

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.09.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **15.09.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/00402562**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.09.2003**

(Věstník č. 9/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/11315**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/022169**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 726

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/385

A 61 K 47/48

A 61 K 39/00

A 61 P 29/00

A 61 P 31/00

A 61 P 33/00

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

INSTITUT PASTEUR, Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, Paris, FR;

(72) Původce:

Leclerc Claude, Paris, FR;
Guermontprez Pierre, Cachan, FR;
Ladant Daniel, Cachan, FR;
Guiso Nicole, Paris, FR;
Khelef Nadia, Paris, FR;
Bauche Cécile, Paris, FR;
Fayolle Catherine, Epinay sur Orge, FR;
El-Azami El-Idrissi Mohammed, Paris, FR;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vektory pro podávání molekul do buněk
exprimujících CD11B**

(57) Anotace:

Řešení se týká nového použití adenylcyklázového toxinu z Bordetella pro přípravu vektorů pro cílení in vivo požadované molekuly specificky do buněk exprimujících CD11b. Rovněž se týká imunogenního přípravku, který instruuje imunitní reakce, farmaceutických přípravků a nového vektoru pro dodání molekul buňkám exprimujícím CD11b.

20.08.03

1

PU2003-426

49725

VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO VÝVOJ
VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO VÝVOJ

VEKTORY PRO PODÁVÁNÍ MOLEKUL DO BUNĚK EXPRIMUJÍCÍCH CD11b

Oblast techniky

Vynález se týká nového použití adenylcyklázového toxinu z *Bordetella* při přípravě vektorů *in vivo* pro cílení požadované molekuly specificky do buněk exprimujících CD11b. Vynález se také týká imunogenního přípravku, který instruuje imunitní reakce, farmaceutických přípravků a nového vektoru pro podání molekul buňkám exprimujícím CD11b.

Dosavadní stav techniky

Bordetella pertussis, příčinné agens černého kašle, vylučuje několik toxinů včetně známého toxinu pertuse (PT) a adenylátcyklázového toxinu (CyaA) nebo také adenylcyklázy. CyaA je rozhodující virulentní faktor *B. pertussis* v myším respiračním modelu, který je vyžadován pro časně stádium kolonizace plic. Genetická delece tohoto toxinu opravdu dramaticky sníží patologické účinky infekce *B. pertussis* redukcí počtu bakterií získaných z plic a téměř eliminuje mobilizaci zánětlivých buněk a plicní léze pozorované po infekci [Weiss et al., 1984, Weiss et al., 1989, Gross et al., 1992, Khelef et al., 1992, Khelef et al., 1994, Gueirard et al., 1998]. Navíc CyaA je antigen ochraňující proti infekci *B. pertussis* v myším respiračním modelu [Guiso et al., 1989, Guiso et al., 1991].

Adenylátcykláza byla původně objevena Hewlitem et al. V supernatantech tkáňových kultur *B. pertussis* [Hewlett et al., 1976] a později bylo zjištěno, že je aktivována

eukaryotickým kalmodulinem [Wolff et al., 1980]. Pro tento nápadný rys byl rychle nalezen logický výklad, když bylo autory Confer a Eaton ukázáno, že adenylátcykláza může vstoupit do eukaryotických buněk, kde po aktivaci kalmodulinem může spouštět velké zvýšení cAMP v těchto cílových buňkách [Confer et al., 1982].

Adenylátcykláza je kódována genem *cyaA* a její exprese, jako exprese jiných virulentních genů *B. pertussis*, je koordinovaně regulována signály z okolního prostředí. Gen *cyaA* je část operonu, který také obsahuje geny *cya B*, *D* a *E*, které jsou vyžadovány pro CyaA sekreci [Ladant et al., 1999].

CyaA toxin je bifunkční protein se 1706 aminokyselinovými zbytky, který je vytvořen z N-koncové katalytické domény o 400 aminokyselinách a C-koncové části se 1306 zbytky, která je zodpovědná za vazbu toxinu k membráně cílové buňky a následné dodání katalytické skupiny do buněčného cytosolu [Sakamoto et al., 1992] [Ladant et al., 1999]. Tato část také projevuje slabou hemolytickou aktivitu díky své schopnosti tvořit kationtové selektivní kanály v biologických membránách [Benz et al., 1994] [Gray et al., 1998]. Tento úsek je homologní k hemolysinu *Escherichia coli* a dalším členům rodiny RTX (Repetitive ToXin) bakteriálních toxinů. Konkrétně obsahuje sérii nonapeptidových repetitivních bohatých na glycin a aspartát, které jsou zapojeny do vazby vápníku [Rose et al., 1995] [Coote et al., 1992].

Polypeptid CyaA je syntetizován jako inaktivní protoxin, který je konvertován na účinný toxin posttranslační palmitoylací dvou interních lysinů (lysiny 856 a 963). Tato modifikace vyžaduje produkt akcesorního genu, *cyaC*, který je lokalizován poblíž *cyaA* na chromozómu *B. pertussis*.

Bylo ukázáno, že CyaA váže a napadá celou řadu buněčných typů včetně buněčných typů, kterým chybí membránový transfer,

jako jsou například savčí erytrocyty [Rogel et al., 1992]. To svědčí pro to, že katalytická doména CyaA je přímo translokována přes plazmatickou membránu cílových buněk. Internalizace katalytické domény do buněčného cytosolu je závislá na kalciu a teplotě a závisí na potenciálu plazmatické membrány [Rogel et al., 1992] [Karimova et al., 1998] [Otero et al., 1995]. Nicméně molekulární mechanismy, kterými toxin transportuje svou N-koncovou katalytickou doménu přes membránu, zůstává doposud z velké části neznámý. Kromě toho nebyl publikován žádný specifický receptor pro CyaA vazbu.

Fyziologické důsledky buněčné intoxikace CyaA byly charakterizovány *in vitro* ve fagocytech. Autoři Confer a Eaton ukázali jako první, že CyaA extrahovaný z *B. pertussis* zvyšuje intracelulární cAMP hladinu v neutrofilech nebo makrofágách vedoucí k inhibici chemotaxe a baktericidních funkcí, jako je například tvorba superoxidu a fagocytární schopnosti [Confer et al., 1982]. Tyto aktivity byly později potvrzeny s purifikovanými toxiny nebo s bakteriálními mutanty s geneticky odstraněným CyaA [Pearson et al., 1987, Friedman et al., 1987] [Njamkepo et al., 2000]. Na rozdíl od toho a přes závažné změny obsahu cAMP, se zdálo, že životaschopnost buněčných linií nehematopoetického původu je nedotčena CyaA intoxikací [Bassinet et al., 2000]. Navíc původci předkládaného vynálezu dříve prokázali, že *B. pertussis* CyaA může spouštět apoptózu makrofágů *in vitro* [Khelef et al., 1993, Khelef et al., 1995] a *in vivo* [Gueirard et al., 1998]. V těchto modelech genetická delece CyaA zrušila apoptózu makrofágů, ale ne smrt neutrofilů, což svědčí pro to, že CyaA:

- i) je hlavně zodpovědný za apoptózu makrofágů,
- ii) může být zodpovědný za apoptózu neutrofilů, ale že může také být zodpovědný další faktor.

Kromě toho *in vivo* studie prováděné na myším modelu infekce *B. Bronchiseptica* (zvířecí homolog *B. pertussis*, jehož CyaA je blízce příbuzný) prokázaly, že hlavní cíl toxicity CyaA *B. Bronchiseptica* je populace závislá na GM-CSF a senzitivní na cyklofosamid, která řídí časná stádia infekce [Harvill et al., 1999]. Tato kritéria identifikovala neutrofily a možná další buňky včetně makrofágů nebo dendritických buněk, ale žádná data nebyla popsána nebo nesvědčí pro to, že CD11b buněčný receptor je zapojen do cílení CyaA. Tyto populace cílových buněk pro CyaA jsou stejné, které limitují rané fáze infekce a podporují rozvoj adaptivní imunitní reakce, která řídí pozdější fáze infekce [Harvill et al., 1999].

Na rozdíl od jiných toxinů byl CyaA dlouhou dobu považován za nezávislý na jakékoliv receptorové vazbě. To bylo založeno na pozorování že i) CyaA může intoxikovat celou řadu modelových buněčných linií různého původu [Ladant et al., 1999] ii) CyaA se váže k buňkám Jurkat a ovčím erytrocytům nesaturovatelným způsobem [Gray et al., 1999]. Nicméně, co se týče buněk infikovaných CyaA, byla zjištěna určitá specifita. Studie *in vivo* opravdu ukázaly, že během myší respirační infekce druhem *Bordetella*, CyaA ničil specificky leukocyty (obzvláště makrofágy) bez dramatického poškození epiteliálních buněk [Gueirard et al., 1998, Harvill et al., 1999].

V patentové přihlášce WO 93/21324 bylo navrženo použití rekombinantní *Bordetella* adenylcyklázy pro indukci reakce CD4⁺ T lymfocytů nebo CD8⁺ T lymfocytů, nicméně, protože nebyl identifikován žádný specifický receptor pro *Bordetella* adenylcyklázu, nebylo známo, jestliže prezentace antigenu byla ve vztahu k vychytávání neprofesionální buňkou prezentující antigen, po kterém následovalo zkřížené instruování („cross-priming“) a prezentace dendritickými buňkami nebo jestliže

antigen byl cílen k profesionálním buňkám prezentujícím antigen (pAPC).

V souladu se svým povrchovým fenotypem, dendritické buňky (s vysokou expresí MHC I a II, kostimulační a adhezivní molekuly) představují nejúčinnější APC v mnoha *in vitro* testech pro instruování naivních T lymfocytů [Bell et al., 1999, Viola et al., 1999]. Jiné APC, jako jsou například klidové naivní B lymfocyty, mohou dokonce být tolerogenní, protože injekce klidových samčích B lymfocytů do samičích příjemců vede ke specifické toleranci samčích specifických CD8⁺ T lymfocytů [Fuchse et al., 1992]. *In vitro* naivní B lymfocyty mohou odstranit naivní CD8⁺ T lymfocyty prostřednictvím mechanismu závislého na Fas [Bennett et al., 1998].

Navíc prezentace Ag dendritickými buňkami koreluje *in vivo* s indukcí reakce T lymfocytů. To bylo prokázáno pro prezentaci Ag omezenou MHC II. Intravenózní (i.v.) injekce Ag bez adjuvans obvykle neindukují instruování T lymfocytů [Kyburz et al., 1993, Aichele et al., 1994, Aichele et al., 1995] a vede k prezentaci Ag nespecifickými B lymfocyty [Guery et al., 1997] [Zhong et al., 1997, Reis e Sousa et al., 1999] a nakonec dendritickými buňkami [Crowley et al., 1990] [Zhong et al., 1997, Reis e Sousa et al., 1999]. Na rozdíl od toho, strategie lokální imunizace, jako je například subkutánní (s.c.) imunizace v přítomnosti adjuvans obvykle indukuje instruování T lymfocytů a cílenou prezentaci Ag Langerhansovou buňkou stěhující se z kůže do LN, která odvádí lymfatickou tekutinu z místa imunizace. V tomto případě nejsou zapojeny B lymfocyty a makrofágy [Guery et al., 1996]. Podobné výsledky byly získány po s.c. nebo intradermální (i.d.) DNA imunizací pro MHCII a MHCI-peptidové komplexy: dendritické buňky mohou být přímo transfekovány do místa lokální injekce a pak migrují do aferentní LN aferentními lymfatickými cévami [Condon et

al., 1996, Casares et al., 1997, Porgador et al., 1998]. Migrace je považována za klíčový jev imunity, protože mechanické porušení aferentních lymfatických cév poruší reakci T lymfocytů na kožní senzibilizaci nebo kožní štěpy [Zinkernagel et al., 1997].

Proto je cílení na dendritické buňky podstatné pro stimulaci $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů. Protože většina protilátkových reakcí je závislá na $CD4^+$ T pomocných lymfocytech, je hlavním cílem při očkování cílení antigenu k dendritickým buňkám.

Původci vynálezu studovali prezentaci adenylcyklázy druhu *Bordetella* T lymfocyty a identifikovali specifickou receptorovou molekulu přítomnou na specifických buňkách, která interaguje s CyaA a otevírá nové možnosti pro použití CyaA jako proteinového vektoru pro požadované molekuly.

Geneticky detoxikované bakteriální toxiny představují vhodné kandidáty na vakcínové vektory, konkrétně pro T epitop, pro svou schopnost napadat eukaryotické buňky (Ladant et al., 1999). Nicméně bylo prokázáno, že pouze málo proteinových vektorů instruuje CTL reakce *in vivo* (Ballard et al., 1996, Cabonette et al., 1999). Navíc, navzdory četným *in vitro* slibným studiím, nebylo prokázáno, že nějaký vektor je výlučně cílen k pAPC, zejména k dendritickým buňkám, a konkrétněji k myeloidním dendritickým buňkám.

Původci vynálezu dále ukázali, že další buňky, obzvláště neutrofily, mohou být cíleny vektory podle předkládaného vynálezu.

Vynález poskytuje prostředky, které mohou alespoň částečně plnit tyto potřeby a navrhuje nové vektory, které specificky cílí molekuly k určeným populacím pAPC, například pro umožnění stimulace imunitní reakce.

Navíc, molekula cílená k pAPC a specifickým leukocytům by umožnila přípravu nových vektorů použitelných pro dodání biologicky účinné molekuly do proximálního prostředí těchto buněk. Tyto molekuly by například mohly modulovat funkční vlastnosti cílených buněk nebo buněk zapojených do imunitní reakce nebo do zánětlivé reakce.

Původci vynálezu vskutku zjistili, že adenylcyklázový toxin *Bordetella pertussis* se váže specificky na buněčný receptor nazvaný (CD11b/CD18) α_M/β_2 receptor a že tato interakce je vyžadována pro intracelulární dodání adenylcyklázové domény do cytosolu buněk a následně pro buněčnou smrt. α_M/β_2 (CD11b/CD18) integrin je dimer z rodiny β_2 integrinů, exprese těchto integrinů je omezena na leukocyty. CD11b/CD18 α_M/β_2 projevuje typ exprese u myši a člověka, který je restringován (omezen) na neutrofily/granulocyty, makrofágy, dendritické buňky, NK buňky a podmnožiny B a T CD8⁺ lymfocytů (Jeyaseelan et al., 2000, Arnaout et al., 1990).

Proto by tento receptor představoval ideální cíl pro nové vektory navržené konkrétně pro imunizaci T epitopu.

Původci v předkládaném vynálezu prokázali, že adenylcykláza z *Bordetella* může být použita pro cílení molekuly *in vivo* specificky k buňkám exprimujícím CD11b.

Přihlašovatelé v předkládaném vynálezu konkrétně prokázali, že antigenní peptid obsažený v adenylcyklázovém toxinu *Bordetella pertussis* může být účinně cílen specificky k povrchu dendritických buněk, translokován v cytosolu dendritických buněk a může instruovat CTL reakci.

Ve specifickém provedení byla získána reakce, která obchází požadavek adjuvans a CD4⁺ T pomocné lymfocyty.

Bylo také prokázáno, že geneticky modifikovaná adenylcykláza může být chemicky kondenzována k požadovanému peptidu pro cílení peptidu k buňkám exprimujícím CD11b, obzvláště do cytosolu dendritických buněk.

Tento vynález tedy poskytuje nový účinný imunogenní přípravek, a také nový vektor pro dodání léčiva k buňkám exprimujícím CD11b.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká použití adenylcyklázy z *Bordetella* pro přípravu proteinového vektoru pro cílení požadované molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b.

Vynález se také týká použití adenylcyklázy z *Bordetella*, kde adenylcykláza je rekombinována s antigenem a konkrétně modifikována inzercí požadovaného peptidu nebo modifikována inzercí požadované molekuly pro přípravu přípravku pro cílení peptidu nebo molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b.

Termín "specificky" znamená v kontextu předkládaného vynálezu, že adenylcykláza, když je použita jako vektor pro požadovanou molekulu, je přednostně mířena k buňkám exprimujícím CD11b, a tím nabízí prostředky pro cílení požadované molekuly na povrch buněk nebo do buněk selektivně vzhledem k ostatním buňkám.

V jednom provedení vynálezu je požadovaná molekula v podstatě mířena k buňkám exprimujícím CD11b.

Jak se v tomto textu používá, termín "buňky exprimující CD11b" se týká buněk, které exprimují CD11b/CD18 $\alpha_M\beta_2$ receptor na svém povrchu. Konkrétně jsou tyto buňky

granulocyty/neutrofily, makrofágy, NK buňky, podmnnožiny T CD8⁺ a B lymfocytů a myeloidní dendritické buňky.

Protože buňky exprimující CD11b a konkrétněji myeloidní dendritické buňky, neutrofily a makrofágy jsou zapojeny do základních funkcí imunitního systému a vrozeného obranného systému, konkrétně do zánětlivých a specifických imunitních reakcí, vynález se týká přípravy proteinového vektoru nebo přípravku schopného cílení molekuly nebo požadovaného peptidu k těmto buňkám exprimujícím CD11b, obzvláště myeloidním dendritickým buňkám, neutrofilům a makrofágům.

Konkrétně v jednom provedení je cílení molekuly nebo peptidu účinné *in vivo*.

Vynález proto poskytuje prostředky vhodné pro přípravu přípravků vhodných pro podávání zvířecím nebo humánním příjemcům vyžadujících cílení určitých leukocytů a obzvláště myeloidních dendritických buněk, neutrofilů nebo makrofágů.

Adenylcykláza z *Bordetella* je adenylcykláza závislá na kalmodulinu sekretovaná druhem *Bordetella* nebo její fragment, kterýžto fragment si zachovává funkční vlastnosti adenylcyklázy, hlavního virulentního faktoru nutného pro počáteční fáze bakteriální kolonizace v plicích. Adenylcykláza je syntetizována a sekretována ve formě polypeptidu s 1706 aminokyselinami: katalytická aktivita závislá na kalmodulinu je lokalizována v prvních 400 aminokyselinách. Aby byl účinný, adenylcyklázový toxin je změněn tak, aby měl invazivní a hemolytické vlastnosti při posttransdukční modifikaci koexpresí produktu genu *cyaC*.

Následující specifické vlastnosti adenylcyklázového toxinu z *Bordetella* ukazují, že tento toxin může být použit při přípravě proteinového vektoru pro cílení *in vivo* požadované molekuly k buňkám exprimujícím CD11b:

- A) tato adenylátcykláza se váže specificky k buňkám exprimujícím CD11b
- B) N-koncová katalytická doména je translokována do cytosolu buněk exprimujících CD11b
- C) C-koncová doména se váže k membráně buněk exprimujících CD11b a může se internalizovat endocytární dráhou
- D) epitop chemicky kondenzovaný ke geneticky modifikované adenylcykláze může vyvolat *in vivo* specifické CTL reakce.

Termín „adenylcykláza“ zahrnuje, v předkládaném vynálezu, přírodní nebo modifikovanou adenylcyklázu, včetně geneticky nebo chemicky modifikované adenylcyklázy, za předpokladu, že výsledný produkt je schopný cílení požadované molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b.

Vynález se tedy týká použití adenylcyklázy *Bordetella*, jak byla definována výše, a konkrétněji použití modifikované nebo rekombinantní adenylcyklázy pro cílení požadované molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b.

Konkrétně rekombinantní adenylcyklázy zahrnují adenylcyklázy, které byly geneticky modifikovány tak, aby poskytly buď adenylcyklázy s peptidovou sekvencí nebo cysteinovými zbytky vloženými do katalytické domény nebo zkrácené adenylcyklázy postrádající celou nebo část katalytické domény.

Díky specifické interakci mezi adenylcyklázovým toxinem *Bordetella* a receptorem CD11b/CD18 $\alpha_M\beta_2$ je požadovaná molekula specificky cílena alespoň k povrchu buněk exprimujících CD11b. V konkrétním provedení vynálezu je adenylcyklázový toxín *Bordetella* použit při přípravě proteinového vektoru pro dodání požadované molekuly buď do cytosolu buněk exprimujících CD11b, na povrch buněk exprimujících CD11b nebo do endocytární dráhy buněk exprimujících CD11b.

Expresní vektory pro přípravu rekombinantní adenylcyklázy *Bordetella* jsou popsány v patentové přihlášce WO 93/21324 (Institut Pasteur). Nové expresní vektory pro přípravu geneticky modifikované adenylcyklázy *Bordetella* vhodné pro chemickou kondenzaci požadovaného peptidu jsou také popsány v experimentální části níže. Konkrétněji, expresní vektory mohou být konstruovány tak, aby řídily expresi obou genů, genu *cyaA* a genu *cyaC* (Sebo et al., 1991). Paralelně může být konstruován sekundární plazmid nesoucí geny nutné pro sekreci cytotoxické adenylcyklázy v *E. coli*, jako jsou například *hlyB* a *hlyD*, jak bylo popsáno například v práci Meckman et al., 1985. Konkrétně může být použit expresní plazmid pCACT3 popsaný ve WO 93/21324. S použitím tohoto plazmidu může být adenylcykláza exprimována v *E. coli* a možná sekretována touto bakterií ve velkém množství. Je také snadno purifikována například s použitím afinitní chromatografie na Cam Affi-Gel pryskyřici nebo jinými publikovanými postupy, jako jsou postupy užívající kolony DEAE-sepharose a fenyl-sepharose.

V jednom provedení vynálezu je adenylcykláza rekombinantní geneticky modifikovaná adenylcykláza. Konkrétně, mutace jako například bodové mutace, delece nebo inserce mohou být získány s použitím obvyklých technik místně cílené nebo náhodné mutagenese, za předpokladu, že domény nutné pro vazbu k buňkám exprimujícím CD11b a volitelně pro translokaci v cytosolu jsou stále funkční. Testy pro vyhodnocení specifické vazby rekombinantních toxinů a jejich fragmentů k buňkám exprimujícím CD11b a volitelně následné translokaci katalytické domény jsou popsány v následující experimentální části.

V dalším provedení vynálezu rekombinantní adenylcykláza druhu *Bordetella* je fragment nativního, modifikovaného nebo rekombinantního adenylcyklázového toxinu druhu *Bordetella*,

přičemž fragment je schopný vázat CD11b receptor. Konkrétně bylo v předkládaném vynálezu zjištěno, že fragment obsahující zbytky 373 až 1706 (CyaA 373-1706) obsahuje struktury obzvláště vyžadované pro interakci s receptorem CD11b/CD18. Tedy výhodný fragment adenylcyklázového toxinu druhu *Bordetella* je adenylcyklázový toxinu druhu *Bordetella*, který postrádá celou nebo část N-koncové katalytické domény a specifičtěji adenylcykláza *Bordetella pertussis*, která postrádá všechny nebo část zbytků 1-373.

Specifická vazba k CD11b může být stanovena *in vitro* s anti-CD11b monoklonálními protilátkami, jak je znázorněno v příkladech.

Aby mohla být používána pro přípravu proteinového vektoru nebo přípravě přípravku, je adenylcykláza výhodně netoxická. Netoxické mutanty adenylcyklázového toxinu jsou v oboru dobře popsány. (Betsou et al. 1993, Betsou et al. 1995).

Ve výhodném provedení tohoto vynálezu je adenylcykláza izolována z *Bordetella pertussis*.

Ve specifickém provedení je požadovaná molekula vybrána ze skupiny obsahující: peptidy, glykopeptidy, lipopeptidy, polysacharidy, oligosacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a chemické sloučeniny.

Ve specifickém provedení je požadovaná molekula heterologní antigen. Jak se v tomto textu používá, termín "heterologní" se týká antigenu jiného než adenylcykláza, která je použita ve vektoru.

Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje příprava proteinového vektoru krok inserce heterologní molekuly a zejména peptidu do katalytické domény adenylcyklázy v permisivním místě.

Jak se v tomto textu používá, termín "permisivní místo" se týká místa, kde heterologní molekula a zejména peptid mohou být vloženy bez podstatného ovlivnění požadovaných funkčních vlastností adenylcyklázového toxinu, tj. bez ovlivnění domén nutných pro specifickou vazbu k CD11b/CD18 receptoru a výhodně bez ovlivnění postupu translokace katalytické domény. Ve výhodném provedení schopnost CyaA toxinu podporovat syntézu cAMP v cílených buňkách je dále udržována.

Způsoby výběru permisivních míst jsou poskytnuty například ve WO93/21324 a v práci Ladant et al., 1992. Konkrétně, metodologie s použitím dvojité selekce (rezistence na antibiotikum a kalorimetrický test na miskách α -komplementací) umožní identifikovat snadno oligonukleotidové inserce (které zachovávají čtecí rámec) v části genu kódující N-koncovou katalytickou doménu toxinu. Funkční důsledky těchto mutací na katalytickou aktivitu toxinu mohou být snadno analyzovány, jak geneticky (funkční komplementace *E. coli* cya⁻ kmene), tak biochemicky (charakterizace stability modifikovaných adenylcykláz, jejich enzymatické aktivity, jejich interakce s caM, apod.). Tato metodologie umožnila, že je možné provádět screening na velkém počtu mutací, aby se identifikovala místa, která jsou potenciálně výhodná pro inzerci antigenních determinant.

Ve specifickém provedení vynálezu je permisivní místo vybráno ze skupiny, kterou tvoří zbytky 137 až 138, zbytky 224 až 225, zbytky 228 až 229, zbytky 235 až 236, zbytky 317 až 318 a zbytky 335 až 336 adenylcyklázy *Bordetella pertussis*.

Nicméně v předkládaném vynálezu mohou být použita další permisivní místa, která mohou být identifikována například s použitím metodologie uvedené výše, obzvláště místa mezi zbytky 400 a 1700.

Příprava proteinového vektoru může také obsahovat krok fúze požadované molekuly, například heterologního peptidu, v N-koncové části adenylcyklázy *Bordetella*, která postrádá celou nebo část své N-koncové katalytické domény, a výhodněji adenylcyklázy *Bordetella pertussis*, která postrádá zbytky 1-373.

Ve výhodném provedení vynálezu je adenylcykláza podle jedné z výše uvedených definic použita při přípravě proteinového vektoru nebo při přípravě přípravku specificky navrženého tak, aby instruoval reakci $CD8^+$ cytotoxických T lymfocytů (CTL reakce), tato reakce následuje cílení adenylcyklázy modifikované (zejména rekombinované nebo kondenzované) požadovanou molekulou k buňkám exprimujícím CD11b, kde následuje translokace požadované molekuly do cytosolu buněk exprimujících CD11b, a obzvláště k myeloidním dendritickým buňkám. V tomto kontextu požadovaná molekula je výhodně epitop nebo antigen nebo je obsahuje.

Jak se v tomto textu používá, termín "epitop" se týká heterologní molekuly a obzvláště heterologního peptidu, který může indukovat imunitní reakci.

Ve specifickém provedení je antigen vybrán ze skupiny, kterou tvoří intracelulární bakteriální buněčný antigen, nádorový buněčný antigen, virový antigen, houbový antigen nebo antigen parazitární buňky.

Ve výhodném provedení vynálezu je adenylcykláza, tj. přírodní, modifikovaná nebo rekombinantní podle jedné z výše uvedených definic, použita při přípravě proteinového vektoru nebo při přípravě přípravku specificky navrženého tak, aby instruoval reakce $CD4^+$ buněk, tato reakce následuje cílení adenylcyklázy modifikované (zejména rekombinované nebo kondenzované) požadovanou molekulou k buňkám exprimujícím CD11b, obzvláště myeloidním dendritickým buňkám. V tomto

kontextu požadovaná molekula je výhodně epitop nebo antigen nebo je obsahuje.

Požadovaná molekula může být obzvláště antigen vybraný ze skupiny, kterou tvoří: poliovirový antigen, antigen viru HIV, antigen viru chřipky, epitop viru choriomeningitidy, nádorový antigen.

Funkční vlastnosti buněk exprimujících CD11b definují dále nové použití adenylcyklázového toxinu *Bordetella* při přípravě proteinového vektoru pro cílení léčiva k těmto specifickým buňkám. V tomto kontextu je v jednom specifickém provedení vynálezu takzvaná požadovaná molekula léčivo. Léčivo může být chemicky nebo geneticky kondenzováno k adenylcykláze. Způsob kondenzace léčiva k polypeptidu jsou v oboru dobře známy a zahrnují například disulfidovou vazbu s použitím N-pyridyl-sulfonyl-aktivované sulfhydrylové skupiny.

Výhodně je požadovaná molekula protizánětlivý lék, který je po kondenzaci k adenylcyklázovému toxinu, specificky cílený k povrchu buněk zapojených do zánětlivé reakce, jako jsou například neutrofily.

Konkrétně je poprvé ukázáno v experimentální části, že je možné připojit molekuly k CyaA chemickou vazbou nebo genetickou inzercí pro *in vivo* cílení k CD11b+ buňkám prezentujícím antigen a zejména do cytosolu CD11b+ buněk prezentujících antigen. Opravdu, při kondenzaci molekuly odpovídající danému epitopu CD8⁺ T lymfocytů ke katalytické doméně detoxikované CyaA, buď pomocí disulfidové vazby nebo genetickou inzercí, bylo zjištěno, že geneticky upravená molekula může vyvolat *in vivo* specifickou reakci CTL, a tím bylo ukázáno, že epitop CD8⁺ T lymfocytů byl translokován do cytosolu buněk exprimujících CD11b.

Konkrétněji, prezentace antigenu pro selektivní instruování $CD8^+$ cytotoxických buněk je hlavně prováděna myeloidními dendritickými buňkami.

V souladu s tím, ve specifickém provedení rekombinantní adenylcykláza použitá pro přípravu proteinového vektoru je geneticky modifikovaná adenylcykláza obsahující jednu nebo více molekul chemicky kondenzovaných pomocí disulfidové vazby ke geneticky vloženému cysteinovému zbytku (zbytkům) lokalizovanému v katalytické doméně adenylcyklázy.

Vskutku, četné molekuly mohou být chemicky kondenzovány k adenylcykláze pomocí disulfidové vazby k odlišným cysteinovým zbytkům lokalizovaným v různých permissivních místech v katalytické doméně.

Přihlašovatelé také ukázali, že specifická CTL reakce pro vektorizovaný antigen může být instruována *in vivo* po jedné intravenózní injekci rekombinantního toxinu, zejména bez potřeby poskytnout heterologní adjuvans. Tyto výsledky ukázané v experimentální části a konkrétně specifické cílení epitopu k myeloidním dendritickým buňkám umožňuje nové imunizační strategie, které obchází požadavek adjuvans a $CD4^+$ T pomocných lymfocytů.

Vynález se tedy také týká použití *Bordetella* adenylcyklázového toxinu rekombinovaného s požadovanou molekulou a zejména peptidem pro přípravu přípravku formulovaného pro intravenózní podávání a umožňujícího imunitní reakci $CD8^+$ T lymfocytů *in vivo*, přípravek je bez heterologního adjuvans. Vynález se také týká tohoto přípravku jako takového.

Vynález se konkrétně také týká nového imunogenního přípravku formulovaného pro podávání, obzvláště intravenózní podávání, zvířeti nebo humánnímu příjemci, charakteristického

tím, že obsahuje rekombinantní adenylcyklázu *Bordetella*, která obsahuje antigen vložený v katalytické doméně.

Vynález se dále týká farmaceutického přípravku pro podávání člověku nebo zvířeti formulovaného pro cílení požadované molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b charakteristického tím, že požadovaná molekula je kondenzována k adenylcykláze druhu *Bordetella*.

V jednom výhodném provedení je požadovaná molekula vybrána ze skupiny obsahující: peptidy, glykopeptidy, lipopeptidy, polysacharidy, oligosacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a chemické sloučeniny.

V dalším výhodném provedení požadovaná molekula je antigen.

V dalším specifickém provedení farmaceutický nebo imunogenní přípravek obsahuje konstrukt nukleové kyseliny kódující rekombinantní adenylcyklázu druhu *Bordetella* obsahující rekombinantní adenylcyklázu druhu *Bordetella* kondenzovanou k požadované molekule.

Ve specifických provedeních adenylcykláza je z toxinu *Bordetella pertussis*.

V dalších specifických provedeních adenylcyklázový toxin je geneticky modifikovaný toxin. V jednom výhodném provedení adenylcykláza je netoxická adenylcykláza, obzvláště detoxikovaná adenylcykláza.

V jednom výhodném provedení je geneticky modifikovaná adenylcykláza schopná translokovat požadovanou molekulu specificky do cytosolu buněk exprimujících CD11b.

Konkrétně, geneticky modifikovaná adenylcykláza je adenylcykláza *Bordetella*, která postrádá celou nebo část své

N-koncové katalytické domény, a specifičtěji adenylcykláza *Bordetella pertussis*, která postrádá zbytky 1-373.

Výhodně geneticky modifikovaná adenylcykláza obsahuje jeden nebo více cysteinových zbytků vložených v katalytické doméně v permisivních místech. Taková geneticky modifikovaná adenylcykláza může být kondenzována k jedné nebo více požadovaným molekulám pomocí disulfidové vazby (disulfidových vazeb) ve vloženém cysteinovém zbytku (zbytcích).

Ve výhodném provedení je molekula, a zejména antigen, vložena do permisivních míst vybraných ze skupiny, kterou tvoří zbytky 137 až 138, zbytky 224 až 225, zbytky 228 až 229, zbytky 235 až 236, zbytky 317 až 318 a zbytky 335 až 336 adenylcyklázy *Bordetella pertussis*, nebo je molekula fúzovaná k N-koncové části adenylcyklázy *Bordetella*, která postrádá celou nebo část své N-koncové katalytické domény, a specifičtěji k N-koncové části adenylcyklázy *Bordetella pertussis*, která postrádá zbytky 1-373.

Ve specifickém provedení je molekula antigen, který je intracelulární bakteriální buněčný antigen, nádorový buněčný antigen, virový antigen, houbový antigen nebo parazitární buněčný antigen.

Ve výhodných provedeních je požadovaná molekula antigen vybraný ze skupiny, kterou tvoří: epitop polioviru, virus HIV, antigen viru chřipky, antigen viru choriomeningitidy.

V dalším provedení je geneticky modifikovaný toxin schopný dodání požadované molekuly specificky na povrch buněk exprimujících CD11b nebo do endocytární dráhy.

Přihlašovatelé prokázali, že *in vivo* intravenózní podávání imunogenního přípravku zvířeti nebo humánnímu příjemci, jak bylo definováno v předkládaném vynálezu, bez adjuvancia je

dostatečné pro účinnou podporu imunitní reakce u zvířete nebo humánního příjemce.

Konkrétně jsou imunogenní přípravky podle vynálezu schopné indukce nebo stimulace, *in vivo* nebo *in vitro*, imunitní buněčné reakce zapojující specificky dendritické buňky.

Jako důsledek, ve specifickém provedení imunogenní nebo farmaceutický přípravek je výhodně bez jakýchkoliv adjuvancií pro instruování, která se obecně v oboru používají, jako je například hydroxid hlinitý.

V jednom specifickém provedení je požadovaná molekula léčivo, výhodně protizánětlivé léčivo.

Kromě toho, se vynález také týká použití imunogenního přípravku, jak definováno výše, pro přípravu vakcíny nebo imunoterapeutického přípravku, pro podávání zvířeti nebo humánnímu příjemci.

Jak se v tomto textu používá, termín "imunoterapeutický přípravek" se týká přípravku, který vede k imunologické reakci a který je sdružený s terapeutickou léčbou, jako například léčba karcinomů, virových infekcí, parazitárních infekcí nebo bakteriálních infekcí.

Vynález se dále týká způsobu imunizace zvířete nebo humánního příjemce, přičemž způsob obsahuje kroky:

- A) poskytnutí imunogenního přípravku, jak bylo definováno výše,
- B) podávání imunogenního přípravku, výhodně intravenózním způsobem příjemci, aby se podporovala imunitní reakce.

Vynález se konečně týká proteinového vektoru pro dodání požadované molekuly, specificky k buňkám exprimujícím CD11b, charakteristického tím, že vektor obsahuje adenylcyklázu druhu *Bordetella* kondenzovanou k požadované molekule.

Proteinový vektor je schopný cílit požadovanou molekulu k buňkám exprimujícím CD11b prostřednictvím specifické vazby adenylcyklázy *Bordetella* s CD11b/CD18 $\alpha\beta_2$, který je přítomný na povrchu specifických buněk. V jednom specifickém provedení je vektor také schopný dodání požadované molekuly specificky do cytosolu buněk exprimujících CD11b.

Ve specifických provedeních je proteinový vektor schopný cílit požadovanou molekulu k dendritickým buňkám, zejména myeloidním dendritickým buňkám, nebo k neutrofilům.

Požadovaná molekula je chemicky nebo geneticky kondenzována k adenylcykláze, výhodněji k rekombinantnímu adenylcyklázovému toxinu. Způsoby kondenzace molekuly k polypeptidu jsou v oboru dobře známy. Jako příklad vynálezci ukázali, že biotinový derivát, biotin HDPD, může být selektivně kondenzován k unikátnímu cysteinovému zbytku geneticky vloženému do katalytické domény. Syntetické peptidy byly kondenzovány podobně k cysteinu obsahujícím adenylcyklázový toxin nebo ke geneticky modifikované adenylcykláze bez nativního cysteinového zbytku, ale obsahující unikátní geneticky vložený cysteinový zbytek.

V dalším specifickém provedení požadovaná molekula kondenzovaná k adenylcykláze je epitop chemicky kondenzovaný ke geneticky modifikované adenylcykláze bez nativního cysteinového zbytku, ale obsahující geneticky vložený cysteinový zbytek (zbytky) v permissivním místě ve své katalytické doméně.

Ve specifickém provedení proteinový vektor obsahuje geneticky modifikovanou adenylcyklázu. V jednom výhodném provedení adenylcykláza je rekombinantní netoxická adenylcykláza z *Bordetella pertussis*.

Vynález se konkrétně týká proteinového vektoru, který se skládá z rekombinantní adenylcyklázy *Bordetella*, která postrádá celou nebo část N-koncové katalytické domény, a výhodněji adenylcyklázy *Bordetella pertussis*, která postrádá zbytky 1 až 373.

Další výhodný proteinový vektor podle vynálezu je geneticky modifikovaná adenylcykláza *Bordetella* bez nativního cysteinového zbytku, ale obsahující geneticky vložený cysteinový zbytek (zbytky) v permissivním místě v katalytické doméně.

Výhodně, v jednom specifickém provedení vynálezu, je léčivo, které má být dodáno, protizánětlivý lék, který je při kondenzaci k adenylcyklázovému toxinu cílený na povrch nebo do cytosolu buněk zapojených do zánětlivé reakce, jako jsou například neutrofily.

Následující příklady slouží k podrobnějšímu objasnění předkládaného vynálezu, aniž by omezovaly rozsah vynálezu, který je definován v připojených nárocích. Konkrétně jsou v části A ukázána experimentální data, která demonstrují specifickou vazbu adenylcyklázového toxinu k CD11b/CD18 receptoru a konkrétně specifickou vazbu adenylcyklázového toxinu k buňkám exprimujícím CD11b *in vitro*. V části B experimentální výsledky ukazují možnost cílit geneticky kondenzovanou molekulu, konkrétněji antigen *in vitro* a *in vivo* specificky do cytosolu buněk exprimujících CD11b a konkrétně k myeloidním dendritickým buňkám. Navíc, výsledky ukazují, že cílení je zprostředkováno CD11b receptorem a že CTL instruování je pozorováno po systémové imunizaci v nepřítomnosti adjuvans. V části C je ukázáno, že specifická kondenzace epitopových peptidů pomocí disulfidové vazby na CyaA fragmenty může být prováděna za vzniku nových proteinových vektorů. V části D je ukázáno, že pouze C-koncová

část CyaA je nezbytná a postačující pro interakci s receptory CD11b.

Konečně výsledky ukazují, že na rozdíl od mnoha dalších CTL reakcí, jako jsou reakce vyvolané proti zkříženě intruujícímu antigenu, pomoc $CD4^+$ T lymfocytů nebyla nutná pro instruování CTL reakcí.

Popis obrázků

Obrázek 1

Saturovatelná vazba CyaA koreluje s CD11b expresí

a: CyaA vazba na povrch makrofágů (J774A.1), B lymfocytů (LB27.4) a T lymfocytů (EL4) byla prováděna ve 37 °C po dobu 20 minut. Povrchově vázaný CyaA byl detekován biotinylovanou anti-CyaA polyklonální protilátkou, ukázán streptavidinem-PE a detekován průtokovou cytometrií na živých buňkách, jak bylo popsáno v části materiál a metody. Vazba byla vyjádřena jako $\Delta MFI = (\text{hodnota průměrné intenzity fluorescence buněk inkubovaných s CyaA}) - (\text{průměrná intenzita fluorescence buněk bez CyaA})$.

b, c, d, e: Povrchová exprese $\beta 2$ integrinů na buňkách J774A.1, LB27.4 a EL4. Exprese CD11a (b), CD11b (c), CD11c (d) a CD18 (e) byla určována průtokovou cytometrií s použitím specifických mAbs kondenzovaných k PE. Exprese integrinu je vyjádřena jako $\Delta MFI = (\text{hodnota průměrné intenzity fluorescence buněk značených specifickou mAb}) - (\text{průměrná intenzita fluorescence buněk značených izotypovou kontrolní mAb})$.

Obrázek 2

CyaA vazba k myším buněčným liniím je blokována anti-CD11b mAb.

Buňky byly preinkubovány ve 4 °C po dobu 15 minut s nebo bez specifických mAbs v koncentraci 20 µg/ml, a pak byly inkubovány ve 4 °C po dobu 20 minut s CyaA v koncentraci 5 µg/ml a se specifickými mAbs v koncentraci 10 µg/ml, jestliže byly přítomny během preinkubace. Povrchově vázaný CyaA byl detekován biotinylovanou anti-CyaA polyklonální protilátkou, ukázán streptavidinem-PE a detekován průtokovou cytometrií na živých buňkách, jak bylo popsáno v části materiál a metody.

a, b: Účinek M1/70 anti-CD11b mAb na vazbu různých dávek CyaA. FSDC dendritické buňky (a) nebo J774A.1 makrofágy (b) byly preinkubovány s médiem samotným (○) nebo s M1/70 anti-CD11b mAb (●), a pak byly inkubovány s CyaA s nebo bez M1/70 anti-CD11b mAb. Bmax byla určena proložením experimentálních bodů získaných z experimentů prováděných bez mAbs funkcí $\Delta\text{MFI} = B_{\text{max}} * [\text{CyaA}] / (K_d + [\text{CyaA}])$. Vazba CyaA je vynesena do grafu jako % Bmax proti CyaA koncentraci.

c, d: Účinek specifických mAbs na stálou dávku CyaA vazby. Buňky FSDC (c) nebo J774A.1 (d) byly preinkubovány s nebo bez specifických mAbs (anti-CD11a, 2D7, antiCD11b, M1/70 a 5C6, anti-CD11c, HL3, anti-CD18, C17/16, kontrolní A95-1) a byly inkubovány s CyaA ve stálé koncentraci 5 µg/ml. Hodnoty ΔMFI získané pro CyaA vazbu na buňkách ošetřených specifickými mAbs byly normalizovány jako hodnoty ΔMFI získané pro CyaA vazbu bez mAb.

Obrázek 3

CyaA vazba k humánním neutrofilům je blokována anti-CD11b a anti-CD18 mAbs.

a, b, c: fluorescenční histogramey získané z čerstvě purifikovaných neutrofilů, které byly preinkubovány s médiem samotným (a), s 44 anti-CD11b mAb (b) nebo s izotypově shodnou kontrolní myší mAb (c), a pak byly inkubovány s (znázorněno šedě) nebo bez (znázorněno bezbarvě) biotinylované CyaA a ukázány streptavidinem-PE. Počet buněk je vyneseno do grafu proti logaritmu PE fluorescence.

d: Účinek specifických mAbs na CyaA vazbu k neutrofilům (anti-CD11b, 44, M1/70, anti-CD18, TS/18, kontrolní myší IgG2a, kontrolní potkaní IgG2b, A95-1). Čerstvě purifikované neutrofilily byly preinkubovány s nebo bez specifických mAbs a byly inkubovány s CyaA. Hodnoty Δ MFI získané pro CyaA vazbu na buňkách ošetřených specifickými mAbs byly normalizovány jako % hodnot Δ MFI získaných pro CyaA vazbu bez mAb.

Obrázek 4

Intracelulární zvýšení cAMP a buněčná smrt zprostředkovaná CyaA jsou specificky blokovány anti-CD11b mAb v buňkách J774A.1.

a: Účinek specifických mAbs na intracelulární akumulaci cAMP. Buňky J774A.1 byly preinkubovány ve 4 °C po dobu 1 hodiny s nebo bez specifických mAbs v koncentraci 10 μ g/ml (anti-CD11b, M1/70, anti-CD18, C17/16) a pak byly inkubovány ve 37 °C po dobu 20 minut s CyaA v koncentraci 5 μ g/ml a s mAbs v koncentraci 10 μ g/ml, jestliže byly přítomny během

preinkubace. Intracelulární obsah cAMP byly určen tak, jak bylo popsáno v části materiál a metody.

b: Účinek specifických mAbs na CyaA zprostředkovanou buněčnou smrt. Buňky J774A.1 byly preinkubovány ve 4 °C po dobu 1 hodiny s médiem samotným nebo se specifickými mAbs v koncentraci 10 µg/ml (anti-CD11a, 2D7, anti-CD11b, M1/70, anti-CD11c, HL3, anti-CD18, C71/16, kontrolní, 2.4G2). Pak byly inkubovány ve 37 °C po dobu 2 hodin s CyaA v koncentraci 0,5 µg/ml a se specifickými mAbs v koncentraci 10 µg/ml, jestliže byly přítomny během preinkubace. Buněčná lýza byla určována uvolňováním LDH s použitím testu Cytotox 96™.

Obrázek 5

CHO buňky vážou CyaA a stanou se citlivými na CyaA, když jsou transfekovány s CD11b, ale ne s CD11c

a, b: CyaA vazba na povrch CHO transfektant. CHO buňky transfekované s humánním CD11b/CD18 (●), humánním CD11c/CD18 (○) nebo falešně transfekované (■) byly inkubovány s různými dávkami CyaA po dobu 20 minut ve 37 °C (a) nebo 4 °C (b). Povrchově vázaná CyaA byla detekována biotinylovanou anti-CyaA polyklonální protilátkou, ukázána streptavidinem-PE a detekována průtokovou cytometrií na živých buňkách, jak bylo popsáno v části materiál a metody. Vazba byla vyjádřena jako $\Delta\text{MFI} = (\text{hodnota průměrné intenzity fluorescence buněk inkubovaných s CyaA}) - (\text{průměrná intenzita fluorescence buněk bez CyaA})$.

C: Intracelulární akumulace cAMP v CHO transfektantách. CHO buňky transfekované humánním CD11b/CD18 (●), humánním CD11c/CD18 (○) nebo falešně transfekované (■) byly inkubovány

s nebo bez CyaA po dobu 20 minut ve 37 °C. Intracelulární obsah cAMP byly určen tak, jak bylo popsáno v části materiál a metody.

d: Buněčná lýza CHO transfektant. CHO buňky transfekované s humánním CD11b/CD18, humánním CD11c/CD18 nebo falešně transfekované byly inkubovány s CyaA v koncentraci 5 µg/ml po dobu 4 hodin ve 37 °C. Buněčná lýza byla určována uvolňováním LDH s použitím testu Cytotox 96TM.

Obrázek 6

Intravenózní imunizace s CyaAOVA instruuje anti-OVA CTL reakce v B lymfocytech, CD4 a CD40-nezávislým způsobem.

Myši C57BL/6 WT +/+ (a), CD4^{-/-} (b), CD40^{-/-} (c) nebo IgM^{-/-} (d) byly intravenózně imunizovány s 50 µg CyaAOVA, geneticky detoxikované formy CyaA nesoucí H-2K^b restringovaný SIINFEBL epitop z OVA (●, ○) nebo s CyaAE5, kontrolním detoxikovaným toxinem bez OVA epitopu (▲, Δ). Sedm dnů později byla zvířata usmrcena a splenocyty byly restimulovány *in vitro* po dobu 5 dnů s pOVA syntetickým peptidem v koncentraci 10 µg/ml v přítomnosti ozářených C57BL/6 splenocytů. CTL aktivita byla hodnocena ve 4-hodinovém testu uvolňování ⁵¹chrómu proti H-2K^b EL4 buňkám předem vystaveným impulsu (●, ▲) nebo nevystaveným (○, Δ) pOVA v koncentraci 10 µg/ml.

Obrázek 7

Identifikace splenických buněk prezentujících antigen zapojených do prezentace CyaAOVA *in vitro* nebo *in situ*, po intravenózní imunizaci.

Frakce splenocytů s nízkou denzitou prezentuje CyaAOVA specifickým anti-OVA CD8⁺ T lymfocytárním hybridomovým buňkám (a, b):

In vitro test (a): frakce s nízkou (LDF, ●) a vysokou denzitou (HDF, ▲) nebo nefrakcionované celkové splenocyty z naivních myši (TSC, ■, □) byly pěstovány s B3Z, CD8⁺ T lymfocytárními hybridomovými buňkami specifickými pro pOVA peptid v kontextu H-2K^b. Po 18 hodin kokultivace v přítomnosti rekombinantní detoxikované CyaA nesoucí OVA peptid (CyaAOVA, ●, ▲, ■) nebo kontrolní peptid (CyaALCMV, □) v různých koncentracích, IL-2 uvolňovaný do supernatantů byl měřen testem proliferace CTLL. Výsledky jsou vyjádřeny v Δ cpm a vyneseny do grafu proti CyaA koncentraci během testu Δ cpm = [cpm + CyaA] - [cpm - CyaA]).

Ex vivo test (b): splenocyty byly získány z myši předem imunizovaných i.v. (6-12 hodin) s 50 μ g CyaAOVA (●, ▲, ■) nebo CyaALCMV (○) a frakcionovány na LDF a HDF. Různá množství buněk získaných z TSC (■), LDF (●, ○) nebo HDF (▲) nebo nefrakcionovaných splenocytů (■) byla vložena přímo do kultury s B3Z bez přidání rekombinantní CyaA. Uvolňování IL-2 bylo hodnoceno po 18 hodinách kultivace, jak bylo popsáno předtím. Výsledky, vyjádřené v cpm, jsou vyneseny do grafu proti počtu APC přítomných v každé jamce.

Dendritické buňky (CD11c) jsou účinnější APC pro CyaAOVA než CD11b^{vysoko}CD11c⁻ buňky nebo B lymfocyty (CD45R⁺) (c,d):

In vitro test (c): $CD11c^+$ (●) tříděné buňky z LDF, $CD11b^{vysoke+}CD11c^-$ (○) a $CD45R^+$ (■) tříděných buněk z TSC, byly vloženy do tkáňové kultury s B3Z po dobu 18 hodin v přítomnosti různých koncentrací CyaAOVA. IL-2 byl stanoven tak, jak uvedeno výše.

Ex vivo test (d): Buňky tříděné průtokovou cytometrií z myší C57BL/6 předem (6-12 hodin) imunizovaných s 50 μ g CyaAOVA byly použity jako APC. $CD11c^+$ (●), $CD11b^{vysoke+}CD11c^-$ (○), $CD45R^+$ (■) tříděné buňky z frakce splenocytů s nízkou denzitou byly přímo vloženy do kultury po dobu 18 hodin s B3Z v různém množství buněk na jamku, bez přidání CyaAOVA. IL-2 byl stanoven tak, jak uvedeno výše.

Podskupina $CD8\alpha^-$ myeloidních dendritických buněk je účinnější APC pro CyaA než podskupina $CD8\alpha^+$ lymfoidních dendritických buněk (e, f):

$CD11c^+$ buňky s nízkou denzitou z naivních myší (e) nebo myší předem (6-12 hodin) imunizovaných i.v. s 50 μ g CyaAOVA (f) byly frakcionovány na myeloidní dendritické buňky ($CD11c^+CD8\alpha^-$, ●,) a lymfoidní dendritické buňky ($CD11c^+CD8\alpha^+$, ○) průtokovou cytometrií a byly použity jako APC v *in vitro* (e) a *ex vivo* (f) testech pro B3Z stimulaci. IL-2 byl stanoven tak, jak uvedeno výše.

Genetická deplece B lymfocytů nezhorší CyaAOVA prezentaci splenocyty (g, h):

TSC (■, □), LDF (●, ○) nebo HDF (▲, △) z myší C57BL/6 WT (■, ●, ▲) nebo deficitních v B lymfocytech (□, ○, △) byly použity jako APC v *in vitro* testu (g, ■, □) nebo *ex vivo* testu (h, ■, ●, ▲, □, ○, △) pro B3Z stimulaci, jako v bodě a. Myši byly buď naivní (g) nebo předem (1,5 hodiny) imunizovány i.v. s 50 μ g CyaAOVA (h). IL-2 byl stanoven tak, jak uvedeno výše.

Obrázek 8

Prezentace CyaAOVA dendritickými buňkami vyžaduje TAP transportéry *in vitro* a *in vivo* po intravenózní imunizaci.

In vitro test (a): TSC ($\blacktriangle, \Delta$) nebo CD11c⁺ ($\bullet, \circ$) tříděné buňky z kontrolních C57BL6 TAP+/+ ($\blacktriangle, \bullet$) nebo TAP-/- myši ($\Delta, \circ$) byly pěstovány s B3Z v přítomnosti nebo v nepřítomnosti různých dávek CyaAOVA. IL-2 byl stanoven tak, jak bylo popsáno na obrázku 6a. Výsledky jsou vyjádřeny v cpm vynesných do grafu proti koncentraci antigenu.

Ex vivo test (b): TSC ($\blacktriangle, \Delta$) nebo CD11c⁺ ($\bullet, \circ$) tříděné buňky z kontrolních C57BL6 TAP+/+ ($\blacktriangle, \bullet$) nebo TAP-/- myši ($\Delta, \circ$) předem i.v. imunizovaných s 50 μ g CyaAOVA byly pěstovány s B3Z po dobu 18 hodin. IL-2 byl stanoven tak, jak bylo popsáno na obrázku 6a. Výsledky jsou vyjádřeny v cpm vynesných do grafu proti množství kokultivovaných buněk.

Obrázek 9

Úloha $\alpha_M\beta_2$ integrinu (CD11b) ve vazbě CyaAOVA k buňkám.

Vazba CyaAOVA-biotinu k TSC je blokována anti-CD11b (a): TSC suspenze byly inkubovány ve 4 °C s anti-CD11b M1/70 mAb v koncentraci 10 μ g/ml nebo izotypovou kontrolní mAb nebo bez ničeho. Pak byl k buňkám přidán CyaAOVA-biotin v koncentraci 2 μ g/ml (levé panely) nebo různé koncentrace (pravý panel) po dobu 30 minut ve 4 °C. Po promytí byl CyaAOVA-biotin odhalen streptavidinem-PE po dobu 30 minut (Strep-PE). Po promytí pak byly buňky resuspendovány v PBS obsahujícím propidiumjodid. Velikost (FSC) živých buněk analyzovaných podle vylučování

propidiumjodidu byla vynesena do grafu proti Strep-PE fluorescenci. Procento leukocytů pozitivních na CyaAOVA-biotin bylo vyneseno do grafu proti koncentraci CyaAOVA-biotin během značení.

Vazba CyaAOVA-biotinu buňkám s nízkou denzitou koreluje s expresí CD11b (b): LDF byly trojitě značeny s CD11c, CD8 α a CyaOVA-biotin (nebo médium) nebo, v samostatných experimentech s CD11c, CD8 α a CD11b (nebo kontrolní mAb). Po promytí byly buňky značeny po dobu 30 minut se Strep-PE, aby se odhalil CyaAOVA-biotin, anti-CD11c-FITC a anti-CD8 α -APC. Analýzy byly prováděny na lymfoidní DC (CD11c⁺CD8 α ⁺), myeloidní DC (CD11c⁺CD8 α ⁻), CD8⁺ T lymfocyty (CD11c⁻CD8 α ⁺) a ostatní buňky (CD11c⁻CD8 α ⁻). Pro každou bránu je značení CyaAOVA-biotinem nebo značení CD11b vyneseno do grafu proti počtu buněk v samostatných histogramech. Levé histogramy: LDF suspenze byly inkubovány s koncentrací 0 (histogramy vybarveny šedě), 2,5 (úzké prázdné histogramy) nebo 10 μ g/ml (silné prázdné histogramy) CyaAOVA-biotinu po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Pravé histogramy: izotypová kontrolní-PE (histogram vybarven šedě), CD11b-PE (tenké prázdné histogramy).

Obrázek 10

Úloha $\alpha_M\beta_2$ integrinu (CD11b) v CyaAOVA prezentaci MHCI

In vitro test prezentace antigenu s TSC (a, b): Stejně experimenty jako v a, b byly prováděny s TSC z naivních C57BL/6 myši jako APC. Stimulace B3Z byla hodnocena uvolňováním IL-2 do kokultivačních supernatantů měřeným v CTLL testu proliferace. Výsledky jsou vyneseny do grafu v cpm proti koncentraci CyaAOVA nebo pOVA.

Ex vivo test prezentace antigenu s TSC nebo CD11b⁺ a CD11b⁻ frakcemi (c, d): C57BL/6 myši byly intravenózně imunizovány s 50 µg CyaAOVA (c) nebo 10 µg pOVA (d). CD11b⁺ (●) a CD11b⁻ (○) buňky byly tříděny průtokovou cytometrií TSC (Δ) a vloženy do kultury s B3Z s různým množstvím buněk na jamku. Po 18 hodinách kokultivace byla stimulace B3Z vyhodnocena uvolňováním IL-2. Výsledky, vyjádřené v cpm, jsou vyneseny do grafu proti množství APC z imunizovaných zvířata přítomných v každé jamce.

Obrázek 11

Shrnutí postupu pro chemickou vazbu epitopů k rekombinantní CyA prostřednictvím disulfidové vazby.

Obrázek 12

schéma vektoru pro chemickou kondenzaci CTL epitopů

Obrázek 13

Graf ukazující IL-2 uvolňování B3Z měřené testem proliferace CTLL.

3×10^5 buněk sleziny z myši C57BI/6 bylo kokultivováno po dobu 18 hodin s 10^5 buněk B3Z v přítomnosti různých koncentrací cykláz. IL2 uvolňování B3Z bylo měřeno testem proliferace CTLL.

Obrázek 14

Graf ukazující cytotoxickou aktivitu měřenou na ^{51}Cr značených EL4 cílových buňkách s pulsem (A) nebo bez pulsu (B) 50 μM OVA peptidu.

Myši C57BL/6 byly i.v. injikovány 50 μg různých CyaA. Sedm dnů později byly buňky sleziny *in vitro* stimulovány OVA peptidem. Cytotoxická aktivita byla měřena na ^{51}Cr -značených cílových buňkách.

Obrázek 14 ukazuje *in vivo* schopnost proteinových vektorů podle vynálezu indukovat OVA-specifické CTL reakce.

Obrázek 15

Inhibice CyaA vazby k CD11b prostřednictvím CyaA-E5 a CyaA fragmenty

CHO buňky transfekované s CD11b/CD18 byly preinkubovány na ledu po dobu 1 hodiny s různými koncentracemi CyaA-E5 (černý trojúhelník), CyaA 1-383 (černý čtverec) nebo CyaA-373-1706 (černý kosočtverec), a pak inkubovány na ledu po dobu 30 minut s biotinylovanou CyaA-E5 v koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cykláza navázaná na povrchu byla odhalena s použitím streptavidinu-PE a analyzována průtokovou cytometrií na živých buňkách. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná intenzita fluorescence (A), procento pozitivních buněk (B) a procento inhibice (C).

Obrázek 16

Schématické znázornění pTRAC-373-1706 expresního vektoru

Velké šipky představují otevřené čtecí rámce β -laktamázy (bla), termosenzitivního represoru cl^{857} z λ fágu (λcl^{857}), genu *cyaC* a zkráceného '*cyaA* genu (šipky ukazují na směr translace odpovídajících genů). Počátek ColE1 (Ori), Pr promotor (λ Pr) a některá relevantní restriční místa jsou také ukázána. Intergenový úsek mezi genem *cyaC* a zkráceným genem '*cyaA* je popsán níže. Ukazuje novou extenzi C-konce *cyaC* (po směru k Arg182 divokého typu CyaC), stop kodon (podtrženo), iniciátor Met a první kodony CyaA373-1706 (v protisměru k Ser373 divokého typu CyaA).

Příklady provedení vynálezu

Příklad A

Adenylátcyklázový toxin *Bordetella* interaguje specificky s $\alpha_M\beta_2$ integrinem (CD11b/CD18)

A.1 Materiál a metody

A.1.1 Rekombinantní toxiny a protilátky

Protokol pro produkci CyaA již byl popsán jinde [Karimova, et al, 1998]. CyaA toxiny byly tvořeny v kmenu BLR *E. coli* obsahujícím expresní plazmid, pCACT3, který nese *cyaA* strukturální gen CyaA pod lacUV5 promotorem a *cyaC* akcesorní

gen vyžadovaný pro aktivaci protoxinu. Po solubilizaci v 8M močovíně, Hepes-Na 20mM, pH 7,5, CyaA byla purifikována na homogenitu vyšší než 95 % (jak usuzováno podle analýzy v SDS gelu, neukázáno) postupně DEAE-sepharose a fenyl-Sepharose. Rekombinantní detoxikovaný CyaA toxin, CACTE5-Cys-Ova, obsahující unikátní cystein vložený do geneticky deaktivované katalytické domény, byl konstruován inzercí vhodného dvojvláknového oligonukleotidu mezi BsiwI a KpnI místa v pCACT-Ova-E5 [Guermónprez et al, 2000]. Do výsledného proteinu CACTE5-Cys-Ova byla aminokyselinová sekvence ASCGSIINFELGT vložena mezi zbytky 224 a 225 z CyaA. Rekombinantní toxin byl exprimován a purifikován, jak bylo popsáno dříve. Purifikovaný protein byl značen na svém unikátním Cys vysoce specifickým sulfhydrylovým činidlem N-(6-(biotinamido)hexyl))-3'-(2'-pyridyldithio)propionamidem (Biotin-HPDP, PIERCE) podle instrukcí výrobce. Biotinylovaný CyaA byl opět purifikován na DEAE-sepharose, aby se odstranilo nezreagované činidlo Biotin-HPDP. Koncentrace toxinu byly určeny spektrofotometricky z adsorpce ve 280 nm s použitím molekulárního extinkčního koeficientu $142 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (vazebné studie) nebo s použitím proteinového testovacího systému od firmy Biorad (studie akumulace cAMP a buněčné smrti).

Purifikované mAbs specifické pro myši CD11a (2D7, potkaní IgG2a, κ), myši a humánní CD11b (M1/70, potkaní IgG2b, κ), myši CD11c (HL3, křeččí 1, λ), myši CD18 (C71/16, potkaní IgG2a, κ), kontrolní (A95-1 nebo anti-CD16/32, 2.4G2, potkaní IgG2b, κ) pocházející od firmy Pharmingen (San Diego, USA). Supernatanty z anti-humánních CD11b (44, myši IgG2a, κ) a anti-humánních CD18 (TS/18, myši IgG1, κ) hybridomů byly laskavě poskytnuty a byly použity v 1/2 ředění v blokujících experimentech. Supernatanty z anti-myších CD11b (5C6, potkaní IgG2b, κ) byly laskavě poskytnuty G. Milonem (Pasteur Institut, Paříž) a byly

použity v 1/2 konečném ředění v testech inhibice vazby. Anti-CyaA polyklonální protilátky byly získány z králíka imunizovaného subkutánně purifikovaným CyaA. Séra byla precipitována z imunního séra sulfátem amonným (33%). Po centrifugaci byly peletované proteiny resuspendovány ve 20mM Hepes-Na, 150mM NaCl, pH 7,5 (pufr C) a extenzivně dialyzovány proti stejnému pufru. Protilátky pak byly biotinylovány inkubací s biotin-amidokaproát-N-hydroxysukcinimidesterem (SIGMA, rozpuštěn v dimethylsulfoxidu) po dobu 130 minut při teplotě místnosti. Pak byl přidán 100mM ethanolamin, pH 9,0 a po 30 minutách další inkubace byla směs extenzivně dialyzována ve 4 °C proti pufru C. Biotinylované protilátky byly uloženy v -20 °C.

A.1.2 Buňky a kultivační média

EL4, J774A.1, LB27.4, THP-1 byly získány ze Sbírky mikroorganismů ATCC (American Type Culture Collection) a byly pěstovány v RPMI 1640 doplněném 10% fetálním telecím sérem, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 2mM L-glutaminem, s nebo bez 5×10^{-5} M 2-merkптоethanolem (kompletní médium). FSDC [Girolomoni et al, 1995] byly pěstovány v kompletním médiu. CHO buňky transfekované humánním CD11b/CD18 nebo CD11c/CD18 nebo transfekované pouze vektorem byly získány od D. Golenbocka (Boston, USA) a pěstovány v přítomnosti neomycinu, jak bylo popsáno dříve [Ingalls et al, 1998]. Humánní neutrofily byly purifikovány, jak bylo popsáno dříve [Rieu et al, 1992].

A.1.3 CyaA vazebné testy

Všechny vazebné testy byly prováděny v DMEM 4,5 mg/ml glukóze (Life Technologies) bez séra na 96 jamkových

kultivačních destičkách (Costar). 2×10^5 buněk/jamka bylo inkubováno po dobu 20 minut (ve 4 °C nebo 37 °C v závislosti na experimentech) v konečném objemu 200 μ l. V některých experimentech byly buňky preinkubovány po dobu 20 minut ve 4 °C v přítomnosti blokujících mAbs v konečném objemu 100 μ l. Do jamek byl přidán roztok toxinu v kontinuální přítomnosti mAbs v celkovém objemu 200 μ l ve 4 °C. Pak byly destičky stočeny v 1500 rpm po dobu 5 minut a supernatanty byly odstraněny. Buňky byly inkubovány ve 4 °C po dobu 25 minut s biotinylovanými anti-CyaA králíčími polyklonálními protilátkami (1/400 v DMEM, 50 μ l/jamka) v přítomnosti kontrolního (neimunního nebo preimunního) králíčího séra jako saturujícího činidla (1/50).

Po centrifugaci a odstranění supernatantu byly buňky značeny streptavidinem-fykoerytrinem (PE) (Pharmingen) v ředění 1/300 (50 μ l/jamka). Po promytí byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji FACStar (Becton-Dickinson, Mountain View, USA) v přítomnosti propidiumjodidu v koncentraci 5 μ g/ml. Byly prováděny analýzy vylučování propidiumjodidu, aby se vyřadily buněčné agregáty a mrtvé buňky. Experimentální body byly proloženy funkcí popisující hyperbolický model $\Delta\text{MFI} = B_{\text{max}} \cdot [\text{CyaA}] / (K_d + [\text{CyaA}])$, přičemž B_{max} = % maximální vazby, s použitím počítačového programu Prism.

A.1.4 cAMP test

Akumulace cAMP byla měřena imunotestem kompetice antigenu [Karimova et al, 1998], ve kterém inkubační médium bylo složeno z DMEM bez séra, ale obsahujícím 4,5 mg/ml glukózy a 20 U/ml hexokinázy. Hexokináza, která katalyzuje fosforylaci glukózy závislou na ATP, byla přidána pro zbavení extracelulárního média veškerých stop ATP, aby se tak

zabránilo extracelulární syntéze cAMP. Proto změřené množství cAMP je reprezentativní pro akumulaci přísně intracelulárního cAMP. 5×10^5 buněk bylo preinkubováno na 96 jamkových destičkách v koncentraci 100 μl /jamka s nebo bez specifických mAbs v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ ve 4 °C po dobu 1 hodiny, a pak byly buňky inkubovány ve 37 °C po dobu 20 minut s CyaA v koncentraci 0,05, 0,5 nebo 5 g/ml a se specifickými mAbs v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, jestliže byly přítomny během preinkubace. Pro reakci účinku závislého na dávce CyaA, byly buňky přímo inkubovány s toxinem po dobu 20 minut ve 37 °C. Po intoxikaci byly buňky stočeny ve 2 500 rpm po dobu 5 minut. Vzorky byly lyzovány 100 μl 0,1N HCl, zahřívány po dobu 5 minut ve 120 °C a neutralizovány 100 μl 0,125M Tris, 0,2M NaCl. Mikrotitrační destičky byly potaženy cAMP-BSA konjugáty naředěnými na koncentraci 1/4 000 v 0,1M Na_2CO_3 , pH 9,5. Byly dvakrát promyty v PBS-0,1% Tween, satureovány po dobu 1 hodiny v PBS-2% BSA a pětkrát promyty PBS-0,1% Tween. Vzorky a cAMP standardy (Sigma) byly přidány přímo na destičky potažené cAMP-BSA konjugáty a sériově naředěny 1/1 směsí 0,1N HCl a 0,125M Tris-0,2M NaCl. Anti-cAMP králičí protilátka byla přidána v koncentraci 1/2 500 v PBS-2% BSA a byla inkubována ve 37 °C po dobu 3 hodin. Destičky byly pětkrát promyty PBS-Tween 0,1 %. Anti-králičí protilátky kondenzované ke křenové peroxidáze (Amersham) byly přidány v koncentraci 1/2 500 v PBS-2% BSA, byly inkubovány ve 37 °C po dobu 1 hodiny a odhaleny s použitím klasické peroxidázové reakce. Experimentální body standardní křivky byly proloženy modelem sigmoidey s použitím software Prism.

A.1.5 Testy toxicity

Buněčná smrt byla hodnocena tak, jak bylo popsáno dříve [Khelef et al, 1993, Khelef et al, 1995]. Krátce, 10^5 buněk bylo inkubováno po dobu 24 hodin na 96 jamkové destičce v kompletním médiu a promyto jednou médiem bez séra. Všechny buněčné inkubace byly dále prováděny v médiu bez séra. Reakce účinku na dávce byla hodnocena přímou aplikací různých koncentrací CyaA na CHO buňky ve 37 °C po dobu 4 hodin. Pro stanovení inhibice cytotoxicity byly buňky preinkubovány ve 4 °C po dobu 1 hodiny s nebo bez specifických mAbs v koncentraci 10 µg/ml, a pak byly inkubovány ve 37 °C s CyaA v koncentraci 0,5 µg/ml po dobu 2 hodin pro buňky J774A.1A.1 nebo v koncentraci 5 µg/ml po dobu 4 hodin pro buňky CHO a se specifickými mAbs v koncentraci 10 µg/ml, jestliže byly přítomny během preinkubace. Buněčná lýza byla vyhodnocena s použitím testu Cytotox 96TM (Promega), který kvantifikuje množství laktátdehydrogenázy (LDH) uvolňované do média umírajícími buňkami.

A.2 Výsledky

A.2.1 Saturovatelná vazba CyaA koreluje s přítomností CD11b na povrchu cílových buněk

Pro charakterizaci CyaA buněčné specifity k populaci leukocytů, původci si vybrali tři reprezentativní myší buněčné linie exprimující různé kombinace $\beta 2$ integrinů: J774A.1 (nádorový makrofág), EL4 (T lymfocytární thymom) a LB27.4 (B lymfocytární lymfom). Po 20 minutách inkubace s CyaA ve 37 °C byla vazba CyaA k buněčnému povrchu těchto buněk monitorována průtokovou cytometrií s použitím biotinylovaných

anti-CyaA protilátek a streptavidinu-PE. V těchto podmínkách původci pozorovali účinnou, na dávce závislou a saturevatelnou vazbu CyaA na buněčnou linii J774A.1. Afinity CyaA k buňkám J774A.1 byla vysoká, protože zřejmě K_d byly $9,2 \pm 4,5$ nM a $3,2 \pm 1,9$ nM, v daném pořadí. Byla pozorována nízká vazba CyaA k EL4 a LB27.4 buňkám, ale nebyla saturevatelná v testovaných koncentracích.

Aby se určilo, jestliže vazba CyaA k J774 buněčným liniím korelovala s expresí jednoho z členů rodiny $\beta 2$ integrinů, původci prováděli fenotypovou analýzu těchto buněk průtokovou cytometrií s použitím monoklonálních protilátek (mAbs) specifických pro tři α řetězce dobře charakterizovaných $\beta 2$ integrinů (CD11a, CD11b a CD11c) a pro obyčejný β řetězec (CD18) (obrázek 1b, c, d, e). Buňky J774A.1 exprimovaly většinou CD11b a CD18, ale byly také pozitivní na CD11a. Buňky EL4 a buňky LB27.4 exprimovaly většinou CD11a a CD18. Vzato dohromady tato data ukázala, že účinná a saturevatelná vazba CyaA k J774A.1 korelovala s přítomností integrinu CD11b/CD18.

A.2.2 CyaA saturevatelná vazba je specificky blokována anti-CD11b mAbs

Původci dále zkoumali, jestli by CD11b/CD18 mohl být přímo zapojen do vazby CyaA k buňkám exprimujícím tento integrin. Původci prováděli kvantitativní analýzu inhibice získané s anti-CD11b M1/70 mAb výpočtem procenta hodnot průměrné fluorescence v nepřítomnosti mAbs ve stálých nebo měnících se koncentracích CyaA (obrázek 2). Inhibice CyaA vazby získaná s M1/70 anti-CD11b mAb byl téměř úplná při většině testovaných koncentrací CyaA (obrázek 2a, b). Tato inhibice byla specifická, protože anti-CD11a, CD11c, CD18 nebo kontrolní mAb neinhibují CyaA vazbu. Druhá anti-CD11b mAb (klon 5c6) také

inhibovala vazbu CyaA (obrázek 2 c,d). Podobné výsledky byly získány pro FSDC, nezralou dendritickou buněčnou linií exprimující CD11b (obrázek 2a, c) a J774A.1 makrofágovou buněčnou linií (obrázek 2b, d).

Aby se prozkoumalo, zda by CyaA mohla podobně interagovat s humánním CD11b, byly prováděny CyaA vazebné studie na humánních neutrofilech, jejichž vysoká exprese CD11b je dobře prokázána. Protože po inkubaci humánních myeloidních buněk s anti-CyaA králíčími protilátkami (data nejsou ukázána) byla vysoká fluorescence pozadí, původci připravili alternativní vazebný test. Detoxikovaná forma CyaA byla specificky biotinylována v unikátních cysteinových zbytcích, geneticky zavedených do její katalytické domény. S použitím tohoto systému byli původci schopni detekovat CyaA vazbu k neutrofilům (obrázek 3). Preinkubace neutrofilů s 44 nebo M1/70 anti-CD11b mAbs vedla, podle uvedeného daného pořadí, ke kompletní nebo parciální inhibici vazby CyaA (obrázek 3a a b). Na rozdíl od C71/16, anti-myší CD18 mAb, která neblokovala CyaA vazbu k myším buňkám, preinkubace s humánní anti-CD18 TS/18 mAb vedla ke kompletní inhibici CyaA vazby k humánním neutrofilům (obrázek 3b). Podobné výsledky byly získány s humánní monocytární THP-1 buněčnou linií (data nejsou ukázána).

Závěrem lze konstatovat, že CyaA vazba na povrch tří myeloidních buněčných linií, jak myšího tak humánního původu (J774A.1, FSDC, THP-1), a také čerstvě purifikovaných humánních neutrofilů, je hlavně zprostředkována prostřednictvím CD11b/CD18 integrinu.

A.2.3 CyaA-zprostředkované zvýšení cAMP a toxicita jsou specificky blokovány anti-CD11b mAb

Aby se vyhodnotila fyziologická závažnost CyaA vazba závislé na CD11b/CD18, původci zkoumali účinek blokády mAbs na cytotoxicitu CyaA. Původci nejdříve měřili množství cAMP vytvořeného v buňkách J774A.1 vystavených CyaA v přítomnosti různých mAbs. Jak ukázáno na obrázku 4a, zvýšení intracelulárního obsahu cAMP indukovaného CyaA byl zcela odstraněno, když byly buňky preinkubovány s M1/70 anti-CD11b mAb. C17/16 anti-myší CD18 mAb, která neblokovala vazbu CyaA na buňky (obrázek 2) neměla žádný účinek na intracelulární obsah cAMP buněk ošetřených CyaA. Tato data tedy silně svědčí pro to, že zvýšení intracelulárního cAMP indukované CyaA je závislé na interakci toxinu s CD11b. Aby se dále analyzovaly požadavky této molekuly na toxicitu CyaA, původci hodnotili účinek mAbs specifických pro různé řetězce rodiny $\beta 2$ integrinů na CyaA zprostředkovanou buněčnou smrt. Obrázek 4b ukazuje, že anti-CD11b mAb J774A.1 dramaticky redukovala buněčnou smrt indukovanou CyaA (88% inhibice). Buněčná smrt indukovaná CyaA byla neovlivněna, když J774A.1 byly preinkubovány s mAbs, které neblokovaly vazbu toxinu k buňkám (anti-CD11a, CD11c nebo CD18 nebo kontrolní mAb).

Vzato dohromady tato data ukazují, že CyaA vazba prostřednictvím CD11b je striktně vyžadována pro CyaA zprostředkovanou toxicitu na buňky J774A.1.

A.2.4 Transfekce CHO buněk s CD11b/CD18 udělí senzitivitu na CyaA

Aby se potvrdila úloha CD11b pro vazbu CyaA, původci použili CHO buňky transfekované humánními integriny CD11b/CD18 nebo CD11c/CD18 nebo falešně transfekované (samotný vektor).

Jak je ukázáno na obrázku 5a, CyaA se může ve 37 °C vázat k těmto buněčným liniím. Nicméně, CyaA vazba byla účinná a saturovatelná v CHO buňkách exprimujících CD11b/CD18, ale ne v buňkách s CD11c/CD18 nebo falešně transfekovaných buňkách. Afinita CyaA pro CD11b/CD18 transfekované buňky byla v nM rozsahu ($K_d = 0,7 \pm 0,09$ nM). Ve 4 °C byla účinnost CyaA vazby redukována ve srovnání s vazbou ve 37 °C (obrázek 5b). V této teplotě byly rozdíly mezi CD11b/CD18 transfekovanými buňkami a dvěma jinými buněčnými liniemi více vyjádřeny.

Protože původci zjistili, že CD11b byl vyžadován pro CyaA zprostředkovanou toxicitu buňkách J774A.1, původci pak určovali, jestli CD11b exprese byl dostatečná pro udělení CyaA-senzitivního fenotypu CHO transfekovaným buňkám. V souladu s předchozími publikacemi [Gordon et al, 1988], CyaA indukovala význačné množství intracelulárního cAMP v CHO buňkách transfekovaných CD11c/CD18 nebo v kontrolních falešně transfekovaných buňkách, ale pouze ve vysoké koncentraci toxinu (5 µg/ml, obrázek 5c). Na rozdíl od toho CyaA zvýšila intracelulární hladinu cAMP v CD11b/CD18 transfekovaných CHO buňkách dokonce v nejnižší studované koncentraci (0,05 µg/ml). Navíc produkce cAMP jako reakce na CyaA v koncentraci 5 µg/ml byla 4 až 5krát více zvýšena v CD11b/CD18 transfekovaných buňkách ve srovnání s CD11c/CD18-transfekovaných nebo falešně transfekovaných buňkách.

Původci také hodnotili úlohu CD11b/CD18 v CyaA-zprostředkované buněčné smrti. Jak je ukázáno na obrázku 5d, více než 50 % CHO transfekovaných CD11b/CD18 bylo usmrceno po 4 hodinách inkubace s 5 µg/ml CyaA, zatímco CD11c/CD18-transfekované nebo falešně transfekované buňky tímto ošetřením postiženy nebyly.

Vzato dohromady tyto výsledky tedy jasně prokázaly, že exprese humánního CD11b/CD18 integrinu je dostatečná pro vytvoření receptoru s vysokou afinitou pro CyaA v buňkách CHO.

A.3 Diskuse: Receptor pro CyaA

Na rozdíl od jiných toxinů byla CyaA považována po dlouhou dobu za nezávislou na jakémkoliv receptorové vazbě. To bylo založeno na pozorování, že i) CyaA může intoxikovat *in vitro* celou řadu modelových buněčných linií různého původu [Ladant et al, 1999] ii) CyaA se váže k buňkám Jurkat a ovčím erytrocytům nesaturovatelným způsobem [Gray, et al 1999]. Ve skutečnosti, tato pozorování zjistila, že nespecifická adsorpce CyaA na lipidové membrány vede k určité translokaci katalytické domény do cytosolu. Nicméně nevyloučila existenci specifického receptoru. Původci ukázali v této studii na myeloidních buněčných liniích, že vazba a toxické vlastnosti CyaA jsou závislé na její interakci s integrinem CD11b/CD18. Účinná a saturovatelná vazba koreluje s expresí CD11b a je plně a specificky blokována anti-CD11b mAbs. Navíc exprese CD11b/CD18 v CHO buňkách dramaticky zlepšila vazbu CyaA, což má za následek zvýšenou senzitivitu k intoxikaci tímto toxinem. Výsledky původců jsou prvním důkazem, který podporuje interakci CyaA s molekulou buněčného povrchu specificky exprimovanou na leukocytech. Téměř kompletní blokáda CyaA vazby anti-CD11b mAbs svědčí pro to, že CD11b je hlavní receptor pro CyaA v testovaných buněčných liniích. Nedostatek účinné vazby na CD11c/CD18 transfektanty nebo CD11a/CD18 exprimující buňky, jako jsou například EL4 nebo LB27.4 svědčí pro to, že CD11b/CD18 je jediný integrin $\beta 2$ rodiny zapojený do vazby CyaA na cílové buňky.

V souladu s předchozími studiemi původci pozorovali detekovatelnou vazbu CyaA na všechny testované buněčné linie. Kromě toho CyaA ve vysokých koncentracích spustila malé, ale detekovatelné zvýšení cAMP ve falešně transfekovaných CHO buňkách, které nebylo sdruženo s buněčnou smrtí. Ve vysoké koncentraci se tedy CyaA může vázat a translokovat k celé řadě buněčných linií, ale účinná a saturovatelná vazba, translokace a zabíjení je charakteristický znak buněk exprimujících CD11b.

Vazba CyaA k členu rodiny $\beta 2$ integrinů připomíná chování jiných RTX toxinů, o kterých bylo nedávno zjištěno, že interagují s těmito molekulami [Lally et al, 1997, Li et al, 1999, Ambagala et al, 1999, Jeyaseelan et al, 2000]. HlyA z *E. coli*, která je silně homologní s CyaA, tvoří kationtové póry v plazmatické membráně. HlyA projevuje specifitu k leukocytům, ale pouze v nízké koncentraci [Welch et al, 1991]. Bylo ukázáno, že tato relativní specifita je zprostředkována interakcí s integrinem CD11a/CD18 [Lally et al, 1997]. Podobně leukotoxin z *A. actinomycetemcomitans* a *P. haemolytica* (LtxA a LktA, v daném pořadí), což jsou méně promiskuitní RTX toxiny specifické pro humánní a bovinní leukocyty, v daném pořadí, také interagují s CD11a/CD18 [Lally et al, 1997, Li et al, 1999, Ambagala et al, 1999, Jeyaseelan et al, 2000]. Navzdory své silné homologii s HlyA, CyaA rozpoznává další $\beta 2$ integrin (CD11b/CD18), jehož buněčná distribuce je odlišná. Opravdu, CD11b je exprimován většinou na makrofázích, neutrofilech a dendritických buňkách, ale ne na většině T a B lymfocytů, zatímco CD11a je exprimován na všech leukocytech včetně T a B lymfocytů.

Toto specifické cílení CyaA k buňkám exprimujícím CD11b je využíváno v předkládaném vynálezu, aby se specificky cílila tato konkrétní podskupina buněk. Detoxikované mutanty CyaA, které zůstávají invazivní, by mohly být použity pro dodávání

farmakologicky účinných molekul k CD11b pozitivním buňkám, bez znatelného ovlivnění dalších buněčných typů.

Příklad B

Cílené dodání antigenu do cytosolu myeloidních dendritických buněk a selektivní CTL instruování

B.1 Materiál a metody

B.1.1 Rekombinantní toxiny a peptid adenylátcyklázy

Syntetický peptid pOVA (SIINFEKL) pocházel od firmy NEOSYSTEM a byl naředěn v PBS na koncentraci 1 mg/ml.

B.1.2 Imunizace a test detekce cytotoxických T lymfocytů

Byly použity samice C57BL/6 (H-2^b) od Iffa Credo (L'arbrèsle, Francie) ve věku 6 až 8 týdnů. TAP1 -/- (Van Kaer et al., 1992), CD4 -/- (Killeen et al., 1993), CD40 -/- (Kawabe et al., 1994) a B lymfocyt-deficitní μ MT (Kitamura et al., 1991) kříženy na C57BL/6 základě pocházející ze zařízení CDTA (CNRS, Orleans, Francie) a byly rozmnožovány v zařízeních Institutu Pasteur. Zvířata byla intravenózně imunizována Ag v PBS. Sedm dnů po injekci byla zvířata usmrcena a byly jim odstraněny sleziny. Jednobuněčné suspenze splenocytů ($2,5 \times 10^7$ buněk) byly restimulovány v 10 ml CM (viz níže) s ozářenými buňkami sleziny ($2,5 \times 10^7$ buněk) po dobu 5 dnů v přítomnosti 1 μ g/ml pOVA. Test cytotoxicity byl prováděn přesně tak, jak bylo popsáno dříve (Fayolle, et al., 1999).

B.1.3 Buněčné linie

B3Z (Karttunen et al., 1992), CD8⁺ T lymfocytární hybridomové buňky specifické pro pOVA 257-264 peptid (SIINFEKL) v kontextu H-2K^b byl velkorysý dar od Dr N. Shastri (University of California, Berkeley, USA).

B.1.4 Testy prezentace antigenu

Všechny testy prezentace antigenu byly prováděny kokultivací APC s B3Z na 96 jamkových kultivačních mikrotitračních destičkách (konečný objem 0,2 ml) v RPMI 1640 doplněném 10% fetálním telecím sérem, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 2mM L-glutaminem a 5x10⁻⁵M 2-merkaptoethanolem (kompletní médium, CM). Stimulace B3Z buněk (10⁵ buněk/jamka) byla monitorována IL-2 uvolňováním v supernatantech 18 až 24-hodinových tkáňových kultur v přítomnosti APC. IL-2 byl měřen v CTLL testu tak, jak bylo popsáno dříve (Guermonprez et al., 1999). V některých experimentech (viz popisy obrázků), B3Z stimulace byla hodnocena s použitím reportérového testu NF-AT lacZ. Aktivita lacZ v buněčných lyzátech byla vyhodnocována s CPRG substrátem tak, jak bylo popsáno dříve (Karttunen et al., 1992). Byly prováděny dva testy prezentace antigenu: i) *in vitro* test: APC pocházející z naivních myší byly kokultivovány (10⁵/jamka) s B3Z v přítomnosti Ag v různých koncentracích. V některých experimentech byly APC preinkubovány nebo nebyly preinkubovány s mAbs v koncentraci 10 µg/ml po dobu 40 minut ve 4 °C, pak byl k buňkám přidán Ag v konečném objemu 100 µl v kontinuální přítomnosti mAbs. Po 4 hodinách impulsu byly APC dvakrát promyty a vloženy do kokultivace s B3Z. Použité purifikované mAbs byly proti CD11b (M1/70 potkanní IgG2b, κ) nebo izotypově shodná kontrola a pocházely od firmy Pharmingen (San Diego,

USA). ii) *Ex vivo* test: APC pocházely z myši předem intravenózně imunizovaných různými Ag a byly vloženy do kultury s B3Z v konečném objemu 0,2 ml v různých množstvích APC na jamku.

B.1.5 Buňky prezentující antigen a třídění

Celkové buňky ze sleziny (TSC), frakce s nízkou denzitou (LDF) a frakce s vysokou denzitou (HDF) byly připraveny podle protokolu Steinmana modifikovaného autory Vremec et al. (Vremec et al., 1992). Krátce, sleziny byly štěpeny kolagenázou po dobu 40 minut ve 37 °C, a pak rozetřeny a připraveny v kontinuální přítomnosti 5mM EDTA. Buňky byly stočeny na hustém roztoku BSA. Supernatant a buňky peletu byly sebrány odděleně a nazvány frakce s nízkou denzitou a s vysokou denzitou. Značení na CD11c bylo prováděno ve 4 °C v PBS doplněném 5% fetálním telecím sérem a 2mM EDTA (PBS-FACS) s křeččí HL3 mAb kondenzovanou k fykoerytrinu (PE), fluoresceinisothyokyanátu (FITC) nebo biotinylovanou, a pak ukázanou streptavidinem-PE. CD8 α značení bylo prováděno s mAb 53-6.7 kondenzovanou k PE. CD11b značení bylo prováděno s M1/70 mAbs kondenzovanou k PE nebo FITC. CD54R značení bylo prováděno s B220 mAb kondenzovanou k PE nebo biotinylovanou a ukázanou streptavidinem-PE. Všechny mAbs pocházely od firmy Pharmingen. Po dvou promytích byly buňky tříděny s použitím přístroje FACStar (Beckton Dickinson, Mountain View, USA). Buňky byly asepticky získány do CM. čistota tříděných buněk byla kontrolována na alikvotu tříděných buněk analyzovaných na přístroji FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View, USA). čistota tříděných buněk byla typicky mezi 80 a 98 %. V jiných experimentech (jako uvedeno v popisech obrázků), CD11c⁺ buňky byly tříděny přímo po štěpení sleziny kolagenázou s použitím CD11c mikropерliček a technologie magnetického třídění buněk

podle protokolů dodavatele (MACS, MiltenyiBiotec, Bergish Gladbach, Německo). Čistota buněk tříděných touto technikou byla v rozmezí kolem 80 %.

B.2 Výsledky

B.2.1 CD4- a CD40-nezávislé instruování CTL po systémové imunizaci s CyaAOVA v nepřítomnosti adjuvans

Jako experimentální modelový epitop byl použit H-2K^b restringovaný SIINFEBL epitop kuřecího ovalbuminu. Byl geneticky vložen do katalytické domény detoxikované, nicméně dosud invazivní mutanty CyaA. Myši C57BL/6 (H-2^b) byly imunizovány i.v. jednou s 50 µg rekombinantního toxinu nebo kontrolního fyziologického roztoku. Sedm dnů po imunizaci CTL aktivita specifická pro pOVA byla detekována ve splenocytech CyaAOVA-imunizovaných C57BL/6 myší, ale ne v myších injikovaných fyziologickým roztokem nebo kontrolní CyaA (obrázek 6a). Podobné výsledky byly získány u CD4 nebo CD40 deficitních myší, což ukazuje, že na rozdíl od mnoha dalších CTL reakcí (jako jsou reakce vyvolané proti zkříženě instruujícím („cross-priming“) Ag (Bennett et al, 1997, 1998, Schoenberger et al., 1998, Ridge et al., 1998) CD4⁺ T pomocné lymfocyty nebyly závazné pro instruování CTL reakcí prostřednictvím CyaAOVA (obrázek 6b, c). Kromě toho nebyly vyžadovány B lymfocyty, protože CTL reakce byly také získány od B lymfocyt deficitních myší (IgM^{-/-}, obrázek 6d). Kontaminující LPS, možná působící jako adjuvancia, nejsou zapojeny do stimulace CTL reakcí CyaAOVA, protože C57BL10ScSn a LPS-hyporesponsivní myši C57BL10ScCr projevovaly podobnou OVA-specifickou CTL reakci po CyaAOVA injekci (neukázáno).

B.2.2 *In vitro* a *in vivo* cílení CyaAOVA prezentace k buňkám exprimujícím CD11b

Aby se lépe porozumělo imunogenicitě CyaAOVA, původci zamýšleli určit APC zapojené do jeho prezentace CD8⁺ T lymfocytům. S použitím IL-2 sekrece jako údaje o stimulaci, původci prokázali, že B3Z, H-2K^b-restringovaný, anti-OVA CD8⁺ T lymfocytární hybridom, je stimulován *in vitro* velkým množstvím splenocytů v přítomnosti CyaAOVA, ale ne CyaALCMV (obrázek 7a). Původci zamýšleli analyzovat APC schopnost tří přesně stanovených splenických APC: DC (CD11c⁺), B lymfocytů (CD45R⁺) a makrofágů/granulocytů (CD11b^{vysoko}+CD11c⁻). Kvůli nízkému procentu CD11c⁺ v celkových splenocytech (<1%), původci prováděli frakcionaci dle denzity a třídili CD11c⁺ z DC-obohacené (4-10%) populace s nízkou denzitou průtokovou cytometrií. Frakce s vysokou denzitou obsahovala pouze stopová množství CD11c⁺ buněk. Na rozdíl od toho, distribuce CD45R⁺ a CD11b^{vysoko}+CD11c⁻ (složená z granulocytů/makrofágů) buněk v obou frakcích umožnila třídění celkové populace na tyto ukazovatele. Jak je ukázáno na obrázku 7c, CyaAOVA byl prezentován většinou účinně prostřednictvím DC, méně účinně CD11b^{vysoko}+CD11c⁻ a B lymfocyty. To koreluje s kvazivýlučnou distribucí schopnosti prezentovat antigen ve frakci splenocytů s nízkou denzitou (obrázek 7a). V ostrém kontrastu je to, že obě frakce, jak s vysokou, tak s nízkou denzitou, byly schopny stimulovat B3Z jako reakce na pOVA (neukázáno).

Aby se detekovaly K^b-OVA komplexy vytvořené *in vivo* po imunizaci, APC připravené z myší i.v. imunizovaných 8 až 15 hodin předem 50 µg CyaAOVA byly kokultivovány s B3Z *in vitro* bez přidání Ag (*ex vivo* test). Pokud jde o *in vitro* testy, APC zodpovědné za CyaAOVA prezentaci byly přítomny výlučně v DC-obohacené frakci splenocytů s nízkou denzitou (obrázek 7b). Specifita testu byla kontrolována APC z CyaALCMV-imunizovaných

myši, které nestimulovaly B3Z (obrázek 7b). Aby se dále charakterizovaly APC s nízkou denzitou zapojené do CyaAOVA prezentace, původci prováděli třídění buněk: výsledky ukázané na obrázku 7d ukazují, že DC ($CD11c^+$) frakce byla účinnější APC. Makrofágy/granulocyty ($CD11b^{vysoke^+}CD11c^-$) a B lymfocyty ($CD45R^+$) tříděné ze stejné frakce, byly velmi nepostačující při stimulaci B3Z.

Aby se dále charakterizovaly APC zapojené do CyaAOVA, původci prováděli subfrakcionaci splenocytů s nízkou denzitou $CD11c^+$ DC v $CD11c^+CD8\alpha^-$ myeloidní podskupině a $CD11c^+CD8\alpha^+$ lymfoidní podskupině. *In vitro* a *ex vivo* testy (obrázek 7e a f, v daném pořadí) ukázaly, že schopnost prezentace antigenu pro CyaAOVA byla podržena myeloidní podskupinou, která také exprimovala $CD11b^+$, na rozdíl od lymfoidní podskupiny exprimující nízké hladiny tohoto integrinu (Pulendran et al., 1997, Vremec et al., 1997). Neschopnost $CD11c^+CD8\alpha^+$ lymfoidní podskupiny prezentovat CyaAOVA byla specifická pro CyaAOVA, protože $CD11c^+CD8\alpha^+$ a $CD11c^+CD8\alpha^-$ prezentovaly pOVA syntetický peptid stejně dobře B3Z.

In vitro a *ex vivo* testy prováděné se splenocyty z kontrolních (C57BL/6) nebo B lymfocyty-deficitních myši ($IgM^{-/-}$) potvrdily špatné přispívání B lymfocytů k CyaAOVA prezentaci *in vitro* a *in vivo* (obrázek 7 g a h). V souladu s těmito výsledky, CTL reakce indukované CyaAOVA nebyly významně ovlivněny u B lymfocyty-deficitních myši ve srovnání s kontrolními myši (obrázek 5d).

B.2.3 MHCI-restringovaná prezentace CyaAOVA dendritickými buňkami závisí na cytosolovém dodání rekombinantního toxinu jak *in vitro* tak *in vivo*

Aby se určilo, zda CyaAOVA prezentace závisí na cytosolovém dodání OVA epitopu nebo extracelulární dávce, původci prováděli testy prezentace Ag s celkovými splenocyty nebo CD11c⁺ DC z TAP^{-/-} nebo kontrolními TAP^{+/+} splenocyty purifikovanými z naivních zvířat (*in vitro*, obrázek 8a) nebo zvířat imunizovaných i.v. s CyaAOVA (*ex vivo*, obrázek 8b). Výsledky ukázaly, že CyaAOVA prezentace dendritickými buňkami je zcela závislá na TAP buď *in vitro* nebo *in vivo*. Protože pOVA prezentace je jev nezávislý na TAP, původci zkontrolovali funkčnost TAP^{-/-} DC tříděných z CyaAOVA-imunizovaných myší stimulací B3Z s těmito buňkami s *in vitro* vloženým pOVA peptidem (neukázáno). Tyto výsledky ukazují, že *in vivo* prezentace CyaAOVA závisí na jeho cytosolovém dodání.

B.2.4 Interakce CyaA s CD11b je vyžadována pro buněčnou vazbu a dodání vloženého antigenu do cytosolové dráhy pro prezentaci antigenu MHCI

Původci ukázali v části A, že satureovatelná a účinná vazba CyaA WT k CD11b⁺ buňkám může být blokována specificky anti-CD11b mAbs. Navíc CD11b transfekce specificky propůjčila satureovatelnou vazbu a senzitivitu na CyaA WT buňkám CD11b⁻ jinak odolným proti CyaA WT. Blokáda buněčné vazby anti-CD11b mAbs inhibovala následné intracelulární dodání katalytické adenylátcyklázové domény, zvýšení cAMP a buněčnou smrt indukovanou CyaA WT. Protože tyto výsledky byly získány na buněčných liniích, zbývalo určit, jestliže se CyaA váže ke splenocytům. Původci připravili test průtokovou cytometrií pro detekci fixace biotinylované detoxikované formy CyaA nesoucí OVA peptid (CyaAOVAbiotin) k suspenzím celkových splenocytů se

streptavidinem kondenzovaným k fykoerytrinu. S použitím tohoto testu původci pozorovali, že se CyaAOVA váže k podskupině leukocytů v suspenzi celkových splenocytů (5-7%). Preinkubace s anti-CD11b M1/70 mAb, ale ne s kontrolní mAb, tuto vazbu zrušila (obrázek 9a). Kromě toho existuje korelace mezi expresí CD11b a CyaAOVA vazbou k buňkám s nízkou denzitou: CyaAOVA se váže účinně k T lymfocytům $CD11c^+CD8\alpha^-$, které exprimují vysoké hladiny CD11b, méně účinně k $CD11c^+CD8\alpha^+$, které exprimují nízké hladiny CD11b a velmi slabě k $CD11c^-CD8\alpha^-$ T lymfocytům, které neexprimují CD11b (obrázek 9b). Je pozoruhodné, že se CyaOVA váže účinně k nízkému procentu buněk $CD11c^-CD8\alpha^-$ v korelaci s přítomností $CD11b^{vysoko+}$ v této $CD11c^-$ populaci. Vazba CyaOVA biotinu je tedy zprostředkována CD11b (pokud jde o CyaA WT) a předpovídá schopnost daného buněčného typu prezentovat CyaOVA.

Původci ukázali, že *In vitro* anti-CD11b mAb M1/70 blokuje CyaAOVA prezentaci TSC buňkami B3Z (obrázek 10a). Tato blokáda je specifická, protože i) kontrolní mAb nebo mAbs specifické pro další členy rodiny $\beta 2$ integrinů (anti-CD11a, CD11c) měly malý nebo žádný účinek (obrázek 10a a data nejsou ukázána) ii) prezentace pOVA byla nepostižena anti-CD11b nebo jinou z těchto mAbs (obrázek 10b a data nejsou ukázána). To potvrdilo, že CD11b je hlavní receptor pro CyaAOVA alespoň ve slezině a že CyaAOVA-CD11b interakce je závazná pro prezentaci vloženého epitopu.

Konečně, aby se zjistila úloha buněk exprimujících CD11b v CyaAOVA prezentaci, původci prováděli třídící experimenty na celkových splenocytech myši imunizovaných CyaAOVA nebo pOVA. Celkové splenocyty byly tříděny na frakce $CD11b^+$ a $CD11b^-$. Zatímco tyto dvě subpopulace stimulovaly B3Z po pOVA i.v. imunizaci (obrázek 10d), pouze $CD11b^+$ subpopulace stimulovala B3Z po CyaAOVA i.v. imunizaci (obrázek 10c).

Vzato dohromady tyto výsledky jasně prokazují, že prezentace OVA peptidu CyaOVA je závislá na buněčné vazbě a tedy na interakci s CD11b.

B.3 Diskuse

V předkládané studii, s použitím detoxikované adenylátcyklázy *Bordetella pertussis* jako vektoru poskytujícího epitop, původci založili strategii imunizace, která instruuje CTL reakce po jedné injekci tím, že obchází potřebu adjuvans. Původci identifikovali mechanismy, které přispívají k vysoké účinnosti detoxikované CyaA jako vektoru:

B.3.1 CyaA cílí myeloidní dendritické buňky prostřednictvím jejich interakce s CD11b integrinem

Test prezentace antigenu specifickému $CD8^+$ T lymfocytárnímu hybridomu s použitím *in vitro*- nebo *in vivo*-APC (test *in vitro* a *ex vivo*, v daném pořadí) prokázal, že nejúčinnější APC pro CyaAOVA jsou $CD11c^+CD11b^{vysoko+}$ DC. Opravdu, veškerá schopnost prezentace Ag CyaAOVA patří frakci splenocytů s nízkou denzitou, které si podržely DC. Buněčné třídění definovaných buněčných typů ukázalo, že buňky $CD11c^+CD11b^{vysoko+}$ DC jsou mnohem účinnější než buňky $CD11c^-CD11b^{vysoko+}$ pro prezentaci CyaAOVA. Menší příspěvek pozorovaný u B lymfocytů ($CD45R^+$) byl potvrzen účinnou prezentací CyaAOVA (*in vitro* a *ex vivo*) a CTL reakcemi u B lymfocyty-deficitních myší.

B.3.2 CyaA dodá Ag do cytosolové dráhy pro prezentaci MHC I. třídy *in vivo*

Tady původci ukázali závislost CyaOVA prezentace na celkových splenocytech *in vitro*. Původci překvapivě také ukázali, že *in vivo* prezentace CyaAOVA také probíhá po TAP-závislé dráze. To vedlo k závěru, že CyaAOVA prezentace *in vivo* vyplývá účinně z cytosolového dodání a ne z nahodilé extracelulární degradace.

B.3.3 CTL instruování obchází $CD4^+$ T pomocné lymfocyty a je nezávislé na CD40 signalizaci

Zrání z nezralého stádia do stadia zralosti je charakterizováno i) poklesem zachytné schopnosti Ag, ii) zvýšením schopnosti instruování T lymfocytů, iii) migrací z míst odebrání vzorků Ag (marginální zóna ve slezině) do oblasti T lymfocytů (periarteriolární listy ve slezině), kde se maximalizuje pravděpodobnost střetnutí s Ag-specifickými T lymfocyty (De smedt et al., 1996). Navíc k prezentaci Ag prostřednictvím DC je nyní maturační fáze široce přijímána jako předpoklad instruování T lymfocytů. *In vitro* studie upozornily na úlohu $CD4^+$ T lymfocytů v signalizaci DC maturace, zejména prostřednictvím interakce CD40L-CD40 (Bell et al., 1999). V případě instruování $CD8^+$ T lymfocytů zkříženě instruujícího buněčného Ag, $CD4^+$ T lymfocyty provádějí svou pomoc $CD8^+$ T lymfocytům mechanismem závislým na CD40 (Schuurhuis et al., 2000, Bennett et al., 1998, Schoenberger et al., 1998, Ridge et al., 1998). Protože CyaAOVA instruuje CTL způsobem nezávislým na CD4 a CD40, je lákavé spekulovat, že detoxikovaná CyaA může být obdařena vnitřní schopností adjuvans.

B.3.4 Závěr

Předkládaná studie představuje první charakterizaci, pokud je původcům známo, proteinového vakcínového vektoru, který splňuje jak cílení k profesionálním APC, cytosolové podání vektorizovaného Ag a instruování CTL bez použití adjuvans. Navíc původci objasnili mechanismus buněčného cílení průkazem toho, že prezentace Ag je závislá na interakci mezi CyaA a CD11b, jejím receptorem. Z tohoto důvodu je buněčná specifita CyaA je překvapivě přizpůsobena účelu dodání Ag. Konečně, buněčná specifita CyaA nebo jiných bakteriálních toxinů může sloužit cytosolovému dodání široké skupiny farmaceuticky relevantních molekul, jejichž účinky by měly být cíleny na restringovaný soubor buněk.

Příklad C

Použití adenylcyklázy pro dodání chemicky kondenzovaných antigenů do dendritických buněk *in vivo*

C.1 Metody kondenzace požadované molekuly na vektory odvozené z CyaA

Je zde popsán obecný metodologický základ pro přípravu rekombinantních CyaA toxinů takovým způsobem, kdy se „naroubuje“ požadovaná molekula k CyaA prostřednictvím disulfidických vazeb.

Pro ilustraci, syntetický peptid velikosti 12 aminokyselin odpovídající ovalbuminovému epitopu z CD8⁺ T lymfocytů byl chemickým zesítním navázán prostřednictvím disulfidické vazby k cysteinovému zbytku geneticky vnesenému do CyaA katalytické domény v poloze 235 (divoký typ CyaA neobsahuje žádný cysteinový zbytek). Očekávané výhody této nové konstrukce

jsou následující:

- (i) všestrannost: jednoduchý CyaA nosičový protein může být snadno kondenzován s jakýmkoliv požadovaným syntetickým peptidem,
- (ii) imunogenicita: po aplikaci do cytosolu APC, epitopy chemicky kondenzované k CyaA by měly být uvolněny z vektoru (kvůli redukčním intracelulárním podmínkám) a zavedeny přímo do dráhy prezentující MHC I. třídy, čímž by se obešel potenciálně omezující krok proteolytického zpracování v proteasomech.

Obecný postup navázání syntetického peptidu k CyaA prostřednictvím disulfidické vazby je znázorněn na obrázku 11.

V první kroku je připraven rekombinantní CyaA toxin, který obsahuje jeden cysteinový zbytek geneticky vložený v katalytické doméně CyaA (CyaA divokého typu neobsahuje žádný cysteinový zbytek).

Rekombinantní CyaA toxin, ACTM235, byl již dříve charakterizován (Heveker a Ladant, 1997). Konkrétně, ACTM235 nese Cys-Ser dipeptid vložený mezi aminokyseliny 235 a 236 a je plně cytotoxický. Tento toxin byl exprimován a purifikován na homogenní produkt, jak bylo již popsáno v A.1.1.

Ve druhém kroku byl konstruován syntetický peptid odpovídající epitopu ovalbuminu pro CD8⁺ T lymfocyt: navíc k sekvenci SIINFEKL (jedinopísmenný kód aminokyselin), což je přesná sekvence epitopu, cysteinový zbytek s aktivovanou nitro-pyridin-sulfonylthiolovou skupinou (Cys-NPys) byl přidán na N-konec peptidu v průběhu chemické syntézy. Aktivovaný Npys-cystein byl oddělen od sekvence SIINFEKL ohebným GGA motivem, který usnadňuje další proteolytické opracování peptidu v APC. Peptid (Cys-Npys-OVA, molekulová hmotnost: 1405 Da) byl syntetizován užitím zařízení Neosystem (Strasbourg,

Francie).

V třetím kroku byl peptid Cys-Npys-OVA kondenzován k ACTM235 následujícím postupem:

Deset mg purifikovaného ACTM235 v pufru: 8 M močovina, 20 mM Hepes-Na, pH 7,5, bylo redukováno inkubací po dobu 12 hodin v přítomnosti 10 mM dithiothreitolu (DTT). Účinnost redukčního kroku byla ověřena SDS-PAGE analýzou za neredukčních podmínek: v podstatě všechny ACTM235 protein se pohyboval jako jediný pás velikosti 200 kDa odpovídající monomeru, bez jakéhokoliv důkazu výskytu dimeru (molekulová hmotnost přibližně 400 kDa). Redukovaný protein pak byl nanesen na kolonu DEAE-SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) s 5 ml naplněné pryskyřice ekvilibrovanou v pufru: 8 M močovina, 20 mM Hepes-Na, pH 7,5. ACTM235 protein byl plně zachycen na DEAE-SEPHAROSE pryskyřici, která pak byla promývána puftrem: 8 M močovina, 20 mM Hepes-Na, pH 7,5, 0,1 M NaCl (> 100 ml), aby se odstranily jakékoliv stopy DTT (nepřítomnost reziduálního DTT byla ověřována použitím klasické Ellmanovy reakce s 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoovou kyselinou), DTNB). Redukovaný ACTM235 protein pak byl eluován z DEAE-sepharose pryskyřice 7 ml pufru: 8 M močovina, 20 mM Hepes-Na, pH 7,5, 0,5 M NaCl. Tři mg (přibližně (2 μ mol) peptidu Cys-Npys-OVA pak byly přidány k redukovanému ACTM235 proteinu (8 mg, přibližně 45 nmol) a směs byla inkubována po dobu 16 hodin při teplotě místnosti. Pak bylo přidáno 25 ml 20 mM Hepes-Na, pH 7,5 a 8 ml 5 M NaCl a takto naředěná směs pak byla nanesena na kolonu fenyl-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) s 10 ml nanesené pryskyřice ekvilibrovanou puftrem: 20 mM Hepes-Na, pH 7,5, 1 M NaCl. Fenyl-Sepharose pryskyřice byla promyta 50 ml pufru: 20 mM Hepes-Na, pH 7,5, 1 M NaCl, a pak 50 ml 20 mM Hepes-Na, pH 7,5. Derivatizovaný ACTM235 protein pak byl eluován puftrem: 8 M močovina, 20 mM

Hepes-Na, pH 7,5. Koncentrace toxinu byla určena spektrofotometricky z absorpce při 280 nm s použitím hodnoty molekulárního extinkčního koeficientu z $142\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.

Peptid Cys-Npys-OVA byl s použitím stejného postupu kondenzován na druhý rekombinantní CyaA toxin, CyaAE5-LCMVgp, který je detoxikovanou variantou (tj. postrádá enzymatickou aktivitu v důsledku genetického inserce 2 aminokyselin LQ mezi zbytky 188 a 189). Tento toxin také obsahuje 15 aminokyselin dlouhou polypeptidovou sekvenci (PASAKAVYNFATCGT) vloženou mezi zbytky 224 a 225 CyaA, a tak obsahuje též jeden Cys zbytek. Plazmid kódující tento rekombinantní toxin je derivát pCACT-ova-E5 (Guermonprez et al. 2000) modifikovaný inzercí vhodného syntetického dvojvláknového oligonukleotidu kódujícího sekvenci PASAKAVYNFATCGT mezi restrikční místa Stul a KpnI. CyaAE5-LCMVgp protein byl exprimován a purifikován jak bylo popsáno dříve v A.1.1.

Peptidy uvedené v tabulce 1 byly také kondenzován podobně k jinému detoxikovanému rekombinantní CyaA toxinu, CyaAE5-CysOVA, který obsahuje stejný LQ dipeptid vložený v katalytickém místě a 14 aminokyselinovou sekvenci vloženou mezi zbytky 224 a 225 CyaA. Tento inzert obsahuje Cys zbytek přilehlý k OVA epitop, jak je ukázáno na obrázku 12. Plazmid kódující tento rekombinantní toxin je derivát pCACT-ova-E5 modifikovaný inzercí vhodného syntetického dvojvláknového oligonukleotidu kódujícího sekvenci ASCGSIINFEKLGT mezi restrikční místa BsiW1 a KpnI. CyaAE5-CysOVA protein byl exprimován a purifikován jak bylo popsáno dříve v A.1.1.

CyaAE5-CysOVA může být považován za obecný detoxikovaný vektor pro chemický kondenzaci CTL epitopů prostřednictvím disulfidických můstků. Přítomnost OVA epitopu v CyaAE5-CysOVA umožňuje snadný *in vitro* test pro funkčnost přenosu epitopu měřením prezentace OVA epitopu specifickému hybridomu

T lymfocytů, jak bylo popsáno dříve v B.1.4.

Tabulka 1

Peptidy Npys-CTL navázané na CyaAE5-CysOVA	
Název epitopu	Aminokyselinová sekvence peptidu
CEA571	Cys (Npys) -GGYL SGANLNL
Gp100	Cys (Npys) -GGITD QVPFSV
MelanA	Cys (Npys) -GGEA AGIGILTV
tyrosináza	Cys (Npys) -GGYMD GTMSQV

Alternativně thiolové skupiny rekombinantního CyaA toxinu mohou být aktivovány 2,2'-dithiodipyridinem (Sigma) a derivatizovány peptidy obsahujícími redukovaný cystein (postup redukce Cys v syntetickém peptidu je poskytnut výrobcem). Toto by bylo obzvláště vhodné, je-li žádoucí peptid obsahující vnitřní cysteinový zbytek.

C.2 Analýza *in vitro* a *in vivo* imunogenicita OVA epitopu chemicky kondenzovaného k CyaA

In vitro přenos OVA epitopu k molekulám MHC I. třídy prostřednictvím CyaA po chemické (CyaA-gp-S-S-OVA E5) nebo genetické kondenzaci (CyaA-OVA E5) byl nejdříve analyzován tím, že se zkoumala prezentace hybridomu OVA B3Z CD8⁺ T lymfocytů těchto molekul na splenocytech. 3 x 10⁵ splenocytů (buněk sleziny) z C57BL/6 myši bylo kokultivováno po dobu 18 h s 10⁵ buněk B3Z v přítomnosti různých koncentrací rekombinantní CyaA. IL-2 produkovaný B3Z byl měřen užitím CTLL proliferčního testu.

Jak je ukázáno na obrázku 13, vysoká IL-2 sekrece byla pozorována, když B3Z byly stimulovány buďto CyaA-gp-S-S-OVA E5 nebo CyaA-OVA E5, což dokazuje, že OVA epitop chemicky navázaný na CyaA byl stejně účinně dopraven do cytosolické dráhy buněk prezentujících antigen jako po genetické kondenzaci. Žádná IL-2 produkce nebyla pozorována, když B3Z byly stimulovány samotnými CyaA molekulami bez OVA epitopu, což dokazuje specifitu IL-2 produkce.

V druhém kroku, byla analyzována *in vivo* schopnost těchto molekul indukovat OVA-specifickou CTL reakci. C57BL/6 myši (2 ve skupině) byly imunizovány i.v. injekcí 50 µg různých CyaA. Sedm dnů později, 25×10^6 buněk sleziny jednotlivých myší bylo restimulováno s 0,1 µg OVA peptidu v přítomnosti z 25×10^6 ozářených syngenních buněk sleziny po pět dnů.

Cytotoxická aktivita efektorových buněk byla měřena na ^{51}Cr -značených EL4 cílových buňkách s pulsem 50 µM OVA peptidu nebo bez něho.

Jak je ukázáno na obrázku 14, vysoká hladina CTL reakce byly indukována v myších imunizovaných jak CyaA-gp-S-S-OVA E5 tak CyaA-OVA E5, což demonstruje srovnatelnou účinnost chemické a genetické kondenzace OVA epitopu. Žádná CTL reakce nebyla pozorována v myších očkovaných kontrolní CyaA molekulou bez OVA epitopu nebo když byly jako cílové buňky použity nepotažené buňky EL4, což prokazuje specifitu zaznamenané CTL reakce.

Na závěr lze shrnout, že tyto výsledky jasně dokazují, že CDB+ T lymfocytový epitop chemicky navázaný na proteinový vektor odvozený z CyaA je velmi účinně přenesen do cytosolické dráhy prezentace MHC I. třídy a indukuje silnou CTL odezvu *in vivo*.

Příklad D

Identifikace fragmentu CyaA, který se váže na CD11b/CD18 a může být použit jak účinný vektor pro přenos molekul

Jako pokus o mapování úseku, který je zapojen do interakce mezi CyaA a CD11b/CD18 receptorem, byly konstruovány různé subfragментy z CyaA a testovány na jejich schopnost soutěžit s biotinylovaným CyaA toxinem o vazbu k CD11b/CD18 na povrchu transfekovaných CHO buněk, s použitím metody dříve popsané v odstavci A.

D.1 Exprese CyaA373-1706

CyaA373-1706 protein byl připraven v *E.coli* s použitím nového expresního vektoru pTRAC-373-1706 (obr. 16). To je derivát plazmidu pDL1312 (Ladant 1995), zkonstruovaný narazením genu neurokalcinu v plazmidu pDL1312 genem *cyaC* (který kóduje CyaC zapojený do konverze proCyaA na účinný toxin posttranslační palmitoylací Lys 860 a 983 v CyaA) a 3' částí z *cyaA* genu, která kóduje C-koncovou doménu - kodony 373 až 1706- CyaA (viz obr. 16). Oba geny *cyaC* a *cyaA* jsou umístěny ve stejné transkripční jednotce pod kontrolou promotoru Pr z fága λ . 3' úsek genu *cyaC* byl modifikovaný tím, že před stop kodon bylo vloženo ribosomální vazebné místo pro zesílení iniciace translace po směru („downstream“) genu *cyaA* (Obr. 16). Výsledná modifikace CyaC polypeptidu (poslední 3 aminokyseliny Gly-Thr-Ala C-konce v CyaC byly nahrazeny sekvencí Asn-Arg-Glu-Glu e) neměla žádný účinek na její schopnost acylovat CyaA. 5' úsek genu *cyaA* (kódující katalytickou doménu toxinu (v protisměru, upstream, od unikátního místa BstBI v *cyaA*) byl odstraněn a nahrazen vhodným syntetickým dvojvláknovým oligonukleotidem kódujícím

sekvenci MGCGN (Obr. 16).

pTRAC-373-1706 také kóduje termosensitivní represor CI^{857} , který silně reprimuje (potlačuje) genovou transkripci z promotoru Pr při teplotě nižší než 32° C, replikační počátek z colE1 a gen pro β -laktamázu, který poskytuje rezistenci k ampicilinu.

Exprese proteinu CyaA373-1706 byl uskutečněna v buňkách *E.coli* kmene BLR. Buňky transformované pTRAC-373-1706 byly pěstovány při 30 °C v LB médiu obsahujícím 150 mg/l ampicilinu až do dosažení střední logaritmické fáze, a pak byla syntéza CyaC a zkráceného CyaA indukována tím, že se zvýšila růstová teplota na 42 °C. Baktérie byly sklizeny po 3-4 hodinách dalšího růstu ve 42 °C. CyaA373-1706 protein pak byl purifikován jak bylo popsáno pro CyaA divokého typu (Guermonprez et al. 2000). CyaA373-1706 nemá žádnou cAMP syntetázovou aktivitu, projevuje hemolytickou aktivitu na ovčích erytrocytech a obsahuje také unikátní cysteinové zbytky ve své N-koncové sekvenci MGCGN.

D.2 Inhibice vazby CyaA-E5 na CD11b fragmenty CyaA-E5 a CyaA: 1-383 (katalytická doména) a 373-1705 (hydrofobní a opakovaná doména)

Jak je ukázáno na obrázku 15, silná inhibice vazby biotinylovaného CyaA-E5 byla dosažena po inkubaci transfekovaných CHO buněk s CyaA-E5. Podobná inhibice byla získána po inkubaci těchto buněk s fragmentem CyaA 373-1706, zatímco fragment CyaA 1-383 neměl žádný významný účinek na vazbu biotinylovaného CyaA-E5.

Takže tyto výsledky jasně demonstrují, že fragment CyaA, který obsahuje aminokyselinové zbytky 373 až 1706, CyaA 373-1706, obsahuje struktury nezbytně nutné pro interakci CyaA

s CD11b/CD18 receptorem.

Příklad E

Závěry z experimentů popsanych v příkladech

Protože molekuly MHC I. třídy obvykle prezentují peptidy pocházející z endogenně syntetizovaných proteinů, epitopy musí být dopraveny do cytosolu buněk prezentujících antigen, aby byla vyvolána CTL reakce. Bylo již dříve prokázáno, že aktivita rekombinantních proteinů ACT vedoucí k instruování CTL alespoň zčásti spočívá v jejich schopnosti dodat CD8⁺ T lymfocytové epitopy do cytosolu buněk prezentujících antigen (APC). Podle jednoho přístupu, epitopy byly geneticky vloženy do katalytické domény CyaA, jelikož je známo, že v případě divokého typu toxinu tato část polypeptidu dosáhne cytosolu cílové buňky, kde se projeví její toxický účinek (tj. cAMP syntéza). Po vstupu do buněk, CyaA katalytická doména nesoucí epitopový inzert musí být proteolyticky zpracována, aby se uvolnil zralý epitop CD8⁺ T lymfocytu, který je pak translokován do endoplazmatického retikula a je asociován s molekulami MHC I. třídy.

Proteolytické zpracování, ke kterému dochází v proteasomech, je v mnohých případech limitujícím krokem (Pamer a Cresswell, 1998, Cascio et al., 2001), vedoucím ke znatelnému poklesu celkového výtěžku zralého epitopu. Alternativní přístup, popsany v předkládané přihlášce, spočívá v tom, že se naváže epitop na katalytickou doménu CyaA prostřednictvím disulfidické vazby, poskytuje významnou výhodu v tom, že takto se zralé epitopy (vyžadující pouze N-koncové sestřižení) kvantitativně uvolňují z vnitřku cytosolu CyaA APC. Kromě toho se jedná o velmi všestranný systém, neboť

jediný nosičový protein CyaA může být snadno a rychle kondenzován s jakýmkoliv požadovaným syntetickým peptidem. Kromě toho je snadné metodami genového inženýrství přenést několik cysteinových zbytků do katalytické domény (jako například v dříve mapovaných permisivních místech, viz WO 93/21324, INSTITUT PASTEUR)) rekombinantního detoxikovaného CyaA toxinu, takže pak může být na jedné CyaA molekule kondenzováno několik peptidů. To by mělo zvýšit celkový přenos epitopů a imunogenicitu rekombinantního proteinu.

Deleční mapování umožnilo identifikovat C-koncovou část CyaA (aminokyseliny 373-1706) jakožto úsek, který je zapojen do interakce toxinu s jeho receptorem CD11b/CD18. Zkrácený protein CyaA373-1706 může být proto použit jako proteinový modul k cílení CD11b+ buněk *in vivo*. Konkrétně polypeptidy nebo proteiny odpovídající požadovaným antigenům mohou být genetickými metodami fúzovány s CyaA373-1706 a tak dopraveny do dendritických buněk, aby vyvolaly specifickou imunitní reakci. Podobná kondenzace může být provedena s rekombinantním CyaA373-1706 proteinem, který také obsahuje unikátní cystein na svém N-konci.

Citované publikace:

1. Aichele, P., D. Kyburz, P.S. Ohashi, B. Odermatt, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, and H. Pircher. 1994. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, no. 2:444-8.
2. Aichele, P., K. Brduscha-Riem, R.M. Zinkernagel, H. Hengartner, and H. Pircher. 1995. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *Journal of Experimental Medicine* 182, no. 1:261-6.
3. Ballard, J.D., R.J. Collier, and M.N. Starnbach. 1996. Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, no. 22:12531-4.
4. Bassinet, L., P. Gueirard, B. Maitre, B. Housset, P. Gounon, and N. Guiso. 2000. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68, no. 4:1934-41.
5. Bell, D., J.W. Young, and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Advances in Immunology* 72:255-324.
6. Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1997. Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 1:65-70.
7. Bennett, S.R., F.R. Carbone, T. Toy, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. B cells directly tolerize CD8(+) T cells. *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 11:1977-83.
8. Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell

- responses is mediated by CD40 signalling [see comments].
Nature 393, no. 6684:478-80.
9. Betsou et al. Infect. Immun. 1993 Sept., 61(9) 3583-3589.
 10. Betsou et al. Infect. Immun. 1995 Sept., 63(9) 3309-3315.
 11. Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann, and P. Sebo. 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 269, no. 44:27231-9.
 12. Carbonetti, N.H., T.J. Irish, C.H. Chen, C.B. O'Connell, G.A. Hadley, U. McNamara, R.G. Tuskan, and G.K. Lewis. 1999. Intracellular delivery of a cytolytic T-lymphocyte epitope peptide by pertussis toxin to major histocompatibility complex class I without involvement of the cytosolic class I antigen processing pathway. Infection & Immunity 67, no. 2:602-7.
 13. Casares, S., K. Inaba, T.D. Brumeanu, R.M. Steinman, and C.A. Bona. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. Journal of Experimental Medicine 186, no. 9:1481-6.
 14. Condon, C., S.C. Watkins, C.M. Celluzzi, K. Thompson, and L.D. Falo, Jr. 1996. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. Nature Medicine 2, no. 10:1122-8.
 15. Confer, D.L., and J.W. Eaton. 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. Science 217, no. 4563:948-50.

16. Coote, J.G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 8, no. 2:137-61.
17. Crowley, M., K. Inaba, and R.M. Steinman. 1990. Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunogenic fragments of foreign proteins. *Journal of Experimental Medicine* 172, no. 1:383-6.
18. De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* 184, no. 4:1413-24.
19. C. Fayolle, P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1996, *In vivo* induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8(+) T-cells epitopes, *J. Immunol.* 156. 4697-4706.
20. Fayolle, C., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *Journal of Immunology* 162, no. 7:4157-62.
21. Friedman, R.L., R.L. Fiederlein, L. Glasser, and J.N. Galgiani. 1987. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infection & Immunity* 55, no. 1:135-40.
22. Fuchs, E.J., and P. Matzinger. 1992. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258, no. 5085:1156-9.
23. Gray, M., G. Szabo, A.S. Otero, L. Gray, and E. Hewlett. 1998. Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and

- hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. Journal of Biological Chemistry 273, no. 29:18260-7.
24. Gross, M.K., D.C. Au, A.L. Smith, and D.R. Storm. 1992. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, no. 11:4898-902.
25. Gueirard, P., A. Druilhe, M. Pretolani, and N. Guiso. 1998. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. Infection & Immunity 66, no. 4:1718-25.
26. Guermonprez, P., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. Journal of Immunology 162, no. 4:1910-6.
27. P. Guermonprez, C. Fayolle, C. Leclerc, G. Karimova, A. Ullmann, and D. Ladant, 2000, *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8⁺T-cell epitopes into antigen presenting cells. In Methods in Enzymology, Chimeric Genes and Proteins, 326, 527-542. J. Abelson, S. Emr, and J. Thorner, (Eds), Academic Press Inc.
28. Guery, J.C., F. Ria, and L. Adorini. 1996. Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. Journal of Experimental Medicine 183, no. 3:751-7.
29. Guery, J.C., F. Ria, F. Galbiati, S. Smiroldo, and L. Adorini. 1997. The mode of protein antigen administration determines preferential presentation of peptide-class II

- complexes by lymph node dendritic or B cells. International Immunology 9, no. 1:9-15.
30. Guiso, N., M. Rocancourt, M. Szatanik, and J.M. Alonso. 1989. *Bordetella* adenylate cyclase is a virulence associated factor and an immunoprotective antigen. Microbial Pathogenesis 7, no. 5:373-80.
 31. Guiso, N., M. Szatanik, and M. Rocancourt. 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. Microbial Pathogenesis 11, no. 6:423-31.
 32. Harvill, E.T., P.A. Cotter, M.H. Yuk, and J.F. Miller. 1999. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. Infection & Immunity 67, no. 3:1493-500.
 33. N. Heveker and D. Ladant. 1997, Characterization of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin. Implications for the mechanism of toxin entry into target cells, Eur. J. Biochem., 243, 643-649.
 34. Hewlett, E., and J. Wolff. 1976. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. Journal of Bacteriology 127, no. 2:890-8.
 35. Jeyaseelan, S., S.L. Hsuan, M.S. Kannan, B. Walcheck, J.F. Wang, M.E. Kehrli, E.T. Lally, G.C. Sieck, and S.K. Maheswaran. 2000. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. Infection & Immunity 68, no. 1:72-9.
 36. Karimova, G., C. Fayolle, S. Gmira, A. Ullmann, C. Leclerc, and D. Ladant. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into

- eukaryotic cells: implication for the *in vivo* delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, no. 21:12532-7.
37. Karttunen, J., S. Sanderson, and N. Shastri. 1992. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, no. 13:6020-4.
38. Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto, and H. Kikutani. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. Immunity 1, no. 3:167-78.
39. Khelef, N., H. Sakamoto, and N. Guiso. 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. Microbial Pathogenesis 12, no. 3:227-35.
40. Khelef, N., A. Zychlinsky, and N. Guiso. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infection & Immunity 61, no. 10:4064-71.
41. Khelef, N., and N. Guiso. 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. FEMS Microbiology Letters 134, no. 1:27-32.
42. Khelef, N., C.M. Bachelet, B.B. Vargaftig, and N. Guiso. 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. Infection & Immunity 62, no. 7:2893-900.

43. Killeen, N., S. Sawada, and D.R. Littman. 1993. Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO Journal* 12, no. 4:1547-53.
44. Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, no. 6317:423-6.
45. Kyburz, D., P. Aichele, D.E. Speiser, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, and H. Pircher. 1993. T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *European Journal of Immunology* 23, no. 8:1956-62.
46. Ladant D., Glaser P. And A. Ullmann. 1992. Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* Adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* (4), no. 267: 2244-2250.
47. Ladant D., Calcium and membrane binding properties of bovine neurocalcin δ expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 270, 1995, 3179-3185.
48. Ladant, D., and A. Ullmann. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology* 7, no. 4:172-6.
49. Njamkepo, E., F. Pinot, D. Francois, N. Guiso, B.S. Polla, and M. Bachelet. 2000. Adaptive responses of human monocytes infected by *bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol* 183, no. 1:91-9.
50. Otero, A.S., X.B. Yi, M.C. Gray, G. Szabo, and E.L. Hewlett. 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 17:9695-9697.

51. Porgador, A., K.R. Irvine, A. Iwasaki, B.H. Barber, N.P. Restifo, and R.N. Germain. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *Journal of Experimental Medicine* 188, no. 6:1075-82.
52. Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, and E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells *in vivo*: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *Journal of Immunology* 159, no. 5:2222-31.
53. Reis e Sousa, C., and R.N. Germain. 1999. Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation *in vivo*: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue. *Journal of Immunology* 162, no. 11:6552-61.1
54. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, no. 6684:474-8.
55. Rogel, A., and E. Hanski. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 267, no. 31:22599-22605.
56. Rose, T., P. Sebo, J. Bellalou, and D. Ladant. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *Journal of Biological Chemistry* 270, no. 44:26370-6.

57. Sakamoto, H., J. Bellalou, P. Sebo, and D. Ladant. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *Journal of Biological Chemistry* 267, no. 19:13598-602.
58. M.F. Saron, C. Fayolle, P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann and C. Leclerc. 1997, Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8⁺ T-cell epitope from LCMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3314-3319.
59. Schoenberger, S.P., R.E. Toes, E.I. Van der Voort, R. Offringa, and C.J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions [see comments]. *Nature* 393, no. 6684:480-3.
60. Schuurhuis, D.H., S. Laban, R.E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M.J. Kleijmeer, E.I. Van Der Voort, D. Rea, R. Offringa, H.J. Geuze, C.J. Melief, and F. Ossendorp. 2000. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli [In Process Citation]. *J Exp Med* 192, no. 1:145-50.
61. Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H., and Ullmann, A. 1991. *Gene* 104, 19-24.
62. Viola, A., G. Lezzi, and A. Lanzavecchia. 1999. The role of dendritic cells in T cell priming: the importance of being professional. In *Dendritic cells*. T.L. Lotze and A.W. Thomson, editors. Academic Press, San Diego. 251-253.
63. Vremec, D., and K. Shortman. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among

- thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of Immunology* 159, no. 2:565-73.
64. Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 176, no. 1:47-58.
65. Weiss, A.A., E.L. Hewlett, G.A. Myers, and S. Falkow. 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Journal of Infectious Diseases* 150, no. 2:219-22.
66. Weiss, A.A., and M.S. Goodwin. 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infection & Immunity* 57, no. 12:3757-64.
67. Wolff, J., G.H. Cook, A.R. Goldhammer, and S.A. Berkowitz. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, no. 7:3841-4.
68. Zhong, G., C.R. Sousa, and R.N. Germain. 1997. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure *in vivo* or *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine* 186, no. 5:673-82.
69. Zinkernagel, R.M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunological Reviews* 156:199-209.

20.05.03

75

70. WO 93/21324 (INSTITUT PASTEUR). Recombinant mutants for inducing specific immune response.

Seznam sekvencí

<210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
 <221> peptid
 <222> (1)..(14)
 <223> epitop ovalbuminu

<400> 1
 Ala Ser Cys Gly Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Gly Thr
 1 5 10

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
 <221> peptid
 <222> (1)..(8)
 <223> pOVA syntetický peptid

<400> 2
 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
 <221> peptid
 <222> (1)..(15)
 <223> CMVgp epitop

<400> 3

Pro Ala Ser Ala Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Thr
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
 <221> peptid
 <222> (1)..(12)
 <223> CEA 571 epitop

<400> 4

Cys Gly Gly Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
 1 5 10

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
 <221> peptid
 <222> (1)..(12)
 <223> Gp100 epitop

<400> 5

Cys Gly Gly Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
<221> peptid
<222> (1)..(13)
<223> MelanA epitop

<400> 6

Cys Gly Gly Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>
<221> peptid
<222> (1)..(12)
<223> epitop tyrosinázy

<400> 7

Cys Gly Gly Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5 10

<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: intergenový úsek

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(15)
<223> C-koncová extenze CyaC

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(45)
<223> První kodony CyaA 373 až 1706

<400> 8

cgg aat aag gag gaa taacat atg ggc tgc ggg aat tcg aag ttc	45
Arg Asn Lys Glu Glu Met Gly Cys Gly Asn Ser Lys Phe	
1 5 10	

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Umělá sekvence
<223> Popis umělé sekvence: intergenový úsek

<400> 9

Arg Asn Lys Glu Glu
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Umělá sekvence
<223> Popis umělé sekvence: intergenový úsek

<400> 10

Met Gly Cys Gly Asn Ser Lys Phe
1 5

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

20.05.03

80

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetický peptid

<220>

<221> peptid

<222> (1)..(16)

<223> OVA epitop

<400> 11

Arg	Ala	Ser	Cys	Gly	Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Lys	Leu	Gly	Thr	Ala
1				5				10					15		

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití adenylcyklázy druhu *Bordetella* pro přípravu proteinového vektoru pro cílení požadované molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b.
2. Použití adenylcyklázy *Bordetella*, přičemž adenylcykláza je modifikována inzercí požadované molekuly, pro přípravu kompozice pro cílení molekuly k buňkám exprimujícím CD11b.
3. Použití podle nároku 2, kde adenylcykláza druhu *Bordetella* je fragment adenylcyklázového toxinu *Bordetella*, přičemž fragment je schopný vázat se na CD11b receptor.
4. Použití podle nároku 3, přičemž fragment adenylcyklázového toxinu *Bordetella* schopný vazby CD11b receptoru je adenylcyklázový toxin *Bordetella*, který postrádá celou nebo část své N-koncové katalytické domény.
5. Použití podle nároku 4, přičemž fragment adenylcyklázového toxinu *Bordetella* schopný vazby CD11b receptoru je adenylcyklázový toxin *Bordetella pertussis*, který postrádá všechny nebo část aminokyselinových zbytků 1 až 373.
6. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, přičemž cílení požadované molekuly je účinné *in vivo*.
7. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, přičemž požadovaná molekula je specificky cílena a translokována do

cytosolu buněk exprimujících CD11b.

8. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, přičemž buňky exprimující CD11b jsou dendritické buňky a výhodněji myeloidní dendritické buňky.

9. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, přičemž buňky exprimující CD11b jsou neutrofily.

10. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, přičemž adenylcykláza je geneticky modifikovaná adenylcykláza druhu *Bordetella*.

11. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, přičemž adenylcykláza je netoxická forma adenylcyklázy.

12. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11, přičemž adenylcykláza je z *Bordetella pertussis*.

13. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12, přičemž požadovaná molekula je vybrána ze skupiny obsahující: peptidy, glykopeptidy, lipopeptidy, polysacharidy, oligosacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a chemické sloučeniny.

14. Použití podle nároku 13, přičemž požadovaná molekula je antigen.

15. Použití podle nároku 13, přičemž požadovaná molekula

obsahuje epitop.

16. Použití podle nároku 15, přičemž požadovaná molekula je heterologní peptid fúzovaný k N-koncové části geneticky modifikované adenylcyklázy *Bordetella*, která postrádá celou nebo část své N-koncové katalytické domény, a výhodněji adenylcykláza *Bordetella pertussis* postrádá zbytky 1 až 373.

17. Použití podle nároku 14, přičemž antigen je vybraný ze skupiny, kterou tvoří intracelulární bakteriální buněčný antigen, nádorový buněčný antigen, virový antigen, houbový antigen nebo parazitární buněčný antigen.

18. Použití podle nároku 17, přičemž antigen je vybraný ze skupiny, kterou tvoří: poliovirový antigen, antigen viru HIV, antigen viru chřipky, epitop viru choriomeningitidy, nádorový antigen.

19. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13, přičemž požadovaná molekula je léčivo chemicky nebo geneticky navázané k adenylcyklázovému toxinu.

20. Použití podle nároku 19, přičemž léčivo je chemicky navázané pomocí disulfidické vazby ke geneticky vloženému cysteinovému zbytku lokalizovanému v katalytické doméně adenylcyklázy.

21. Použití podle kteréhokoliv z nároků 19 nebo 20, přičemž léčivo je protizánětlivé léčivo.

22. Imunogenní přípravek formulovaný pro podávání zvířeti nebo humánnímu hostiteli v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje adenylcyklázu *Bordetella*, která obsahuje antigen vložený v katalytické doméně.

23. Farmaceutický přípravek pro podávání člověku nebo zvířeti formulovaný pro cílení požadované molekuly specificky k buňkám exprimujícím CD11b v y z n a č u j í c í s e t í m, že požadovaná molekula je navázána na adenylcyklázu druhu *Bordetella*.

24. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle nároku 22 nebo 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že adenylcykláza je geneticky modifikovaná adenylcykláza.

25. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že geneticky modifikovaná adenylcykláza je schopná translokovat požadovanou molekulu specificky do cytosolu buněk exprimujících CD11b.

26. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že geneticky modifikovaná adenylcykláza je adenylcykláza *Bordetella*, která postrádá celou nebo část své katalytické N-koncové domény.

27. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že geneticky modifikovaná adenylcykláza je adenylcykláza *Bordetella pertussis*, která postrádá zbytky 1 až 373.

28. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv nároku 24 nebo 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že geneticky modifikovaná adenylcykláza obsahuje jeden nebo více cysteinové zbytků vložených do permissivního místa katalytické domény.

29. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky exprimující CD11b jsou dendritické buňky a výhodněji myeloidní dendritické buňky.

30. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky exprimující CD11b jsou neutrofily.

31. Farmaceutický nebo imunogenní přípravek podle nároků 22 až 30 v y z n a č u j í c í s e t í m, že požadovaná molekula je vybrána ze skupiny obsahující: peptidy, glykopeptidy, lipopeptidy, polysacharidy, oligosacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a chemické sloučeniny.

32. Farmaceutický nebo imunogenní přípravek podle nároků 22 až 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek obsahuje konstrukt nukleové kyseliny kódující adenylátcyklázu druhu *Bordetella* s navázanou požadovanou molekulou.

33. Farmaceutický nebo imunogenní přípravek podle nároku 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že požadovaná molekula je léčivo.

34. Farmaceutický přípravek podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m, že léčivo je protizánětlivé léčivo.

35. Farmaceutický nebo imunogenní přípravek podle nároků 22 až 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že požadovaná molekula je antigen.

36. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle nároku 35 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen je vybraný ze skupiny, kterou tvoří: intracelulární bakteriální buněčný antigen, nádorový buněčný antigen, virový antigen, houbový antigen nebo parazitární buněčný antigen.

37. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle nároku 36 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen je vybraný ze skupiny, kterou tvoří: poliovirový antigen, HIV virus, antigen viru chřipky, antigen viru choriomeningitidy, nádorový antigen.

38. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 35 až 37 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen je fúzovaný k N-koncové části geneticky modifikované adenylcyklázy *Bordetella*, která postrádá svou N-koncovou katalytickou doménu.

39. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 35 až 38 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen je fúzovaný ke geneticky modifikované adenylcykláze *Bordetella*, která postrádá zbytky 1 až 373.

40. Imunogenní nebo farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 22 až 39 v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek je formulovaný pro intravenózní podávání a je zejména bez adjuvancií instruujících imunitní systém.

41. Imunogenní přípravek podle kteréhokoliv z nároků 22 až 40 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunogenní přípravek je schopný indukce nebo stimulace imunitní reakce zahrnující specificky dendritické buňky.

42. Použití imunogenního nebo farmaceutického přípravku podle kteréhokoliv z nároků 35 až 39 pro výrobu vakcíny nebo imunoterapeutického léku.

43. Proteinový vektor pro dodání požadované molekuly, specificky k buňkám exprimujícím CD11b, kde vektor obsahuje rekombinantní adenylcyklázu druhu *Bordetella* navázanou k požadované molekule.

44. Proteinový vektor podle nároku 43, přičemž vektor je také schopný dodání požadované molekula specificky do cytosolu buněk exprimujících CD11b.

45. Proteinový vektor podle nároku 43 nebo 44, přičemž buňky exprimující CD11b jsou dendritické buňky a výhodněji myeloidní dendritické buňky.

46. Proteinový vektor podle nároku 43 nebo 44, přičemž buňky exprimující CD11b jsou neutrofily.

47. Proteinový vektor podle kteréhokoliv z nároků 43 až 46, přičemž adenylcycláza je geneticky modifikovaná adenylcycláza.

48. Proteinový vektor podle nároku 47, přičemž geneticky modifikovaná adenylcycláza je bez nativního cysteinového zbytku, ale obsahuje geneticky vložený cysteinový zbytek(zbytky) do permissivního místa(míst) v katalytické doméně.

49. Proteinový vektor podle kteréhokoliv z nároků 47 nebo 48, přičemž adenylcycláza je netoxická adenylcycláza.

50. Proteinový vektor podle kteréhokoliv z nároků 47 až 49, přičemž geneticky modifikovaná adenylcycláza je adenylcycláza *Bordetella*, která postrádá celou nebo část své N-koncové katalytické domény.

51. Proteinový vektor podle kteréhokoliv z nároků 43 až 50, přičemž adenylcycláza je z *Bordetella pertussis*.

52. Proteinový vektor podle nároku 51, přičemž rekombinantní adenylcycláza je adenylcycláza *Bordetella pertussis*, která postrádá zbytky 1 až 373.

53. Proteinový vektor podle nároků 43 až 52, přičemž požadovaná molekula je vybrána ze skupiny obsahující: peptidy, glykopeptidy, lipopeptidy, polysacharidy, oligosacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a chemické sloučeniny.

54. Proteinový vektor podle kteréhokoliv z nároků 43 až 53, přičemž požadovaná molekula je léčivo chemicky nebo geneticky navázané k adenylcycláze.

55. Proteinový vektor podle nároku 54, přičemž požadovaná molekula je epitop.

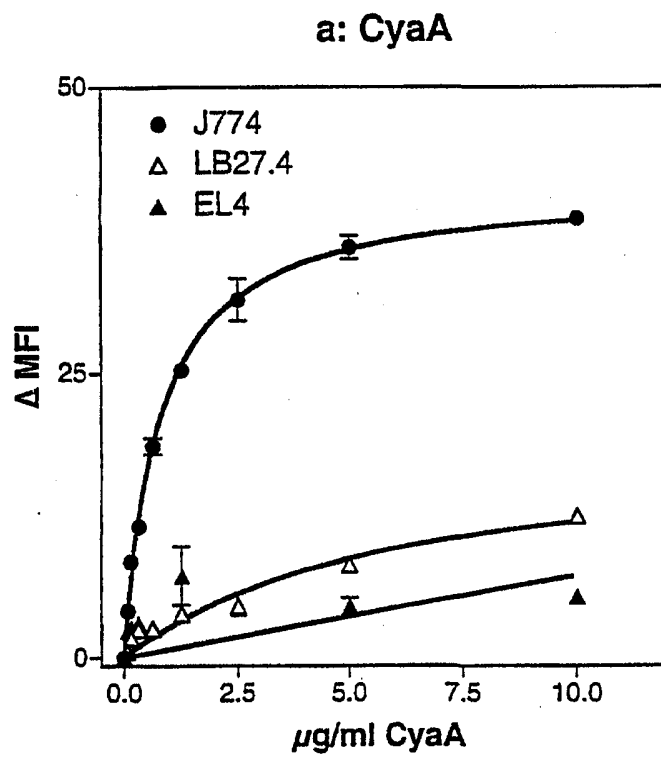
56. Proteinový vektor podle kteréhokoliv z nároků 54 nebo 55, přičemž požadovaná molekula je epitop chemicky kondenzovaný ke geneticky modifikované adenylcycláze bez nativního cysteinového zbytku, ale obsahující geneticky vložený cysteinový zbytek(zbytky) do permisivního místa(míst) v katalytické doméně.

20.05.03

71/203-426

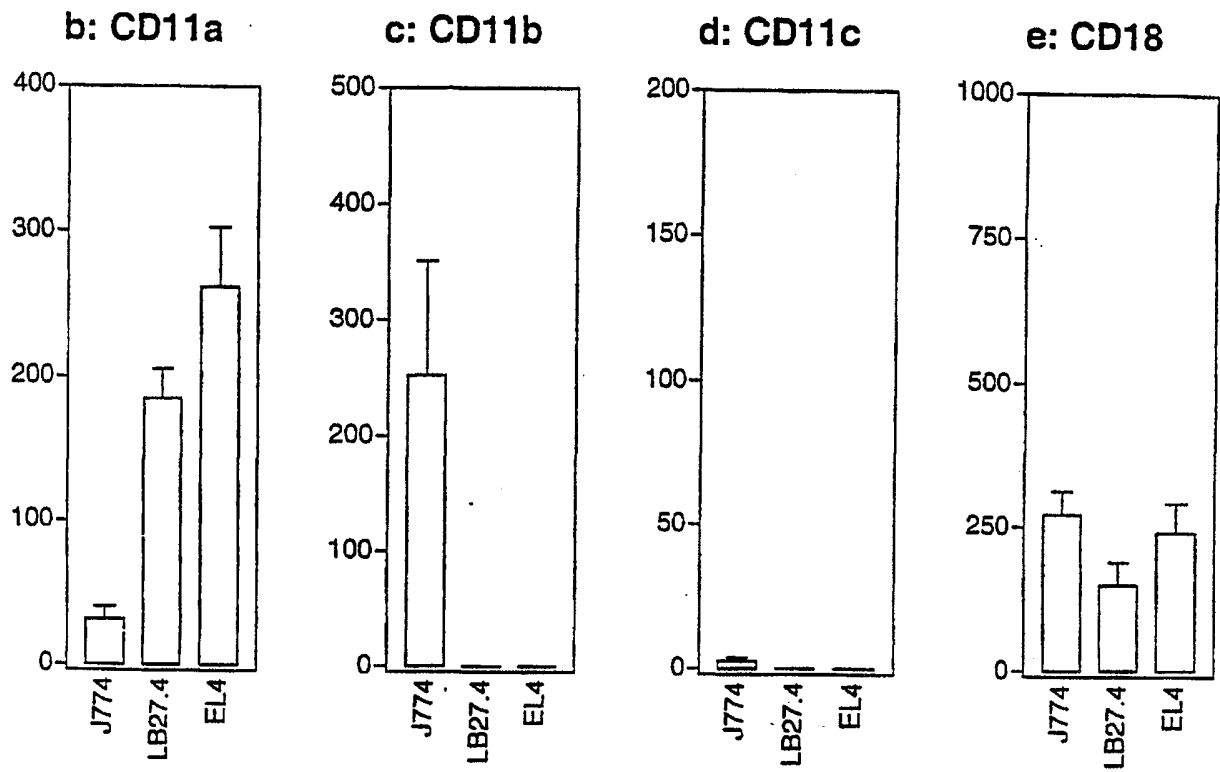
1/25

~~49725~~

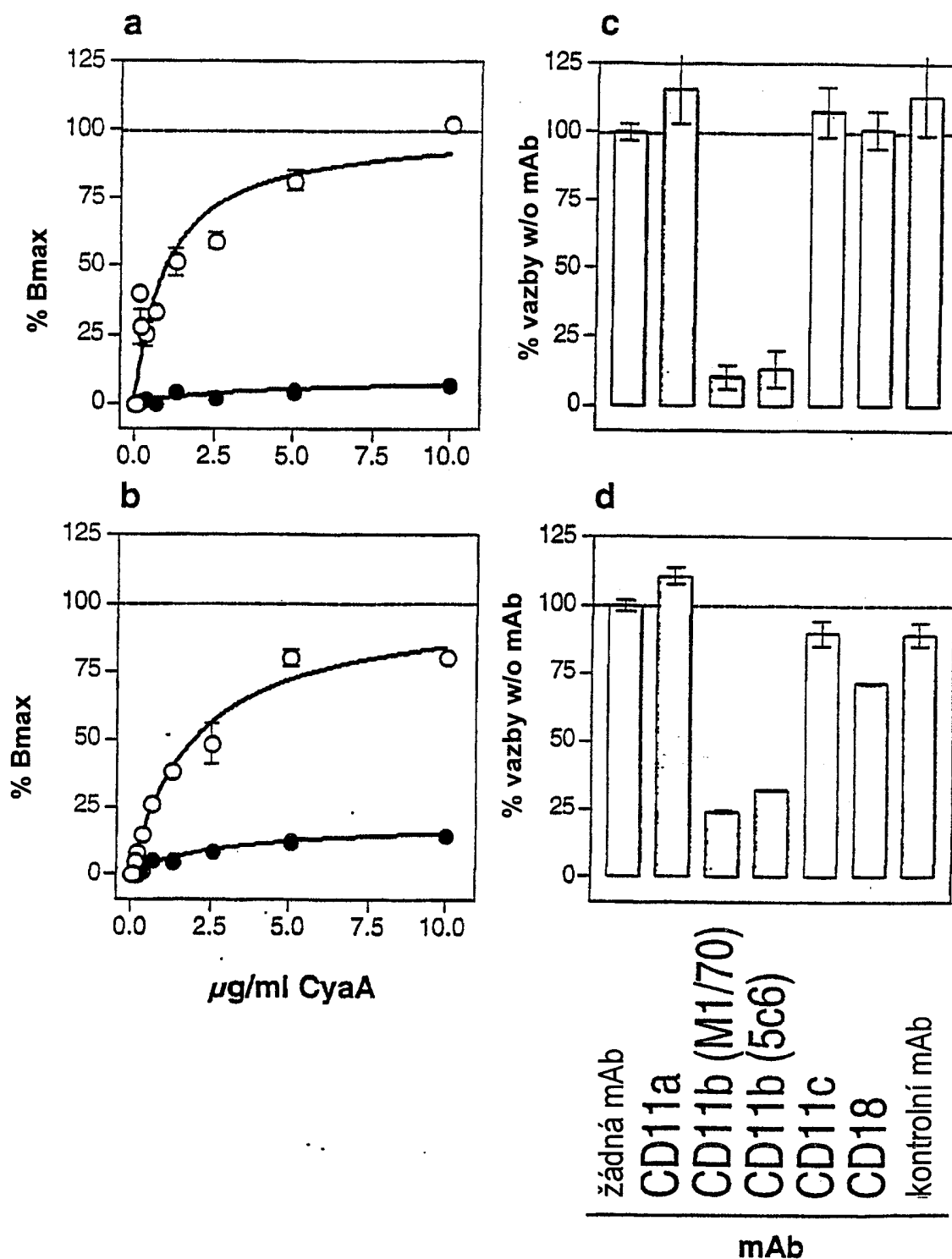


Obr. 1A

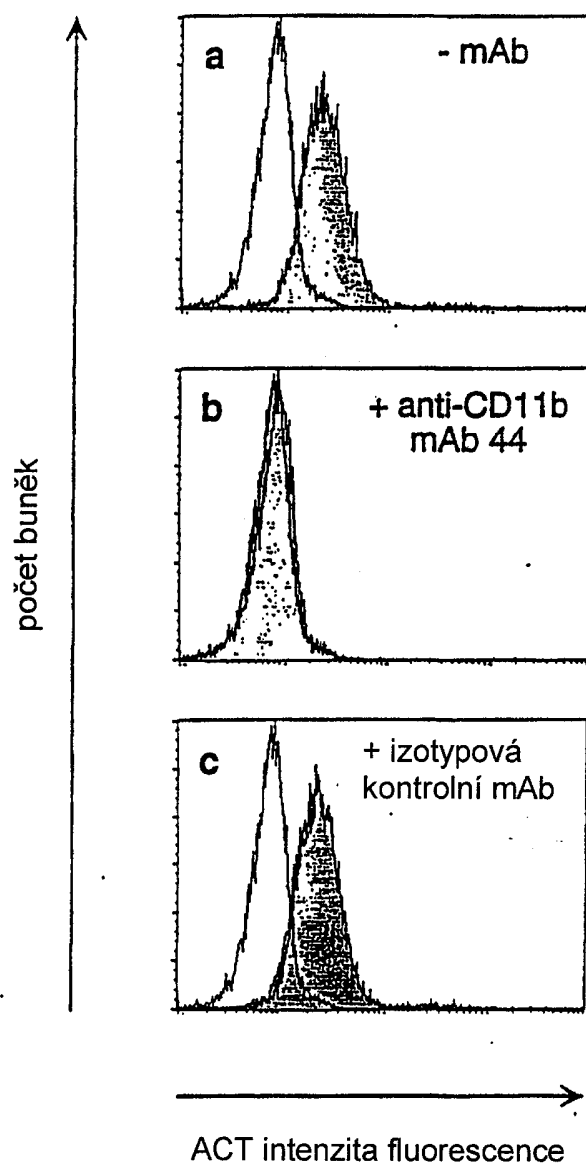
2/25



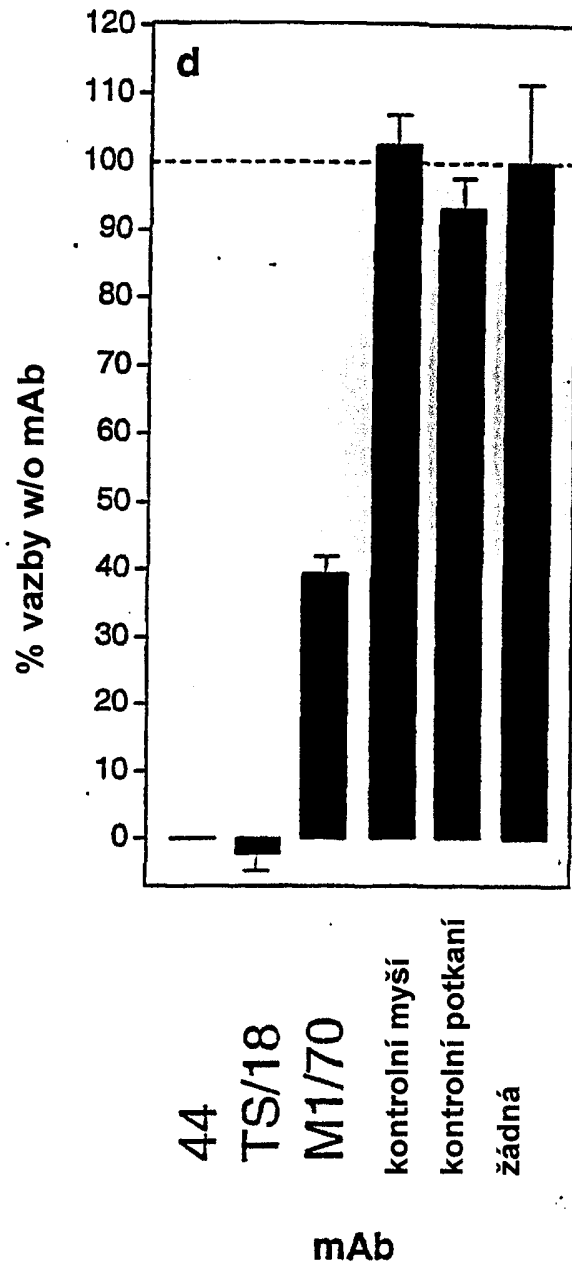
Obr. 1B



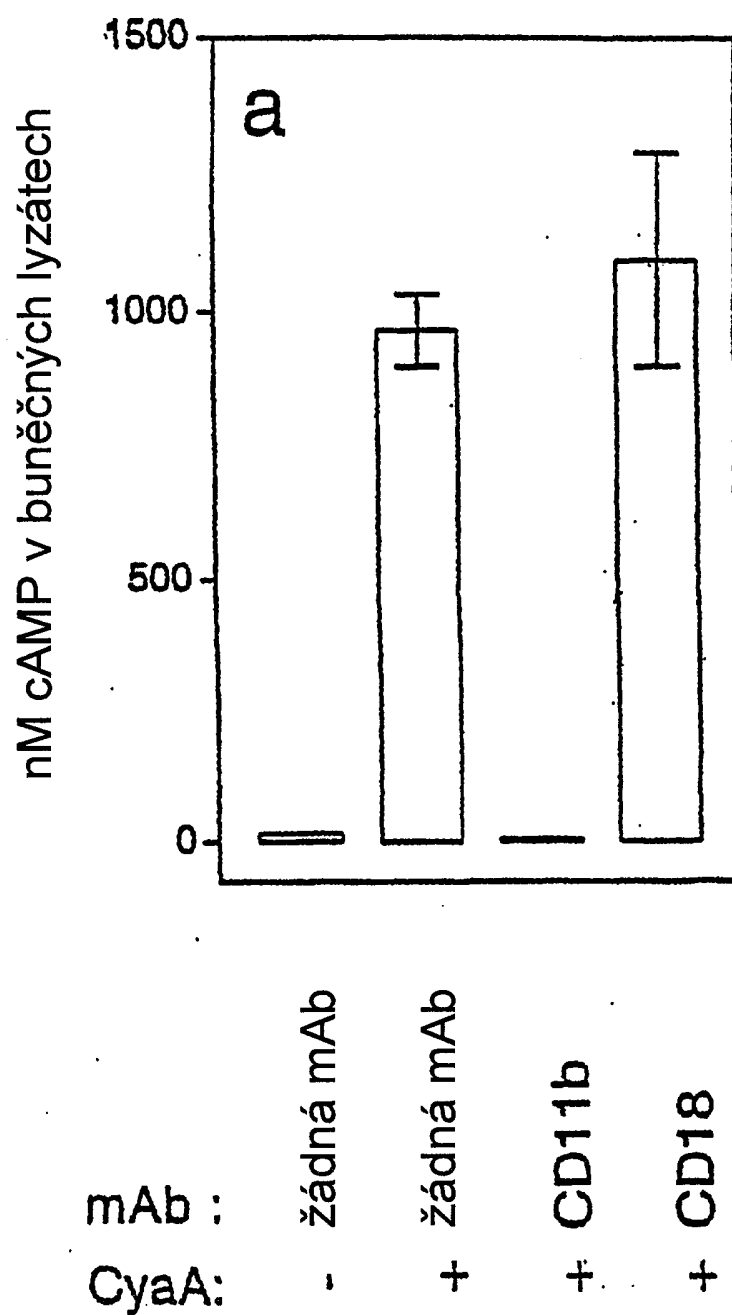
Obr. 2



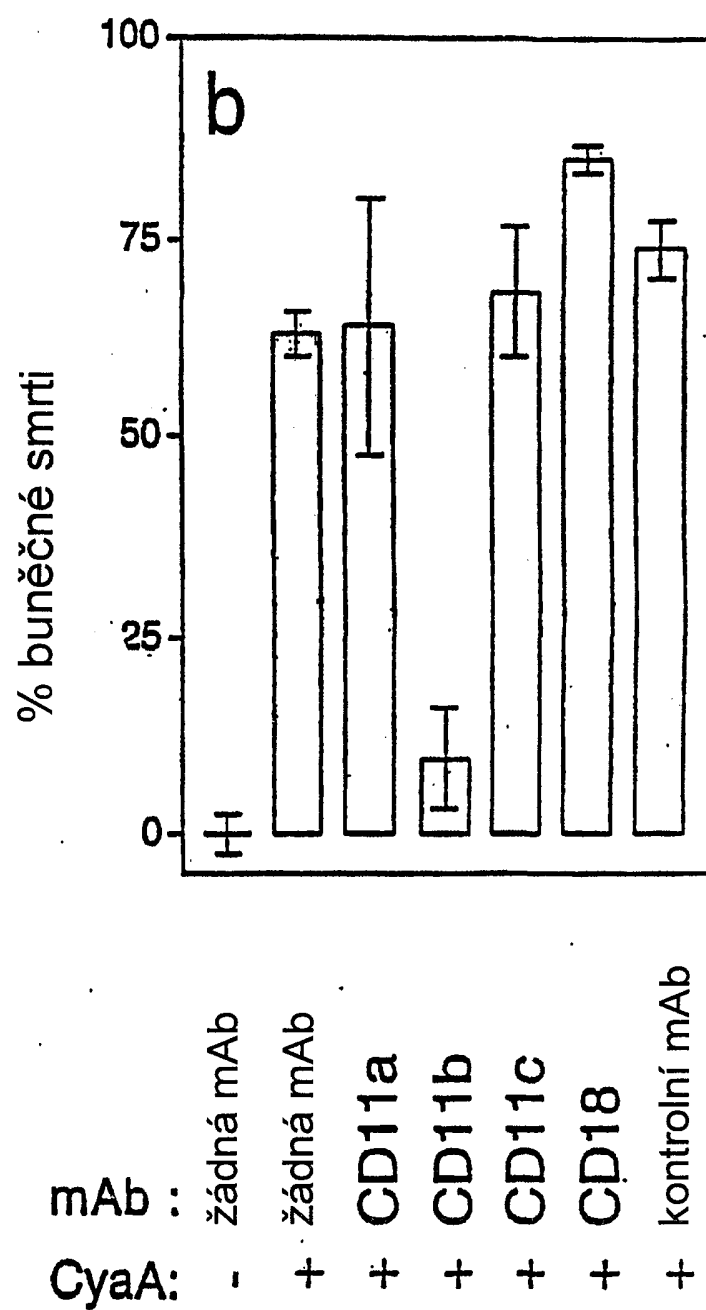
Obr. 3A



Obr. 3B

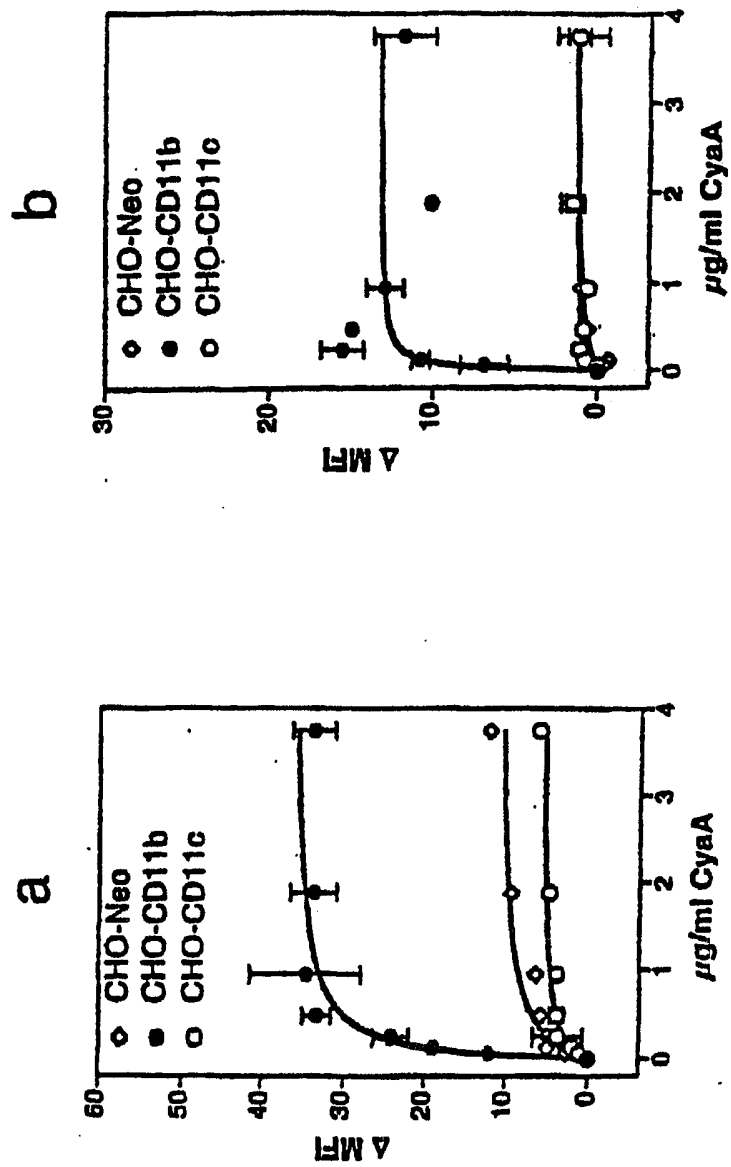


Obr. 4A

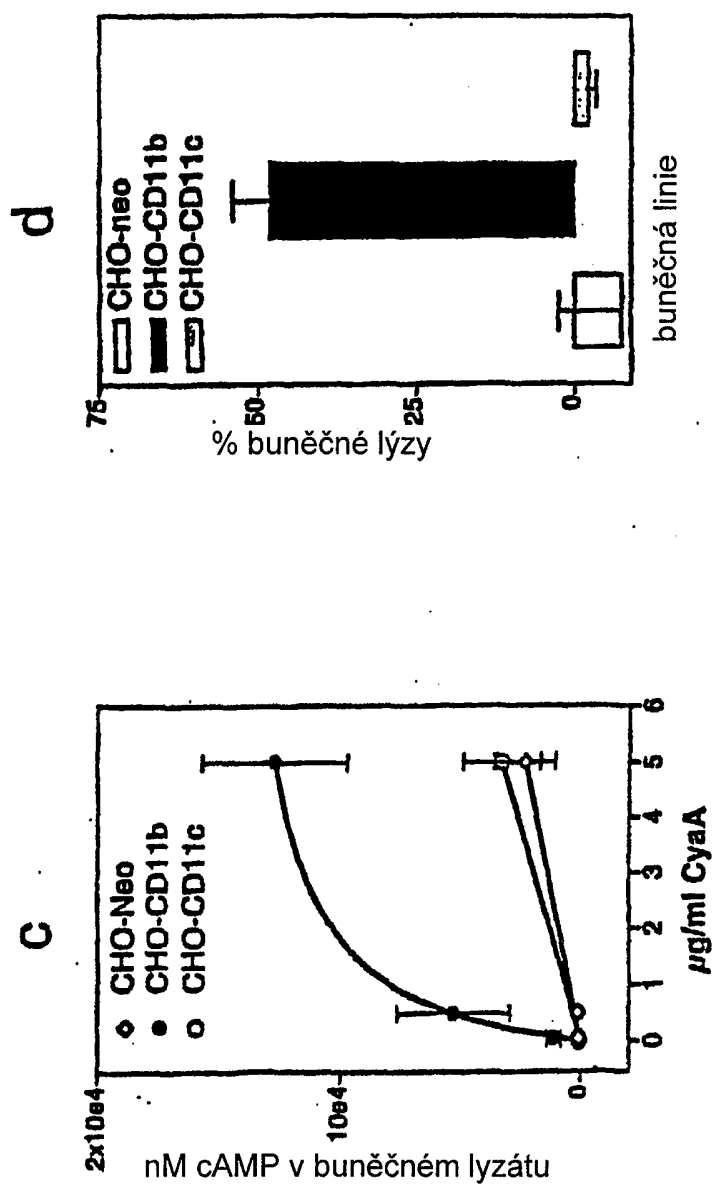


Obr. 4B

8/25

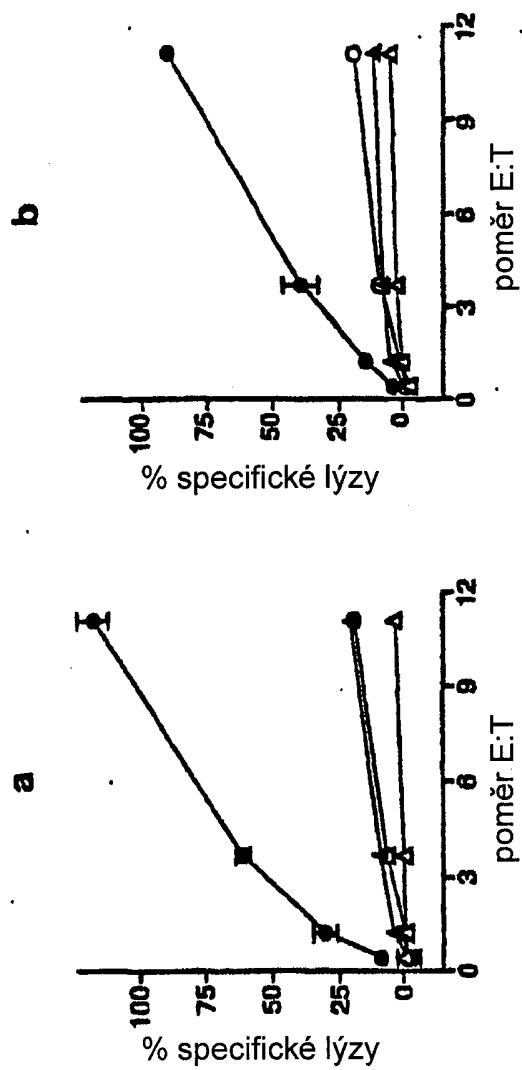


Obr. 5A



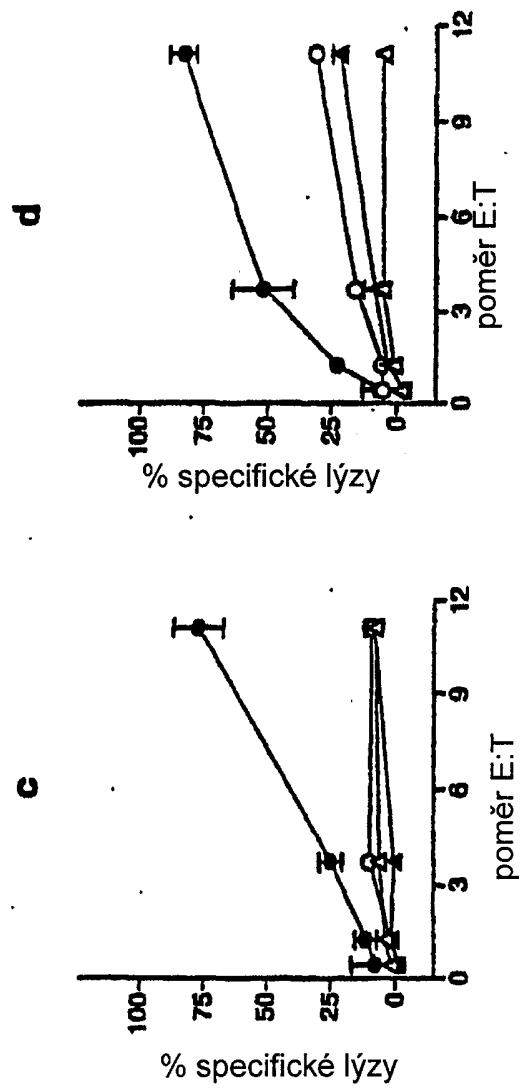
Obr. 5B

10/25



Obr. 6A

11/25

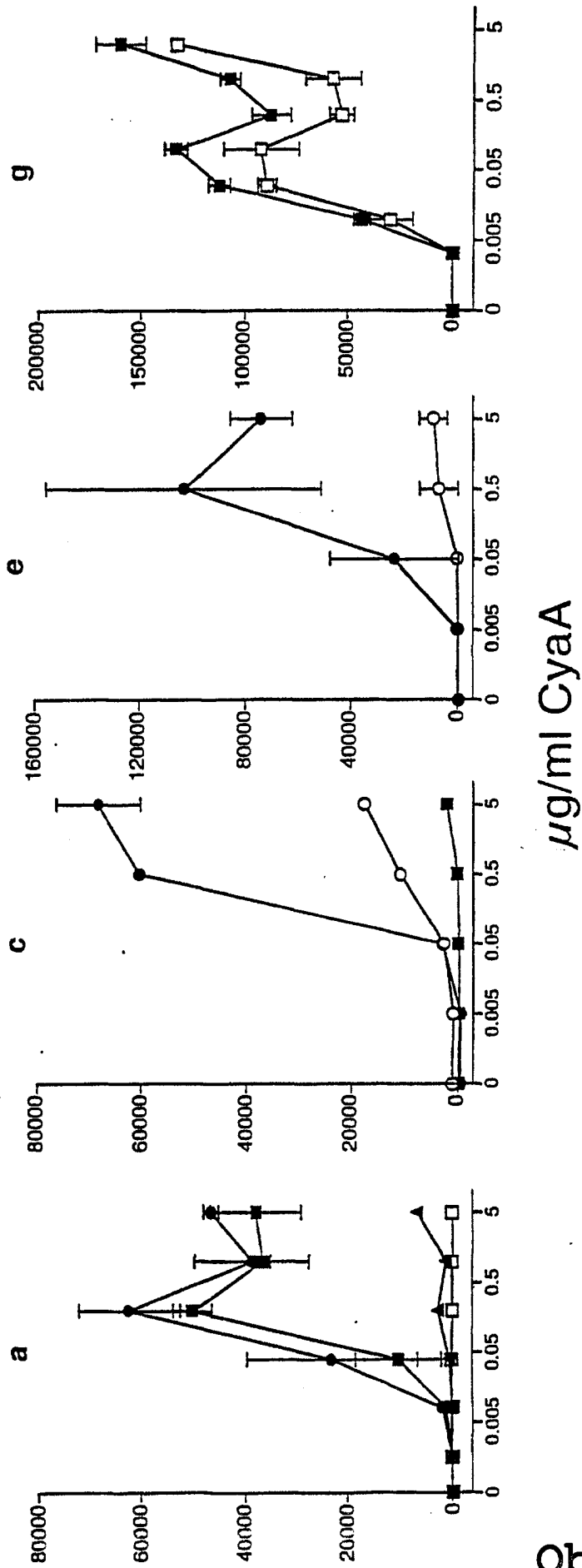


Obr. 6B

20.05.03

12/25

Δ cpm

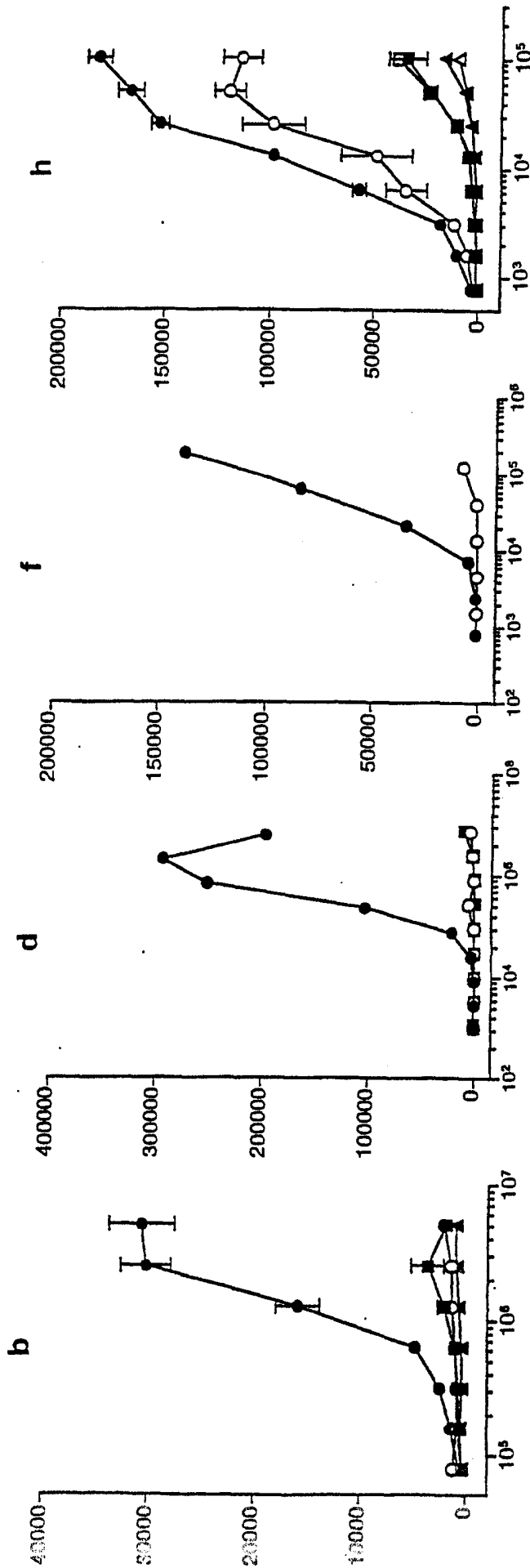


Obr. 7A

20.05.03

13/25

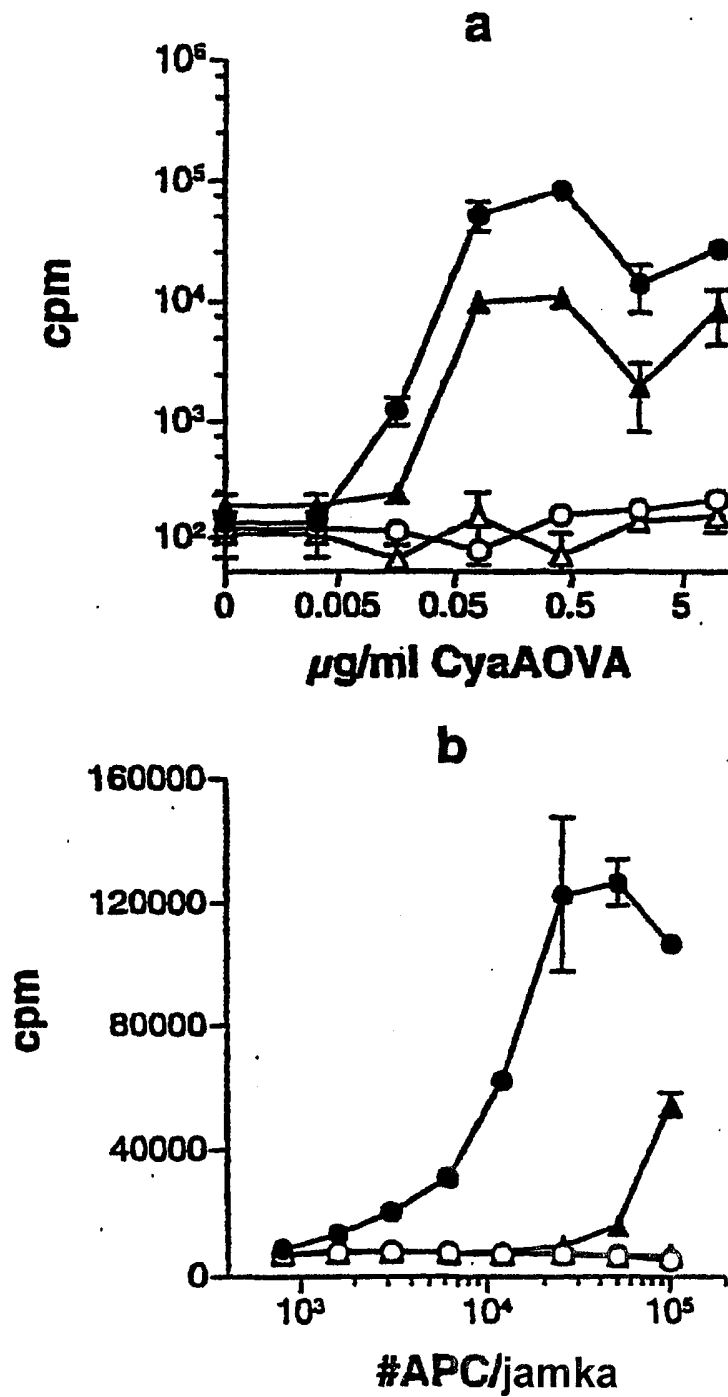
cpm



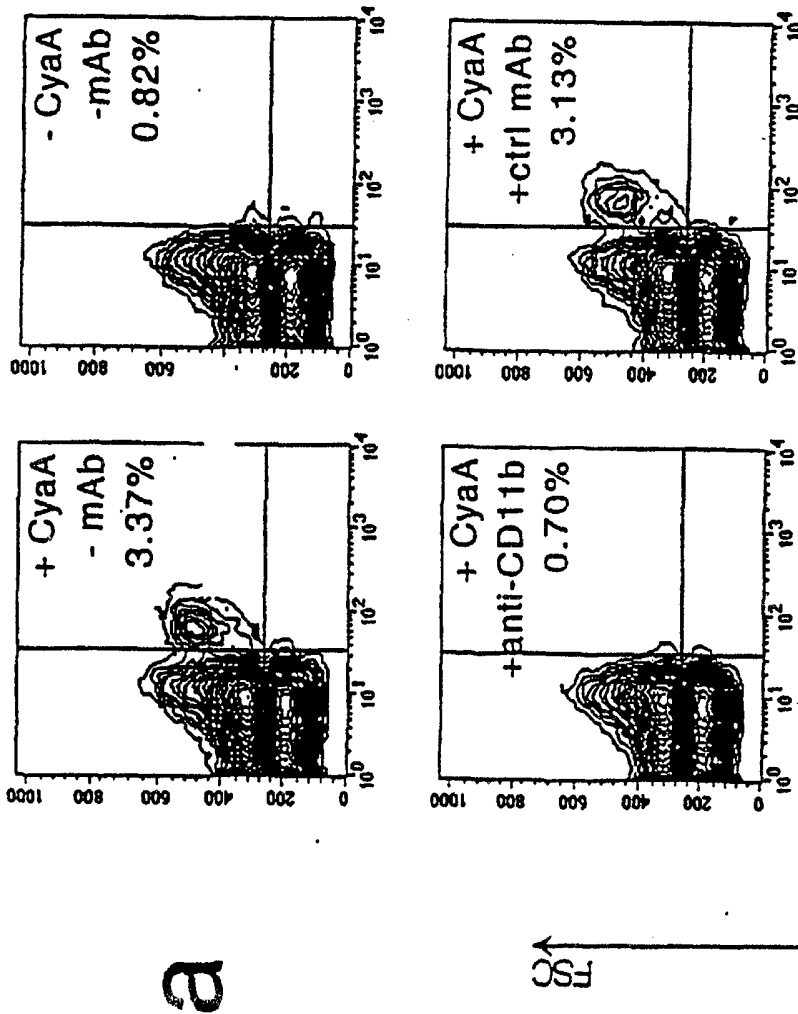
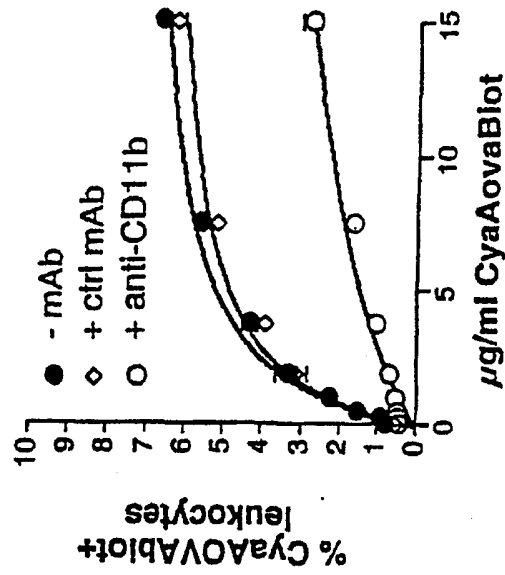
APC

Obr. 7B

14/25



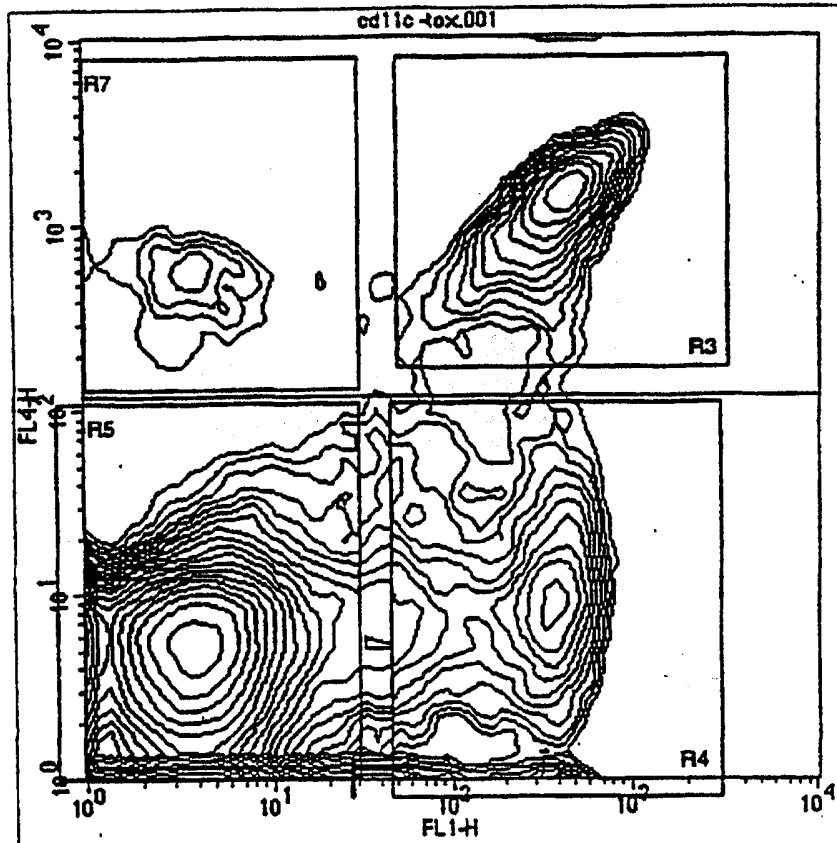
Obr. 8



20.05.03

16/25

CD8 α



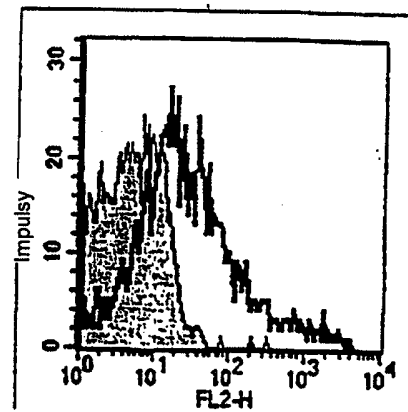
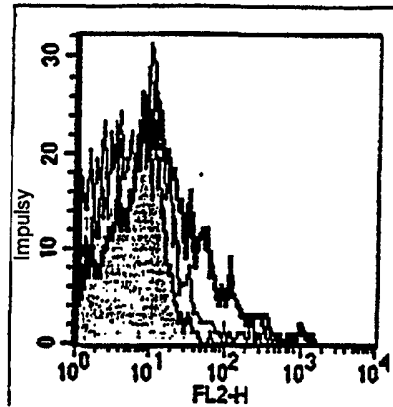
CD11c

Obr. 9b (1)

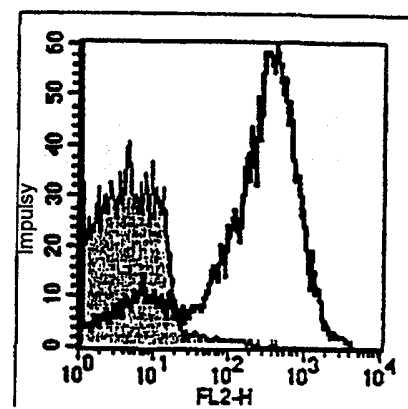
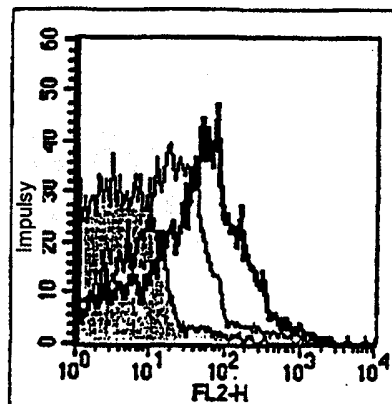
20.05.03

17/25

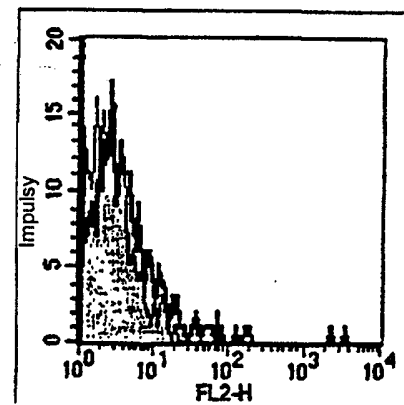
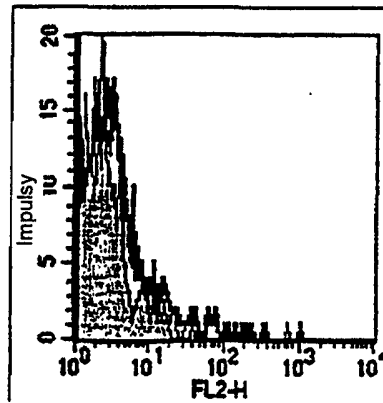
11c+CD8 α +



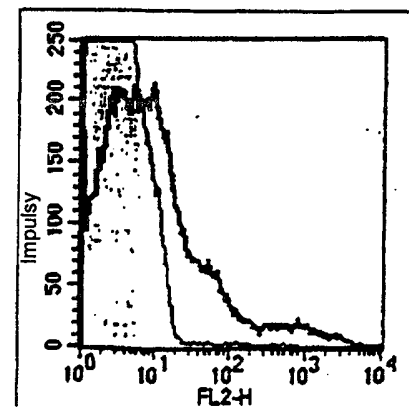
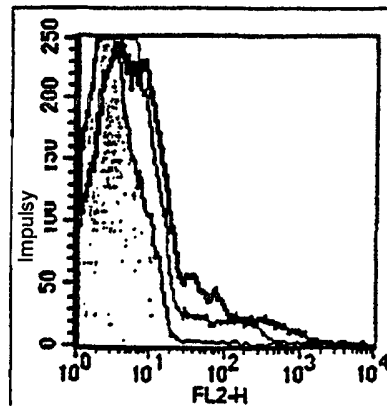
11c+CD8 α -



11c-CD8 α +



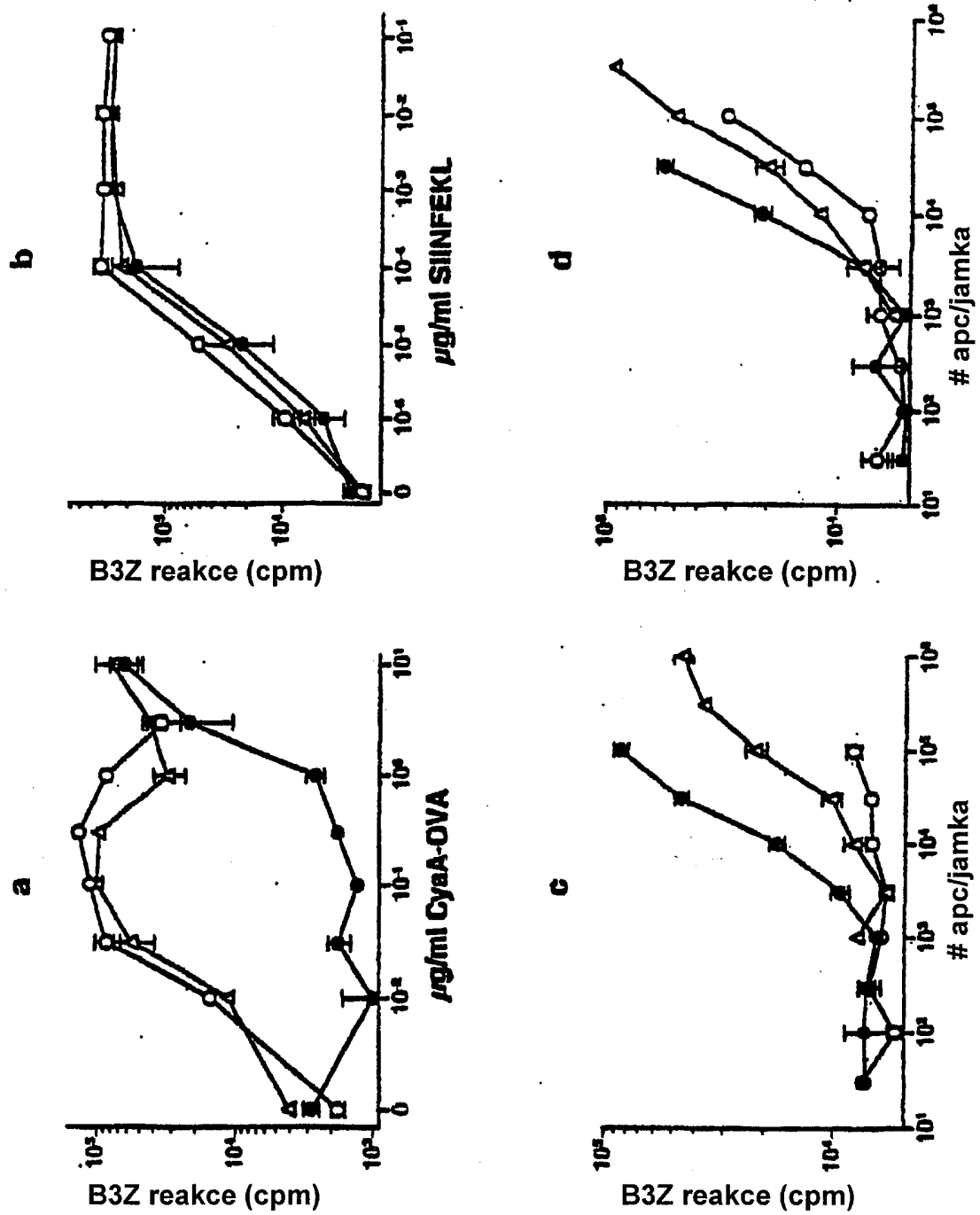
11c-CD8 α -



Obr. 9b (2)

CyaAOVA

CD11b

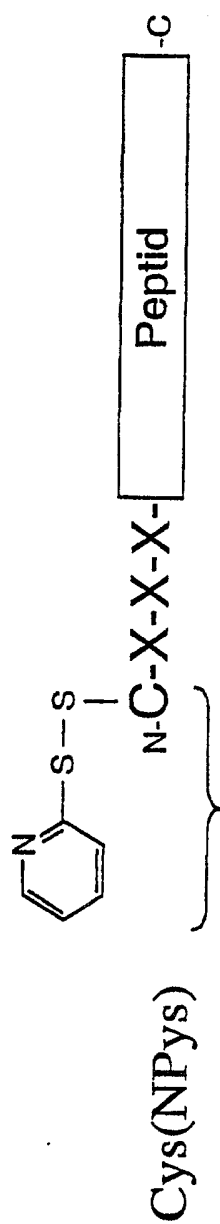


Obr. 10

1 - Inzerce Cys v CyaA (bez Cys zbytku)



2 - Chemická syntéza Cys(Npys)-peptidu



3 - Zesíťení Cys(Npys)-peptidu k CyaA-Cys

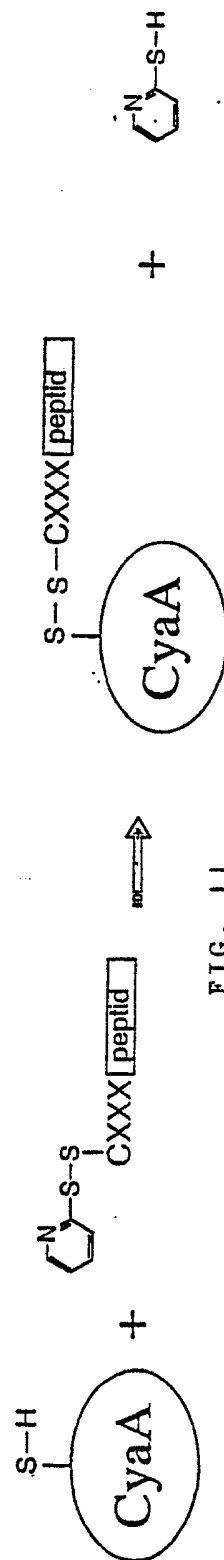
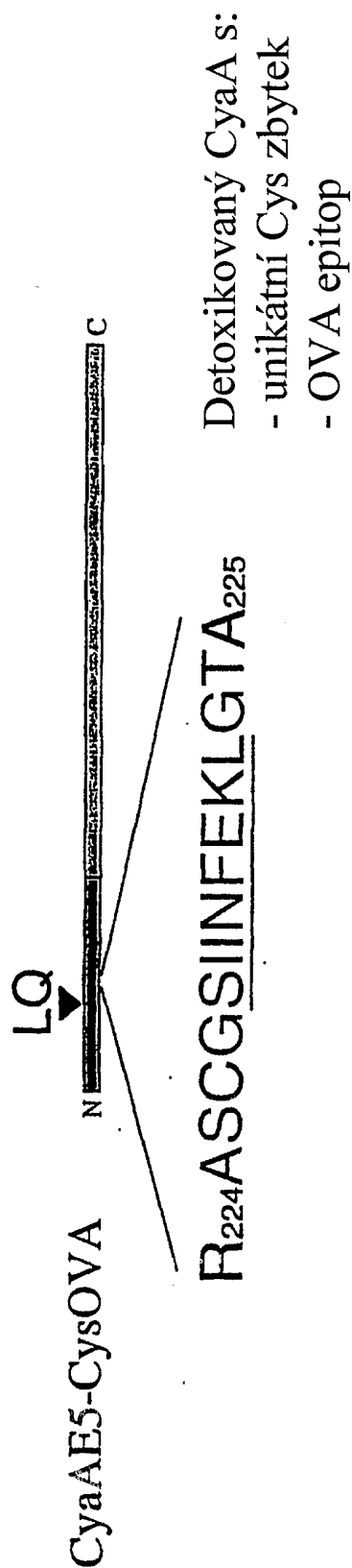


FIG. 11



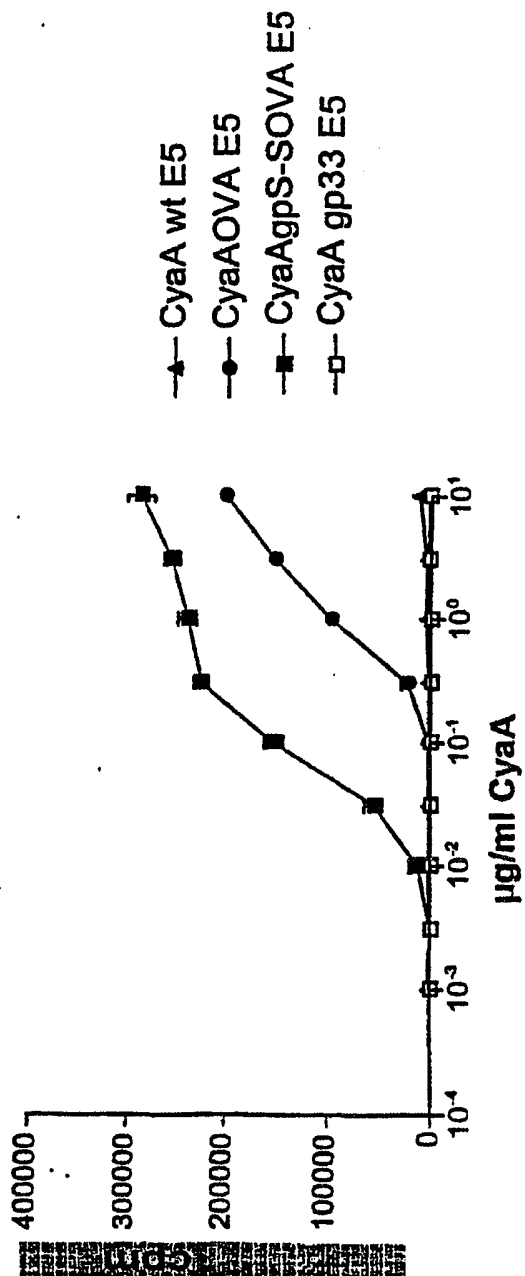
↑

Účinná prezentace OVA B3Z *in vitro*
 &
 Selektivní vazba k buňkám CD11b *in vitro*

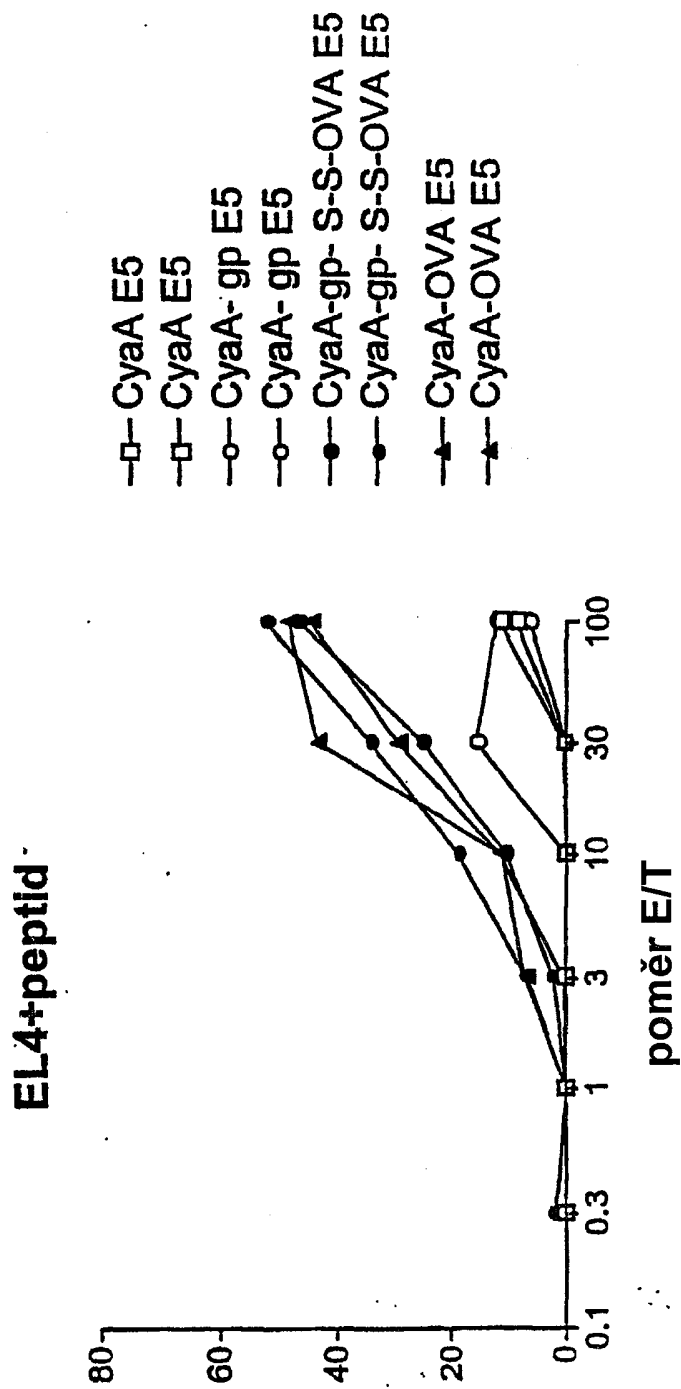
↑

Chemická vazba NPys-peptidů
 HPDP-biotinu
 & proteinů

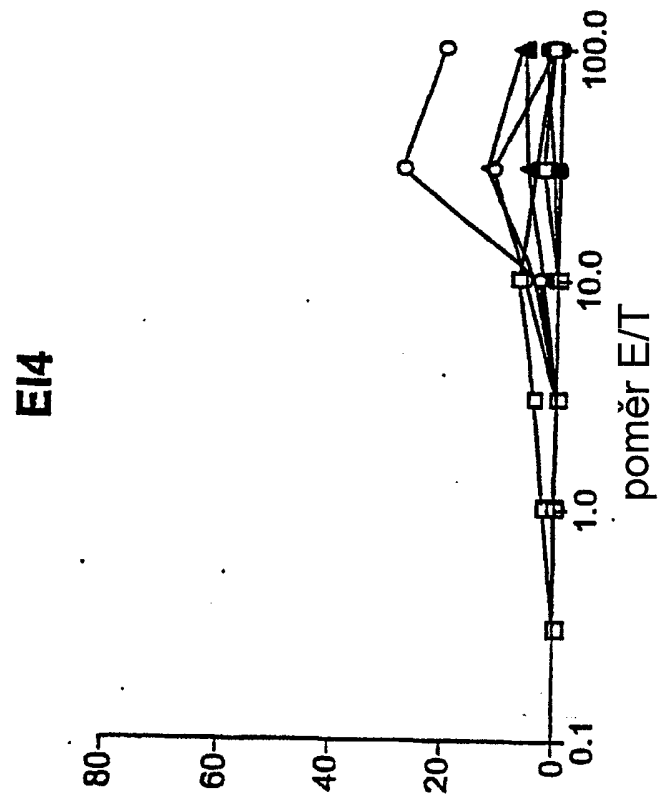
21/25



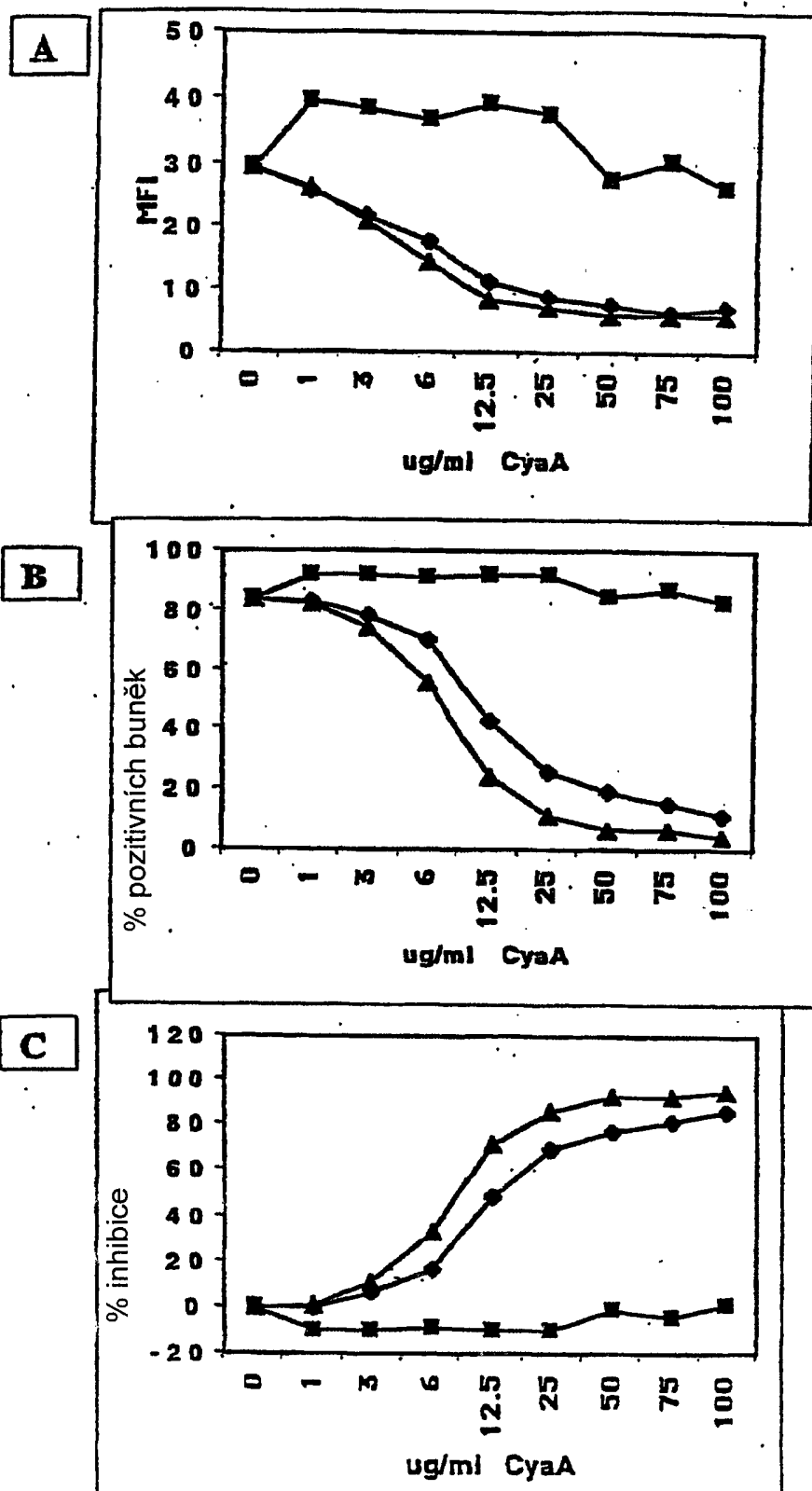
Obr. 13



Obr. 14A



Obr. 14B



Obr. 15

pTRAC-373-1706

