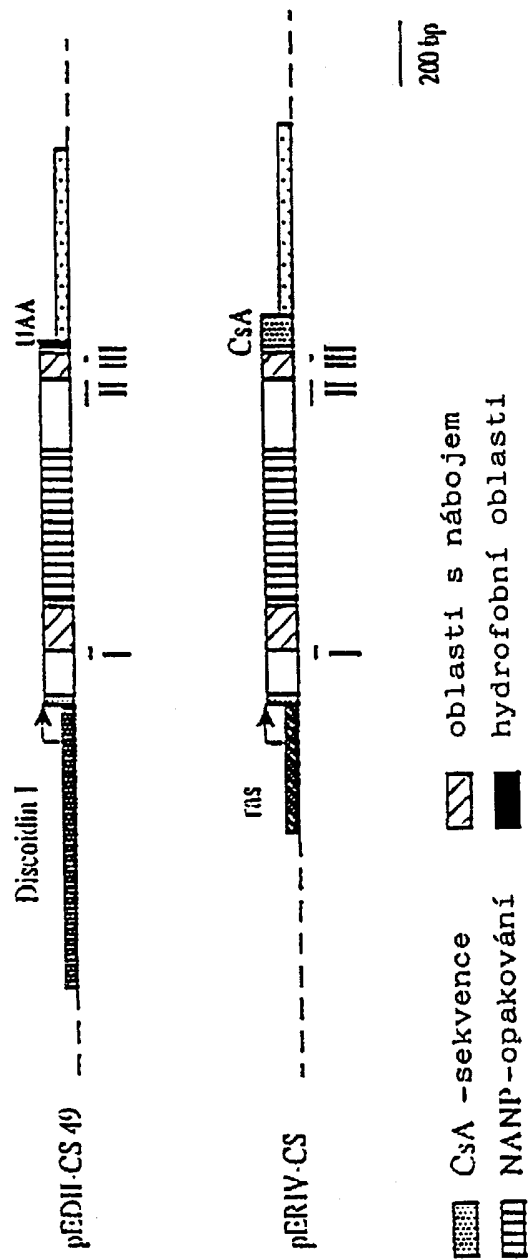


Fig. 1 B

...KKICKMEKCG PTPETA'PPSPTP...

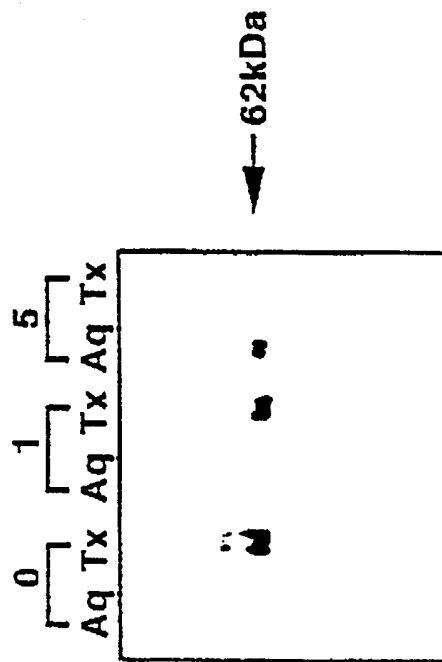


Fig. 2

Konec dokumentu