

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 1236

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/205

C 07 K 16/12

C 12 N 15/10

C 12 N 15/31

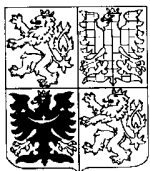
C 12 N 15/74

A 61 K 39/112

A 61 P 37/04

A 61 P 1/04

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.09.1997**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.10.1996**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1996/96116337**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2000**
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/04744**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/16552**

(71) Přihlašovatel:

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.,
München, DE;

(72) Původce:

Meyer Thomas F., Tübingen, DE;
Haas Rainer, Tübingen, DE;
Zhengxin Yan, Tübingen, DE;
Gomez-Duarte Oscar, Tübingen, DE;
Lucas Bernadette, Tübingen, DE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Rekombinantní oslabený mikrobiální patogen
obsahující alespoň jednu molekulu nukleové
kyseliny kódující antigen pocházející z
mikroorganismu Helicobacter**

(57) Anotace:

Rekombinantní oslabený mikrobiální patogen obsahující alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z mikroorganismu Helicobacter, kde tento patogen je schopen exprimovat zmíněnou molekulu nukleové kyseliny nebo je schopen vyvolat expresi zmíněné molekuly nukleové kyseliny v cílové buňce. Oslabený rekombinantní patogen není sám o sobě patogenní. Je schopen indukovat účinnou imunologickou ochranu proti skutečným patogenům.

Rekombinantní oslabený mikrobiální patogen obsahující alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z mikroorganismu *Helicobacter*.

Oblast techniky

Do rozsahu vynálezu spadají nové rekombinantní živé vakcíny, které propůjčují ochrannou imunitu proti infekci vyvolané mikroorganismem *Helicobacter pylori*. Vynález rovněž popisuje způsoby screeningu antigenů *H. pylori* pro optimalizaci vakcín.

Dosavadní stav techniky

Helicobacter je Gram-negativní bakteriální patogen spojovaný s výskytem gastritidy, žaludečních vředů a karcinomu žaludku. Žaludek je kolonizován několika zástupci rodu *Helicobacter*, a to především druhy *H. pylori*, *H. heilmanni* a *H. felis*. Ačkoliv je *H. pylori* mikroorganismem nejčastěji spojovaným s infekcemi člověka, bylo zjištěno, že *H. heilmanni* a *H. felis* člověka rovněž infikují. V zemích Třetího světa, ale i v průmyslově vyspělých zemích, je pozorována vysoká prevalence infekcí vyvolaných *H. pylori*. Je známo, že ze všech virulentních faktorů popsanych u *H. pylori* je ke kolonizaci gnotobiotických vepřů a "nahých" myší (nude mouse) naprosto nepostradatelná ureáza. Ureáza je enzymem složeným ze dvou strukturních podjednotek (UreA a UreB). Dřívější studie naznačovaly, že orální imunizace za použití rekombinantní UreB spolu s toxinem cholery byly u myší schopny zabránit kolonizaci žaludku mikroorganismy *H. felis* a *H. pylori* (Michetti a další, *Gastroenterology*, 107:1002 až 1011, 1994). Orální aplikací rekombinantních antigenů UreB však bylo v několika případech dosaženo pouze částečné ochrany. Dalšími antigeny *H. pylori*, které poskytují částeč-

nou ochranu proti kolonizaci žaludku, jsou 87 kDa vakuolární cytotoxin VacA (Cover a Blaser, J. Biol. Chem., 267:10570, 1992; Marchetti a další, Science, 267:1655, 1995) a 13 kDa a 58 kDa heat shock proteiny HspA a HspB (Ferrero a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6499, 1995).

Je známo, že oslabení patogenové, například bakterie jako například *Salmonella*, slouží jako účinné živé vakcíny. První náznaky účinnosti oslabených bakterií *Salmonella* jako dobrých vakcín v humánní medicíně se objevují ve studiích využívajících chemicky mutovaný kmen *Salmonella typhi* Ty21a (Germanier a Furer, J. Infect. Dis., 141:553 až 558, 1975). Tyto vakcíny byly úspěšně testovány na dospělých dobrovolnících (Gilman a další, J. Infect. Dis., 136:717 až 723, 1977) a později na dětech v rozsáhlém terénním pokusu v Egyptě (Whadan a další, J. Infect. Dis., 145:292 až 295, 1982). Orálně podávaná vakcína Ty21a byla účinná při ochraně 96% egyptských dětí vakcinovaných během tříletého pozorování. Od té doby byly vyvinuty nové vakcíny založené na oslabených živých bakteriích *Salmonella* (Hone a další, Vaccine, 9:810 až 816, 1991), u nichž je důsledkem dobře definovaných mutací v chromozomu vznik nevirulentních kmenů schopných po orální aplikaci indukovat silnou imunitní odpověď (Tacket a další, Vaccine, 10:443 až 446, 1992; a Tacket a další, Infect. Immun., 60:536 až 541, 1992). Mezi další výhody vakcín založených na oslabených živých bakteriích *Salmonella* patří, ve srovnání s dříve masově používanými tyfovými vakcínami (Levine a další, Typhoid Fever Vaccines, v publikaci "Vaccines", editoři Plotkin S. A. a Mortimer E. A., jun., Philadelphia: WB Saunders, strany 333 až 361, 1988), jejich bezpečnost, snadná aplikace, dlouhodobá ochrana a neexistence nežádoucích reakcí.

Podstata vynálezu

Vzhledem k možnosti používání myši jako živočišného modelu, u kterého se předpokládá, že mimikuje infekci lidí patogenem *S. typhi*, byly k aplikaci antigenů ve velké míře používány mutantní kmeny *S. typhimurium*. Nejčastěji používaným způsobem oslabení *S. typhimurium* je cílená mutagenese genů ovlivňujících syntézu aromatických aminokyselin. Tyto kmeny, označované jako mutanty aro, vykazují zanedbatelnou patogenicitu, což bylo za použití těchto konstruktů prokázáno na živočišných modelech a při klinickém testování na lidech (Hoiseth a Stocker, *Nature*, 291:238 až 239, 1981; Tacket a další, viz. výše). Silná imunogenita vakcín založených na živých bakteriích *Salmonella* byla s výhodou využita k aplikaci heterologních antigenů. Expres specifických antigenů v oslabených bakteriích *Salmonella* vyvolala u myši imunitu vůči několika bakteriálním patogenům. Použití rekombinantních živých vakcín, které jsou schopny exprimovat antigeny pocházející z *Helicobacter* a chránit tak vakcinovaného živočicha, nebyla dosud popsána. Použití oslabených živých vakcín za účelem léčby infekce vyvolané mikroorganizmy *Helicobacter* rovněž nebyla zveřejněna. Důvodem je skutečnost, že v průběhu infekce mikroorganizmem *Helicobacter* je indukována silná imunitní odpověď, která nicméně nevede k vytvoření ochranné imunity. Je tudíž velmi překvapivé, že ochranné imunitní reakce je dosaženo použitím oslabených rekombinantních bakteriálních buněk sloužících jako nosiče antigenů a schopných exprimovat molekulu DNA kódující nějaký antigen pocházející z *Helicobacter*. Oslabené rekombinantní bakteriální buňky exprimující nějaký antigen pocházející z *Helicobacter* jsou zřejmě schopny vyvolat vůči tomuto heterolognímu antigenu mikroorganizmu *Helicobacter* kvalitativně odlišnou imunitní reakci ve srovnání s imunitní reakcí vůči homolognímu antigenu *Helicobacter*,. Neochranná imunitní

odpověď je tudíž překvapivě transformována na imunitní reakci chránící organismus proti infekci mikroorganismy *Helicobacter*. Toto neočekávané zjištění umožňuje využití oslabených rekombinantních patogenů, například bakteriálních buněk, zejména pak zástupců rodu *Salmonella*, jako nosičů pro screening (testování) antigenů vyvolávajících ochrannou imunitní reakci, dále pak použití antigenů vyvolávajících ochrannou imunitní reakci (identifikovaných způsobem popsaným výše) v jakékoliv vakcíně proti infekcím způsobeným zástupci rodu *Helicobacter* a použití oslabených rekombinantních bakterií jako nosičů antigenů vyvolávajících ochrannou imunitní reakci k imunizaci proti infekcím způsobeným mikroorganismy *Helicobacter* u lidí a jiných savců.

Do rozsahu vynálezu tudíž spadá oslabený rekombinantní patogen, který obsahuje alespoň jednu heterologní molekulu nukleové kyseliny kódující nějaký antigen pocházející z *Helicobacter*, kde zmíněný patogen je schopen exprimovat uvedenou molekulu nukleové kyseliny nebo je schopen vyvolat expresi této nukleové kyseliny v cílové buňce. Ve výhodném provedení je zmíněnou molekulou nukleové kyseliny molekula DNA.

Oslabeným patogenem je kmen mikroorganismu, který je schopen způsobit infekci a ve výhodném provedení indukovat účinnou imunologickou ochranu proti skutečnému patogenu, nicméně tento oslabený patogen není sám o sobě patogenní. Oslabeným patogenem může být nějaká bakterie, virus, houba nebo parazit. Ve výhodném provedení se jedná o nějakou bakterii, například *Salmonella* jako například *S. typhimurium* nebo *S. typhi*, *Vibrio cholerae* (Mekalanos a další, *Nature*, 306:551 až 557, 1983), *Shingella* jako například *S. flexneri* (Sizemore a další, *Science*, 270:299 až 302, 1995; Mounier a další, *EMBO J.*, 11:1991 až 1999, 1992), *Listeria* jako například *L. monocytogenes* (Milon a Cossart, *Trends in Microbio-*

logy, 3:451 až 453, 1995), *Escherichia coli*, *Streptococcus* jako například *S. gordonii* (Medaglini a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6868 až 6872, 1995) nebo *Mycobacterium* jako například *Bacillus Calmette-Guérin* (Flynn, Cell. Mol. Biol., 40, Suppl. 1, 31 až 34, 1994). Ve výhodném provedení je zmíněným patogenem oslabená enterobaktérie jako například *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* nebo *Salmonella*. Nejvýhodněji použitým oslabeným patogenem je nějaký zástupce rodu *Salmonella*, například mutant *aro Salmonella*. Oslabeným patogenem může být nicméně i nějaký virus, například oslabený virus *vaccinia*, adenovirus nebo poxvirus.

Molekula nukleové kyseliny vnesená do daného patogena kóduje antigen pocházející z *Helicobacter*, ve výhodném provedení nějaký antigen *H. felis*, *H. heilmannii* nebo *H. pylori*, výhodněji pak antigen *H. pylori*. Tento antigen pocházející z *Helicobacter* může být nativní polypeptid odvozený z *Helicobacter*, imunologicky reaktivní fragment takového polypeptidu nebo imunologicky reaktivní varianta nativního polypeptidu nebo jeho fragmentu. Antigenem pocházejícím z *Helicobacter* může být rovněž ochranný sacharid nebo peptidový mimotop napodobující trojrozměrnou strukturu nativního antigenu odvozeného z *Helicobacter*. Peptidové mimotopy mohou být získány z peptidových knihoven exprimovaných na povrchu bakteriálních buněk (PCT/EP96/01130). Transformované buňky mohou samozřejmě rovněž obsahovat několik molekul DNA kódujících rozdílné antigeny odvozené z *Helicobacter*.

Molekuly nukleových kyselin kódující antigeny pocházející z *Helicobacter* mohou být umístěny na mimochromozomálním vektoru, například nějakém plazmidu, nebo mohou být integrovány do buněčného chromozomu daného patogena. Je-li daný patogen použit jako vakcína, je obvykle upřednostňována chromozomální lokalizace.

Oslabené bakterie mohou být použity k transkripci a translaci zmíněné molekuly nukleové kyseliny přímo v této bakteriální buňce nebo mohou být využity k přenesení zmíněné molekuly nukleové kyseliny do infikované cílové buňky, a daná molekula DNA je tudíž transkribována a/nebo translatována v cílové eukaryotické buňce. Tento postup nepřímé bakteriální vakcinace, v této přihlášce označovaný jako genetická vakcinace, byl úspěšně aplikován s využitím mikroorganismu *Shingella* jako vektoru (Sizemore D. R., Branstrom A. A. a Sadoff J. C., Attenuated *Shingella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. Science, 270:299 až 302, 1995).

Ve výhodném provedení vynálezu je antigenem pocházejícím z *Helicobacter* ureáza, podjednotka ureázy nebo jejich imunologicky reaktivní varianta nebo fragment nebo peptidový mimotop. V jiném výhodném provedení vynálezu je antigenem pocházejícím z *Helicobacter* nějaký polypeptid sekretovaný z *Helicobacter*, jeho imunologicky reaktivní varianta nebo fragment nebo peptidový mimotop. Způsob identifikace genů *Helicobacter* kódujících tyto sekretované polypeptidy a zvláště pak adheziny byl popsán v mezinárodní patentové přihlášce PCT/EP/02544, která je zde uvedena záměnou za přenesení jejího celého obsahu do popisu tohoto vynálezu. Tento způsob zahrnuje:

- (a) vytvoření genové banky DNA z *H. pylori* v hostitelském organismu nesoucím inducibilní transpozon spojený nějakým markerem sekreční aktivity,
- (b) inzerci zmíněného transpozonu do DNA z *H. pylori* a
- (c) využití daného markeru k selekci klonů obsahujících gen kódující sekretovaný protein, dále pak s možností
- (d) provedení opětovné transformace *H. pylori* s využitím DNA z klonů obsahujících geny vykazující sekreční aktivitu, kde výsledkem této opětovné transfekce je vytvo-

ření izogenních mutantních klonů *H. pylori* tím, že dojde k integraci příslušné DNA do chromozomu a

(e) selekce detekující mutantní kmeny *H. pylori* deficientní v adhezi.

Vhodnými příklady antigenů, které mohou být získány postupem popsaným výše, jsou antigeny vybrané ze skupiny zahrnující antigeny AlpA, AlpB, jejich imunologicky reaktivní varianty, fragmenty nebo peptidové mimotopy. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence antigenů AlpA a AlpB byla popsána v mezinárodních patentových přihláškách PCT/EP96/02545 a PCT/EP96/04124, které jsou zde uvedeny záměnou za přenesení jejich celého popisu do rozsahu tohoto vynálezu. Nukleotidová a aminokyselinová sekvence AlpB jsou navíc zobrazeny jako SEK. ID. Č.: 1 a 2, a nukleotidová a aminokyselinová sekvence AlpA pak jako SEK. ID. Č.: 3 a 4.

Je nicméně rovněž představitelné, že je použit intracelulární antigen, který může být prezentován na povrchu buňky například autokatalytickým štěpením, kde tento antigen přispívá k imunologické ochraně.

Prezentace (vystavení na povrchu buňky) antigenů pocházejících z *Helicobacter* v rekombinantních patogenech podle vynálezu může být dosaženo různými způsoby. Příslušný antigen nebo antigeny mohou být v rekombinantních patogenech syntetizovány konstitutivně, inducibilně nebo může být jejich syntéza závislá na fázi životního cyklu patogena. Při konstitutivní nebo inducibilní expresi antigenů pocházejících z *Helicobacter* mohou být použity známé expresivní systémy popsané například v publikaci Sambrook a další, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Ve výhodném provedení jsou antigeny exprimovány s využitím expresivního systému ovlivněného fází životního

cyklu patogena. Takové expresivní systémy sloužící k produkci a prezentaci cizích antigenů v hybridních živých vakcínách jsou popsány v přihlášce EP-B-0565548, která je zde uvedena záměnou za přenesení jejího celého obsahu do popisu tohoto vynálezu. V těchto expresivních systémech ovlivněných fází životního cyklu patogena se molekula nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* nalézá pod kontrolou signální sekvence, která je v patogenu v podstatě neaktivní, a která může být aktivována spontánním přemístěním nějaké nukleové kyseliny, například reorganizací DNA v patogenu, například procesem inverze určité DNA, procesem delece určité DNA, procesem replikace určité DNA nebo mechanismem "specific slipped strand mispairing" (specifické "nesprávné" párování opakujících se sekvencí při replikaci DNA).

Rekombinantní buňky obsahující expresivní systém ovlivněný fází životního cyklu patogena jsou schopny vytvářet dvě subpopulace, A a B. K rozdělení do těchto dvou subpopulací dochází spontánní reorganizací v rekombinantní nukleové kyselině, přičemž subpopulace A je sama o sobě infekční a vyvolává imunologickou reakci, zatímco subpopulace B, která je regenerovaná ze subpopulace A, produkuje alespoň jeden heterologní antigen odvozený z *Helicobacter* a v kontextu s tímto heterologním antigenem vyvolává příslušnou imunologickou reakci.

Aktivace promotorové sekvence řídící expresi antigenu odvozeného z *Helicobacter* může být dosaženo přímo reorganizací příslušné nukleové kyseliny nebo nepřímo aktivací genu kódujícího protein, který řídí expresi genu kódujícího antigen odvozený z *Helicobacter*. Tato nepřímá aktivace je reprezentována systémem, který umožňuje produkci antigenu pocházejícího z *Helicobacter* prostřednictvím kaskádové reakce, která může být uskutečněna například tak, že gen přímo říze-

ný reorganizací DNA kóduje RNA polymerázu, která specificky rozpoznává promotor řídící expresi genu odvozeného z *Helicobacter*, nebo gen přímo řízený reorganizací DNA kóduje nějaký regulátor, který nějakým odlišným, nicméně specifickým mechanismem indukuje expresi daného genu odvozeného z *Helicobacter*. Ve výhodném provedení vynálezu je promotorovou sekvencí řídící expresi antigenu odvozeného z *Helicobacter* promotor odvozený z bakteriofága, například promotor T3, T7 nebo SP6, a aktivace promotorové sekvence je dosaženo reorganizací nukleové kyseliny, jejímž důsledkem je produkce příslušné bakteriofágové RNA polymerázy v patogenu.

Expresivní systémy ovlivněné fází životního cyklu patogena mohou být upraveny tak, aby umožňovaly produkci antigenu pocházejícího z *Helicobacter* v předem stanoveném množství. Této skutečnosti může být například dosaženo modifikací nukleové sekvence promotoru řídícího expresi, který je aktivován mechanismem reorganizace příslušné nukleové kyseliny, a/nebo vložení dalších regulačních prvků.

Antigeny pocházející z *Helicobacter* mohou být v patogenu podle vynálezu produkovány intracelulárně, jakož i extracelulárně. Jako extracelulární sekreční systém mohou být například použity autotransportérové systémy jako například systém IgA-proteáza (například EP-A-0254090) nebo systém využívající adhezín AIDA-1 v *E. coli* (Benz a další, Mol. Microbiol., 6:strana 1539, 1992). Jinými vhodnými systémy pro transport přes vnější membránu jsou transportéry využívající toxin RTX, například transportní systém využívající hemolysin v *E. coli* (Hess a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11458 až 11463, 1996).

Patogen podle vynálezu může, mimo molekuly nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter*, nést i nějakou jinou heterologní nukleovou kyselinu, například molekulu DNA kódující imunomodulační polypeptid kvantitativ-

ně nebo kvalitativně ovlivňující imunitní reakci. Příkladem takových imunomodulačních polypeptidů jsou imunostimulační peptidy, cytokiny jako například IL-2, IL-6 nebo IL-12, chemokiny, toxiny jako například cholerový toxin B nebo adheziny.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají farmaceutické přípravky zahrnující jako aktivní složku nějaký oslabený rekombinantní patogen popsany výše, spolu s (nepovinně) farmaceuticky přijatelnými rozpouštědly, nosiči a adjuvans. Ve výhodném provedení je zmíněným přípravkem živá vakcína. Způsob vakcinace je závislý na volbě vektoru použitého pro vakcinaci. Vakcinace může být provedena ve formě jedné dávky nebo opakovanou aplikací. Vhodné dávkování závisí na různých parametrech jako například charakteru vektoru použitého k vakcinaci nebo na způsobu aplikace. Jedna vakcinační dávka obvykle obsahuje přibližně 10^6 až 10^{12} buněk (CFU – colony forming unit), ve výhodném provedení přibližně 10^8 až 10^{10} buněk (CFU). Může být zvolena aplikace na povrch sliznice (například aplikace oční, intranazální, orální, rektální, vaginální, na sliznici žaludku, střev nebo močových cest) nebo parenterální podání (například subkutánní, intradermální, intramuskulární, intravenózní nebo intraperitoneální). Způsob přípravy živých vakcín zahrnuje formulaci oslabeného patogena ve farmaceuticky účinném množství spolu s farmaceuticky přijatelnými rozpouštědly, nosiči a/nebo adjuvans.

Farmaceutický přípravek podle vynálezu může být formulován v jakékoliv formě, například jako suspenze ve vhodném kapalném nosiči jako například vodě nebo mléce, jako tobolka nebo tableta a podobně. Ve výhodném provedení vynálezu je přípravkem lyofilizovaný produkt, který je před použitím rozsuspendován v kapalném nosiči.

Do rozsahu vynálezu dále spadá způsob přípravy oslabeného rekombinantního patogena popsaného výše, kde tento způsob zahrnuje kroky: a) vložení molekuly nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* do oslabeného patogena, čímž dojde k vytvoření rekombinantního patogena, například transformované bakteriální buňky, který je schopen exprimovat výše zmíněnou molekulu nukleové kyseliny nebo je schopen vyvolat expresi výše zmíněné molekuly nukleové kyseliny v cílové buňce; a b) kultivaci výše zmíněného oslabeného rekombinantního patogena za vhodných podmínek. Je-li patogenem nějaká bakteriální buňka, může být molekula nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* umístěna na mimochromozomálním plazmidu. Je nicméně rovněž možné vložit příslušnou molekulu nukleové kyseliny do chromozomu patogena.

Do rozsahu vynálezu dále spadá způsob identifikace antigenů pocházejících z *Helicobacter*, které v savčím hostiteli vyvolávají ochrannou imunitní reakci. Tento způsob identifikace zahrnuje následující kroky: a) expresi genetického materiálu pocházejícího z *Helicobacter* v oslabeném patogenu; a b) testování schopnosti vyvolat v savčím hostiteli ochrannou imunitu proti infekci *Helicobacter* u takto vytvořených klonů. Ve výhodném provedení je tento proces identifikace prováděn v expresivním systému ovlivněném fází životního cyklu patogena, který umožňuje stabilní expresi všech antigenů pocházejících z *Helicobacter*. Rekombinantní klony mohou být následně aplikovány "společně ve směsi" za účelem orální imunizace pokusných živočichů, jako například myší. Potenciál těchto klonů účinkovat jako ochranné antigeny je následně stanovován infikací mikroorganizmem *Helicobacter*, například kmenem *H. pylori* adaptovaným k infekci myší. Existuje tudíž možnost přímé selekce optimalizovaných vakcín vůči *H. pylori*.

Popis obrázků na výkresech

Vynález je dále ilustrován následujícími obrázky a seznamem sekvencí.

Obrázek 1 je schématickým znázorněním vektoru pYZ97 pro expresi ureázy. V tomto vektoru jsou geny kódující podjednotky UreA a UreB ureázy umístěny pod transkripční kontrolou promotoru T7 ϕ 10. Mezi promotorem T7 a geny kódujícími ureázu se nachází místo odpovědné za vazbu na ribozom (RBS - ribosome binding site). Plazmid dále obsahuje počátek replikace (ori), gen kódující β -laktamázu (bla; selekční marker) v čtyři terminátory T7 v řadě za sebou.

Mimo exprese řízené promotorem T7 může být rovněž, prostřednictvím kryptického promotoru umístěného na plazmidu pYZ97 proti směru transkripce od promotoru T7, vyvolána (s nízkou intenzitou) konstitutivní exprese podjednotek UreA a UreB.

Na obrázku 2 je znázorněna nukleotidová sekvence oblasti regulace transkripce exprese ureázy a začátek aminokyselinové sekvence podjednotky A ureázy na plazmidu pYZ97.

Obrázek 3 je schématickým znázorněním expresivních kazet pYZ88, pYZ84 a pYZ114 RNA polymerázy T7 (T7RNAP), které mohou být integrovány do chromozomů bakterií.

V kazetě pYZ88 s vysokou hladinou exprese je promotor lambda PL umístěn v opačné orientaci proti směru transkripce od genu T7RNAP. Gen kódující teplotně senzitivní represor cI₈₅₇ (cI) je řízen právě tímto promotorem. Terminátor z bakteriofága fd (fdT) je situován proti směru transkripce od genu cI. Gen gin (Mertens, EMBO J., 3:2415 až 2421, 1984) kóduje enzym řídící mechanismus reorganizace DNA. Sekvence DNA kódující tRNA Arg je umístěna po směru transkripce od genu gin.

Ve fázi A je promotor PL odpovědný za expresi genu T7RNAP řízen ve směru genu cI₈₅₇ a genu gin. Důsledkem toho

je skutečnost, že při permissivní teplotě 28°C je produkován aktivní represor a je snížena intenzita transkripce genů řízených promotorem PL. Při vyšší teplotě je intenzita transkripce genů řízených promotorem PL zvýšena, protože při takovém vnějším vlivu je represor alespoň částečně inaktivován. Zmíněné teplotně závislé zvýšení intenzity rovněž vede k odpovídajícímu zvýšení exprese genu *gin*, který jako řídící enzym katalyzuje inverzi promotoru PL a přechod do fáze B, ve které je exprimován gen T7RNAP.

V systému pYZ88 s vysokou hladinou exprese je terminátor transkripce fdT umístěn mezi genem pro rezistenci vůči kanamycinu (*km*) a promotorem zmíněného genu. V tomto uspořádání je potlačena syntéza antisense RNA orientované obráceně vzhledem ke genu T7RNAP, která za normálních okolností připívá ke snížení intenzity exprese T7RNAP. Důsledkem je vysoká exprese T7RNAP.

V systému pYZ84 se střední hladinou exprese je terminátor transkripce fdT umístěn mezi promotorem PL a počátkem genu T7RNAP. V tomto uspořádání je potlačena exprese mRNA pro T7RNAP. Navíc je translace mRNA pro T7RNAP ovlivněna antisense RNA. Důsledkem je dosažení pouze mírné exprese.

V systému pYZ114 s nízkou hladinou exprese je do promotoru PL navíc zavedena delece o délce 100 párů bazí (Δ PL). V tomto uspořádání je aktivita promotoru PL podstatně snížena, což vede k nižší expresi T7RNAP a tudíž k potlačení exprese genu *UreA/B*. U tohoto konstruktu je již pozorován vliv kryptického promotoru pYZ97.

Na obrázku 4 jsou znázorněny výsledky testu ELISA detekujícího protilátky proti *H. pylori* přítomné v intestinální tekutině imunizovaných myší. Prázdný sloupec - neimunizovaná a neinfikovaná kontrolní skupina; šrafovaný sloupec (1) - kontrolní skupina PBS; šrafovaný sloupec (2) - kontrolní skupina *Salmonella*; šrafovaný sloupec (3) - SL3261(pYZ97).

Na obrázku 5 jsou znázorněny výsledky testu ELISA detekujícího protilátky proti *H. pylori* přítomné v séru imunizovaných myší. Prázdný sloupec - neimunizovaná a neinfikovaná kontrolní skupina; šrafovaný sloupec(1) - kontrolní skupina PBS; šrafovaný sloupec (2) - kontrolní skupina Salmonella. Panel A: jako testovací antigen byl použit *H. pylori*, kmen P1 (ureáza⁺). Panel B: jako testovací antigen byl použit *H. pylori*, kmen P11 (ureáza⁻).

Obrázek 6 znázorňuje ureázovou aktivitu v žaludeční tkáni imunizovaných myší po infekci prostřednictvím *H. pylori*.

SEK. ID. Č: 1 a 2 znázorňují nukleotidovou sekvenci genu AlpB pro adhezín z *H. pylori* (SEK. ID. Č: 1) a odpovídající aminokyselinovou sekvenci (SEK. ID. Č: 2) kódovanou tímto genem.

SEK. ID. Č: 3 a 4 znázorňují nukleotidovou sekvenci genu AlpA pro adhezín z *H. pylori* (SEK. ID. Č: 3) a odpovídající aminokyselinovou sekvenci (SEK. ID. Č: 4) kódovanou tímto genem.

SEK. ID. Č: 5 a 6 znázorňují nukleotidovou sekvenci oblasti regulující transkripci genu pro ureázu a počátek aminokyselinové sekvence podjednotky A ureázy v plazmidu pYZ97.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Klonování genů ureA a ureB

Strukturní geny ureA a ureB kódující ureázu byly klonovány z chromozomální DNA klinického izolátu P1 (dříve 69A) izolovaného na University of Amsterdam a poskytnutého Dr. Jos van Puttenem. Tyto geny byly izolovány metodou PCR s využitím dvojice primerů YZ019 (5'-GGAATTCATATGAACTGACTCCCAAAGAG-3') a RH132 (5'-CTGCAGTCGACTAGAAAATGCTAAAGAG). Sekvence zmíněných primerů

byla odvozena ze sekvencí v databázi GenBank (přístupová čísla M60398, X57132). Nukleotidová sekvence primeru YZ019 zahrnuje nukleotidy 2659 až 2679 z publikované sekvence a dále obsahuje regulační sekvenci translace (down stream box; Sprengart M. L. a další, Nuc. Acid. Res., 18:1719 až 1723, 1990) a restrikční místo NdeI. Nukleotidová sekvence primeru RH132 zahrnuje nukleotidy 5071 až 5088 z publikované sekvence a dále pak restrikční místo SalI. Produkt amplifikační reakce měl velikost 2,4 kbp (2400 párů bazí), což zahrnuje celou kódující oblast genů ureA a ureB z chromozomu *Helicobacter*, vyjma počátku transkripce a terminačních sekvencí. Přečištěný fragment vzniklý PCR reakcí byl štěpen restrikčními enzymy NdeI a SalI a vložen do odpovídajících klonovacích míst plazmidu pYZ57 (s promotorem T7), čímž byl vytvořen plazmid pYZ97.

pYZ57 byl původně odvozen z plazmidu pT7-7, který je popsán Taborem (Current Protocols in Molecular Biology, 16.2.1 až 16.2.11, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1990). Do kostry plazmidu pT7-7 byly následující strategie zavedeny v různých místech dva terminátory transkripce: (1) Tandemové terminátory T7. Restrikčními enzymy EcoRI/HindIII byl z plazmidu pEP12 (Brunschwig a Darzins, Gene, 111:35 až 41, 1992) vyštěpen fragment o velikosti 2,2 kbp a tento přečištěný fragment byl zaligován do vektoru pBA (Mauer J. a další, J. Bacteriol., 179:794 až 804, 1997).

Produkt ligační reakce byl rozštěpen enzymy HindIII a ClaI. Vzniklý fragment HindIII/ClaI o velikosti 2,2 kbp byl následně vložen do předem štěpeného plazmidu pT7-7. (2)

Z plazmidu pDS3EcoRV (poskytnul Dr. H Bujard; ZMBH, Heidelberg) byl pomocí HpaI/NdeI vyštěpen fragment o velikosti 220 bp. Následně byly pomocí polymerázy Klenow oba konce tohoto fragmentu zatupeny. Purifikovaný fragment rrnBT1 byl vložen do výše zmíněného plazmidu odvozeného z pT7-7, který byl

nejprve štěpen pomocí BglIII a vzniklé konce byly následně zatupeny polymerázou Klenow. Na obrázku 1 je znázorněn celý vektor pYZ97 použitý k expresi genů kódujících podjednotky UreA a UreB ureázy v *S. typhimurium*. Jak je naznačeno na obrázku 1, geny kódující ureázu se nacházejí pod kontrolou promotoru T7 fága $\phi 10$. Místo pro vazbu na ribozom (RBS) je umístěno mezi promotorem T7 a geny pro ureázu. Tento plazmid dále obsahuje počátek replikace (ori) a gen kódující β -laktamázu (bla; rezistence vůči ampicilinu).

Na rozdíl od exprese řízené promotorem T7 nedochází ke konstitutivní expresi (se střední intenzitou) podjednotek A a B ureázy řízené promotorem pro RNA polymerázu ze *Salmonella*. Tento promotor je na plazmidu pYZ97 umístěn proti směru transkripce od promotoru T7. Za účelem provedení detailní molekulové analýzy byl purifikovaný fragment BglIII/HindIII z plazmidu pYZ97 klonován do pCR-Script™ SK(+) (Amersham) a sekvenován. Sekvenační data potvrdila přítomnost jednotlivých prvků a jejich úplnost (viz. obrázek 2 a SEK. ID. Č: 5 a 6): část genu ureA, regulační sekvenci translace, RBS, promotor T7 a terminátor T1 (rrnBT1). Sekvenční analýza rovněž odhalila oblast mezi terminátorem T1 a promotorem T7, kde je lokalizován promotor RNA polymerázy ze *Salmonella*. Sekvenační data naznačují, že tento konstitutivní promotor, jehož motiv byl odhadnut na základě strukturních predikcí, je umístěn mezi nukleotidy 222 a 245 (Lisser a Margalit, Nuc. Acid. Res., 21:1507 až 1516, 1993).

Příklad 2

Imunologická ochrana prostřednictvím podání živé vakcíny
Materiál a metody

Bakteriální kmeny: Jako recipient plazmidových konstruktů obsahujících ureázu pocházející z *H. pylori* byla použita živá vakcína *S. typhimurium* kmen SL3261. *S. typhimurium*

SL3261 je aroA mutant odvozený z divokého kmene *S. typhimurium* SL3261. *S. typhimurium* SL3261 je nevirulentní kmen, který po orální aplikaci poskytuje myším ochranu proti infekci vyvolané *S. typhimurium* divokého typu (Hoiseth a Stocker, 1981, viz. výše). *S. typhimurium* SL3261 a kmeny z něj odvozené obsahující expresivní plazmid pYZ97 pro ureázu (mimochromozomální) a expresivní kazety T7RNAP pYZ88, pYZ84 nebo pYZ114 (integrované do chromozomu) jsou popsány v tabulce 1. Pro kultivaci bakterií při 28°C byl použit Luria Broth (LB, živný bujón) nebo LB agar. K infekci byl použit kmen *H. pylori* divokého typu kultivovaný při 37°C na miskách se sérem.

Imunizace myší: Myši Balb/c ve stáří 4 týdny, zakoupené od společnosti Interfauna (Tuttlingen, Německo), byly před použitím k experimentům dva týdny adaptovány na podmínky zvěřince. Předimunizační sérum bylo získáno retroorbitálním odběrem 150 μ l krve z každého jedince. Jeden a tři týdny po imunizaci byly retroorbitální odběry u všech pokusných zvířat opakovány.

Při této studii bylo použito osm skupin po pěti jedincích včetně kontrol (tabulka 2). Skupina A - kontrolní skupina, nebyla ani imunizována *Salmonellou* ani infikována *H. pylori* divokého typu. Všechny zbylé skupiny byly imunizovány orálně. Skupina B, negativní kontrolní skupina, nebyla imunizována *Salmonellou*, ale byla infikována *H. pylori* divokého typu. Myši ze skupin C až G byly imunizovány vakcínami *Salmonelly* a infikovány *H. pylori*. Poslední skupina H byla imunizována rekombinantní ureázou B v kombinaci s toxinem cholery a byla rovněž infikována.

Před imunizací byly myši ponechány přes noc bez pevné potravy a 4 hodiny bez vody. Za účelem neutralizace pH v žaludku bylo myším prostřednictvím nerezového ocelového katetru orálně aplikováno 100 μ l 3% roztoku hydrogenuhličí-

tanu sodného. Následně bylo myším ze skupiny B podáno 100 μ l PBS a myším ze skupin C až G $1,0 \times 10^6$ CFU (colony forming unit) mikroorganismů *Salmonella* v celkovém objemu 100 μ l. Myším ve skupině H bylo celkem čtyřikrát v jednotýdenních intervalech aplikováno 100 μ l směsi rekombinantní ureázy B z *H. pylori* spolu s toxinem cholery. Po každé imunizaci byla myším vrácena voda i potrava.

Infikace prostřednictvím *H. pylori*: Čtyři týdny po první orální imunizaci byly myši ze skupin B až H infikovány *H. pylori*. Před vlastním infikací byly myši ponechány přes noc bez pevné potravy a 4 hodiny bez vody. Prostřednictvím nerezového ocelového katetru bylo myším orálně aplikováno 100 μ l 3% roztoku hydrogenuhličitanu sodného a následně pak dávka $5,0 \times 10^9$ CFU mikroorganismů *Helicobacter pylori*. Po infekci byla myším vrácena voda i potrava.

Odebírání krve a tkáně myším: Dvanáct týdnů po první imunizaci byly myši ponechány přes noc bez pevné potravy a následně usmrceny za účelem analýzy stupně ochrany a imunitní reakce. Finální odebrání krve přímo ze srdce a usmrcení zlomením vazů bylo prováděno v narkóze navozené podáním methoxyfluoranu. Za aseptických podmínek byly každé myši opatrně odejmuty slezina a žaludek a tyto orgány byly až do dalšího zpracování umístěny na led do jednotlivých sterilních nádob. Za účelem izolace intestinální tekutiny byly myším odebrány tenké a tlusté střevo.

Zpracování žaludku a měření ureázové aktivity: Stupeň kolonizace myšího žaludku *H. pylori* byl stanovován na základě přítomnosti aktivní ureázy v této tkáni. K tomuto účelu byl použit Jatrox-test (Rohm-Pharma GmbH, Weiterstadt, Německo). Žaludeční sliznice byla exponována a promyta PBS a polovina antrální části žaludku byla okamžitě umístěna do mikrozkuřavky Eppendorf obsahující substrát pro měření ureázové aktivity. Po 4 hodinové inkubaci při pokojové teplotě

byla změřena absorbance při vlnové délce 550 nm. Zbytek žaludeční tkáně byl před dalšími experimenty skladován při -20°C. Hodnoty ureázové aktivity získané ze žaludků myší, které nebyly imunizovány ani infikovány *H. pylori*, byly použity ke stanovení referenční hladiny označující absenci infekce *H. pylori* a tudíž ochranu živočichů.

Tabulka 1

Kmeny vakcíny na bázi *S. typhimurium* exprimující UreA a UreB

Kmeny	Exprese ureázy	Zdroj
<i>S. typhimurium</i> SL3261	negativní	Hoiseth a Stocker
<i>S. typhimurium</i> SL3261 pYZ97	Konstitutivní Nízká	tato studie
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ88pYZ97	Vysoká hladina exprese indukovaná T7	tato studie
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ84pYZ97	Střední hladina exprese indukovaná T7	tato studie
<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ114pYZ97	Nízká hladina exprese indukovaná T7	tato studie

Tabulka 2

Skupiny myší použitých k imunizaci

Skupina	Imunogen	Počet orálních imunizací
A	Žádný	0
B	orální imunizace PBS	1
C	<i>S. typhimurium</i> SL3261	1
D	<i>S. typhimurium</i> SL3261 pYZ97	1
E	<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ88pYZ97	1
F	<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ84pYZ97	1
G	<i>S. typhimurium</i> SL3261::pYZ114pYZ97	1
H	Ureáza B spolu s toxinem cholery	4

Výsledky:

U 100% myší z kontrolních skupin (skupiny B a C) byla pozorována infekce *H. pylori*. U myší imunizovaných rekombinantními oslabenými patogeny (skupiny D, E, F, G) byla pozorována infekce v intervalu 0% až 60% případů (100% až 40% ochrana). Imunologická ochrana nekorelovala s humorální odpovědí proti UreA a UreB což naznačuje, že mimo humorální imunity je k ochraně proti infekci *H. pylori* nezbytná buněčná imunita. Získané výsledky naznačují, že orální imunizace myší prostřednictvím UreA a UreB aplikovaných oslabeným kmenem *S. typhimurium* je účinná při indukci intenzivní ochranné reakce proti kolonizaci žaludku *H. pylori*.

U myší imunizovaných rekombinantní ureázou B spolu s toxinem cholery byla za výše uvedených experimentálních podmínek pozorována podstatně vyšší ureázová aktivita, než tomu bylo při aplikaci oslabených rekombinantních patogenů podle vynálezu.

Výsledky testování ureázové aktivity jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Skupina	Myš	E _{550nm, 4h}	E _{4h} - E _{kontrolní}	E _{kor.} *3	Ředění
A	1	0,085	-0,022	-0,066	200µl+400µl
A	2	0,091	-0,016	-0,048	200µl+400µl
A	3	0,116	0,009	0,027	200µl+400µl
A	4	0,099	-0,008	-0,024	200µl+400µl
A	5	0,101	-0,006	-0,018	200µl+400µl
Kontrola		0,107	0	0	200µl+400µl
B	1	0,394	0,292	0,876	200µl+400µl
B	2	0,464	0,362	1,086	200µl+400µl
B	3	0,329	0,227	0,681	200µl+400µl
B	4	0,527	0,425	1,275	200µl+400µl
B	5	0,462	0,36	1,08	200µl+400µl
Kontrola		0,102	0	0	200µl+400µl
C	1	0,248	0,145	0,435	200µl+400µl
C	2	0,369	0,266	0,798	200µl+400µl
C	3	0,209	0,106	0,318	200µl+400µl
C	4	0,219	0,116	0,348	200µl+400µl
C	5	0,24	0,137	0,411	200µl+400µl
Kontrola		0,103	0	0	200µl+400µl
D	1	0,143	0,002	0,004	300µl+300µl
D	2	0,156	0,015	0,03	300µl+300µl
D	3	0,142	0,001	0,002	300µl+300µl
D	4	0,114	-0,027	-0,054	300µl+300µl
D	5	0,133	-0,008	-0,016	300µl+300µl
Kontrola		0,141	0	0	300µl+300µl
E	1	0,127	0,027	0,081	200µl+400µl
E	2	0,094	-0,006	-0,018	200µl+400µl
E	3	0,099	-0,001	-0,003	200µl+400µl
E	4	0,161	0,061	0,183	200µl+400µl
E	5	0,198	0,098	0,294	200µl+400µl
Kontrola		0,1	0	0	200µl+400µl
F	1	0,166	0,025	0,05	300µl+300µl
F	2	0,145	0,004	0,008	300µl+300µl
F	3	0,166	0,025	0,05	300µl+300µl
F	4	0,154	0,013	0,026	300µl+300µl
F	5	0,301	0,16	0,32	300µl+300µl
Kontrola		0,141	0	0	300µl+300µl
G	1	0,084	-0,019	-0,057	200µl+400µl
G	2	0,087	-0,016	-0,048	200µl+400µl
G	3	0,269	0,166	0,498	200µl+400µl
G	4	0,085	-0,018	-0,054	200µl+400µl
G	5	0,092	-0,011	-0,033	200µl+400µl
Kontrola		0,103	0	0	200µl+400µl
H	1	0,638	0,531	1,593	200µl+400µl
H	2	0,282	0,175	0,525	200µl+400µl
H	3	0,141	0,034	0,102	200µl+400µl
H	4	0,135	0,028	0,084	200µl+400µl
H	5	0,171	0,064	0,192	200µl+400µl
Kontrola		0,107	0	0	200µl+400µl

Příklad 3

Konstrukce a molekulová analýza různých rekombinantních kmenů *S. typhimurium* exprimujících podjednotky UreA/UreB.

Popis kmenů *S. typhimurium* použitých při imunizacích.

S. typhimurium SL3261(pYZ97) (konstrukt A): Jako příjemce plazmidového konstruktu obsahujícího rekombinantní ureázu (pYZ97) byl použit vektor živé vakcíny kmene *S. typhimurium* SL3261.

S. typhimurium SL3261: :série YZ (pYZ97) (konstrukt B): Tyto kmeny použité jako vektory jsou odvozeny z kmene *S. typhimurium* SL3261, který byl doplněn o expresivní kazety RNA polymerázy T7 (T7RNAP) schématicky znázorněné na obrázku 3. Tyto expresivní kazety kódují gen pro T7RNAP, který je exprimován ve dvoufázovém režimu ("zapnuto/vypnuto"), jak je popsáno v patentové přihlášce Yan a další ("Two phase system for the production and presentation of foreign antigens in hybrid live vaccines", PCT/EP91/02478). Použitá kazeta může být integrována do chromozomu bakterie a této buňce může tedy v režimu "zapnuto" dodávat optimální množství T7RNAP pro aktivaci expresivních plazmidů závislých na T7RNAP (jako například pYZ97).

Principem kazety YZ84 je přítomnost promotoru PL fága lambda umístěného na fragmentu, který může být invertován invertázou Gin fága Mu (Yan a Meyer, J. Biotechnol., 44:197 až 201, 1996). V závislosti na orientaci promotoru PL je buď exprimován gen gin (režim "vypnuto") nebo gen pro T7RNAP (režim "zapnuto"). V plazmidu YZ84 jsou obsaženy následující regulační prvky: (1) Teplotně senzitivní represor fága lambda cI_{ts} (cI), který při teplotě 28°C blokuje promotor PL, a který při 37°C tento promotor blokovat přestává; (2) Terminátor fd (fdT) snižující expresi genu gin tak, aby bylo dosaženo mírné úrovně inverze promotoru PL na fragmentu, který může být invertován.

Dvoufázový expresivní systém umožňuje vysokou hladinu exprese cizorodých antigenů, jako například podjednotek A a B ureázy. Je dobře známo, že vysoká úroveň exprese cizorodých antigenů snižuje životaschopnost vektoru *Salmonella* a potlačuje tudíž imunitní reakci a z toho důvodu i ochranný potenciál vakcíny. Bylo prokázáno, že zmíněný dvoufázový systém má přirozenou schopnost zvýšit životaschopnost rekombinantních *Salmonell* exprimujících velké množství cizorodého antigenu. V konstruktu B je exprese genů *ureA* a *ureB* řízena především silným promotorem T7, což má za následek vysokou hladinu exprese těchto podjednotek ureázy. Je-li expresivní kazeta pro T7RNAP v pozici "vypnuto" a není-li tedy přítomna žádná T7RNAP, jsou geny *ureA* a *ureB* konstitutivně exprimovány v menších množstvích a tato exprese je řízena promotorem *Salmonelly*.

Analýza podjednotek UreA/B produkovaných různými kmeny *S. typhimurium* použitými k imunizačním experimentům.

Konstrukty A a B *S. typhimurium* byly nejprve analyzovány na SDS-polyakrylamidových gelech za účelem zjištění, zda-li exprimují podjednotky UreA a UreB. Rekombinantní kmeny byly při 37°C kultivovány v kapalném LB médiu (zaočkovaném z kultury pěstované přes noc) doplněném ampicilinem na koncentraci 100 µg/ml. V exponenciální fázi růstu byly bakterie zcentrifugovány, získaná buněčná peleta byla rozsuspendována v pufru 10 mM Tris-HCl a 10 mM EDTA (pH 8,0) a hustota buněk byla ve všech případech upravena na hodnotu $A_{590} = 1$. Takto získaná bakteriální suspenze byla smíchána se stejným objemem vzorkového pufru (Sambrook J. a další, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) a povařena po dobu 5 minut. 20 µl této suspenze bylo nanášeno na dva 10% SDS-polyakrylamidové gely; jeden gel byl barven modří

Coomassie a proteiny z druhého gelu byly elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu a dále zpracovány metodou Western blot. Nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny byla 45 minut při pokojové teplotě blokována v 10% (w/v) roztoku odtučněného mléka ve fyziologickém roztoku pufovaném Tris-HCl (TBS; 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2). Po třech promytích v TBS-0,05 % (v/v) Tween-20 byla nitrocelulózová membrána inkubována přes noc při 4°C s králičí protilátkou proti UreB (AK201) v ředění 1:2000 v 5% (v/w) roztoku odtučněného mléka v TBS. Použité sérum bylo získáno k králíka imunizovaného rekombinantní podjednotkou B ureázy přečištěnou afinitní chromatografií. Membrána byla třikrát po dobu 10 minut promývána roztokem 0,05 % (v/v) Tween-20 v PBS a následně po dobu 45 minut při pokojové teplotě inkubována s kozí protilátkou proti králičím IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou v 5% (w/v) roztoku odtučněného mléka v TBS. Po třech promytích roztokem 0,2% (v/v) Tween-20 (za podmínek popsaných výše) byla membrána obarvena za použití soupravy ECL (Amersham, Německo) postupem doporučeným výrobcem.

Konstrukt A: Na gelu barveném Coomassie byly v celkovém buněčném lyzátu konstruktu A (*S. typhimurium* kmen SL3261(pYZ97)) pozorovány proužky proteinů o velikosti 67 kDa a 30 kDa; tyto molekulové hmotnosti odpovídají podjednotce UreB, respektive UreA. V kontrolních drahách obsahujících celkový lyzát ze *S. typhimurium* kmen SL3261 nebyly tyto proteiny pozorovány. Analýza stejných proteinových vzorků metodou Western blot za použití králičí protilátky proti UreB potvrdila, že proužek o velikosti 67 kDa pozorovaný na gelu barveném Coomassie je skutečně UreB. Exprese UreB prostřednictvím *S. typhimurium* kmene SL3261(pYZ97) byla rovněž stanovována v různých fázích růstu kultivací po dobu 2, 6 a 11 hodin při 37°C. Ve všech fázích růstu, včetně stacionární

fáze, byla pozorována exprese UreB. V časných fázích růstu byla tato exprese nicméně vyšší. Výsledky získané z experimentů s kmenem SL3261(pYZ97) naznačují, že proteiny UreA a UreB jsou pro *Salmonelly* netoxické a při 37°C mohou být exprimovány v jakékoliv fázi bakteriálního růstu.

Konstrukt B: Podobná analýza byla provedena i u konstruktu B. Srovnání obou konstruktů analýzou SDS-PAGE odhalilo, že konstrukt B produkuje vysoké hladiny UreA a UreB, zatímco konstrukt A se vyznačuje nepřiliš velkou expresí těchto proteinů. V průběhu růstu konstruktu B je v delším časovém úseku exprese UreA a UreB konstantně vysoká, a to i bez selekce antibiotiky. Tato skutečnost potvrzuje výjimečnou produktivitu konstruktu B ve srovnání s konstruktem A.

V souhrnu získaná data naznačují, že polypeptidy UreA a UreB pocházející z *H. pylori* mohou být exprimovány v *S. typhimurium*, aniž by na tyto producenty měly negativní vliv, a jsou tudíž, jsou-li aplikovány prostřednictvím vektorů *Salmonella*, vhodné pro experimenty zkoumající imunologickou ochranu živočichů.

Stabilita plazmidů

Stabilita plazmidů je nezbytná k zajištění stabilní exprese antigenů kódovaných geny, které byly do těchto plazmidů klonovány.

Stabilita plazmidů in vitro: Jako indikátor stability plazmidu byl využit marker rezistence vůči ampicilinu přítomný na plazmidu pYZ97 a nevyskytující se v baktériích *S. typhimurium* SL3261, které tento plazmid neobsahují. *S. typhimurium* kmen SL3261 byl kultivován při teplotě 28°C v kapalném LB médiu a to až do 100 generace (viz. dřívější publikace Summers D. K. a Sherrat D. J., Cell, 36:1097 až 1103, 1984). Každou desátou generaci byl stanovován počet CFU (colony forming unit; počet bakterií schopných vytvořit

kolonii na LB agaru) rezistentních vůči ampicilinu vzhledem k celkovému počtu CFU. Zmíněné stanovení bylo prováděno vyšetím mikroorganismů *Salmonella* ve stejných ředěních na misky s LB agarem bez ampicilinu a na misky s LB agarem doplněným ampicilinem na koncentraci 100 µg/ml.

Stabilita plazmidů in vivo: Stabilita plazmidů in vivo byla analyzována určením celkového počtu CFU a počtu CFU rezistentních vůči ampicilinu ze slezin myší, a to druhý a sedmý den po orální infekci těchto myší prostřednictvím *S. typhimurium* SL3261(pYZ97) v množství $5,0 \times 10^9$ CFU. Myši byly *Salmonellou* infikovány orální cestou postupem popsaným výše. Druhý a sedmý den po infekci byly myši v narkóze navozené methoxyfluoranem usmrceny a za účelem dalšího zpracování jim byla sterilně odebrána slezina. Sleziny byly následně v Petriho miskách rozřezány na malé kousky, smíchány s 1 ml ledově studené deionizované vody a slezinné buňky byly rozsuspendovány několikanásobným protažením přes jehlu o průměru 1 mm. Získaná buněčná suspenze byla poté vyseta na misky s LB agarem s nebo bez ampicilinu v koncentraci 100 µg/ml. Misky byly přes noc inkubovány při 37°C a následující den byl stanoven počet kolonií.

Stabilita plazmidů in vivo byla analyzována po infekci myší jednou orální dávkou *S. typhimurium* SL3261(pYZ97) v množství $5,0 \times 10^9$ CFU. Druhý a sedmý den po infekci byly myším odebrány sleziny a slezinné buňky byly za účelem kvantifikace celkového počtu CFU a CFU rezistentních vůči ampicilinu vysety na misky s LB agarem. Ze slezin odebraných po 48 hodinách bylo izolováno $2,0 \times 10^4$ CFU rezistentních vůči ampicilinu (tabulka 4). Sedmý den po imunizaci se počet CFU snížil na 56, nicméně všechny byly opět rezistentní vůči ampicilinu. Získaná data naznačují, že plazmid pYZ97 je v mikroorganismu *Salmonella* stabilní jak za podmínek in vitro tak in vivo, a je tudíž vhodný k charakterizaci pod-

jednotek ureázy coby ochranných antigenů vůči kolonizaci žaludku myší prostřednictvím *H. pylori*. Malý počet kolonií kmene *Salmonella* SL3261 získaný sedmý den po infekci potvrzuje, že tento kmen je oslabený, což umožňuje jeho bezpečné použití k aplikaci ureázy do organismu myší.

Tabulka 4

Počet kolonií kmene *S. typhimurium* SL3261pYZ97 ze slezin myší a hodnocení stability plazmidu pYZ97 in vivo.

Doba po infekci	Celkový počet CFU ^a	Procento Amp ^r CFU ^b
2 dny	$2,0 \times 10^7$	100
7 dní	56	100

^a Počet CFU *S. typhimurium* (ze slezin myší dva a sedm dní po orální aplikaci $5,0 \times 10^9$ CFU *S. typhimurium* SL3261pYZ97) izolovaných z misek s LB agarem bez přídavku antibiotika.

^b Procentuální zastoupení CFU rezistentních vůči ampicilinu v celkovém počtu CFU izolovaných ze slezin myší.

Tabulka 5

Stanovení ureázové aktivity a počtu *H. pylori* rezistentních vůči streptomycinu v žaludku myší imunizovaných *Salmonellou* exprimující UreA a UreB

Skupina myší	Počet	Ureázová aktivita ^a	CFU ^b
Neinfikovaná kontrolní skupina	5	$0,058 \pm 0,004$	0 ± 0
Kontrolní skupina PBS	5	$0,427 \pm 0,059$	$2,7 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$
SL3261pYZ97 ^c	5	$0,057 \pm 0,006$	$62,6 \pm 97,3$

^a Ureázová aktivita je uvedena ve tvaru průměr $\pm$ směrodatná odchylka.

^b Stanovení CFU kmene *H. pylori* P76 rezistentních vůči streptomycinu bylo provedeno vysetím části žaludku na misky ze sérem s přidavkem streptomycinu v koncentraci 200 µg/ml. *H. pylori* byly identifikovány na základě morfologie kolonií, ureázové aktivity a pozorováním světelným mikroskopem. Hodnoty jsou uvedeny ve tvaru CFU ± standardní odchylka.

^c Myši imunizované kmenem *S. typhimurium* SL3261pYZ97 exprimujícím *UreA* a *UreB* pocházející z *H. pylori* (jak je popsáno v oddíle Materiál a Metody).

Příklad 4

Experimenty stanovující na myším modelu míru ochrany proti infekci *H. pylori*, a to s využitím různých rekombinantních kmenů *S. typhimurium* exprimujících podjednotky *UreA/UreB*.

Popis kmenů *Helicobacter pylori* použitých při experimentech.

Kmen *H. pylori* P11 deficientní v ureázové aktivitě je odvozen z kmene P1 mutagenezí využívající minitranspozon TnMax5 (transposon shuttle mutagenesis), postupem popsáným v přihlášce autorů Haas a další ("Verfahren zur Identifizierung sekretorischer Gene aus *Helicobacter pylori*"; PCT/EP96/02544). Inzerce minitranspozonu TnMax5 na 3'-konec genu *UreA* měla za následek defektní expresi genů *ureA* a *ureB*, a to vzhledem k jejich propojené transkripci.

Kmen *H. pylori* P49 adaptovaný na organizmus myši byl původně vytvořen Dr. J. G. Foxem (MIT, Boston, MA) z izolátu získaného z koček. Kmen *H. pylori* P76 je kmen rezistentní vůči streptomycinu, odvozený z kmene P49 metodou homologní rekombinace s chromozomální DNA kmene *H. pylori* NCTC11637 rezistentního vůči streptomycinu, popsáného v publikaci autora P. Nedenskov-Sorensen (J. Infect. Dis., 161:365 až 366, 1990).

Všechny kmeny *H. pylori* byly kultivovány při 37°C v mikraaerobní atmosféře (5% O₂, 85% N₂ a 10% CO₂) na miskách se sérem (Odenbreit S. a další, J. Bacteriol., 178:6960 až 6967, 1996) doplněným (tam kde to bylo žádoucí) streptomycinem v koncentraci 200 µg/ml.

Profylaktická imunizace myší.

Imunizační experimenty byly prováděny za účelem testování schopnosti UreA a UreB aplikovaných ve vektoru *Salmonella* ochránit myši před kolonizací žaludku mikroorganismy *H. pylori*. Celkem bylo provedeno pět nezávislých imunizačních experimentů. Při každém experimentu bylo použito pět skupin myší o pěti jedincích: (1) neinfikovanou kontrolní skupinou byly myši, které nebyly ani imunizovány *Salmonellami*, ani infikovány *H. pylori* P49 divokého typu nebo odvozeným kmenem P76 rezistentním vůči streptomycinu; (2) kontrolní skupinu PBS tvořily myši, které nebyly imunizovány (byl jim aplikován PBS), a které byly orálně infikovány *H. pylori*; (3) kontrolní skupinu *Salmonella* tvořily myši, které byly imunizovány oslabeným kmenem *S. typhimurium* SL3261 a infikovány *H. pylori*; a (5) imunizovanou skupinou *Salmonella* byly myši imunizované odpovídajícím rekombinantním konstruktem *S. typhimurium* (A + B) exprimujícím UreA a UreB a následně infikované *H. pylori*.

Před imunizací byly myši ponechány přes noc bez pevné potravy a 4 hodiny bez vody. Za účelem neutralizace pH v žaludku bylo myším prostřednictvím nerezového ocelového katetru orálně aplikováno 100 µl 3% roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Okamžitě po neutralizaci žaludku bylo myším z kontrolní skupiny PBS aplikováno 100 µl PBS a myším z kontrolní skupiny *Salmonella* bylo aplikováno 5,0 x 10⁹ CFU *S. typhimurium* kmene SL3261 a myším z imunizované skupiny *Salmonella* bylo aplikováno 5,0 x 10⁹ CFU jednotlivých rekom-

binantních konstruktů v celkovém objemu 100 μ l. Po imunizaci byl myším opět obnoven přísun potravy a vody.

Čtyři týdny po imunizaci byly myši z kontrolní skupiny PBS, z kontrolní skupiny Salmonella a myši z imunizované skupiny Salmonella infikovány $1,0 \times 10^9$ CFU H. pylori. Před infikací byly myši ponechány přes noc bez pevné potravy a 4 hodiny bez vody. Po orální aplikaci $1,0 \times 10^9$ CFU H. pylori kmene P49 nebo P76 bylo myším podáno prostřednictvím nerezového ocelového katetru orálně 100 μ l 3% roztoku hydrogenuhlitanu sodného. Po infikaci byl myším opět obnoven přísun potravy a vody.

Příklad 5

Imunologické analýzy profylaktické imunizace prováděné s využitím různých rekombinantních kmenů S. typhimurium exprimujících podjednotky ureA/ureB na myším modelu.

Odběr krve a intestinální tekutiny myší za účelem sérologických analýz.

U všech myší byla ve vzorcích krve a intestinální tekutiny stanovována intenzita protilátkové reakce. Před imunizací a tři týdny po imunizaci (před infikací prostřednictvím Helicobacter) bylo myším retroorbitálně odebráno 150 μ l krve. Poslední odběr byl proveden 11 týdnů po imunizaci Salmonellou (6 týdnů po infikaci) nabodnutím srdečního svalu za anestézie metoxyfluoranem. Na konci experimentu byla myším odebrána tenká střeva a tato dále (s menšími úpravami) zpracována postupem popsáním dříve (Elson C. O. a další, J. Immunol. Meth., 67:101 až 108, 1984). Stručně vzato, obsah střev byl odstraněn promytím 2 ml roztoku 50 mM EDTA (Riedel), pH 7,5 obsahujícího inhibitor trypsinu ze sójových bobů (Sigma) v koncentraci 0,1 mg/ml. Celkový objem byl pomocí 0,15 M NaCl upraven na 5 ml. Vzorky byly intenzívně vortexovány, centrifugovány 10 minut při 2500 otáčkách za

minutu (Heraeus, Německo) a k supernatantům bylo přidáno 50 μ l 100 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF; Serva) v 95% ethanolu. Poté následovala centrifugace při 13000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě 4°C (Hermes). K takto získaným supernatantům bylo přidáno 50 μ l 100 mM PMSF a 50 μ l 2% azidu sodného (Merck) a tyto vzorky byly před přidávkem 250 μ l 7% bovinního sérového albuminu (Biomol) ponechány 15 minut na ledu. Poté byly vzorky až do dalšího použití uskladněny při -20°C.

Analýza protilátek z myšího séra a střevní mukózy namířených proti ureáze prováděná metodou ELISA.

Je známo, že orální imunizace Salmonellou vyvolává protilátkovou odpověď s imunoglobuliny typu IgA. Reakce typu IgA vůči podjednotkám ureázy byla stanovována metodou ELISA, a to u myší imunizovaných *S. typhimurium* (konstrukty A + B) a u kontrolní skupiny myší. Rozpustné extrakty *H. pylori* P1 a odvozeného mutantního kmene P11 deficientního v ureázové aktivitě byly připraveny sonikací (Branson, Danbury, Conn.) ve fyziologickém roztoku pufovaném fosforečnanovým puforem pětikrát v 5 sekundových intervalech (35% pulsů) po dobu 45 sekund. Získaná suspenze byla po dobu 10 minut centrifugována (Heraeus, Německo) při 13000 otáčkách za minutu a teplotě 4°C, čímž byly odstraněny nerozbité buňky. Po stanovení obsahu proteinů soupravou BioRad byl získaný supernatant použit jako antigen. 96-jamkové mikrotitrační destičky (Nunc, Německo) byly potaženy 50 μ l antigenu v koncentraci 50 μ g/ml v uhličitanovém pufru, pH 9,6, a inkubovány přes noc při teplotě 4°C. Jamky byly po dobu 45 minut při pokojové teplotě blokovány 1,0% (w/v) odtučněným mlékem ve fyziologickém roztoku pufovaném Trisem (TBS) a následně třikrát promyty v TBS-0,05% Tween 20. Při stanovení (prováděném v triplikátech) bylo 50 μ l séra (v ředění 1:100) nebo výplachu střev (v ředění 1:2) v 0,5% (w/v) odtučněném mléku-TBS

umístěno do jamek a ponecháno přes noc při 4°C. Následně byly jamky třikrát promyty v TBS-0,05% Tween 20 a do všech jamek byla přidána kozí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma, ředění 1:3000) namířená proti myším IgA. Inkubace probíhala přes noc při 4°C. Barevná reakce probíhala při 37°C po dobu 30 minut a jako substrát byl použit orthofenylendiamin spolu s peroxidem vodíku v pufru octanu sodného. Reakce byla zastavena přidavkem 10 N H₂SO₄ a na čtečce destiček (Digiscan, Asys Hitech GmbH, Rakousko) byla stanovena absorbance při vlnové délce 492 nm.

Slizniční protilátky: (Konstrukt A) Z každé myši usmrčené na konci experimentu byla odebrána intestinální tekutina (šest týdnů po infekci H. pylori) a za použití celkových buněčných extraktů H. pylori divokého typu (P1) a mutantního kmene H. pylori deficientního v ureázové aktivitě (P11) byla tato intestinální tekutina testována na přítomnost protilátek namířených proti ureáze. Jak ukazuje obrázek 4, protilátková odpověď typu IgA proti extraktu H. pylori divokého typu byla u imunizovaných myší 10-ti násobně vyšší než u myší neimunizovaných nebo u myší, které nebyly infikovány. Slizniční protilátková odpověď IgA vůči mutantnímu kmeni H. pylori deficientnímu v ureázové aktivitě byla u všech myší velmi nízká což naznačuje, že většina protilátkové odpovědi typu IgA ve střevě imunizovaných myší byla namířena proti ureáze.

Sérové protilátky: (Konstrukt A) Hladina sérových protilátek typu IgA namířených proti H. pylori divokého typu a kmenu H. pylori deficientnímu v ureázové aktivitě byla stanovena před imunizací, tři týdny po imunizaci (před infekcí) a 10 týdnů po imunizaci (6 týdnů po infekci H. pylori). Jak lze vidět z obrázku 5 (panel A), u myší imunizovaných S. typhimurium (konstrukt A) exprimujícím ureázu (konstrukt A) byla koncentrace protilátek proti H. pylori divokého typu

tři týdny po imunizaci 20-ti násobně a 10 týdnů po imunizaci 34-násobně vyšší než v séru před imunizací. Protilátková odpověď typu IgA (v séru) vůči kmenu *H. pylori* deficientnímu v ureázové aktivitě byla ve třetím a 10 týdnu u všech skupin myší, včetně myší imunizovaných konstruktem A S. typhimurium, nízká (obrázek 5, panel B), což naznačuje, že převážná část protilátkové odpovědi typu IgA je u imunizovaných myší namířena proti podjednotkám ureázy. Nízké hladiny sérových protilátek namířených proti *H. pylori* divokého typu byly rovněž pozorovány u neimunizovaných myší v desátém týdnu což naznačuje, že infekce prostřednictvím *H. pylori* provedená tři týdny dříve byla dostačující k indukci specifické protilátkové odpovědi u těchto myší. Odpověď typu IgA vůči *H. pylori* divokého typu byla ve třetím týdnu po imunizaci prostřednictvím S. typhimurium SL3261 (kontrolní skupina Salmonella) mírně zvýšená. Tato skutečnost může být vysvětlena přítomností antigenů u zástupců Salmonella, jež jsou schopny indukovat produkci protilátek křížově reagujících s *H. pylori*. Naproti tomu protilátková reakce vůči kmenu *H. pylori* deficientnímu v ureázové aktivitě byla u imunizovaných myší stejně nízká jako u myší neimunizovaných (obrázek 5, panel B). Tento výsledek naznačuje, že protilátková odpověď pozorovaná u imunizovaných myší je převážně namířena vůči ureáze. V séru myší kontrolní skupiny PBS nebo myší imunizovaných S. typhimurium SL3261 byla v 10. týdnu pozorována nízká intenzita protilátkové odpovědi proti mutantu *H. pylori* deficientnímu v ureázové aktivitě což naznačuje, že pozorovaná protilátková reakce je specifickou imunitní odpovědí vůči antigenům *H. pylori* aplikovaným těmto myším při infekci provedené o tři týdny dříve. Slabá protilátková reakce proti kmenu *H. pylori* deficientnímu v ureázové aktivitě byla ve třetím týdnu pozorována u myší imunizovaných Salmonellou exprimující ureázu i u myší imunizovaných Salmonellou ureázu

neexprimující, ale nebyla pozorována u myší z kontrolní skupiny PBS. Tato skutečnost potvrzuje přítomnost křížově reagujících epitopů v proteinech pocházejících ze *Salmonelly* a *H. pylori*. (Konstrukt B): Při sérologických analýzách myší imunizovaných sérií konstruktů B bylo dosaženo podobných výsledků což naznačuje, že větší produkce antigenů rekombinantními zástupci *Salmonella* výrazně nezesiluje protilátkovou odpověď.

Analýza myších sérových protilátek proti ureáze metodou imunoblotu.

Byla analyzována exprese *UreA* a *UreB* v *S. typhimurium* nezbytná k indukci specifické imunitní odpovědi u myší. Identifikace in vivo exprese *UreA* a *UreB* byla provedena sledováním protilátek proti *UreA* a *UreB* v séru myší imunizovaných *Salmonellou* (konstrukt A) a myší z kontrolních skupin. Antigeny z celých buněk *H. pylori* byly připraveny z *H. pylori* kmene P1 divokého typu. Baktérie byly sebrány ze tří misek se sérem, rozsuspendovány v PBS a centrifugovány při 5000xg po dobu 10 minut. Získaná buněčná peleta byla rozsuspendována v pufru o složení 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8,5, a ve všech případech byla buněčná hustota upravena na standardní hodnotu $A_{590}=1,0$. Tato bakteriální suspenze byla smíchána se stejným objemem vzorkového pufru s SDS (Sambrook, 1989) a vařena po dobu 5 minut. Na 10% SDS-polyakrylamidový gel bylo nanášeno 20 μ l takto připraveného vzorku. Následně byly proteiny přebírány (elektropřenos) na nitrocelulózovou membránu a tato byla rozřezána na proužky, které byly po dobu 45 minut při pokojové teplotě blokovány v 10% (w/v) odtučněném mléce v TBS (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7,2). Po trojnásobném promytí roztokem TBS-0,05% (v/v) Tween-20 bylo k proužkům membrány přidáno, v ředění 1:80, myší sérum v 5% (w/v) odtučněném mléce v TBS a inkubace probíhala přes noc při 4°C. Séra byla získána

z neimunizovaných myší a myší imunizovaných *Salmonellou*. Po třech promytích byly proužky nitrocelulózové membrány inkubovány s kozí protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou namířenou proti myším IgG (Sigma) v ředění 1:3000 v 5% (w/v) odtučněném mléce v TBS. K obarvení byla, postupem doporučeným výrobcem, použita chemiluminiscenční souprava ECL (Amersham, Německo).

Séra z imunizovaných a neimunizovaných myší byla získána 3 týdny po imunizaci (před infekcí *H. pylori*) a tato séra byla testována s využitím buněčných lyzátů kmene P1 *H. pylori* divokého typu exprimujícího UreA a UreB. Při použití séra myší imunizovaných konstruktem A byly identifikovány proteiny o velikosti 67 kDa a 30 kDa, což odpovídá podjednotkám UreB (67 kDa) a UreA (30 kDa). Zmíněné proužky nebyly porovnány na membránách inkubovaných se sérem z neimunizovaných myší nebo myší imunizovaných pouze *Salmonellou* což naznačuje, že ureáza exprimovaná kmenem *Salmonella* použitým k vakcinaci byla schopna indukovat specifickou protilátkovou odpověď vůči UreA i UreB pocházející z kmene *H. pylori* divokého typu. Obdobné výsledky byly získány za použití konstruktu B.

Příklad 6

Stanovení kolonizace žaludku mikroorganizmem *H. pylori* u myší imunizovaných různými rekombinantními kmeny *S. typhimurium* exprimujícími podjednotky ureA/ureB na myším modelu *H. pylori*.

Zpracování žaludků a měření ureázové aktivity.

Testování ureázové aktivity: Analýza stupně ochrany vůči kolonizaci žaludku mikroorganizmem *H. pylori* byla prováděna měřením ureázové aktivity v antrální části žaludku myší. Měření ureázové aktivity je velmi spolehlivou, citlivou a specifickou metodou ke stanovení infekce mikroorganizmem *H.*

pylori (Konzervativní vývoj *Helicobacter pylori* při onemocnění žaludečními vředy. 1994. *Helicobacter pylori* při onemocnění žaludečními vředy. JAMA, 272:strana 65) a je rutinně používáno při klinických stanoveních (Kawanishi M. S. a další, J. Gastroenterol., 30:16 až 22, 1995; Kamiya S. a další, Eur. J. Epidemiol., 9:450 až 452, 1993; Conti-Nibali S. a další, Am. J. Gastroenterol., 85:1573 až 1575, 1990) a při výzkumu prováděném na zvířatech (Gottfried M. R. a další, Am. J. Gastroenterol., 85:813 až 818, 1990). Jatrox-test (Rhon-Pharma GmbH, Weiterstadt, Německo) byl použit v souladu s doporučením výrobce. Jedenáct týdnů po imunizaci *Salmonellou* byly myši usmrceny a za aseptických podmínek jim byly opatrně odejmuty žaludky. Každý žaludek byl umístěn do ledového PBS ve sterilní nádobě a řezem podél malého zakřivení provedeného sterilním ostřím byla obnažena sliznice. Za účelem odstranění zbytků potravy byl žaludek propláchnut PBS a rozříznut tak, aby byla oddělena antrální část od těla žaludku. Polovina antrální části žaludku byla okamžitě umístěna do mikrozkuřavky Eppendorf obsahující 500 μ l substrátu pro ureázu z Jatrox-testu. Vzorky byly inkubovány 4 hodiny při pokojové teplotě a následně byla stanovena absorbance při vlnové délce 550 nm (A_{550}). Ke stanovení referenční hladiny byly použity hodnoty ureázové aktivity získané z žaludků myší, které nebyly ani imunizovány ani infikovány. Referenční hladina odpovídá průměrné hodnotě ureázové aktivity v žaludcích 5 testovaných neimunizovaných a neinfikovaných myší plus hodnota dvojnásobku standardní odchylky. Hodnoty ureázové aktivity vyšší než referenční hladina byly považovány za signál kolonizace žaludku mikroorganizmem *H. pylori*, zatímco hodnoty nižší než referenční hladina byly považovány jako negativní (nepřítomnost *H. pylori* v žaludku).

Kultivace: Levá část antrální části žaludků získaných z myší infikovaných kmenem P76 H. pylori rezistentním vůči ampicilinu byla umístěna na misky se sérem doplněným streptomycinem na koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$. Inkubace probíhala za standardních podmínek. Po třech dnech byly narostlé bakterie, na základě morfologie kolonií, pozorování pod mikroskopem a stanovením ureázové aktivity, identifikovány jako H. pylori. U každého vzorku myšího žaludku byl na každé misce stanoven počet H. pylori schopných tvořit kolonie (CFU).

Ureázová aktivita (konstrukt A versus konstrukt B): Myši imunizované prostřednictvím přibližně $5,0 \times 10^9$ CFU Salmonella a infikované pomocí přibližně $1,0 \times 10^9$ CFU H. pylori kmene P49, jakož i myši z kontrolní skupiny, byly usmrčeny v narkóze a v antrální části žaludků byla stanovována ureázová aktivita. Z obrázku 6 vyplývá, že 100% myší imunizovaných pomocí UreA a UreB aplikovaných prostřednictvím konstruktů A Salmonelly mělo ureázovou aktivitu nižší než referenční hladina což naznačuje absenci kolonizace žaludku mikroorganizmem H. pylori. Naproti tomu 100% neimunizovaných myší (PBS) a myší imunizovaných pouze kmenem SL3261 S. typhimurium mělo hodnoty ureázové aktivity daleko převyšující referenční hladinu což naznačuje, že v těchto případech je žaludek kolonizován mikroorganizmem H. pylori. Ke stanovení referenční hladiny ureázové aktivity byla použita skupina myší, které nebyly imunizovány ani infikovány.

U myší imunizovaných konstruktem B Salmonelly byly zjištěny hodnoty ureázové aktivity převyšující referenční hladinu což naznačuje kolonizaci žaludku těchto myší mikroorganizmem H. pylori použitým k infikaci. Zjištěné hodnoty ureázové aktivity jsou u této skupiny nicméně nižší než je tomu u kontrolní skupiny což naznačuje, že u myší imunizovaných konstruktem B Salmonelly bylo dosaženo částečné ochrany (obrázek 6). Konstrukty A a B Salmonelly indukují podobnou

protilátkovou odpověď, ale liší se v expresi podjednotek ureA a ureB. Z této skutečnosti vyvozujeme, že množství exprimovaného antigenu ureázy je důležité pro získání optimální ochrany.

Konstrukt A: Za účelem korelace mezi kolonizací žaludku mikroorganizmem *H. pylori* a ureázovou aktivitou byl proveden další imunizační experiment, při němž byly myši orálně imunizovány konstruktem A *Salmonelly* a následně infikovány kmenem *H. pylori* P76 rezistentním vůči ampicilinu. Hodnoty ureázové aktivity korelovaly s počtem identifikovaných CFU *H. pylori*. U dvou z pěti myší imunizovaných konstruktem *Salmonelly* exprimujícím ureázu nebyly detekovány žádné CFU *H. pylori*. Průměrný počet CFU u všech imunizovaných myší byl pouze 62. Naproti tomu, průměrný počet CFU u neimunizovaných myší byl 2737, což odpovídá 44-násobně vyšší kolonizaci. Získaná data naznačují, že u myší imunizovaných konstruktem *Salmonelly* exprimujícím ureázu byla eliminována nebo podstatně potlačena kolonizace žaludku mikroorganizmem *H. pylori*.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) PŘIHLAŠOVATEL:

(A) JMÉNO: Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung
der Wissenschaften e.V. Berlin

(B) ULICE: Hofgartenstr. 2

(C) MĚSTO: Mnichov

(E) STÁT: Německo

(F) PSČ: 80539

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Rekombinantní oslabený mikrobiální
patogen obsahující alespoň jednu mole-
kulu nukleové kyseliny kódující antigen
pocházející z mikroorganismu Helicobac-
ter.

(iii) POČET SEKVENCÍ: 6

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

(A) ADRESÁT: ČERMÁK-HOŘEJŠ-VRBA, Advokátní a paten-
tová kancelář

(B) ULICE: Národní 32

(C) MĚSTO: Praha 1

(D) STÁT: Česká Republika

(E) PSČ: 116 66

(v) STROJNĚ ČITELNÁ FORMA:

(A) TYP MÉDIA: Floppy disk

(B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní

(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release č. 1.0, Verze č.

1.30

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1557 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ: jeden
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: Helicobacter pylori

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

- (B) KLON: alpB

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:

- (A) NÁZEV/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..1554

(xi) POPIS SEKVENCE: SEK. ID. Č.:1:

```

ATG ACA CAA TCT CAA AAA GTA AGA TTC TTA GCC CCT TTA AGC CTA GCG
 48
Met Thr Gln Ser Gln Lys Val Arg Phe Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala
 1           5           10           15
TTA AGC TTG AGC TTC AAT CCA GTG GGC GCT GAA GAA GAT GGG GGC TTT

```

96
 Leu Ser Leu Ser Phe Asn Pro Val Gly Ala Glu Glu Asp Gly Gly Phe
 20 25 30
 ATG ACC TTT GGG TAT GAA TTA GGT CAG GTG GTC CAA CAA GTG AAA AAC
 144
 Met Thr Phe Gly Tyr Glu Leu Gly Gln Val Val Gln Gln Val Lys Asn
 35 40 45
 CCG GGT AAA ATC AAA GCC GAA GAA TTA GCC GGC TTG TTA AAC TCT ACC
 192
 Pro Gly Lys Ile Lys Ala Glu Glu Leu Ala Gly Leu Leu Asn Ser Thr
 50 55 60
 ACA ACA AAC AAC ACC AAT ATC AAT ATT GCA GGC ACA GGA GGC AAT GTC
 240
 Thr Thr Asn Asn Thr Asn Ile Asn Ile Ala Gly Thr Gly Gly Asn Val
 65 70 75 80
 GCC GGG ACT TTG GGC AAC CTT TTT ATG AAC CAA TTA GGC AAT TTG ATT
 288
 Ala Gly Thr Leu Gly Asn Leu Phe Met Asn Gln Leu Gly Asn Leu Ile
 85 90 95
 GAT TTG TAT CCC ACT TTG AAC ACT AGT AAT ATC ACA CAA TGT GGC ACT
 336
 Asp Leu Tyr Pro Thr Leu Asn Thr Ser Asn Ile Thr Gln Cys Gly Thr
 100 105 110
 ACT AAT AGT GGT AGT AGT AGT AGT GGT GGT GGT GCG GCC ACA GCC GCT
 384
 Thr Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ala Ala Thr Ala Ala
 115 120 125
 GCT ACT ACT AGC AAT AAG CCT TGT TTC CAA GGT AAC CTG GAT CTT TAT
 432
 Ala Thr Thr Ser Asn Lys Pro Cys Phe Gln Gly Asn Leu Asp Leu Tyr
 130 135 140
 AGA AAA ATG GTT GAC TCT ATC AAA ACT TTG AGT CAA AAC ATC AGC AAG
 480
 Arg Lys Met Val Asp Ser Ile Lys Thr Leu Ser Gln Asn Ile Ser Lys
 145 150 155 160
 AAT ATC TTT CAA GGC AAC AAC AAC ACC ACG AGC CAA AAT CTC TCC AAC
 528
 Asn Ile Phe Gln Gly Asn Asn Asn Thr Thr Ser Gln Asn Leu Ser Asn
 165 170 175
 CAG CTC AGT GAG CTT AAC ACC GCT AGC GTT TAT TTG ACT TAC ATG AAC
 576
 Gln Leu Ser Glu Leu Asn Thr Ala Ser Val Tyr Leu Thr Tyr Met Asn
 180 185 190

TCG TTC TTA AAC GCC AAT AAC CAA GCG GGT GGG ATT TTT CAA AAC AAC
624
Ser Phe Leu Asn Ala Asn Asn Gln Ala Gly Gly Ile Phe Gln Asn Asn
195 200 205

ACT AAT CAA GCT TAT GGA AAT GGG GTT ACC GCT CAA CAA ATC GCT TAT
672
Thr Asn Gln Ala Tyr Gly Asn Gly Val Thr Ala Gln Gln Ile Ala Tyr
210 215 220

ATC CTA AAG CAA GCT TCA ATC ACT ATG GGG CCA AGC GGT GAT AGC GGT
720
Ile Leu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Met Gly Pro Ser Gly Asp Ser Gly
225 230 235 240

GCT GCC GCA GCG TTT TTG GAT GCC GCT TTA GCG CAA CAT GTT TTC AAC
768
Ala Ala Ala Ala Phe Leu Asp Ala Ala Leu Ala Gln His Val Phe Asn
245 250 255

TCC GCT AAC GCC GGG AAC GAT TTG AGC GCT AAG GAA TTC ACT AGC TTG
816
Ser Ala Asn Ala Gly Asn Asp Leu Ser Ala Lys Glu Phe Thr Ser Leu
260 265 270

GTG CAA AAT ATC GTC AAT AAT TCT CAA AAC GCT TTA ACG CTA GCC AAC
864
Val Gln Asn Ile Val Asn Asn Ser Gln Asn Ala Leu Thr Leu Ala Asn
275 280 285

AAC GCT AAC ATC AGC AAT TCA ACA GGC TAT CAA GTG AGC TAT GGC GGG
912
Asn Ala Asn Ile Ser Asn Ser Thr Gly Tyr Gln Val Ser Tyr Gly Gly
290 295 300

AAT ATT GAT CAA GCG CGA TCT ACC CAA CTA TTA AAC AAC ACC ACA AAC
960
Asn Ile Asp Gln Ala Arg Ser Thr Gln Leu Leu Asn Asn Thr Thr Asn
305 310 315 320

ACT TTG GCT AAA GTT AGC GCT TTG AAT AAC GAG CTT AAA GCT AAC CCA
1008
Thr Leu Ala Lys Val Ser Ala Leu Asn Asn Glu Leu Lys Ala Asn Pro
325 330 335

TGG CTT GGG AAT TTT GCC GCC GGT AAC AGC TCT CAA GTG AAT GCG TTT
1056
Trp Leu Gly Asn Phe Ala Ala Gly Asn Ser Ser Gln Val Asn Ala Phe
340 345 350

AAC GGG TTT ATC ACT AAA ATC GGT TAC AAG CAA TTC TTT GGG GAA AAC
1104
Asn Gly Phe Ile Thr Lys Ile Gly Tyr Lys Gln Phe Phe Gly Glu Asn
355 360 365

AAG AAT GTG GGC TTA CGC TAC TAC GGC TTC TTC AGC TAT AAC GGC GCG
 1152
 Lys Asn Val Gly Leu Arg Tyr Tyr Gly Phe Phe Ser Tyr Asn Gly Ala
 370 375 380

GGC GTG GGT AAT GGC CCT ACT TAC AAT CAA GTC AAT TTG CTC ACT TAT
 1200
 Gly Val Gly Asn Gly Pro Thr Tyr Asn Gln Val Asn Leu Leu Thr Tyr
 385 390 395 400

GGG GTG GGG ACT GAT GTG CTT TAC AAT GTG TTT AGC CGC TCT TTT GGT
 1248
 Gly Val Gly Thr Asp Val Leu Tyr Asn Val Phe Ser Arg Ser Phe Gly
 405 410 415

AGT AGG AGT CTT AAT GCG GGC TTC TTT GGG GGG ATC CAA CTC GCA GGG
 1296
 Ser Arg Ser Leu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gly Ile Gln Leu Ala Gly
 420 425 430

GAT ACT TAC ATC AGC ACG CTA AGA AAC AGC TCT CAG CTT GCG AGC AGA
 1344
 Asp Thr Tyr Ile Ser Thr Leu Arg Asn Ser Ser Gln Leu Ala Ser Arg
 435 440 445

CCT ACA GCG ACG AAA TTC CAA TTC TTG TTT GAT GTG GGC TTA CGC ATG
 1392
 Pro Thr Ala Thr Lys Phe Gln Phe Leu Phe Asp Val Gly Leu Arg Met
 450 455 460

AAC TTT GGT ATC TTG AAA AAA GAC TTG AAA AGC CAT AAC CAG CAT TCT
 1440
 Asn Phe Gly Ile Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ser His Asn Gln His Ser
 465 470 475 480

ATA GAA ATC GGT GTG CAA ATC CCT ACG ATT TAC AAC ACT TAC TAT AAA
 1488
 Ile Glu Ile Gly Val Gln Ile Pro Thr Ile Tyr Asn Thr Tyr Tyr Lys
 485 490 495

GCT GGC GGT GCT GAA GTG AAA TAC TTC CGC CCT TAT AGC GTG TAT TGG
 1536
 Ala Gly Gly Ala Glu Val Lys Tyr Phe Arg Pro Tyr Ser Val Tyr Trp
 500 505 510

GTC TAT GGC TAC GCC TTC TAA
 1557
 Val Tyr Gly Tyr Ala Phe
 515



(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 518 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEK. ID. Č.:2:

Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	
1				5					10					15		
Leu	Ser	Leu	Ser	Phe	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	Glu	Glu	Asp	Gly	Gly	Phe	
			20					25					30			
Met	Thr	Phe	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Gln	Gln	Val	Lys	Asn	
		35					40					45				
Pro	Gly	Lys	Ile	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	
	50					55					60					
Thr	Thr	Asn	Asn	Thr	Asn	Ile	Asn	Ile	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Asn	Val	
65					70					75					80	
Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Asn	Leu	Phe	Met	Asn	Gln	Leu	Gly	Asn	Leu	Ile	
			85						90					95		
Asp	Leu	Tyr	Pro	Thr	Leu	Asn	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Gln	Cys	Gly	Thr	
			100					105					110			
Thr	Asn	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	
		115					120					125				
Ala	Thr	Thr	Ser	Asn	Lys	Pro	Cys	Phe	Gln	Gly	Asn	Leu	Asp	Leu	Tyr	
		130				135					140					
Arg	Lys	Met	Val	Asp	Ser	Ile	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Asn	Ile	Ser	Lys	
145					150					155					160	
Asn	Ile	Phe	Gln	Gly	Asn	Asn	Asn	Thr	Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Ser	Asn	
			165						170					175		
Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Met	Asn	
			180					185					190			
Ser	Phe	Leu	Asn	Ala	Asn	Asn	Gln	Ala	Gly	Gly	Ile	Phe	Gln	Asn	Asn	
		195					200					205				
Thr	Asn	Gln	Ala	Tyr	Gly	Asn	Gly	Val	Thr	Ala	Gln	Gln	Ile	Ala	Tyr	
		210				215					220					
Ile	Leu	Lys	Gln	Ala	Ser	Ile	Thr	Met	Gly	Pro	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	
225					230				235						240	
Ala	Ala	Ala	Ala	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Gln	His	Val	Phe	Asn	
				245					250					255		

20199

Ser Ala Asn Ala Gly Asn Asp Leu Ser Ala Lys Glu Phe Thr Ser Leu
260 265 270

Val Gln Asn Ile Val Asn Asn Ser Gln Asn Ala Leu Thr Leu Ala Asn
275 280 285

Asn Ala Asn Ile Ser Asn Ser Thr Gly Tyr Gln Val Ser Tyr Gly Gly
290 295 300

Asn Ile Asp Gln Ala Arg Ser Thr Gln Leu Leu Asn Asn Thr Thr Asn
305 310 315 320

Thr Leu Ala Lys Val Ser Ala Leu Asn Asn Glu Leu Lys Ala Asn Pro
325 330 335

Trp Leu Gly Asn Phe Ala Ala Gly Asn Ser Ser Gln Val Asn Ala Phe
340 345 350

Asn Gly Phe Ile Thr Lys Ile Gly Tyr Lys Gln Phe Phe Gly Glu Asn
355 360 365

Lys Asn Val Gly Leu Arg Tyr Tyr Gly Phe Phe Ser Tyr Asn Gly Ala
370 375 380

Gly Val Gly Asn Gly Pro Thr Tyr Asn Gln Val Asn Leu Leu Thr Tyr
385 390 395 400

Gly Val Gly Thr Asp Val Leu Tyr Asn Val Phe Ser Arg Ser Phe Gly
405 410 415

Ser Arg Ser Leu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gly Ile Gln Leu Ala Gly
420 425 430

Asp Thr Tyr Ile Ser Thr Leu Arg Asn Ser Ser Gln Leu Ala Ser Arg
435 440 445

Pro Thr Ala Thr Lys Phe Gln Phe Leu Phe Asp Val Gly Leu Arg Met
450 455 460

Asn Phe Gly Ile Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ser His Asn Gln His Ser
465 470 475 480

Ile Glu Ile Gly Val Gln Ile Pro Thr Ile Tyr Asn Thr Tyr Tyr Lys
485 490 495

Ala Gly Gly Ala Glu Val Lys Tyr Phe Arg Pro Tyr Ser Val Tyr Trp
500 505 510

Val Tyr Gly Tyr Ala Phe
515

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

- (A) DÉLKA: 1557 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ: dva
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: *Helicobacter pylori*

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

- (B) KLON: alpB

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:

- (A) NÁZEV/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1..1554

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEK. ID. Č.:3:

```

ATG ATA AAA AAG AAT AGA ACG CTG TTT CTT AGT CTA GCC CTT TGC GCT
 48
Met Ile Lys Lys Asn Arg Thr Leu Phe Leu Ser Leu Ala Leu Cys Ala
520                               525                               530

AGC ATA AGT TAT GCC GAA GAT GAT GGA GGG TTT TTC ACC GTC GGT TAT
 96
Ser Ile Ser Tyr Ala Glu Asp Asp Gly Gly Phe Phe Thr Val Gly Tyr
535                               540                               545                               550

CAG CTC GGG CAA GTC ATG CAA GAT GTC CAA AAC CCA GGC GGC GCT AAA
144
Gln Leu Gly Gln Val Met Gln Asp Val Gln Asn Pro Gly Gly Ala Lys
                    555                               560                               565

AGC GAC GAA CTC GCC AGA GAG CTT AAC GCT GAT GTA ACG AAC AAC ATT
192
Ser Asp Glu Leu Ala Arg Glu Leu Asn Ala Asp Val Thr Asn Asn Ile
                    570                               575                               580

TTA AAC AAC AAC ACC GGA GGC AAC ATC GCA GGG GCG TTG AGT AAC GCT
240
Leu Asn Asn Asn Thr Gly Gly Asn Ile Ala Gly Ala Leu Ser Asn Ala
                    585                               590                               595

TTC TCC CAA TAC CTT TAT TCG CTT TTA GGG GCT TAC CCC ACA AAA CTC
288
Phe Ser Gln Tyr Leu Tyr Ser Leu Leu Gly Ala Tyr Pro Thr Lys Leu
600                               605                               610

AAT GGT AGC GAT GTG TCT GCG AAC GCT CTT TTA AGT GGT GCG GTA GGC
336
Asn Gly Ser Asp Val Ser Ala Asn Ala Leu Leu Ser Gly Ala Val Gly
615                               620                               625                               630

```

2019

TCT GGG ACT TGT GCG GCT GCA GGG ACG GCT GGT GGC ACT TCT CTT AAC
384
Ser Gly Thr Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Gly Gly Thr Ser Leu Asn
635 640 645

ACT CAA AGC ACT TGC ACC GTT GCG GGC TAT TAC TGG CTC CCT AGC TTG
432
Thr Gln Ser Thr Cys Thr Val Ala Gly Tyr Tyr Trp Leu Pro Ser Leu
650 655 660

ACT GAC AGG ATT TTA AGC ACG ATC GGC AGC CAG ACT AAC TAC GGC ACG
480
Thr Asp Arg Ile Leu Ser Thr Ile Gly Ser Gln Thr Asn Tyr Gly Thr
665 670 675

AAC ACC AAT TTC CCC AAC ATG CAA CAA CAG CTC ACC TAC TTG AAT GCG
528
Asn Thr Asn Phe Pro Asn Met Gln Gln Gln Leu Thr Tyr Leu Asn Ala
680 685 690

GGG AAT GTG TTT TTT AAT GCG ATG AAT AAG GCT TTA GAG AAT AAG AAT
576
Gly Asn Val Phe Phe Asn Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Lys Asn
695 700 705 710

GGA ACT AGT AGT GCT AGT GGA ACT AGT GGT GCG ACT GGT TCA GAT GGT
624
Gly Thr Ser Ser Ala Ser Gly Thr Ser Gly Ala Thr Gly Ser Asp Gly
715 720 725

CAA ACT TAC TCC ACA CAA GCT ATC CAA TAC CTT CAA GGC CAA CAA AAT
672
Gln Thr Tyr Ser Thr Gln Ala Ile Gln Tyr Leu Gln Gly Gln Gln Asn
730 735 740

ATC TTA AAT AAC GCA GCG AAC TTG CTC AAG CAA GAT GAA TTG CTC TTA
720
Ile Leu Asn Asn Ala Ala Asn Leu Leu Lys Gln Asp Glu Leu Leu Leu
745 750 755

GAA GCT TTC AAC TCT GCC GTA GCC GCC AAC ATT GGG AAT AAG GAA TTC
768
Glu Ala Phe Asn Ser Ala Val Ala Ala Asn Ile Gly Asn Lys Glu Phe
760 765 770

AAT TCA GCC GCT TTT ACA GGT TTG GTG CAA GGC ATT ATT GAT CAA TCT
816
Asn Ser Ala Ala Phe Thr Gly Leu Val Gln Gly Ile Ile Asp Gln Ser
775 780 785 790

CAA GCG GTT TAT AAC GAG CTC ACT AAA AAC ACC ATT AGC GGG AGT GCG
864
Gln Ala Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Asn Thr Ile Ser Gly Ser Ala
795 800 805

20.11.99

GTT ATT AGC GCT GGG ATA AAC TCC AAC CAA GCT AAC GCT GTG CAA GGG
912
Val Ile Ser Ala Gly Ile Asn Ser Asn Gln Ala Asn Ala Val Gln Gly
810 815 820

CGC GCT AGT CAG CTC CCT AAC GCT CTT TAT AAC GCG CAA GTA ACT TTG
960
Arg Ala Ser Gln Leu Pro Asn Ala Leu Tyr Asn Ala Gln Val Thr Leu
825 830 835

GAT AAA ATC AAT GCG CTC AAT AAT CAA GTG AGA AGC ATG CCT TAC TTG
1008
Asp Lys Ile Asn Ala Leu Asn Asn Gln Val Arg Ser Met Pro Tyr Leu
840 845 850

CCC CAA TTC AGA GCC GGG AAC AGC CGT TCA ACG AAT ATT TTA AAC GGG
1056
Pro Gln Phe Arg Ala Gly Asn Ser Arg Ser Thr Asn Ile Leu Asn Gly
855 860 865 870

TTT TAC ACC AAA ATA GGC TAT AAG CAA TTC TTC GGG AAG AAA AGG AAT
1104
Phe Tyr Thr Lys Ile Gly Tyr Lys Gln Phe Phe Gly Lys Lys Arg Asn
875 880 885

ATC GGT TTG CGC TAT TAT GGT TTC TTT TCT TAT AAC GGA GCG AGC GTG
1152
Ile Gly Leu Arg Tyr Tyr Gly Phe Phe Ser Tyr Asn Gly Ala Ser Val
890 895 900

GGC TTT AGA TCC ACT CAA AAT AAT GTA GGG TTA TAC ACT TAT GGG GTG
1200
Gly Phe Arg Ser Thr Gln Asn Asn Val Gly Leu Tyr Thr Tyr Gly Val
905 910 915

GGG ACT GAT GTG TTG TAT AAC ATC TTT AGC CGC TCC TAT CAA AAC CGC
1248
Gly Thr Asp Val Leu Tyr Asn Ile Phe Ser Arg Ser Tyr Gln Asn Arg
920 925 930

TCT GTG GAT ATG GGC TTT TTT AGC GGT ATC CAA TTA GCC GGT GAG ACC
1296
Ser Val Asp Met Gly Phe Phe Ser Gly Ile Gln Leu Ala Gly Glu Thr
935 940 945 950

TTC CAA TCC ACG CTC AGA GAT GAC CCC AAT GTG AAA TTG CAT GGG AAA
1344
Phe Gln Ser Thr Leu Arg Asp Asp Pro Asn Val Lys Leu His Gly Lys
955 960 965

ATC AAT AAC ACG CAC TTC CAG TTC CTC TTT GAC TTC GGT ATG AGG ATG
1392
Ile Asn Asn Thr His Phe Gln Phe Leu Phe Asp Phe Gly Met Arg Met
970 975 980

22.11.99

AAC TTC GGT AAG TTG GAC GGG AAA TCC AAC CGC CAC AAC CAG CAC ACG
1440
Asn Phe Gly Lys Leu Asp Gly Lys Ser Asn Arg His Asn Gln His Thr
985 990 995
GTG GAA TTT GGC GTA GTG GTG CCT ACG ATT TAT AAC ACT TAT TAC AAA
1488
Val Glu Phe Gly Val Val Val Pro Thr Ile Tyr Asn Thr Tyr Tyr Lys
1000 1005 1010
TCA GCA GGG ACT ACC GTG AAG TAT TTC CGT CCT TAT AGC GTT TAT TGG
1536
Ser Ala Gly Thr Thr Val Lys Tyr Phe Arg Pro Tyr Ser Val Tyr Trp
1015 1020 1025 1030
TCT TAT GGG TAT TCA TTC TAA
1557
Ser Tyr Gly Tyr Ser Phe
1035

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 518 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEK. ID. Č.:4:

Met Ile Lys Lys Asn Arg Thr Leu Phe Leu Ser Leu Ala Leu Cys Ala
1 5 10 15
Ser Ile Ser Tyr Ala Glu Asp Asp Gly Gly Phe Phe Thr Val Gly Tyr
20 25 30
Gln Leu Gly Gln Val Met Gln Asp Val Gln Asn Pro Gly Gly Ala Lys
35 40 45
Ser Asp Glu Leu Ala Arg Glu Leu Asn Ala Asp Val Thr Asn Asn Ile
50 55 60
Leu Asn Asn Asn Thr Gly Gly Asn Ile Ala Gly Ala Leu Ser Asn Ala
65 70 75 80
Phe Ser Gln Tyr Leu Tyr Ser Leu Leu Gly Ala Tyr Pro Thr Lys Leu
85 90 95
Asn Gly Ser Asp Val Ser Ala Asn Ala Leu Leu Ser Gly Ala Val Gly
100 105 110
Ser Gly Thr Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Gly Gly Thr Ser Leu Asn
115 120 125

22.11.99

Thr Gln Ser Thr Cys Thr Val Ala Gly Tyr Tyr Trp Leu Pro Ser Leu
130 135 140

Thr Asp Arg Ile Leu Ser Thr Ile Gly Ser Gln Thr Asn Tyr Gly Thr
145 150 155 160

Asn Thr Asn Phe Pro Asn Met Gln Gln Gln Leu Thr Tyr Leu Asn Ala
165 170 175

Gly Asn Val Phe Phe Asn Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Lys Asn
180 185 190

Gly Thr Ser Ser Ala Ser Gly Thr Ser Gly Ala Thr Gly Ser Asp Gly
195 200 205

Gln Thr Tyr Ser Thr Gln Ala Ile Gln Tyr Leu Gln Gly Gln Gln Asn
210 215 220

Ile Leu Asn Asn Ala Ala Asn Leu Leu Lys Gln Asp Glu Leu Leu Leu
225 230 235 240

Glu Ala Phe Asn Ser Ala Val Ala Ala Asn Ile Gly Asn Lys Glu Phe
245 250 255

Asn Ser Ala Ala Phe Thr Gly Leu Val Gln Gly Ile Ile Asp Gln Ser
260 265 270

Gln Ala Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Asn Thr Ile Ser Gly Ser Ala
275 280 285

Val Ile Ser Ala Gly Ile Asn Ser Asn Gln Ala Asn Ala Val Gln Gly
290 295 300

Arg Ala Ser Gln Leu Pro Asn Ala Leu Tyr Asn Ala Gln Val Thr Leu
305 310 315 320

Asp Lys Ile Asn Ala Leu Asn Asn Gln Val Arg Ser Met Pro Tyr Leu
325 330 335

Pro Gln Phe Arg Ala Gly Asn Ser Arg Ser Thr Asn Ile Leu Asn Gly
340 345 350

Phe Tyr Thr Lys Ile Gly Tyr Lys Gln Phe Phe Gly Lys Lys Arg Asn
355 360 365

Ile Gly Leu Arg Tyr Tyr Gly Phe Phe Ser Tyr Asn Gly Ala Ser Val
370 375 380

Gly Phe Arg Ser Thr Gln Asn Asn Val Gly Leu Tyr Thr Tyr Gly Val
385 390 395 400

Gly Thr Asp Val Leu Tyr Asn Ile Phe Ser Arg Ser Tyr Gln Asn Arg
405 410 415

20199

Ser Val Asp Met Gly Phe Phe Ser Gly Ile Gln Leu Ala Gly Glu Thr
 420 425 430
 Phe Gln Ser Thr Leu Arg Asp Asp Pro Asn Val Lys Leu His Gly Lys
 435 440 445
 Ile Asn Asn Thr His Phe Gln Phe Leu Phe Asp Phe Gly Met Arg Met
 450 455 460
 Asn Phe Gly Lys Leu Asp Gly Lys Ser Asn Arg His Asn Gln His Thr
 465 470 475 480
 Val Glu Phe Gly Val Val Val Pro Thr Ile Tyr Asn Thr Tyr Tyr Lys
 485 490 495
 Ser Ala Gly Thr Thr Val Lys Tyr Phe Arg Pro Tyr Ser Val Tyr Trp
 500 505 510
 Ser Tyr Gly Tyr Ser Phe
 515

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

- (A) DÉLKA: 656 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET ŘETĚZCŮ: dva
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ix) CHARAKTERISTICKÝ ZNAK:

- (A) NÁZEV/KLÍČ: CDS
- (B) UMÍSTĚNÍ: 567..656

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEK. ID. Č.:5:

AGATCTATGA ATCTATGATA TCAACACTCT TTTTGATAAA TTTCTCGAG GTACCGAGCT
 60
 TGAGGCATCA AATAAAACGA AAGGCTCAGT CGAAAGACTG GGCCTTTCGT TTTATCTGTT
 120
 GTTTGTTCGGT GAACGCTCTC CTGAGTAGGA CAAATCCGCC GGGAGCGGAT TTGAACGTTG
 180
 CGAAGCAACG GCCCGGAGGG TGGCGGGCAG GACGCCCCGCC ATAAACTGCC ACAAGCTCGG
 240
 TACCGTTGAT CTTCCTATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCG CTACGTGACT
 300
 GGGTCATGGC TGCGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA CGGGCTTGTC
 360

22.11.99

TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC ATGTGTCAGA
420

GGTTTTACCC GTCATCACCG AAACGCGCGA GGCCAGCGC TTCGAACTTC TGATAGACTT
480

CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CACAACGGTT TCCCTCTAGA AATAATTTTG
540

TTTAACTTTA AGAAGGAGAT ATACAT ATG AAA CTG ACT CCC AAA GAG TTA GAC
593

Met Lys Leu Thr Pro Lys Glu Leu Asp

520

525

AAG TTG ATG CTC CAC TAC GCT GGA GAA TTG GCT AAA AAA CGC AAA GAA
641

Lys Leu Met Leu His Tyr Ala Gly Glu Leu Ala Lys Lys Arg Lys Glu
530 535 540

AAA GGC ATT AAG CTT
656

Lys Gly Ile Lys Leu
545

(2) INFORMACE O SEK. ID. Č.:6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:

(A) DÉLKA: 30 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEK. ID. Č.:6:

Met Lys Leu Thr Pro Lys Glu Leu Asp Lys Leu Met Leu His Tyr Ala
1 5 10 15

Gly Glu Leu Ala Lys Lys Arg Lys Glu Lys Gly Ile Lys Leu
20 25 30

1. Rekombinantní oslabený mikrobiální patogen obsahující alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z mikroorganismu *Helicobacter*, kde tento patogen je schopen exprimovat zmíněnou molekulu nukleové kyseliny nebo je schopen vyvolat expresi zmíněné molekuly nukleové kyseliny v cílové buňce.
2. Patogen podle nároku 1, kde tímto patogenem je nějaká enterobaktérie, zvláště pak buňka *Salmonelly*.
3. Patogen podle nároků 1 nebo 2, kde tímto patogenem je mutant *aro Salmonelly*.
4. Patogen podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3, kde zmíněným antigenem pocházející z *Helicobacter* je ureáza, podjednotka ureázy, jejich imunologicky reaktivní fragment nebo peptidový mimotop.
5. Patogen podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3, kde zmíněným antigenem pocházející z *Helicobacter* je polypeptid sekretovaný z *Helicobacter*, jeho imunologicky reaktivní fragment nebo peptidový mimotop.
6. Patogen podle jakéhokoliv z nároků 1 až 3 a 5, kde zmíněný antigen pocházející z *Helicobacter* je vybrán ze skupiny zahrnující antigeny AlpA, AlpB, jejich imunologicky reaktivní fragmenty nebo peptidový mimotop.
7. Patogen podle jakéhokoliv z nároků 1 až 6, kde zmíněná molekula nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* může být exprimována v závislosti na fázi

životního cyklu.

8. Patogen podle nároku 7, kde zmíněná molekula nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* je pod kontrolou expresivního signálu, který je v patogenu v podstatě neaktivní, a který může být aktivován reorganizací nukleové kyseliny vyvolané mechanismem reorganizace nukleové kyseliny v tomto patogenu.
9. Patogen podle nároku 8, kde tímto expresivním signálem je promotor bakteriofága a aktivace je dosaženo reorganizací DNA, která má za následek produkci odpovídající RNA polymerázy bakteriofága v daném patogenu.
10. Patogen podle jakéhokoliv z nároků 1 až 9, kde tento patogen dále zahrnuje alespoň jednu další (druhou) molekulu nukleové kyseliny kódující nějaký imunomodulační polypeptid, a kde zmíněný patogen je schopen exprimovat uvedenou druhou molekulu nukleové kyseliny.
11. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento přípravek zahrnuje jako aktivní složku rekombinantního patogena podle jakéhokoliv z nároků 1 až 10 spolu s (volitelně) farmaceuticky přijatelnými rozpouštědly, nosiči a adjuvans.
12. Přípravek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že tímto přípravkem je živá vakcína, která je vhodná pro parenterální aplikaci nebo aplikaci na slizniční povrchy.
13. Způsob přípravy živé vakcíny v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob zahrnuje formulaci farma-

ceuticky účinného množství oslabeného patogena podle jakéhokoliv z nároků 1 až 10 spolu s farmaceuticky přijatelnými rozpouštědly, nosiči a/nebo adjuvans.

14. Způsob přípravy rekombinantního oslabeného patogena podle jakéhokoliv z nároků 1 až 10

v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob zahrnuje kroky:

a) vložení molekuly nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* do oslabeného patogena, čímž je vytvořen rekombinantní oslabený patogen, který je schopen exprimovat zmíněnou molekulou nukleové kyseliny nebo je schopen vyvolat expresi této molekuly nukleové kyseliny v cílové buňce; a

b) kultivaci zmíněného rekombinantního oslabeného patogena za vhodných podmínek.

15. Způsob podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná molekula nukleové kyseliny kódující antigen pocházející z *Helicobacter* je umístěna na mimochromozomálním plazmidu nebo je vložena do chromozomu.

16. Způsob použitelný k identifikaci antigenů pocházejících z *Helicobacter* schopných indukovat ochrannou imunitní reakci v savčím hostiteli v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento způsob zahrnuje kroky:

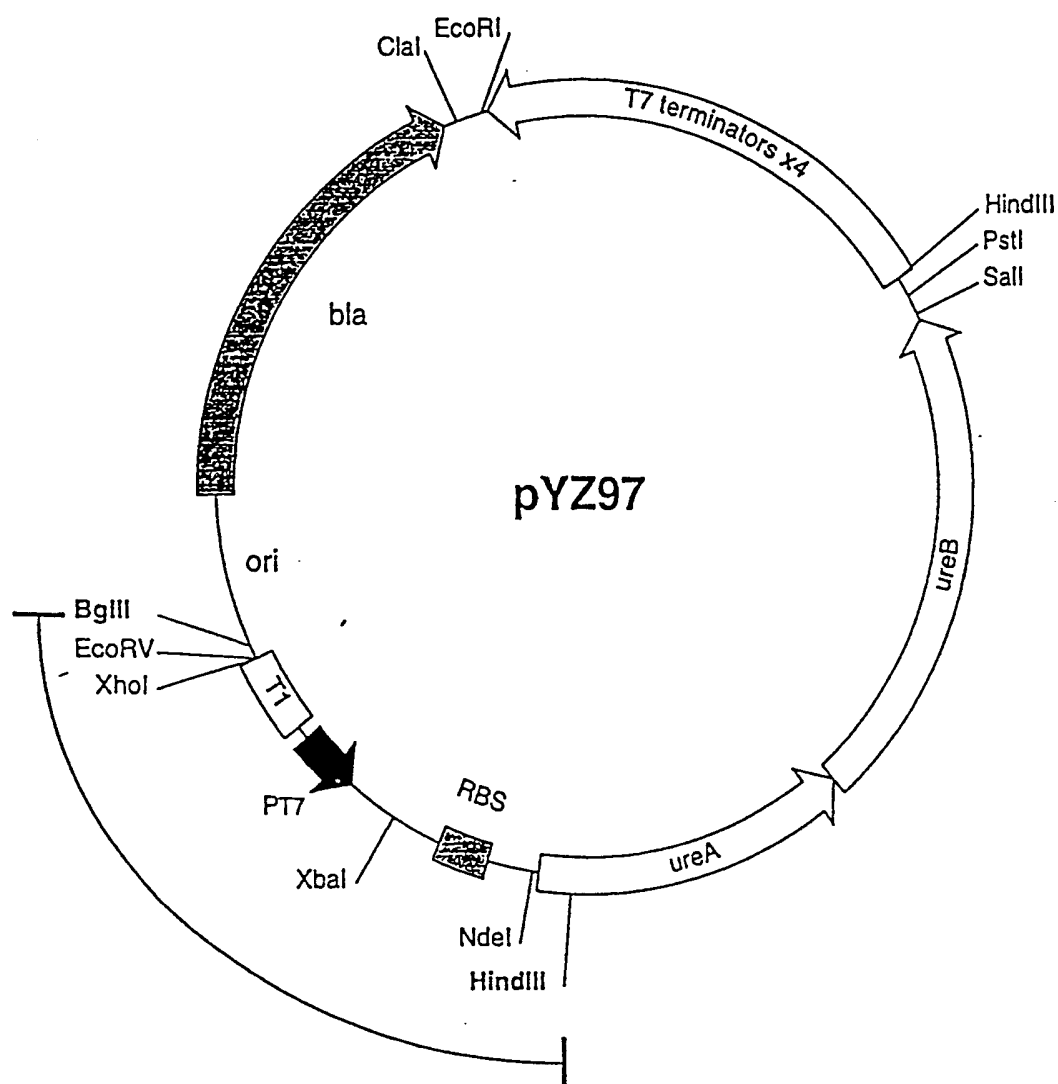
a) vytvoření expresivní genové banky mikroorganismu *Helicobacter* v oslabeném patogenu a

b) screening klonů z této genové banky za účelem identi-

22.11.99

fikace klonů schopným indukovat v savčím hostiteli
ochrannou imunitní reakci proti infekci mikroorganizmem
Helicobacter.

Obr. 1



2/6

20.11.99

PV 1999-1236

Obr. 2

```

1  AG ATC TAT GAA TCT ATG ATA TCA ACA CTC TTT TTG ATA AAT TTT CTC GAG GTA CCG AGC
   BglII          EcoRV          XhoI

rrnB T1
.....
60  TTG AGG CAT CAA ATA AAA CGA AAG GCT CAG TCG AAA GAC TGG GCC TTT CGT TTT ATC TGT
.....
120 TGT TTG TCG GTG AAC GCT CTC CTG AGT AGG ACA AAT CCG CCG GGA GCG GAT TTG AAC GTT
.....
                                     -35
180 GCG AAG CAA CGG CCC GGA GGG TGG CGG GCA GGA CGC CCG CCA TAA ACT GCC ACA AGC TCG
                                     -10
240 GTA CCG TTG ATC TTC CTA TGG TGC ACT CTC AGT ACA ATC TGC TCT GAT GCG CTA CGT GAC

300 TGG GTC ATG GCT GCG CCC CGA CAC CCG CCA ACA CCC GCT GAC GCG CCC TGA CGG GCT TGT

360 CTG CTC CCG GCA TCC GCT TAC AGA CAA GCT GTG ACC GTC TCC GGG AGC TGC ATG TGT CAG

420 AGG TTT TCA CCG TCA TCA CCG AAA CGC GCG AGG CCC AGC GCT TCG AAC TTC TGA TAG ACT

PT7

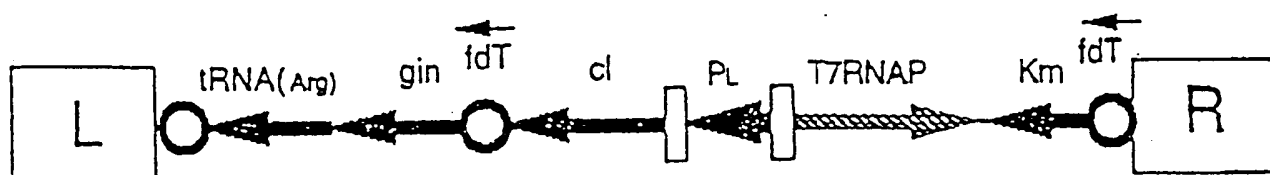
480 TCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT TTT
                                     XbaI

RBS                                     down stream box
YZ019
540 GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG AAA CTG ACT CCC AAA GAG TTA GAC AAG TTG
                                     Met Lys Leu Thr Pro Lys Glu Leu Asp Lys Leu

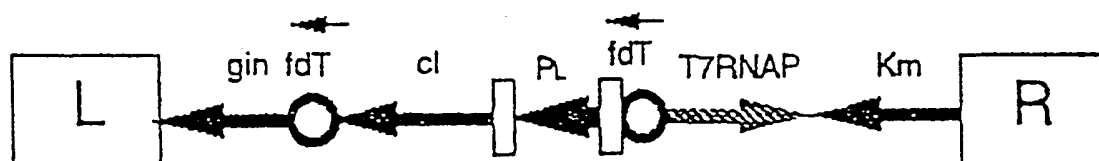
600 ATG CTC CAC TAC GCT GGA GAA TTG GCT AAA AAA CGC AAA GAA AAA GGC ATT AAG CTT
   Met Leu His Tyr Ala Gly Glu Leu Ala Lys Lys Arg Lys Glu Lys Gly Ile Lys Leu

```

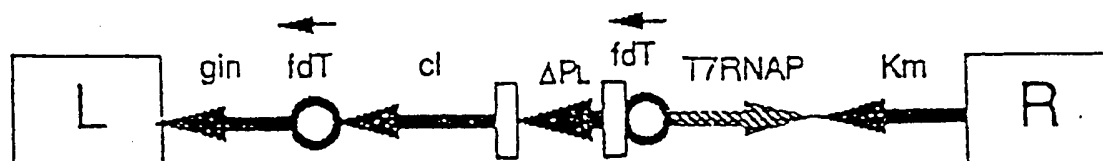
Obr. 3



pYZ88 (vysoká exprese)

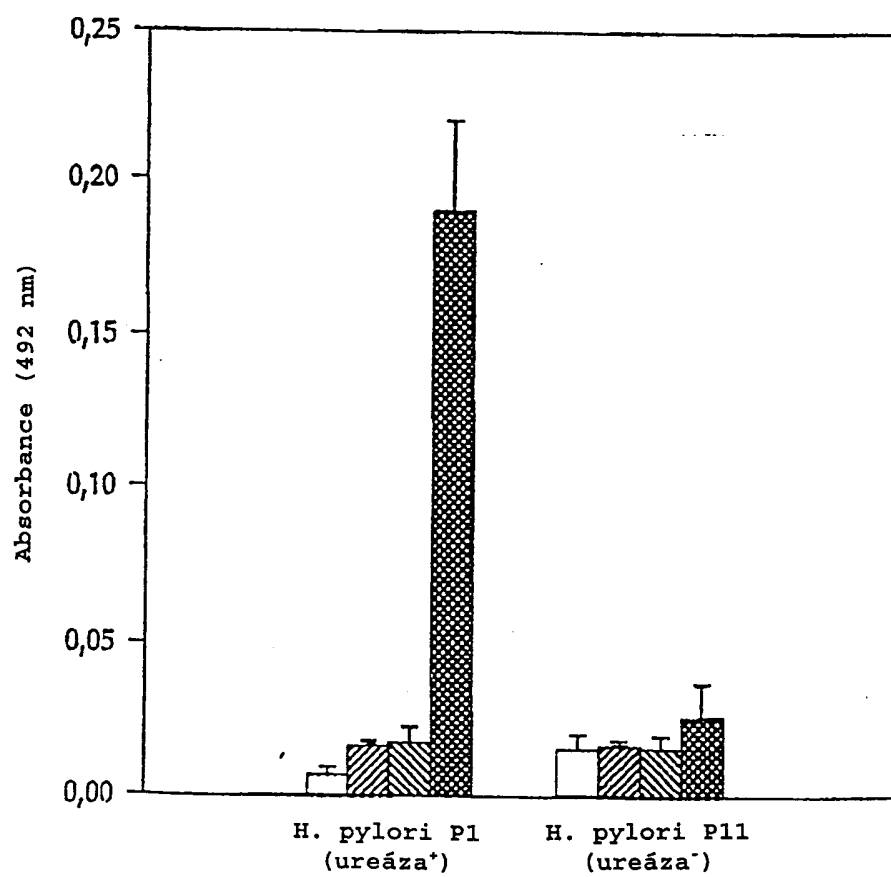


pYZ84 (střední exprese)



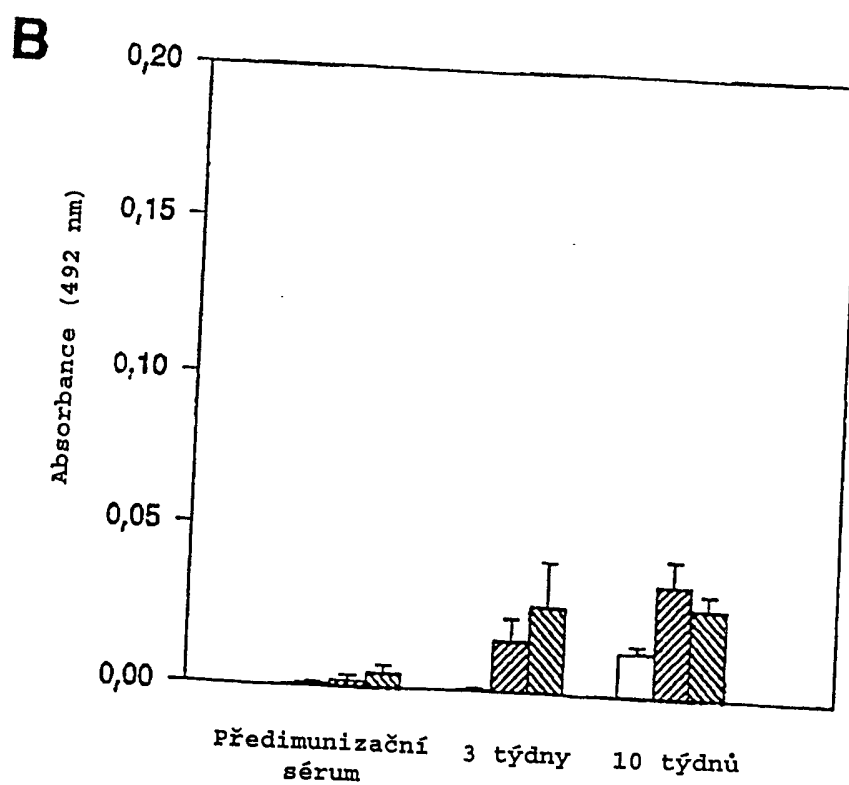
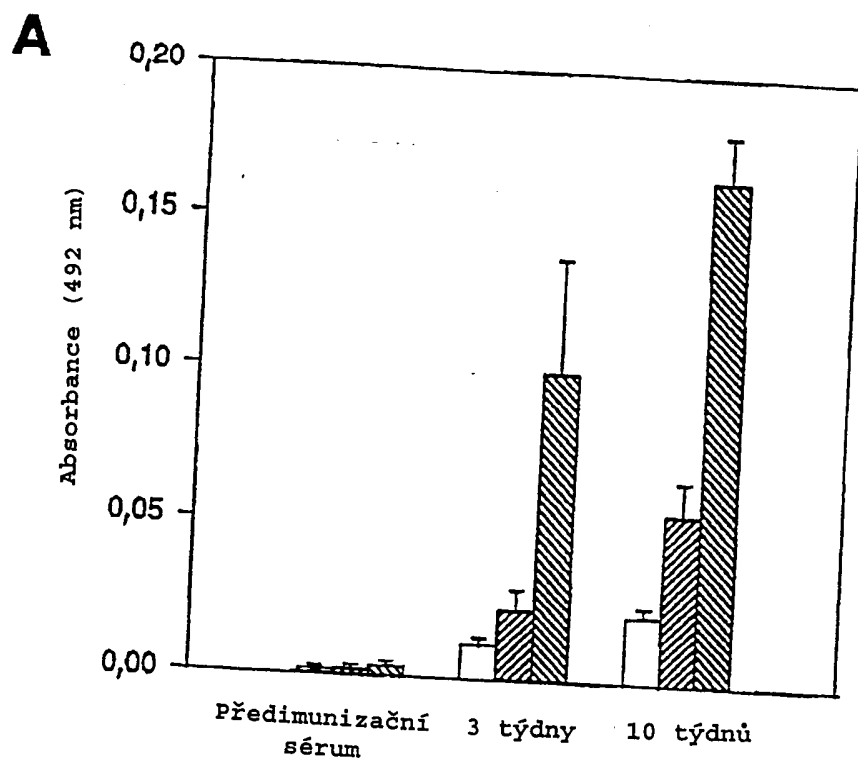
pYZ114 (nízká exprese)

Obr. 4



Testovaný antigen

Obr. 5



Obr. 6

