

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.07.2003**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2005**
(Věstník č. 2/2005)

(21) Číslo dokumentu:

2003-1859

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
C 12 N 15/62
C 07 K 14/025
A 61 K 39/12

(71) Přihlašovatel:

ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE ROSTLIN AV
ČR, České Budějovice, CZ
ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVNÍ TRANSFUZE,
Praha, CZ

(72) Původce:

Vlasák Josef RNDr. CSc., Hluboká nad Vltavou, CZ
Pavingerová Daniela Mgr. CSc., České Budějovice, CZ
Bříza Jindřich Doc. RNDr. CSc., České Budějovice, CZ
Šmahel Michal RNDr. PhD., Říčany, CZ
Ludvíková Viera RNDr., Praha, CZ
Pokorná Dana MUDr. Mgr., Praha, CZ
Šubrtová Jana Mgr., Praha, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Fúzní protein pro vakcinaci proti lidskému
papillomaviru a způsob jeho produkce**

(57) Anotace:

Fúzní protein, získaný spojením sekvencí aminokyselin proteinu E7 lidského papillomaviru s β -glukuronidázou z Escherichia coli, je velmi stabilní v lidských, rostlinných i bakteriálních buňkách a je více imunogenní, než protein E7. Jeho exprese ochrání myši proti nádorově transformovaným buňkám. Může být použit jako účinná složka vakcín proti premaligním nebo maligním onemocněním vyvolaným lidskými papillomaviry. Součástí řešení je také konstrukce genů a expresních vektorů pro přípravu fúzního proteinu a způsoby jeho produkce, zejména metoda produkce v transgenních rostlinách.

CZ 2003 - 1859 A3

Fúzní protein pro vakcinaci proti lidskému papillomaviru a způsob jeho produkce.

4318

Oblast techniky

Vynález se týká fúzního proteinu, vzniklého spojením sekvencí aminokyselin proteinu E7 lidského papillomaviru s β -glukuronidázou z *Escherichia coli*, konstrukce genů a expresních vektorů pro jeho přípravu a metod pro jeho produkci a použití jako vakcíny k účinné imunizaci proti premaligním nebo maligním onemocněním vyvolaným lidskými papillomaviry.

Dosavadní stav techniky

Anogenitální léze způsobené lidskými papillomaviry (HPV) jsou celosvětově nejrozšířenější pohlavně přenášenou chorobou. Některé typy HPV se podílejí na vzniku karcinomu děložního čípku, který představuje významné zdravotní riziko ve vyspělých státech a v rozvojových zemích je dokonce nejčastější příčinou smrti na rakovinu u žen. Vakcinace inaktivovanými viry není možná, protože není znám způsob účinné kultivace viru. Proto je velké výzkumné úsilí zaměřeno na tzv. subjednotkové vakcíny, připravené pomocí technologie rekombinantní DNA.

Příčinou maligní transformace buněk infikovaných HPV jsou virové nestrukturální proteiny E6 a E7, které specificky inaktivují proteiny řídící buněčný cyklus, zejm. proteiny p53 a pRb. Také růst nádorů je závislý na stálé produkci těchto proteinů. Většina strategií terapeutické vakcinace je proto založena na stimulaci cytotoxické imunitní odpovědi proti buňkám produkujícím proteiny E6 a E7. Bylo prokázáno, že expresí izolovaných a upravených genů HPV E6 a E7 ve vhodných systémech je možno vyvolat specifickou imunitu (M. Da Silva *et al.*, J.Cell Physiol. 186, 169-182, 2001).

Vakcinace proteiny E6 a E7, připravenými různým způsobem, ale není příliš účinná pro jejich nízkou imunogenitu a malou stabilitu ve většině buněk. Proto bylo za účelem vakcinace připraveno několik typů fúzních proteinů, obsahujících sekvence E6 a E7 a případně sekvence dalších proteinů, které by měly zvýšit stabilitu a imunogenitu. Např. v patentové přihlášce US 6,342,224 je navržena fúze proteinů E6 s E7 a s částí proteinu D z *Haemophilus influenza B*. V přihlášce EP 1 243 655 je navrhována fúze N-koncových částí proteinů E6 s E7 a s plášťovým proteinem viru hepatitidy B, nebo s několika jinými proteiny. Žádná fúze se ale neosvědčila natolik, aby na jejím základě vznikla široce použitelná vakcína.

Podstata vynálezu

Náš vynález se týká fúzního proteinu, produkovaného z rekombinantní DNA, která byla získána fúzí genu HPV E7 s genem pro bakteriální β -glukuronidázu (GUS). Expres fúzního genu v různých systémech je snadno a přesně měřitelná a vede ke vzniku stabilního, silně imunogenního proteinu. Předmětem patentu je i tato rekombinantní DNA, jejíž příprava se dá provést obvyklými technikami molekulární biologie, popsány např. v knize Sambrook, K. et al., *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1989, a spočívá v těchto krocích:

a) Celý gen E7, resp. jeho přední část obsahující prvních alespoň 41 kodonů, se vyštěpí z jednoho z obecně dostupných klonů těsně před iniciačním kodonem ATG a těsně před jeho stop kodonem, resp. za 41. nebo některým dalším kodonem, nebo se tyto fragmenty získají polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) pomocí vhodných primerů. Fúze jakéhokoli fragmentu genu E7 delšího než 40 kodonů od N- konce s GUS genem je předmětem tohoto vynálezu. Jako zdroj E7 sekvencí je možno s výhodou použít plasmid pBSC/E7GGG, kde jsou v genu E7 z HPV16 tři bodové mutace, které mění sekvenci vazebného místa pro pRb a tím snižují onkogenní vlastnosti proteinu E7. Gen E7GGG se proto vyznačuje minimálním rizikem při manipulacích a použití (Šmahel, M. *et al.*, *Virology* 281, 231-238, 2001). Je ovšem možno použít i jakoukoli jinou vhodnou mutantu E7 nebo gen E7 z jiného typu HPV.

b) Isolovaný fragment se pomocí vhodného linkeru spojí s genem pro GUS z *Escherichia coli*, který je obecně dostupný v mnoha klonovacích vektorech. Spojení se provede tak, aby čtecí rámec genu E7 resp. jeho části navazoval přes několik kodonů linkeru na čtecí rámec genu GUS, výhodně, ale ne výhradně na N-konci GUS.

c) Fúzní gen se integruje do vektoru s transkripčními signály pro silnou expresi v daném typu buněk. S výhodou se dají použít v rostlinných buňkách vektory s promotorem a terminátorem transkripce z viru mosaiky kvěťáku, v savčích buňkách vektory s promotorem z lidského cytomegaloviru (hCMV) a terminátorem transkripce z králíčího genu pro β -globin, a v bakteriích *E. coli* expresní plasmid pQE30 (QIAGEN) s 6x His spojkou pro snazší izolaci fúzního proteinu. Všechny tyto struktury jsou komerčně dostupné.

Fúzní proteiny připravené expresí fúzního genu E7/GUS v těchto systémech mají řadu předností proti dosud zkoušeným preparátům. Exprimované fúzní proteiny se snadno a přesně stanoví na základě zachované enzymatické aktivity GUS. Jsou značně stabilní v živočišných, rostlinných i bakteriálních buňkách (na rozdíl od nemodifikovaného proteinu E7) a jsou silně imunogenní. Imunizací myši DNA vakcínou odvozenou z patentovaného fúzního genu bylo dosaženo podstatně vyšší resistance proti aplikovaným nádorově transformovaným buňkám

produkujícím antigen E7, nežli preparáty s jinými E7 konstrukty. Positivní výsledky přineslo i stanovení indukované buněčné imunity u myší po subkutánní aplikaci extraktů z transformovaných rostlin, produkujících fúzní protein.

Předmětem patentu jsou i vakciny, stimulující imunitní odpověď proti lidskému papillomaviru, které obsahují fúzní proteiny E7/GUS podle vynálezu. Pro použití ve vakcíně mohou být fúzní proteiny izolovány a vyčištěny zavedenými metodami z produkčních buněk, nebo mohou být použity celé produkční buňky nebo orgány k orální vakcinaci.

Přípravek rekombinantní DNA, kódující fúzní protein podle vynálezu, je také předmětem patentu. Je vhodný na přímou vakcinaci jako DNA vakcína, pro transformaci bakterií produkujících následně velká množství imunogenního proteinu použitelného k vakcinaci nebo pro transformaci rostlin produkujících následně orálně aplikovatelnou rostlinnou vakcínu.

Seznam obrázků

Obr. 1: Sekvence genu E7GGG s odpovídajícími aminokyselinami pod sekvencí a s vyznačenými úpravami: podtržená jsou místa pro restrikční endonukleázu PvuII, dvojité podtržené místa pro BamHI, tučně jsou iniciační kodon ATG, stop kodon TAA a změněné base a aminokyseliny u mutanty E7GGG. V rámečku jsou sekvence PCR primerů E7-1 a E7-2 (poslední je zapsán obráceně, 3'-5'), použitých k amplifikaci celého genu.

Obr. 2: Schema některých konstruktů s vyznačením důležitých genů, promotorů a terminátorů transkripce. Další značky: GUS: ORF β -glukuronidázy, p35S a !: promotor 35S a terminátor transkripce z viru mosaiky kvěťáku, ORF Ip.: část ORF I z viru mosaiky kvěťáku, amp: gen pro resistenci k ampicilinu, ori: počátek replikace z plasmidu pUC19, B-E-K-Sm: místa pro restrikční endonukleázy BamHI, EcoRI, KpnI, SmaI.

Znázorněny jsou také nejdůležitější části sekvencí zobrazených fúzních genů. V nich jsou tučně iniciační a stop kodony, kursivou sekvence z E7, malými písmeny linkery, dvojité podtržené v restrikčních místech.

Obr. 3: Exprese různých fúzních proteinů E7GGG/GUS pod p35S promotorem, po transfekci do protoplastů bramboru, stanovená jako aktivita GUS. Hodnota 100% srovnávacího vzorku MonoGUS představuje asi 0,2% β -glukuronidázy ze všech proteinů.

Obr. 4: Detekce fúzních proteinů E7GGG/GUS na western blotu proteinů z protoplastů bramboru po transfekci fúzními geny. Detekce provedena pomocí polyklonální protilátky proti E7. Vzorky představují fúzní proteiny Ip./E7GGG/GUS (1150), E7GGG/GUS (1155)

Ip./E7GGG/E7GGG/E7GGG/GUS (1153), a E7GGG/E7GGG/GUS (1160). Symboly M1, M2, M3 jsou označeny různé klony daných konstruktů.

Obr. 5 a 6: Detekce fúzních proteinů E7/GUS na western blotu proteinů extrahovaných z transformovaných rostlin bramboru a rajčete.

Obr. 7: DNA vakcinace proti nádorovým buňkám TC-1 produkujícím onkoprotein HPV16 E7. Myši byly dvakrát imunizovány pomocí genové pistole plazmidy navázanými na zlaté částice. Po druhé imunizační dávce byly zvířatům podkožně inokulovány buňky TC-1 a byl sledován růst nádorů.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Restrikční endonukleázou PvuII byl z plasmidu pBSC/E7GGG (Šmahel, M. *et al.*, Virology 281, 231-238, 2001) vyštěpen fragment dlouhý 132 bp začínající 7 b před iniciačním kodonem ATG genu E7GGG a končící za jeho 41. kodonem (Obr. 1). Tento fragment byl naklonován do SmaI místa mezi EcoRI a BamHI rostlinné expresní kazety MonoGUS (Bonneville, J.M. *et al.*, Cell 59, 1135-1143, 1989), která nese fúzi 15 kodonů ORF I viru mosaiky kvěťáku, linker EcoRI-SmaI-BamHI-SmaI a gen GUS, mezi promotorem p35 a terminátorem transkripce z viru mosaiky kvěťáku (Obr. 2A). Tím byla získána fúze 15 kodonů ORF I, 5 kodonů linkeru, 41 kodonů z N-konce E7GGG, 9 kodonů linkeru a 603 kodonů genu GUS v expresní struktuře označované 1140 (= p35S-Ip./E7GGGp./GUS-!, Obr. 2C), která se v rostlinných protoplastech po transformaci pomocí polyetylenglykolu (PEG) silně exprimuje na velmi stabilní produkt, jak potvrzuje stanovení aktivity GUS (Obr. 3). Fúze s kodony ORF I na N-konci zajišťuje vyšší translaci v rostlinách, ale na imunogenní vlastnosti fúzního proteinu nemá zřetelný vliv.

Příklad 2

Postup podle příkladu 1 byl opakován s použitím rostlinné expresní kazety pCB1123, která se liší od kazety MonoGUS delecí ORF I a linkerem KpnI-SmaI-BamHI-SmaI před genem GUS (Obr. 2B). Klonování do SmaI místa mezi KpnI a BamHI poskytlo fúzi 41 kodonů E7GGG, 9 kodonů linkeru a 603 kodonů GUS (Obr. 2D), resp. fúzi tří repetit 41 kodonů E7GGG oddělených 3 kodony linkeru a GUS s 5 dalšími kodony linkeru před GUS ORF. Vzniklé expresní struktury, označované 1133 (= p35S-E7GGGp./GUS!) resp. 1135 (= p35S-E7GGGp./E7GGGp./E7GGGp./GUS!) se v rostlinných protoplastech po transformaci PEG exprimovaly do množství 0,08% resp. 0,06% všech proteinů (Obr. 3).

Příklad 3

Pomocí nasyntetizovaných primerů E7-1 (CCA GGA TCC ATC **ATG** CAT GGA GAT ACA CC) a E7-2 (CAG CCA **TGG TGG** ATC CTG GTT TCT GAG AAC AG) byl polymerázovou řetězovou reakcí amplifikován gen E7GGG (Obr. 1) z plasmidu pBSC/E7GGG tak, že po štěpení produktu restriční endonukleázou BamHI v zabudovaných místech BamHI (vyznačeno dvojitým podtržením) vznikl fragment začínající 3 kodony před kodonem ATG genu E7GGG (vyznačen tučně) a končící bezprostředně za posledním, 98. kodonem (vyznačen tučně). Fragment byl naklonován jako v příkladech 1 a 2 do expresních kazet MonoGUS a pCB1123 do jejich unikátního místa BamHI v linkeru. Bylo získáno několik fúzí celého genu E7GGG s GUS, konkrétně rostlinné expresní struktury 1150 (= p35S-I/E7GGG/GUS!), 1153 (= p35S-I/E7GGG/E7GGG/E7/GUS!), 1155 (= p35S-E7GGG/GUS!) a 1160 (= E7GGG/E7GGG/GUS!). Všechny struktury se po transformaci PEG exprimovaly v rostlinných protoplastech na velmi stabilní produkt, jak potvrzuje stanovení aktivity GUS (Obr. 3) i imunochemická reakce protilátek proti E7 (Obr. 4).

Příklad 4

Expresní struktury 1133, 1135, 1155 a 1160, obsahující CaMV p35S promotor, příslušný fúzní gen a CaMV terminátor transkripce, byly jako EcoRI fragment integrovány do unikátního místa EcoRI rostlinného binárního vektoru pCB1399 (Vlasák a Ondřej, Fol. Microbiol. 37, 227, 1991). Po převedení vektoru do pomocného kmene *Agrobacterium tumefaciens* 4404 a transformaci bramboru a rajčete byly získány transformované rostliny, v jejichž tkáních tvoří fúzní proteiny E7GGG/GUS 0,01-1% všech proteinů (Obr. 5, 6). Subkutánní aplikace částí rostlin myším vedla k imunizaci proti HPV. Orální imunizace myší jedlými částmi transformovaných rostlin se zkouší.

Příklad 5

Fúzní gen ze struktur 1140, 1150 a 1153 byl jako EcoRI fragment překlonován do savčího expresního vektoru pBSC (Šmahel et. al., 2001) mezi promotor lidského cytomegaloviru a terminátor transkripce genu králíčího β -globinu. Vzniklé rekombinantní DNA byly použity jako DNA vakcíny k vyvolání protinádorové imunitní odpovědi u myší. Po navázání 1 μ g DNA na zlaté částice o velikosti 1 μ m byla provedena aplikace DNA vakcín genovou pistolí do kůže na břicho myší. Byla zjištěna 100% ochrana myší proti nádorově transformovaným buňkám TC-1 produkujícím onkoprotein E7. Dosažená účinnost imunizace byla vyšší než po použití vektoru pBSC/E7GGG (Obr. 7).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Fúzní protein pro vakcinaci proti lidskému papillomaviru obsahující prvních alespoň 41 aminokyselin proteinu HPV E7, spojených funkčně s β -glukuronidázou (GUS) z bakterie Escherichia coli.
2. Fúzní protein podle nároku 1, který dále obsahuje jednu nebo více aminokyselinových spojek před nebo mezi zmíněnými aminokyselinovými sekvencemi.
3. Fúzní protein podle nároku 2, kde zmíněné spojky obsahují 1-10 aminokyselin.
4. Fúzní protein podle nároků 1 a 2, ve kterém je protein E7 z HPV16 nebo HPV18.
5. Fúzní protein podle jakéhokoliv z nároků 1 až 4, kde protein E7 je mutován pro snížení vazby pRb proteinu a tím tumorogenity.
6. DNA sekvence kódující fúzní proteiny podle jakéhokoliv z nároků 1-5.
7. Expresní vektor s vhodnými replikačními a markerovými strukturami, obsahující DNA sekvenci podle nároku 6 funkčně napojenou na expresní signály, které zajistí produkci fúzního proteinu po transformaci nebo transfekci buněk vhodného typu tímto vektorem.
8. Expresní vektor podle nároku 7, který zajistí vysokou expresi fúzního proteinu v živočišných buňkách a je použitelný jako tzv. DNA vakcína.
9. Expresní vektor podle nároku 7, který zajistí vysokou expresi fúzního proteinu v baktériích.
10. Vakcína proti papillomaviru, vyznačující se tím, že obsahuje jako imunologicky účinnou složku fúzní protein podle nároku 1.
11. Expresní vektor podle nároku 7, který po následné transformaci rostlin umožňuje vypěstovat transgenní rostliny produkující fúzní protein podle nároku 1.
12. Transgenní rostliny připravené transformací vektorem podle nároku 11. a jejich části, které produkují fúzní protein podle nároku 1.
13. Vakcína proti papillomaviru, vyznačující se tím, že obsahuje jako imunologicky účinnou složku extrakt z transformovaných rostlin podle nároku 12.
14. Vakcína proti papillomaviru, vyznačující se tím, že účinná složka je podávána přímo ve formě transformovaných rostlin podle nároku 12 nebo jejich částí.

03.07.03

PV 2003-1859

47315

Obr. 1

E7-1: ccaggatccatc
cacgtagagaaacccagctgtaatc

atg cat gga gat aca cc-OH

ATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG CAT GAA TAT ATG TTA GAT TTG
M H G D T P T L H E Y M L D L

CAA CCA GAG ACA ACT GGT CTC TAC GGT TAT GGG CAA TTA AAT GAC
Q P E T T G L Y G Y G Q L N D

AGC TCA GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT CCA GCT GGA CAA GCA
S S E E E D E I D G P A G Q A

GAA CCG GAC AGA GCC CAT TAC AAT ATT GTA ACC TTT TGT TGC AAG
E P D R A H Y N I V T F C C K

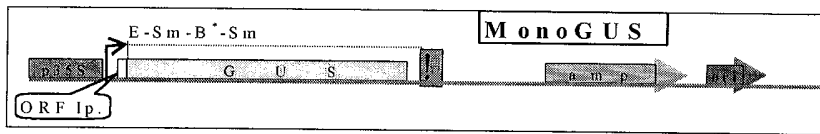
TGT GAC TCT ACG CTT CGG TTG TGC GTA CAA AGC ACA CAC GTA GAC
C D S T L R L C V Q S T H V D

ATT CGT ACT TTG GAA GAC CTG TTA ATG GGC ACA CTA GGA ATT GTG
I R T L E D L L M G T L G I V

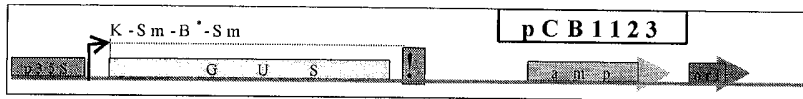
OH-g aca aga gtc.ttt.ggt. cc taggttggtaccgac : E7-2
TGC CCC ATC TGT TCT CAG AAA CCA **taat**ctaccatggctg
C P I C S Q K P *

Obr. 2

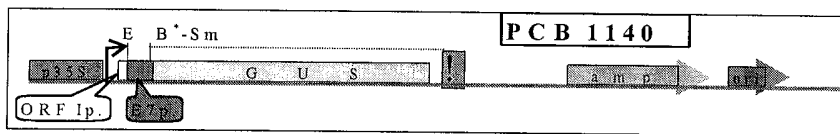
A



B



C



CaMV ORFI, 15 kodonů

Sekvence fúzniho genu: gag**ATG** GAT GAT TTG TAT CCA GAA GAA AAT ACC CAA

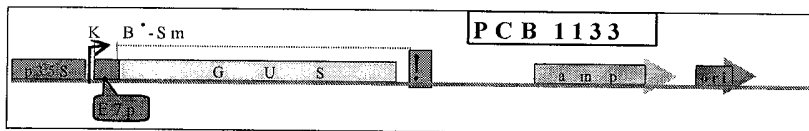
E7, 41 kodonů

AGC GAG CAA TCG CAG aat tcc cct gta atc **ATG** CAT...CCA ggg gga tcc ccg ggt

GUS, 603 kodonů

ggt cag tcc ctt **ATG** TTA - ...-TGA.

D



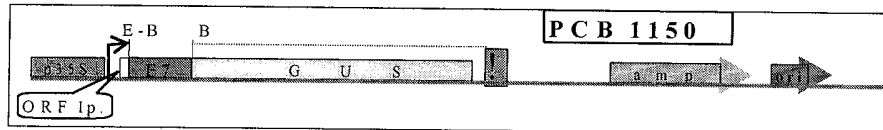
E7, 41 kodonů

Sekvence fúzniho genu: cccctgtaatc**ATG** CAT...CCA ggg gga tcc ccg ggt

GUS, 603 kodonů

ggt cag tcc ctt **ATG** TTA - ...-TGA.

E



CaMV ORFI, 15 kodonů

Sekvence fúzniho genu: gag**ATG** GAT GAT TTG TAT CCA GAA GAA AAT ACC CAA

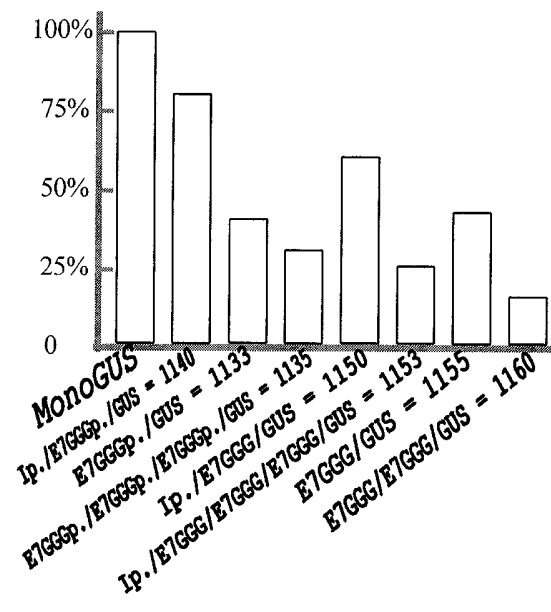
E7, 98 kodonů

AGC GAG CAA TCG CAG aat tcc cgg gga tcc atc **ATG** CAT...CCA gga tcc ccg ggt

GUS, 603 kodonů

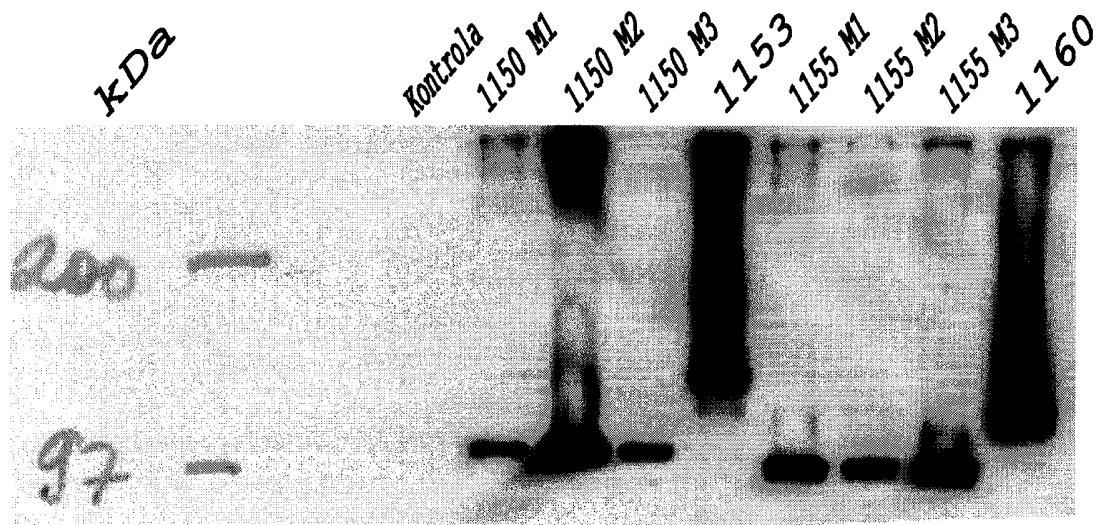
ggt cag tcc ctt **ATG** TTA - ... TGA

Obr. 3



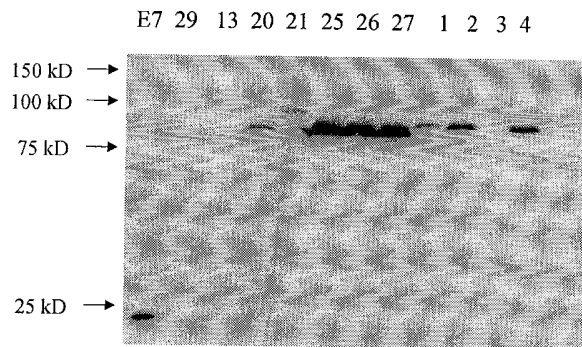
03.07.03

Obr. 4



Obr. 5

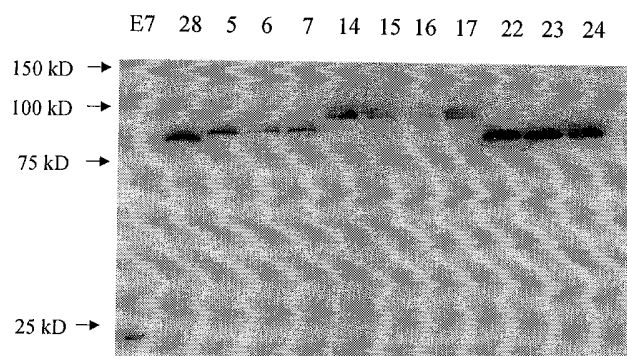
E7GGG/GUS v transgenních rajčatech a bramborách



Vzorky: 29 – kontrola, 13 – E7/GUS rajče, 20 a 21 E7/E7/GUS rajče, 25 až 27 – E7p./GUS rajče, 1 až 4 E7/GUS brambor

Obr. 6

E7GGG/GUS v transgenních bramborách



Vzorky: 28 – kontrola, 5 až 7 – E7/GUS, 14 až 17 – E7/E7/GUS, 22 až 24 – E7p./GUS

Obr. 7

