

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

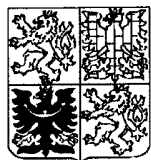
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 3738-97

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26. 05. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 26.05.95

(31) Číslo prioritní přihlášky: 95US/9506750

(33) Země priority: WO

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 02. 99**  
(Věstník č. 2/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/06750**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/37624**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N 15/86**  
**C 12 N 15/62**  
**C 07 K 14/11**  
**A 61 K 39/145**

(71) Přihlašovatel:

PROTEIN SCIENCES CORPORATION,  
Meriden, CT, US;

(72) Původce:

Smith Gale Eugene, Middlefield, CT, US;  
Volvovitz Franklin, New Haven, CT, US;  
Wilkinson Bethanie E., Middletown, CT, US;  
Voznesensky Andrei I., West Hartford, CT,  
US;  
Hackett Craig Stanway, Wallingford, CT, US;

(74) Zástupce:

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

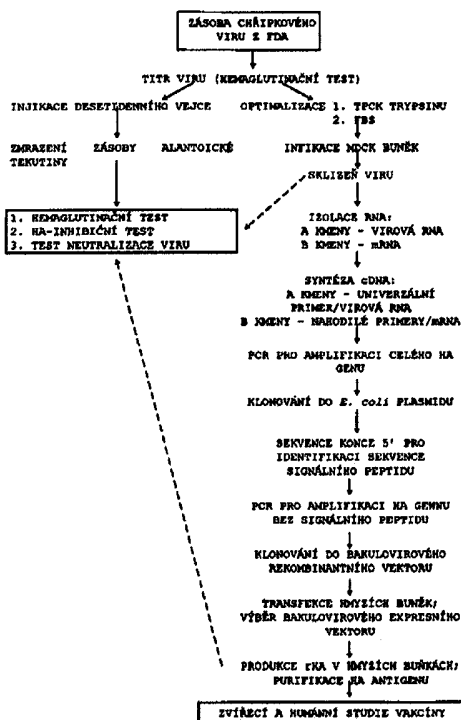
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby hemaglutininových  
multivalentních vakcín proti chřipce**

(57) Anotace:

Způsob výroby rekombinantní chřipkové vakcíny za použití DNA technologie. Výsledná vakcína je multivalentní, výhodně trojvalenční chřipková vakcína, jejíž bázi tvoří směs rekombinantních hemaglutininových antigenů klonovaných z chřipkových virů, které mají epidemický potenciál. Rekombinantní hemaglutininové antigeny jsou celodělkové, neštěpené /HA0/ glykoproteiny produkované z bakulovirových expresivních vektorů v kultivovaných hmyzích buňkách a purifikované za nedenačních podmínek. U výhodného provedení se klonované HA geny následně modifikují delecí přirozených hydrofobních signálních peptidových sekvencí a jejich nahrazením novým bakulovirovým chitinázovým signálním peptidem. Vynález se rovněž týká obecného přístupu pro účinnou extrakci a purifikaci rekombinantního HA proteinu produkovaného v hmyzích buňkách pro purifikaci

rHA proteinů a A podtypů a B typu chřipkových virů.



CZ 3738-97 A3

Způsob výroby hemagglutininových multivalentních vakcín  
proti chřipce

Oblast techniky

Vynález se obecně týká rekombinantních vakcín proti chřipce.

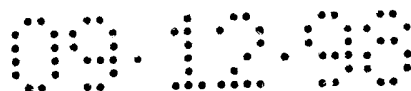
Dosavadní stav techniky

Každoročně v celém světě propukají epidemie chřipky, které způsobují značnou nemocnost a úmrtnost. Chřipkový vir nejčastěji napadá děti, které se velkou měrou podílí na přenosu virů chřipky ve společnosti. U starých osob a osob se zdravotními problémy existuje v případě infekce chřipkovým virem zvýšené riziko vzniku možných komplikací a s nimi spojené hospitalizace. V samotných Spojených státech amerických způsobil zápal plic a chřipka v letech 1956 až 1988 během každé chřipkové sezóny více než 10 000 úmrtí a každou druhou sezónu bylo zaznamenáno dokonce více než 40 000 úmrtí (Update: Influenza Activity - United States and Worldwide, and Composition of the 1992-1993 Influenza Vaccine, Morbidity and Mortality Weekly Report. U.S. Departmente of Health and Human Services, Public Health Service, 41/No. 18:315-323, 1992). Chřipkové viry jsou vysoce pleomorfní částice, tvořené dvěma povrchovými glykoproteiny, hemagglutininem (HA) a neuraminidázou (NA). HA zprostředkovává navázání viru na hostitelskou membránu a fúzi viro-buněčné membrány během pronikání viru do buňky. Genom chřipkového viru je tvořen osmi jednořetězcovými

protismyslnými RNA segmenty z nichž čtvrtý největší segment kóduje HA gen. Chřipkové viry jsou rozděleny na základě antigenových diferenciací na typ A, B a C. Viry chřipky A popisuje nomenklatura, jejíž součástí je označení podtypu nebo typu, geografické místo původu, počet řetězců a rok izolace, například A/Beijing/353/89. Existuje alespoň 13 podtypů HA (H1-H13) a devět podtypů NA (N1-N9). Všechny tyto podtypy byly nalezeny u ptáků, ale u lidí, prasat a koní byly zjištěny pouze H1-H3 a N1-N2 (Murphy and Webster, „Orthomyxoviruses“, in Virology, ed. Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., 1091-1152 (Raven Press, New York, (1990))).

Protilátky, jejichž úkolem je HA neutralizace viru a vytvoření báze pro vytvoření přirozené imunity proti infekci způsobené chřipkou, popisuje například Clements v článku „Influenza Vaccines“ ve *Vaccines: New Approaches to Immunological Problems*, ed. Ronald W. Ellis str. 129-150 (Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA 1992). Antigenová variace v HA molekule je často zodpovědná za propuknutí chřipky a omezenou imunizační kontrolu infekce.

Trojrozměrná struktura HA a interakce s jejím celulárním receptorem, kyselinou sialovou, byla extenzivně studována (Wilson a kol., Structure of the hemagglutinin membrane glykoprotein of influenza virus at 3Å rozlišení“ Nature 289:366-378 (1981); Weis a kol., „Structure of the influenza virus hemagglutinin completed with its receptor, sialic acid“ Nature, 333:426-431 (1988); Murphy and Webster, 1990). HA molekula je ve virionu přítomna jako trimer. Každý monomer existuje ve formě řetězců HA1 a HA2, vázaných jednoduchou disulfidovou vazbou. Infikované hostitelské buňky produkují prekurzorový glykosylátovaný

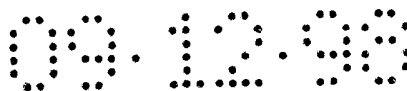


polypeptid (HA0) s molekulovou hmotností přibližně 85 000, který se následně rozštěpí na HA1 a HA2.

Přítomnost chřipky, HA-specificky neutralizující IgG a IgA protilátku, souvisí s rezistencí vůči infekci a nemoci (Clements, 1992). Celý inaktivovaný virus nebo částečně vyčištěné (podjednotka získaná sestřihem) vakcíny proti chřipce jsou standardizovány tak, že obsahují určité množství HA z každého řetězce. Chřipkové vakcíny zpravidla obsahují 7 až 25  $\mu\text{g}$  HA z každého ze zmíněných tří řetězců chřipkového viru.

Role dalšího hlavního povrchového glykoproteinu, NA, pokud jde o ochrannou imunitu protilátky nebo T-buněčné odezvy na chřipkové viry, nebyla doposud definována. Neuraminidáza je v případě čištění a skladování velmi nestálá (Murphy a Webster, 1990) a množství NA v současně používaných vakcínách proti chřipce není standardizováno. Vyčištěná HA, ale nikoliv NA vakcína chrání před onemocněním zvířata napadená chřipkou (Johansson a kol., „Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection“ J. Virology, 63:1239-1246 (1989)). Ukázalo se, že experimentální vakcína na bázi neuraminidázového antigenu neposkytuje člověku ochranu (Orga a kol., J. Infect. Dis. 135:499-506 (1977)).

Vakcíny proti chřipce, na které bylo uděleno povolení, jsou tvořeny formalinem inaktivovanými podtypy virů (H1N1 a H3N2) influenzy A a jedním podtypem virů influenzy B nebo přípravky, tvořené podjednotkami získanými chemickým štěpením těchto virů. Před každým chřipkovým obdobím doporučuje „U.S. Food and Drug Administration's Vaccines



and Related Biologicals Advisory Committee" pro nadcházející období použití trojvalenční vakcíny proti chřipce. Vakcíny, používané v letech 1992 až 1993 obsahovaly viry podobné virům A/Texas/36/91-(H1N1), A/Beijing/353/89-H3N2 a B/Panama/45/90. FDA navrhla, aby v letech 1993 až 1994 vakcína proti chřipce obsahovala stejné texaské a panamské kmeny a nový kmen influenzy A Beijing (A/Beijing/32/92).

Vakcinace vysoce rizikových osob, prováděná každoročně před vypuknutím chřipkového období, je nejúčinnějším opatřením pro snížení možnosti infekce chřipkovým virem. Nízká četnost použití, slabá účinnost u starších osob a u mládeže, produkce ve vejcích, antigenní variace a nežádoucí reakce jsou omezujícími faktory současně dostupných vakcín.

Centrum pro kontrolu chorob (CDC) odhaduje, že je proti chřipce každoročně vakcinováno méně než 30% rizikových jedinců (MMWR, 1992). Současné inaktivované vakcíny dosahují vysoké úspěšnosti při ochraně proti onemocnění ve skupině normálních zdravých jedinců, pokud jsou antigeny vakcíny a antigeny cirkulujících virů influenzy blízce příbuzné. Ve skupině starších osob je úspěšnost prevence proti onemocnění mnohem nižší, zejména v případě, kdy jsou tyto starší osoby umístěny v ústavech (Clements, 1992). Nedávné studie zpracované Powersem a Belsheem, J. Inf. Dis. 167:584-592 (1993), uvádí, že podstatnější odezvy protilátky na trojvalenční subvirionovou vakcínu proti chřipce byly pozorovány u méně než třiceti procent osob ve věku 65 let nebo starších.

Zárodečné viry pro vakcíny influenzy A a B jsou přirozeně se vyskytující kmeny, které se replikují do vysokých titrů v alantoické dutině vajec kuřat. Alternativně je kmenem viru influenzy A přeuspořádaný vir

se správnými povrchovými antigenními geny. Přeuspořádaný vir je takový vir, který má v důsledku segmentace virového genomu vlastnosti všech parentálních kmenů. Pokud buňku infikuje více než jeden kmen viru influenzy, potom se tyto segmentované viry smísí a vytvoří progenní virion, který obsahuje virová přeskupení genů z obou rodičovských kmenů.

Ochrana pomocí současně používaných vakcín proti chřipce, tvořených celými podtypy virů nebo jejich segmenty, je krátkodobá a její účinnost ještě snižuje výskyt antigenního posunu v epidemických kmenech chřipky. Viry influenzy podléhají antigennímu posunu, který je výsledkem imunitní selekce virů se změnami aminokyselinové sekvence v molekule hemaglutininu. V ideálním případě virové kmeny vakcíny odpovídají virovým kmenům influenzy, které způsobují onemocnění. Nicméně současná produkce chřipkových vakcín je omezena propagací viru v oplodněných kuřecích vejcích. Ne všechny kmeny viru influenzy se dobře replikují ve vejcích; je tedy třeba viry přizpůsobit nebo realizovat virová přeskupení. V hemaglutininu virů influenzy vypěstovaných ve vejcích se objevila extenzivní heterogenita v porovnání s primárními izoláty, izolovanými z infikovaných jedinců, rostoucími v savčích buňkách (Wang a kol., Viril. 171:275-279 (1989); Rajakumar a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4154-4158 (1990)). Změny v HA v průběhu selekce a produkce chřipkových vakcín mohou mít za následek vznik směsi antigenově distinktních subpopulací viru. Viry ve vakcíně se mohou tedy lišit od variant přítomných v epidemických kmenech, což může mít za následek nižší úroveň ochrany.

U osob trpících vážnou alergií na vejce může zbytek vaječného proteinu ve vakcíně způsobit střední

hypersenzitivní reakce. Prasečí chřipková vakcína byla v roce 1976 dávána do souvislosti se zvyšující se četností výskytu Guillain-Barré syndromu. U následných vakcín, připravených z dalších virových kmenů influenzy, nebyl již dále pozorován zvýšený výskyt tohoto vzácného onemocnění.

Způsobem výroby chřipkové vakcíny, který nevyžaduje propagaci ve vejcích, lze získat čistší produkt, u kterého je bylo méně pravděpodobné, že způsobí nežádoucí imunitní reakci. Kromě toho by čistší vakcínový přípravek nevyžadoval virovou inaktivaci nebo organickou extrakci složek virové membrány, čímž by se eliminovala denaturace antigenových epitopů a vyloučily by se reziduální chemikálie, které mohou nežádoucím způsobem ovlivnit bezpečnost nákazy.

Kromě toho chřipková vakcína, vyrobená za nepřítomnosti vaječné propagace, by zabránila genetické heterogenitě, která se objevuje při přizpůsobování a průchodem vejci. Výsledkem toho je, že se vakcína lépe přizpůsobí chřipkovým epidemickým kmenům a bude mít vyšší účinnost.

Cílem vynálezu by rovněž mělo být poskytnutí způsobů výroby chřipkové vakcíny, která nevyžaduje replikaci ve vejcích.

Cílem vynálezu by mělo být poskytnutí způsobu výroby chřipkové vakcíny, který by byl rychlý, čistý a ekonomicky efektivní a který by umožňoval vyrábět vakcíny z primárních chřipkových zdrojů.

Podstata vynálezu

Vynález tedy poskytuje způsob výroby rekombinantního chřipkového hemaglutininového proteinu, který spočívá v expresi tohoto proteinu v hmyzích buňkách bakulovirovým expresním systémem. Výsledný protein je použitelný při výrobě multivalenční chřipkové vakcíny, jejíž podstatu tvoří směs rekombinantních hemaglutininových antigenů, klonovaných z chřipkových virů, které mají epidemický potenciál. Rekombinantní hemaglutininové proteiny jsou celodélkové neštěpené (HA0) glykoproteiny, které zahrnují jak HA1 tak HA2 podjednotky (HA0), purifikované za nenedenaturačních podmínek do alespoň 95% čistoty, výhodně do 99% čistoty.

Vynález se rovněž týká způsobu klonování chřipkových hemaglutininových genů z chřipkových virů A a B za použití specificky navržených oligonukleotidových sond a metody využívající polymerázové řetězové reakce (PCR). U výhodného provedení se klonované HA geny modifikují delecí nukleotidů, kódujících přirozené hydrofobní signální peptidové sekvence, a nahrazují se novým bakulovirovým signálním peptidem, čímž se získá sekvence, kódující signální peptid bezprostředně sousedící s hemaglutininem. Tyto chimerické geny se zavedou do bakulovirových expresních vektorů tak, že bakulovirový polyhedrinový promotor řídí expresi rekombinantních HA proteinů v infikovaných hmyzích buňkách. Osmnáctiaminokyselinový bakulovirový signální peptid směřuje translaci rHA do glykosylační dráhy hmyzí buňky a není přítomen ve zralém rHA glykoproteinu. U výhodného provedení je vektor navržen tak, že mezi signálním peptidem a hemaglutininovým proteinem nekóduje žádné intervenující aminokyseliny.

Tuto metodologii lze rozšířit na všechny typy chřipkových virů včetně prevalenčního A (H1N1) podtypu, A(H3N2) podtypu a typu B, který infikuje lidi, a rovněž chřipkových virů, které infikují další savčí a ptačí druhy.

Vynález rovněž popisuje obecný přístup pro účinnou extrakci a purifikaci rekombinantního proteinu produkovaného v hmyzích buňkách, konkrétně pro purifikaci rHA proteinů z A podtypů a B typu chřipkových virů. Rekombinantní vakcínu lze vyvinout spíše z primárních zdrojů chřipky, například z nazálních sekretů infikovaných jedinců, než z viru přizpůsobeného a kultivovaného v kuřecích vejcích. To umožňuje rychlý vývoj vakcíny přímo z epidemických kmenů chřipky a eliminuje problémy spojené s přizpůsobováním viru kultivaci ve vejcích a rovněž eliminuje reakci pacientů na vaječnou kontaminaci ve výsledné vakcíně.

Příklady demonstrují formulaci a klinickou účinnost vakcíny v imunizující dávkové formě, zahrnující purifikované rHA antigeny ze tří kmenů chřipkového viru, doporučených FDA pro 1993/1994 a 1994/1995 chřipková epidemická období. Funkční imunita se měřila pomocí testů, které kvantifikovaly protilátky, které se váží na chřipkový hemaglutinin blokující schopnost chřipkového viru srážet červené krvinky nebo které neutralizují chřipkový virus. Ochranné imunitní odpovědi na rHA vakcíny se měřily u živočichů, kteří jsou citliví na chřipkovou infekci nebo v rámci humánních imunologických studií.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 schematicky znázorňuje klonování HA genů z chřipkových A kmenů z purifikovaných virálních RNA přípravků, purifikaci exprimovaného rHA a biologickou charakterizaci rHA. Zkratky použité obrázcích mají následující význam:

FDA - Food and Drug Administration;

MDCK - (Madin Darby Canine Kidney) ledviny psa Madin Darby;

TPCK - tosylfenylalanylchloromethylketon;

RNA - ribonukleová kyselina;

cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina;

HA - hemaglutinin;

FBS - fetální bovinní sérum;

PCR - polymerázová řetězová reakce; a

BV - bakulovirus.

Obr. 2 detailněji znázorňuje způsob, schematicky znázorněný na obrázku 1, aplikovaný na klonování a expresi HA genu chřipkového kmene A/Texas/36/91. Chřipkový HA gen se získal z RNA purifikované z MDCK buněk infikovaných chřipkovým kmenem influenza A/Texas/36/91 pomocí reverzní transkriptázy a univerzálního primeru (SEQ ID NO.1), a následných dvou cyklů PCR amplifikace a klonování. Při prvním cyklu PCR reakcí se použil 5' koncový primer SEQ ID NO. 2 a 3' koncový primer SEQ ID NO. 3. Při druhém cyklu PCR reakcí se použil 5' koncový primer SEQ ID NO. 4 a 3' koncový primer SEQ ID NO. 5. Zkonstruoval se bakulovirový rekombinantní vektor obsahující polyhedrinový promotor a signální peptidovou sekvenci z bakulovirového 61K genu (bakulovirový gen, který kóduje signální peptid mající molekulovou hmotnost přibližně 61 000) a následně kompletní kódující sekvence pro zralý HA protein. Tento

rekombinantní vektor se následně použil pro produkci bakulovirového expresního vektoru, který produkuje HA z tohoto kmene viru.

Obr. 3 znázorňuje graf anti-HA imunitní odezvy u myši ve 42. dni,  $n=5$ , na titr protilátky pro čistý rHA0; vakcíny Fluzone; a rHA0-kamence; při dávkách 0,5  $\mu\text{g}$  (černé sloupce), 0,1  $\mu\text{g}$  (stínované sloupce), 0,02  $\mu\text{g}$  (tečkované sloupce) a 0,004  $\mu\text{g}$  (bílé sloupce).

Obr. 4a, 4b a 4c znázorňují grafy anti-HA imunitní odezvy u myši imunizovaných rHA nebo schválenou trojvalenční vakcínou, 1994-1995 formule, v týdnech po vakcinaci vs. HIA titru pro HAI A/Texas/36/91 (obrázek 4a), HAI A/Shangdong/ 9/93 (obrázek 4b) a HAI B/Panama/45/90 (obrázek 4c), rHA (kosočtverce) a FLUVIRON zeslabené vakcíny kultivované ve vejcích (čtverečky).

Jak již bylo uvedeno, vynález se týká způsobu výroby rekombinantní chřipkové vakcíny. Celodélkový, neštěpený (HA0), hemaglutininový antigen z chřipkového viru se produkuje pomocí bakulovirových expresních vektorů v kultivovaných hmyzích buňkách a purifikuje za nedenaturačních podmínek. Dva nebo více purifikovaných hemaglutininových antigenů z kmenů influenzy A a/nebo influenzy B se smísily za vzniku multivalenční chřipkové vakcíny. Účinnost rekombinantních antigenů lze zvýšit jejich sloučením s nosičem adjuvansu.

Použití rekombinantní DNA technologie při výrobě chřipkových vakcín nabízí řadu výhod: rekombinantní DNA chřipkovou vakcínu lze vyrábět za bezpečných a přísněji

kontrolovaných podmínek; není zapotřebí propagace infekční influenzou ve vejcích; rekombinantní HA protein je čistší, což v podstatě eliminuje vedlejší účinky způsobené kontaminujícími proteiny; purifikační postupy pro rekombinantní HA nesmí zahrnovat virovou inaktivaci nebo organickou extrakci virálních membránových složek, čímž se eliminuje denaturace antigenů; produkce HA rekombinantní DNA technologií dává možnost eliminovat genetickou heterogenitu, ke které dochází během adaptace a průchodu vejci, což by mělo umožnit lépe přizpůsobit vakcínové kmeny epidemickými kmeny influenzy a dosáhnout tak vyšší účinnosti; přičemž rekombinantní přístup rovněž umožňuje provádět kmenovou selekci později v průběhu roku, čímž se získá delší čas pro shromáždění a vyhodnocení spolehlivějších epidemiologických dat, na jejichž základě se zmíněná selekce provede.

#### Bakulovirový expresní systém

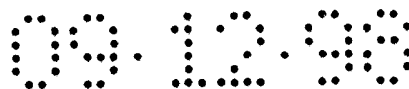
Jako bakuloviry se označují DNA viry spadající do rodiny *Baculoviridae*. Je známo, že tyto viry mají úzké hostitelské rozmezí, které se omezuje zejména na hmyzí druhy *Lepidoptery* (motýly a můry). Bakulovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV), který se stal prototypem bakuloviru se účinně replikuje v úspěšně pěstovaných hmyzích buňkách. AcNPV má dvouřetězcový uzavřený kruhový DNA genom tvořený přibližně 130 000 bazickými páry a je dobře charakterizován pokud jde o hostitelské rozmezí, molekulární biologii a genetické vlastnosti.

Mnoho bakulovirů včetně AcNPV, tvoří velké proteinové krystalické okluze uvnitř jader infikovaných buněk. Jediný polypeptid, označený jako polyhedrin, má na svědomí přibližně 95% proteinové hmoty těchto okluzních těl. Gen pro polyhedrin je přítomen v jediné kopii v AcNPV virovém genomu. Vzhledem k tomu, že polyhedrinový gen není podstatný pro virovou replikaci v kultivovaných buňkách, může snadno modifikovat expresi cizích genů. Sekvence cizího genu se vloží do AcNPV genu právě 3' koncem k polyhedrinové promotorové sekvenci, tj. za transkripční kontroly polyhedrinového promotoru.

Rekombinantní bakuloviry, které exprimují cizí geny se konstruují homologickou rekombinací mezi DNA bakuloviru a chimerickými plasmidy obsahujícími sledovanou genovou sekvenci. Rekombinantní viry lze detekovat pomocí jejich odlišitelné plakové morfologie a purifikovat z plak do homogenity.

Bakuloviry jsou použitelné zejména jako eukaryotické klonovací a expresní vektory. Díky svému úzkému hostitelskému rozhraní, které se omezuje na artropody, jsou obecně bezpečné. US úřad pro ochranu životního prostředí (EPA) schválil použití tří bakulovirových druhů pro kontrolu škodlivého hmyzu. AcNPV se již několik let aplikuje na zemědělské plodiny.

AcNPV standardní typ a rekombinantní viry se replikují v celé řadě různých hmyzích buněk včetně kontinuálních buněčných linií odvozených ze *Spodoptery frugiperdy* (Lepidoptera; Noctuidae). Čas zdvojení u buněk *S. frugiperda* je 18 až 24 hodin. Tyto buňky se mohou propagovat v monovrstvě nebo volných suspenzních kulturách.



Rekombinantní HA proteiny se mohou produkovat například v buňkách odvozených z motýlích druhů *Spodoptera frugiperda*. Dalšími hmyzími buňkami, které lze infikovat bakulovirem, jsou například buňky druhů *Bombix mori*, *Galleria mellanoma*, *Trichplusia ni* nebo *Lamantbria dispar*, které lze rovněž použít jako vhodný substrát pro produkci rekombinantních HA proteinů.

Nejvýhodnější hostitelskou buněčnou linií pro produkci proteinů z rekombinantních bakulovirů je Sf900+. Další výhodnou hostitelskou buněčnou linií pro produkci proteinů z rekombinantních bakulovirů je Sf9. Sf900+ a Sf9 představují netransformované, netumorigenové kontinuální buněčné linie odvozené ze *Spodoptery frugiperdy* (Lepidoptera; Noctuidae). Buňky Sf900+ a Sf9 se propagují při 28±2°C bez obohacení oxidem uhličitým. Kultivačním médiem použitým pro buňky Sf9S je TNMFH, prostá směs solí, vitaminů, cukrů a aminokyselin, doplněná 10% fetálním bovinním sérem. S výjimkou fetálního bovinního séra se žádné další produkty odvozené ze zvířat (tj. trypsin atd.) při buněčné propagaci nepoužívají. Pro růst buněk Sf9 lze rovněž použít séra prosté kultivační médium (dostupné jako Sf900 kultivační médium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD), které je vhodné zejména pro propagaci buněk Sf900+.

Doba populačního zdvojení buněk Sf9 je 18 až 24 hodin, tyto buňky se mohou propagovat jako monovrstva nebo jako volné suspenzní kultury. Doposud nebylo zveřejněno, že by buňky *S. frugiperdy* podporovaly replikaci jakéhokoliv známého savčího viru.

Odborníkům v daném oboru je zřejmé, že expresní vektor se neomezuje pouze na bakulovirový expresní systém. Rekombinantní HA proteiny se rovněž mohou exprimovat v

dalších expresních vektorech, například virech Entomopox (virus hmyzího moru) a hmyzí buňky se potom mohou transformovat konstituční expresí rekombinantního HA genu nebo genů.

#### Izolace kmenů influenzy

Z těl jedinců infikovaných chřipkou se izoloval jeden nebo několik kmenů influenzy. Výhodně jsou kmeny influenzy ty kmeny, které identifikoval Úřad pro potraviny a léčiva (FDA) nebo CDC, které mají epidemický potenciál pro následující chřipkové období. Výhodou zde popsaného způsobu je to, že jako přímý zdroj viru lze použít například nazální sekrety pacientů infikovaných chřipkou. Alternativně lze viry získat z FDA nebo CDC.

#### Propagace kmenů influenzy

Kmeny se dále propagovaly v buňkách produkujících vysoké virové titry, například v Madin Darby psích ledvinových (MDCK) buňkách (dostupných ve sbírce American Type Culture Collection pod přístupovým číslem ATCC CCL34). Například MDCK buňky se infikují v přítomnosti tosylfenylalanylchloromethylketonem (TPCK) částečně inaktivovaném trypsinu a v takových koncentracích fetálního bovinního séra, které jsou optimální pro produkci vysokých titrů prvního viru. MDCK buňky se infikovaly chřipkovými kmeny při nízké násobnosti infekce (0,1 až 0,5), jak určil standardní HA test (Rosen, „Hemagglutination with Animal Viruses“ in *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel a N.P. Salzman, str. 276-28 (Academic Press, New York 1969). Infikované buňky se inkubovaly 48 hodin při 33°C a

médium se použilo pro testy, jejichž úkolem bylo určit hemaglutinační aktivitu a tedy virovou produkci. Podmínky poskytující nejvyšší HA aktivitu se následně použily pro přípravu velké zásoby viru influenzy.

#### Purifikace viru

Virové částice, produkované z první frakce, se purifikovaly z média za použití některé známé purifikační metody, například odstředování s hustotním gradientem sacharózy. Virus se například sklídil 24 až 48 hodin po infekci centrifugačním médiem MDCK buněk infikovaných influenzou. Výsledná virová peleta se resuspendovala v pufru a odstředovala přes pufrovaný sacharózový gradient. Pás chřipkového viru se sklídil ze 40 až 45% sacharózového úseku gradientu, naředil puftrem a peletoval odstředováním při 100 000 x g. Purifikovaná virová peleta se resuspendovala v pufru skladovala při -70°C.

#### Klonování hemaglutininových chřipkových genů

Přehled způsobů klonování HA genů poskytuje obrázek 1. Buňky jsou v podstatě infikovány chřipkovým kmenem, který se má klonovat. Virus se sklídí z buněčného média a izoluje se buď virová RNA pro kmene influenzy A nebo mRNA pro kmene influenzy B. Virová RNA (-RNA) se extrahuje z purifikovaných virionů a pomocí standardních metod analyzuje na formaldehydo-agarózových gelech. cDNA se syntetizuje, buď za použití univerzálního primerového systému v případě virové RNA izolované z kmenů influenzy A nebo za použití nahodilých primerů v případě mRNA izolované



z kmenů influenzy B. Plus-standardní komplementární DNA (cDNA) se připraví za použití univerzálního oligonukleotidového primeru (5'-AGCAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:1)), který je homologický se všemi hemagglutininovými RNA segmenty ve virech influenzy A a B (Davis a kol., „Construction and characterization of a bacterial clone containing the hemagglutinin gene of the WSN strain (HON1) of influenza virus“ *Gene*, 10:205-218 (1980)). Primery jsou navrženy tak, aby byly homologické se zachovanými úseky na 5' a 3' konci chřipkových hemagglutininových genů. Jak 5', tak 3' primer má na svých koncích rovněž restriční enzymatická místa, která se nacházejí v hemagglutininových genech.

Vhodné primery influenzy A a B a chřipková cDNA se smísí a pomocí standardních PCR postupů se amplifikují hemagglutininové genové segmenty. Výsledné dvouřetězcové DNA fragmenty obsahují sekvence kódující celý zralý hemagglutinin. Pro amplifikaci celého HA genu, který se následně naklonuje do vhodného bakteriálního hostitele, jakým je například *E. coli*, se používá polymerázová řetězová reakce („PCR“). 5' konce se sekvencují s cílem identifikovat signální peptid HA genů, načež se pro amplifikaci HA genů bez signálního peptidu použije PCR. Ten se následně naklonuje do plasmidového transferového vektoru obsahujícího AcNPV polyhedrinový promotor. Výsledné transferové vektory obsahují následující 5' -> 3' sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru *A. californica* NPV, ATG translační startovací kodon, 61K bakulovirový signální peptid, kódující sekvence pro zralý hemagglutin, přirozený hemagglutininový translační terminační kodon, polyhedrinový RNA polyadenylační signál a lemovací bakulovirovou DNA.



Purifikovaná DNA chimerického transferového plasmidu, která obsahuje klonovaný hemagglutininový gen se následně smísí s AcNPV standardním typem DNA, vysráží společně s vápníkem a transfektuje do buněk *S. frugiperdy*. Rekombinantní bakuloviry se rozdělí za základě morfologie plak a dále purifikují dalšími cykly plakové purifikace. U klonovaných rekombinantních bakulovirů se určuje hemagglutininová exprese a jednotlivé bakulovirové expresní vektory se rozdělí tak, aby produkovaly základní virovou banku.

#### Kmeny influenzy A

HA geny z kmenů influenzy A se klonovaly z purifikovaných virových RNA přípravků. Virová RNA se extrahovala ze 100 až 200  $\mu$ l purifikovaných virionů influenzy A, obsahujících 1 000 až 2 000 hemagglutinačních jednotek (HAU) influenzy. Jedna HAU odpovídá množství viru, které bude srážet 50 % červených krvinek ve standardním testu srážlivosti (Rosen, 1969). Viriony se ošetří proteinázou K, jejímž úkolem je digerovat protein a potom se virová DNA extrahuje shodnými objemy fenolu a chloroformu a vysráží ethanolem v přítomnosti tRNA nosiče. Virová RNA se resuspenduje v pufru a digeruje RNAzy-prostou DNAzou, jejímž úkolem je odstranit veškerou kontaminující DNA, načež se extrakční a srážecí krok zopakuje. Virová RNA (vRNA) se následně analyzuje za použití formaldehydoagarózových gelů způsobem, který popisuje Maniatis a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. str. 86-96 a 366-367 (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring, N.Y. 1982).



### Kmeny influenzy B

HA geny z kmenů influenzy B se klonují z celkové mediátorové RNA (mRNA), extrahované z buněk infikovaných kmenem influenzy B. Celá RNA se následně extrahovala z infikovaných buněk. Sklizené buňky se lyzovaly v přítomnosti guanidiniumthiokyanátu a celá buněčná RNA se purifikovala, například za použití RNA extrakční sady od společnosti Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ). Celá mRNA se extrahovala z buněčné RNA na Oligo-(dT)-celulózových odstředěných kolonách, například pomocí RNA extrakční sady od společnosti Pharmacia Biotech Inc.

### Exprese a zpracování rekombinantního hemaglutininu v hmyzích buňkách

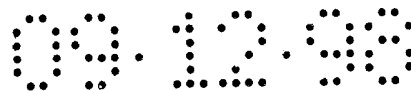
Rekombinantní hemaglutininové antigeny se exprimovaly ve vysoké koncentraci, v buňkách *S. frugiperda* infikovaných AcNPV-hemaglutininovými vektory. Hlavním genovým produktem je nezpracovaný celodélkový hemaglutinin (rHA0), který se nesekretuje ale zůstává spojen s periferními membránami infikovaných buněk. Tímto rekombinantním HA0 je protein s molekulovou hmotností 68 000, který je glykosylátovaný N-navázaným vysokomanósovým typem glykanů, které se liší od glykanů produkovaných expresí virových proteinů v savčích nebo ptačích buňkách. To dokazuje, že rHA0 tvoří posttranslačně trimery, které se akumulují v cytoplazmatických membránách.

## Vektory pro expresy HA0 a dalších proteinů

HA0 je díky své vynikající stabilitě v porovnání s HA1/HA2 komplexem a díky zachování správného sbalení během purifikace a skladování lepší vakcínou. Vynikající stabilita je zvláště patrná v případě B kmenů, což se projevuje u titrů, které jsou přibližně 5krát větší než titry, získané pomocí komerčně dostupných, slabších, B kmenů.

Jak zmiňují níže uvedené příklady, pokud se HA geny klonovaly v pMGS12 přes restriční místa, potom se HA zralý signální peptid odstraní a nahradí bakulovirovým chitinázovým signálním peptidem, označeným jako 61 kD signální peptid. Vzhledem k tomu, že HA gen je na chitinázový signální peptid navázán přes restriční místa, jsou mezi zralým HA0 proteinem a 61 kD signálním peptidem, v závislosti na zvoleném restričním místě, tři až pět aminokyselin. Přesto, že s kmenem influenzy A nebyly žádné problémy, kmen HA0 B exprimovaný dalšími aminokyselinami se nesbalil správným způsobem.

Pro řešení tohoto problému byly vyvinuty dva způsoby. Prvním je použití nového vektoru, pMGS3, který nekóduje 61 kD signální peptid. HA0 se svým přirozeným signálním peptidem se naklonuje do vektoru a exprimuje. Při SDS-PAGE charakterizaci HA0 B kmene exprimovaný v tomto vektoru, vykazuje lepší glykosylaci a zpracování, než pokud je exprimován v pMGS12. Tento HA0 je sbalen tak dokonale, že ho lze kvantitativně převést na HA1/HA2. Naneštěstí, jak ukázal westernový přenos, výtěžek není tak vysoký. Druhý způsob zvyšuje výtěžek použitím 61 kD signálního peptidu v pMGS12 pro řízenou expresi, při které se HA0 gen inzertuje



bez použití restričních enzymů. Nový vektor zahrnující 61kD signální peptid a HA0 gen bez sekvenční, kódující zevně intervenující aminokyseliny, je označen jako pMGS27.

pMGS27 může být použit pro klonování a expresi libovolného genu v bakulovirovém expresním systému. Cílový gen, namísto aby se klonoval do vektoru restrikcí a ligací, se klonuje do vektoru temperací. Reakční činidla lze získat u společnosti Clontech v jejich PCR-řízeném klonovacím systému. pMGS27 je navržen tak, že může být linearizován na konci úseku, kódujícího chitinázový signální peptid, a dva dlouhé jednořetězcové konce lze vytvořit ošetřením linearizovaného pMGS27 T4 DNA polymerázou a dATP.

Cílový gen se amplifikuje pomocí polymerázové řetězové reakce („PCR“) nebo pomocí reverzní transkriptázové-PCR („RT-PCR“) s párem oligonukleotidů navržených tak, aby vytvořily jednořetězcové konce, které jsou komplementární s konci ošetřeného pMGS27, načež se PCR fragment ošetří T4 DNA polymerázou a dTTP. Pomocí prosté temperace lze následně sloučit dvě molekuly tak, že se vytvoří kruhový plasmid, který se snadno transformuje do hostitele. Kromě toho, že tento postup je rychlejší a snadnější než tradiční restričně-ligační způsob klonování HA genu do pMGS12, je výhodou pMGS27 to, že neposkytuje nadbytečné aminokyseliny, kódované restričními místy mezi chitinázovým signálním peptidem a zralým HA proteinem. V některých případech, například v případě B kmene HA, může přítomnost nadbytečných aminokyseliny vést k tomu, že signální peptidáza nemůže rozštěpit signál nebo že se kódovaný protein sbalí nesprávným způsobem.

## Purifikace rekombinantního HA0

Několik dní po infekci lze rHA0 selektivně extrahovat z periferních membrán AcNPV-hemaglutininem infikovaných buněk nenedenaturačním noniovým detergentem nebo dalšími způsoby, které jsou pro purifikaci rekombinantních proteinů z hmyzích buněk včetně afinitní nebo gelové chromatografie a navázání protilátek odborníkům v daném oboru známy. rHA0 rozpustný v detergentu může být dále purifikován pomocí DEAE iontoměničové a čočkové lektinové afinitní chromatografie nebo dalších ekvivalentních metod, odborníkům v daném oboru známých.

U výhodného provedení se rHA0 purifikuje postupem, který je opatrnější a jeho výsledkem je vyšší výtěžek rHA0 z B kmenů influenzy. Tento postup je zpravidla následující.

HA0 protein, který tvoří nedílnou součást membrány hmyzích buněk se separuje z rozpustných proteinů, periferních membránových proteinů a většiny DNA a RNA extrakcí buněk v relativně viskózním roztoku alkálie, přičemž pH alkálie se pohybuje přibližně v rozmezí od 9,5 do 10,5. Viskóza se zvyšuje v důsledku inkluze sacharózy při koncentraci přibližně 250 mM. Disulfid-redukující činidlo, například  $\beta$ -merkптоethanol, je použito v takové koncentraci, která účinně brání navázání proteinu ze směsi na disulfid. Buňky se suspendují v extrakčním pufru, homogenizují a následně odstřeďují. Peleta se promyje homogenizací v pufru s nízkou iontovou silou, který obsahuje disulfid-redukující činidlo při alkalickém pH (vodivost je zpravidla menší než 1 mS, pH 10,5) a odstřeďuje se. HA0 se následně extrahuje z pelety v pufru, který obsahuje 0,3 až 1,5 % detergentu, například Tritonu a

disagregační činidlo v množství, které brání tvorbě komplexů způsobené vzájemnými reakcemi mezi náboji, například 0,3 až 1,0 M betainu nebo paurinu, při alkalickém pH (výhodně 9,5). HA0 v supernatantu se následně purifikuje aniontoměničovou chromatografií a následnou kationtoměničovou chromatografií. HA0 se ve stejném pufru, ve kterém se extrahoval ale který se naředí alespoň 1:2 dalším puftrem, aplikuje na iontoměničovou kolonu, například DEAE nebo Q-Sepharosa (agarózová kuličková kolona s kvarterními aminoskupinami), která se před tím uvedla do rovnovážného stavu puftrem, který obsahoval přibližně 1/10 koncentrace detergentu a disulfid-redukujícího činidla. HA0 se následně eluuje snížením pH přibližně na 8,5. Eluovaný HA0 se aplikuje na kationtoměničovou kolonu ve v podstatě stejném pufru. Kontaminující látky se eluují snížením pH přibližně na 7,4, a následně se HA0 eluuje zvýšením koncentrace soli na 0,15 M NaCl.

Tento výhodný způsob purifikace bude podrobněji popsán níže.

#### Preparace rekombinantní HA-obsahující membránové frakce

Buňky exprimující rekombinantní HA (6,2 g buněk z 0,34 l kultury) se suspendují při 100 mg/ml v ledově studeném 100 mM pyrofosfátu sodném, 100 mM chloridu sodného, 250 mM sacharózy, 0,1%  $\beta$ -merkптоethanol, pH 10,5. Buňky se rozrušily pomocí homogenizéru Polytron (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) při dvouminutovém nastavení 4. Pro zvýšení rozpustnosti kontaminujících proteinů a zvýšení čistoty membránového přípravku je třeba použít alkalické pH homogenizačního média. Homogenizát se

odstřeďuje 30 minut při 9 200 g. Supernatant se rozruší a pelety se shromáždí. Po preparaci membránové frakce následuje promývací krok, ve kterém se membránová frakce promývá roztokem s nízkou iontovou silou. Peleta se resuspenduje do původního objemu v ledově studeném 0,1%  $\beta$ -merkapt ethanolu, 10,5, a homogenizuje za použití homogenizéru Polytron při dvou minutovém nastavení 4. Homogenizát se odstřeďuje 30 minut při 9 200 g. Supernatant se odstraní a pelety se seberou. Tento průplach s nízkou iontovou silou odstraní další část periferních membránových proteinů. Preparace membránové frakce vede ke značnému obohacení rekombinantního HA a k odstranění kontaminujících nukleových kyselin.

#### Extrakce rekombinantního HA

Rekombinantní HA se následně selektivně extrahuje z membránové pelety za podmínek, které nedenaturují antigen. Membránová peleta se homogenizuje ve 41 ml ledově studeného 10 mM ethanolaminu, pH 9,5, 1% Tritonu N101, 0,1%  $\beta$ -merkapt ethanolu, 25 mM NaCl a 400 mM betainu za použití homogenizéru Polytron při dvouminutovém nastavení 4. Po čtyřicetiminutové inkubaci při 23°C se směs odstřeďuje 30 minut při 9 200 g. Supernatant obsahující rekombinantní HA se oddekantuje a naředí na dvojnásobek stejným puforem.

Proteiny se analyzují pomocí SDS polyakrylamidové gelové elektroforézy. Vzorky se rozruší desetiminutovým pobytem ve vroucí vodní lázni v přítomnosti 2% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 5%  $\beta$ -merkapt ethanolu, podrobí elektroforéze na 11% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% SDS a následně se zabarví modří Coomassie.

### Chromatografická purifikace

Chromatografická purifikace rekombinantního HA se zjednoduší a drahá afinitní chromatografie na čočkové lectin-sepharóze se z procesu vyloučí a nahradí dvoustupňovým chromatografickým purifikačním procesem, který poskytne vysoce purifikovaný rekombinantní HA antigen, který není denaturován a lze vhodně použít jako složka chřipkové vakcíny pro humánní aplikaci. Jako chromatografické gelové matrice se použily matrice Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow a CM-Sepharose Fast Flow.

### Aniontoměničová chromatografie

Celá chromatografie se provádí při pokojové teplotě. Extrakt, který obsahuje rekombinantní HA, připravený výše popsaným způsobem se aplikuje rychlostí 1 ml/min na Pharmacia Q-Sepharose Fast Flow (5 ml v koloně C10/10 Pharmacia), která se předtím uvede do rovnovážného stavu 10 mM ethanolaminem pH 9,5, 0,1% tritonem N101, 0,01%  $\beta$ -merkптоethanolem, 25 mM NaCl a 400 mM betainem. Kolona se potom promývá vyrovnávacím pufrem, dokud se UV absorbance odtékající látky nevrátí zpět na počáteční hodnotu. Za těchto podmínek se rekombinantní HA váže na kolonu, zatímco část kontaminujících látek proudí touto kolonou bez zachycení. Částečně purifikovaný rekombinantní HA se následně eluuje 30 mM diethanolaminu pH 8,5, 0,1% Tritonem N101, 0,01%  $\beta$ -merkптоethanolem, 25 mM NaCl a 400 mM betainem.

### Kationtoměničová chromatografie

Q-Sepharosový eluát (23 ml) se naředí na dvojnásobný objem 30 mM diethanolaminem pH 8,5, 0,1% Tritonem N101, 0,01%  $\beta$ -merkптоethanolem, 10 mM NaCl a 400 mM betainem. Kolona se následně promyje 35 ml 10 mM fosforečnanem sodným pH 7,4, 0,1% Tritonem N101, 0,01%  $\beta$ -merkптоethanolem, 10 mM NaCl a 400 mM betainem. Toto ošetření eluuje kontaminující látky z kolony, zatímco rekombinantní HA zůstane navázaný na CM Sepharose. Detergent se následně odstraní promýváním kolony 10 mM fosforečnanem sodným pH 7,4, 10 mM NaCl, které se ukončí až potom, co UV absorbance proudu vytékajícího z kolony dosáhne opět své počáteční hodnoty. Purifikovaný rekombinantní HA se eluuje fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem, pH 7,5 (PBS).

Purifikovaný rHA0 se resuspenduje v isotonickém pufrovaném roztoku. Po odstranění detergentu bude purifikovaný HA0 účinně aglutinovat červené krvinky.

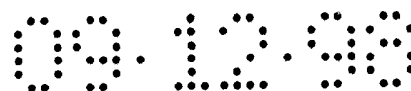
### Strukturní a biochemické vlastnosti rekombinantního HA0

rHA0 se purifikuje do dosažení alespoň 95% čistoty, výhodněji do dosažení 99% čistoty. Na SDS-polyakrylamidovém gelu migruje, převážně jako jediný, hlavní polypeptid s molekulovou hmotností 68 000. Kvarterní struktura purifikovaného rekombinantního HA0 antigenu se určuje pomocí elektronové mikroskopie, trypsinové resistance, hustotní sedimentační analýzy a schopnosti aglutinovat červené krvinky. Z výsledků těchto testů vyplývá, že rekombinantní HA0 tvoří trimery, které se sestavují do tvaru růžic.



Purifikovaný rHA0 neaglutinuje před odstraněním detergentu buňky, z čehož vyplývá, že aby se antigen mohl křížově navázat na červené krvinky kuřete, musí vytvořit komplexy (růžice). Kvantitativní schopnost purifikovaného rHA0 aglutinovat buňky se využívá jako (lot-to-lot) míra konzistence antigenu. Hemagglutininová jednotka se definovala jak množství antigenu, které je potřebné pro dosažení 50% aglutinace ve standardním hemagglutininovém testu, prováděném na červených krvinkách kuřete. Srovnávací data ukázala, že purifikované rHA0 antigeny aglutinují červené krvinky s účinností, srovnatelnou s účinností pozorovanou v souvislosti s celkovými chřipkovými viriony.

Rekombinantní HA0 se může štěpit v místě disulfidové vazby, což může způsobit konformační změnu, která vede k vytvoření dvou řetězců, HA1 a HA2, jak uvádí Carr, C.M. a Kim, P.S., „A Spring-loaded Mechanism for the Conformational Change of Influenza Hemagglutin“, Cell 73:823-832 (1993). Rozštěpení rekombinantního HA0 je podrobněji popsáno v níže uvedeném příkladu 6. Rovněž se dá předpokládat, že po rozštěpení přirozeného HA0 na HA1 a HA2, se řetězce stanou infekčními získáním schopnosti vázat se na buňky a tak se dosáhne lepší imunitní odezvy. Toto zpracování antigenů, například chřipkového hemagglutininu, se projeví navázáním antigenových peptidů na hlavní histokompatibilní (MHC) molekuly. Rozpoznání antigen/MHC komplexu T buňkami představuje iniciaci imunitní odezvy, jak přehledně popisuje Harding a Geuze, *Current Opinion in Cell Biology* 5:596-605 (1993). Nicméně rHA0, produkovaný v bakuloviru, je vysoce stabilní a imunogenní jako intaktní molekula. Porovnání molekul cukru na HA0 exprimovaném v



hmyzích buňkách ukázalo, že se tyto glykany liší od glykanů na HA0, exprimovaném v savčích nebo ptačích buňkách.

#### Produkce fúzních proteinů

Fúzní proteiny, tvořené HA0 navázaným na druhý antigenový protein, lze produkovat, pokud je antigenicita druhého proteinu nižší nebo pokud je výhodné vyvolání imunogenní odezvy na více antigenů. Příkladem druhého výhodného antigenu je neuraminidáza produkovaná chřipkou. Tento antigen může být tvořen celulárním, virovým nebo bakteriálním proteinem nebo jeho antigenovou částí, zahrnující alespoň pět až osm aminokyselin. Další antigeny zahrnují hepatitický B antigen, HIV antigeny a karcinoembryonický antigen. Výraz „imunitní odezva“, jak je zde uveden, označuje buď humorální odezvu, měřenou produkcí protilátky k antigenu, nebo celulární odezvu, měřenou vyvoláním T buňkou mediované odezvy na antigen. V některých případech se může mezi HA a antigen zavést „vazebník“ neantigenových aminokyselin a tím tak dále zvýšit antigenicitu antigenu, v porovnání s původním HA. Součástí způsobu je zkonstruování DNA plasmidu pro fúzi genů cílového antigenu na celodélkový HA gen chřipkového genu nebo jeho fragmenty za použití oligonukleotidových sond a metodologie polymerázové řetězové reakce (PCR).

Fúzní geny HA-cílového antigenu se modifikují pro správnou expresi hmyzích buněk delecí přirozených hydrofobních signálních peptidových sekvencí a jejich náhradou novým bakulovirovým signálním peptidem. Fúzní protein se zavede do bakulovirového expresního vektoru tak, že bakulovirový polyhedronový promotor řídí transkripci

fúzních proteinů v infikovaných hmyzích buňkách. Osmnáctiaminokyselinový bakulovirový signální peptid řídí transkripci fúzního polypeptidu HA-cílového antigenu do glykosylační dráhy hmyzí buňky a není přítomen na zralém fúzním proteinu.

Například plasmid pA9440, který obsahuje HA gen A/Beijing/32/92 kmene v níže popsaném pMGS12 bakulovirovém transferovém plasmidu se použije jako matrice pro amplifikaci HA genu polymerační řetězovou reakcí (PCR) a za použití protokolu doporučeného dodavatelem (Gene Amp PCR cloning kit, Perkin Elmer Cetus). Reakční směs (100  $\mu$ l), obsahovala 20 pmol primerů navržených pro temperaci částí HA genu. 5' a 3' primer byly navrženy s endonukleázovými místy na koncích, které se nenacházely v HA genu. 5' PCR primer (0 až 567) pro HA0a HA1 fragmenty začíná 52 bazických párů za 5' koncem sekvencí kódujících přirozený HA gen, které postrádají přirozenou signální peptidovou sekvenci, a přidává *Sma*I místo bezprostředně za 5' na sekvenci kódující HA. 5' PCR primer (0 až 651) pro HA2 začíná na nukleotidu 1108 zralého HA genu, bezprostředně následujícím za kodonem kódujícím argininový zbytek, který se odstranil během rozštěpení HA0 na HA1 a HA2. Byl navržen 3' PCR primer (0 až 680) pro HA0 a HA2 fragmenty, který zavede *Kpn*I místa bezprostředně za HA kódující sekvence, které odstraňují přirozený koncový kodon. 3' PCR primer pro HA1 (0 až 679) upravuje gen bezprostředně před argininovým zbytkem odstraněným během HA0 štěpení. Amplifikace fragmentu HA genu se prováděla ve třiceti cyklech, z nichž každý sestával z jednominutové denaturace při 94°C, dvouminutového temperování primerů při 55°C a dvouminutové extenze při 72°C. Výsledné amplifikované fragmenty HA genu

se podrobily elektroforéze na agarózovém gelu, purifikovaly z gelu pomocí sady GeneClean (Bio 101, Inc.) a ligovaly do plasmidu, navrženého tak, aby přijal PCR-generované fragmenty (pCRII; Invitrogen). Takže se získají plasmidy pB142, pB144 a pB330, které obsahují HA0, HA1, resp. HA2 genové fragmenty.

Z plasmidů pB142, pB144 a pB330 se pomocí *Sma*I a *Kpn*I restričních enzymů odstranily HA genové fragmenty, které se následně subklonovaly standardními rekombinantními DNA technikami (Sambrook a kol., 1989) do AcNPV transferového plasmidu pMGS12. Plasmid pMGS12 obsahuje, směrem od 5' k 3', AcNPV polyhedronový promotor, ATG iniciační kodon, sekvenci pro odštěpitelný signální peptid z bakulovirového glykoproteinu s molekulovou hmotností 61 000 (61K), *Sma*I a *Kpn*I klonovací místa pro restriční enzym a TAA univerzální koncovou kodonovou sekvenci. Tyto regulační oblasti lemuje DNA *Eco*RI I fragmentu AcNPV genomu (Summers a Smith, „A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures“, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987)). Klonované HA PCR fragmenty se izolují z pCRII klonovacího vektoru pomocí *Sma*I a *Kpn*I, purifikovaných elektroforézou na agarózovém gelu a sadou GeneClean, a ligovaly do pMGS12, který byl rovněž digеровán *Sma*I a *Kpn*I. Výsledné AcNPV transferové plasmidy, pB879, pB1201 a pB1205, obsahovaly kódovací oblasti pro HA0, HA1 resp. HA2 navázané v rámci s rozštěpitelným bakulovirovým signálním peptidem 61K genu a polyhedrinovým promotorem. Výsledné AcNPV transferové plasmidy, pB879, pB1201 a pB1205 lze použít pro fúzi HA0, HA1 nebo HA2 na libovolný sledovaný gen.

Druhým krokem při konstrukci HA-CEA fúzních genových transferových plasmidů je zavedení CEA-kódujících sekvencí do HA-kódujících konstruktů. Restrikční endonukleázou rozpoznávací/štěpná místa pro *Sma*I a *Kpn*I se umístila PCR amplifikací plasmidu pA9080 na oba konce CEA genu. 5' PCR primer, 0-649, začíná 82 bazických párů od 5' konce genu s delecí sekvence zralého CEA signálního peptidu. 3' PCR primer, 0-650, byl navržen pro delecí posledních 72 bazických párů na 3' konci genu, který kóduje hydrofobní sekvenci C-koncového úseku. Amplifikace CEA genového fragmentu se provádí ve třiceti cyklech, z nichž každý sestává z jednodominutové denaturace při 94°C, dvouminutového temperování primerů při 55°C a dvouminutové extenze při 72°C. Výsledný amplifikovaný CEA genový fragment se podrobil elektroforéze na agarózovém gelu, purifikoval metodou GeneClean a ligoval do pCRII (Invitrogen) způsobem, který doporučuje výrobce. Výsledný plasmid, pB806, obsahuje CEA gen bez jeho přirozeného signálního peptidu, C-koncové hydrofobní domény nebo koncového kodonu, ale jak se *Sma*I, tak s *Kpn*I místem na obou koncích genu.

Příprava peptidu ve velkém měřítku se prováděla pomocí plasmidu pB806 a DNA se digerovala buď pomocí *Sma*I nebo *Kpn*I. CEA-kódující fragmenty se purifikovaly elektroforézou na agarózovém gelu pomocí sady GeneClean a purifikované fragmenty se ligovaly do každého ze tří HA-kódujících konstruktů (pB879, pB1201 nebo pB1205), digerovaných stejným restrikčním enzymem. Například CEA-kódující fragmenty s *Sma*I-sestřiženými konci se ligovaly do HA0-, HA1- a HA2-kódujících konstruktů (pB879, pB1201, resp. pB1205) sestřižených *Sma*I tak, že vytvořily plasmidy pB1250, pB1555, resp. pB1584. CEA-kódující fragmenty s



KpnI-sestřiženými konci se ligovaly do HA0-, HA1- a HA2-kódujících konstruktů, sestřižených KpnI tak, že vytvořily plasmidy pB1264 resp. pB1564 a pB1593. Inzerce CEA genu na SmaI místě zavede CEA- kódující sekvence za HA-kódující sekvence. V případě všech konstruktů byly navrženy PCR primery tak, aby se EA gen vložil v rámci HA a aby se fúzní genová translace ukončila na univerzálním translačním koncovém signálu (TAATTAATTAA) (SEQ ID NO:4) v pMGS12 vektorových sekvencích za KpnI místem.

Tento konstrukt lze vylepšit delecí intervenujících aminokyselin, buď mezi signálním peptidem a HA0, jak bude popsáno dále, nebo mezi HA0 a fúzním genem, a zlepšit tak jeho sbalení a imunogenicitu.

#### Formulace a balení vakcíny

rHA lze formulovat a balit samotné nebo v kombinaci s dalšími chřipkovými antigeny, za použití metod a materiálů, které jsou odborníkům v oboru chřipkových vakcín známy. U výhodného provedení se HA proteiny ze dvou kmenů A a jednoho kmene B sloučí za vzniku multivalenční vakcíny.

U zvláště výhodného provedení se HA sloučí s adjuvansem, který se použije v množství, účinném pro zvýšení imunogenní odezvy proti HA proteinům. V současnosti je jediným, v širším měřítku používaným, adjuvansem u lidí kamenec (fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý). Saponin a jeho purifikovaná složka Quil A, Freundův kompletní adjuvans a další adjuvansy používané při výzkumu a při veterinárních aplikacích mají toxicitu, která omezuje jejich potenciální použití v lidských vakcínách. Nicméně

nově chemicky definované přípravky, jakými jsou například muramyldipeptid, monofosforyl lipid A, fosfolipidové konjugáty, například konjugáty, které popsal Goodman-Snitkoff a kol., J. Immunol. 147:410-415 (1991), a rovněž by se mělo použít zapouzdření proteinu v proteoliposomu, jak popisuje Miller a kol., J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992), a zapouzdření proteinu v lipidových vehikulech, například lipidových vehikulech Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH).

U výhodného provedení se vakcína balí ve formě jediné dávky, určené pro imunizaci parenterálním (tj. intramuskulárním, intradermálním nebo subkutánním) podáním nebo nazofaryngeálním (tj. intranazálním) podáním. Účinná dávka se stanoví způsoby, popsány v níže uvedených příkladech. Nosičem je zpravidla voda nebo pufrovaný fyziologický solný roztok, s konzervační látkou nebo bez konzervační látky. Antigen se může lyofilizovat a v okamžiku podání resuspendovat, nebo podávat v roztoku.

Nosičem může rovněž být polymerní systém se zpožděným uvolňováním. Syntetické polymery jsou zvláště použitelné při formulaci vakcíny, u které má být dosaženo kontrolovaného uvolňování antigenů. Raným příkladem byla polymerace methylnmethakrylátu do kuliček, s průměrem menším než jeden mikrometr, za vzniku takzvaných nanočástic, které popsal Kreuter J., Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacology, M. Donbrow (ed.), CRC Press, str. 125-148. Odezva protilátky, stejně jako ochrana proti infikaci chřipkovým virem, byla podstatně lepší než v případě, kdy se antigen podával v kombinaci s hydroxidem hlinitým. Experimenty s dalšími částicemi ukázaly, že



přídavný účinek těchto polymerů závisí na velikosti částic a hydrofobicitě.

Mikrozapouzdřením injekce mikrozapouzdřených farmaceutických látek se dosáhne jejich kontrolovaného uvolňování. Na volbu příslušného polymeru pro mikrozapouzdření má vliv celá řada faktorů. Reprodukovatelnost polymerní syntézy a mikrozapouzdřovací proces, cena zapouzdřovacího materiálu a ekonomická náročnost způsobu zapouzdřování, toxikologický profil, požadavky pro různou kinetiku uvolňování a fyzikochemickou slučitelnost polymeru a antigenů představují faktory, které je třeba vzít při rozhodování v úvahu. Použitelnými polymery jsou například polykarbonáty, polyestery, polyurethany, polyorthoestery a polyamidy, zejména ty, které jsou biologicky degradovatelné.

Často voleným nosičem pro farmaceutika a v poslední době častěji pro antigeny je poly(d,1-laktid-ko-glykolid) (PLGA), což je biologicky degradovatelný polyester, který se v lékařské praxi již dlouhou dobu používá, například v případech vstřebávacích stehů, kostních plotének a dalších dočasných implantátů, kde nevykazuje žádnou toxicitu. Do PLGA mikrokapslí se formuluje celá řada různých farmaceutik. K tomu, aby bylo možné upravit PLGA tak, aby kontrolovaně uvolňovala antigen, je třeba shromáždit určitá tělesná data, jak uvádí například Eldridge, J.H. a kol., Current Topics in Microbiology and Immunology, 1989, 146: 59-66. Zachycení antigenů v PLGA mikrokuličkách o průměru 1 až 10  $\mu\text{m}$  ukázalo, že mají značně adjuvansní účinek, pokud se podají orálně. PLGA mikrozapouzdřovací proces používá fázovou separaci emulze typu „voda v oleji“. Sledovaná sloučenina se připraví jako vodný roztok a PLGA

se rozpustí ve vhodných organických rozpouštědlech, například v methylenchloridu a ethylacetátu. Tyto dva nemísitelné roztoky se ko-emulgují vysokorychlostním mícháním. Potom se přidá nerozpouštědlo pro polymer, což způsobí vysrážení polymeru okolo vodných kapiček za vzniku embryonálních mikrokapslí. Mikrokapsle se ochladí a stabilizují jedním z činidel, která zahrnují polyvinylalkohol (PVA), želatinu, algináty, polyvinylpyrrolidon (PVP) a methylcelulózu, a buď sušením ve vakuu nebo extrakcí rozpouštědla se zbaví rozpouštědla.

Vynález se stane zřejmějším po prostudování následujících příkladů.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

#### Propagace a purifikace chřipkových virů

Z FDA v alantoické kapalině vejce kuřete se získaly následující kmeny chřipkové vakcíny:

A/Beijing/353/89-podobný (H3N2)

A/Beijing/32/92-podobný (H3N2)

A/Texas /36/91-podobný (H1N1)

B/Panama/45/90.

Pro propagaci původní zásoby chřipkového viru, získaného z FDA, se MDCK buňky infikovaly v přítomnosti TPCK-ošetřeného trypsinu (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a koncentracích fetálního bovinního séra, které jsou optimální pro přípravu nejvyšších titrů viru první choroby.

MDCK buňky se infikovaly chřipkovými kmeny při nízké multiplicitě infekce (0,1 až 0,5), jak určil standardní HA test (Rosen, „Hemagglutination with Animal Viruses“ in *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel a N.P. Salzman, str. 276-28 (Academic Press, New York 1969)). Infikované buňky se inkubovaly 48 hodin při 33°C a u média se provedl test hemaglutininové aktivity. stanovující produkci viru. Podmínky poskytující nejvyšší HA aktivitu se použily pro přípravu velkých zásob chřipkového viru. Optimální koncentrace TPCK trypsinu a fetálního bovinního séra pro výše uvedené chřipkové viry jsou shrnuty v níže uvedené tabulce 1.

Tabulka 1 Optimální koncentrace TPCK trypsinu a fetálního bovinního séra

	A/Beijing/353/89	A/Beijing/32/92	A/Texas/36/91	B/Panama/45/90
% Fetálního bovinního séra	0,25 %	0,25 %	0,25 %	5,0 %
Množství TPCK ošetřeného trypsinem	45 $\mu$ /ml	45 $\mu$ /ml	45 $\mu$ /ml	3 $\mu$ /ml

### Purifikace chřipkového viru

Virus se 24 až 48 hodin po infekci sklídil z 10 T175 kultivačních nádob klarifiačního média (1 000 x g po dobu 10 minut), chřipkou infikovaných MDCK buněk. Virus se peletoval z média při 100 000 x g po dobu 1 hodiny. Výsledná virová peleta se resuspendovala v 1 ml fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS) pH 7,4 a odstřeďovala přes 20 ml 20-60% (hm./obj.) sacharóзовého gradientu v PBS. Pás chřipkového viru se sklídil ze 40-45% sacharóзовé oblasti gradientu, naředil PBS a peletoval při 100 000 x g. Purifikovaná virová peleta se resuspendovala v 0,5 ml PBS, skladovaného při -70°C.

### Příklad 2

#### Klonování HA genu influenzy A/Texas/36/91

Specifický příklad klonovaného kroku pro jeden z chřipkových HA genů je znázorněn na obrázku 2. Virová RNA se extrahovala výše popsaným způsobem z influenzy A/Texas/36/91, získané z CDC. Univerzální primer, komplementární s koncem 3' chřipkových RNA segmentů 5'-AGCAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:1), se použil spolu s reverzní transkriptázou viru myší Maloneyovy leukémie (M-MuLV) pro výrobu chřipkové cDNA. Purifikovaná virová RNA nebo mRNA (5 µg) se použila jako matrice pro výrobu cDNA, používající M-MuLV reverzní transkriptázu, dodanou společností Pharmacia Inc. v sadě First-Strand cDNA Synthesis Kit. Primerem, použitým pro cDNA virové RNA z chřipkových kmenů A, byl syntetický oligonukleotidový

primer (5'-AGCAAAAGCAGG-3') (SEQ ID NO:1), který je homologický s koncem 3' všech segmentů HA genového virionu.

Amplifikace HA genů z cDNA se provedla polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) za použití standardních reakčních podmínek (Gene Amp kits; Cetus/Perkin Elmer, Norwalk, CT). PCR reakční směs (100  $\mu$ L) obsahovala 20 pmolů primerů, specifických pro 5'a 3' konec HA genu chřipkového kmene influenza A (H3) nebo A (H1) nebo chřipkové kmeny influenza B, jak ukazují konvenční sekvence zjištěné v genové bance DNA dat, která ukazuje tabulka 2. Amplifikace se prováděla ve třiceti cyklech, z nichž každý sestával z jednodominutové denaturace při 94°C, dvouminutové temperace při 55°C a třiminutové extenze při 72°C. Správná velikost PCR produktů se před klonováním potvrdila na 0,8% agarózových gelech.

PCR primery z konce 5' HA genu: 5'-GGG GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA-3' (SEQ ID NO:2) a konce 3' HA genu: 5'GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEQ ID NO:3) se použily při PCR k získání celodélkového HA genu.

Nový 5' PCR primer byl navržen z 5' konce genu: 5'-GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT-3' (SEQ ID NO:4) a 3' konce genu: 5'-GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEQ ID NO:5). Tyto primery se použily při PCR k získání HA genu bez sekvence signálního peptidu. Ten se následně vložil do TA vektoru rozštěpeného KpnI. 61K signální peptid pro bakulovirovou expresi a polyhedrinový promotor se následně vložil do TA vektoru, obsahujícího HA gen postrádající sekvenci chřipkového signálního peptidu. Výsledný bakulovirový rekombinantní vektor obsahoval polyhedrinový promotor,

61K bakulovirový signální peptid a HA gen pro influenzu A/Texas/36/91.

HA geny z chřipkových kmenů influenzy B se klonovaly z celkové mediátorové RNA (mRNA), extrahované z MDCK buněk infikovaných chřipkovým kmenem B, B/Panama/45/90. Celková RNA se připravila z 5 T175 láhví infikovaných buněk. Sklizené buňky se lyzovaly v přítomnosti guanidiniumthiokyanátu a celková RNA se purifikovala výše popsaným způsobem. Celková mRNA se extrahovala z celulární RNA za použití výše popsaných oligo-(dT)-celulózových odstředovaných kolon.

Primerem, použitým pro mRNA chřipkových kmenů B byl nahodilý oligonukleotidový DNA primer (Pharmacia, Inc.).

Tabulka 2 Primery použité pro PCR amplifikaci

A/Beijing/32/93	
5' konec genu (SEQ ID NO:27)	5' GGG <u>GGA TCC GGT ACC AAA AGC AGG GGA TAA TTC TAT</u> 3' BamH1 Kpn1
5' konec minus HA signální peptid (SEQ ID NO:28)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG GAC TTT CCA GGA AAT GAC AAC AG</u> 3' Kpn1 Sma1
3' konec (SEQ ID NO:29)	3' TAA TTA ATT TTT GTG GGA ACA AAG ATC CTA AGC CAT <u>GGC CC</u> 5' Kpn1

A/Texas/36/91	
5' konec genu (SEQ ID NO:2)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG AGC AAA AGC AGG GGA AAA TAA AAA</u> 3' Kpn1 Sma1
5' konec minus HA signální peptid (SEQ ID NO:4)	5' GGG <u>GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT</u> 3' Kpn1 Sma1
3' konec (SEQ ID NO:3)	3' GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT <u>CCA TGG CCC</u> 5' Kpn1



Tabulka 2 pokračování

B/Panama/45/90	
5' konec genu (SEQ ID NO:30)	5' GGG GAA TTC GGT ACC CCC GGG AAG GCA ATA ATT GTA CTA CTC ATG GT 3' EcoRI KpnI SmaI
5' konec minus HA signální peptid (SEQ ID NO:31)	5' GGT ACC CCC GGG GAT CGA ATC TGC ACT GGG ATA ACA 3' KpnI SmaI
3' konec (SEQ ID NO:32)	3' TG TTA CAA AGA ACA/G AGG TAG ACA GAC ACT CCA TGG CCT AGG CTT AAG GGG 5' KpnI BamHI EcoRI

99.10.98

Příklad produktů cDNA syntézy použil jako matrici virovou RNA chřipkového viru A/Texas/36/91. Oblast cDNA segmentů, která kóduje chřipkové proteiny by mohla být zjištěna následujícím způsobem. Purifikovaná virová RNA se sloučí v reakční směsi s univerzálním jednořetězcovým DNA primerem 5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO: 124) (SEQ ID NO:1). Tento primer je komplementární s 3' koncem již zmíněných segmentů chřipkového virionu. Reakce rovněž zahrnovala přidání [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, čímž se zajistila vizualizace cDNA produktů, které se separovaly na 1,5% alkalickém hydrolyzačním gelu (Maniatis a kol., 1982) a exponovaly na X-OMAT-AR film.

### Příklad 3

Klonování HA genů do bakteriálních plasmidů

PCR amplifikované rHA geny se klonovaly do pUC-podobného plasmidového vektoru, za použití TA klonovacího systému (Invitrogen, Inc.). Přítomnost HA genů se ověřila restriktivně enzymatickou digerační analýzou plasmidové DNA, purifikované standardními postupy (Maniatis a kol., 1982). Konec 5' rHA genů se následně analyzoval DNA sekvencováním a pro odstranění sekvencí, kódujících hydrofobní signální peptidy na N-konci HA proteinů, byly navrženy nové primery. Specifické 5' a 3' oligonukleotidové primery, jejichž seznam uvádí tabulka 2, se následně použily pro amplifikaci cDNA produktů, k níž se použila PCR, a standardními klonovacími metodami se klonovaly do *E. coli* TA plasmidových vektorů (Invitrogen, Inc.). Výsledné DNA klony obsahovaly kódovací sekvence pro zralé HA.

rHA geny z A/Texas/36/91, A/Beijing/353/89, A/Beijing/32/92 a B/Panama/45/90 se subklonovaly standardními postupy (Maniatis a kol., 1982) do bakulovirových expresních vektorů. HA geny se odstranily z TA klonovacích plasmidů pomocí vhodných restričních enzymů a DNA fragment purifikovaného HA se vložil do bakulovirového rekombinantního plasmidu. Výsledné bakteriální klony se prohledávaly na ampicilinovou rezistenci a následně sestříhly restričními enzymy, uvolnily vložený HA genu a tím potvrdily jeho přítomnost. Rekombinantní plasmidy, obsahující HA geny, se purifikovaly na gradientech chloridu cesného a ethidiumbromidu (Maniatis a kol., 1982). 5' konec plasmidů se sekvencoval s cílem potvrdit přítomnost správných bakulovirových signálů (sekvence AcNPV polyhedrinového promotoru, ATG translačního startovního signálu, a bakulovirového signálu) a správnou HA-kódující sekvenci ve správném čtecím rámci. DNA sekvence na 5' konci HA genů a lemovací AcNPV polyhedrinový promotor a bakulovirový signální peptid (prvních 18 aminokyselin každé aminokyselinové sekvence) je znázorněno v sekvenčním protokolu.

SEQ ID NO.6 kóduje sekvenci 5' konce HA genu pro A/Beijing/32/92 (sekvenční rozsah 1-481). SEQ ID NO:7 je odpovídající aminokyselinová sekvence (začíná na startovacím kodonu „ATG“ [nukleotidu 21] SEQ ID NO:6). Aminokyselinová sekvence 61K signálního peptidu je uvedena v SEQ ID NO:7 jako aminokyseliny 1-18.

SEQ ID NO. 8 kóduje sekvenci 5' konce HA genu pro A/Texas/36/91 (sekvenční rozmezí 1-481). SEQ ID NO: 9 je odpovídající aminokyselinovou sekvencí (začínající na startovacím kodonu „ATG“ [nukleotidu 21] SEQ ID NO: 8).

Aminokyselinová sekvence 61K signálního peptidu je uvedena v SEQ ID NO: 9 jako aminokyseliny 1- 18.

SEQ ID NO: 10 kóduje sekvenci 5' konce HA genu pro B/Panama/45/90 (sekvenční rozmezí 1-434). SEQ ID NO: 11 je odpovídající aminokyselinovou sekvencí (začínající na startovacím kodonu „ATG“ [nukleotidu 21] SEQ ID NO: 10). Aminokyselinová sekvence 61K signálního peptidu je uvedena v SEQ ID NO. 11 jako aminokyseliny 1-18.

V SEQ ID NO 6, 8 a 10 nukleotidy 1-20 kódují 3' konec polyhedrinového promotoru, nukleotidy 21-74 kódují 61K signální peptid a nukleotidy 75 až konec kódují 5' konec HA genu.

#### Příklad 4

Expresí rekombinantního HA ve hmyzích buňkách

Chimerické rekombinantní plasmidy, obsahující klonované HA geny se purifikovaly a 2 µg se smísily s 1 µg standardního typu DNA AcNPV. DNA se vysrážely s vápníkem a transfektovaly do buněk *S. frugiperda* za použití standardních postupů (Smith, Summers a Fraser, Mol. and Cell. Biol. 3:2156-2165 (1983)). Rekombinantní bakuloviry se identifikovaly na základě morfologie plak a následně dále purifikovaly dalšími cykly purifikace plak. Plakově purifikované rekombinantní bakuloviry se prohledávaly s cílem analyzovat expresi rHA a pro další vývoj se zvolil jediný bakulovirový expresní vektor.

Buňky *S. frugiperda* se infikovaly bakulovirovým vektorem, obsahujícím HA gen z chřipkového kmene:

B/Panama/45/90. 24, 48 a 72 hodin po infekci se  $1 \times 10^6$  buněk pulzovalo s 25  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]methioninu po dobu 15 minut, čímž se značené proteiny syntetizovaly. Buňky se sebraly a proteiny se separovaly na 11% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% SDS. Radiologicky značené proteiny se detekovaly expozicí na X-OMAT-AR film. Umístění proteinových standardů a jejich velikosti v kilodaltonech (kd) naznačily, že 85 kd rekombinantní HA protein je jedním z hlavních proteinů, které se syntetizovaly v buňkách 48 hodin a 72 hodin po infekci.

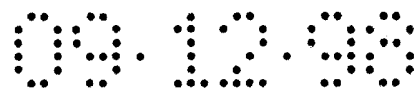
#### Příklad 5

##### Produkce a purifikace rekombinantního HA

Bakulovirový expresní vektor A8611, který obsahuje gen pro influenzi A/Beijing/353/89, produkováný v podstatě výše popsaným způsobem pro A/Beijing/32/92 hemaglutinin pod kontrolou polyhedrinového promotoru, se použil pro infikování buněk *S. frugiperda*. Buňky se nechaly narůst při 27°C do hustoty  $1 \times 10^6$  buněk/ml v TNMFH médiu (Gibco BLR, Gaithersburg, MD) obohaceném 10% fetálním bovinním sérem a infikovaly se při multiplicitě infekce (MOI) 1 A8611 rekombinantním bakulovirem. Během infekce se hemaglutinin influenzy A/Beijing/353/89 produkoval za transkripční kontroly bakulovirového polyhedrinového promotoru. Buňky se sklídily 72 hodin po infekci patnáctiminutovým odstředováním při 3 400 x g a promyly resuspenzí v séru prostém TNMFH médiu a následně třicetiminutovým odstředováním při 10 400 x g. Supernatant se oddekantoval a infikované buněčné pelety se skladovaly při -70°C.

Vyvinul se způsob, ve kterém se rekombinantní HA za podmínek, které nedenuarují antigen selektivně extrahoval z infikovaných buněk. Není-li stanoveno jinak, provádí se všechny extrakční kroky při 4°C. Buněčná peleta z 0,5 l kultury (přibližně  $5 \times 10^8$  buněk) se rozrušovala 2 minuty ve 40 ml ledově studených 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 1% (obj./obj.) Tweenu-20, 1 mg/ml leupeptinu za použití homogenizátoru Polytron (Brinkmann Instrumens Inc. Westbury, NY). Homogenát se odstřeďoval třicet minut při 9 200 x g. Supernatant se vypustil a pelety se sebraly. Tento krok odstranil rozpustné a periferní membránové proteiny z hmyzích buněk bez extrakce integrálním membránovým proteinům podobného rHA. rHA se z pelet extrahoval dvouminutovou homogenizací při nastavení 4 ve 40 ml ledově studeného 30 mM Tris, 10 mM ethanolaminu, pH 11, 25 mM LiCl a 2% Tweenu-20. Po šedesátiminutové inkubaci na ledu se pH hodnota homogenátu nastavila na 8,4 pomocí 1 N HCl a nerozpustný materiál se odstranil třicetiminutovým odstřeďováním při 9 200 x g. Supernatant obsahující rozpustný rHA se oddekantoval a pH hodnota se zkontrolovala, a pokud to bylo nezbytné, tak se nastavila na 8,4 při pokojové teplotě. Nerozpustný materiál se pro analytické účely resuspendoval ve 40 ml vody. HA integrální membránový protein se solubilizoval při vysokém pH v přítomnosti detergentu Tween-20 a zůstal v roztoku potom, co pH pokleslo.

Proteiny se analyzovaly SDS elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Vzorky se rozrušily ve vroucí vodní lázni, kde se ponechaly 10 minut v přítomnosti 2% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 5% beta-merkapt ethanolu, načež se podrobily elektroforéze na 11% polyakrylamidovém



gelu v přítomnosti 0,1% SDS, načež se zabarvily modří Coomassie.

Pro purifikaci rekombinantního cHA byl vyvinut chromatografický purifikační proces, který poskytuje vysoce purifikovaný rekombinantní HA antigen, který není denaturovaný a je vhodný jako složka chřipkové vakcíny pro humánní aplikaci. Pro čištění A/Beijing/353/89 HA z buněk *S. frugiperda* infikovaných rekombinantním virem A8611 se použil následující postup.

Chromatografickými gelovými maticemi, použitými pro purifikaci HA z 0,5 l infikovaných buněk *S. frugiperda*, bylo 30 ml Pharmacia DEAE Sepharose Fast Flow (v koloně Pharmacia C16/20) a 4 ml Pharmacia Lentil Lectin Sepharose 4B (v koloně Pharmacia C10/10). Výstup DEAE kolony je spojen se vstupem čočkové lektinové kolony a S/N 2 buněčný extrakt, připravený výše popsaným způsobem, se aplikoval do spojených kolon rychlostí 1 ml/minutu. Kolony se promyly 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,5% Tween-20 dokud se hodnota UV absorpce při 280 nm proudu vytékajícího z čočkové lektinové kolony navrátila na výchozí hodnotu. Za těchto podmínek se většina kontaminujících proteinů navázala na DEAE, ale rekombinantní HA proudí kolonou. Zbývající kontaminující látky prochází čočkovou kolonou a glykosylátovaný rHA se váže na čočkovou lektinovou afinitní matici. DEAE kolona se rozpojí a lektinová kolona se promyje dalšími 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,5% Tween-20. Lektinová kolona se následně promyla 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,4% (obj/obj) deoxycholátu sodného (DOC). Tento krok nahradí detergent Tween-20 detergentem, jako je DOC, který lze z proteinu odstranit dialýzou. Rekombinantní HA se následně z

lektinové kolony eluovala pomocí přibližně 20 ml 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,4% (obj/obj) ddeoxycholátu sodného, obsahujícího 0,3 M  $\alpha$ -D-methylmannosidu. Výsledky se analyzovaly pomocí 11% PAGE.

Díky generické variabilitě chřipkových HA proteinů se detaily, týkající se výše uvedeného purifikačního postupu, mohou v případě každého jedinečného rekombinantního HA proteinu lišit. rHA se může například vázat na DEAE intoměničovou kolonu namísto toho, aby touto kolonou procházely. V tomto případě by se rHA mohl z DEAE kolony odstranit promytím kolony pufrém obsahujícím vysokou koncentraci LiCl, NaCl nebo jiné soli.

Pro odstranění DOC detergentu a dalších složek pufru se proud vytékající z lektinové kolony, který obsahuje purifikovaný rHA, dialyzoval proti fosfátem pufrovanému fyziologickému roztoku, pH 7,5 (PBS). Purifikovaný rekombinantní HA měl alespoň 95% čistotu, stanoveno analýzou na SDS polyakrylamidových gelech.

#### Příklad 6

##### Analýza proteázové rezistence rHA

Zralý HA tvoří trimerové struktury, které jsou rezistentní proti různým proteázám včetně trypsinu, které degradují HA monomery (Murphy a Webster, 1990). Rezistence vůči trypsinovému ošetření může být tedy použita jako test pro určení funkční trimerové tvorby. Pro studie rezistence rHA vůči proteázovému ošetření se použil následující postup.

Dva alikvotní podíly purifikovaného rHA (A/Beijing/353/89) při koncentraci 60  $\mu\text{g/ml}$  se inkubovaly po dobu 30 minut na ledu, v 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 150 mM NaCl, v přítomnosti a za absence 50  $\mu\text{g/ml}$  TPCK-ošetřeného trypsinu. Reakce se ukončila přidáním 57,4 mM fenylmethylsulfonylfluoridu v isopropanolu do konečné koncentrace 1 mM. Alikvotní podíly každého vzorku se denaturovaly varem v 3% SDS za redukčních podmínek, podrobily elektroforéze na 11,5% polyakrylamidových gelech a pomocí westernového přenosu přenesly na nitrocelulózoový filtr. HA polypeptidy se detekovaly za použití anti-HA séra morčete, připraveného proti purifikovanému rHA a kozího anti-morčecího IgG alkalinfosfatázového konjugátu.

Neošetřený rHA migroval při velikosti HA prekurzoru (HA0). Proteázové ošetření vedlo k vytvoření dvou hlavních pásů, které migrovaly při velikostech předpokládaných pro chřipkový hemaglutinin HA1 a HA2. Výsledky ukázaly, že trypsin rozštěpil rHA protein a dal tak vzniknout dvěma polypeptidům, jejichž velikosti odpovídají předpokládaným HA1 HA2 velikostem. K žádnému dalšímu protalytickému procesu nedošlo. Tyto výsledky ukazují, že rHA, purifikovaný výše popsáním způsobem, je rezistentní proti degradaci proteázou. Tato vlastnost je specifická pro purifikovaný rHA, který se nachází ve formě trimerů.

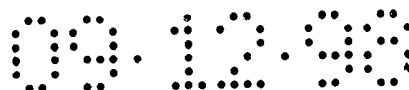
Příklad 7

Stanovení imunogenicity rHA pomocí standardizovaného testu myší potence

Jedním způsobem měření imunogenicity antigenu je stanovení množství, nezbytného pro indukci detekovatelné odezvy na protilátku u myší (test myší potence). Standardizovaný test myší potence se používá pro měření imunogenicity rHA0 vakcíny. Skupiny pěti až deseti myší se imunizovaly jednou vakcínou, obsahující postupná naředění rHA, tj. 0,500  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,02  $\mu\text{g}$  a 0,004  $\mu\text{g}$  purifikovaného rHA. Séra se odebrala 28 dní po imunizaci a protilátky proti rHA antigenu se měřily pomocí standardního testu (ELISA) v 96jamkových mikrotitračních plotnách. Myši jsou sérokonvertované, pokud je OD<sub>450</sub> při 1:100 naředění 28denního antiséra vyšší, než průměrná hodnota OD<sub>450</sub> myšího pre-imunního séra, zvýšená o tři standardní odchylky. Účinná dávka vakcíny, potřebná pro 50% sérokonverzi myší (ED<sub>50</sub>) je mírou imunogenicity antigenu.

Například čtyři skupiny zahrnující 10 myší se imunizovaly 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,02  $\mu\text{g}$ , 0,004  $\mu\text{g}$  nebo 0,0008  $\mu\text{g}$  (pětinásobné naředění), rHA0 vakcínou. Séra se shromáždila 28 dnů po imunizaci a pomocí ELISA testu se měřila proti každému rHA0 antigenu ve vakcíně, s cílem určit sérokonverzi. Vypočetla se dávka, potřebná pro 50% sérokonverzi myší (ED<sub>50</sub>), a pro každý rHA0 antigen se určila minimální hodnota ED<sub>50</sub>.

Předběžná data ukázala, že jedna dávka 0,004  $\mu\text{g}$  rHA0 bude sérokonvertovat alespoň 50 % myší.



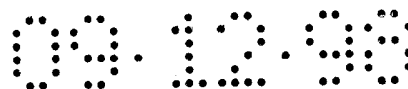
### Příklad 8

Podání rHA v kombinaci s adjuvansem a srovnání s dostupnými chřipkovými vakcínami

Myší potence purifikovaného rHA chřipkového kmene A/Beijing/353/89 se analyzovala s kamenecem nebo bez kamence a srovnávala s komerčně dostupnou chřipkovou vakcínou FLUZONE (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA), která obsahovala A/Beijing/353/89 chřipkový kmen. Vakcína se podala v dávkách 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,02  $\mu\text{g}$  a 0,04  $\mu\text{g}$ . Dvacátý osmý den se myším injektovaly výše popsané dávky purifikovaného rHA. Čtyřicetidvoudenní myší sérum se titrovalo v ELISA testu, s cílem stanovit IgG-HA protilátky.

Výsledky jsou znázorněny na obrázku 3. Za nepřítomnosti adjuvansu indukovala pouze dávka 0,5  $\mu\text{g}$  produkci podstatnějšiho titru protilátky (200 000). V přítomnosti adjuvansů produkovaly podstatnější množství protilátky již dávky 0,004  $\mu\text{g}$  rHA0. Zvířata, imunizovaná rHA (bez kamence) produkovala přibližně stejné koncentrace anti-HA protilátek jako komerční vakcína. Kamenec zvýšil imunogenicitu rHA, přičemž v přítomnosti adjuvansu se generovaly minimálně desetinásobně vyšší anti-HA titry než v nepřítomnosti adjuvansu.

Srovnání imunogenicity purifikovaných rHA0 s komerční celovirionovou chřipkovou vakcínou FLUZONE (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) ukazuje, že rHA0 vyvolává po dobu 48 dnů podobnou imunitní odezvu u myší. Adsorpce rHA0 na kamenec podstatně zvyšuje imunogenicitu purifikovaného rHA0 u myší, jak ukazují výsledky testu,



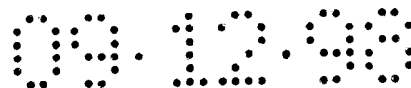
popsaného v příkladu 7. Kombinace s kamencem způsobuje vyšší tvorbu IgG hemagglutininových protilátek než chřipkové vakcíny FLUZONE.

### Příklad 9

#### Studie hemaglutinační inhibice

Hemaglutinačně inhibiční (HAI) protilátky se váží na tři ze čtyř známých epitopů na hemagglutininu a blokují schopnost chřipky aglutinovat červené krvinky (Wilson a kol., „Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution“. Nature, 289:366-378 (1981)). Tyto antigenní determináty se shlukují okolo vazebného místa receptoru kyseliny sialové na hemagglutininových trimerech. Protilátky proti těmto místům budou neutralizovat infekčnost viru (Weis a kol., „Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid“, Nature 333:426-431 (1988)). Titr a specifita HAI protilátek jsou důležitými mírami potence chřipkové vakcíny chránit proti infekci podobnými nebo odvozenými typy chřipky.

Studie, porovnávající schopnost purifikovaného rHA0 připraveného z chřipkového kmene A/Beijing/353/89 a chřipkové vakcíny FLUZONE (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) vyvolávat tvorbu HAI protilátek, se prováděly na myších. Skupiny pěti myší se injektovaly nultý a dvacátý osmý den 0,05 µg, 0,1 µg, 0,02 µg nebo 0,004 µg rHA0 nebo třikrát stejnými množstvími vakcíny FLUZONE, takže se podala stejná množství rekombinantního nebo virového A/Beijing/353/89 hemagglutininu. Například myši v



nejvyšší dávkové skupině byly imunizovány 1,5  $\mu\text{g}$  FLUZONE hemaglutininu (0,5  $\mu\text{g}$  hemaglutininu z každého kmene) a 0,5  $\mu\text{g}$  rHA0. Přítomnost dalšího hemaglutininového antigenu ve vakcíně FLUZONE ze dvou dalších chřipkových kmenů může vést k určitým křížově reaktivním protilátkám.

Anti-hemaglutininové protilátky (hemaglutininový IgG) se měřily proti purifikovanému rHA0 ve standardním testu ELISA. HAI protilátky se měřily proti čtyřem hemaglutininovým jednotkám následujících antigenů: celý chřipkový virus A/Beijing/353/89 (A/Bei), purifikovaný rHA0 A/Beijing/353/89 antigen a FLUZONE. HAI titr odpovídá nejvyššímu naředění antiséra, které z 50 % inhibuje aglutinaci kuřecích červených krvinek.

Tabulka 3 uvádí titry sérového hemaglutininového IgG a HAI u myši, stanovené 42. den. Vyšší hladiny anti-hemaglutininových protilátek produkovala rekombinantní rHA0 vakcína. Tyto titry byly přibližně desetkrát vyšší než titry získané při aplikaci vakcíny FLUZONE. Nejpodstatnější je to, že rHA0 vakcína produkovala dobré titry protilátek, které blokovaly aglutinaci červených krvinek, způsobenou virem A/Beijing/353/89 a rHA0 antigeny. Takže rHA0 vakcína produkovala HAI protilátky, které rozpoznávaly stejně dobře imunogen a chřipkový vir A/Beijing. Nižší HAI titry, naměřené proti vakcíně FLUZONE, mohou být způsobeny neschopností antiséra blokovat aglutinaci způsobovanou dalšími dvěma kmeny hemaglutininu ve vakcíně FLUZONE. Na druhé straně myši imunizované vakcínou FLUZONE produkují vysoké titry HAI protilátek v případě, že se měření provádí proti vakcíně FLUZONE. HAI titry proti chřipkovému viru A/Beijing/353/89 a rHA0 antigenu byly podstatně nižší.

Podobné schéma bylo možné pozorovat u myší, spadajících do nižších dávkových skupin.

Tabulka 3 HAI titry proti rHAO a FLUZONE

rHAO A/Bei (42. den)		FLUZONE (42. den)					
HA IgG		HAI		HA IgG	HAI		
MYŠ č.	rHAO	A/Bei	rHAO	FLUZONE	rHAO	FLUZONE	
1	4.096.000	1.920	960	15	256.000	<10	600
2	4.096.000	480	480	15	512.000	120	600
3	8.192.000	1.920	960	15	256.000	60	300
4	4.096.000	960	960	30	128.000	30	400
5	4.096.000	1.920	960	60	512.000	80	400
<b>PRŮMĚR</b>	<b>4.915.000</b>	<b>1.440</b>	<b>864</b>	<b>27</b>	<b>332.800</b>	<b>58</b>	<b>460</b>

9 0 9 9

Z těchto výsledků rovněž vyplývá, že mezi chřipkovým kmenem A/Beijing/353/89 ve vakcíně FLUZONE a stejným chřipkovým kmenem získaným z FDA a před použitím v HAI testu jednou pasážovaným ve vejcích jsou genetické rozdíly. Skutečnost, že protilátky produkované v odezvě na rekombinantní HA0, klonovaný z chřipkového viru A/Beijing/353/89, blokují aglutinaci červených krvinek způsobovanou tímto chřipkovým kmenem je dobrým důkazem toho, že během klonování nedošlo k žádným genetickým změnám, které by ovlivnily vazebné místo receptoru kyseliny sialové na purifikovaném rHA0 antigenu.

#### Příklad 10

##### Formulace a klinická účinnost chřipkové vakcíny 1993/1994

Provedla se celá řada humánních klinických testů, které měly charakterizovat bezpečnost a imunogenicitu experimentální chřipkové vakcíny, obsahující rekombinantní HA u lidí a pomoci získat předběžná data, týkající se ochranné účinnosti této vakcíny proti přirozené infekci během epidemického období. Výsledky ukazují, že vakcíny obsahující rekombinantní chřipkový hemaglutinin (rHA0), připravený zde popsanými způsoby způsobovaly méně místních nežádoucích reakcí a poskytovaly stejnou nebo lepší ochrannou imunitní odpověď v porovnání s komerčně dostupnou, licencí opatřenou, zředěnou chřipkovou vakcínou vyráběnou ve vejcích.

## Materiály a metody

### Vakcíny

Rekombinantní HA vakcíny použité v této studii zahrnovaly celodélkový neštěpený HA (HA0) glykoprotein z chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N3). Rekombinantní HA0 (rHA0) se produkoval v kulturách motýlích (hmyzích) buněk, načež následovala expozice bakulovirovým vektorem obsahujícím cDNA inzerty kódující HA gen. Exprimovaný protein se purifikoval za nedenaturačních podmínek do 95% čistoty, měřeno kvantitativní skenovací densitometrií objemného antigenu separovaného elektroforézou na natrium dodecylsulfátpolyakrylamidových gelech. Identita peptidu se potvrdila aminokyselinovou analýzou, N-koncového sekvencování a analýzy westernového blotu protichřipkovým A/Beijing/32/92 sérem. rHA0 vakcíny obsahovaly specifické množství syntetický syntetického HA antigenu buď rozpuštěného ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku nebo adsorbovaném na fosforečnanu hlinitém (kamenci), jako adjuvansu, ve formě gelové suspenze. Schválená trojvalenční subvirionová vakcína použitá při studii obsahovala 15 µg/dávku každého HA z chřipkového viru A/Texas/36/91 (N1N1), chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N2) a chřipkového viru B/Panama/45/90 ředěné chřipkové vakcíny FLUZONE vyráběné ve vejcích (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA).

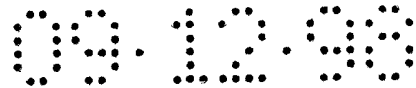
## Klinické testy

Institucionálními posudkovými týmy Univerzity Saint Louis a Univerzity v Rochesteru schválily identické studijní protokoly. Studií na obou univerzitách se účastnily zdraví dospělí jedinci ve věku 18 až 45 let. Subjekty se nahodile rozdělily do skupin, kterým se následně aplikovala jedna z následujících pěti vakcínových přípravků dvojím slepým způsobem: (1) 15  $\mu\text{g}$  rHA0, (2)  $\mu\text{g}$  rHA0 plus kamenec, (3) 90  $\mu\text{g}$  rHA0, (4) schválená trojvalenční inaktivovaná chřipková vakcína, nebo (5) fyziologické placebo. Vakcíny se podávaly intramuskulární injekcí v objemu 0,5 ml. Pro počáteční odhad bezpečnosti tří vakcínových přípravků obsahujících rHA0, se zvolilo nahodile a nezávisle na ostatních subjektech prvních 25 jedinců, kteří měli být vakcinováni, (tj. 5 osob na studii) a tyto jedinci byli 48 hodin po vakcinaci před tím, než se aplikovaly zbývající vakcíny, nepřetržitě telefonicky sledováni. Všichni zvolení jedinci byli instruováni tak, aby vyplňovali denní zprávu a v ní uvedli veškeré nežádoucí reakce včetně lokálních a systemických příznaků, které se u nich projeví během prvních šesti dní po vakcinaci. Pokud jde o povahu příznaků, jedinci sami tyto příznaky hodnotili jako mírné, střední nebo vážné. Pokud sledovaní jedinci cítili, že mají zvýšenou teplotu, potom rovněž zaznamenali hodnoty orálně měřené teploty. Pokud se na místě po injekci objevilo lokální zduření nebo erytém, potom se hodnotilo zda je plocha zduření nebo erytému menší, resp. větší než čtvrt dolar. Všechny vakcíny se aplikovaly v průběhu posledního týdnu měsíce listopadu a prvního týdne měsíce prosince 1993. Vzorky séra se odebraly každému jedinci v okamžiku vakcinace, tři týdny po vakcinaci a znovu koncem

března nebo v měsíci dubnu 1994 alespoň dva až tři týdny potom, co již viry necirkulovali v místních komunitách. Účastníci studie byly rovněž instruovány, aby kontaktovali studijní centrum, pokud během zimního chřipkového epidemického období prodělají chřipce podobnou chorobu. Chřipce podobná choroba byla definována jako výskyt jakéhokoliv respiračního příznaku trvajících déle než dva dny a doprovázeného horečkou a/nebo systemickými příznaky myalgie nebo nachlazení. Jedincům, kteří zaznamenali chřipkové příznaky, se provedly nosohltanové výtěry za účelem získání a identifikace virové kultury. Klinické vzorky se opatřily identifikačními kódy a zpracovaly slepým způsobem.

#### Sérologie

Pro jednotlivé typy sérologických testů se všechny vzorky shromážděné v obou institucích testovaly najednou v jediné laboratoři. Hemaglutinačně inhibiční (HAI) protilátky proti antigenu chřipkového viru A/Beijing/32/93 (H3N2) se měřily v séru standardním mikrotitračním testem, načež následovalo odstranění nespecifického inhibitoru pomocí enzymu ničícího receptor a odstranění studených aglutininů hemadsorpcí při 4°C. Titr se definoval jako nejvyšší naředění séra, které zcela zabránilo hemaglutinaci způsobené čtyřmi antigenovými jednotkami viru, přičemž jako výchozí naředění se zvolilo naředění 1:4. Protilátky sérového HA-specifického imunoglobulin G (IgG) se měřily pomocí testu ELISA, při kterém se jako potahový antigen použil purifikovaný rHA0 chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N2). Sled reakčních činidel směrem ven z pevné fáze



tvořil (1) purifikovaný rHA0 antigen, (2) vzorek séra, (3) alkalinfosfatáza-konjugovaná s kozím anti-humánním IgG a (4) substrát na bázi p-nitrofenylfosfátu disodného. ELISA titr se exprimoval jako nejvyšší naředění, při kterém byla optická hustota obsahu jamky obsahující antigen alespoň dvakrát vyšší, než optická hustota obsahu odpovídající kontrolní jamky bez antigenu. Neutralizované protilátky se měřily za použití mikroneutralizačního testu, který již popsal Treanor J.J. a Betts R.F., *J. Infect. Dis.* 168:455-459 (1993). Postupná naředění tepelně inaktivovaného séra se smísila s přibližně 100 TCID<sub>50</sub> chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N2) a inkuboval jednu hodinu při 37°C. Směs viru a séra se následně adsorbovala při pokojové teplotě v průběhu jedné hodiny na splývající monovrstvu ledvinových buněk psa Madin-Darby (MDCK) v jamkách devadesátijamkových ploten. Plotny se promyly za účelem odstranění zbytkového inokula a opět naplnily séra prostým Dulbeccovým MEM s 2 µg/ml trypsinu a sedmdesát dva hodin inkubovaly v 5% CO<sub>2</sub> při 33°C. Buňky se následně fixovaly methanolem a virová replikace se vyhodnotila za použití seznamu myších monoklonálních protilátek specifických pro matrici a nukleoproteiny chřipkového viru A (Centers for Disease Control, Atlanta, GA), a následně alkalinfosfatázou-konjugovanou s anti-myším IgG. Poslední titr séra se definoval jako nejvyšší naředění, které způsobuje 50% redukci signálu v porovnání s neneutralizovanými kontrolními jamkami.



## Virologie

Virové kultury vzorků nosohltanových výtěrů se zpracovaly v každé instituci standardními technikami. Vzorky se očkovaly buď v MDCK nebo ledvinových buňkách makaka a inkubovaly 14 dní při 33°C. Hemadsorpce buněčných monovrstev se testovala pomocí 0,4% roztoku erythrocytů morčete. Chřipkové viry se identifikovaly v hemadsorpčně pozitivních kulturách HAI za použití H3-specifického antiséra (Centers for Disease Control).

## Statistické analýzy

Reciproký HAI, ELISA IgG a titry neutralizační protilátky se logaritmicky transformovaly pro účely statistické analýzy. Jako významná odpověď na vakcinaci se definovalo čtyřnásobné nebo větší zvýšení titru protilátky mezi vzorky séra odebranými před vakcinací a po vakcinaci. Laboratorní důkaz chřipkového virové infekce A (H3N2) se definoval jako izolace viru z nosohltanových sekretů a/nebo čtyřnásobné a větší zvýšení titru HAI protilátky v séru mezi třítýdenním post-vakcinačním vzorkem (presezonním) odebraným v prosinci a odpovídajícím (postsezonním) vzorkem, odebraným následující jaro. Rozdíly mezi vakcinovanými skupinami se analyzovaly pomocí Fisherova exaktního testu, jehož cílem je porovnat podíly subjektů s nežádoucími reakcemi, s podstatnou protilátkovou odezvou nebo laboratorně potvrzenou chřipkovou nemocí nebo infekcí, a analyzováním rozdílu (ANOVA), a porovnat postvakcinační průměrný reciproký  $\log_2$  titerů protilátky. Modifikovaný test Bonferroniho nepravdělnosti a Tukey-Kramerův test se



aplikovaly v případě, kdy bylo pro dosažení konečného výsledku vhodné provést více možných srovnání.

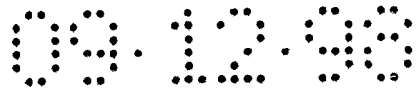
## Výsledky

### Reaktogenicita

rHA0 vakcíny v této studii byly bezpečné a velmi tolerantní. Nezdálo se, že by byla frekvence nežádoucích reakcí ovlivněna změnou dávky rHA0 antigenu v rozmezí od 10  $\mu\text{g}$  do 90  $\mu\text{g}$ , ale přidáním kamence se může mírně zvýšit. Lokalizovaný erytém, citlivost a bolestivost v místě injekce byly častěji zaznamenány u jedinců, kterým se aplikovala schválená subvirová vakcína, než u jedinců kterým se aplikovalo 15  $\mu\text{g}$  nebo 90  $\mu\text{g}$  rHA0 ve fyziologickém roztoku. S výjimkou jediné osoby, která pocítovala po imunizaci schválenou vakcínou v paži středně silnou bolest, citlivost a ztuhlost, byly všechny příznaky hodnoceny jako příznaky mírné povahy, které zpravidla trvaly 1 až 2 dny. Lokalizovaný erytém a/nebo zatvrdnutí, pokud se objevilo, bylo podstatně menší než čtvrt dolar.

### Imunogenicita

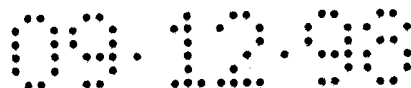
Základní titry sérové HAI protilátky proti chřipkovému viru A/Beijing/32/92 (H3N2) dosahovaly maximálně 1:8 u 64 (50%) ze 127 zúčastněných subjektů. Většina subjektů v každé ze čtyř vakcinovaných skupin poskytla HA-specifickou sérologickou odpověď, měřeno pomocí HAI a testu ELISA (tabulka 4). Postvakcinační titry sérové HAI protilátky dosahovaly u všech osob, kterým byla podána vakcína



maximálně 1:32 s výjimkou dvou osob, kterým bylo podáno 15 µg rHA0 a jedné osoby, která byla podána již schválená vakcína. Vakcinace byla jinak u většiny dobrovolníků spojena s produkcí neutralizační protilátky. Průměrné zvýšení titrů protilátky a hodnoty sérokonverze po imunizaci 15 µg rHA0 bylo poněkud nižší než v případě imunizace již schválenou vakcínou, nicméně tyto rozdíly neměly statistický význam. Protilátková odezva na rHA0 se přidáním kamence nezvýšila. Subjekty imunizované 90 µg rHA0 dosáhly po vakcinaci průměrného titru HAI a ELISA IgG protilátky, který byl dvakrát až pětkrát vyšší než v případě zbývajících tří vakcinačních skupin (rozdíly zjištěné při porovnávání titrů sérového HAI byly statisticky významné).

#### Ochranná účinnost

V průběhu sledované periody, zaznamenalo celkem 28 subjektů chorobu podobnou chřipce. Čtyřem z těchto jedinců (z nichž třem bylo aplikováno placebo a jednomu, který byl imunizován 15 µg rHA0) byl z nosohltanových kultur izolován chřipkový virus typu A (H3N2). Podstatné zvýšení titru HAI protilátky proti chřipkovému viru A/Beijing/32/92 (H3N2) mezi předsezónním a postsezónním vzorkem séra bylo rovněž zjištěn ve třech ze čtyřech případech, kdy byl v kultuře potvrzen virus, ale u žádného dalšího jedince, který zaznamenal chorobu. Jediný rHA0 příjemce, u kterého se následně vyvinula laboratorně potvrzená chřipková choroba, měl pozitivní kulturu získanou 31 dní po imunizaci a sérokonvertoval se z prevakcinačního HAI titru, který byl menší než 1:4, na postvakcinační (předsezónní) titr, který



dosahoval 1:32. Dvě další osoby, kterým se podávalo placebo, a jeden dobrovolník imunizovaný již schválenou vakcínou měl sérologický důkaz infekce chřipkovým virem A (H3N2) v průběhu epidemického období při absenci klinické nemoci. Při srovnání všech vakcinovaných subjektů (neboli všech subjektů, kteří přijali libovolnou rHA0 vakcínu) se zjistilo, že u jedinců, kterým bylo aplikováno pouze placebo, bylo zaznamenáno podstatně vyšší procento jedinců, kteří prodělali laboratorně potvrzenou chřipku typu A (H3N2) ( $p < 0,05$ ) nebo kteří byly infikováni jejím virem ( $p < 0,005$ ).

Výše uvedené výsledky naznačují, že chřipkové vakcíny obsahující purifikovaný rHA0 antigen, připravené způsobem popsaným ve výše uvedené patentové přihlášce, jsou tolerantní a schopné vyvolávat ochranné imunitní odezvy u lidských subjektů. I při dávce 90  $\mu\text{g}$  nebyl rHA0, hodnocený v této studii, reaktogeničtější než placebo na bázi fyziologického roztoku a způsoboval podstatně méně místních nežádoucích reakcí než již schválená a patentovaná trojvalenční subvirionová vakcína obsahující poloviční množství (tj. 45  $\mu\text{g}$ ) celkového HA antigenu.

Odezvy neutralizačních HA-specifických protilátek na 15  $\mu\text{g}$  rHA0 přípravku byly srovnatelné s odezvami vyvolanými subvirionovou vakcínou a podstatně se zvýšily zvýšením dávky rHA0 na 90  $\mu\text{g}$ .

Celková četnost infekce a nemoci, způsobená přirozenou expozicí cirkulujícímu epidemickému chřipkovému kmenu A (H3N2), byla podstatně nižší u vakcinovaných subjektů než u jedinců, kterým se podalo placebo. Z těchto výsledků vyplývá, že ochranná imunita poskytnutá rHA0,

zejména pokud je podán ve vyšších dávkách, je srovnatelná nebo vyšší než ochranná imunita, získaná aplikací v současnosti dostupných vakcín.

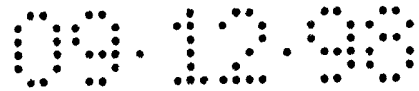


Tabulka 4 Odezvy Sérových protilátek u mladých dospělých subjektů po imunizaci vakcínami zahrnujícími purifikovaný rekombinantní hemaglutinin (rHA0) získaný z chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N2), již schválenou trivalentní subvirovou vakcínu obsahující 15 µg HA z A/Beijing/32/92 (H3N2) nebo placebo tvořené fyziologickým roztokem.

Vakcína (počet ve skupině)	HAI protilátka				ELISA IgG HA protilátka				Neutralizace protilátky		
	HAI titr Pre	Post	% s >4x zvýše- ním	% s >1:32	ELISA titr před	po	% s >4x zvýše- ním	Mikro- neutra- lizační titr Před	Po	% >4x zvý- šením	
rHA0 15 µg (26)	3,7±0,3	9,0±0,6*	85	92	8,7±0,3	12,0±0,3	88	5,7±0,3	10,0±0,4	85	
rHA0 15 µg plus kamenec (26)	4,3±0,5	8,6±0,4*	88	100	9,4±0,4	11,5±0,4	76	6,4±0,4	9,3±0,2	76	
rHA0 90 µg (26)	3,3±0,4	11,1±0,3	100	100	8,5±0,4	13,1±0,4	100	5,7±0,3	10,2±0,4	96	
Schvále- ný subviro- (26)	3,7±0,4	9,3±0,5 <sup>+</sup>	100	96	8,1±0,4	12,0±0,4	92	5,8±0,3	9,9±0,4	96	
Placebo (24)	3,7±0,5	3,8±0,5 <sup>#</sup>	0	38	9,1±0,3	9,1±0,3	0	5,3±0,4	5,4±0,4	8	

HAI, hemaglutinační inhibice; HA, hemaglutinin. Vzorky postvakcinačního séra se získaly tři týdny po imunizaci. Titry protilátky se vyjádřily jako průměry reciprokého log<sub>2</sub>+SEM. Statistická srovnání se provedla mezi průměrným postvakcinačním HAI titrem navržené skupiny a průměrným postvakcinačním titrem 90 µg rHA0 vakcinační skupiny analýzou rozdílů pomocí Dunnettova testu pro vícečetná srovnání. <sup>+</sup> P<0,1; <sup>#</sup> P<0,05; <sup>8</sup> P<0,01.





načež se lineárním pMGS27 ošetřil T4 DNA polymerázou plus dATP za vzniku výše uvedených jednořetězcových konců (zbytky 23 až 36 a doplněk zbytků 6 až 18 SEQ ID NO.24):

```

A                               5' GGCCAGAGAGGCC T
T CAG CGG CAC AGG 5'                               A

```

Cílový HA gen se naklonoval do pMGS27

Krok 1 Syntetizovaly se PCR primery

Původní oligo (SEQ ID NO:25):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (5' konec 20 bází zralého HA)

Reverzní oligo (doplněk SEQ ID NO:26):

(3' konec 20 bází zralého HA) ATT AA

CCGGTCTCTCCGG 5'

PCR HA genu

PCR cílového HA genu se dvěma oligonukleotidy se použil pro získání (SEQ ID NO:25 a SEQ ID NO:26):

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (zralý HA)

CAG CGG CAC AGG TTG CGC (zralý HA)

TAA TTGGCCAGAGAGGCC 3'

ATT AACCGGTCTCTCCGG

Tepelná hybridizace cílového HA genu do pMHGS27 a transformace *E. coli*

Lineární pMGS27 a T4 DNA polymerázou ošetřený PCR fragment HA genu se smísily. Dvě molekuly vzájemně tepelně hybridizovaly za vzniku kruhového plasmidu, který je připraven pro použití při transformování *E. coli*. Diagram zahrnuje SEQ ID NOS. 25 a 26, zbytky 23 až 36 a 6 až 18 SEQ ID NO.24

SEQ ID NO:24.

GTCGCCGTGTCCAACGCG (zralý HA) TAATT

TTGCGC (zralý HA) ATTAACCGGTCTCTCCGG

+

A	GGCCAGAGAGGCCT
TCAGCGGCACAGG	A

až

chitinázový signální peptid	konec
<u>GTCGCCGTGTCCAACGCG</u> (zralý HA	<u>TAATTGGCCAGAGAGGCCT</u>

Z výše uvedeného vyplývá, že mezi signálním peptidem a zralým HA neexistuje žádná další aminokyselina.

### Příklad 12

Příprava a účinnost trojvalenčních chřipkových vakcín typu A a B 1995-1996

Chřipková vakcína, purifikovaný rekombinantní hemaglutinin, trojvalenční chřipková vakcína typu A a B



A/Texas/36/92\1 (H1N1), A/Johanesburg/33/94 (H3N2) a B/Harbin/7/94) je neinfekční podjednotka odvozená z purifikovaných rekombinantních chřipkových hemaglutinino-vých antigenů (HA). HA geny se klonovaly z výše popsaných kmenů chřipkových virů A a B, doporučených institucí pro kontrolu léčiv a k identifikaci jednotlivých klonovaných genů se použila DNA sekvenční analýza. Bakulovirové expresní vektory obsahující klonované HA geny z chřipkových virových kmenů A/Texas/36/91 (H1N1), A/Johanesburg/33/94 (H3N2), B/Harbin/7/94 se použily pro výrobu rekombinantních HA antigenů v kultivovaných hmyzích buňkách. Rekombinantní HA proteiny jsou celodélkové, neštěpené hemaglutininy (rHA0) s molekulovou hmotností přibližně 69 000. rHA0 se produkují v buněčné linii *Spodoptery frugiperdy* (řád motýlů) uchovávané v séru prostém kultivačním médiu. Trívalenční vakcíny jsou tvořeny purifikovaným (s více než 95% čistotou, pravděpodobněji s 99% čistotou) rHA0 ze dvou chřipkových A kmenů a jednoho B kmene, smíchanými ve stejném poměru. Vakcína, která se dodává pro klinické použití, je tvořena purifikovanými typy A B rHA0 proteinů ve fosfátem pufrovaném fyziologickém roztoku bez konzervačních látek.

Studie, testující jednovalenční, dvouvalenční a trojvalenční rHA0 vakcíny na zvířatech, měly ukázat, že jsou v podstatě netoxické. ve vakcíně nebyla zjištěna žádná toxická látka. Studie obecné bezpečnosti a imunogenicity A/Beijing/32/92 a A/Texas/36/91 rHA0 se prováděly na myších a morčatech. Při těchto studiích nebyly zaznamenány žádné nežádoucí reakce. U myši jediná imunizace 15 mikrogramy rHA0 antigenů bez adjuvansu vyvolala během dvou až tří týdnů vytvoření vysoké hladiny anti-HA IgG protilátek,

hemaglutininově inhibičních (HAI) protilátek a neutralizačních protilátek.

V jedné studii se skupiny deseti myší imunizovaly 15 µg purifikovaného rHA0 A/Beijing/32/92 (H3N2) vyrobeného v buňkách přizpůsobených médiu obsahujícímu 10% fetální bovinní sérum nebo rHA0, vyrobeným v hmyzích buňkách přizpůsobených médiu obsahujícímu 10% fetální bovinní sérum nebo rHA0 vyrobeném v hmyzích buňkách přizpůsobených séra prostému médiu (rHA0-SF). Dva a tři týdny po infekci se myším odebrala krev a připravily se vzorky séra. U každého séra se stanovoval obsah anti-HA IgG a HAI protilátek. Jak rHA0, tak rHA0-SF antigeny poskytují podobné titry anti-HA a HAI protilátek. Dva týdny po imunizaci měla většina myší značné titry HAI protilátek a do tří týdnů osm z deseti myší v každé skupině mělo HAI titry 32 nebo vyšší. Tyto a další biochemické a imunologické studie ukázaly, že rHA0 produkovaný v séra prosté hmyzí buněčné kultuře, je nerozlišitelný od rHA0 vyrobeného za sérum obsahujících fermentačních podmínek.

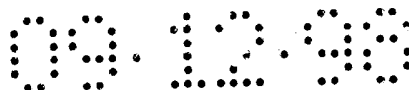
Cílem další studie bylo porovnat 1994-1995 formulaci trojvalenční rHA0 chřipkové vakcíny s již schválenou vakcínou Fluvirin povrchového antigenu purifikovaného viru (ředěná chřipková virová vakcína obsahující 15 µg rHA0 nebo virového HA na 0,5 ml z A/Texas/36/91 (H1N1), A/Shangdong/9/93 (H3N2) a B/Panama/45/90 chřipkových kmenů.

Tabulka 5

## Srovnání trojvalenční rHAO vakcíny s Fluvirinem

GMT (n=10 myší) Virový kmen použitý jako antigen	Trojvalenční rHAO vakcína GMT (n=10 myší)		Fluvirin CHřipková	
	anti-HA IgG		anti-HA IgG	
	Týden 0	Týden 3	Týden 0	Týden 3
A/Texas/36/91 (H1N1)	<1000	103.000	<1000	11.200
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<1000	162.400	<1000	41.000
B/Panama/45/90	<1000	164.800	<1000	26.000
Virový kmen použitý jako antigen	<u>HAI</u>		<u>HAI</u>	
A/Texas/36/91 (H1N1)	<8	1.522	<8	1.088
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<8	494	<8	435
B/Panama/45/90	<8	174	<8	42
Virový kmen použitý jako antigen	<u>Neutralizační Ab</u>		<u>Neutralizační Ab</u>	
A/Texas/36/91 (H1N1)	<100	5.800	<100	2.720
A/Shangdong/32/92 (H3N2)	<100	840	<100	360
B/Panama/45/90	<100	1.300	<100	700

Konečně je třeba uvést, že výše popsané způsoby a kompozice mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.



## Sekvenční protokol

(1) údaje k SEQ ID NO:1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 12 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:1:

AGCAAAGCA GG

12

(1) údaje k SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 39 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:2:

GGGGGTACCC CCGGGAGCAA AAGCAGGGGA AAATAAAAA

39

(1) údaje k SEQ ID NO:3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 35 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:3:

CCCGGTACCT CAKATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

35

(1) údaje k SEQ ID NO:4:

## (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:4:

GGGGGTACCC CCGGGGACAC AATATGTATA GGCTACCAT

39

## (1) údaje k SEQ ID NO:5:

## (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 35 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:5:

CCCGGTACCT CAKATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

35

## (1) údaje k SEQ ID NO:6:

## (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1793 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Bejing/32/92 rHA

(ix) ZNAKY

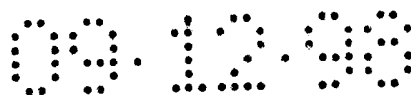
(A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)

(B) POZICE: 1 až 18

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinové signální sekvence

(B) POZICE: 19 až 72



## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA

(B) POZICE: 73 až 11728

## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa

(B) POZICE: 1771 až 1777

## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: BglIII restrikční místa

(B) POZICE: 1776 až 1782

## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál

(B) POZICE: 1783 až 1793

## (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:6:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGAC AAATTGTAA ACGTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GACTTTCCA GGAAATGACA ACAGCACAGC AACGCTGTGC	120
CTGGGACATC ATGCAGTGCC AAACGGAACG CTAGTGAAAA CAATCACGAA TGATCAAATT	180
GAAGTGACTA ATGCTACTGA GCTGGTTCAG AGTTCCTCAA CAGGTAGAAT ATGCGACAGT	240
CCTCACCGAA TCCTTGATGG AAAAACTGC AACTGATAG ATGCTCTATT GGGAGACCCT	300
CATTGTGATG GCTTCCAAA TAAGGAATGG GACCTTTTGT TTGAACGCAG CAAAGCTTAC	360
AGCAACTGTT ACCCTTATGA TGTACCGGAT TATGCCTCCC TTAGGTCACT AGTTGCCTCA	420
TCAGGCACCC TGGAGTTTAT CAATGAAGAC TTCAATTGGA CTGGAGTCGC TCAGGATGGG	480
GGAAGCTATG CTTGCAAAAG GGGATCTGTT AACAGTTTCT TTAGTAGATT GAATTGGTTG	540
CACAAATCAG AATACAAATA TCCAGCGCTG AACGTGACTA TGCCAAACAA TGGCAAATTT	600
GACAAATTGT ACATTTGGGG GGTTCACCAC CCGAGCACGG ACAGAGACCA AACCAGCCTA	660
TATGTTTCGAG CATCAGGGAG AGTCACAGTC TCTACCAAAA GAAGCCAACA AACTGTAACC	720
CCGAATATCG GGTCTAGACC CTGGGTAAGG GGTCAGTCCA GTAGAATAAG CATCTATTGG	780
ACAATAGTAA AACCGGGAGA CATACTTTTG ATTAATAGCA CAGGGAATCT AATTGCTCCT	840
CGGGGTTACT TCAAAATACG AAATGGGAAA AGCTCAATAA TGAGGTCAGA TGCACCCATT	900
GGCACCTGCA GTTCTGAATG CATCACTCCA AATGGAAGCA TTCCCAATGA CAAACCTTTT	960
CAAAATGTAA ACAGGATCAC ATATGGGGCC TGCCCCAGAT ATGTTAAGCA AAACACTCTG	1020
AAATTGGCAA CAGGGATGCG GAATGTACCA GAGAAACAAA CTAGAGGCAT ATTCGGCGCA	1080
ATCGCAGGTT TCATAGAAAA TGGTTGGGAG GGAATGGTAG ACGGTTGGTA CGGTTTCAGG	1140
CATCAAAATT CTGAGGGCAC AGGACAAGCA GCAGATCTTA AAAGCACTCA AGCAGCAATC	1200
GACCAAATCA ACGGGAAACT GAATAGGTTA ATCGAGAAAA CGAACGAGAA ATTCCATCAA	1260
ATCGAAAAAG AATTCTCAGA AGTAGAAGGG AGAATTCAGG ACCTCGAGAA ATATGTTGAA	1320

GACTACTAAA TAGATCTCTG GTCTTACAAC GCGGAGCTTC TTGTTGCCCT GGAGAACCAA 1380  
 CATACAATTG ATCTAACTGA CTCAGAAATG AACAACTGT TTGAAAAAC AAGGAAGCAA 1440  
 CTGAGGGAAA ATGCTGAGGA CATGGGCAAT GGTGCTTCA AAATATACCA CAAATGTGAC 1500  
 AATGCCTGCA TAGGGTCAAT CAGAAATGGA ACTTATGACC ATGATGTATA CAGAGACGAA 1560  
 GCATTAAACA ACCGGTTCCA GATCAAAGGT GTTGAAGCTGA AGTCAGGATA CAAAGATTGG 1620  
 ATCCTATGGA TTTCTTTGC CATATCATGC TTTTGCTTT GTGTTGTTTT GCTGGGGTTC 1680  
 ATCATGTGGG CCTGCCAAA AGGCAACATT AGGTGCAACA TTTGCATTG AGTGTATTAA 1740  
 TTAAAAACAC CCTTGTTTCT AGGATGATTC GGTACCAGAT CTTAATTAAT TAA 1793

(1) údaje k SEQ ID NO:7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 570 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Bejing/32/92 rHA

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence

(B) POZICE: 1 až 18

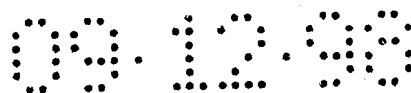
(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA

(B) POZICE: 19 až 552

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:7:

Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met
450						455					460				
Asn	Lys	Leu	Phe	Glu	Lys	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Glu
465					470					475					480
Asp	Met	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Ala
			485						490					495	
Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr	Arg
			500					505					510		
Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu	Lys
		515				520						525			
Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser	Cys
	530					535					540				
Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys	Gln
545					550					555					560
Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile						
				565					570						



```

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1      5      10
Asn Ala Ile Pro Gly Asp Phe Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr
20      25      30
Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr
35      40      45
Ile Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln
50      55      60
Ser Ser Ser Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu Asp
65      70      75      80
Gly Lys Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys
85      90      95
Asp Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys
100     105     110
Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu
115     120     125
Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Asp
130     135     140
Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys Lys
145     150     155     160
Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Lys
165     170     175
Ser Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Gly
180     185     190
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp
195     200     205
Arg Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr Val
210     215     220
Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser Arg
225     230     235     240
Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile
245     250     255
Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile
260     265     270
Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile Met
275     280     285
Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Thr Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr Pro
290     295     300
Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile
305     310     315     320
Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
325     330     335
Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe
340     345     350
Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp
355     360     365
Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala
370     375     380

Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys
385     390     395     400
Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu
405     410     415
Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr
420     425     430
Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
435     440     445

```

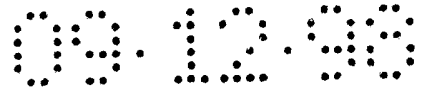
(1) údaje k SEQ ID NO:8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

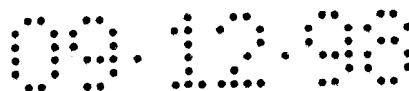
(A) DÉLKA: 1766 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
  - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Texas/36/91 rHA
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)
  - (B) POZICE: 1 až 18
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinového signálního peptidu
  - (B) POZICE: 19 až 72
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
  - (B) POZICE: 76 až 81
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: KnpI restrikční místa
  - (B) POZICE: 82 až 87
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
  - (B) POZICE: 88 až 93
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
  - (B) POZICE: 73 až 1734
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: KnpI restrikční místa
  - (B) POZICE: 1744 až 1749
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
  - (B) POZICE: 1750 až 1755
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
  - (B) POZICE: 1756 až 1766
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:8:



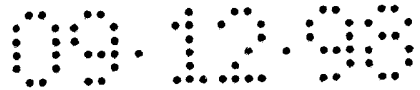
TAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCCCC GGGGACACAA TATGTATAGG CTACCATGCG	120
AACAACCTCAA CCGACACTGT TGACACAGTA CTTGAGAAGA ACGTGACAGT GACACACTCT	180
GTCAACCTAC TTGAGGACAG TCACAACGGA AACTATGTC GACTAAAGGG AATAGCCCCA	240
CTACAATTGG GTAATTGCAG CGTTGCCGGA TGGATCTTAG GAAACCCAAA ATGCGAATCA	300
CTGTTTTCTA AGGAATCATG GTCCTACATT GCAGAAACAC CAAACCCTGA GAATGGAACA	360
TGTTACCCAG GGTATTTTCG CGACTATGAG GAACTGAGGG AGCAATTGAG TTCAGTATCA	420
TCATTCGAGA GATTCGAAAT ATTCCCCAAA GAAAGCTCAT GGCCCAACCA CACCGTAACC	480
AAAGGAGTAA CGAGATCATG CTCCATAAT GGGAAAAGCA GTTTTTACAG AAATTTGCTA	540
TGGCTGACGG AGAAGAATGG CTTGTACCCA AATCTGAGCA AGTCCTATGT AAACAACAAA	600
GAGAAAGAAG TCCTGTACT ATGGGGTGTT CATCACCCGT CTAACATAAG GGACCAAAGG	660
GCCATCTATC ATACAGAAAA TGCTTATGTC TCTGTAGTGT CTTACACATTA TAGCAGAAGA	720
TTCACCCAG AAATAGCAA AAGACCCAAA GTAAGAGATC AAGAAGGAAG AATTAACCTAC	780
TACTGGACTC TGCTGGAACC CGGGGACACA ATAATATTTG AGGCAAATGG AAATCTAATA	840
GCGCCATGGT ATGCTTTCGC ACTGAGTAGA GGCTTTGGGT CAGGAATCAT CACCTCAAAC	900
GCATCAATGG ATGAATGTGA CGCGAAGTGT CAAACACCCC AGGGAGCTAT AAACAGTAGT	960
CTTCCTTCC AGAATGTACA CCCAGTCACA ATAGGAGAGT GTCCAAAGTA TGTCAGGAGT	1020
ACAAAATTAA GGATGGTTAC AGGACTAAGG AACATCCCAT CCATTCAATC CAGAGGTTTG	1080
TTTGGAGCCA TTGCCGTTT CATTGAAGGG GGGTGGACTG GAATGATAGA TGGATGGTAT	1140
GGTTATCATC ATCAGAATGA ACAAGGATCT GGCTATGCTG CGGACCAAAA AAGCACACAA	1200
AATGCCATTA ACGGGATTAC AAACAAGGTG AATTCTGTAA TCGAGAAAAT GAACACTCAA	1260
TTCACAGCTG TGGGCAAAGA ATTCAACAAA TTAGAAAGAA GGATGGAAAA CTTAAATAAA	1320
AAAGTTGATG ATGGATTTCT GGACATTTGG ACATATAATG CAGAATTGTT GGTTCTACTG	1380
GAAAATGGAA GGACTTTGGA TTTTCATGAC TCAAATGTGA AGAATCTGTA TGAGAAAGTA	1440
AAAAGCCAAT TGAAGAATAA TGCCAAAGAA ATAGGGAACG GGTGTTTTGA ATTCTATCAC	1500
AAGTGTAACA ATGAATGCAT GGAAAGTGTG AAAAATGGAA CTTATGACTA TCCAAAATAT	1560
TCCGAAGAAT CAAAGTTAAA CAGGGGAAAA ATTGATGGAG TGAAATTGGA ATCAATGGGA	1620
GTCTATCAGA TTCTGGCGAT CTACTIONACT GTCGCCAGTT CACTGGTGCT TTTGGTCTCC	1680
CTGGGGGCAA TCAGCTTCTG GATGTGTTCT AATGGGTCTT TGCAGTGCAG AATATGAATC	1740
TGAGGTACCA GATCTTAATT AATTAA	1766



## (1) údaje k SEQ ID NO:9:

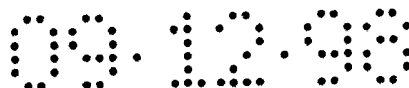
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 572 aminokyselin
  - (B) TYP: aminokyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
  - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Texas/36/91 rHA
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence
  - (B) POZICE: 1 až 18
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
  - (B) POZICE: 19 až 554
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:9:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gly	Thr	Pro	Gly	Asp	Thr	Ile	Cys	Ile	Gly	Tyr
		20						25					30		
His	Ala	Asn	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Lys	Asn
		35					40					45			
Val	Thr	Val	Thr	His	Ser	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser	His	Asn	Gly
		50				55					60				
Lys	Leu	Cys	Arg	Leu	Lys	Gly	Ile	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gly	Asn	Cys
65					70				75					80	
Ser	Val	Ala	Gly	Trp	Ile	Leu	Gly	Asn	Pro	Lys	Cys	Glu	Ser	Leu	Phe
				85					90					95	
Ser	Lys	Glu	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ile	Ala	Glu	Thr	Pro	Asn	Pro	Glu	Asn
				100				105						110	
Gly	Thr	Cys	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Phe	Ala	Asp	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu
		115					120					125			
Gln	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Arg	Phe	Glu	Ile	Phe	Pro	Lys
		130					135					140			
Glu	Ser	Ser	Trp	Pro	Asn	His	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Arg	Ser
145					150					155					160

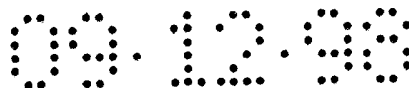


Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu  
 165 170 175  
 Thr Glu Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn  
 180 185 190  
 Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Ser  
 195 200 205  
 Asn Ile Arg Asp Gln Arg Ala Ile Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val  
 210 215 220  
 Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp  
 245 250 255  
 Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn  
 260 265 270  
 Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser  
 275 280 285  
 Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys  
 290 295 300  
 Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val  
 305 310 315 320  
 His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys  
 325 330 335  
 Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg  
 340 345 350  
 Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly  
 355 360 365  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser  
 370 375 380  
 Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile  
 385 390 395 400  
 Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr  
 405 410 415  
  
 Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu  
 420 425 430  
 Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala  
 435 440 445  
 Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gly Arg Thr Leu Asp Phe His Asp  
 450 455 460  
 Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn  
 465 470 475 480  
 Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys  
 485 490 495  
 Asn Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro  
 500 505 510  
 Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn Arg Gly Lys Ile Asp Gly Val  
 515 520 525  
 Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr  
 530 535 540  
 Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe  
 545 550 555 560  
 Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile  
 565 570

- (1) údaje k SEQ ID NO:10:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 1799 bazických párů
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
  - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)
  - (iii) HYPOTETICKÁ: ne
  - (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
  - (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
    - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
    - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Panama/45/90 rHA
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částičná)
    - (B) POZICE: 1 až 18
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K signální peptidové sekvence
    - (B) POZICE: 19 až 69
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
    - (B) POZICE: 22 až 27
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
    - (B) POZICE: 70 až 1773
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
    - (B) POZICE: 1777 až 1782
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
    - (B) POZICE: 1783 až 1788
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
    - (B) POZICE: 1789 až 1799
  - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:10:



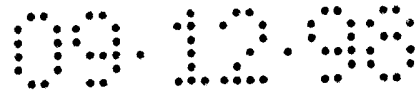
TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA	60
TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA	120
ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA	180
AAATCTCATT TTGCAAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAAACTGT	240
CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT	300
TCGGCAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCTATA	360
ATGCACGACA GAACAAAAAT CAGACAGCTA CCCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAAATATC	420
AGATTATCAA CCCAAAACGT TATCAACGCA GAAAGAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT	480
GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGTTACC AGTAGAGACG GATTCTTCGC AACAAATGGCT	540
TGGGCTGTCC CAAGGGACAA CAAAACAGCA ACGAATCCAC TAACAGTAGA AGTACCATAC	600
ATTTGTACCA AAGGAGAAGA CCAAATTACT GTTTGGGGGT TCCATTCTGA TAACAAAATC	660
CAAATGAAAA ACCTCTATGG ARACTCAAAT CCTCAAAAGT TCACCTCATC TGCCAATGGA	720
GTAACCACAC ATTATGTTTC TCAGATTGGT GGCTTCCCAA ATCAAACAGA AGACGGAGGG	780
CTACCACAAA GCGGCAGAAT TGTTGTTGAT TACATGGTGC AAAACCTGG GAAAACAGGA	840
ACAATTGTCT ATCAAAGAGG TGTTTTGTTG CCTCAAAAGG TGTGGTGCGC AAGTGGCAGG	900
AGCAAGGTAA TAAAAGGGTC CTTGCCTTTA ATTGGTGAAG CAGATTGCCT TCACGAAAAA	960
TACGGTGGAT TAAACAAAAG CAAGCCTTAC TACACAGGAG AACATGCAAA AGCCATAGGA	1020
AATTGCCCAA TATGGGTGAA AACACCTTTG AAGCTTGCCA ATGGAACCAA ATATAGACCT	1080
CCTGCAAAAC TATTAAAGGA AAGGGGTTTC TTCGGAGCTA TTGCTGGTTT CTTAGAAGGA	1140
GGATGGGAAG GAATGATTGC AGGTTGGCAC GGATACACAT CTCATGGAGC ACATGGAGTG	1200
GCAGTGGCAG CAGACCTTAA GAGTACGCAA GAAGCCATAA ACAAGATAAC AAAAAATCTC	1260
AATTCTTTGA GTGAGCTAGA AGTAAAGAAT CTTCAAAGAC TAAGTGGTGC CATGGATGAA	1320
CTCCACAACG AAATACTCGA GCTGGATGAG AAAGTGGATG ATCTCAGAGC TGACACAATA	1380
AGCTCGCAA TAGAGCTTGC AGTCTTGCTT TCCAACGAAG GAATAATAAA CAGTGAAGAT	1440
GAGCATCTAT TGGCACTTGA GAGAAAATA AAGAAAATGC TGGGTCCCTC TGCTGTAGAC	1500
ATAGGGAATG GATGCTTCGA AACCAAACAC AAGTGCAACC AGACCTGCTT AGACAGGATA	1560
GCTGCTGGCA CCTTTAATGC AGGAGAATTT TCTCTCCCA CTTTTGATTC ACTGAATATT	1620
ACTGCTGCAT CTTTAAATGA TGATGGATTG GATAATCATA CTATACTGCT CTACTIONTCA	1680
ACTGCTGCTT CTAGTTTGGC TGTAACATTG ATGATAGCTA TTTTATTGT TTATATGGTC	1740
TCCAGAGACA ATGTTTCTTG TTCCATCTGT CTGTGAGGTA CCAGATCTTA ATTAATTAA	1799



## (1) údaje k SEQ ID NO:11:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 585 aminokyselin
  - (B) TYP: aminokyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
  - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Panama/45/90 rHA
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: HA signální peptid
  - (B) POZICE: 1 až 17
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
  - (B) POZICE: 18 až 568
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:11:

Met	Pro	Gly	Lys	Ala	Ile	Ile	Val	Leu	Leu	Met	Val	Val	Thr	Ser	Asn
1			5					10						15	
Ala	Asp	Arg	Ile	Cys	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Pro	His	Val
			20					25					30		
Val	Lys	Thr	Ala	Thr	Gln	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Thr	Gly	Val	Ile	Pro
	35						40					45			
Leu	Thr	Thr	Thr	Pro	Thr	Lys	Ser	His	Phe	Ala	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr
	50					55					60				
Lys	Thr	Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Pro	Asn	Cys	Leu	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu
65				70						75				80	
Asp	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Met	Cys	Val	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala
			85						90					95	
Lys	Ala	Ser	Ile	Leu	His	Glu	Val	Arg	Pro	Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Phe
			100					105					110		
Pro	Ile	Met	His	Asp	Arg	Thr	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu
		115					120					125			
Arg	Gly	Tyr	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Ile	Asn	Ala
	130					135					140				
Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Tyr	Arg	Leu	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys
145					150					155					160



Pro Asn Val Thr Ser Arg Asp Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala  
 165 170 175  
 Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Val Glu Val  
 180 185 190  
 Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly Phe  
 195 200 205  
 His Ser Asp Asn Lys Ile Gln Met Lys Asn Leu Tyr Gly Asp Ser Asn  
 210 215 220  
 Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr Val  
 225 230 235 240  
 Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu Pro  
 245 250 255  
 Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Pro Gly Lys  
 260 265 270  
 Thr Gly Thr Ile Val Tyr Gln Arg Gly Val Leu Leu Pro Gln Lys Val  
 275 280 285  
 Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro Leu  
 290 295 300  
 Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn Lys  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn Cys  
 325 330 335  
 Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys Tyr  
 340 345 350  
 Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Gly Phe Phe Gly Ala Ile  
 355 360 365  
 Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Trp Glu Gly Met Ile Ala Gly Trp His  
 370 375 380  
 Gly Tyr Thr Ser His Gly Ala His Gly Val Ala Val Ala Ala Asp Leu  
 385 390 395 400  
 Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Asn Lys Ile Thr Lys Asn Leu Asn Ser  
 405 410 415  
 Leu Ser Glu Leu Glu Val Lys Asn Leu Gln Arg Leu Ser Gly Ala Met  
 420 425 430  
 Asp Glu Leu His Asn Glu Ile Leu Glu Leu Asp Glu Lys Val Asp Asp  
 435 440 445  
 Leu Arg Ala Asp Thr Ile Ser Ser Gln Ile Glu Leu Ala Val Leu Leu  
 450 455 460  
 Ser Asn Glu Gly Ile Ile Asn Ser Glu Asp Glu His Leu Leu Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Glu Arg Lys Leu Lys Lys Met Leu Gly Pro Ser Ala Val Asp Ile Gly  
 485 490 495  
  
 Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp  
 500 505 510  
 Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr  
 515 520 525  
 Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu  
 530 535 540  
 Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu  
 545 550 555 560  
  
 Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg  
 565 570 575  
 Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu  
 580 585

- (1) údaje k SEQ ID NO:12:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 1811 bazických párů
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
  - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)
  - (iii) HYPOTETICKÁ: ne
  - (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
  - (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
    - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
    - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Netherlands/13/94 rHA
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)
    - (B) POZICE: 1 až 18
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinové signální sekvence
    - (B) POZICE: 19 až 72
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
    - (B) POZICE: 76 až 81
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
    - (B) POZICE: 73 až 1785
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
    - (B) POZICE: 1789 až 1794
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
    - (B) POZICE: 1795 až 1800
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
    - (B) POZICE: 1801 až 1811
  - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:12:



TAAAAAACC TATAATAAT GCCCTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC 60  
 GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGATCGAATC TGCACTGGGA TAACATCTTC AAAATCACCT 120  
 CATGTAGTCA AAACAGCTAC TCAAGGGGAG GTCAATGTGA CTGGTGTGAT ACCACTGACG 180  
 ACAACACCAA CAAAATCTCA TTTTGCAAAT CTCAAAGGAA CAAAGACCAG AGGGAAACTA 240  
 TGCCCAAAC TGTCTCAACTG CACAGATCTG GATGTGGCCT TGGGCAGACC AATGTGTGTG 300  
 GGGATCACAC CTTCCGGCAA AGCTTCAATA CTCCACGAAG TCAGACCTGT TACATCCGGG 360  
 TGCTTTCCTA TAATGCATGA CAGAACAAAA ATCAGACAGC TACCCAATCT TCTCAGAGGA 420  
 TATGAAAACA TCAGACTATC AACCCAAAAC GTTATCAACG CAGAAAAGGC ACCAGGAGGA 480  
 CCCTACAGAC TTGGAACCTC AGGATCTTGC CCTAACGTTA CCAGTAGAAC CGGATTCTTC 540  
 GCAACAATGG CTTGGGCTGT CCCAAGGGAC AACAAAACAG CAACGAATCC ACTAACAGTA 600  
 GAAGTACCAT ACATTTGTAC GAAAGGAGAA GACCAAATTA CTGTTTGGGG GTTCCATTCT 660  
 GATAACAAAA CCCAAATGAA AAACCTCTAT GGAGACTCAA ATCCTCAAAA GTTCACCTCA 720  
 TCTGCCAATG GAGTAACCAC ACATTATGTT TCTCAGATTG GTGGCTTCCC AGATCAAACA 780  
  
 GAAGACGGAG GACTACCACA AAGCGGCAGA ATTGTTGTTG ATTACATGGT GCAAAAACCT 840  
 GGGAAAACAG GAACAATTGT CTATCAAAGA GGTATTTTGT TGCCTCAAAA GGTGTGGTGC 900  
 GCAAGTGGCA GGAGCAAGGT AATAAAAGGG TCCTTGCCTT TAATTGGTGA AGCAGATTGC 960  
 CTTACAGAAA AATACGGTGG ATTAAACAAA AGCAAGCCTT ACTACACAGG AGAACATGCA 1020  
 AAAGCCATAG GAAATTGCCC AATATGGGTG AAAACACCTT TGAAGCTTGC CAATGGAACC 1080  
 AGATATAGAC CTCCTGCAAA ACTATTAAAG GAAAGGGGT TCTTCGGAGC TATTGCTGGT 1140  
 TTCTTAGAAG GAGGATGGGA AGGAATGATT GCAGGTTGGC ACGGATACAC ATCTCACGGG 1200  
 GCACATGGAG TGGCAGTGGC AGCAGACCTT AAGAGTACGC AAGAAGCCAT AAACAAGATA 1260  
 ACAAAAAATC TCAATTCTTT GAGTGAGCTA GAAGTAAAGA ACCTCAAAG ACTAAGTGGT 1320  
 GCCATGGATG AACTCCACAA CGAAATACTC GAGCTGGATG AGAAAGTGA TGATCTCAGA 1380  
 GCTGACACAA TAAGCTCGCA AATAGAGCTT GCAGTCTTAC TTTCCAACGA AGGAATAATA 1440  
 AACAGTGAAG ATGAGCATCT ATTGGCACTT GAGAGAAAAC TAAAGAAAAT GCTGGGTCCC 1500  
 TCTGCTGTAG ACATAGGGAA TGGATGCTTC GAAACAAAAC ACAAGTGCAA CCAGACCTGC 1560  
 TTAGACAGGA TAGCTGCTGG CACCTTTAAT GCAGGAGAAT TTTCTCTTCC CACTTTTGAT 1620  
 TCACTGAATA TTACTGCTGC ATCTTTAAAT GATGATGGAT TGGATAATCA TACTATACTG 1680  
 CTCTACTACT CAACTGCTGC TTCTAGTTTG GCTGTAACAT TGATGATAGC TATTTTTATT 1740  
 GTTTATATGG TCTCCAGAGA CAATGTTTCT TGTTCATCT GTCTGTGAGG TACCAGATCT 1800  
 TAATTAATTA A 1811



## (1) údaje k SEQ ID NO:13:

## (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 589 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Netherlands/13/94 rHA

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence

(B) POZICE: 1 až 18

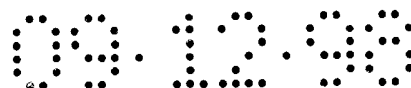
(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA

(B) POZICE: 19 až 571

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:13:

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



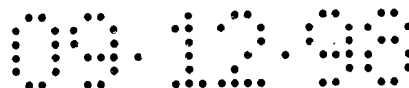
Gly	Asp	Ser	Asn	Pro	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Asn	Gly	Val	Thr
225					230					235					240
Thr	His	Tyr	Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp
				245					250					255	
Gly	Gly	Leu	Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Met	Val	Gln
			260					265					270		
Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu
		275					280					285			
Pro	Gln	Lys	Val	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	Ile	Lys	Gly
	290					295					300				
Ser	Leu	Pro	Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	Lys	Tyr	Gly
305					310					315					320
Gly	Leu	Asn	Lys	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Ala
				325					330					335	
Ile	Gly	Asn	Cys	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys	Leu	Ala	Asn
			340					345					350		
Gly	Thr	Arg	Tyr	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Phe
		355					360					365			
Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile
	370					375					380				
Ala	Gly	Trp	His	Gly	Tyr	Thr	Ser	His	Gly	Ala	His	Gly	Val	Ala	Val
385					390					395					400
Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Ile	Thr	Lys
			405						410					415	
Asn	Leu	Asn	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Gln	Arg	Leu
			420					425					430		
Ser	Gly	Ala	Met	Asp	Glu	Leu	His	Asn	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu
		435					440					445			
Lys	Val	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu
	450					455					460				
Ala	Val	Leu	Leu	Ser	Asn	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn	Ser	Glu	Asp	Glu	His
465					470					475					480
Leu	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Leu	Gly	Pro	Ser	Ala
				485					490					495	
Val	Asp	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Thr	Lys	His	Lys	Cys	Asn	Gln
			500					505					510		
Thr	Cys	Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala	Gly	Glu	Phe
		515				520						525			
Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn
	530					535					540				
Asp	Asp	Gly	Leu	Asp	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ala
545					550					555					560
Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Ile	Phe	Ile	Val	Tyr
				565					570					575	
Met	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Val	Ser	Cys	Ser	Ile	Cys	Leu			
			580					585							

(1) údaje k SEQ ID NO:14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1557 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)



- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
  - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Shandong/9/93 rHA
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)
  - (B) POZICE: 1 až 18
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinové signální sekvence
  - (B) POZICE: 19 až 72
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
  - (B) POZICE: 76 až 81
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
  - (B) POZICE: 73 až 1728
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
  - (B) POZICE: 1735 až 1740
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: BglIII restrikční místa
  - (B) POZICE: 1741 až 1746
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
  - (B) POZICE: 1747 až 1757
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:14:

```

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC      60
GTTTCTAACG CGATTCCC GG GCAAGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG      120
TGCCTGGGAC ATCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA      180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGTTGGTT CAGAGTTCCT CAACAGGTAG AATATGCGGC      240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAAAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC      300
CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT      360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC      420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAATGAA GACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT      480
GGGGGAAGCT ATGCTTGCAA AAGAGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG      540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA      600

```



TTTGACAAAT TGTACATTTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC	660
CTATATGTTT GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACCTGTA	720
ACCCCGAATA TCGGGTCTAG ACCCTGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AAGCATCTAT	780
TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTGATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT	960
TTTCAAAATG TAAACAGAAT CACATATGGG GCCTGCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT	1020
CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTCGGC	1080
GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC	1140
AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCAGCAGATC TTAAAAGCAC TCAAGCAGCA	1200
ATCGACCAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAATCGAGA AAACGAACGA GAAATTCAT	1260
CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT	1320
GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AACCGGAGC TTCTTGTTGC CCTGGAGAAC	1380
CAACATACAA TTGATCTAAC TGA CT CAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAAA ACAAGGAAG	1440
CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGCT TCAAAATATA CCACAAATGT	1500
GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGA ACTTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC	1560
GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT	1620
TGGATCCTAT GGATTCCTT TGCCATATCA TGCTTTTTGC TTTGTGTTGT TTTGCTGGGG	1680
TTCATCATGT GGGCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC	1740
AGATCTTAAT TAATTAA	1757

(1) údaje k SEQ ID NO:15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 571 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

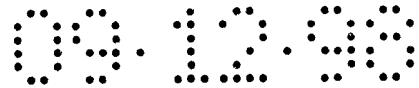
(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Shandong/9/93 rHA



## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence

(B) POZICE: 1 až 18

## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA

(B) POZICE: 19 až 553

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:15:

Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Leu	Leu	Asn	Val	Leu	Trp	Leu	Val	Ala	Val	Ser
1				5					10					15	
Asn	Ala	Ile	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Pro	Gly	Asn	Asp	Asn	Ser	Thr	Ala
		20						25					30		
Thr	Leu	Cys	Leu	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Lys
		35					40					45			
Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Val
	50					55					60				
Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Arg	Ile	Cys	Gly	Ser	Pro	His	Arg	Ile	Leu
65					70					75					80
Asp	Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ile	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	His
			85						90					95	
Cys	Asp	Gly	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Trp	Asp	Leu	Phe	Val	Glu	Arg	Ser
			100					105					110		
Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser
		115					120					125			
Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu
	130						135					140			
Asp	Phe	Asn	Trp	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Asp	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Cys
145					150					155					160
Lys	Arg	Gly	Ser	Val	Asn	Ser	Phe	Phe	Ser	Arg	Leu	Asn	Trp	Leu	His
				165						170					175
Lys	Leu	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	Met	Pro	Asn	Asn
			180					185					190		
Gly	Lys	Phe	Asp	Lys	Leu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Val	His	His	Pro	Ser	Thr
		195					200					205			
Asp	Ser	Asp	Gln	Thr	Ser	Leu	Tyr	Val	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Thr
	210					215					220				
Val	Ser	Thr	Lys	Arg	Ser	Gln	Gln	Thr	Val	Thr	Pro	Asn	Ile	Gly	Ser
225						230					235				240
Arg	Pro	Trp	Val	Arg	Gly	Gln	Ser	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Tyr	Trp	Thr
				245						250					255
Ile	Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Ile	Asp	Ser	Thr	Gly	Asn	Leu
			260					265					270		
Ile	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	Phe	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Ile
		275					280					285			
Met	Arg	Ser	Asp	Ala	Pro	Ile	Gly	Asn	Cys	Ser	Ser	Glu	Cys	Ile	Thr
	290					295					300				
Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	Asn	Asp	Lys	Pro	Phe	Gln	Asn	Val	Asn	Arg
305					310					315					320
Ile	Thr	Tyr	Gly	Ala	Cys	Pro	Arg	Tyr	Val	Lys	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys
				325						330					335
Leu	Ala	Thr	Gly	Met	Arg	Asn	Val	Pro	Glu	Lys	Gln	Thr	Arg	Gly	Ile
			340					345					350		
Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Val
		355					360					365			
Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln
	370					375					380				
Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly
385					390					395					400
Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile
				405						410				415	
Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
			420					425						430	



```

Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu
      435      440      445
Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu
      450      455      460
Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala
465      470      475
Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn
      485      490      495
Ala Cys Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr
      500      505      510
Arg Asp Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu
      515      520      525
Lys Ser Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser
      530      535      540
Cys Phe Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys
545      550      555      560
Gln Lys Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
      565

```

## (1) údaje k SEQ ID NO:16:

## (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1814 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

## (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

## (iii) HYPOTETICKÁ: ne

## (iv) PROTISMYSLNÝ: ne

## (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
- (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Shanghai/4/94 rHA

## (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)
- (B) POZICE: 1 až 18

## (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinové signální sekvence
- (B) POZICE: 19 až 72

## (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
- (B) POZICE: 76 až 81

## (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
- (B) POZICE: 82 až 87

## (ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA

(B) POZICE: 73 až 1794

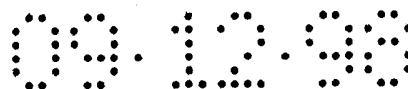
(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál

(B) POZICE: 1804 až 1814

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:16:

TAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGGTACCGAT CGAATCTGCA CTGGGATAAC ATCTTCAAAC	120
TCACCTCATG TGGTCAAAAC AGCTACTCAA GGGGAGGTCA ATGTGACTGG TGTGATACCA	180
CTGACAACAA CACCAACAAA ATCTCATTTT GCAAATCTCA AAGGAACAAA GACCAGAGGG	240
AAACTATGCC CAAACTGTCT CAACTGCACA GATCTGGATG TGGCCTTGGG CAGACCAATG	300
TGTGTGGGGA CCACACCTTC GGCAAAAGCT TCAATACTCC ACGAAGTCAG ACCTGTTACA	360
TCCGGGTGCT TTCCTATAAT GCACGACAGA ACAAAAATCA GACAGCTACC CAATCTTCTC	420
AGAGGATATG AAAATATCAG ATTATCAACC CAAAACGTTA TCAACGCAGA AAAGGCACCA	480
GGAGGACCCT ACAGACTTGG AACCTCAGGA TCTTGCCCTA ACGTACCAG TAGAAGCGGA	540
TTTTTCGCAA CAATGGCTTG GGCTGTCCCA AGGGACAACA ACAAACAGC AACGAATCCA	600
CTAACAGTAG AAGTACCATA CATTGACACA AAAGGAGAAG ACCAAATTAC TGTTTGGGGG	660
TTCCATTCTG ATAACAAACC CCAAATGAAA AACCTCTATG GAGACTCAA TCCTCAAAG	720
TTCACCTCAT CTGCTAATGG AGTAACCACA CATTATGTTT CTCAGATTGG CGGCTTCCCA	780
GATCAAACAG AAGACGGAGG GCTACCACAA AGCGGCAGAA TTGTTGTTGA TTACATGGTG	840
CAAAAACCTG GGAAGACAGG AACCAATTGTC TATCAGAGAG GTGTTTTGTT GCCTCAAAG	900
GTGTGGTGCG CTAGTGCCAG GAGCAAAGTA ATAAAAGGGT CCTTGCCTTT AATTGGTGAA	960
GCAGATTGCC TTCACGAAAA ATACGGTGGG TTAACAAAA GCAAGCCTTA CTACACAGGA	1020
GAACATGCAA AAGCCATAGG AAATTGCCCA ATATGGGTGA AAACACCTTT GAAGCTTGCC	1080
AATGGAACCA AATATAGACC TCCTGCAAAA CTATTAAGG AAAGGGGTTT CTTCGGAGCT	1140
ATTGCTGGTT TCTTAGAAGG AGGATGGGAA GGAATGATTG CAGGTTGGCA CGGATACACA	1200
TCTCACGGAG CACATGGAGT GGCAGTGGCA GCAGACCTTA AGAGTACGCA AGAAGCCATA	1260
AACAAGATAA CAAAAAATCT CAATTCTTTG AGTGAGCTAG AAGTAAAGAA TCTTCAAAGG	1320
CTAAGTGGTG CCATGGATGA ACTCCACAAC GAAATACTCG AGCTGGATGA GAAAGTGGAT	1380



```

GATCTCAGAG CTGACACAAT AAGCTCGCAA ATAGAACTTG CAGTCTTGCT TTCCAACGAA      1440
GGAATAATAA ACAGTGAAGA TGAGCATCTA TTGGCACTTG AGAGAAAAC T AAAGAAAATG      1500
CTGGGTCCCT CTGCTGTAGA CATAGGAAAT GGATGCTTCG AAACCAAACA CAAGTGCAAC      1560
CAGACCTGCT TAGACAGGAT AGCTGCTGGC ACCTTTAATG CGGGAGAATT TTCTCTTCCC      1620
ACTTTTGATT CACTGAATAT TACTGCTGCA TCTTTAAATG ATGATGGATT GGATAACCAT      1680
ACTATACTGC TCTACTACTC AACTGCTGCT TCTAGTTTGG CGGTAACATT GATGATAGCT      1740
ATTTTTATTG TTTATATGGT CTCCAGAGAC AATGTTTCTT GCTCCATCTG TCTGTGAGGA      1800
TCTTAATTAA TTAA                                                                1814

```

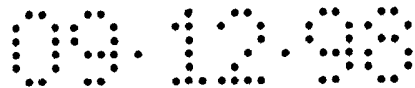
(1) údaje k SEQ ID NO:17:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 592 aminokyselin
  - (B) TYP: aminokyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
  - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Shanghai/4/94 rHA
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinový signální peptid
  - (B) POZICE: 1 až 18
- (ix) ZNAKY
  - (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
  - (B) POZICE: 19 až 574
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:17:

```

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

```



Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Ser	Ile	Leu	His	Glu	Val	Arg	Pro
			100					105					110		
Val	Thr	Ser	Gly	Cys	Phe	Pro	Ile	Met	His	Asp	Arg	Thr	Lys	Ile	Arg
		115					120					125			
Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	Arg	Gly	Tyr	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Thr
	130					135						140			
Gln	Asn	Val	Ile	Asn	Ala	Glu	Lys	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Tyr	Arg	Leu
145					150						155				160
Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys	Pro	Asn	Ala	Thr	Ser	Arg	Ser	Gly	Phe	Phe
				165					170					175	
Ala	Thr	Met	Ala	Trp	Ala	Val	Pro	Arg	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Ala	Thr
		180						185					190		
Asn	Pro	Leu	Thr	Val	Glu	Val	Pro	Tyr	Ile	Cys	Thr	Lys	Gly	Glu	Asp
		195					200					205			
Gln	Ile	Thr	Val	Trp	Gly	Phe	His	Ser	Asp	Asn	Lys	Pro	Gln	Met	Lys
	210					215						220			
Asn	Leu	Tyr	Gly	Asp	Ser	Asn	Pro	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Asn
225					230					235					240
Gly	Val	Thr	Thr	His	Tyr	Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Asp	Gln
				245					250					255	
Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu	Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr
			260					265						270	
Met	Val	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly
		275					280						285		
Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys	Val	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val
	290					295					300				
Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro	Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu
305					310					315					320
Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn	Lys	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His
				325					330					335	
Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn	Cys	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys
			340					345					350		
Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys	Tyr	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu
		355					360						365		
Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu
	370					375						380			
Gly	Met	Ile	Ala	Gly	Trp	His	Gly	Tyr	Thr	Ser	His	Gly	Ala	His	Gly
385					390					395					400
Val	Ala	Val	Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys
				405					410					415	
Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	Asn	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Leu
			420						425					430	
Gln	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala	Met	Asp	Glu	Leu	His	Asn	Glu	Ile	Leu	Glu
		435					440						445		
Leu	Asp	Glu	Lys	Val	Asp	Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Gln
	450					455						460			
Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Ser	Asn	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn	Ser	Glu
465					470						475				480
Asp	Glu	His	Leu	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Leu	Gly
			485						490					495	
Pro	Ser	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Thr	Lys	His	Lys
			500					505					510		
Cys	Asn	Gln	Thr	Cys	Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala
		515					520						525		
Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala
	530					535						540			
Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly	Leu	Asp	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Leu	Tyr	Tyr
545					550					555					560
Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Ile	Phe
				565					570					575	
Ile	Val	Tyr	Met	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Val	Ser	Cys	Ser	Ile	Cys	Leu
			580					585						590	

- (1) údaje k SEQ ID NO:18:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 1802 bazických párů
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
  - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)
  - (iii) HYPOTETICKÁ: ne
  - (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
  - (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
    - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir
    - (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Harbin/7/94 rHA
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)
    - (B) POZICE: 1 až 18
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast HA signální peptidové sekvence
    - (B) POZICE: 19 až 69
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
    - (B) POZICE: 22 až 27
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
    - (B) POZICE: 70 až 1776
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
    - (B) POZICE: 1780 až 1785
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
    - (B) POZICE: 1786 až 1791
  - (ix) ZNAKY
    - (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
    - (B) POZICE: 1792 až 1802
  - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:18:



TAAAAAACC	TATAATAAT	GCCCGGAAG	GCAATAATTG	TACTACTCAT	GGTAGTAACA	60
TCCAACGCAG	ATCGAATCTG	CACTGGGATA	ACATCTTCAA	ACTCACCTCA	TGTGGTCAAA	120
ACAGCTACTC	AAGGGGAAGT	CAATGTGACT	GGTGTGATAC	CACTGACAAC	AACACCAACA	180
AAATCTCATT	TTGCAAATCT	AAAAGGAACA	AAGACCAGAG	GGAAACTATG	CCCAAACGT	240
CTCAACTGCA	CAGATCTGGA	TGTGGCCTTG	GGCAGACCAA	TGTGTGTGGG	GACCACACCT	300
TCGGCAAAAG	CTTCAATACT	CCACGAAGTC	AGACCTGTTA	CATCCGGGTG	CTTTCCTATA	360
ATGCACGACA	GAACAAAAT	CAGACAGCTA	CCCAATCTTC	TCAGAGGATA	TGAAAATATC	420
AGATTATCAA	CCCAAACGT	TATCAATGCA	GAAAAGCAC	CAGGAGGACC	CTACAGACTT	480
GGAACCTCAG	GATCTTGCCC	TAACGCTACC	AGTAGAAGCG	GATTTTTTGC	AACAATGGCT	540
TGGGCTGTCC	CAAGGGACGA	CAACAAAACA	GCAACGAATC	CACTAACAGT	AGAAGTACCA	600
TACGTTTGTA	CAGAAGGAGA	AGACCAAATT	ACTGTTTGGG	GGTCCATTTC	TGATAACAAA	660
GCCCAAATGA	AAAACCTCTA	TGGAGACTCA	AATCCTCAAA	AGTTCACCTC	ATCTGCTAAT	720
GGAGTAACCA	CACATTATGT	TTCTCAGATT	GGCGGCTTCC	CAGATCAAAC	AGAAGACGGA	780
GGGCTACCAC	AAAGCGGCAG	AATTGTTGTT	GATTACATGG	TGCAAAAACC	TGGGAAAACA	840
GGAACAATTG	TCTATCAAAG	AGGTGTTTTG	TTGCCTCAAA	AGGTGTGGTG	CGCGAGTGGC	900
AGGAGCAAAG	TAATAAAAGG	GTCCTTGCC	TTAATTGGTG	AAGCAGATTG	CCTTCACGAA	960
AAATACGGTG	GATTAAACAA	AAGCAAGCCT	TACTACACAG	GAGAACATGC	AAAAGCCATA	1020
GGAAATTGCC	CAATATGGGT	GAAAACACCT	TTGAAGCTTG	CCAATGGAAC	CAAATATAGA	1080
CCTCCTGCAA	AACTATTAAA	GGAAAGGGGT	TTCTTCGGAG	CTATTGCTGG	TTTCTTAGAA	1140
GGAGGATGGG	AAGGAATGAT	TGCAGGTTGG	CACGGATACA	CATCTCACGG	AGCACATGGA	1200
GTGGCAGTGG	CAGCAGACCT	TAAGAGTACG	CAAGAAGCCA	TAAACAAGAT	AACAAAAAAT	1260
CTCAATTCTT	TGAGTGAGCT	AGAAGTAAAG	AATCTTCAAA	GACTAAGTGG	TGCCATGGAT	1320
GAACTCCATA	ACGAAATACT	CGAGCTGGAT	GAGAAAGTGG	ATGATCTCAG	AGCTGACACT	1380
ATAAGCTCGC	AAATAGAACT	TGCAGTCTTG	CTTTCCAACG	AAGGAATAAT	AAACAGTGAA	1440
GATGAGCATC	TATTGGCACT	TGAGAGAAAA	CTAAAGAAAA	TGCTGGGTCC	CTCTGCTGTA	1500
GACATAGGGA	ATGGATGCTT	CGAAACCAAA	CACAAGTGCA	ACCAGACCTG	CTTAGACAGG	1560
ATAGCTGCTG	GCACCTTTAA	TGCAGGAGAA	TTTTCTCTCC	CCACTTTTGA	TTCACTGAAT	1620
ATTACTGCTG	CATCTTTAAA	TGATGATGGA	TTGGATAATC	ATACTATACT	GCTCTACTAC	1680
TCAACTGCTG	CTTCTAGTTT	GGCTGTAACA	TTGATGATAG	CTATTTTTAT	TGTTTATATG	1740
GTCTCCAGAG	ACAATGTTTC	ATGCTCCATC	TGTCTGTGAG	GTACCAGATC	TTAATTAATT	1800
AA						1802



(1) údaje k SEQ ID NO:19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 586 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Harbin/7/94 rHA

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: HA signální peptid

(B) POZICE: 1 až 17

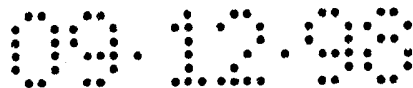
(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA

(B) POZICE: 18 až 569

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:19:

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



Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Leu
				245					250					255	
Pro	Gln	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Met	Val	Gln	Lys	Pro	Gly
			260					265					270		
Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Val	Tyr	Gln	Arg	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Lys
			275				280					285			
Val	Trp	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	Val	Ile	Lys	Gly	Ser	Leu	Pro
	290					295					300				
Leu	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Leu	His	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asn
305					310					315					320
Lys	Ser	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Glu	His	Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Asn
				325					330					335	
Cys	Pro	Ile	Trp	Val	Lys	Thr	Pro	Leu	Lys	Leu	Ala	Asn	Gly	Thr	Lys
			340					345					350		
Tyr	Arg	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ala
				355				360				365			
Ile	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile	Ala	Gly	Trp
	370					375					380				
His	Gly	Tyr	Thr	Ser	His	Gly	Ala	His	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Asp
385					390					395					400
Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	Asn
				405					410					415	
Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Val	Lys	Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala
			420					425					430		
Met	Asp	Glu	Leu	His	Asn	Glu	Ile	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Lys	Val	Asp
		435				440						445			
Asp	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Gln	Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Leu
	450					455					460				
Leu	Ser	Asn	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn	Ser	Glu	Asp	Glu	His	Leu	Leu	Ala
465					470					475				480	
Leu	Glu	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Leu	Gly	Pro	Ser	Ala	Val	Asp	Ile
			485						490					495	
Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Glu	Thr	Lys	His	Lys	Cys	Asn	Gln	Thr	Cys	Leu
			500					505					510		
Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala	Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro
		515					520					525			
Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly
		530				535						540			
Leu	Asp	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser
545					550					555					560
Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Ile	Phe	Ile	Val	Tyr	Met	Val	Ser
				565					570					575	
Arg	Asp	Asn	Val	Ser	Cys	Ser	Ile	Cys	Leu						
			580					585							

(1) údaje k SEQ ID NO:20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1757 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir



(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Johannesburg/33/94 rHA

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: vedoucí polyhedrinová mRNA (částečná)

(B) POZICE: 1 až 18

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinového  
signálního peptidu

(B) POZICE: 19 až 72

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa

(B) POZICE: 76 až 81

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA

(B) POZICE: 73 až 1731

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: KnpI restrikční místa

(B) POZICE: 1735 až 1740

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa

(B) POZICE: 1741 až 1747

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál

(B) POZICE: 1747 až 1757

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:20:

TAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAGGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG	120
TGCCTGGGAC ACCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA	180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGCTGGTT CAGAGTTCCC CAACAGGTAG AATATGCGAC	240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAGAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC	300
CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT	360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC	420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAACGAA AACTTCAATT GGAAGTGGAGT CGCTCAGGAT	480
GGGAAAAGCT ATGCTTGCAA AAGGGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG	540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAA	600
TTTGACAAAT TGTACATTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC	660
CTATATGTCC GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAAGTGA	720
ATCCCGGATA TCGGGTATAG ACCATGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AGGCATCTAT	780

TGGACAATAG TAAAACCGGG AGACATACTT TTGATTAATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT	960
TTTCAAAATG TAAACAGGAT CACATATGGG GCCTGCCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT	1020
CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTCGGC	1080
GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC	1140
AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCTGCAGATC TAAAAGCAC TCAAGCAGCA	1200
ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAGTCGAGA AAACGAACGA GAAATTCCAT	1260
CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATC AGGACCTCGA GAAATATGTT	1320
GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AATGCGGAGC TTCTTGTTGC TCTGGAGAAC	1380
CAACATACAA TTGATCTAAC TGA CTCAGAA ATGAACAAAC TGTTGAAAG AACAAGGAAG	1440
CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGTT TCAAAATATA CCACAAATGT	1500
GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGA ACTTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC	1560
GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT	1620
TGGATTCTAT GGATTCCTT TGCCATATCA TGCTTTTTC TTTGTGTTGT TTTGCTTGGG	1680
TTCATCATGT GGGCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC	1740
AGATCTTAAT TAATTAA	1757

(1) údaje k SEQ ID NO:21:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 571 aminokyselin
  - (B) TYP: aminokyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: chřipkový vir



(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Johannesburg/33/94 rHA

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence

(B) POZICE: 1 až 18

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA

(B) POZICE: 19 až 569

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:21:

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Ile Pro Gly Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys  
 35 40 45  
 Thr Ile Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val  
 50 55 60  
 Gln Ser Ser Pro Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu  
 65 70 75 80  
 Asp Gly Lys Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His  
 85 90 95  
 Cys Asp Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser  
 100 105 110  
 Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser  
 115 120 125  
 Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu  
 130 135 140  
 Asn Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Lys Ser Tyr Ala Cys  
 145 150 155 160  
 Lys Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His  
 165 170 175  
 Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn  
 180 185 190  
 Gly Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr  
 195 200 205  
 Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr  
 210 215 220  
 Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asp Ile Gly Tyr  
 225 230 235 240  
 Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Gly Ile Tyr Trp Thr  
 245 250 255  
 Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu  
 260 265 270  
 Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile  
 275 280 285  
 Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Asn Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr  
 290 295 300  
 Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg  
 305 310 315 320  
 Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys  
 325 330 335  
 Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile  
 340 345 350  
 Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val  
 355 360 365



Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Thr	Gly	Gln
	370					375					380				
Ala	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Asn	Gly
385					390					395				400	
Lys	Leu	Asn	Arg	Leu	Val	Glu	Lys	Thr	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Gln	Ile
				405					410					415	
Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Arg	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys
			420					425					430		
Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu
	435						440					445			
Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu
	450					455					460				
Met	Asn	Lys	Leu	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala
465					470					475					480
Glu	Asp	Met	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn
				485					490					495	
Ala	Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu
		515					520						525		
Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser
	530					535						540			
Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys
545					550					555					560
Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile					
				565					570						

(1) údaje k SEQ ID NO:22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 39 bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:22:

TGGTTGGTCG CCGTTTCTAA CGCGATTCCC GGGGGTACC

39

(1) údaje k SEQ ID NO:23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 13 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:23:

Trp Leu Val Ala Val Ser Asn Ala Ile Pro Gly Gly Thr

1

5

10

(1) údaje k SEQ ID NO:24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

105

- (A) DÉLKA: 43 bazických párů
  - (B) TYP: nukleová kyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:24:

TGGTTAGTCG CCGTGTCTTG CAGGCCAGAG AGGCCTTGGT ACC

43

- (1) údaje k SEQ ID NO:25:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 18 bazických párů
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:25:

GTCGCCGTGT CCAACGCG

18

- (1) údaje k SEQ ID NO:26:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 18 bazických párů
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:26:

TAATTGGCCA GAGAGGCC

18

- (1) údaje k SEQ ID NO:27:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 39 bází
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:27:

GGGGGATCCG GTACCAGCAA AAGCAGGGGA TAATTCTAT

39

- (1) údaje k SEQ ID NO:28:
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 38 bází



- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:28:

GGGGGTACCC CCGGGGACTT TCCAGGAAAT GACAACAG 38

- (1) údaje k SEQ ID NO:29:
  - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 44 bází
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
  - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:29:

CCCGGTACCG AATCATCCTA GAAACAAGGG TGTTTTTAAT TAAT 44

- (1) údaje k SEQ ID NO:30:
  - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 47 bází
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
  - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:30:

GGGGAATTCG GTACCCCGG GAAGGCAATA ATTGTACTAC TCATGGT 47

- (1) údaje k SEQ ID NO:31:
  - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 36 bází
    - (B) TYP: nukleová kyselina
    - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
    - (D) TOPOLOGIE: lineární
  - (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:31:

GGTACCCCGG GGGATCGAAT CTGCACTGGG ATAACA 36

- (1) údaje k SEQ ID NO:32:
  - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
    - (A) DÉLKA: 50 bází
    - (B) TYP: nukleová kyselina

107

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:32:

GGGGAATTTCG GATCCGGTAC CTCACAGACA GATGGARCAA GAAACATTGT

50

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Rekombinantní chřipkový HA0 hemaglutininový protein exprimovaný v bakulovirovém expresním systému v kultivovaných hmyzích buňkách.

2. Rekombinantní chřipkový HA0 hemaglutininový protein podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje bakulovirový signální peptid, který se váže přímo na HA0 protein bez intervenujících aminokyselin.

3. Rekombinantní chřipkový HA0 hemaglutininový protein podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že dále obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič pro podání ve formě vakcíny.

4. Rekombinantní chřipkový HA0 hemaglutininový protein podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje adjuvans a farmaceuticky přijatelný nosič pro podání ve formě vakcíny.

5. Rekombinantní chřipkový HA0 hemaglutininový protein podle nároku 3, v y z n a č e n ý t í m , že

farmaceuticky přijatelným nosičem je polymerní dopravní systém.

6. Rekombinantní chřipkový HA0 hemagglutininový protein podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že chřipka se zvolí ze skupiny tvořené chřipkovými kmeny A a chřipkovými kmeny B.

7. Rekombinantní chřipkový HA0 hemagglutininový protein podle nároku 6, v y z n a č e n ý t í m , že chřipka infikuje lidi.

8. Rekombinantní chřipkový HA0 hemagglutininový protein podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m , že dále obsahuje druhý protein, který se váže na hemagglutinin.

9. Rekombinantní chřipkový HA0 hemagglutininový protein podle nároku 8, v y z n a č e n ý t í m , že se zvolí ze skupiny tvořené virovými proteiny hepatitidy B, proteiny HIV, karcinoembryonickým antigenem a neuraminidázou.

10. Vektor pro výrobu rekombinantního chřipkového HA0 hemagglutininového proteinu obsahujícího následující 5' -> 3' sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, signální peptid, kódující sekvence pro zralý hemagglutinin z chřipkového kmene,



translační terminační kodon a polyhedrinový RNA polyadenylační signál.

11. Vektor podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m , že signálním peptidem je bakulovirový protein mající molekulovou hmotnost přibližně 61K a aminokyselinovou sekvenci tvořenou prvními osmnácti aminokyselinami sekvence ID NO 7.

12. Vektor podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m , že signálním peptidem je chřipkový hemaglutininový proteinový promotor.

13. Vektor podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m , že sekvence kódující signální peptid a hemaglutinin nekódují žádnou intervenující aminokyselinu.

14. Vektor podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje sekvenci kódující druhý protein, který se exprimuje jako fúzní protein s hemaglutininem.

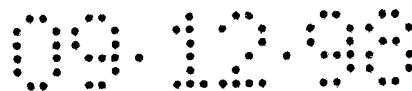
15. Vektor podle nároku 10, v y z n a č e n ý t í m , že je transfektován v kultivovaných hmyzích buňkách.

16. Způsob výroby rekombinantního chřipkového hemaglutininového proteinu, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje infekci kultivovaných hmyzích buněk vektorem obsahujícím následující 5' -> 3' sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, signální peptid, kódující sekvence pro zralý hemaglutinin z chřipkového kmene, translační terminační kodon a polyhedrinový RNA polyadenylační signál, a kultivaci buněk v živném prostředí.

17. Způsob podle nároku 16, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje izolaci HAO chřipkového hemaglutininového proteinu z buněk v čistotě alespoň 95%.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č e n ý t í m , že protein se izoluje separací hemaglutininu z nemembránových proteinů při alkalickém pH, promytím proteinů navázaných na membránu, při kterém se eluuje hemaglutinin, separování hemaglutininu od dalších proteinů navázáním na aniontoměničovou pryskyřici změnou pH, a separováním hemaglutininu od ostatních proteinů navázáním na kationtoměničovou pryskyřici změnou koncentrace soli.

19. Způsob výroby vektoru obsahujícího následující 5' -> 3' sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, signální peptid, kódující sekvence pro zralý hemaglutinin z chřipkového kmene, translační terminační kodon a polyhedrinový RNA polyadenylační signál, v y z n a č e n ý t í m , že



zahrnuje sklizeň viru z buněčného média a izolaci virové RNA, v případě chřipkových kmenů A, nebo mRNA, v případě chřipkových kmenů B; syntetizaci cDNA za použití univerzálního primeru (5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID NO. 1)) pro virovou RNA z chřipkových kmenů A nebo nahodilých primerů pro mRNA z chřipkových kmenů B, přičemž primery 5' a 3' mají na koncích, které se nenalézají uvnitř hemaglutininových genů, restriční enzymová místa; amplifikaci chřipkových A a B primerů a chřipkové cDNA smísené se segmenty hemaglutininového genu za vzniku dvouřetězcových DNA fragmentů obsahujících celé sekvence kódující zralý hemaglutinin; identifikaci signálního peptidu hemaglutininových genů, potom amplifikaci hemaglutininových genů bez signálního peptidu; a klonování hemaglutininových genů bez signálního peptidu do vektoru obsahujícího AcNPV polyhedrinový promotor.

20. Způsob podle nároku 19, v y z n a č e n ý t í m , že se hemaglutininové geny klonují do vektoru za použití PCR tak, že vektor kóduje signální peptid navázaný přímo na hemaglutinin bez intervenujících aminokyselin.

21. Způsob podle nároku 19, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje transfekci vektoru do hmyzích buněk a výběr buněk pro hemaglutininovou expresi.

22. Způsob vakcinace živočichů proti chřipce, v y z n a č e n ý t í m , že zahrnuje podání účinného množství rekombinantního chřipkového HA0 hemaglutininového

proteinu, exprimovaného v bakulovirovém expresním systému v kultivovaných hmyzích buňkách, živočichovi.

23. Způsob podle nároku 22, v y z n a č e n ý t í m , že dále zahrnuje podání proteinu v polymerním dopravním systému.

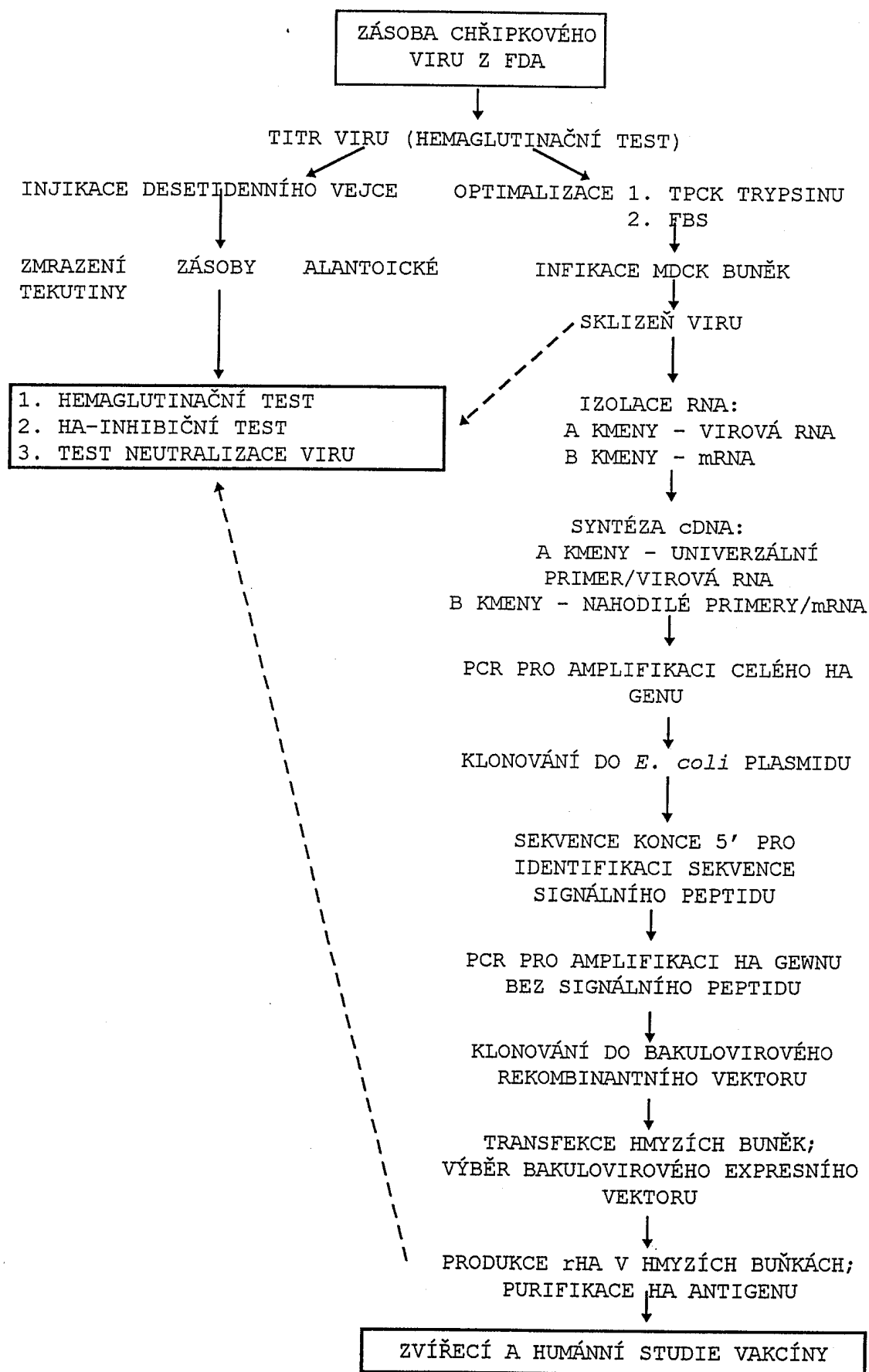
24. Způsob podle nároku 22, v y z n a č e n ý t í m , že se chřipka zvolí ze skupiny tvořené chřipkovými kmeny A a chřipkovými kmeny B.

25. Způsob podle nároku 22, v y z n a č e n ý t í m , že se živočich zvolí ze skupiny tvořené savčími a ptačími druhy.

26. Způsob podle nároku 22, v y z n a č e n ý t í m , že živočichem je člověk.

Zastupuje:

OBR. 1



PV 3738-99  
09.10.99

OBR. 2

Influenza A/Texas/36/91.

Virová RNA  
A/Texas/36/91

Univerzální primer  
5'-AGCAAAGCAGG-3'

M-MuLV reverzní transkriptáza

Chřipkové cDNAs

PCR primery

5' konec HA genu:  
5'-GGG GGT ACC CCC GGG AGC  
AAA AGC AGG GGA AAA TAA  
AAA-3'

PCR

3' konec HA genu:  
3' GA AAC GTC ACG TCT TAT  
ACG/T TAG/T ACT CCA TGG  
CCC-5'

Celodélkový HA gen

Sekvence 5' konce genu.  
Návrh nového 5' PCR primeru.

5' konec bez signální  
sekvence :

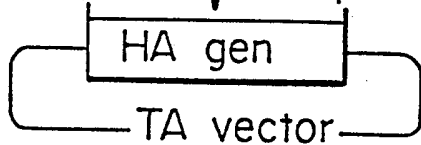
5'-GGG GGT ACC CCC GGG GAC  
ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT-3'

PCR

3' konec HA genu:  
3' GA AAC GTC ACG TCT TAT  
ACG/T TAG/T ACT CCA TGG  
CCC-5'

HA gen bez signální  
peptidové sekvence

KpnI KpnI



polyhedrinový  
promotor

61K signální peptid

KpnI



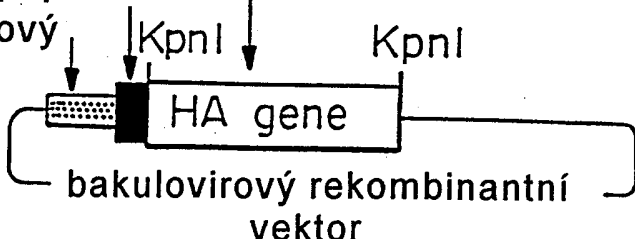
MGS 12

61K signální  
peptid

polyhedrinový  
promotor

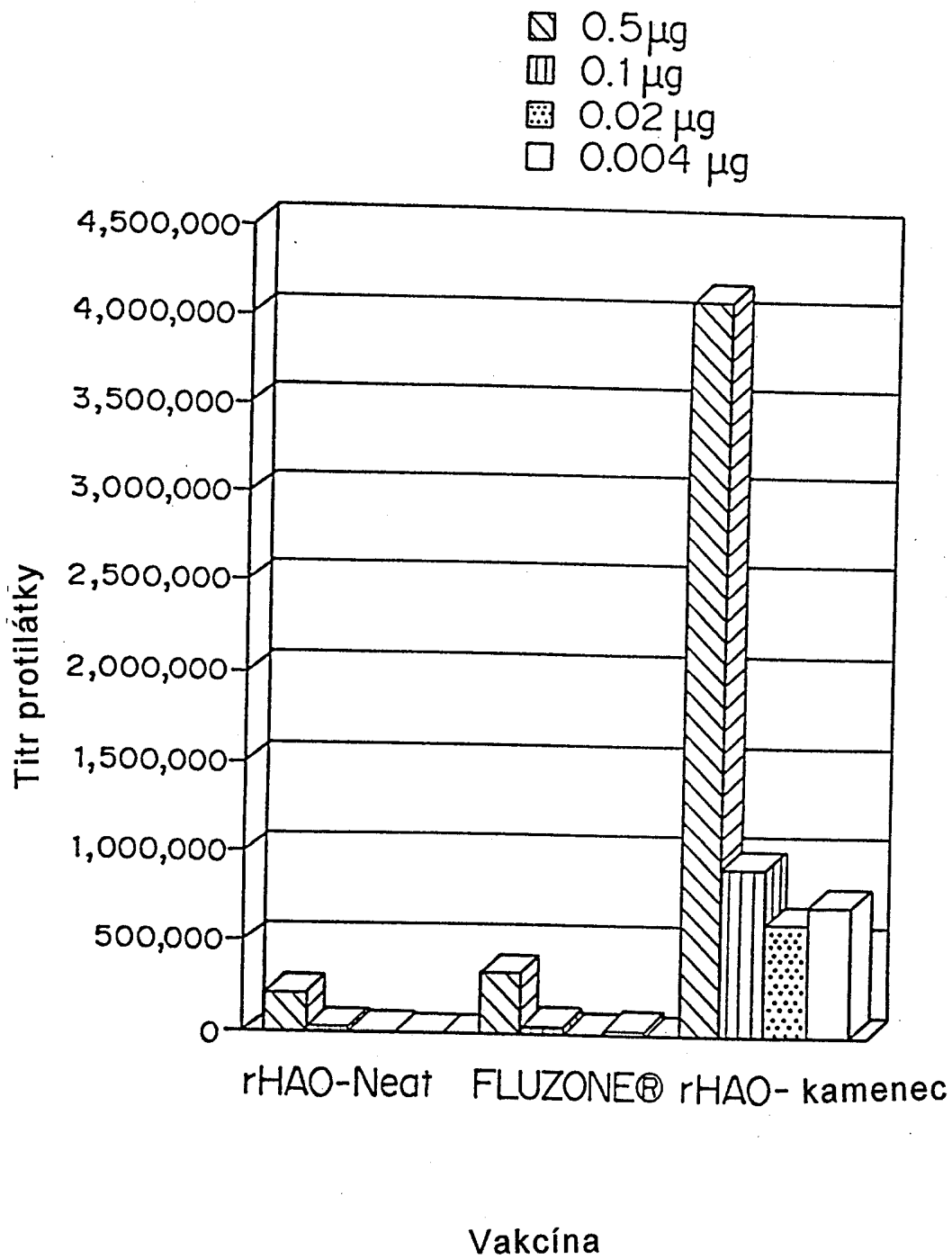
KpnI

KpnI

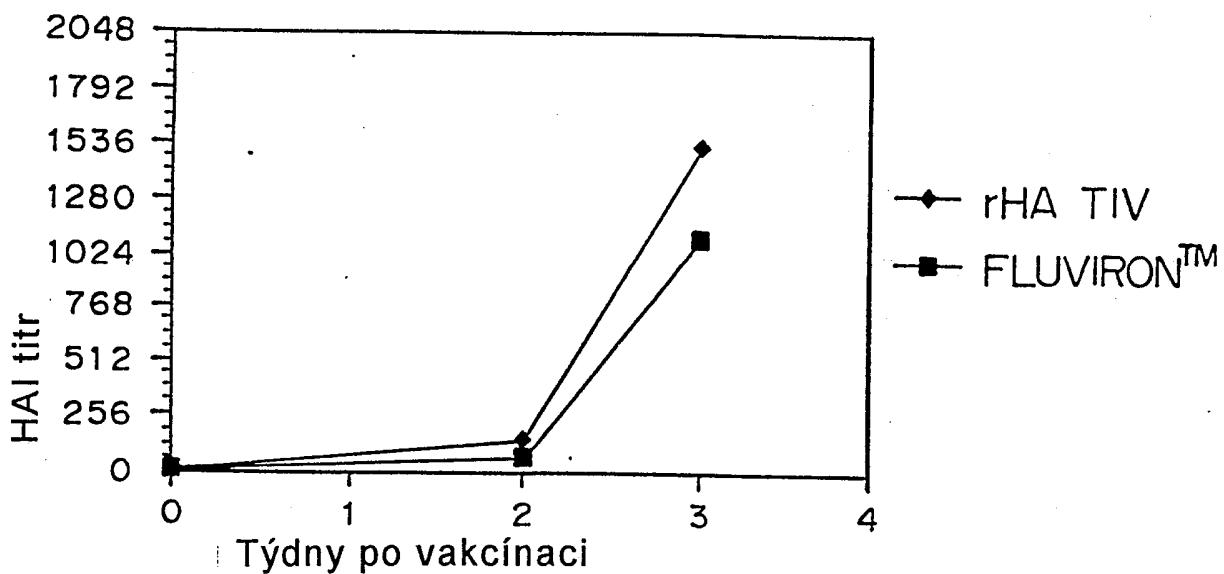


bakulovirový rekombinantní  
vektor

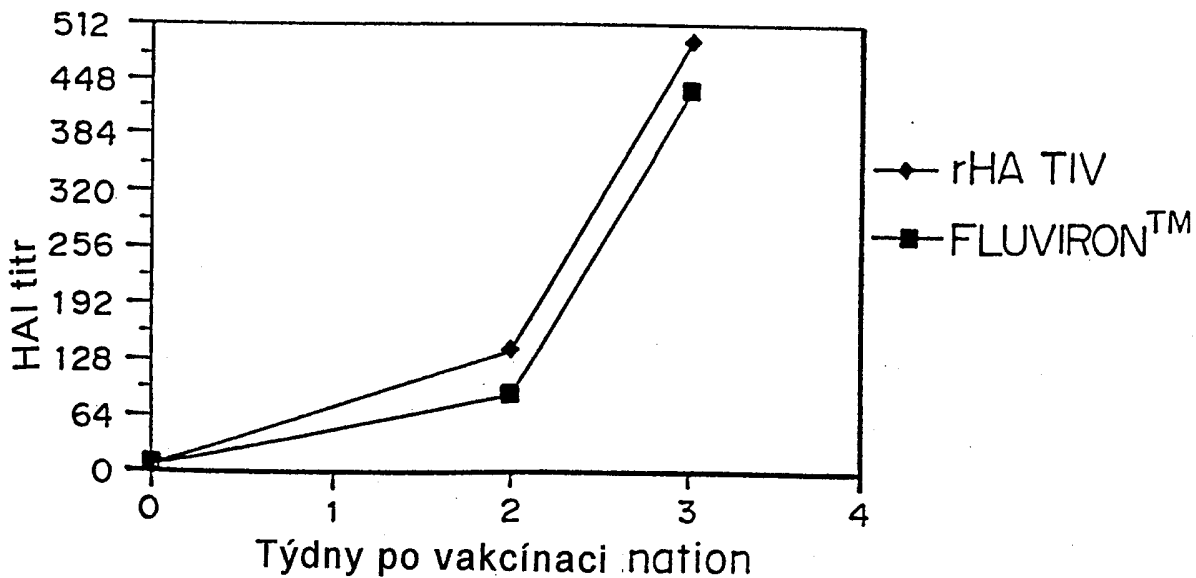
OBR. 3



OBR: 4a



OBR: 4b



OBR. 4c

