

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 180

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.07.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.07.2000 20.10.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0017990 2000/0025802**

(33) Země priority: **GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.08.2003**
(Věstník č. 8/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/GB01/03290**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/008435**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/86

C 12 N 5/10

C 12 N 1/21

C 07 K 14/025

A 61 K 39/12

(71) Přihlašovatel:

GLAXO GROUP LIMITED, Greenford, GB;

(72) Původce:

Ertl Peter Franz, Stevenage, GB;

Gough Gerald Wayne, Stevenage, GB;

Parmar Vanita, Stevenage, GB;

Ring Christopher Jeffrey Alan, Stevenage, GB;

Walcott Sarah Marina, Stevenage, GB;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Papilomavirové sekvence s optimalizovanými
kodony**

(57) Anotace:

Řešení souvisí se způsoby a směsmi užitečnými při léčbě a prevenci infekcí lidského papilomaviru a symptomů a onemocnění s nimi spojenými. Konkrétněji, souvisí s polynukleotidovými sekvencemi, které kódují aminokyselinové sekvence lidského papilomaviru (HPV), kde se profil využití kodonů polynukleotidové sekvence podobá profilu silně exprimovaných savčích genů.

PAPILOMAVIROVÉ SEKvence S OPTIMALIZOVANÝMI KODONY

L9344

Předkládaný vynález souvisí se způsoby a směsmi užitečnými při léčbě a prevenci infekcí lidským papilomavirem a s nimi spojených symptomů a onemocnění.

Papilomavirové infekce byly pozorovány u řady druhů, včetně ovčí, psů, králíků, opic, dobytka a lidí. Lidské papilomaviry (HPV) byly klasifikovány do více než 80 typů (Epidemiology a Biology of Cervical Cancer. Seminars in Surgical Oncology 1999 16:203-211). Jako nové (původní) typy jsou definovány ty, u nichž L1 gen vykazuje menší než 90% sekvenční identitu k L1 sekvencím dříve identifikovaných typů, zatímco subtyp vykazuje sekvenční identitu L1 mezi 90% a 98%, a varianta vykazuje více než 98% sekvenční identity (k prototypickému (rodičovskému) typu). Papilomaviry obecně infikují epitel, ale různé typy HPV způsobují různá onemocnění. Například, typy 1-4, 7, 10 a 26-29 způsobují benigní kožní bradavice, typy 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, a 68 jsou spojeny s rakovinami děložního hrdla a typy 6 a 11 jsou spojeny s bradavicemi na pohlavních orgánech (nezhoubný kondylom rodidel).

Většina bradavic na pohlavních orgánech (>90%) obsahuje HPV genotypu 6 a 11. Zatímco HPV-6 je nejrozšířenější genotyp identifikovaný v jednotlivých infekcích, mohou se oba, jak HPV-6, tak HPV-11 příležitostně vyskytovat ve stejném poškození. Bradavice se obecně vyskytují na několika místech infikovaných jedinců a u více než 60% pacientů s partnery, kteří mají kondylom (bradavicemi na pohlavních orgánech), se vyvine poranění, s průměrnou inkubační dobou 3 měsíce. V současné době je dostupná řada léčebných možností. Ty však spoléhají na odstranění nebo ablaci anebo na lokálním použití

gelů a krémů. Tyto možnosti nejsou bezbolestné, mohou vyžadovat časté návštěvy kliniky a účinnost je vysoce proměnlivá. Značný problém pro účinné zvládnutí tohoto onemocnění je recidiva.

Bradavice na pohlavních orgánech mohou spontánně ustoupit a zdá se, že za regresi bradavic jsou zodpovědné buňky zprostředkovávající imunitu. Vysoké spontánní rychlosti regrese naznačují, že hostitelská buněčná imunita může vyřešit klinické onemocnění, a činí z imunoterapeutického zásahu možnost pro léčbu nebo prevenci bradavic na pohlavních orgánech. Cíle pro léčbu nemoci jsou pro virově specifickou terapii, která je bezbolestná, vyžaduje minimum návštěv kliniky, má vysokou míru vyřešení nemoci a snižuje/minimalizuje recidivu onemocnění.

Je prokázán obtížný růst HPV v tkáňové kultuře, takže neexistuje žádná živá nebo oslabená virová vakcína. Vývoj HPV vakcíny je také zpomalen nedostatkem vhodného zvířecího modelu, ve kterém může být lidský virus studován. Je to z důvodů, že viry jsou vysoce specifické druhy, takže není možné infikovat lidským papilomavirem imunokompetentní zvíře, což by bylo vyžadováno pro bezpečné testování před tím, než by byla vakcína poprvé vyzkoušena na lidech.

Papilomaviry mají DNA genom, který kóduje "časné" a "pozdní" geny, označené E1 až E7, L1 a L2. Bylo ukázáno, že sekvence časného genu mají funkční spojitost s replikací a transkripcí virové DNA, únikem hostitelské imunity, pozměněním normálního buněčného cyklu hostitele a dalšími procesy. Například protein E1 je ATP-dependentní DNA helikasa a účastní se procesu iniciace replikace virové DNA, zatímco E2 je regulační protein, kontrolující jak virovou expresi genu, tak replikaci DNA. Díky této schopnosti vázat se jak k E1, tak k virovému

počátku replikace, způsobuje E2 lokální koncentraci E1 v počátku, a tak stimuluje iniciaci replikace virové DNA. Zdá se, že protein E4 má řadu málo prozkoumaných funkcí, ale mezi nimi může být vazba k cytoskeletu hostitelské buňky, zatímco E5 zřejmě zpožďuje acidifikaci endosomů, vedoucí ke zvýšení exprese receptoru EGF na buněčném povrchu, a oba, jak E6 tak E7 jsou známy, že váží buněčné proteiny, E6 protein p53 a E7 protein pRB. Proteiny E6 a E7 z HPV typů, které jsou spojeny s rakovinou děložního hrdla, jsou známé onkogeny. L1 a L2 kódují dva virové strukturální (kapsidové) proteiny.

Historicky, bylo na vakcíny pohlíženo, jako na způsob prevence infekce patogenem, připravující imunitní systém na rozpoznání patogenu a jeho neutralizaci tam, kde by mělo dojít k infekci. Vakcína obsahuje jeden nebo více patogenních antigenů, často celý organismus, buď mrtvý nebo v oslabené (atenuované) formě nebo obsahuje vybrané antigenní peptidy organismu. Když je imunitní systém vystaven antigenu(ům), vytvoří se buňky, které si ponechají imunologickou „paměť“ pro tento antigen po celý život jednotlivce. Následné vystavení stejnému antigenu (např. při infekci patogenem), stimuluje specifickou imunitní odpověď, která vede k odstranění nebo inaktivaci infekčního činidla.

Existují dva mechanismy imunitní odpovědi: humorální odpověď (založená na protilátkách) a buněčně zprostředkovaná odpověď. Proteinové antigeny odvozené od patogenů, které jsou replikovány intracelulárně (viry a některé bakterie), jsou procesovány uvnitř infikované hostitelské buňky za uvolnění krátkých peptidů, které jsou následně vystaveny na povrchu infikované buňky ve spojení s MHC molekulami (major histocompatibility complex) I třídy. Spojí-li se tento spojený komplex MHC I a peptidu s antigen-specifickými CD8+ T-buňkami,

jsou aktivovány T-buňky, vyžadující cytotoxickou aktivitu. Tyto cytotoxické T-buňky (CTL) mohou lyzovat infikované hostitelské buňky, a tak omezit replikaci a rozšíření infekčního patogenu. Dalším důležitým mechanismem imunitní odpovědi je kontrola pomocí CD4⁺ T-buněk. Je-li antigen odvozený od patogenů uvolněn do vnějšího buněčného prostředí, může být přijat pomocí specializovaných antigen-prezentujících buněk (APC) a vystaven na povrchu těchto buněk ve spojení s molekulami MHC II. Rozpoznání antigenu v tomto komplexu stimuluje CD4⁺ T-buňky, aby sekretovaly rozpustné faktory (cytokiny), které regulují efektorové mechanismy jiných T-buněk. Protilátka je produkována B-buňkami. Vazba antigenu k sekretované protilátce může neutralizovat infektivitu patogenu a vazba antigenu k membránově-vázané protilátce na povrchu B-buněk stimuluje dělení B-buněk, čímž se zesiluje odezva B-buňkami. Obecně, jak protilátkové, tak buněčně zprostředkované imunitní odpovědi (CD8⁺ a CD4⁺) jsou nutné pro potlačení infekcí patogeny.

Má se za to, že by mohlo být možné ovládnout imunitní systém, dokonce po infekci patogenem, pro potlačení nebo vyřešení infekce, inaktivací nebo odstraněním patogenu. Takové imunitní terapie (také známy jako „terapeutické“ vakcíny nebo imunoterapeutika) by ideálně vyžadovaly, aby buněčně zprostředkovaná odezva byla účinná, ačkoliv mohou být vyvolány obě, jak humorální, tak buněčně zprostředkovaná imunitní odpověď.

Bylo ukázáno (Benvenisty, N a Reshaf, L. PNAS 83 9551-9555), že naočkováním precipitátu fosforečnanu vápenatého a DNA vede k expresi peptidů kódovaných DNA. Následně, bylo ukázáno, že byla-li do myši vpravena nitrosvalová injekce obsahující plasmidovou DNA, která nebyla precipitována, vedlo to k příjmu

DNA svalovými buňkami a expresi kódovaného proteinu. Protože exprese DNA vede k tvorbě patogenem kódovaných proteinů v hostitelských buňkách, podobně jako během přirozené infekce, může tento mechanismus stimulovat buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď nutnou pro imunitní terapie nebo terapeutickou vakcinaci, takže může být aplikován lék na bázi DNA jako ochranná vakcína nebo jako imunitní terapie. DNA vakcíny jsou popsány v WO90/11092 (Vical, Inc.).

DNA vakcína může být přenesena jiným mechanismem než nitrosvalovou injekcí. Například, přenos do kůže má tu výhodu, že imunitní mechanismy jsou vysoce aktivní v tkáních jako kůže a mukózní membrány, které jsou bariéry pro infekci. Přenos do kůže může být pomocí injektování tryskovým injektorem, (který pod tlakem tlačí kapalinu do kůže nebo do spodní tkáně včetně svalů), nebo pomocí bombardování částic, ve které může DNA obalovat částice o dostatečné hustotě, aby prošly epitelem (US Patent No. 5371015). Například, nukleotidové sekvence mohou být vloženy do plasmidu, který je obaluje zlaté kuličky, které jsou poté pod tlakem vedeny do pokožky tak, jak je například popsáno v Haynes a kol. *J. Biotechnology* 44: 37-42 (1996). Výběžky těchto částic do kůže vedou k přímé transfekci jak epidermálních buněk, tak i epidermálních Langerhansových buněk. Langerhansovy buňky jsou antigen prezentující buňky (APC), které přijímají DNA, exprimují kódované peptidy a procesují je pro vystavení s buněčnými povrchovými proteiny MHC. Transfekované Langerhansovy buňky migrují do lymfatických uzlin, kde prezentují vystavené fragmenty antigenů lymfocytům, vyvolávajících imunitní odpověď. Pro indukování imunitní odpovědi pomocí částice zprostředkovávající přenos do kůže je potřeba velmi malého množství DNA (méně než 1 μg , často méně než 0,5 μg), což je v kontrastu s miligramovými množstvími DNA,

které, jak je známo, jsou potřebné k navození imunitních odpovědí následně po přímé nitrosvalové injekci.

Bylo často prokázáno, že exprese a detekce proteinů HPV v transfekovaných živočišných buňkách, takových jako HeLa, 293 nebo CHO buňky, je nesnadná a proto jsou pro biochemické a imunologické studie, vyžadující detekovatelnou expresi proteinů, nebo množství čistých proteinů, často používány proteinové expresní systémy *E.coli*, bakuloviru nebo kvasinek. V těchto systémech jsou výtěžky proteinu postačující pro funkční analýzy a purifikaci a následné možné biochemické a imunologické studie. Přímé způsoby detekce proteinu (např. Western blot), většinou neuspějí při detekci exprese E1 proteinu v transfekovaných živočišných buňkách, dokonce i když jsou použity vektory se silnými promotory jako CMV nebo SV40. Způsoby navržené pro zvýšení exprese proteinu E1 v živočišných buňkách zahrnují klonování 5'přesahující sekvence podél genu E1 (Remm a kol. *J.Virol* 1999 **73**, 3062-3070) a amplifikaci transfekovaného E1 plasmidového vektoru po transfekci (Zou a kol. *J.Virol* 1998 **72**, 3436-3441). Amplifikace vloženého vektorového plasmidu replikací po transfekci způsobuje zvýšení počtu kopií genu E1 v buňce, čímž se zvyšují hladiny proteinů, a tak usnadňují detekci proteinu (pomocí Western blotu). Protože exprese a detekce proteinu E1 je v živočišných buňkách problematická, několik autorů se uchýlilo k detekování exprese proteinu pomocí *in vitro* transkripce-translace s ³⁵S-značeným methioninem, používající králičí retikulocytový systém (Promega), (Gopalakrishnan a kol. *Virology* 1999 **256**, 330-339., Safari a kol. *Virology* 1995 **211**, 385-396). Toto je však bezbuněčný systém a vyžaduje použití modifikovaného promotoru, který obsahuje vazebnou sekvenci pro RNA polymerasu z fága T7.

Exprese E1 proteinu byla navíc detekována nepřímo, pomocí detekce *in vitro* DNA replikace plasmidu obsahujícího HPV

počátek replikace DNA. Detekce tohoto replikovaného plastidu, obsahujícího počátek replikace, působí jako náhrada za expresi proteinu E1 (a E2) (Gopalakrishnan a kol, Virology 1999 **256**, 330-339., Lu a kol J.Virol 1993 **67**, 7131-7139 a Del Vecchio a kol J. Virol 1992 **66**, 5949-5958). Jak E1, tak i E2 jsou vyžadovány pro replikaci HPV počátku replikace, takže transfekce živočišných buněk plasmidy kódujícími oba geny E1 a E2 a třetím plasmidem nesoucím HPV počátek replikace DNA povede pouze k replikaci plasmidu nesoucí počátek replikace, jestliže exprese E1 proteinu (a E2 proteinu) byla úspěšná, i když nebyla detekovatelná standardním způsobem detekce proteinu (Western blotem).

DNA kód je 4 písmenkový (A, T, C a G) a používá je pro vytvoření tří písmenkových „kodonů“, které reprezentují aminokyseliny proteinů, kódovaných geny organismu. Lineární sekvence kodonů v molekule DNA je translatována do lineární sekvence aminokyselin proteinů, kódovaných těmito geny. Kód je vysoce degenerovaný, s 61 kodony kódujícími 20 přirozených aminokyselin a 3 kodony reprezentujícími „stop“ signály. Většina aminokyselin je tedy kódována více než jedním kodonem - ve skutečnosti několik aminokyselin je kódováno čtyřmi nebo více různými kodony.

Bylo pozorováno, že tam, kde je k dispozici více než jeden kodon pro kódování dané aminokyseliny, jsou způsoby využívání kodonů daného organismu vysoce nenáhodné. Různé druhy vykazují různé tendence při jejich výběru kodonů a navíc, využití kodonů může být značně odlišné v jednom druhu mezi geny, které jsou exprimovány ve vysoké nebo nízké míře. Tato tendence je různá u virů, rostlinných, bakteriálních a živočišných buněk, a některé druhy ukazují silnější tendenci vzdálenější od náhodné selekce kodonu než jiné. Například, lidé a jiní savci

jsou ovlivněny méně než určité bakterie nebo viry. Z těchto důvodů, existuje značná pravděpodobnost, že savčí gen exprimovaný v E.coli nebo virový gen exprimovaný v savčích buňkách, bude mít nevhodné rozdělení profilu využití kodonů pro účinnou expresi. Avšak, gen s profilem využití kodonů vhodným pro expresi v E.coli, může být také účinně exprimován v lidech. Má se za to, že pokud jsou v heterologní DNA sekvence klastrů kodonů, které jsou zřídka pozorovány v hostiteli, ve kterém k expresi dochází, dá se z toho usuzovat na nízkou hladinu heterologní exprese v tomto hostiteli.

Existuje několik příkladů, kde změna kodonů z těch, které se v hostiteli zřídka vyskytují na ty, které hostitel preferuje („optimalizace kodonu“) zvyšuje hladiny heterologní exprese. Například, pokud byl u pozdních genů L1 a L2 BPV (bovine papilloma virus) optimalizován profil využití kodonů pro využití v savcích, bylo ukázáno, že to vede k zvýšeným hladinám exprese ve srovnání s HPV sekvencemi divokého typu v kultuře savčích (Cos-1) buněk (Zhou et. al. J. Virol 1999. **73**, 4972-4982). V této práci byly všechny kodony BPV, které se vyskytují více než dvakrát častěji v BPV než u savců (poměr použití >2), a většina kodonů s použitým poměrem $>1,5$, konzervativně nahrazeny přednostně využívaným savčím kodonem. V W097/31115, W097/48370 a W098/34640 (Merck & Co., Inc.) bylo ukázáno, že optimalizace kodonu HIV genů nebo jeho segmentů vedla ke zvýšení exprese proteinu a zlepšení imunogenity, byly-li kodonově optimalizované sekvence použity jako DNA vakcíny v savčích hostitelích, pro které byla optimalizace navržena. V této práci sekvence sestávají zcela z optimalizovaných kodonů (s výjimkou těch, kde bylo zavedeno nežádoucí restriční místo, místo sestřihu intronu, atd.), protože každý virový kodon je konzervativně nahrazen optimálním kodonem pro zamýšleného hostitele.

Podle prvního aspektu, poskytuje předkládaný vynález polynukleotidovou sekvenci, která kóduje aminokyselinovou sekvenci HPV, kde je profil využití kodonů polynukleotidové sekvence podobný tomu, který je obsažen v silně exprimovaných savčích genech. Je vhodnější, aby polynukleotidová sekvence byla sekvence DNA. Je vhodné, aby se profil využití kodonů podobal tomu, který je v silně exprimovaných lidských genech. V ideálním případě se profil využití kodonů také podobá tomu, který je v silně exprimovaných genech E.coli. Polynukleotidová sekvence může být DNA sekvence, například dvojřetězcová DNA sekvence. Je vhodnější, když polynukleotidová sekvence kóduje polypeptid HPV typu nebo subtypu HPV spojeného s rakovinou děložního hrdla, benigními kožními bradavicemi nebo bradavicemi na pohlavních orgánech, například typů 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, a 68, vhodnější typů 6, 11, 16, 18, 33 nebo 45, které jsou spojeny zejména s rakovinou děložního hrdla a s bradavicemi na pohlavních orgánech, nejvhodnější HPV 11, 6a nebo 6b.

Podle toho, je poskytnut umělý gen, zahrnující rozmanitost kodonů kódujících aminokyselinovou sekvenci HPV, kde výběr možných kodonů použitých pro kódování aminokyselinové sekvence byl změněn, aby se podobal optimálnímu savčímu využívání kodonu tak, aby se frekvence využívání kodonu v umělém genu více podobala frekvenci v silně exprimovaných savčích genech než frekvenci v genech papilomaviru. Je vhodnější, když profil využití kodonu je v podstatě stejný jako pro vysoce exprimované lidské geny.

V určitých formách, je kódovaná aminokyselinová sekvence aminokyselinovou sekvencí divokého typu HPV. V alternativních formách, je kódovaná aminokyselinová sekvence mutovaná

aminokyselinová sekvence HPV, zahrnující sekvenci divokého typu se změnami v aminokyselinách, například aminokyselinové bodové mutace, dostatečné ke snížení nebo inaktivaci jedné nebo více přirozených biologických funkcí polypeptidu. Je vhodné, aby si mutovaná aminokyselinová sekvence ponechala imunogenitu polypeptidu divokého typu.

Kódovaný polypeptid HPV může zahrnovat produkt časného genu, takového jako E1, E2 nebo E7, nebo jeho fragment, analog nebo fúzi, nebo může být produkt pozdního genu, takového jako L1 nebo L2, nebo jeho fragment, analog nebo fúze. Polynukleotid vynálezu může například kódovat fúzi mezi dvěma nebo více produkty časných genů HPV, mezi produktem časného genu HPV a produktem pozdního genu HPV, nebo mezi dvěma nebo více produkty pozdních genů HPV, mezi jedním nebo více fragmenty produktů genu HPV nebo mezi produktem genu HPV (nebo jeho fragmentem) a polypeptidem, odvozeným z jiného zdroje než HPV, například adjuvans nebo cílovým peptidem nebo polypeptidem, jako je peptid core HBV. Fúze mohou být mezi produktem genu HPV odvozeným od stejných nebo rozdílných virových typů nebo subtypů. Je vhodné, aby si takové fúze ponechaly imunogenitu fúzních polypeptidových složek. Je vhodnější, když kódovaný polypeptid HPV zahrnuje celý nebo část produktu časného genu, nejvhodněji E1 nebo E2. V jedné konkrétní formě kóduje polynukleotidová sekvence HPV 6b polypeptid E1 divokého typu, jak je ukázáno na Obr.1, nebo jeho fragment nebo analog. V jiných formách může polynukleotidová sekvence kódovat jednu nebo více z: mutovaných aminokyselinových sekvencí E1 HPV6b, ukázaných na Obr. 2; aminokyselinové sekvence divokého typu E2 (Obr. 3) HPV 11 nebo 6a nebo 6b; mutované aminokyselinové sekvence E2 HPV6b z Obr. 4b; a mutované sekvence E2 HPV11 z Obr. 4a, nebo jejich fragmenty, analoga nebo fúze, ve kterých si kódované polypeptidy ponechávají svou imunogenitu.

Podle předkládaného vynálezu, bude profil využití kodonů polynukleotidu vhodněji vylučovat kodony s hodnotou RSCU menší než 0,2 v silně exprimovaných genech cílového organismu. Hodnota relativně synonymního využití kodonů (RSCU) je počet sledovaných kodonů dělený počtem očekávaných kodonů, když všechny kodony pro takovou aminokyselinu byly využity stejně často. Polynukleotid předkládaného vynálezu bude mít obecně koeficient využívání kodonu (jak je definováno níže) pro silně exprimované lidské geny vyšší než 0,3, vhodněji vyšší než 0,4, nejvhodněji vyšší než 0,5 ale menší než 1. Je vhodné, aby polynukleotid měl také koeficient využívání kodonu pro silně exprimované geny E.coli vyšší než 0,5, vhodněji vyšší než 0,6, nejvhodněji vyšší než 0,7.

V jedné formě poskytuje předkládaný vynález polynukleotidovou sekvenci, jak je ukázáno na Obr. 5 nebo na Obr. 6, nebo její fragment nebo analog, která zachovává svůj profil využití kodonů. V další formě poskytuje předkládaný vynález polynukleotidovou sekvenci komplementární k sekvenci ukázané na Obr. 5 nebo na Obr. 6.

Podle druhého aspektu vynálezu, je poskytnut expresní vektor, který zahrnuje a je schopen řídit expresi polynukleotidové sekvence podle prvního aspektu vynálezu, kódující aminokyselinovou sekvenci HPV, kde se profil využití kodonů polynukleotidové sekvence podobá profilu v silně exprimovaných savčích genech, vhodněji v silně exprimovaných lidských genech. Vektor může být vhodný pro řízení exprese heterologních DNA v bakteriálních, hmyzích nebo savčích buňkách, zejména lidských buňkách. V jedné formě je expresní vektor p7313PLc (Obr.7).

Podle třetího aspektu vynálezu, jsou poskytnuty hostitelské buňky, obsahující polynukleotidovou sekvenci podle prvního

aspektu vynálezu, nebo expresní vektor podle druhého aspektu. Hostitelské buňky mohou být bakteriální, např. E.coli, savčí, např. lidské, nebo mohou být hmyzí buňky. Savčí buňky obsahující vektor podle předkládaného vynálezu mohou být kultivované buňky transfekované in vitro nebo mohou být transfekovány in vivo podáním vektoru savci.

Ve čtvrtém aspektu poskytuje předkládaný vynález farmaceutickou směs obsahující polynukleotidovou sekvenci podle prvního aspektu vynálezu. Je vhodnější, aby směs obsahovala DNA vektor podle druhého aspektu předkládaného vynálezu. V přednostních formách směs zahrnuje rozmanitost částic, vhodněji zlatých částic, potažených DNA obsahující vektor, kódující polynukleotidovou sekvenci, která kóduje aminokyselinovou sekvenci HPV, kde profil využití kodonů polynukleotidové sekvence se podobá profilu u silně exprimovaných savčích genů, zejména lidských genů. V alternativních formách obsahuje směs farmaceuticky přijatelnou excipientní látku a DNA vektor podle druhého aspektu předkládaného vynálezu. Směs může také obsahovat adjuvans.

V dalším aspektu poskytuje předkládaný vynález způsob vytvoření farmaceutické směsi, včetně kroku změny profilu využití kodonu nukleotidové sekvence HPV divokého typu nebo vytvoření syntetické polynukleotidové sekvence, pro tvorbu sekvence, která má profil využití kodonů podobný profilu vysoce exprimovaných savčích genů a kódující aminokyselinovou sekvenci HPV divokého typu nebo mutovanou aminokyselinovou sekvenci HPV, obsahující sekvenci divokého typu s aminokyselinovými změnami, dostatečnými pro inaktivaci jedné nebo více přirozených funkcí polypeptidu.

Je také poskytnuto použití polynukleotidu podle prvního aspektu nebo vektoru podle druhého aspektu vynálezu, při léčbě nebo prevenci infekce HPV, vhodněji infekce typem nebo subtypem HPV spojeným s rakovinou děložního hrdla, benigními kožními bradavicemi nebo bradavicemi na pohlavních orgánech například typy, 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68. V určitých formách poskytuje vynález použití polynukleotidu podle prvního aspektu nebo vektoru podle druhého aspektu vynálezu při léčbě nebo prevenci infekce HPV typu 6, 11, 16, 18, 33 nebo 45, které jsou spojeny zejména s rakovinou děložního hrdla a s bradavicemi na pohlavních orgánech, nejvhodněji HPV 11, 6a nebo 6b. Vynález také poskytuje použití polynukleotidu podle prvního aspektu, vektoru podle druhého aspektu vynálezu nebo farmaceutické směsi podle čtvrtého aspektu vynálezu, při léčbě nebo prevenci benigních kožních bradavic, bradavic na pohlavních orgánech, atypické ploché buňky nezjištěného významu (ASCUS), dysplazie děložního hrdla, intraepiteliální neoplazie děložního hrdla (CIN) nebo rakoviny děložního hrdla. Podle toho, předkládaný vynález také poskytuje použití polynukleotidu podle prvního aspektu nebo vektoru podle druhého aspektu vynálezu pro přípravu léku pro léčbu nebo prevenci infekce HPV, jakéhokoliv jednoho nebo více typů 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68, nebo s ní spojených jakýchkoliv symptomů nebo onemocnění.

Předkládaný vynález také poskytuje způsoby pro léčbu nebo prevenci infekcí HPV, zejména infekcí jakéhokoliv jednoho nebo více typů HPV 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68, nebo s nimi spojených jakýchkoliv symptomů nebo onemocnění, včetně podávání účinného množství polynukleotidu podle prvního aspektu, vektoru podle druhého aspektu nebo farmaceutické směsi podle čtvrtého aspektu vynálezu. Podávání farmaceutické směsi může být ve

formě jedné nebo více jednotlivých dávek, například v první spouštěcí dávce „prime-boost“ terapeutického vakcinačního režimu. V některých případech může být „první“ vakcinace provedena pomocí částice zprostředkující DNA přenos polynukleotidu podle předkládaného vynálezu, vhodněji inkorporovaného do plasmidového vektoru a spouštěcí dávka „boost“ podáním rekombinantního virového vektoru obsahujícího stejnou polynukleotidovou sekvenci.

V předkládané specifikaci a v doprovodných nárocích jsou slova „zahrnovat“ a „obsahovat“ a takové obměny jako „zahrnuje“, „zahrnující“, „obsahuje“ a „obsahující“ vykládána jako plně zahrnující. To znamená, že tato slova mají vyjadřovat možné zahrnutí dalších prvků nebo čísel, které nejsou specificky uvedeny tam, kde to kontext umožňuje.

Výraz „analog“ označuje polynukleotid, který kóduje stejnou aminokyselinovou sekvenci jako jiný polynukleotid předkládaného vynálezu, ale který má díky nadbytečnosti genetického kódu odlišnou nukleotidovou sekvenci ale zachovává si stejný profil využití kodonů, například má stejný koeficient využití kodonů nebo má koeficient využití kodonů do 0,1, vhodněji do 0,05 koeficientu jiného polynukleotidu.

Výraz „profil využití kodonů“ označuje průměrné frekvence všech kodonů v nukleotidové sekvenci, genu nebo třídě genů, o nichž se diskutuje (např. silně exprimované savčí geny). Profil využití kodonu pro savce, včetně lidí, je možné nalézt v literatuře (viz např. Nakamura a kol., *Nucleic Acids Research* 1996, **24**:214-215).

V polynukleotidech předkládaného vynálezu se profil využití kodonů mění z toho, který je typický pro lidské papilomaviry na takový, který je blíže kodonům cílového organismu, např.

E.coli nebo savci, zejména člověku. „Koeficient využití kodonů“ je míra toho, jak moc se profil využití kodonů dané polynukleotidové sekvence podobá profilu využití kodonů cílového druhu. Frekvence kodonů mohou být odvozeny z literárních zdrojů pro mnoho druhů silně exprimovaných genů (viz např. Nakamura a kol. Nucleic Acids Research 1996, 24:214-215). Frekvence kodonů pro každý z 61 kodonů (vyjádřené jako číslo vyskytovaného výskytu na 1000 kodonů z 10 vybraných tříd genů) jsou normalizovány pro každou z dvaceti přirozených aminokyselin, takže hodnota pro nejfrekventovaněji využívaný kodon pro každou aminokyselinu se rovná 1 a frekvence méně běžných kodonů leží mezi nulou a 1. Každý z 61 kodonů je tedy označen hodnotou 1 nebo nižší pro silně exprimované geny cílových druhů. Za účelem spočítat koeficient využití kodonů pro specifický nukleotid, vzhledem k silně exprimovaným genům tohoto druhu, jsou velikosti hodnoty pro každý kodon specifického polynukleotidu zaznamenány a je vypočten geometrický průměr všech těchto zaznamenaných hodnot (pomocí dělení sumy přirozených logaritmů těchto hodnot celkovým počtem kodonů a převedením na jejich záporný logaritmus). Koeficient bude mít hodnotu mezi nulou a 1 a čím vyšší koeficient tím více je kodonů, které jsou v polynukleotidu často využívány. Jestliže má polynukleotidová sekvence koeficient využívání kodonů 1, všechny kodony jsou "nejfrekventovanější" kodony pro silně exprimované geny cílových druhů.

Kratší polynukleotidové sekvence jsou v rámci tohoto vynálezu. Polynukleotid vynálezu může například kódovat fragment proteinu HPV. Polynukleotid, který kóduje fragment dlouhý alespoň 8, například 8-10 aminokyselin nebo do 20, 50, 60, 70, 80, 100, 150 nebo 200 aminokyselin je považován, že náleží do rámce vynálezu, pokud má polynukleotid profil využití kodonů, který se podobá profilu silně exprimovaného savčího genu a

kódovaný oligo nebo polypeptid vykazuje antigenní vlastnosti HPV. Zejména, ale ne výhradně, zahrnuje tento aspekt vynálezu situaci, kde polynukleotid kóduje fragment kompletní proteinové sekvence HPV a může představovat jeden nebo více samostatných epitopů tohoto proteinu.

Polynukleotidy předkládaného vynálezu vykazují vyšší expresi v *E.coli* a savčích buňkách než odpovídající sekvence divokého typu, kódující stejné aminokyselinové sekvence. I když není žádoucí vázat se na jakoukoliv teorii, má se za to, že je to způsobeno alespoň dvěma důvody. Za prvé tím, že má profil využití kodonů bližší profilu hostitelské buňky, jsou sekvence snadněji procesovány buněčnou translační mašinérií. Za druhé, protože až 30% nukleotidové sekvence (nebo více) je odlišných od sekvence divokého typu, jsou odstraněna nebo změněna místa, která interferují s transkripcí nebo translací (taková jako vazebná místa pro proteiny).

V některých formách vykazují polynukleotidy podle předkládaného vynálezu profily využití kodonů, které se podobají profilům *E.coli* a savčím (např. lidským) genům. To je zejména výhodné tam, kde je sekvence použita při vakcinaci savců a při přípravě značných množství antigenového proteinu in vitro použitím buněk *E.coli* (např. pro použití v testech, takových jako jsou imunotesty pro odhadnutí hladin exprese v savčích nebo lidských tkáních).

Jak je diskutováno výše, zahrnuje předkládaný vynález expresní vektory, které obsahují nukleotidové sekvence vynálezu. Takové expresní vektory jsou rutinně konstruovány v oblasti molekulární biologie a mohou například zahrnovat použití plasmidové DNA a vhodných iniciátorů, promotorů, enhancerů a dalších prvků, takových jsou například polyadenylační signály, které mohou být nezbytné a které jsou umístěny ve

správné orientaci, aby umožnily expresi proteinu. Osobám, které jsou orientovány v oboru budou zřejmě další vhodné vektory. S ohledem na další příklad odkazujeme na Sambrook a kol. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2 vydání. CSH Laboratory Press. (1989).

Výhodněji, je polynukleotid vynálezu nebo pro použití ve vynálezu ve vektoru, funkčně spojen s kontrolní sekvencí, která umožňuje poskytnutí exprese kódující sekvence hostitelskou buňkou, tj. vektor je expresní vektor. Výraz "funkčně spojen" označuje vzájemnou polohu, kde popsané složky jsou v takovém vztahu, který jim dovoluje správně fungovat žádoucím způsobem. Regulační sekvence, taková jako promotor, "funkčně spojená" s kódující sekvencí je umístěna tak, že exprese kódující sekvence je dosaženo za podmínek, které jsou slučitelné s regulační sekvencí.

Vektory mohou být například plasmidy, umělé chromosomy (např. BAC, PAC, YAC), virové nebo fágové vektory, poskytnuté s počátkem replikace, volitelně promotor pro expresi polynukleotidu a volitelně regulátor promotoru. Vektory mohou obsahovat jeden nebo více selekčních markerových genů, například gen pro ampicilinovou nebo kanamycinovou rezistenci v případě bakteriálního plasmidu nebo rezistenční gen pro fungální vektor. Vektory mohou být použity *in vitro*, například pro tvorbu DNA nebo RNA nebo použity pro transfekci nebo transformaci hostitelských buněk, například savčí hostitelské buňky např. pro tvorbu proteinu, kódovaného vektorem. Vektory mohou být také upraveny pro použití *in vivo*, například při způsobech DNA vakcinace nebo genové terapie.

Promotory a další expresní regulační signály mohou být vybrány tak, aby byly slučitelné s hostitelskou buňkou, pro kterou je exprese navržena. Například, savčí promotory zahrnují

metalothioneinový promotor, který může být indukován jako odezva na těžké kovy, takové jako kadmium a β -aktinový promotor. Mohou být také použity virové promotory, takové jako promotor velkého T antigenu SV40, ranně časný (IE) promotor lidského cytomegaloviru, LTR promotor Rous sarcoma viru, adenovirový promotor nebo HPV promotor, zejména protisměrná regulační oblast (URR) HPV. Všechny tyto promotory jsou velmi dobře popsány a jsou v oboru dostupné.

Příklady vhodných virových vektorů zahrnují virové vektory herpes simplex, vektory vakcinia nebo alfa-viru a vektory retrovirů, včetně lentivirů, adenovirů a virů spojenými s adenoviry. Techniky přenosu genů použitím těchto virů jsou známy těm, jenž jsou orientováni v oboru. Retrovirové vektory mohou být například použity pro stabilní integraci polynukleotidu vynálezu do hostitelského genomu, i když taková rekombinace není přednostní. Na druhé straně replikačně-defektní adenovirové vektory zůstávají epizomální a proto dovolují tranzientní expresi. Za účelem tvorby velkého množství proteinu HPV, kódovaného polynukleotidy předkládaného vynálezu, například pro použití jako podjednotkové vakcíny nebo pro imunotesty, mohou být použity vektory schopné řídit expresi v hmyzích buňkách (například bakulovirové vektory), v lidských buňkách nebo v bakteriích.

Polynukleotidy podle tohoto vynálezu mají využití při tvorbě kódovaných proteinů pomocí exprese, kde exprese může být *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo*. Nukleotidy mohou tedy být obsaženy v syntéze rekombinantního proteinu, například pro zvýšení výtěžků nebo mohou najít uplatnění jako uznávaná terapeutická činidla, používaná v technikách DNA vakcinace. Tam, kde jsou polynukleotidy předkládaného vynálezu použity při tvorbě kódovaných proteinů *in vitro* nebo *ex vivo*, budou buňky, například v buněčné kultuře modifikovány, aby

obsahovaly polynukleotid, jenž má být exprimován. Takové buňky zahrnují tranzientní nebo vhodněji stabilní savčí buněčné linie. Konkrétní příklady buněk, které mohou být modifikovány vložím vektorů, kódujících polypeptid podle vynálezu, zahrnují savčí HEK293T, CHO, HeLa, 293 a COS buňky. Výhodněji bude vybraná buněčná linie ta, která je nejen stabilní, ale také umožňuje kompletní glykosylaci a expresi polypeptidu na buněčném povrchu. Expresce může být dosaženo v transformovaných oocytech. Polypeptid může být exprimován z polynukleotidu předkládaného vynálezu v buňkách transgenního nelidského živočicha, vhodně myši. V rámci předkládaného vynálezu je zahrnut transgenní nelidský živočich exprimující polypeptid z polynukleotidu vynálezu.

Najdou-li polynukleotidy předkládaného vynálezu použití jako terapeutická činidla, např. v DNA vakcinaci, bude nukleová kyselina podávána živočichu, např. člověku, který má být vakcinován. Nukleová kyselina, taková jako RNA nebo DNA, výhodněji DNA, je poskytnuta ve formě vektoru, takového jako ty popsané výše, který může být exprimován v buňkách živočicha. Polynukleotidy mohou být podávány jakoukoliv vhodnou technikou. Nukleová kyselina může být například vnesena injekční jehlou, výhodněji intradermálně, subkutánně nebo intramuskulárně. Nukleová kyselina může být alternativně vnesena přímo do kůže použitím přenosového zařízení pro nukleové kyseliny, takového jako přenos DNA zprostředkovaný částicemi (PMDD). V tomto způsobu, jsou inertní částice (takové, jako zlaté kuličky) potaženy nukleovou kyselinou a jsou urychleny na dostatečnou rychlost, aby jim umožnila penetrovat povrchem recipienta (např. kůží), například vypuštěním za vysokého tlaku z projektilového zařízení. (Částice potažené molekulou nukleové kyseliny předkládaného vynálezu jsou v rámci předkládaného vynálezu, stejně jako přenosová zařízení naplněná takovými částicemi). Směs vhodně

zahrnuje zlaté částice, které mají průměrný průměr 0,5-5 μm , výhodněji přibližně 2 μm . V přednostních formách, jsou potažené zlaté kuličky naplněny do nádobek, sloužících jako náplně tak, že každá náplň obsahuje 0,1-1 mg, výhodněji 0,5 mg zlata potaženého 0,1-5 μg , výhodněji přibližně 0,5 μg DNA/náplň.

Techniky vhodné pro vnesení holého polynukleotidu nebo vektoru do pacienta zahrnuje topikální aplikaci vhodným prostředkem. Nukleová kyselina může být podána topikálně na kůži, nebo na mukózní povrchy například pomocí intranasálního, orálního, intravaginálního nebo intrarektálního podávání. Holý polynukleotid nebo vektor mohou být přítomny společně s farmaceuticky přijatelnou excipientní látkou, takovou jako fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS). Příjem DNA může být dále usnadněn pomocí usnadňovacích činidel, takových jako bupivacain, buď odděleně nebo zahrnutých ve směsi DNA. Další způsoby podávání nukleové kyseliny přímo příjemci zahrnují ultrazvuk, elektrické stimulace a mikrovýsev, které jsou uvedeny v US-5,697,901.

Příjem konstruktů nukleových kyselin může být zvýšen několika známými transfekčními technikami, například takovými, které zahrnují použití transfekčních činidel. Příklady těchto činidel zahrnují kationtová činidla, například fosfát vápenatý a DEAE-Dextran a lipofektanty, například lipofektam nebo transfektam. Dávka nukleové kyseliny, která má být podána, může být změněna. Většinou je nukleová kyselina podávána v množství v rozmezí od 1pg do 1mg, výhodněji 1pg až 10 μg nukleové kyseliny na částici zprostředkovávající přenos a 10 μg až 1mg pro jiné cesty.

Sekvence nukleové kyseliny předkládaného vynálezu může být také podána prostřednictvím specializovaných přenosových vektorů, používaných při genové terapii. Přístupy genové

terapie jsou diskutovány například v Verme a kol, Nature 1997, 389:239-242. Mohou být použity jak virové, tak nevirové vektorové systémy. Virově založené systémy zahrnují systémy založené na retrovirech, lentivirech, adenovirech, virech spojených s adenoviry, herpes virech, canarypox a vakcinia virech. Nevirově založené systémy zahrnují přímé podávání nukleových kyselin, mikrosférickou enkapsulační technologii (poly(laktid-ko-glykolid) a systémy založené na liposomech. Virové a nevirové přenosové systémy mohou být kombinovány, je-li žádoucí poskytnou opakované injektování po první vakcinaci, například první „prime“ DNA vakcinace pomocí nevirových vektorů, takových jako plasmid, následované jednou nebo více „opakovacími dávkami“ vakcinace použitím virového vektoru nebo nevirově založeného systému.

Sekvence nukleové kyseliny předkládaného vynálezu může být také podávána prostřednictvím transformovaných buněk. Takové buňky zahrnují buňky odebrané ze subjektu. Čistý polynukleotid nebo vektor předkládaného vynálezu mohou být vloženy do takových buněk *in vitro* a transformované buňky mohou být později vráceny subjektu. Polynukleotid vynálezu může být integrován do nukleové kyseliny, která je již přítomna v buňkách pomocí homologní rekombinace. Je-li žádoucí, mohou být transformované buňky připraveny nárůstem *in vitro* a jedna nebo více výsledných buněk mohou být použity v předkládaném vynálezu. Buňky mohou být poskytnuty na vhodném místě pacienta pomocí známých chirurgických nebo mikrochirurgických technik (např. štěpy, mikroinjektování, atd.)

Vhodné buňky zahrnují antigen-prezentující buňky (APC), takové jako dendritické buňky, makrofágy, B buňky, monocyty a další buňky, které mohou být zkonstruovány tak, aby byly účinné APC. Takové buňky mohou být, ale nemusí, geneticky modifikovány pro zvýšení kapacity pro prezentování antigenu, aby se vylepšila

aktivace a udržení odezvy T buněk, a aby měly protinádorové účinky, např. proti rakovině děložního hrdla per se anebo, aby byly imunologicky kompatibilní s příjemcem (tj. odpovídající HLA haplotypu). APC mohou být obecně izolovány z jakékoliv celé řady biologických tekutin a orgánů, včetně nádoru a peritumorálních tkání a mohou být autologní, alogenní, syngenní nebo xenogenní buňky.

Určité přednostní formy předkládaného vynálezu používají dendritické buňky nebo jejich předky jako antigen-prezentující buňky, buď pro transformaci *in vitro* a navrácení pacientu nebo jako *in vivo* cíl nukleotidů přenesených ve vakcíně, například pomocí částice zprostředkovávající přenos DNA. Dendritické buňky jsou velmi účinné APC (Banchereau a Steinman, *Nature* 392:245-251, 1998) a byly ukázány, že jsou účinné jako fyziologické adjuvans pro vyvolání profylaktické nebo terapeutické protinádorové imunity (viz Timmerman a Levy, *Ann. Rev. Med.* 50:507-529, 1999). Obecně, mohou být dendritické buňky identifikovány na základě jejich typického tvaru (hvězdicový *in situ*, se zřetelnými cytoplasmatickými procesy (dendrity) viditelnými *in vitro*), jejich schopnosti přijmout, procesovat a prezentovat antigeny a jejich schopnosti aktivovat odezvy naivních T buněk. Dendritické buňky samozřejmě mohou být zkonstruovány tak, aby exprimovaly specifické buněčné povrchové receptory nebo ligandy, které nejsou běžně nalezeny na dendritických buňkách *in vivo* nebo *ex vivo*, například antigen(y), kódované v konstruktech vynálezu a takové modifikované dendritické buňky jsou zamýšleny v předkládaném vynálezu. Jako alternativní k dendritickým buňkám mohou být ve vakcíně použity sekretované vezikuly dendritických buněk, naplněné antigeny (nazývané exosomy) (viz Zitvogel a kol., *Nature Med.* 4:594-600, 1998).

Dendritické buňky a jejich přeci mohou být získány z periferní krve, kostní dřeně, nádorem infiltrovaných buněk, buněk infiltrujících do peritumorálních tkání, lymfatických uzlin, sleziny, kůže, pupečnickové krve nebo jakýchkoliv jiných vhodných tkání nebo tekutin. Dendritické buňky mohou být například diferencovány ex vivo přidáním kombinace cytokinů, takových jako GM-CSF, IL-4, IL-13 anebo TNF ke kulturám monocytů získaných z periferní krve. Alternativně, mohou být CD34 pozitivní buňky získané z periferní krve, pupečnickové krve nebo krevní dřeně diferencovány na dendritické buňky přidavkem směsí GM-CSF, IL-3, TNF, CD40 ligandu, lipopolysacharidu LPS, fit3 ligandu (cytokinu důležitého pro vytvoření profesionálních antigen prezentujících buněk, zejména dendritických buněk) anebo jiných sloučenin indukujících diferenciaci, maturaci a proliferaci dendritických buněk, ke kultivačnímu médiu.

APC mohou být obecně transfekovány polynukleotidem kódujícím antigenní aminokyselinovou sekvenci HPV, takovým jako kodonově-optimalizovaný polynukleotid, jak je předpokládáno v předkládaném vynálezu. Taková transfekce může být provedena ex vivo a směs nebo vakcína zahrnující takové transfekované buňky může být poté použita pro terapeutické účely, jak je zde popsáno. Alternativně, prostředek pro přenos genu, který cílí do dendritických nebo jiných antigen prezentujících buněk, může být podán pacientu, což vede k transfekci, která se odehrává *in vivo*. *In vivo* a *ex vivo* transfekce dendritických buněk, mohou být obecně provedeny například použitím jakýkoliv způsobů známých v oboru, jako těch, popsanych v WO 97/24447, nebo přístupem zprostředkovaným částicí, popsaným v Mahvi a kol., *Immunology and Cell Biology* 75:456-460, 1997.

Vakcíny a farmaceutické směsi mohou být předkládány v jednodávkových nebo v mnohodávkových nádobkách, jako

uzavřené ampule nebo lahvičky. Takové nádoby jsou výhodněji hermeticky uzavřeny pro zachování sterility složení, až do doby použití. Obecně, mohou být směsi skladovány jako suspenze, roztoky nebo emulze v olejových nebo vodných prostředcích. Alternativně, může být vakcína nebo farmaceutická směs skladována za lyofilizovaných podmínek, které vyžadují pouze přidavek sterilního tekutého nosiče těsně před použitím. Vakcíny zahrnující nukleotidové sekvence, jež jsou zamýšleny pro podávání pomocí částic zprostředkovávajících přenos, mohou být předkládány jako náplně, vhodné pro použití s přístrojem pro přenos se stlačeným plynem, kde náplně mohou být složeny z dutých trubiček, jejichž vnitřní povrch je potažen částicemi nesoucími nukleotidovou sekvenci vakcíny, dle volby za přítomnosti dalších farmaceuticky přijatelných přísad.

Farmaceutické směsi předkládaného vynálezu mohou obsahovat adjuvans, nebo jiné látky, které mohou sloužit pro modulování nebo zvýšení imunitní odezvy, indukované proteinem, který je kódován DNA. Tyto mohou být kódovány DNA, buď odděleně od nebo ve fúzi s antigenem, nebo mohou zahrnovat prvky, jež nejsou tvořeny DNA. Příklady substancí typu adjuvans, které mohou být zahrnuty ve směsích předkládaného vynálezu, zahrnují ubikvitin, membránový protein asociován s lysosomem (LAMP), antigen core viru hepatitidy B, fit3-ligand a další cytokiny, takové jako IFN- γ a GM-CSF.

Další vhodná adjuvans jsou komerčně dostupná, například Freundovo nekompletní adjuvans a kompletní adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI); Imiquimod (3M, St. Paul, MN); Resiquimod (3M, St. Paul, MN); Merck Adjuvans 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); soli hliníku takové, jako gel hydroxidu hlinitého (alum) nebo fosforečnan hlinitý; soli vápníku,

železa nebo zinku, nerozpustné suspenze acylovaného tyrosinu; acylované cukry; kationtově a aniontově derivatizované polysacharidy; polyfosfazeny; biodegradovatelné mikrosféry; monofosforylovaný lipid A a quil A. Jako adjuvans mohou být také použity cytokiny, jako GM-CSF nebo interleukin-2, -7, nebo -12.

Ve směsích vynálezu je přednostní, aby složení adjuvans indukovalo imunitní odezvu převážně Th1 typu. Adjuvans může tedy sloužit pro modulaci imunitní odpovědi vytvořené v odezvě na antigen kódovaný DNA z převážně Th2 na převážně Th1 typ odezvy. Vysoké hladiny cytokinů Th1 typu (např., IFN-, TNF, IL-2 a IL-12) mají tendenci upřednostňovat indukci buněk, zprostředkovávajících imunitní odezvu na podávaný antigen. V přednostní formě, ve které je odezva převážně Th1 typu, se bude hladina cytokinů Th1 typu zvyšovat na vyšší hodnotu než hladina cytokinů Th2 typu. Hladiny těchto cytokinů mohou být snadno stanoveny použitím standardních stanovení. Pro přehled o rodinách cytokinů, viz Mosmann a Coffman, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.

Podle toho, vhodná adjuvans pro použití pro vyvolání odezvy převážně Th1 typu zahrnují například kombinaci monofosforyllipidu A, výhodněji 3-de-O-acylovaného monofosforylovaného lipidu A (3D-MPL), spolu se solí hliníku. Další známá adjuvans, která přednostně indukují imunitní odezvu typu Th1, zahrnují oligonukleotidy obsahující CpG. Tyto oligonukleotidy jsou charakteristické tím, že CpG dinukleotid je nemetylovaný. Takové oligonukleotidy jsou dobře známy a jsou popsány například v WO96/02555. Také jsou popsány imunostimulační sekvence DNA, například v Sato a kol., *Science* 273:352, 1996. Oligonukleotidy obsahující CpG mohou být kódovány odděleně od antigen(ů) papilomaviru ve stejném nebo jiném polynukleotidovém konstrukt, nebo k němu mohou být připojeny, např. pomocí fúze. Alternativně, oligonukleotidy

obsahující CpG mohou být podávány odděleně, tj. ne jako součást směsi, která zahrnuje kódovaný antigen. CpG oligonukleotidy mohou být použity samotné nebo v kombinaci s jinými adjuvans. Zesílený systém například zahrnuje kombinaci oligonukleotidu obsahujícího CpG a saponinového derivátu, zejména kombinaci CpG a QS21, jak je ukázáno v WO 00/09159 a WO 00/62800. Výhodněji, tato směs dále zahrnuje emulzi oleje ve vodě anebo tokoferol.

Další přednostní adjuvans je saponin, výhodněji QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), který může být použit samotný nebo v kombinaci s jinými adjuvans. Zesílený systém zahrnuje například kombinaci monofosforyllipidu A a saponinového derivátu, takovou jako je kombinace QS21 a 3D-MPL, jak je popsáno v WO 94/00153, nebo směs méně vyvolávající reakci, kde QS21 je zastaven cholesterolem, jak je popsáno v WO 96/33739. Další přednostní formy zahrnují emulzi olej ve vodě a tokoferol. Zvláště účinné složení adjuvans, obsahující QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi olej ve vodě je popsáno v WO 95/17210.

Další přednostní adjuvans zahrnují Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, United States), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox (Ribi, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) a jiné aminoalkylglukosaminid 4-fosfáty (AGP).

Další přednostní adjuvans zahrnují molekuly adjuvans obecného vzorce (I)

Vzorec (I): $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$

kde n je 1-50, A je vazba nebo $-\text{C}(\text{O})-$, R je C1-50 alkyl nebo fenyl C1-50 alkyl.

Jedna forma předkládaného vynálezu sestává ze složení obsahujícího polyoxyethylenether obecného vzorce (I), kde n je mezi 1 a 50, výhodněji 4-24, nejvýhodněji 9; R složka je C_{1-50} , výhodněji $C_{4-C_{20}}$ alkyl a nejvýhodněji C_{12} alkyl, a A je vazba. Koncentrace polyoxyethylenetherů by měla být v rozmezí 0,1-20%, výhodněji od 0,1-10%, a nejvýhodněji v rozmezí od 0,1-1%. Přednostní polyoxyethylenethery jsou vybrány z následující skupiny: polyoxyethylen-9-laurylether, polyoxyethylen-9-steorylether, polyoxyethylen-8-steorylether, polyoxyethylen-4-laurylether, polyoxyethylen-35-laurylether a polyoxyethylene-23-laurylether. Polyoxyethylenethery, takové jako polyoxyethylenlaurylether, jsou popsány v Merck indexu (12 vydání: entry 7717). Tyto molekuly adjuvans jsou popsány v WO 99/52549. Polyoxyethylenether podle obecného vzorce (I) uvedeného výše může, je-li to žádoucí, být kombinován s dalším adjuvans. Přednostní směs adjuvans je například výhodněji s CpG, jak je popsáno v podané UK patentové žádosti GB 9820956.2.

Tam, kde vakcína zahrnuje adjuvans, může být vakcína podávána ve dvou částech. Například, část složení vakcíny, obsahující nukleotidový konstrukt, který kóduje antigen, může být podán jako např. subkutánní nebo intramuskulární injekcí nebo pomocí intradermálního částicí zprostředkovaného přenosu, poté později může být podána část složení obsahující adjuvans, a to buď ihned nebo po vhodné době, která bude zřejmá lékaři, jenž je obeznámen s vakcinací. Za těchto podmínek, může být adjuvans podáváno stejnou cestou jako antigenní směs nebo pozměněnou cestou. V další formě bude část adjuvans směsi podávána před antigenní částí. V jedné formě je adjuvans podáván jako lokální směs, aplikovaná na kůži v místě, kde částice zprostředkovává přenos nukleotidové sekvence, která

kóduje antigen(y), buď před nebo po jeho přenosu zprostředkovaného částicí.

Následující Příklady slouží pro další objasnění vynálezu, s odkazy k doprovodným obrázkům, na kterých:

- Obrázek 1 ukazuje prototyp aminokyselinových sekvencí divokého typu E1 HPV typů 11, 6a a 6b, odvozených z GenBank;
- Obrázek 2 ukazuje prototyp aminokyselinové sekvence divokého typu E1 HPV6b z Obr.1 (6b-e1), porovnanou s aminokyselinovou sekvencí E1 HPV6b, včetně bodových mutací odstraňujících biologickou aktivitu (6b-e1 mut);
- Obrázek 3 ukazuje aminokyselinové sekvence divokého typu E2 HPV typů 11, 6a a 6b, odvozených z genové banky;
- Obrázek 4a ukazuje prototyp aminokyselinové sekvence divokého typu E2 HPV11 z Obr.3 (Hpv-11e2-wt) porovnanou s aminokyselinovou sekvencí E2 HPV11, včetně bodové mutace odstraňující biologickou aktivitu (Hpv-11e2-mut) a s aminokyselinovou sekvencí kódovanou nukleotidovou sekvencí z Obr. 6 (Hpv-11e2-comut);
- Obrázek 4b ukazuje prototyp aminokyselinové sekvence divokého typu E2 HPV6b z Obr.3 (Hpv-6be2-wt), porovnanou s aminokyselinovou sekvencí E2 HPV6b, včetně bodové mutace odstraňující biologickou aktivitu (Hpv-6be2-mut);
- Obrázek 5 ukazuje nukleotidovou sekvence, která má profil využívání kodonů podobající se profilu silně exprimujícího lidského genu, kódující mutovanou aminokyselinovou sekvenci E1 HPV6b z Obr. 2;
- Obrázek 6 ukazuje nukleotidovou sekvence, která má profil využívání kodonů, podobající se profilu silně

- exprimujícího lidského genu, kódující mutovanou aminokyselinovou sekvenci E2 HPV11 z Obr. 4;
- Obrázek 7 ukazuje DNA vektor p7313-PLc;
- Obrázek 8 ukazuje vzorky buněčného lyzátu z Příkladu 4, rozdělené na akrylamidovém gelu a barvené tak, aby se ukázala vazba protilátky k exprimovanému E1 proteinu;
- Obrázek 9 ukazuje buněčné odezvy na antigen po imunizaci myši polynukleotidem podle vynálezu (Příklad 6);
- a
- Obrázek 10 ukazuje vzorky buněčného lyzátu z Příkladu 7, rozdělené na akrylamidovém gelu a barvené tak, aby se ukázala vazba protilátky k exprimovanému proteinu E2.

Příklad 1 - Optimalizace kodonů E1 HPV6b

Aminokyselinová sekvence prototypu divokého typu E1 HPV6b získaná z GenBank je předložena na Obr.1 (spodní sekvence). Tento obrázek ukazuje vysoký stupeň homologie pro tento protein mezi sekvencemi virových prototypů HPV typů 11, 6a a 6b. Podobně jsou na Obr. 3 ukázány prototypové aminokyselinové sekvence divokého kmene proteinu E2 HPV 11, 6a a 6b. Očekává se, že imunitní terapie (terapeutická vakcína) použitím sekvencí HPV6b bude křížově reagovat za poskytnutí profylaktické nebo terapeutické imunitní odezvy proti všem třem typům viru.

Využití kodonů sekvence E1 HPV6b bylo porovnáno s využitím vysoce exprimovaných lidských a E.coli genů a bylo zjištěno, že má nízký koeficient využití kodonů pro oba druhy. Jednoduché použití nejčastějšího kodonu pro každý aminokyselinový zbytek by také vedlo ke zkreslenému profilu využití kodonů, protože žádný organismus nevyužívá pouze svůj nejpřednostnější kodon pro danou aminokyselinu. Následně byly

kodony přiřazeny použitím statistického způsobu za vytvoření syntetického genu, který má frekvenci kodonů blíže té, která byla nalezena v silně exprimovaných E.coli a lidských genech.

Kodony v syntetickém genu byly přiřazeny použitím Vizualního základního programu (Visual Basic program) nazvaného Calcgen, který napsal R. S. Hale a G. Thompson (Protein Expression and Purification Sv. 12 str. 185-188 (1998)). Pro každý aminokyselinový zbytek v původní sekvenci byl přiřazen kodon na základě pravděpodobnosti jeho výskytu v silně exprimovaných E.coli genech. Podrobnosti o tomto programu, který pracuje pod Microsoft Windows 3.1, mohou být získány od autorů. Protože program pro přiřazení kodonů v syntetickém genu aplikuje statistický způsob, ne všechny výsledné kodony jsou nejfrekventovanější využívané v cílovém organismu. Spíše je podíl často a méně často využívaných kodonů cílového organismu zobrazen v syntetické sekvenci přiřazením kodonů ve správném poměru. Jelikož zde však neexistuje žádné přísné pravidlo pro přiřazení konkrétního kodonu na konkrétní místo v sekvenci, je pokaždé, když je spuštěn tento program, vytvořen jiný syntetický gen - ačkoliv každý bude mít stejný profil využití kodonů a každý bude kódovat stejnou aminokyselinovou sekvenci. Je-li tento program spuštěn několikrát pro danou aminokyselinovou sekvenci a daný cílový organismus bude vytvořeno několik odlišných nukleotidových sekvencí, které se mohou lišit v počtu, typu a poloze restrikčních míst, signálů pro sestřih intronu atd., z nichž některé mohou být nežádoucí. Ten, kdo je orientovaný v oboru bude na základě těchto vlastností, schopen vybrat vhodnou sekvenci pro použití pro expresi polypeptidu.

Kromě toho, jelikož jsou kodony přiřazeny náhodně na základě statistiky, je možné (ačkoli nepravděpodobné), že dva nebo více kodonů, které jsou relativně zřídka využívány v cílovém

organismu, mohou být seskupeny v těsné blízkosti. Má se za to, že taková seskupení mohou narušit translační aparát a mít za následek zejména nízké rychlosti exprese, takže algoritmus pro výběr kodonů v optimalizovaném genu vylučuje jakékoliv kodony s RSCU hodnotou, nižší než 0,2 pro silně exprimované geny, aby se zabránilo náhodnému vybrání jakémukoliv seskupení zřídka využívaných kodonů. Rozdělení zbylých kodonů bylo poté přiděleno podle frekvencí u silně exprimovaných genů *E.coli*, za vytvoření celkového rozdělení v syntetickém genu, které se podobá rozdělení genů v *E.coli* (koeficient = 0,85) a také rozdělení silně exprimovaných lidských genů (koeficient = 0,50). Podobný postup byl použit pro získání nukleotidové sekvence s optimalizovanými kodony pro E2 HPV11, kromě toho, že byl použit Syngen (Peter Ertl, nepublikováno), novější verze programu Calcgen, dovolující volitelné vyloučení zřídka využívaných kodonů, pro přiřazení kodonů podle profilu frekvence kodonů silně exprimovaných lidských genů. Na rozdíl od přiřazení kodonu pro E1, zřídka využívané kodony nebyly vyloučeny. Současně byla také provedena změna v jednom z oligonukleotidů, taková, aby kódoval aminokyselinovou změnu K111A, jak je popsáno níže.

Mutace byly vloženy do E1 a E2 genů s optimalizovanými kodony, za vzniku bodových mutací v aminokyselinových sekvencích E1 (K83G, R84G a G483D) a E2 (K111A). Aminokyselinové sekvence mutovaných genů jsou ukázány (porovnány s prototypem sekvence divokého typu) na Obr. 2 (HPV6bE1) a 4 (HPV6bE2 a HPV11E2). Nukleotidová sekvence s optimalizovanými kodony a mutovaná nukleotidová sekvence pro E1 HPV6b je ukázána na Obr. 5. Nukleotidová sekvence s optimalizovanými kodony a mutovaná nukleotidová sekvence pro E2 HPV11 je ukázána na Obr. 6. Obr. 4 také ukazuje aminokyselinovou sekvenci polypeptidu, získaného expresí genu s optimalizovanými kodony a mutovaného genu E2 HPV11, v porovnání s prototypem sekvence divokého typu

a mutovaných sekvencí divokého typu, aby bylo zřejmé, že nukleotidová sekvence s optimalizovanými kodony nemění kódovanou aminokyselinovou sekvenci (která je identická s mutovanou sekvencí divokého typu).

Příklad 2 - Příprava polynukleotidové sekvence E1 HPV6b s optimalizovanými kodony

Návrh genu:

Použitím softwaru pro optimalizaci, diskutovaného výše, byly z optimalizovaných sekvencí vypočteny 40merní překrývající se oligonukleotidy. Terminální oligonukleotidy, obsahující restriční místa, byly 60méry. Oligonukleotidy byly objednány od Life Technologies Ltd v 50 nmol koncentraci, nechráněné a nefosforylované.

Příprava oligonukleotidu:

Každý oligonukleotid byl rozpuštěn v dvakrát destilované vodě na finální koncentraci 100 mikromolární (μM) a byla připravena ekvimolární směs všech 96 oligonukleotidů o 100 μM koncentraci. Syntéza byla připravena následovně použitím Pwo polymerasy od Roche Boehringer (Kat č. 1 644 955).

Dvakrát destilovaná voda	86 μl
Pwo 10X pufr	10 μl
Směs dNTP	1 μl (ekvimolární směs 100mM dNTP)
směs oligonukleotidů	1 μl (ekvimolární směs 100 μM oligo)
Pwo polymerasa	2 μl

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla provedena s výše uvedenou reakční směsí v Trio Thermoblock (Biometra), použitím následujících podmínek:

1. 40°C 2 minuty

2. 72°C 10 sekund
3. 94°C 15 sekund
4. 40°C 30 sekund
5. 72°C 20 sekund + 2 sekundy na cyklus
6. 4°C ∞

Cyklus se opakoval 25 krát mezi kroky 3 a 5.

Po dokončení 25 cyklů byl z každé nádoby odebrán 10μl alikvot a byl analyzován na 0,8% Tris acetátovém (TAE) agarosovém gelu a vyhodnocen pod UV světlem při dlouhé vlnové délce. Očekávaná velikost syntetizované E1 DNA by měla být přibližně 2kb.

Získání genu:

Syntetický gen byl získán PCR použitím polymerasy použitím dvou terminálních oligonukleotidů, které obsahovaly restriční místo pro Not 1 na N-konci syntetického oligonukleotidu a Bam HI místo na C-konci syntetického oligonukleotidu.

Dvakrát destilovaná voda	65μl
Pwo 10X pufr	10μl
Směs dNTP	1μl (ekvimolární směs 100mM dNTP)
Sestavená směs	20μl (z předchozího PCR)
N-koncový oligonukleotid	1μl (100μM)
C-koncový oligonukleotid	1μl (100μM)
Pwo polymerasa	2μl.

1. 94°C 45 sekund
2. 72°C 2 minuty + 1 minuta na 500bp
3. 72°C 10 minut
4. 4°C co

Cyklus se opakuje 25krát mezi kroky 2 a 1.

PCR produkt byl poté purifikován použitím QIAquick PCR purifikačního kitu (Qiagen kat. č. 28104), a DNA byla resuspendována v celkovém objemu 50 µl elučního pufru použitého kitu. 10 µl alikvot byl štěpen restričními enzymy Not 1 a BamH1 (od Life Technologies Ltd, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley, Scotland) 2 hodiny při 37°C. Toto štěpení bylo purifikováno na 0.8% TAE agarosovém gelu a 2kb DNA produkt byl vyřezán a extrahován použitím QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen kat.č.28704). Finální naštěpený čistý DNA fragment byl eluován celkovým objemem 50µl elučního pufru použitého kitu.

Tento PCR fragment byl klonován do vektoru p7313PLc (Obr. 7), (Powderject Vaccines Inc., viz další podrobnosti níže) a transformován do kompetentních buněk JM109 (Promega kat.č.: P9751). DNA plasmid z vybraných klonů byl zkontrolován štěpením restričními enzymy Nco1-BamH1 a Nco1-EcoR1. Bylo vybráno pět správných klonů s 2kb fragmentem inzertu a inzert DNA byl sekvenován. Pro další použití byl vybrán jeden klon s inzertem obsahujícím tři bodové mutace. Tři bodové mutace byly opraveny výměnnou ligací s homologními malými fragmenty z jiných klonů.

Opravené klony byly znovu zkontrolovány štěpením restričním enzymem a DNA inzert byl celý sekvenován. Tento klon byl označen p6bE1c/o. Současně, pro porovnání exprese a pro imunizační studie byly PCR amplifikovány E1 gen HPV-6b divokého typu a E1 gen HPV-11 divokého typu, použitím genomových klonů HPV-6b, (EMBO J. 2 (12) 2314-2318 1983) a HPV-11 (Virology 151, 124-130 1986), a příslušné fragmenty byly klonovány do vektoru p7313PLc štěpeného Not 1 -BamH1. První z těchto klonů byl označen jako p6bE1w/t a druhý p11E1w/t.

E1 geny v klonech p6bE1c/o a p6bE1w/t byly dále mutovány tak, aby vytvořily aminokyselinové záměny K83G, R84G a G438D. V PCR reakcích byly spolu s dalšími reagensiemi popsány v QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kitu (Stratagene kat.č. 200518) použity 3' a 5' oligonukleotidové primery odpovídajících sekvencí s nukleotidovými substitucemi navrženými pro zavedení žádaných mutací. Mutovaný klon p6bE1c/o byl označen p6bE1c/o mut a mutovaný klon p6bE1w/t byl označen p6bE1w/t mut.

Příklad 3 - Příprava polynukleotidové sekvence E2 HPV11 s optimalizovanými kodony

Návrh, příprava a získání genu E2 s optimalizovanými kodony byly popsány výše pro E1, ale překrývající se oligonukleotidy byly 60 nukleotidů dlouhé místo 40, s 18 nt překryvem. Na rozdíl od postupu E1 byl vytvořen klon obsahující aminokyselinovou mutaci K111A současně s klonem genu E2 s optimalizovanými kodony, nahrazením dvou vhodných oligonukleotidů o sekvenci divokého typu dvěma 60 merními oligonukleotidy, které společně obsahují nukleotidovou substituci nutnou pro vytvoření změny K111A.

Složení plasmidu p7313-PLc

Plasmid byl vytvořen nahrazením genu beta-laktamasy, obsahujícího Eam11051 - Pst1 fragment pUC19 (dostupný od Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, HP7 9NA) EcoRI fragmentem pUC4K (Amersham-Pharmacia), obsahujícím gen pro rezistenci ke kanamycinu, následovaném použitím T4 DNA polymerasy pro vytvoření tupých konců na obou fragmentech. Lidský cytomegalovirový IE1 promotor/enhancer, Intron A, byl odvozen z plasmidu JW4303, získaného od Dr. Harriet Robinson, University of Massachusetts, a vložen do Sal1 místa v pUC19 jako XhoI -SalI fragment, inkorporujícího polyadenylační signál hovězího

růstového hormonu. Delece 5' SalI-BanI fragmentu z promotoru vytvořila minimální promotor použitý ve vektoru (W000/23592 - Powderject Vaccines Inc.). 3'UTR povrchového antigenu HBV byl odvozen z Hepatitis B viru, serotyp adw, ve vektoru pAM6 (Moriarty a kol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78, 2606-2610, 1981). pAM6 (vektor založený na pBR322) byl získán od American Type Culture Collection, katalogové číslo ATCC 45020. 3'UTR byl vložen na 5' konec polyadenylačního signálu jako 1,4kb BamHI fragment, pro vložení byl zatupen, aby se odstranila BamHI místa. V řadě kroků (včetně štěpení Bgl II, úpravy Klenowovou polymerasou, štěpení BstX I, štěpení Nco I, úpravy Mung bean nukleasou pro odstranění přečnávajícího konce a dalšího štěpení BstX I) byly vytvořeny modifikace v oblasti mezi 3'netranslatované enhancerové oblasti HBV S genu a bGHpA signálu pro odstranění všech otevřených čtecích rámců, větších než 5 kodonů mezi promotorem X genu a bGHpA signálem. Toto má za výsledek delecí sekvence kódující translatovatelnou část proteinu X (9 aminokyselin) a iniciačního kodonu genu X. Byla však ponechána oblast slabého enhanceru/promotoru, protože bylo zjištěno, že tato oblast zvyšuje expresi HBsAg z CMV promotoru. Polyadenylační signál hovězího růstového hormonu byl nahrazen polyadenylačním signálem králičího beta globinu. 5'nekódující a kódující sekvence S antigenu byly odstraněny a nahrazeny oligonukleotidovým linkerem za poskytnutí vícenásobných klonovacích míst, jak je ukázáno, za vytvoření plasmidu p7313-PL.

```

Hind --NotI--      -EcoRV      -NdeI-      -BamHI-
AGCTTGC GGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC ....
.....ACGCCGGCGATCGCTATAGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG
              -NheI-      -KpnI-      -SalI-      ΔNotI

```

Sekvence ColE1 cer byla získána ze subklonu z plasmidu pDAH212 od David Hodgeson (Warwick University) a amplifikovaná pomocí PCR použitím primerů pro vytvoření restrikčních míst EcoRI na koncích sekvence. Sekvence cer byla poté vložena do EcoRI místa p7313-PL za vytvoření plasmidu p7313-PLc (Obr.7). Sekvence amplifikovaného ceru byla ověřena s genovou bankou entry M11411.

Příklad 4 - Exprese E1 v savčích 293T buňkách

Savčí 293T buňky rostly do logaritmické fáze do finální koncentrace 2×10^5 buněk na 6 jamkové misce Corning Costar™ (Corning Science Products, 10 The ValleyCentre, Gordon Road, High Wycombe, Bucks, UK) pro tkáňové kultury přes noc při 37°C v 5%CO₂. Byla připravena následující transfekční směs a pro vytvoření byla ponechána 25 minut:

2µg plasmidové DNA (vektor, p6bE1c/o, p6bE1w/t) v 16µl sterilní dvakrát destilované vodě

plus:

OPTI-mem™ (Gibco BRL, Paisley, Scotland)	8µl
Lipofectamine™ (GibcoBRL)	6µl.

Každá buněčná monovrstva byla pečlivě promyta dvakrát OPTI-mem™. Ke každé jamce bylo přidáno 800µl OPTI-mem™. Ke každé transfekční směsi bylo přidáno 200 µl OPTI-mem™, směs byla promíchána a opatrně přidána k buněčné monovrstvě. Miska byla inkubována 5 hodin při 37°C v 5% CO₂ a po této inkubaci byly transfekční směs a OPTI-mem™ odstraněny. Buněčné monovrstvy byly dvakrát opatrně promyty buněčným růstovým médiem a nakonec byly transfekované buňky inkubovány 24 hodin v Dulbecco Modified Eagle Mediu, obsahujícím 10% fetální telecí sérum a 29,2mg/ml L-glutaminu, při 37°C v 5% CO₂. Buňky byly seškrábnuty do mikrozkuvek, dvakrát promyty PBS, odstředěny a buněčná peleta byla resuspendována v Laemmliho barvičce pro

SDS Page. Buněčné pelety byly povařeny a nanесeny na 10% SDS Page gel a elektroforéza probíhala v 1X Tris Glycinovém SDS pufру. Po elektroforéze byl gel přenesen na nitrocelulosovou membránu (Amersham) a byl proveden Western blot. Nitrocelulosová membrána byla blokována 5% Marvel™ (Premier Beverages, Knighton, Adbaston, Stafford, UK) v PBS po 30 min při laboratorní teplotě a dvakrát promyta PBS a 0,1% Tweenem 20. K nitrocelulosové membráně byla přidána polyklonální protilátka, připravená proti C terminální sekvenсe proteinu E1 HPV6b (proteinová sekvenсe: CSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFR) v králíčích, která byla naředěna v 5% Marvel™ v PBS. Membrána byla inkubována při laboratorní teplotě 1 hodinu za mírného třepání. Zředěná protilátka byla odstraněna a membrána byla třikrát promyta PBS a 0,1% Tweenem 20. Sekundární konjugát, prasečí proti králíčí s křenovou peroxidasou (HRP) (DAKO), byl naředěn 1:20000 v PBS a 0,1% Tweenu 20. Toto bylo přidáno k promyté membráně a inkubace byla prováděna 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného třepání. Poté byla membrána pečlivě promyta PBS a 0,1% Tweenem 20. Pro detekci přenesených proteinů na membráně byl použit chemiluminiscenční HRP kit (Amersham).

Výsledky:

Předpovídaná velikost pro translatovaný E1 protein je 68kDa - 72kDa. Výsledky (Obr. 8) ukazují správnou velikost proteinu, exprimovaného pomocí p7313-PLc, obsahujícího HPV6bE1 s optimalizovanými kodony (dráha 4). Vektor obsahující E1 divokého typu je v dráze 3, která ukazuje, že zde nebyla žádná detekovatelná exprese E1 v lidských buňkách z nukleotidové sekvenсe divokého typu. Podobně nebyl E1 detekován v dráze 2 (prázdný vektor) a dráze 1 (netransfekované buňky). Přibližně 60kDa zóna v drahách 1-4 je neindentifikovaný buněčný protein, který křížově reaguje s protilátkou proti E1. Tato zóna je ve

všech drahách v téměř konstantní intenzitě, což ukazuje, že nanáška vzorků byla stejná.

Příklad 5 - Příprava rekombinantního vakcinia viru, exprimujícího HPV E1 a HPV E2 proteiny.

Vakcinia virus exprimující HPV-6b E1 protein byl vytvořen v Glaxo Wellcome, Stevenage, UK. Vakcinia viry exprimující HPV-11 E1 a HPV-11 E2 byly darovány Jeffem Englerem, University of Alabama at Birmingham, US.

Krátce, E1 gen z p6bE1w/t byl klonován do vektoru pTM3 vakcinia viru, který byl poté zkontrolován restrikcí enzymem a po sekvenování DNA byl rekombinantní vektor použit pro transfekci HTK⁻ buněk. Rekombinantní vakcinia virus byl izolován a purifikován pomocí plaků. Exprese E1 byla kontrolována pomocí Western blotu použitím peptidového antiséra po infekci permissivních buněk pomocí obou, jak rekombinantního viru exprimujícího HPV-6b E1, tak i vakcinia viru (vTF7-3) exprimujícího RNA polymerasu bakteriofága T7. Pro přímou expresi E1 a E2 proteinu z HPV-11 E1 a E2 rekombinantních vakcinia virů je také nezbytná koinfekce buněk s vakcinia virem vFT7-3. Jako negativní kontrola byl v pokusech použit vakcinia virus kmene WR. Vektor pTM3 a virus vTF7-3 byly z National Institute of Health, Maryland, US.

Příklad 6 - Imunologie - detekce buněčných odezev na HPV antigeny

Všechna činidla byla získána od Gibco BRL, Paisley, Scotland nebo Sigma, Poole, Dorset, pokud není uvedeno jinak.

A. Imunizační protokol.

Samičky myši C57BL/6 byly imunizovány 1,0-2,0 µg DNA (buď p6bE1c/o, p6bE1w/t, p6bE1c/o mut, p6bE1w/t mut nebo prázdným

plasmidem p7313PLc) pomocí PMDD a boosted stejnou dávkou o 14 dní později. Zvířata byla usmrcena narušením děložního hrdla a odstraněním sleziny pro zjištění buněčných odezev na HPV antigeny.

B. Příprava buněčné suspenze splenocytů.

Sleziny byly "rozmačkány" mezi podložními sklíčky (BDH), červené krvinky byly lyzovány (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA) a buňky byly resuspendovány v kompletním RPMI. (RPMI-1640 medium doplněno o 10% fetální telecí sérum (FCS), 2mM glutamin, 100 jednotek/ml penicilin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin a 5×10^{-5} M 2-merkaptotoethanol).

C. Infekce MC57 cílových buněk.

Imunodominantní epitopy odvozené z HPV antigenu nebyly definovány a proto detekce antigen specifických odezev *in vitro* závisela na přirozeném štěpení celého antigenu, dosaženého v cílových buňkách, které byly transfekovány cDNA kódující celý protein(y). MC57 buňky (K^b pozitivní) byly infikovány rekombinantním vakcinia virem exprimujícím HPV-6b E1, HPV-11 E2 nebo HPV-11 E1 použitím četnosti infekce 5 po 1 hodinu při 37°C . Přbytek viru byl odmyt a buňky byly resuspendovány v kompletním RPMI obsahujícím 50ng/ml rekombinantního lidského IL-2 (Glaxo Wellcome, Geneva).

D. ELISPOT.

ELISPOT misky (96 jamkové, Millipore MAIP S 45 1 0) byly potaženy krysí proti myši IFN gama (Pharmingen 18181D) 15 $\mu\text{g/ml}$ v PBS přes noc (4°C) před přidáním 4×10^{-5} splenocytů, získaných od experimentálních skupin. Antigen byl prezentován přidavkem 1×10^{-4} MC57 buněk infikovaných rekombinantním vakcinia virem. Jako negativní kontrola byl použit vakcinia

virus divokého typu kmen WR. Stanovení bylo inkubováno přes noc při 37°C (5% CO₂).

Druhý den stanovení byly detekovány buňky tvořící skvrny použitím biotinylované krysy proti myši IFN gama (Pharmingen 18112D) 1µg/ml následovaným přídatkem konjugátu streptavidinu s alkalickou fosfátasou (TCS Biologicals SA 1008) v ředění 1/1000 v PBS. Tato reakce byla vizualizována pomocí soupravy substrátu pro alkalickou fosfátasu (Biorad 170-6432) a kvantifikována pomocí analýzy obrazu. Výsledky jsou ukázány na Obr. 9.

Jak je zřejmé z Obr. 9, byla silná buněčná odezva pozorována u všech tří myší, vakcinovaných plasmidem kódujícím sekvenci E1 HPV-6b s optimalizovanými kodony, když byly vystaveny E1, obsaženému ve vakcinia vektoru (vacc.E1(11) nebo vacc.E1(6b)). Žádná odezva nebyla pozorována, když byly tyto myši vystaveny vakcinia viru divokého typu (vacc.WT), nebo s vakcinia virem exprimujícím E2 HPV-11 (vacc.E2(11)). Naproti tomu, vakcinace myší plasmidem, kódujícím sekvenci E1 divokého typu nevedla k odezvě T-buněk. Splenocyty z těchto myší nereagují na vystavení vakcinia virem, nesoucím gen E1, ani na jakékoliv další jiné vystavení (data nejsou ukázána). Mutace genu E1 buněčnou odezvu v myších nezmění. Jelikož se u myší imunizovaných p6bE1 c/o a p6bE1c/o mut také zvýšily silné buněčné imunitní odezvy proti cílovým buňkám infikovaným vakcinia virem exprimujícím protein E1 z HPV-11, můžeme předpokládat, že zde existuje vysoký stupeň imunologické křížové reaktivity mezi HPV-6b E1 a HPV-11 E1. Myši vakcinované prázdným vektorem p7313-PLc nevykázaly žádnou odezvu na jakékoliv vystavení.

Příklad 7 - Exprese E2 HPV 6b v savčích 293T buňkách

293T buňky v jedné vrstvě (80% konfluentní) ve 24 jamkových miskách byly transfekovány 1µg každého z plasmidu (p6bw/t, p6bc/o, p6bw/t mut, p6bc/o mut) použitím 2,5µl Lipofectaminu 2000 (Life Technologies) na transfekci, prováděnou podle standardního protokolu (viz Příklad 4, výše). 24hodin po transfekci byly buňky sklizeny, promyty fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem a analyzovány SDS-PAGE a Western blotem použitím antiséra proti peptidu E2 (#1100), připraveného proti N terminální aminokyselinové sekvenci MEAIAKRLDACQEQLLELYEEC HPV-6b (Obr. 10).

Výsledky

Výsledky ukazují hlavní proteinovou zónu s očekávanou velikostí (40kDa - 45 kDa) v dráze 3 (E2 s optimalizovanými kodony) a dráze 5 (E2 mutovaná a s optimalizovanými kodony). Slabá zóna stejné velikosti je také v dráze 4, což naznačuje velmi slabou hladinu exprese z plasmidu kódujícího mutovaný E2 divokého typu, ale není v dráze 1 (negativní kontrola) nebo v dráze 2 (protein E2 divokého typu). Ve všech drahách je patrný křížově reagující protein o ~25kDa, což ukazuje rovnoměrné nanesení vzorků proteinových lyzátů. Mutace E2 zjevně neovlivnila expresi proteinu E2, která byla značně zlepšena optimalizací kodonů.

Patentové nároky

1. Polynukleotidová sekvence kódující aminokyselinovou sekvenci časného antigenu HPV nebo jeho fragmentu lidského papilomaviru, mající koeficient využití kodonů vyšší než 0,3 ale nižší než 1,0 pro lidský gen a schopné vyvolat imunitní odezvu k řečenému časnému antigenu in vivo.
2. Polynukleotidová sekvence podle jakéhokoliv z nároku 1, kde sekvence je DNA.
3. Polynukleotidová sekvence podle nároku 1 nebo 2, která kóduje polypeptid HPV typu nebo subtypu HPV, spojeného s rakovinou děložního hrdla, benigními kožními bradavicemi nebo bradavicemi na pohlavních orgánech.
4. Polynukleotidová sekvence podle nároku 3, která kóduje polypeptid HPV jednoho z typů 1-4, 6, 7, 10, 11, 16, 18, 26-29, 31, 33, 35, 39, 49, 51, 52, 56, 58, 59, a 68.
5. Polynukleotidová sekvence podle nároku 4, která kóduje polypeptid HPV typu nebo subtypu HPV, spojeného s rakovinou děložního hrdla nebo bradavicemi na pohlavních orgánech.
6. Polynukleotidová sekvence podle nároku 5, která kóduje polypeptid HPV jednoho z typů 6, 11, 16, 18, 33 nebo 45, nebo fúzi dvou nebo více typů virů HPV 6, 11, 16, 18, 33 nebo 45.

7. Polynukleotidová sekvence podle nároku 5, která kóduje polypeptid HPV typu nebo subtypu HPV vybraného z HPV 11, 6a nebo 6b.
8. Polynukleotidová sekvence podle jakéhokoli z předcházejícího nároku, která kóduje mutovaný polypeptid HPV mající sníženou biologickou funkci.
9. Polynukleotidová sekvence podle nároku 7, která kóduje mutovaný polypeptid HPV, obsahující jednu nebo několik bodových mutací, pomocí nichž je jedna nebo více přirozených biologických funkcí polypeptidu inaktivována.
10. Polynukleotidová sekvence podle jakéhokoli z předcházejícího nároku, ve kterých kódovaný polypeptid HPV obsahuje celý produkt nebo část produktu časného genu HPV.
11. Polynukleotidová sekvence podle nároku 9, ve které kódovaný polypeptid HPV obsahuje celý nebo část E1 nebo E2, nebo fúzi celého nebo části E1 nebo E2 s jiným polypeptidem HPV.
12. Polynukleotidová sekvence podle jakéhokoli z předcházejícího nároku, mající koeficient použití kodonů pro lidské geny vyšší než 0,4, ale menší než 1.
13. Polynukleotidová sekvence podle nároku 15, mající koeficient použití kodonů pro lidské geny vyšší než 0,5 ale menší než 1.

14. Polynukleotidová sekvence podle jakéhokoliv z předcházejícího nároku, mající koeficient použití kodonů pro geny E.coli vyšší než 0,6.
15. Polynukleotidová sekvence ukázaná na Obr. 5 nebo její fragment nebo její analog, který zachovává její profil využití kodonů.
16. Polynukleotidová sekvence ukázaná na Obr. 6 nebo její fragment nebo její analog, který zachovává její profil využití kodonů.
17. Expresní vektor obsahující polynukleotidovou sekvenci podle jakéhokoliv z předcházejícího nároku, funkčně spojeného s kontrolní sekvencí, která je schopna poskytnout expresi polynukleotidové sekvence hostitelskými buňkami.
18. Expresní vektor podle nároku 17, který je schopen řídit expresi polynukleotidové sekvence v bakteriálních, hmyzích nebo savčích buňkách.
19. Expresní vektor podle nároku 17 nebo nároku 18, který je p7313PLc.
20. Hostitelské buňky obsahující polynukleotidovou sekvenci podle jakéhokoliv z nároků 1-16.
21. Hostitelské buňky obsahující expresní vektor podle jakéhokoliv z nároků 17-19.
22. Hostitelské buňky, podle nároku 20 nebo nároku 21, které jsou bakteriální, savčí nebo hmyzí buňky.

23. Farmaceutická směs obsahující polynukleotidovou sekvenci podle jakéhokoliv z nároků 1-16.
24. Farmaceutická směs obsahující vektor podle jakéhokoliv z nároků 17-19.
25. Farmaceutická směs podle nároku 23 nebo nároku 24, obsahující rozmanitost částic, výhodněji zlaté částice, potažené DNA.
26. Farmaceutická směs podle nároku 24, obsahující farmaceuticky přijatelnou excipientní látku a DNA vektor.
27. Farmaceutická směs podle jakéhokoliv z nároků 23-26, dále obsahující adjuvans.
28. Farmaceutická směs podle nároku 27, ve které je adjuvans kódováno ve fúzi s polypeptidem HPV, kódovaným polynukleotidem.
29. Použití polynukleotidu podle jakéhokoliv z nároků 1-16 při léčbě nebo prevenci infekce HPV.
30. Použití vektoru podle jakéhokoliv z nároků 17-19 při léčbě nebo prevenci infekce HPV.
31. Použití složení vakcíny podle jakéhokoliv z nároků 23-28 při léčbě nebo prevenci infekce HPV.
32. Použití podle jakéhokoliv z nároků 29-31, ve kterých je infekce HPV infekcí HPV typů 6, 11, 16 nebo 18.

33. Použití polynukleotidu podle jakéhokoliv z nároků 1-16, vektoru podle jakéhokoliv z nároků 17-19 nebo farmaceutické směsi podle jakéhokoliv z nároků 24-28 při léčbě nebo prevenci kožních bradavic, bradavic na pohlavních orgánech, atypických plochých buněk nedefinovaného významu (ASCUS), dysplasií děložního hrdla, intraepiteliální neoplasie děložního hrdla (CIN) nebo rakoviny děložního hrdla.
34. Způsob léčby nebo prevence infekcí HPV nebo jakýchkoliv symptomů nebo onemocnění s nimi spojených, zahrnující podávání účinného množství polynukleotidu podle jakéhokoliv z nároků 1-16, vektoru podle jakéhokoliv z nároků 17-19 nebo farmaceutické směsi podle jakéhokoliv z nároků 23-28.
35. Způsob léčby nebo prevence infekcí HPV nebo symptomů nebo onemocnění s nimi spojených, zahrnující podávání farmaceutické směsi podle jakéhokoliv z nároků 23-27 v dávkovacím režimu s první spouštěcí dávkou rekombinantním virovým vektorem nebo s nevirově-založeným systémem, obsahujícím polynukleotid podle jakéhokoliv z nároků 1-16.

1/12

PV2003-180

29044

Obr. 1

	1	60
Hpv11-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFMEIVAIVHTTGTQISEDEEEVEEDSGYDMVDFIDDRHITQNS	
Hpv6a-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFMEIVAIVQHPTGTQISDDEDEEVEEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
6b-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFMEIVAIVQHPTGTQISDDEDEEVEEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
	61	120
Hpv11-e1	VEAQALFNRQEADAHYATVQDLKRKYLGSPIVSPISNVANAVESEISPRLDAIKLTTQPK	
Hpv6a-e1	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLKRKYLGSPIVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
6b-e1	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLKRKYLGSPIVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
	121	180
Hpv11-e1	KVKRRLFETRELTDSGYGYSEVEA..ATQVEKHGDPENGGDGQERDTGRDIEGEGVEHRE	
Hpv6a-e1	KVKRRLFQTRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDGQEKDTGRDIEG..EEHTE	
6b-e1	KVKRRLFQTRELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDGQEKDTGRDIEG..EEHTE	
	181	240
Hpv11-e1	AEAVDDSTREHADTSGILELLKCKDIRSTLHGKFKDCFGLSFVDLIRPFKSDRTTCADWV	
Hpv6a-e1	AEAPTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTTCADWV	
6b-e1	AEAPTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTCLDWV	
	241	300
Hpv11-e1	VAGFGIHHSIADAFQKLIIEPLSLYAHIQWLTNAGMVLLVLRFKVKNKSRTCARTVARTLGTL	
Hpv6a-e1	VAGFGIHHSISEAFQKLIIEPLSLYAHIQWLTNAGMVLLVLRFKVKNKSRTCARTVARTLATL	
6b-e1	VAGFGIHHSISEAFQKLIIEPLSLYAHIQWLTNAGMVLLVLRFKVKNKSRTCARTVARTLATL	
	301	360
Hpv11-e1	LNIPENHMLIEPPKIQSGVRALYWFRTGISNASTVIGEAPWITRQTVIEHSLADSQFKL	
Hpv6a-e1	LNIPDNQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPWITRQTVIEHGLADSQFKL	
6b-e1	LNIPENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAPWITRQTVIEHGLADSQFKL	
	361	420
Hpv11-e1	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNLSNMQAKYVKDCAIMCRHYKHAEM	
Hpv6a-e1	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNLSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
6b-e1	TEMVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNLSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEM	
	421	480
Hpv11-e1	KKMSIKQWIKYRGTKVDSVGNWKPQVFLRHQNIIEFIPFLSKLKLWLHGTPKKNCIAIVG	
Hpv6a-e1	RKMSIKQWIKHRGSKIIEGTGNWKPQVFLRHQNIIEFIPFLSKFKLWLHGTPKKNCIAIVG	
6b-e1	RKMSIKQWIKHRGSKIIEGTGNWKPQVFLRHQNIIEFIPFLTKFKLWLHGTPKKNCIAIVG	
	481	540
Hpv11-e1	PPDTGKSCFCMSLIKFLGGTVISYVNSCSHFWLQPLTDAKVALLDATQPCWYMDTYMR	
Hpv6a-e1	PPDTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDATQPCWIYMDTYMR	
6b-e1	PPDTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDATQPCWIYMDTYMR	
	541	600
Hpv11-e1	NLLDGNPMSIDRKHRALTLIKCPPLLVTSNIDISKEEKYKYLHRSRVTTFTFPNPFPPDRN	
Hpv6a-e1	NLLDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTSNIDITKEEKYKYLHTRVTTFTFPNPFPPDRN	
6b-e1	NLLDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVTSNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNPFPPDRN	
	601	651
Hpv11-e1	GNAVYELSDANWKCFFERLSSSLDIEDSEDEEDGSNSQAFRCVPGSVVRTL	
Hpv6a-e1	GNAVYELSNANWKCFFERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFRCVPGTVVRTL	
6b-e1	GNAVYELSNANWKCFFERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFRCVPGTVVRTL	

2/12

Obr. 2

	1	60
6b-e1	MADDSGTENEGSGCTGWFMV EAI VQHPTGTQISDDEDEEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
6b-e1 mut	MADDSGTENEGSGCTGWFMV EAI VQHPTGTQISDDEDEEVEDSGYDMVDFIDDSNITHNS	
	61	120
6b-e1	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLKRKYL GSPYVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
6b-e1 mut	LEAQALFNRQEADTHYATVQDLGGKYL GSPYVSPINTIAEAVESEISPRLDAIKLTRQPK	
	121	180
6b-e1	KVKRRLFQTR ELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDGQEKDTGRDIEGEEHTEAE	
6b-e1 mut	KVKRRLFQTR ELTDSGYGYSEVEAGTGTQVEKHGVPENGGDGQEKDTGRDIEGEEHTEAE	
	181	240
6b-e1	APTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTCLDWVVA	
6b-e1 mut	APTNSVREHAGTAGILELLKCKDLRAALLGKFKECFGLSFIDLIRPFKSDKTTCLDWVVA	
	241	300
6b-e1	GFGIHHSISEAFQK LIEPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLLRFKVNKSRSTVARTLATLLN	
6b-e1 mut	GFGIHHSISEAFQK LIEPLSLYAHIQWLTNAWGMVLLVLLRFKVNKSRSTVARTLATLLN	
	301	360
6b-e1	IPENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAP EWITRQTVIEHGLADSQFKLTE	
6b-e1 mut	IPENQMLIEPPKIQSGVAALYWFRTGISNASTVIGEAP EWITRQTVIEHGLADSQFKLTE	
	361	420
6b-e1	MVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEMRK	
6b-e1 mut	MVQWAYDNDICEESEIAFEYAQRGDFDSNARAFLNSNMQAKYVKDCATMCRHYKHAEMRK	
	421	480
6b-e1	MSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKPIVQFLRHQNIEFIPFLTKFKLWLHGTPKKNCIAIVGPP	
6b-e1 mut	MSIKQWIKHRGSKIEGTGNWKPIVQFLRHQNIEFIPFLTKFKLWLHGTPKKNCIAIVGPP	
	481	540
6b-e1	DTGKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDATQPCWIYMDTYMRNL	
6b-e1 mut	DTDKSYFCMSLISFLGGTVISHVNSSSHFWLQPLVDAKVALLDATQPCWIYMDTYMRNL	
	541	600
6b-e1	LDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVT SNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNFFPFDRNGN	
6b-e1 mut	LDGNPMSIDRKHKALTLIKCPPLLVT SNIDITKEDKYKYLHTRVTTFTFPNFFPFDRNGN	
	601	649
6b-e1	AVYELSNTNWKCFERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFCVPGTVVRTL	
6b-e1 mut	AVYELSNTNWKCFERLSSSLDIQDSEDEEDGSNSQAFCVPGTVVRTL	

3/12

Obr. 3

	1	60
Hpv-11e2	MEAI AKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv6a-e2	MEAI AKRLDACQEQLLELYEENSTD LNKHVLHWKCMRHESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
Hpv6b-e2	MEAI AKRLDACQEQLLELYEENSTD LKHVHLHWKCMRHESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
	61	120
Hpv-11e2	PLTVSETKGHNAIEMQMHLESIAKTOYGVEPWT LQDTSYEMWLT PPKRCFKKQGNTVEVK	
Hpv6a-e2	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLESLLKTEYSMEPWT LQETS YEMWQT PPKRCFKKRGKTVEVK	
Hpv6b-e2	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLESLLRTEYSMEPWT LQETS YEMWQT PPKRCFKKRGKTVEVK	
	121	180
Hpv-11e2	FDGCEDNVMEYVWVTHIYLQDND SWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYYVNFNKEAQKYGS	
Hpv6a-e2	FDGCANNTMDYVWVTDVYVQD TDSWVKVHSMVDAKGIYYTCGQFKTYYVNFVKEAEKYGS	
Hpv6b-e2	FDGCANNTMDYVWVTDVYVQD NDTWVKVHSMVDAKGIYYTCGQFKTYYVNFVKEAEKYGS	
	181	240
Hpv-11e2	TNHW EVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQT TAPTVSACTTEDGVSAPPRKR	
Hpv6a-e2	TKQW EVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIP ESTTYTPAQTSTP.VSSSTQEDAVQT PPRKR	
Hpv6b-e2	TKHW EVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIP ESTTYTPAQTSTL.VSSSTKEDAVQT PPRKR	
	241	300
Hpv-11e2	ARGPSTN..NTLCVANIRSVDSTINNIVTDN YNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKC	
Hpv6a-e2	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVD SGNHNLTNNHDQHQRNNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv6b-e2	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVD SGNHNLTNNHDQHQRNNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
	301	360
Hpv-11e2	FRYRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHK	
Hpv6a-e2	FRYRLNDKHRH LFDLISSTWHWASPKAPHKHAIVTVTYHSEEQRQQFLNVVKIPPTIRHK	
Hpv6b-e2	FRYRLNDRHRH LFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPPTISHK	
	361	369
Hpv-11e2	VGFM SLHLL	
Hpv6a-e2	LGFM SLHLL	
Hpv6b-e2	LGFM SLHLL	

4/12

Obr. 4a

	1	60
Hpv-11e2-comut	MEAI AKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv-11e2-mut	MEAI AKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
Hpv-11e2-wt	MEAI AKRLDACQDQLLELYEENSIDIHKHIMHWKCIRLESVLLHKAKQMGLSHIGLQVVP	
	61	120
Hpv-11e2-comut	PLTVSETKGHNAIEMQMHLLESŁAKTQYGVEPWTŁQDTSYEMWLTŁPPKRCFAKQGNŁVEVK	
Hpv-11e2-mut	PLTVSETKGHNAIEMQMHLLESŁAKTQYGVEPWTŁQDTSYEMWLTŁPPKRCFAKQGNŁVEVK	
Hpv-11e2-wt	PLTVSETKGHNAIEMQMHLLESŁAKTQYGVEPWTŁQDTSYEMWLTŁPPKRCFAKQGNŁVEVK	
	121	180
Hpv-11e2-comut	FDGCEDNVMEYVVWTHIYLQDNDSDWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
Hpv-11e2-mut	FDGCEDNVMEYVVWTHIYLQDNDSDWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
Hpv-11e2-wt	FDGCEDNVMEYVVWTHIYLQDNDSDWVKVTSSVDAKGIYYTCGQFKTYVNFNKEAQKYGS	
	181	240
Hpv-11e2-comut	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQTTAPTVSACTTEDGVSAPPRKR	
Hpv-11e2-mut	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQTTAPTVSACTTEDGVSAPPRKR	
Hpv-11e2-wt	TNHWEVCYGSTVICSPASVSSTVREVSIAEPTTYTPAQTTAPTVSACTTEDGVSAPPRKR	
	241	300
Hpv-11e2-comut	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR	
Hpv-11e2-mut	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR	
Hpv-11e2-wt	ARGPSTNNTLCVANIRSVDSTINNIVTDNYNKHQRRNNCHSAATPIVQLQGDSNCLKCFR	
	301	360
Hpv-11e2-comut	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHKVG	
Hpv-11e2-mut	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHKVG	
Hpv-11e2-wt	YRLNDKYKHLFELASSTWHWASPEAPHKNAIVTLTYSSEEQRQQFLNSVKIPPTIRHKVG	
	361 367	
Hpv-11e2-comut	FMSLHLL	
Hpv-11e2-mut	FMSLHLL	
Hpv-11e2-wt	FMSLHLL	

Obr. 4b

	1	60
Hpv-6be2-wt	MEAI AKRLDACQEQLLELYEENSTDLHKHVLHWKCMRHESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
Hpv-6be2-mut	MEAI AKRLDACQEQLLELYEENSTDLHKHVLHWKCMRHESVLLYKAKQMGLSHIGMQVVP	
	61	120
Hpv-6be2-wt	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLLESŁRTEYSMEPWTŁQETSYEMWQTŁPPKRCFAKRGKTŁVEVK	
Hpv-6be2-mut	PLKVSEAKGHNAIEMQMHLLESŁRTEYSMEPWTŁQETSYEMWQTŁPPKRCFAKRGKTŁVEVK	
	121	180
Hpv-6be2-wt	FDGCANNTMDYVVWTDVYVQDNDTWVKVHSMVDAKGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
Hpv-6be2-mut	FDGCANNTMDYVVWTDVYVQDNDTWVKVHSMVDAKGIYYTCGQFKTYVNFVKEAEKYGS	
	181	240
Hpv-6be2-wt	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIPESTTYTPAQSTŁ.VSSSTKEDAVQTŁPPRKR	
Hpv-6be2-mut	TKHWEVCYGSTVICSPASVSSTTQEVSIPESTTYTPAQSTŁ.VSSSTKEDAVQTŁPPRKR	
	241	300
Hpv-6be2-wt	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHNŁITNNHDQHQRRNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	
Hpv-6be2-mut	ARGVQQSPCNALCVAHIGPVDSGNHNŁITNNHDQHQRRNNSNSSATPIVQFQGESNCLKC	

	301		360
Hpv-6be2-wt	FRYRLNDRHRHLEFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPPTISHK		
Hpv-6be2-mut	FRYRLNDRHRHLEFDLISSTWHWASSKAPHKHAIVTVTYDSEEQRQQFLDVVKIPPTISHK		
	361	369	
Hpv-6be2-wt	LGFMSLHLL		
Hpv-6be2-mut	LGFMSLHLL		

6/12

Obr. 5

HPV6bel-comut 1 60
GCGGCCGCCATGGCAGACGATTCCGGTACTGAGAACGAAGGTTCTGGTTGTACCGGTTGG

HPV6bel-comut 61 120
TTCATGGTTGAAGCAATCGTTCAGCATCCGACTGGTACCCAGATCTCCGATGACGAAGAC

HPV6bel-comut 121 180
GAAGAAGTTGAAGATTCTGGTTACGACATGGTTGACTTCATCGATGACTCCAACATCACT

HPV6bel-comut 181 240
CATAACTCTCTGGAAGCACAGGCTCTGTTTAACCGCCAGGAAGCTGATACCCATTACGCT

HPV6bel-comut 241 300
ACTGTTTCAGGACCTGGGAGGCAAATATCTGGGCTCTCCGTACGTTTCCCCGATCAACACT

HPV6bel-comut 301 360
ATCGCAGAAGCAGTTGAGTCTGAAATCTCCCCGCGCCTGGACGCTATCAAAGTACTCGT

HPV6bel-comut 361 420
CAGCCGAAGAAGGTTAAACGTCGTCTGTTCCAGACTCGTGAACTGACCGACTCCGGTTAC

HPV6bel-comut 421 480
GGTTATAGCGAAGTTGAGGCTGGCACCGGCACCCAGGTTGAAAAACACGGTGTACCGGAA

HPV6bel-comut 481 540
AACGGCGGCGACGGTCAGGAAAAGGACACCGGCCGCGACATCGAGGGTGAGGAACACACC

HPV6bel-comut 541 600
GAAGCTGAAGCTCCGACTAACTCTGTTTCGTGAACACGCAGGTACTGCGGGTATCCTGGAA

HPV6bel-comut 601 660
CTGCTGAAATGCAAAGACCTGCGCGCGGCTCTGCTGGGCAAATTCAAAGAATGCTTCGGC

HPV6bel-comut 661 720
CTGTCTTTCATTGACCTGATCCGTCCGTTTAAGTCTGACAAAACCTACCTGTCTGGACTGG

HPV6bel-comut 721 780
GTTGTAGCAGGCTTCGGCATCCACCACTCTATCTCTGAAGCATTCCAGAACTGATCGAG

HPV6bel-comut 781 840
CCGCTGTCTCTGTACGCGCACATCCAGTGGCTGACTAACGCTTGGGGTATGGTTCTGCTG

HPV6bel-comut 841 900
GTACTGCTGCGCTTTAAAGTAAACAAATCTCGTTCCACTGTTGCTCGTACTCTGGCTACC

HPV6bel-comut 901 960
CTGCTGAACATCCCGGAGAACCAGATGCTGATCGAACC GCCGAAAATCCAGTCTGGTGTAT

HPV6bel-comut 961 1020
GCTGCACTGTACTGGTTTCGTACTGGCATCTCTAACGCTAGCACTGTTATCGGTGAAGCA

HPV6bel-comut 1021 1080
CCGGAATGGATCACTCGTCAGACCGTTATCGAACACGGTCTGGCAGATTCTCAGTTCAAA

HPV6bel-comut 1081 1140
CTGACTGAAATGGTTTCAGTGGGCATACGACAACGACATCTGCGAGGAATCTGAAATTGCG

7/12

Obr. 5 Pokrač...

HPV6bel-comut 1141 1200
TTCGAATACGCTCAGCGTGGCGACTTCGACTCCAACGCTCGTGCTTTCCTGAACAGCAAC

HPV6bel-comut 1201 1260
ATGCAGGCTAAATACGTAAAAGACTGCGCTACCATGTGCCGTCCTACAAACACGCGGAA

HPV6bel-comut 1261 1320
ATGCGTAAAATGTCTATCAAACAGTGGATCAAGCACCGCGGTTCTAAAATCGAAGGTACC

HPV6bel-comut 1321 1380
GGTAACTGGAAACCGATCGTTCAGTTCCTGCGCCATCAGAACATCGAATTCATCCCCTTC

HPV6bel-comut 1381 1440
CTGACCAAATTCAAGCTGTGGCTGCACGGTACCCCGAAAAAACTGCATCGCTATCGTA

HPV6bel-comut 1441 1500
GGTCCACCGGACACTGACAAGTCTTACTTCTGTATGTCCCTGATCTCTTTCCTGGGCGGC

HPV6bel-comut 1501 1560
ACTGTAATCTCTCACGTTAACTCTTCCCTCCCATTTCTGGCTGCAGCCACTGGTAGACGCG

HPV6bel-comut 1561 1620
AAAGTAGCTCTGCTGGACGACGCGACCCAGCCGTGCTGGATCTACATGGATACTTACATG

HPV6bel-comut 1621 1680
CGCAACCTGCTGGACGGTAACCCGATGTCTATCGACCGTAAACACAAAGCGCTGACTCTG

HPV6bel-comut 1681 1740
ATCAAGTGCCCGCCGCTGCTGGTAACTTCTAACATCGACATCACCAAGGAAGATAAATAC

HPV6bel-comut 1741 1800
AAGTACCTGCATACCCGTGTTACTACCTTTACTTTCCCGAACCCGTTCCCGTTTGATCGT

HPV6bel-comut 1801 1860
AACGGTAACGCTGTTTACGAAGTGTCCAACACTAACTGGAAATGCTTCTTCGAGCGTCTG

HPV6bel-comut 1861 1920
TCTTCCTCCCTGGACATCCAGGACTCTGAAGATGAAGAAGATGGTTCTAACTCTCAGGCT

HPV6bel-comut 1921 1968
TTCCGTTGTGTTCCGGGTACTGTTGTTTCGTACTCTGTGAGGATCC''.

8/12

Obr. 6

1 60
Hpv11e2-comut 'GCGGCCGCCATGGAAGCCATCGCGAAGAGGCTCGACGCCTGCCAGGACCAGCTGCTCG

61 120
Hpv11e2-comut AGCTGTACGAGGAGAACAGCATTGACATCCATAAGCACATCATGCACTGGAAGTGCATT

121 180
Hpv11e2-comut GCCTGGAGAGCGTGCTGTTGCACAAGGCCAAGCAGATGGGCCTGTCCCACATAGGCCTTC

181 240
Hpv11e2-comut AGGTGGTCCCCCTCTGACCGTGTGAGAGACAAAGGGCCATAACGCAATCGAGATGCAGA

241 300
Hpv11e2-comut TGCACCTCGAGTCGCTGGCGAAAACACAGTACGGCGTGGAGCCATGGACCCTGCAGGACA

301 360
Hpv11e2-comut CCTCGTACGAAATGTGGCTGACCCACCTAAGCGATGCTTCGCCAAACAGGGCAACACAG

361 420
Hpv11e2-comut TGGAGGTGAAGTTCGACGGCTGTGAGGATAACGTTATGGAGTATGTCGTGTGGACGCACA

421 480
Hpv11e2-comut TCTATCTGCAGGACAACGACAGTTGGGTGAAGGTGACCAGCTCCGTGGACGCGAAGGGCA

481 540
Hpv11e2-comut TCTACTATACCTGTGGGCAGTTTAAACCTACTATGTGAACTTCAACAAAGAGGCCCAAA

541 600
Hpv11e2-comut AGTATGGCTCCACCAACCACTGGGAGGTCTGCTATGGGAGCACGGTGATTTGCTCTCCCG

601 660
Hpv11e2-comut CCAGCGTGTCTAGCACTGTGCGCGAGGTGAGCATTGCCGAGCCGACCACGTACACCCCTG

661 720
Hpv11e2-comut CCCAGACGACCGCTCCGACCGTGTCTGCTTGTACTACCGAGGACGGCGTGAGCGCTCCAC

721 780
Hpv11e2-comut CCAGGAAGCGTGCGAGGGGCCCAAGCACCAACAACACCCCTCTGTGTGGCGAACATTGCGA

781 840
Hpv11e2-comut GCGTCGACAGTACCATCAATAACATCGTGACGGATAACTATAACAAGCACCAAGAGGCGTA

841 900
Hpv11e2-comut ACAACTGTCACTCTGCCGCAACCCCCATCGTGACGCTCCAGGGAGACAGCAATTGCCTTA

901 960
Hpv11e2-comut AGTGCTTCCGCTATCGCCTCAACGACAAGTACAAGCACCTCTTTGAGCTCGCCTCGTCTGA

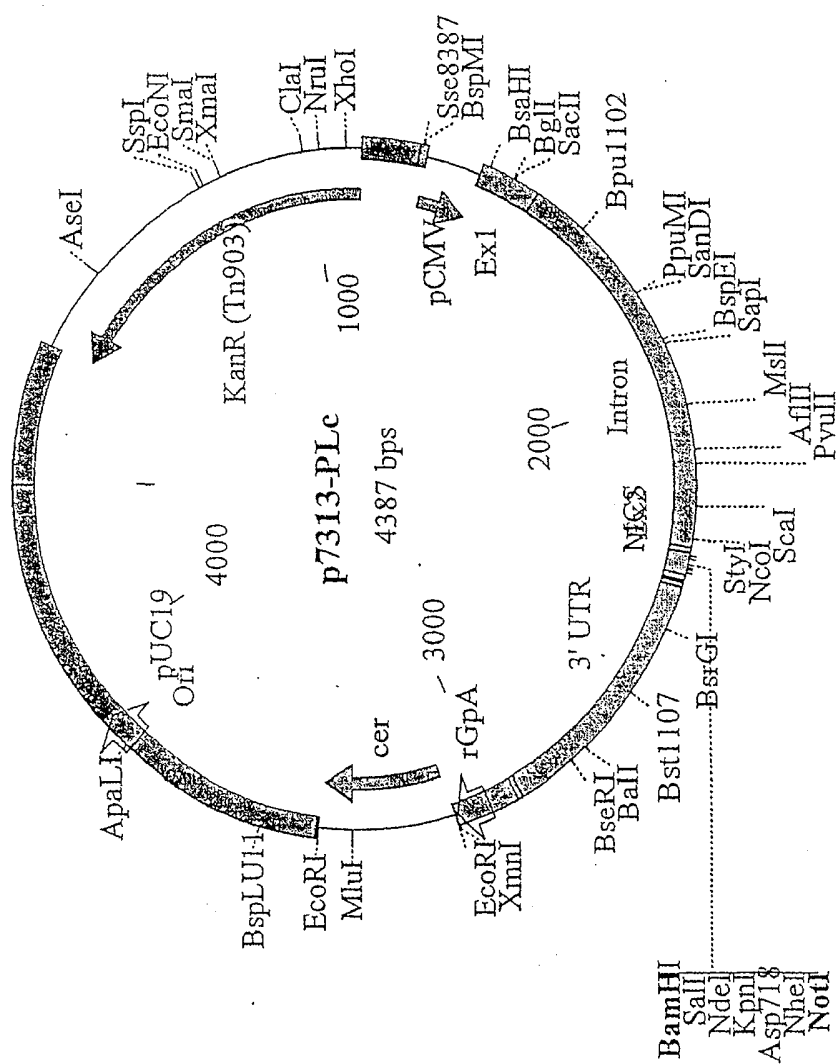
961 1020
Hpv11e2-comut CGTGGCACTGGGCCTCACCCGAGGCACCTCACAAGAAGCCATCGTCACTCTCACTTACT

1021 1080
Hpv11e2-comut CCAGTGAGGAGCAGAGACAGCAGTTTCTGAACAGCGTGAAGATCCCACCGACGATCCGTC

1081 1123
Hpv11e2-comut ATAAGGTGGCTTCATGTCACTGCATCTCCTGTGAGGATCC''

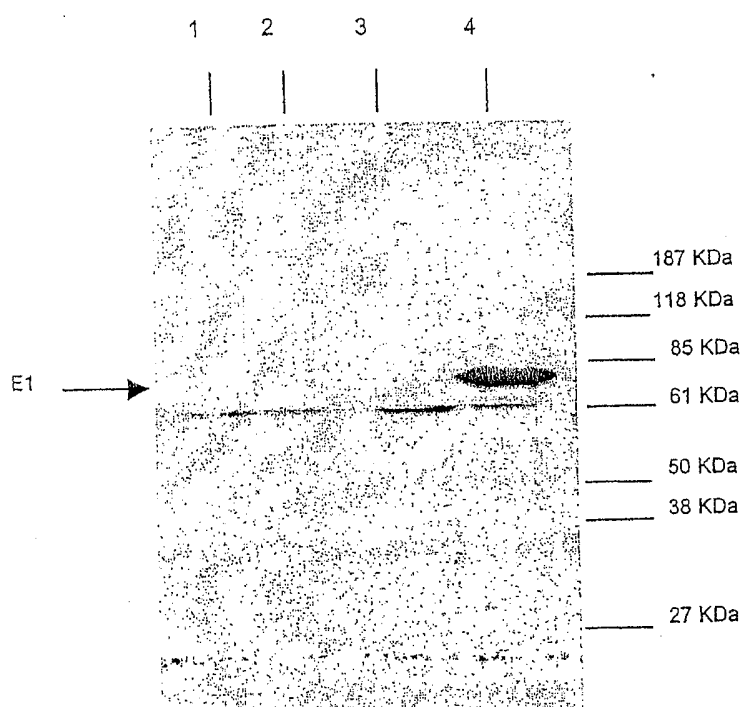
9/12

Obrázek 7: WRG7313plc



10/12

Obr. 8

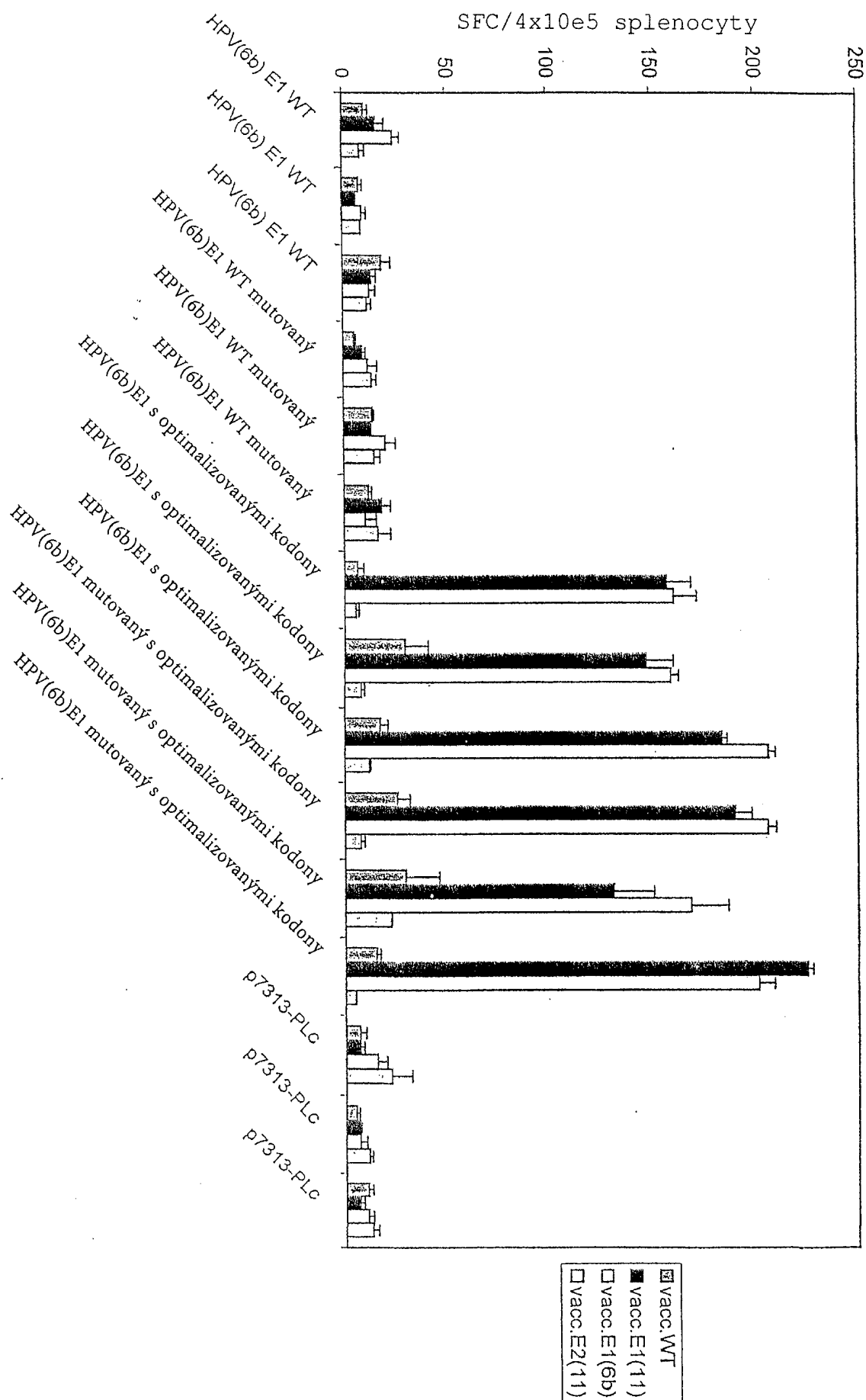


Klíč:

- 1- kontrola 293T buněčný lyzát
- 2- kontrola p7313PLc vektor
- 3- p6bE1 w/t
- 4- p6bE1 c/o

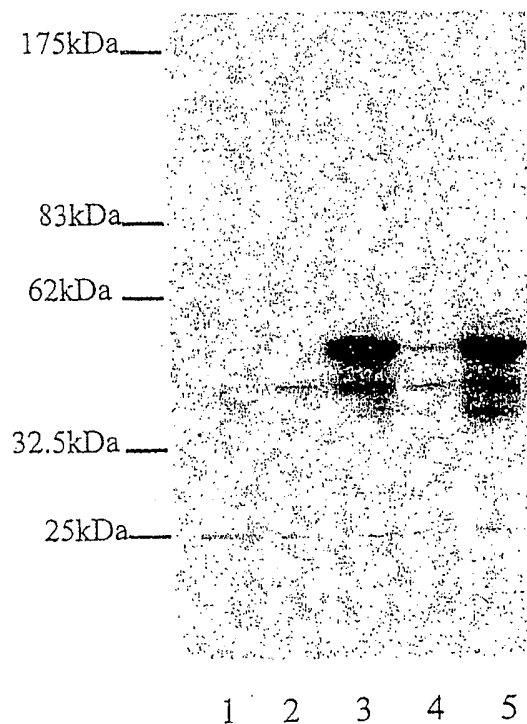
Obr. 9

11/12



12/12

Obr. 10



- 1 p7313Lc
- 2 p6bE2 w/t
- 3 p6bE2 c/o
- 4 p6bE2 w/t mutovaný
- 5 p6bE2 c/o mutovaný