

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 22889 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **200800259**

(51) Int. Cl. (2009)

(22) Datum prijave: **28.10.2008**

C07K 14/195 C12N 15/09
A61K 39/02

(45) Datum objave: **30.04.2010**

(72) Izumitelji: **JERALA Roman, 1000 Ljubljana, SI;**
PIRHER Nina, 9242 Križevci, SI;
IVIČAK Karolina, 2211 Pesnica pri Mariboru, SI;
CIGLIČ Monika, 4208 Šenčur, SI;
BENČINA Mojca, 1000 Ljubljana, SI;
HORVAT Simon, 4000 Kranj, SI;
ČEH Eva, 1000 Ljubljana, SI;
KOČAR Vid, 2229 Malecnik, SI;
KOLAR Katja, 1111 Ljubljana, SI;
LOZNARIČ Jan, 2000 Maribor, SI;
LASIČ Ana, 1356 Dobrova, SI;
MORI Jerneja, 2390 Ravne na Koroškem, SI;
SMOLE Anže, 1000 Ljubljana, SI

(73) Imetnik: **Kemijski inštitut,**
Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, SI

(74) Zastopnik: **ITEM d.o.o., Zastopniška pisarna za patente in blagovne znamke, Resljeva 16, 1000 Ljubljana, SI**

(54) HIMERNI FLAGELINI ZA CEPIVA

(57) Izum predstavlja fuzijski protein, ki vsebuje himerni flagelin sestavljen iz dveh različnih tipov flagelina, ki se razlikujeta v jakosti aktivacije receptorja TLR5; cepivo, ki vsebuje fuzijski protein ali DNA z zapisom za fuzijski protein in je cepivo namenjeno za zdravljenje in preprečevanje infekcije s patogenimi bakterijami, ki vsebujejo flagelin, ki ne aktivira receptorja TLR5. Nova cepiva vključujejo fuzijski protein, ki vsebuje flagelin bakterij, ki stimulirajo aktivacijo receptorja TLR5. Segment flagelina *Helicobacter pylori* se pri tem zamenja s segmentom

flagelina bakterij, ki sprožijo stimulacijo TLR5, dodajo pa se proteinski segmenti, proti katerim želimo spodbuditi imunski odziv ter opcijsko doda signalna sekvenca, ki omogoča željeno lokalizacijo proteina. Izum se nanaša tudi na metodo uporabe vakcine za imunizacije v več stopnjah, ki obsega imunizacijo z različnimi fuzijskimi proteini, ki se razlikujejo v delu flagelina, ki stimulira receptor TLR5 in s tem preprečimo nevtralizacijo aktivnosti fuzijskega proteina.

Himerni flagelini za cepiva

Področje izuma

Področje izuma je fuzijski protein, DNA z zapisom za fuzijski protein, vakcina, ki vsebuje poleg zapisa za antigen tudi zapis za proteine, ki aktivirajo naravni imunski odziv in posledično pridobljeni imunski odziv. Področje izuma je priprava in uporaba vakcine namenjena za zdravljenje oziroma preprečevanje bolezni in obolenja, ki jih povzročajo patogene bakterije, katerih flagelin slabo aktivira receptor TLR5.

Stanje tehnike

Večcelični organizmi se zaščitijo pred okužbami s patogenimi mikroorganizmi iz okolja s pomočjo imunskega sistema. Pri tem sodelujejo receptorji, ki zaznavajo prisotnost molekul, ki so značilne za patogene mikroorganizme in tudi patološko spremenjene lastne celice.

Za učinkovito obrambo imunskega sistema je potrebna tako aktivacija naravnega imunskega sistema kot tudi pridobljenega imunskega odziva, ki vključujejo celični in protitelesni odziv. Aktivacija naravnega imunskega odziva je potrebna za učinkovito procesiranje antigenov in zorenje pridobljenega imunskega odziva. Pomemben sestavni del naravnega odziva so receptorji, ki prepoznajo značilne molekule patogenih mikroorganizmov – s patogeni povezane molekularne vzorce. Za učinkovit imunski odziv so pomembni predvsem Tollu-podobni receptorji (TLR). Med njimi igra pomembno vlogo TLR5, ki prepozna flagelin večine bakterij. (Hayashi et al., Nature 2001, 410, 1099-1103). V monomeru flagelina sta za prepoznavanje in aktivacijo TLR5 potrebna N-končni in C-končni segment, medtem ko sredinski, variabilni del ni pomemben za aktivacijo TLR5 (Murthy et al., 2004, J. Biol.Chem. 279, 5667-5675; Smith et al., 2003, Nature Immunol. 4, 1247-1253). Nekatere bakterije se zaščitijo pred prepoznavanjem s strani imunskega sistema s spremembo flagelina.

Med temi je bakterija *Helicobacter pylori*, katere flagelin ne aktivira signalizacije preko TLR5 (Gewirtz et al.2004, J.Infect. Dis. 189, 1914-1920; Andressen-Nissen et al., 2005 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 9247-9252). Flagelin je sicer med bolj imunogenimi proteini, proti katerim učinkovito nastajajo protitelesa, ki pripomorejo k obrambi proti bakterijski okužbi.

Protitelesni odziv proti flagelinu bakterije *Helicobacter pylori* pa omogoči le delno zaščito zaradi nezadostne aktivacije naravnega imunskega odziva (Yan et al., 2003, World J. Gastroenterol.9, 2240-2250).

Bakterija *Helicobacter pylori* preživi v želodčni kislini in kolonizira sluznico želodca ter tankega črevesa, kjer povzroča vnetje, nastanek razjed, ki lahko vodijo do rakastih sprememb. Omenjena bakterija je med pomembnimi povzročitelji raka na želodcu in tankem črevesu, čeprav okužba ne vodi vedno do rakastih sprememb. Cepivo proti *H. pylori* bi pomenilo učinkovito zdravlilo, vendar sproži bakterija šibak odziv. Tekom evolucije in prilagajanja na gostitelja je spremenila virulenčne dejavnike kot sta lipopolisaharid ali flagelin, tako, da jih imunski sistem gostitelja ne prepozna, medtem ko ga omenjene molekule drugih bakterij aktivirajo. Doslej so za cepiva proti *H. pylori* uporabljali bakterijske proteine, kot so UreB (US Pat. 5972336), HpaA, CagA (US Pat. 10487962), ki se nahajajo bodisi na površini bakterije *Helicobacter pylori* ali povzročajo kot npr. CagA poškodbe v tkivu gostitelja (Owen et al., 1994, FEMS Immunol Med Microbiol.9, 307-315). Imunizacija s samimi proteini povzroči tvorbo nezadostno tvorbo protiteles, zato v cepiva dodajajo adjuvanse, ki pa lahko povzročajo škodljive stranske učinke.

Uporablja se več tipov cepiv. (i) Cepivo lahko vsebuje izolirane podenote mikroorganizma, kot so proteini, ali pa (ii) cepivo tvorijo celi, mrtvi mikroorganizmi, ki vsebujejo izbrane antigene, proti kateremu želimo doseči imunski odziv. Slabost teh dveh oblik cepiva je možna patogenost oslABLJENE vakuine, slabo definirana in variabilna sestava ter slabša aktivacija naravne imunosti, kot v primeru, da ima mikroorganizem spremenjene molekule, ki aktivirajo naravni imunski sistem, kot je na primer lipopolisaharid ali flagelin. (iii) Tretja, v humanem zdravstvu zaenkrat še neuporabljena oblika so cepiva v obliki DNA, kjer v celice gostitelja vnesemo genski zapis za proteinske podenote mikroorganizma proti kateremu želimo zaščito. Pri vse treh načinih imunizacije je poleg podenote mikroorganizma proti kateri se sproži imunski odziv potrebno zagotoviti dodaten signal za stimulacijo naravne imunosti, kar zagotovi adjuvans. Slabost uporabe adjuvansov je, da lahko povzročijo pretiran odziv organizma na adjuvans.

Imunogeni flagelin, kot je na primer FliC bakterije *Salmonella typhymurium* so doslej že uporabljali kot adjuvans za cepiva. Uporabili so tudi fuzijski protein, kjer so v flagelin bakterije *S. typhymurium* dodali izbran proteinski antigen (Newton et al., 1991, Infect Immun. 59, 2158-2165, US Pat. 6130082). Pomanjkljivost omenjene strategije je, da ni splošno uporabna za vse

bakterijske infekcije, saj določene bakterije slabo aktivirajo imunski sistem in se s tem izognejo zaščiti in uspešno kolonizirajo gostitelja. En od takih primerov je bakterija *Helicobacter pylori*.

Po imunizaciji s cepivom, ki vsebuje flagelin pride v telesu človeka in živali do tvorbe protiteles tudi proti flagelinu. Ta telesa se lahko ob ponovni imunizaciji vežejo na antigenske determinante flagelina in tako preprečijo ponovno aktivacijo TLR5 (Saha et al., 2007, J.Immunol. 179, 1147-1154; Nempont et al., 2008, J.Immunol. 181, 2036-2043), kar je slabost omenjenega postopka imunizacije z identičnim cepivom, ki vsebuje flagelin kot adjuvans. V tem primeru je odziv na cepivo naslednjič manj učinkovit. Tudi ob infekciji z bakterijo, katere flagelin je bil uporabljen kot adjuvans nato sproži šibkejši odziv, kot bakterija, katere flagelin ni bil uporabljen za imunizacijo.

Izum predstavlja rešitev za zgoraj opisane slabosti, kot so (i) slaba aktivacija imunskega sistema proti bakterijam, ki vsebujejo flagelin, ki ne sproži aktivacije naravnega imunskega sistema in (ii) nastanek protiteles na flageline uporabljene v cepivu kot adjuvans in zmanjšanju učinkovitosti cepiva ob ponovnem cepljenju.

Povzetek izuma

Izum se nanaša na fuzijski protein iz himernega flagelina in vezanega antigenskega segmenta. Himerni flagelin je sestavljen iz (a) N- in C- končnega dela flagelina, ki aktivira receptor TLR5 in med njima lociranega (b) sredinskega segmenta flagelina, ki ne aktivira TLR5. Natančneje je himerni flagelin sestavljen iz najmanj 100 amino končnih in najmanj 100 karboksi končnih aminokislin flagelina, ki aktivira receptor TLR5, in sredinskega segmenta flagelina, ki ne aktivira TLR5.

Izum se nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje: himerni flagelin, ki ima sposobnost aktivacije receptorja TLR5 in je izbran iz skupine: beta proteobakterij ali gama proteobakterij ali spirohet ali firmucut, kot so: bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella sp.*, *Borellia burgdorferi*, *Clostridium sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*; in sredinski segment flagelina, ki ne aktivira TLR5 in je izbran iz flagelinov bakterij skupine: alfa proteobakterij ali epsilon proteobakterij, kot so: bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*.

Izum se nanaša na fuzijski protein, ki poleg himernega flagelina vsebuje dodano zaporedje za antigenski segment, za protein ali peptidni segment ali več proteinov ali proteinskih segmentov, na osnovi proteinov organizma proti kateremu želimo sprožiti imunski odziv in je to isti organizem, iz katerega smo izbrali zapis za sredinski segment flagelina, in je zaporedje za protein ali peptidni segment vključeno ali na C-končnem delu proteina ali znotraj sredinskega segmenta flagelina.

Izum se nanaša na fuzijski protein, ki je sestavljen iz N- terminalnega dela flagelina FliC *E. coli*; sredinskega segmenta flagelina FlaA *H. pylori* in C- terminalnega dela flagelina FliC *E. coli*. Natančneje se izum nanaša na fuzijski protein sestavljen iz aminokislin od 1 do 176 flagelina FliC *E. coli*; sredinskega variabilnega segmenta aminokislin od 178 do 418 flagelina FlaA *H. pylori* in aminokislin od 401 do 498 flagelina FliC *E. coli*. Opcijsko je fuzijskemu proteinu po izumu dodan antigenski segment, ki je sestavljen iz proteina ali več segmentov proteinov, ki so kodirani v genomu *Helicobacter pylori* in proti katerim želimo sprožiti imunski odziv.

Izum se nanaša na protein, ki vsebuje flagelin FlaA *H. pylori*, kjer sta amino-terminalni in karboksi- terminalni segment nadomeščena z zaporedjem flagelina bakterije, ki aktivira TLR5 in nadalje opsijsko antigenski segment, ki je sestavljen iz proteina ali več segmentov proteinov, ki so kodirani v genomu *Helicobacter pylori* in se uporablja za pripravo cepiva za zaščito in zdravljenje okužbe z bakterijo *H. pylori*.

Izum se nanaša na protein, ki opsijsko vsebuje tudi enega ali več linker peptidov, ki povezujejo posamezne segmente proteina in je vsak linker peptid neodvisno dolg od ene do več, preferenčno do 50 aminokislin, dodatno lahko protein vsebuje tudi enega ali več peptidnih označevalcev in so tako linker peptidi kot tudi označevalci v protein vključeni na način, ki ne spremeni osnovne funkcije proteina.

Izum se nanaša na protein, ki se uporablja za pripravo cepiva za stimulacijo imunskega odziva proti bakterijam, katerih flagelin ne aktivira TLR5, za preprečevanje in zdravljenje nalezljivih bolezni. Natančneje, se izum nanaša na protein za cepivo proti bakterijam iz skupine alfa in epsilon proteobakterij, kot so, vendar ne izključno: bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*, prednostno *Helicobacter pylori*.

Izum se nanaša na DNA, ki nosi zapis za fuzijske proteine opisane zgoraj. Natančneje se izum nanaša na DNA, ki vsebuje zapis za protein po izumu in zapis sestavljajo signalna sekvenca, ki

omogoča izločanje proteinov ali vezavo proteina na membrano v gostiteljskem organizmu in proteina po izumu, ki je funkcionalno povezan s signalno sekvenco. Celice gostiteljskega organizma so lahko bakterije, glive, rastline, živali ali človek. V nadaljevanju se izuma nanaša na DNA, ki poleg zapisa za signalno sekvenco, operativno povezano s proteinom po izumu, vsebuje regulatorne elemente, promotor in terminator, ki so operativno povezani s kodirajočim delom zapisa DNA in omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah.

Izum se prav tako nanaša na DNA, ki nosi zapis za fuzijski protein po izumu, ter se DNA uporablja za pripravo DNA cepiva za vnos DNA v celice človeka ali živali z namenom vzbuditi imunski odziv na fuzijski protein po izumu.

Izum se nanaša na DNA, ki vsebuje zapis za fuzijski protein po izumu, za pripravo cepiva za stimulacijo imunskega odziva proti bakterijam, katerih flagelin ne aktivira receptorja TLR5, za preprečevanje in zdravljenje nalezljivih bolezni. Natančneje, proti bakterijam iz skupine alfa in epsilon proteobakterij, kot so: bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*, prednostno *Helicobacter pylori*.

Izum se nanaša na cepivo, ki vsebuje protein po izumu ali DNA po izumu in ustrezne farmacevtsko sprejemljive dodatke.

Izum se nanaša na gostiteljski organizem, ki vsebuje fuzijski protein ali DNA po izumu in se DNA prepisuje v fuzijski protein in je gostiteljski organizem izbran iz bakterij, kvasovk ali gliv ter sesalskih celic; prednostno je gostiteljski organizem izbran med človeku in živali neškodljivimi organizmi, prednostno neškodljivimi organizmi, ki se običajno nahajajo v človeški in živalski črevesni flori.

Izum se nanaša na farmacevtsko zmes, ki vsebuje bakterije z izraženim proteinom po izumu in je protein izražen na površini mrtvih bakterij in so bakterije izbrane iz skupine bakterij, ki so običajno prisotne v subjektu.

Izum se nanaša na metodo za določanje sposobnosti variant flagelinov za aktivacijo receptorjev TLR5, ki vsebuje sledeče korake: gojenje celičnih linij, ki izražajo funkcionalen receptor TLR5; vnos DNA z zaporedjem za fuzijski protein med signalno sekvenco za izločanje flagelinov in preiskovanim flagelinom, ki je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih

celicah, v celične linije, ki izražajo receptor TLR5; analiza aktivacije receptorja TLR5 v celičnih linijah s pomočjo reporterskih plazmidov ali produkcije vnetnih posrednikov.

Izum se v nadaljevanju nanaša na metodo za določanje sposobnosti variant flagelinov za aktivacijo receptorjev TLR5, ki vsebuje sledeče korake: gojenje celičnih linij, ki izražajo funkcionalen receptor TLR5; vnos DNA z zaporedjem za fuzijski protein med signalno sekvenco za izločanje flagelinov in preiskovanim flagelinom, ki je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah, v celične linije, ki niso celične linije, ki izražajo nizke količine receptorja TLR5; skupno gojenje mešanice celičnih linij; analiza aktivacije TLR5 v celičnih linijah s pomočjo reporterskih plazmidov ali produkcije vnetnih posrednikov.

Izum se v nadaljevanju nanaša na metodo za določanje sposobnosti variant flagelinov za aktivacijo receptorjev TLR5, ki vsebuje sledeče korake: gojenje celičnih linij, ki izražajo funkcionalen receptor TLR5; dodatek supernatant celic, ki izražajo protein zapisan z zaporedjem za fuzijski protein med signalno sekvenco za izločanje flagelinov in preiskovanim flagelinom, ki je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah, celičnim linijam, ki izražajo receptor TLR5; analiza aktivacije TLR5 v celičnih linijah s pomočjo reporterskih plazmidov ali produkcije vnetnih posrednikov

Izum se nanaša na cepivo, ki vsebuje protein po izumu ali DNA po izumu in se cepiva za večkratno imunizacijo subjekta razlikujejo po aminokislinski sestavi amino-končnega in karboksi-končnega himernega flagelina, ki aktivira receptor TLR5, tako da protitelesa nastala zaradi predhodne imunizacije ne preprečijo aktivacije TLR5 ob naslednji imunizaciji s spremenjenim cepivom, sredinski segment flagelina v fuzijskem proteinu pa ostane med cepivi nespremenjen.

Opis slik

Slika 1: Shematski prikaz sestave fuzijskega proteina, ki je sestavljen iz himernega flagelinskega in antigenskega segmenta. Slika prikazuje: N, amino končni segment flagelina, ki aktivira TLR5; V, variabilen sredinski segment flagelina, ki ne aktivira TLR5; C, karboksi končni segment flagelina, ki aktivira TLR5; A, antigenski protein ali več proteinskih segmentov.

Slika 2: Detekcija fuzijskih proteinov z analizo po western prenosu. Analizirali smo sledeče protein: UreB (HPUreB-His_{tag}); HimFla-UreB (EcNfla-HpVfla-EcCfla-HPUreB-RGD-His_{tag}); HimFla-multi (EcNfla-HpVfla-EcCfla-multiepitop-RGD-His_{tag}).

Slika 3: Učinkovitost internalizacije fuzijskih proteinov v celičnih linijah CaCo-2. Slika vsebuje: [A,B] Barvilo Alexa555 (MolecularProbe) deaktivirano v Tris pufru pH 8.5; [C] Internalizacija proteina HimMulti označenega z Alexa555 (0.125 µg/µl); [D] Celice [C] dodatno barvane z LysoTrackerGreen (MolecularProbes) (50 mM); [E] Internalizacija proteina HimMulti označenega z Alexa555 (0.125 µg/µl) [F] Celice [E] dodatno barvane s SynaptoRed; [G] Internalizacija proteina *Salmonella* FliC označen z Alexa555 (0.1 µg/µl) [H]; Celice [G] dodatno barvane s transferrin633 (MolecularProbes) (0,1 mg/ml).

Slika 4: Aktivacija receptorja TLR5 s fuzijskimi proteini. Slika prikazuje aktivacijo receptorja TLR5 ob dodatku HimFla (št. 4, tabela 3) in HimFla-multi (št. 7, tabela 3) ali 100 ng FliC kot agonista.

Slika 5: Profilaktična imunizacija inducira proizvodnjo protiteles proti rekombinantnima proteinoma HimFla-UreB in HimFla-multi (proteina št 2 in 3, tabela 3). Histogrami prikazujejo poprečne OD vrednosti pri 450 nm.

Slika 6: Analiza po westernu fuzijskih proteinov v brezflagelinskih bakterijskih kulturah.

Slika 7: Prisotnost fuzijskih proteinov na površini brezflagelinskih bakterij transformiranih s konstrukti, ki nosijo zapis za fuzijski protein. Bakterije, ki vsebujejo fuzijski protein so na slik obarvane belo. Slika vsebuje: [A] HimFla (št. 4); [B] HimFla-ureB (št. 12); [C] HimFla-ureB (št. 9); [D] HimFla-multi (št. 3); [E] Negativna kontrola (samo sekundarna protitelesa).

Slika 8: Gibljivost brezflagelinskih bakterij transformiranih s fuzijskim proteinom. Slika vsebuje sledeče vzorce: 1 do 10: HimFla v pSB1.AK3 (št.4); 11 in 12: HimFla-ureB (št.12); 13 do 20: HimFla-ureB (št.9); 21 do 25: HimFla (št. 5); 26 do 30: HimFla-multi (št. 7); 35 do 38: FliC (št. 8); 39 do 42: HimFla v pSB1.AK3 (št.4).

Slika 9: Aktivacija receptorja TLR5 z brezflagelinskimi bakterijami, ki izražajo fuzijske proteina na površini bakterije. Stimulacija bakterij, ki na površini izražajo transformiran konstrukt. V *E. coli* JW1908-1 smo transformirali FliC (št. 8), T7-HF-UreB v AK3. Testne bakterije smo nanesti na celične linije HEK293, ki izražajo TLR5. Testirali smo bakterije, ki smo jih inkubirali na 70°C 20 min in bakterije, ki smo jih inkubirali na 4°C 20 minut.

Slika 10: Internalizacija brezflagelinskih bakterij, ki izražajo fuzijske proteine v celične linije Caco-2. [A] Bakterije z mCerulean; [B] LysoTracker; [C] Bakterija z mCerulean; [D] Prekrivanje slike.

Slika 11: Aktivacija receptorja TLR5 s fuzijskim proteinom, ki ga izražajo iste ali druge celice celične linije. Kontrolne celice smo stimulirali s flagelinom iz bakterije *Salmonella typhimurium* v končni koncentraciji 100 ng/ml. Aktivacijo TLR5 smo testirali za fuzijska proteina ssHimFla-UreB (št. 2) in ssHimFla-multi (št. 4).

Slika 12: Primerjava aktivacije z in brez signalne sekvence. Aktivacijo TLR5 smo testirali za fuzijska proteina HimFla-multi (št. 18) in ssHimFla-multi (št. 4)

Opis izuma

Splošen opis

Osnova izuma je odkritje, da aktivacija prirojene imunosti deluje kot aktivator adaptivne imunosti in poveča imunski odziv na antigen, ter da aktivacijo prirojene imunosti lahko dosežemo z aktivatorji receptorjev TLR, na primer TLR5. Ključno za izum je odkritje, da nekatere bakterije, kot je *Helicobacter pylori* vsebujejo flagelin, ki ne aktivira imunskega odziva, zato se subjekt slabo odziva na okužbo s to vrsto bakterij.

Izumitelji so prišli do presenetljivega odkritja. Če uporabijo fuzijski protein, ki vsebuje del flagelina, ki je sposoben aktivirati receptor TLR5 in ta flagelin vsebuje specifičen segment flagelina, ki ni sposoben aktivacije prirojene imunosti, tak fuzijski flagelin sproži nastajanje protiteles proti flagelinu bakterij, ki drugače sproži slab imunski odziv. Fuzijski protein nadomešča dodatek adjuvantov in izboljša aktivacijo adaptivne imunosti proti bakterijam, katerih flagelin ni imunogen.

V pričujočem izumu so izumitelji ugotovili, da lahko za učinkovito cepivo uporabijo flagelin bakterij, ki sicer ne aktivirajo TLR5, kot je flagelin FlaA bakterije *Helicobacter pylori*, kateremu so zamenjali N- in C-končni segment s flagelinom bakterije, ki aktivira TLR5, kot je na primer flagelin bakterije *Escherichia coli*. Na ta način so pripravili cepivo, ki aktivira naravni imunski sistem preko aktivacije TLR5, istočasno pa se lahko razvije specifični imunski odziv na sredinski del flagelina, ki sicer ne sproži aktivacije TLR5, ter na druge proteinske segmente, ki so povezani v fuzijski protein.

Izum temelji tudi na odkritju, da se zaščita subjekta pred okužbo z bakterijami, ki vsebujejo flagelin, ki ne aktivira receptorja TLR5, poveča, če se fuzijskemu proteinu med flagelinom, ki inducira receptor TLR5 in flagelinom, ki ni sposoben indukcije receptorja TLR5, doda še druge antigene, značilne za mikroorganizem, iz katerega je izbran flagelin, ki ne inducira prirojene imunosti.

Odkritje je tudi, da lahko za cepivo, ki uspešno aktivira prirojeno imunost in nastajanje protiteles, uporabimo (a) fuzijski protein, (b) mikroorganizme, prednostno bakterije, prednostno bakterije, ki namesto lastnega flagelina izražajo na celični površini flagelinski protein ali (c) DNA, ki nosi zapis za fuzijski protein, kateri je dodana signalna sekvenca, ki zagotavlja izločanje izraženega fuzijskega proteina.

Izraz »cepivo« ima v opisu izuma splošen pomen in se nanaša na katerokoli terapevtsko, imunogeno in imunostimulatorno komponento, ki vsebuje značilnosti predstavljenega izuma.

Osnova izuma je tudi odkritje, da imunizacija v določenih korakih izboljša imunski odziv na cepivo. Izumitelji so odkrili, da se imunski odziv poveča, če je cepivo druge in nadaljnjih imunizacij vsakič drugačno v smislu dela fuzijskega proteina, ki vsebuje del flagelina, ki aktivira receptor TLR5. Tako so prišli izumitelji do spoznanja, da uporaba cepiva s fuzijskim proteinom, ki vsebuje himerni flagelin, ki inducira TLR5 (npr.: dela flagelina iz *E. coli*) v drugi imunizaciji ne doseže želenega namena, ker po prvi imunizaciji nastajajo protitelesa tudi proti delu himernega flagelina, ki inducira TLR5 (npr.: dela flagelina *E. coli*). V tem primeru ni mogoče doseči želenega učinka adjuvansa. Izumitelji so odkrili, da se ta pojav lahko zaobide z uporabo cepiva v drugi vakcinaciji, ki vsebuje kot del fuzijskega proteina, himerni flagelin, ki inducira receptor TLR5, iz drugega mikroorganizma (npr.: dela flagelina *Salmonelle*) ali z mutacijami na ključnih mestih flagelina, da ga protitelesa ne prepoznajo. Zamenjava dela fuzijskega proteina, himernega flagelina, ki inducira receptor TLR5, v vsaki nadaljnji imunizaciji še poveča odziv na antigene, ki so vključeni v fuzijski protein.

Izumitelji so ugotovili, da lahko z vnosom DNA zapisa za modificirane flageline v sesalske celice ugotavljajo sposobnosti aktivacije modificiranega flagelina za aktivacijo, TLR5 kar je uporabno za načrtovanje in izbor učinkovitih cepiv. Pri tem lahko uporabijo celice, ki izražajo receptor TLR5, katerega aktivacija s flagelinom sproži aktivacijo transkripcijskih faktorjev in prepis mediatorjev, ki tem celicam omogočijo selektivno prednost v kulturi. Omenjena metoda se lahko uporabi tudi za pregledovanje knjižnic flagelinskih variant.

Osnova izuma je tudi odkritje, da uporaba kombinacije cepiv, ki se razlikujejo v amino in karboksi končnem segmentu flagelina, ki aktivira receptor TLR5, medtem ko sredinski segment flagelina in antigenski del ostaneta nespremenjena, poveča učinkovitost tvorbe protiteles, kadar je potrebna večkratna imunizacija. Namreč pokazalo se je, da organizem tvori protitelesa tudi proti amino in karboksi končnemu delu flagelina, kar zmanjša delovanje tega segmenta na receptor TLR5, saj je nevtraliziran s protitelesi. Z zamenjavo amino in karboksi končnega dela flagelina v fuzijskem proteinu, pa se le ta izogne nastalim protitelesom in učinkoviteje aktivira receptor TLR5 in preko njega naravni imunski odziv ob ponovnem cepljenju.

Če ni definirano drugače, imajo vsi tukaj uporabljeni tehnični in znanstveni izrazi enak pomen kot je splošno znano strokovnjakom s področja izuma. Terminologija, ki se jo uporablja ob opisu izuma ima namen obrazložitve določenega segmenta izuma in nima namena omejevanja izuma. Vse publikacije omenjene v opisu izuma so navedene kot reference. V opisu izuma in zahtevkih je opis v ednini vendar vključuje tudi množino, kar pa v opisu zaradi lažjega razumevanja ni posebej poudarjeno.

Fuzijski protein/DNA

Predstavljeni izum temelji na odkritju, da cepivo, ki vsebuje zapis za fuzijski protein med (a) delom himernega flagelina, ki stimulira prirojeni imunski odziv preko aktivacije receptorja TLR5 in (b) delom flagelina, ki ni sposoben stimulirati receptorja TLR5 in kot tak ne izkazuje imunogenosti in (c) opcijsko antigenom, ki izhaja iz istega organizma kot neimunogen flagelin, sproži imunski odziv in sintezo protiteles in tako cepivo izkazuje imunogene sposobnosti, ki se pričakujejo s konvencionalnimi cepivi, ki vsebujejo adjuvanse.

Izum sloni na odkritju, da himerni flagelin, ki je sposoben aktivacije receptorja TLR5, in je komponenta fuzijskega proteina in s tem cepiva, sproži sintezo interleukinov preko MyD88 odvisne poti v celicah imunskega odziva. Izumitelji so prišli do spoznanja, da je taka cepivo sposobna aktivirati prirojeno imunost.

Izraz »aktivacija celic« se nanaša na aktivacijo imunskega odziva preko Tollu podobnega receptorja 5, aktivacijo prirojene imunosti in aktivacijo sinteze protiteles s sproščanjem interferona alfa. Aktivacija celic z aktivacijo receptorjev TLR5 poveča učinkovitost sinteze protiteles na prisoten antigen.

Predstavljen izum temelji na odkritju, da imunizacija s cepivom, ki vsebuje fuzijski protein/DNA po izumu in izraža fuzijski protein sproži manjše vnetje v primerjavi s cepivi z dodatkom adjuvansa. Kljub zmanjšanemu vnetju pa fuzijski protein inducira močan imunski odziv. Omenjen pristop zmanjša stranske učinke vakcinacije in kljub temu poveča imunski odziv.

Izum temelji na presenetljivem odkritju, da, če ob večkratni imunizaciji s cepivom, ki vsebuje fuzijski protein med (a) delom flagelina, ki aktivira TLR5 in (b) delom flagelina, ki ne aktivira TLR5 in služi kot antigen, za vsako imunizacijo uporabimo drugo cepivo, ki se od prejšnjih razlikuje v izvoru dela flagelina, ki aktivira TLR5, dosežemo izboljšan imunski odziv. Izumitelji so odkrili, da se z zamenjavo dela flagelina, ki aktivira TLR5, ob vsaki naslednji vakcinaciji ponovno sproži imunski odziv, ki ga v primerjavi ob večkratni vakcinaciji z identično cepivo ni mogoče doseči.

Izum se nanaša na fuzijski protein med (a) deli flagelina, ki aktivira receptor TLR5, (b) deli flagelina, ki ne aktivirajo TLR5 vendar služijo kot antigen. Fuzijski protein opcijsko vsebuje (a) signalno sekvenco, ki določa lokalizacijo izraženega proteina, (b) linker peptide, ki povezujejo posamezne segmente fuzijskega proteina, katerih dolžina je od ene do več aminokislin, (c) označevalna zaporedja, ki omogočajo izolacijo proteina.

Natančneje se izum nanaša na fuzijski protein, ki opcijsko vsebuje linker peptide, ki povezujejo posamezne proteinske segmente fuzijskega proteina po izumu in je opcijsko linker peptid dolg od ene do več aminokislin. Natančneje se izum nanaša na fuzijski protein po izumu, ki vsebuje aminokislinski zapis za peptid, ki služi izolaciji proteina, ki je izbran iz skupine, vendar ni omejen na: his-tag, flag-tag, myc-tag, hemaglutininski-tag in drugo.

Linker peptid

Izraz »linker peptid« se nanaša na krajša aminokislinska zaporedja, katerih vloga je lahko samo ločevati posamezne domene fuzijskega proteina. Vloga linker peptida v fuzijskem proteinu, katerega vključitev je opcijska, pa je lahko tudi vnos mesta za cepitev ali za posttranslacijske modifikacije, vključno z vnosom mest za boljše procesiranje antigenov. Dolžina linker peptida je lahko poljubna in ni omejena, vendar je običajno do 30 aminokislin.

Signalni peptid

Izraz »signalna sekvenca« ali »signalni peptid« se nanaša na aminokislinsko zaporedje, ki je pomembno pri usmerjanju proteina na določeno lokacijo v celici. Signalne sekvence se

razlikujejo tudi glede na gostiteljski organizem, v katerem se fuzijski protein izraža. Aminokislinska zaporedja signalnih sekvenc so dobro poznana strokovnjakom, prav tako katera signalna sekvenca funkcionira v katerem organizmu.

Označevalna zaporedja.

Izraz »označevalna zaporedja« se nanaša na aminokislinska zaporedja, ki se jih proteinu doda za enostavnejše čiščenje/izolacijo/detekcijo proteina.

Položaj signalne sekvence, linker peptidov in označevalnega zaporedja je poljuben, vendar tak, da omogoča funkcionalno izražanje proteina in na položaju, kjer so umeščene, ohranjajo funkcijo, zaradi katere so bila ta aminokislinska zaporedja izbrana, kar je poznano strokovnjakom s področja.

Izum se nanaša na DNA, ki nosi zapis za fuzijski protein, kateri je sestavljen opcijsko s signalno sekvenco, ki opcijsko usmerja fuzijski protein na površino membrane ali v organele znotraj celice, antigen ali antigene ali epitope, med seboj opcijsko povezane z linker peptidom, antigenski segment se povezuje na opcijsko dimerizacijsko regijo in transmembransko domeno, katera je lahko sočasno tudi dimerizacijska regija, ter znotrajcelično domeno receptorjev TLR. DNA po izumu je vstavljena v vektor, ki omogoča izražanje DNA v gostiteljskem organizmu. DNA po izumu je v gostiteljski organizem vstavljena z metodami poznanimi strokovnjakom.

Flagelin

Celice v telesu človeka ali živali lahko same proizvajajo flagelin, če vanje vnesemo DNA zapis za kodirajoče zaporedje flagelina. Pokazali so, da se tak DNA zapis lahko uporabi kot cepivo (Applequist et al. 2005, J.Immunol. 175, 3882-3891). Vendar sam flagelin *Helicobacter pylori* ne bi sprožil zadostnega dobrega odziva, ker ne aktivira TLR5. V pričujočem izumu so izumitelji pokazali, da lahko uporabijo genski zapis za himerni flagelin, ki vsebuje centralni del flagelina *Helicobacter pylori* ter N- in C-končni segment flagelina bakterije, ki aktivira TLR5. Genski zapis je pod kontrolo ustreznih regulacijskih elementov, ki poskrbijo za izražanje v celicah človeka in živali.

Izumitelji so tak zapis vnesli v celice, ki so začele izločati fuzijski protein, ta pa je povzročil močan imunski odziv in produkcijo protiteles. Dodatek zapisa za protein ali njegovo podenoto je omogočil učinkovit imunski odziv na ta protein. Aktivacija TLR5 je v primeru uporabe flagelina z dodanim proteinskim antigenom celo močnejša kot s samim flagelinom.

Izum temelji na odkritju, da se flagelini delijo na dva podtipa glede na sposobnost aktivacije prirojene imunosti: (a) flagelini, ki aktivirajo receptor TLR5 in (b) flagelini, ki ne aktivirajo receptorja TLR5. Za bakterije, ki vsebujejo flagelin, ki ne aktivirajo receptorja TLR5, je značilno, da se lažje izognejo obrambnim mehanizmom organizma pred okužbo z bakterijami. Medtem ko bakterije, ki vsebujejo flagelin, ki sproži aktivacijo receptorja TLR5, aktivirajo celosten imunski odziv in obrambo telesa pred bakterijami. Izumitelji so pokazali, da se lahko inducira imunski odziv proti bakterijam, katerih flagelin ne aktivira imunskega odziva s cepivom, ki združuje obe vrsti flagelina. Na podlagi omenjenega odkritja, se izum nanaša na fuzijski protein med (a) N- in C- terminalnim delom flagelina, ki aktivira receptor TLR5 in (b) sredinskim delom flagelina, ki ne aktivira receptor TLR5 in se sredinski del flagelina, ki ne aktivira receptorja TLR5, nahaja med N- in C- terminalnim delom flagelina, ki aktivira receptor TLR5.

Izumitelji so prišli do odkritja, da, če se fuzijskemu proteinu s himernim flagelinom doda proteine, ki izhajajo iz istega mikroorganizma kot flagelin, ki ne aktivira receptorja TLR5, se poveča imunski odziv gostiteljskega organizma, subjekta proti mikroorganizmu. Po izumu se dodatni proteini/antigeni lahko nahajajo za sredinskim segmentom flagelina ali na C-terminalnem koncu fuzijskega proteina.

Iz omenjenega se izum nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje N- in C- terminalna dela flagelina, ki aktivirajo receptor TLR5. Po izumu N-končni del flagelina obsega fragment, ki vsebuje minimalno od 1 do 176 aminokisline proteina flagelina *E. coli* K-12 podsev MG1655 bakterije, oziroma ustrezne homologe iz drugih bakterij. Po izumu C-terminalni del flagelina obsega fragment ki vsebuje minimalno od 401 do 498 aminokisline flagelina *E. coli* K-12 podsev MG1655 bakterije, oziroma ustrezne homologe iz drugih bakterij.

Bakterije, katere vsebujejo flagelin, ki stimulira receptor TLR5 so beta proteobakterije ali gama proteobakterije ali spirohete ali firmucute kot so bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella sp.*, *Borellia burgdorferi*, *Clostridium sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*.

Iz omenjenega se izum nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje sredinski del flagelina, kateri celoten ne aktivira receptorja TLR5. Po izumu sredinski fragment flagelina obsega fragment, ki

vsebuje minimalno od 178 do vključno 418 aminokisline proteina flagelina A bakterije *Helicobacter pylori* J99, oziroma ustrezne homologe iz drugih bakterij

Bakterije, ki vsebujejo flagelin, ki ne stimulira receptorja TLR5 so alfa proteobakterije ali epsilon proteobakterije kot so bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*

Natančneje se izum nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje (a) N- in C- končna dela flagelina *E. coli*, *Salmonela*, *Seratia*, prednostno aminokislinske sekvence od 1 do 176 FliC za N-končni del flagelina in od 401 do 498 FliC za C-končni del flagelina, oziroma odgovarjajoči homologni deli flagelina drugih naštetih bakterij; (b) sredinski del flagelina, ki ne stimulira receptorja TLR5 iz *Helicobacter pylori*, (prednostno aminokislinske sekvence od 178 do vključno 418, oziroma odgovarjajoči homologni deli flagelina drugih naštetih bakterij, kjer je ta sredinski del postavljen med amino in karboksi terminalni del flagelina, ki aktivira TLR5.

Izraz »homologne sekvence/fragmenti/proteini« se nanaša na aminokislinska zaporedja proteinov/fragmentov, ki izhajajo iz istovrstnega ali drugega organizma, ki v analizi prileganja pokažejo dobro medsebojno prileganje, prednostno več kot 50% ohranjenost strukture, prednostno 60%, prednostno 70%. Izraz »homolog« se nanaša tudi na mutante proteina, katerih mutacije spremenijo aminokislinsko sekvenco minimalno.

Ohranjena regija flagelina je dobro poznana v stanju tehnike (Mimori-Kiyosue et al. 1997 J. Mol. Virol. 270:222-237; Wei, Joys 1985, J. Mol.Biol. 186, 791-803). Strokovnjakom s področja je poznano, da se ohranjena regija razlikuje po velikosti glede na izvor flagelina. Na splošno N-terminalni konstantni del vključuje od 170 do 180 aminokislin na N-terminalnem delu proteina in C-terminalni ohranjeni del vključuje 85-100 aminokislin na C-terminalnem delu proteina. Sredinski del/hipervariabilni del se po velikosti zelo razlikuje med posameznimi flagelini glede na izvor flagelina. Strokovnjaki s področja lahko s poznanimi tehnikami prileganja aminokislinskih sekvenc identificirajo N-, C- terminalni del flagelina in sredinski del.

Izraza »N-/C- terminalni del flagelina« se nanaša na aktivne fragmente flagelina in modifikacije aktivnih fragmentov, ki aktivirajo prirojeno imunost preko receptorja TLR5.

Izraz »flagelin, ki ne aktivira receptorja TLR5/prirojene imunosti« se nanaša na skupino flagelinov iz skupine bakterij, ki niso sposobni aktivacije receptorja TLR5. Za bakterije, ki

imajo flagele sestavljene iz omejenega flagelina je značilno, da se izognejo zaščitnim mehanizmom gostitelja. Ena od takih bakterije je *H. pylori*.

Natančneje se izum nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje 1-vključno 176 (K) in C 401 (A)-498 dela flagelina. (od najširše do najožje možnosti)

Izraz »sredinski fragment« se nanaša na variabilen del flagelina, ki se zelo razlikuje po sestavi in velikosti glede na izvor flagelina. Sredinski del je del flagelina, ki se ga ne da označiti kot N- in C- terminalni del in se nahaja med N- in C- terminalnima deloma flagelina. Strokovnjaki s področja s tehnikami prileganja lahko določijo aminokislinsko področje, ki se nanaša na sredinski del flagelina.

Izum se nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje sredinski del flagelina, kateri ne inducira receptorja TLR5. Prednostno se izum nanaša na flagelin bakterije *H. pylori*.

Natančneje se izum nanaša na fuzijski protein, ki vsebuje sredinski del flagelina z aminokislinsko sekvenco SEQ ID NO.: 1.

Metoda za določanje sposobnosti flagelina za aktivacijo.

Določanje sposobnosti aktivacije receptorja TLR5 s flagelinom in mutantami flagelina je ključnega pomena za pripravo proteina po izumu. Izumitelji so pripravili metodo, ki omogoča zelo enostavno določanje, kateri flagelin je sposoben aktivacije receptorja. Priprava celic, ki izražajo receptor TLR5, da se receptor izraža na površini celic. Celice so lahko izbrane izmed celic, ki vsebujejo izražen nativni TLR5 ali med celicami, ki nimajo izraženega nativnega TLR5, vendar jim je gen za nativni ali mutiran, vendar funkcionalen TLR5 vstavljen. Celice s funkcionalnim receptorjem TLR5 na površini izpostavimo flagelinu ali mutanti flagelina, ki ga želimo analizirati, in po določenem času analiziramo *aktivacijo* receptorja. Čas delovanja flagelina na celice je odvisen od načina detekcije oziroma uporabe reporterskega sistem. Čas je daljši v primeru, da je reporterski sistem/odziv povezan s sintezo reporterskih proteinov. Krajši čas se uporablja pri detekciji fosforilacije. Flagelin ali mutante flagelina lahko reporterskim celicam dodamo tako, da celice, ki že vsebujejo receptor TLR5 in reporterski sistem, transficiramo z genom za flagelin, katerega učinek želimo analizirati. Flagelin ali mutante flagelina lahko reporterskim celicam dodamo v obliki suprenatanta, ki vsebuje izražene flageline. Prav tako lahko flageline ali mutirane flageline reporterskim celicam dodamo na način, da reporterske celice, ki vsebujejo izražen receptor TLR5 na površini, inkubiramo

skupaj s celičnimi linijami, ki so transficirane z genom za flagelin in izražajo flagelin, ki se izloča v medij.

Tako reporterske celice kot celice z genom za flagelin so lahko celične linije živali ali človeka. Reporterske celice morajo vsebovati izražen TLR5 na površini in morajo imeti delujoč reporterski sistem. Reporterske celice imajo lahko receptor TLR5 vstavljen preko DNA ali je receptor prisoten v takih celicah. Celice z genom za flagelin so tiste, ki flagelin izražajo in so lahko enake ali drugačne reporterskim celicam, lahko so tudi celice mikroorganizmov, ki izražajo flagelin.

Izraz »reporterskih sistemov« se nanaša na povečano prisotnost proteinov, katerih ekspresija je pod kontrolo promotorja, ki se aktivira po aktivaciji receptorja TLR5 in signalne poti, ki jo aktivacija receptorja TLR5 sproži. Predvsem se to nanaša izraz na proteine, katerih povečano prisotnost lahko zmerim s povečano aktivnostjo teh proteinov, bodisi povečano cepitvijo substratov in nastankom produktov, ki so lahko merljivi. Predvsem se to nanaša na nastanek ali razgradnjo luminiscenčnih substratov, fluorokromnih substratov ali obarvanih substratov. Izraz »reporterski sistem« se nanaša tudi na nastanek ali razpad celici lastnih produktov, katerih procesiranje je pod kontrolo aktivacije receptorja TLR5. Predvsem se to nanaša na spekter vnetnih posrednikov, katerih ekspresija je pod kontrolo transkripcijskih faktorjev, npr: NF κ B, ki se aktivirajo z aktivacijo receptorja TLR5. Izražanja vnetnih posrednikov se detektira z barvanjem s specifičnimi protitelesi v ELISA testih ali z detekcijo prisotnosti mRNA teh vnetnih posrednikov z uporabo kvantitativnega PCR z reverzno transkripcijo. Za »reporterski sistem« lahko štejemo tudi spremembo v fosforilacijskem vzorcu, saj aktivacija receptorja TLR5 sproži aktivacijo proteinskih kinaz, ki glede na jakost aktivacije bolj ali manj intenzivno fosforilirajo substrat. Detekcija fosforilacijskega vzorca poteka po western prenosu s protitelesi, ki so specifična na fosforilacijo substrata.

Antigen/imunogen

Izraz »antigen/imunogen« se nanaša na proteine, dele proteinov, t.i. fragmente proteinov, epitope, v nativni ali mutirani obliki, ki inducirajo stanje občutljivosti in/ali imunske odzivnosti po določenem času vnosa in reagirajo, z namenom demonstracije, s protitelesi in/ali celicami po imunizaciji *in vivo* in *in vitro*. Antigen je sestavljen iz enega ali več proteinov/fragmentov med seboj povezanih v poljubnem vrstnem redu. Antigeni vključujejo, vendar niso omejeni na: antigene povezane z bakterijami in mikroorganizmi s flagelini, ki ne inducirajo TLR5.

Natančneje se izum nanaša na himerni flagelin, katerega sredinski segment flagelina izhaja iz flagelinov bakterij skupine alfa proteobakterij ali epsilon proteobakterij, ki vključujejo, vendar ne izključno, bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella sp.*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*, in je antigen, ki je opcijsko vključen v fuzijski protein, ravno tako izbran iz omenjenih bakterij.

Procesiranje in prepoznavanje antigenov predstavljenih s peptidi z T-limfociti je v veliki meri odvisno od aminokislinskega zapisa antigena. Antigen uporabljen v cepivu predstavljenega izuma lahko vsebuje epitope ali specifične domene. Antigenska domena je lahko sestavljena iz več epitopov. Antigen uporabljen v cepivu predstavljenega izuma lahko vsebuje celoten antigen, ki ohranja tridimenzionalno strukturo antigenskih determinant z namenom tvorbe protiteles z B-limfociti napram strukturi epitopa antigena.

Antigeni, ki so predstavljeni na površini bakterij so najpogostejše v stiku z receptorji imunskih celic in obramba proti njim je pogosto najbolj učinkovita. Med takšnimi molekulami so flagelini, ki tvorijo bakterijske flagele na površini bakterij. Med najbolj učinkovitimi tarčami imunskega sistema so proteini, ki so potrebni za preživetje bakterij v organizmu, virulenčni faktorji in molekule, ki v tarčnem organizmu povzročajo škodljivo delovanje kot so pri *Helicobacter pylori* ureaza B, CagA, VacA.

Rekombinantna nukleinska kislina/ produkcija proteinov

Razen, če ni zapisano drugače, so bile v izumu uporabljene standardne metode molekularne biologije, kot so: kloniranje genov, pomnoževanje s polimerazo, detekcija nukleinskih kislin, priprava fuzijskih konstruktov, ekspresija peptidov, proteinov v gostiteljskih celicah in podobno. Metode so splošno znane strokovnjakom s področja (glej Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, Inc and John Wiley & Sons, Inc, NY).

Izraz »DNA/nukleinska kislina« se nanaša na polinukleotidne molekule, kot so DNA, RNA, vključno s cDNA, genomska DNA, sintetična DNA, himerna DNA in RNA. Nukleinska kislina je lahko dvoverižna ali enoverižna. Nukleinska kislina je lahko vsebuje nukleinske analoge ali derivate.

Fuzijski protein po izumu je lahko sintetiziran v gostiteljskem organizmu, ki izraža heterologno nukleinsko kislino, ki kodira za fuzijski protein. Fuzijski protein po izumu služi za indukcijo

imunskega odziva. Po izumu je prednostno, da je fuzijski protein operativno povezan s signalno sekvenco, kar je zapisano v nukleinski kislini.

Izraz »nativen protein/fragment« se nanaša na protein/proteinski fragment, ki ga je mogoče pridobiti iz organizma brez predhodne manipulacije genskega materiala in je protein/proteinski fragment kodiran v genomu tega organizma.

Izraz »mutiran protein/fragment« se nanaša na protein/proteinski fragment, ki se vsaj v eni aminokislini razlikuje od nativnega proteina/proteinskega fragmenta.

Predstavljeni izum se nanaša na gostiteljske celice transformirane z nukleinsko kislino, ki nosi zapis za fuzijski protein po zahtevku. Gostiteljska celica je lahko prokariotska ali evkariotska. Evkariotske celice primerne za izražanje fuzijskega proteina niso omejene v kolikor so celične linije kompatibilne s metodami propagacije ekspresijskega vektorja in ekspresijo fuzijskega proteina. Prednostne evkariotske celice vključujejo, niso pa omejene z, kvasovke, insektne celice, rastlinske celice in celice vretenčarjev, kot so: mišje, podganje, opičje ali človeški fibroblasti.

Katerikoli bakterijski gostitelj se lahko uporabi za izražanje DNA/fuzijskega proteina po izumu. Prednostna prokariotska bakterija je izbrana izmed *E. coli*, *H. pylori*. Izum se nanaša na izražanje proteina v bakterijah. Izum se nanaša na bakterijske celice, ki izražajo fuzijski protein, prednostno so to bakterije *E. coli* ali *H. pylori*.

Na splošno je heterologna nukleinska kislina vključena v ekspresijski vektor (virusni ali ne virusni). Ustrezni vektorji vključujejo, vendar niso omejeni na: plazmide, virusne vektorje, in drugo. Ekspresijski vektorji, ki so kompatibilni s celicami gostiteljskega organizma, so dobro poznani strokovnjakom s področja in vsebuje ustrezne kontrolne elemente za transkripcijo in translacijo nukleinske kisline. Tipično ekspresijski vektor vključuje ekspresijsko kaseto, ki vključuje v smeri 5' proti 3', promotor, kodirajočo sekvenco za fuzijski protein operativno povezano s promotorjem in terminator vključno s stop kodonom za RNA polimerazo in poliadenilacijski signal za poliadenilazo.

Ekspresijski vektor je lahko pripravljen za izražanje v prokariotskih in evkariotskih celicah. Na primer; prokariotske celice so bakterije predvsem *Escherichia coli*. Po izumu je uporaba prokariotskih celic namenjena pripravi zadostne količine nukleinske kisline. Ekspresijski vektor na splošno vsebuje operativno povezane kontrolne elemente, ki so operativno povezani z DNA izuma, ki nosi zapis za fuzijski protein. Razumljivo je, da so kontrolni elementi izbrani

na način, da ustrezajo količini izražanja in tkivno specifičnemu izražanju. Promotor je lahko konstitutiven ali inducibilen glede na željen vzorec izražanja. Promotor je lahko nativen ali tujega izvora (ni zastopan v celicah, kjer se ga uporablja) in je lahko naraven ali sintetičen. Promotor je izbran, da funkcionira v tarčnih celicah gostiteljskega organizma. Poleg tega so vključeni iniciacijski signali za učinkovito translacijo fuzijskega proteina, kar vključuje ATG in pripadajoče sekvence. V primeru, da vektor uporabljen v izumu vključuje dva ali več bralnih okvirjev, naj bi bili bralni okvirji operativno povezani z kontrolnimi elementi neodvisno in naj bi bile kontrolni elementi enaki ali različni, glede na željeno produkcijo proteinov.

Primeri bakterijskih ekspresijskih vektorjev, vključujejo, vendar niso omejeni na: pET vektorje, pRSET vektorje, in drugi. Kadar so vektorji uporabljeni v bakterijskih celicah so kontrolni elementi bakterijskega izvora.

Primeri sesalskih ekspresijskih vektorjev za sesalske celice vključujejo, vendar niso omejeni na: pcDNA (Invitrogen), pFLAG (Sigma), in drugi. Kadar so vektorji uporabljeni v sesalskih celicah so kontrolni elementi po večini virusnega izvora, na primer: adenovirus 2, citomegalovirus, simian virus 40.

Izum v nadaljevanju vključuje gostiteljske celice in organizme, ki vsebujejo nukleinsko kislino po izumu (prehodno ali stabilno), ki nosi zapis za fuzijski protein po izumu. Ustrezne gostiteljske celice so poznane v stanju tehnike in vključujejo bakterijske in evkariontske celice. Poznano je, da je protein lahko izražen v sesalskih celicah sledečih organizmov: človek, glodalci, govedo, svinjina, perutnina, zajci in podobno. Gostiteljske celice so lahko gojene celične linije primarnih ali imortaliziranih celičnih linij.

Vnos vektorjev v gostiteljske celice je opravljen s konvencionalnimi metodami poznanimi iz stanja tehnike in se metode nanašajo na transformacijo, transfekcijo, ki vključujejo: kemični vnos, elektroporacijo, mikroinjiciranje, DNA lipofekcija, celična sonikacija, gensko bombardiranje, virusni DNA vnos in drugo. V kontekstu izuma je vnos DNA po izumu z elektroporacijo in virusni vnos v celice vretenčarjev ali celične linije vretenčarjev.

Vnos DNA je lahko prehodnega značaja ali stabilen. Vnos prehodnega značaja se nanaša na vnos DNA z vektorjem, ki DNA po izumu ne vgrajuje v genom celic. Stabilen vnos dosežemo z vgradnjo DNA po izumu v genom gostitelja. Vnos DNA po izumu predvsem za pripravo gostiteljskega organizma, ki ima stabilno vgrajeno DNA po izumu lahko kontroliramo s

prisotnostjo markerjev. DNA zapis za markerje se nanaša na odpornost na droge, npr.: antibiotike in je lahko vključen na vektorju z DNA po izumu ali na ločenem vektorju.

Cepivska formulacija in vnos/imunizacija

Cepiva predstavljena v izumu vsebuje eno ali več DNA/fuzijskih proteinov, ki v tarčnih celicah gostiteljskega organizma izražajo aktiven fuzijski protein opisan zgoraj med (a) N- in C-terminalnim delom flagelina, (b) sredinskim segmentom flagelina (c) antigenom, (d) linker peptidi in z ustreznimi (e) signalnimi sekvencami.

Izum, cepiva po izumu, se lahko uporablja z namenom preprečevanja ali zdravljenja bolezni, katere se lahko preprečujejo/zdravijo z inducirano sintezo protiteles, infekcije z mikroorganizmi, prednostno bakterij, ki vsebujejo flagelin, ki slabo inducira receptor TLR5, opcijsko, bakterij, ki vsebujejo flagelin, ki ne inducira receptor TLR5, opcijsko bakterije *H. pylori*.

Izraz »zdravljenje« se nanaša na bolezensko stanje subjekta, ki je izboljšano ali delno izboljšano v vsaj enem od kliničnih pokazateljev, izraz se nanaša tudi na upočasnjeno napredovanje bolezni ali motnje. Izraz vključuje tudi preprečevanje infekcije ali nastanka bolezenskega stanja, vendar ni mišljen kot popolna preprečitev bolezenskega stanja, pač pa tudi upočasnjem razvoj bolezenskega stanja subjekta. Metoda »zdravljenja bolezenskega stanja« vključuje terapevtske metode zdravljenja in preprečevanje bolezenskega stanja.

Izraz »vakcinacija/imunizacija« je dobro poznana strokovnjakom s področja. Izraz se razume kot proces za povečan imunski odziv organizma na antigen, kar privede do kljubovanja in premostitve infekcije, pojava bolezni.

Izraz »aktivna imunost« se nanaša na odziv gostiteljskega organizma po srečanju z imunogenom. Vključuje diferenciacijo in proliferacijo imunokompetentnih celic in vodi k sintezi protiteles ali razvoju celično mediirane reaktivnosti. Aktivno imunost lahko sproži izpostavitvev gostitelja imunogenom kot so infekcije ali cepivom.

Izraz »zaščitni imunski odziv« se nanaša na imunski odziv v gostiteljskem organizmu, ki ima zaščitno vlogo za gostitelja.

Predstavljeni izum se nanaša na medicinsko in veterinarsko aplikacijo cepiva po izumu. Subjekti, ki so vključeni v proces imunizacije po izumu so perutnina in sesalci, vključno, vendar ne omejujejo: človek, primati, psi, mačke, zajci, koze, kopitarji, pujski, in drugi.

Subjekti so lahko zdravljeni z dvigom zaščitne imunosti, ali uporabljeni za produkcijo protiteles (izjema je človek), katera so kasneje lahko izolirana in uporabljena za diagnostiko ali administracijo v drug subjekt za produkcijo pasivne imunosti.

Podrobneje se izum nanaša na vakcinacijo subjektov s cepivom, ki vsebuje DNA/fuzijski protein po izumu, za zdravljenje in preprečevanje infekcijskih bolezni, ki jih povzročajo mikroorganizmi, prednostno patogeni mikroorganizmi, kot so: bakterije.

Izum se nanaša na cepivo ki vsebuje fuzijski protein/DNA po izumu za stimulacijo odziva proti bakterijam, katerih flagelin ne aktivira signalizacije preko receptorja TLR5. Natančneje se izum nanaša na cepivo za stimulacijo imunskega odziva proti bakterijam iz skupine: alfa in epsilon proteobakterij, kot so: *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.* Natančneje se izum nanaša na cepivo, ki vsebuje DNA ali fuzijski protein po izumu za zaščito ali zdravljenje okužbe z bakterijo *H. pylori*.

Po imunizaciji s cepivom, ki vsebuje flagelin pride v telesu človeka in živali do tvorbe protiteles tudi proti flagelinu. Ta telesa se lahko ob ponovni imunizaciji vežejo na antigenske determinante flagelina in tako preprečijo ponovno aktivacijo TLR5 (Saha et al., 2007, J.Immunol. 179, 1147-1154; Nempont et al., 2008, J.Immunol. 181, 2036-2043), kar je slabost omenjenega postopka imunizacije z identičnim cepivom, ki vsebuje flagelin kot adjuvans. V tem primeru je odziv na cepivo naslednjič manj učinkovito. Tudi ob infekciji z bakterijo, katere flagelin je bil uporabljen kot adjuvans nato sproži šibkejši odziv, kot bakterija, katere flagelin ni bil uporabljen za imunizacijo.

Izumitelji so odkrili, da je zelo učinkovita uporaba protokola cepljenja, kjer se za prvo imunizacijo uporabi vakcina, ki vsebuje poleg izbranega antigena fuzijo s flagelinom za aktivacijo TLR5. Za naslednje ojačitvene stimulacije imunskega odziva se uporabi vakcina, ki vsebuje enak izbrani antigen kot ob predhodni imunizaciji, vendar vezan na drugačen flagelin. Ta prav tako stimulira TLR5, sposobnosti aktivacije TLR5 pa protitelesa, nastala v organizmu zaradi predhodne stimulacije ne nevtralizirajo. Omenjen drugačen flagelin oziroma njegov segment, ki aktivira TLR5, je izbran iz flagelina bakterij, ki stimulirajo TLR5, oziroma je pripravljen s pomočjo mutacij.

Izum se nanaša na cepiva, ki se uporabljajo za večkratne imunizacije, ki vsebuje fuzijski protein po izumu, pri tem se za vsako vakcinacijo uporabi fuzijski protein, ki se od prejšnjih

razlikuje v N- in C- terminalnem delu flagelina. Iz literature je razvidno, da vakcinacija s fuzijskim proteinom, ali DNA, ki izraža fuzijski protein, ki vsebuje flagelin, ki inducira receptor TLR5, privede do sinteze protiteles tudi na N- in C- terminalni del. Tako pridobljena protitelesa vežejo fuzijski flagelin in inhibirajo indukcijo TLR5 v drugi vakcinaciji in naslednjih vakcinacijah. S tem je učinek vseh naslednjih vakcinacij slabši od želenih. Izumitelji so prišli do odkritja, da zamenja cepiva v nadaljnjih imunizacijah s cepivom, ki vsebuje fuzijski protein z identičnim sredinskim segment flagelina in antigeni po izumu, ima pa fuzijski protein v cepivi različne N- in C- terminalne segmente flagelina, sproži boljši imunski odgovor glede na prej opisano situacijo, ker omenjeni flagelini še vedno lahko inducirajo imunski odziv pri gostitelju.

V smislu ilustracije se metoda vakcinacije z večkratnimi aplikacijami lahko izvrši z uporabo cepiva, ki vsebuje fuzijski protein med (a) N- in C- terminalnim delom flagelina *E. coli* in (c) sredinskim segmentom flagelina *H. pylori*, naslednja vakcinacija vključuje uporabo cepiva, ki vsebuje fuzijski protein med (a) N- in C- terminalnim delom flagelina *Salmonella* sp. in (c) sredinskim segmentom flagelina *H. pylori*, in naslednja vakcinacija vključuje uporabo cepiva, ki vsebuje fuzijski protein med (a) N- in C- terminalnim delom flagelina *Serratia* in (c) sredinskim segmentom flagelina *H. pylori*, za zaščito/zdravljenje subjekta (človeka ali živali) pred infekcijo z bakterijo *Helicobacter pylori*.

Izum se prav tako nanaša na DNA, ki nosi zapis za fuzijski protein po izumu in se DNA uporablja za pripravo cepiva za vnos DNA v celice človeka ali živali z namenom vzbuditi imunski odziv na fuzijski protein oziroma antigen oziroma izbran mikroorganizem po izumu.

Izum se nanaša tudi na metodo indukcije imunskega odziva z administracijo cepiva, ki vsebuje DNA po izumu, z inhalacijo, oralno, intravenozno, transdermalno, parenteralno, subkutano, intradermalno, intrapleuralno, intracerebralno, intraarterijsko, oziroma z injiciranjem direktno v organ ali tkivo. Prednostno se izum nanaša na administracijo DNA cepiva preko sluznice nosu, ust, žrela, požiralnika, črevesa, očesa, urološkogenitalne sluznice.

Izum se nanaša na vakcinacijo z mrtvimi ali oslabljenimi mikroorganizmi, ki na površini izražajo fuzijski protein po izumu in so mikroorganizmi sami ne škodljivi za subjekt, prednostno so to bakterije, kvasovke, prednostno izbrane med: *E. coli*; *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, in druge.

Farmacevtska kompozicija

Izum v nadaljevanju zagotavlja farmacevtsko zmes, ki vsebuje fuzijski protein ali DNA po izumu, s farmacevtsko sprejemljivimi nosilci.

Izum se nanaša na farmacevtsko zmes, ki vsebuje cepivo po izumu in cepivo vsebuje fuzijski protein ali DNA z zapisom za fuzijski protein po izumu in farmacevtska zmes predstavlja bakterije. Po izumu bakterije vsebujejo DNA z zapisom za fuzijski protein po izumu, in izražajo fuzijski protein. Bakterije so v farmacevtski zmesi v neaktivnem stanju in so običajno prisotne v subjektu.

Izraz »neaktivno stanje« se nanaša na bakterije, ki se v subjektu niso sposobne razmnoževati in na subjekt ne delujejo škodno, so običajno prisotni v subjektu.

Izum se nanaša na cepivo, ki je v farmacevtski zmesi, v obliki fuzijskega proteina, ki je v telo vnesen po metodah, ki so poznane v stanju tehnike.

Prednostna je farmacevtska zmes formulirana za virusni vnos, vnos preko sluznice, vnos z elektroporacijo ali katerokoli drug vnos DNA poznan strokovnjakom s področja. Izraz »farmacevtsko sprejemljiv« se nanaša na material, ki ni toksičen za gostiteljski organizem.

V okvir izuma je fuzijski protein/DNA po izumu prisoten v farmacevtski zmesi v »imunogeno učinkoviti« količini. Izraz »imunogeno učinkovita« količina se nanaša na količino, ki zadostno sproži aktivni imunski odziv (celični ali humoralni) v subjektu, kateremu je farmacevtska zmes administrirana. Opcijsko je dozirna količina zadostna, ko producira zaščiten imunski odziv (terapevtski ali profilaktičen). Pridobljena zaščita ni nujno, da je popolna, stalna samo, da je korist administracije farmacevtske zmesi večja od neželenih učinkov. Imunološko učinkovita količina je odvisna od načina administracije od vrste fuzijskega proteina ali DNA izuma in za DNA cepivo od učinkovitega izražanja proteina, od subjekta. Učinkovite količine, doze, so določene na način poznan v stanju tehnike.

Farmacevtska zmes po izumu lahko vključuje druge medicinske agense, farmacevtske agense, stabilizacijske spojine, pufre, nosilce, redčila, soli, močila, osmostabilizatorje.

V nadaljevanju so prikazani izvedbeni primeri, katerih namen je ilustrirati izum. Opis izvedbenih primerov nima namena omejevanja izuma ampak naj se razume kot demonstracija delovanja izuma.

Izvedbeni primeri

Primer 1. Priprava DNA konstruktov.

Za pripravo DNA konstruktov so izumitelji uporabili metode molekularne biologije, kot so: kemijska transformacija kompetentnih celic *E. coli*, izolacija plazmidne DNA, pomnoževanje s polimerazo (PCR), reverzna transkripcija - PCR, lepljenje s PCR, določanje koncentracije nukleinskih kislin, elektroforeza DNA na agaroznem gelu, izolacija fragmentov DNA iz agaroznih gelov, rezanje DNA z restrikcijskimi encimi, rezanje plazmidnih vektorjev, ligacija fragmentov DNA, čiščenje plazmidne DNA v večjih količinah. Natančen potek eksperimentalnih tehnik in metode so dobro poznane strokovnjakom s področja in so opisane v priročnikih molekularne biologije.

Za vse delo smo uporabljal sterilne tehnike dela, ki so prav tako dobro poznane strokovnjakom s področja. Vsi plazmidi, zaključeni konstrukti in delni konstrukti, so bili transformirani v bakterijo *E. coli* DH5 α s kemično transformacijo. Plazmidi za transfekcijo v celične linije HEK293 ali HEK293T ali Caco-2 celice so bili izolirani z uporabo izolacijskega seta UltraMobius 200 (Novagen), ki odstrani endotoksine.

Končni konstrukti so naštet v tabeli 1 in so bili vsi pripravljeni s tehnikami po metodah poznanih strokovnjakom. Ustreznost nukleotidnega zaporedja so izumitelji potrdili s sekveniranjem in restrikcijskimi analizami.

Tabela 1: Fuzijski proteini, ki smo jih uporabili za demonstracijo izuma.

št.	ime	sestava konstrukta	preostanek plazmida
1	UreB	T7 _p -HPUreB-His _{tag} -HIS _t	pSB1.AK3
2	HimFla-UreB	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-HPUreB-RGD-His _{tag} -HIS _t	pSB1.AK3
3	HimFla-multi	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-multiepitop-RGD-His _{tag} -T7 _t	pET
4	HimFla	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-RGD-His _{tag} -HIS _t	pSB1.AK3
5	HimFla	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-RGD-His _{tag} -T7 _t	pET
6	HimFla-multi	T7 _p -EcNfliC HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCfliC-HIS _t	pSB1.AK3
7	HimFla-multi	T7 _p -EcNfliC HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCfliC-T7 _t	pET
8	FliC	T7 _p -EcfliC-T7 _t	pET
9	HimFla-ureB	TetRRBS _p -EcNfliC HpVfla213-ureB-215HpVfla EcCfliC-HIS _t	pSB1.AK3
10	HimFla-multi	TetRRBS _p -EcNfliC HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCfliC- HIS _t	pSB1.AK3
12	HimFla-ureB	T7 _p - EcNfliC HpVfla213-ureB-215HpVfla EcCfliC- HIS _t	pSB1.AK3
13	UreB	CMVp- _{ss} hCD4-HPUreB-His _{tag} -BGH _t	pSB1.AK3
14	ssHimFla-UreB	CMVp- _{ss} hCD4-EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-HPUreB-RGD-His _{tag} -BGH _t	pSB1.AK3
15	HimFla	CMVp- _{ss} hCD4-EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-RGD-His _{tag} -BGH _t	pSB1.AK3
16	ssHimFla-multi	CMVp- _{ss} hCD4-EcNfliCHpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCfliC-RGD-His _{tag} - BGH _t	pSB1.AK3
17	HimFla-UreB	CMVp-EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-HPUreB-RGD-His _{tag} -BGH _t	pSB1.AK3
18	HimFla-multi	CMVp-EcNfliCHpVfla213-multiepitop-215HpVflaEcCfliC-RGD-His _{tag} -BGH _t	pSB1.AK3

Tabela 2: Legenda genov, funkcija, številka v bazi in aminokislinsko/nukleotidno sekvenco, ki predstavlja meje uporabljenih delov gena.

ime gena	SwissProt št.:	aminokislinska/nukleinska sekvenca	funkcija
EcCfliC	P04949	AK:401-498 (SEQ ID NO: 2, 3)	<i>E. coli</i> C-terminalni del flagelina
EcNfliC- HpVfla213	P04949-P0A0S2	AK:1-176 (SEQ ID NO: 4, 5)-AK: 178-213	176 N-terminalnih del flagelina <i>E. coli</i> z variabilnim delom flagelina <i>H. pylori</i> do 213 AK
EcfliC	P04949	AK: 1-498 (SEQ ID NO: 6, 7)	<i>E. coli</i> flagelin
EcNfliC	P04949	AK: 1-176 (SEQ ID NO: 8, 9)	<i>E. coli</i> N-terminalni del flagelina
215HpVfla- EcCfliC	P0A0S2-P04949	AK: 215-418 (SEQ ID NO: 10, 11)-AK: 401-498	Variabilni del flagelina <i>H. pylori</i> od 215 AK z 99 C terminalni delom flagelina <i>E. coli</i>
HPUreB	SEQ ID NO: 12		<i>H. pylori</i> ureaza B antigen (B podenota ureaze od <i>H. pylori</i>)
HIS _t	SEQ ID NO: 13	http://partsregistry.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K133044	terminator
His _{tag}		HHHHHH@	označevalec
HpVfla	P0A0S2	AK: 178- 418	sredinski segment flagelina; Variabilna regija flagelijna od <i>H. pylori</i>
Multiepitop	SEQ ID NO: 14, 15, 16		antigen; fuzijski protein sestavljen iz epitopov: ureB, VacA, HpaA <i>H. pylori</i>
RGD	SEQ ID NO: 17	RGD	Peptidni motiv potreben za vezavo na integrine
T7 _p	SEQ ID NO: 18		promotor
T7 _t	SEQ ID NO: 19		terminator
ureB/UB33	SEQ ID NO: 14		ureB epitop <i>H. pylori</i>
BGH _t	SEQ ID NO: 21		terminator
CMV _p		http://partsregistry.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_I712004	promotor
ss _h CD4	P01730	AK 1-25	signalna sekvenca
TetRRBS _p	SEQ ID NO: 20		represibilni TetR promotor z vezavnim mestom za ribosom

Primer 2 - Imunodetekcija proteina

Postopki priprave gela za SDS-PAGE, prenos proteinov iz gela na membrano in analiza proteinov po Westernu so splošno znani strokovnjakom in jih tukaj opisujemo le v smislu ilustracije. Vzorcem (supernatantu ali delno prečiščenim proteinom) smo dodali 4 x reducirajoči vzorčni pufer z SDS in jih denaturirali s segrevanjem 5 min pri 100° C. Nato smo vzorce nanesti na gel. Kot proteinski velikostni standard smo uporabili SeeBluePlus (Fermentas). Za elektroforezo smo uporabili vertikalni sistem Mini-Protean II in 10% poliakrilamidni gel. Elektroforeza je potekala v 1 x SDS elektroforeznem pufru 45-60 min pri konstantni napetosti 200 V. Po končani elektroforezi smo odstranili vstopni gel, ločitveni gel pa uporabili v prenosu Western. Gel PAGE, filter papirje in nitrocelulozno membrano smo namakali v pufru za mokri prenos. Sestavili smo aparaturo za mokri prenos. Prenos je potekal 1 uro pri konstantnem toku 350 mA. Nespecifična vezalna mesta na membrani smo blokirali z 0,2% I-Block reagentom v 1xPBS/0,1% Tween-20.. Blokiranje je potekalo bodisi 1,5 ure med stresanjem pri sobni temperaturi ali pa preko noči pri 4 °C in rahlem stresanju. Nitrocelulozno membrano smo inkubirali v raztopini za blokiranje (0,2% I-Block reagent/1xPBS/0,1% Tween-20) z mišjimi monoklonskimi AntiHis primarnimi protitelesi (Qiagen), redčenimi v razmerju 1 : 2000. ter inkubirali 1,5 ure pri sobni temperaturi in rahlem stresanju oziroma preko noči pri 4 °C in rahlem stresanju. Po inkubaciji smo membrano spirali (4x5min) s pufrom za spiranje (1xPBS/0,1% Tween-20). Nato smo membrano inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi in rahlem stresanju v raztopini za blokiranje s sekundarnimi kozjimi proti-mišjimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo, redčenimi v razmerju 1 : 3000. Po spiranju membrane s pufrom za spiranje (3-krat 5 min) smo membrano 5 minut inkubirali v Super Signal West Pico kemiluminiscentnem reagentu. Substrat vsebuje luminol, ki ga hrenova peroksidaza na sekundarnih protitelesih oksidira. Oksidiran luminol preide v vzbujeno stanje, pri prehodu v osnovno stanje pa se sprošča svetloba, ki jo zaznamo na filmu.

Primer 3 - Priprava antigena za analizo ELISA

Kot antigene za test ELISA smo uporabili fuzijske proteine UreB, HimFla-UreB in HimFla-multi (proteini št 1, 2 in 3, tabela 3) ter celični lizat bakterij *H. pylori*. Fuzijski proteini z antigeni so bili izraženi v *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Erlenmajerice s kulturo smo inkubirali na 37°C do ustrezne gostote (OD(600) 0,4-0,5), nato smo temperaturo inkubacije znižali na 25°C. IPTG do končne koncentracije 1mM smo dodali, ko je gostota celic dosegla vrednost OD(600) 0,8-1,0 ter kulturo inkubirali čez noč na 25°C pri 180 obratih/min. Celice smo zbrali z 10 min

centrifugiranjem pri 5000 obratih/min. Pelet bakterijskih celic, smo resuspendirali v pufru za lizo celic (0,1% natrijev deoksiholat, 10 mM Tris/HCl, pH=8,0 s proteaznimi inhibitorji. Lizirane celice smo sonicirali. Homogeno zmes smo centrifugirali 30 min pri 12000 obratih/min in 4°C. Supernatant, kjer se je nahajal protein, smo pod nativnimi pogoji vezali na Ni-NTA kolono. Pred vezavo smo kolono kondicionirali s pufrom za nativno vezavo (50 mM Tris/HCl, pH=8,0), ki smo mu dodali 100 mM NaCl. Vezavo proteina smo izvedli čez noč na 4°C ob stresanju. S kolone smo spirali nečistoče s 5 volumni polnila kolone s pufrom za nativno vezavo (50 mM Tris/HCl, pH=8,0), 100 mM NaCl). Nespecifično vezane proteine smo s kolone spirali s pufrom za nativno vezavo, ki smo mu dodali imidazol do koncentracije 20 mM. Elucijo proteina smo izvedli s pufrom za nativno vezavo z dodanim imidazolom do koncentracije 250 mM. Prisotnost našega proteina v frakcijah z najvišjo absorbanco smo preverili z SDS-PAGE in western analizo s primarnimi protitelesi, specifičnimi za His-tag.

ELISA - coat z antigenom, detekcija serumskih IgG. Antigen izoliran po zgoraj opisanem postopku smo razredčili v 50 mM Na₂CO₃ pufru pH 9.6 in sicer do koncentracije 10 µg/ml. V posamezno luknjico smo dali 50 µl razredčenega antigena (velja za fuzijske rekombinantne proteine) in inkubirali preko noči pri 4°C. Za test ELISA, kjer smo uporabili kot antigen lizat *H. pylori*, smo v posamezno luknjico dodali 50 µl celičnega lizata v 50 mM Na₂CO₃ pripravljenega iz 5 x 10⁷ bakterijskih celic liziranih s postopkom toplotne obdelave. Plošče z vezanim antigenom smo 3x spirali s PBS-T (PBS/0,05% Tween-20), blokirali 1,5 h v 3% BSA/PBS-T pri 37°C, nato pa ponovno 3x spirali s PBS-T.

Nato smo vezali različne razredčitve seruma, raztopljenega v blokirnem pufru (3% BSA/PBS-T) (50 µL/luknjo) in inkubirali 1,5 h na 37°C. Ponovno smo 3x spirali s PBS-T. Nato smo vezali s hrenovo peroksidazo označena sekundarna kozja proti-mišja protitelesa IgG, redčena z blokirnim pufrom v razmerju 1:3000 (50 µL/luknjo) in inkubirali 1,5 h na 37°C. Sledilo je spiranje 3x PBS-T. Na koncu smo dodali 100 µL že pripravljenega substrata za detekcijo peroksidaze ABTS (Sigma)-0.5 mg v 50 µL. Reakcijo smo po 20 min ustavili z dodatkom enakega volumna 1% SDS (100 µL). Takoj po ustavitvi reakcije smo na mikrotitrskem optičnem čitalniku (Mithras) izmerili A₄₂₀.

Primer 4 - Linija miši in pogoji nastanitve

Za živalski poskus smo izbrali linijo miši C57BL/6J kupljeno v vzrejnem centru Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Linija C57BL/6J je bila izbrana, ker je ena najbolj standardnih in preučenih linij miši (genom, fiziologija) ter ima preverjeno dobro odzivnost na okužbo s *H.*

pylori ter kaže boljšo kolonizacijo in histološke spremembe želodca od drugih standardnih linij miši. Glavni razlog za izbor te linije pa je v tem, da je bilo pokazano, da se ta linija na okužbo s *H. pylori* odzove pretežno z Th1 odzivom, kar je podobno kot pri ljudeh okuženih z *H. pylori*. Zato je ta linija primeren model za tovrstne študije in ekstrapolacijo rezultatov na človeka. Z zgornjim smo zadostili principom »3R« pri poskusih na živalih – principu »reduce« s premišljenim izborom ustrezne živalske vrste in linije, ki nam z najmanjšim možnim številom poskusnih živali zagotavlja statistično validne rezultate; principu »replace« z načrtom poskusa, ki je osnovan na predhodnih in vitro testih se zmanjša število testiranih pripravkov, ki so potencialno neučinkoviti ter principu »refine«, kjer smo z jemanjem manjših količin krvi skozi obdobje poskusa na isti živali zmanjšali število živali.

Živali so bile nastanjene v starosti med 8-10 tednov na inštitutu za mikrobiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Po individualni označitvi živali so bile za 2 tedna nastanjene v karanteni. Med poskusom smo živali redno pregledovali in tehtali, da bi v primeru izgube telesne mase do 15 % v primerjavi s telesno maso na začetku poskusa žival izločili iz poskusa. V poskusnem obdobju so bile miši hranjene s standardno krmo za vzdrževanje glodalcev Altromin 1324 (Lage, Nemčija). Celoten poskus so bile živali krmljene po volji razen na dneve oro-gastričnih aplikacij, ko smo živalim preko noči odvzeli hrano, da je bila aplikacija izvedena na prazen želodec. Živali so skozi celoten poskus imele stalen dostop do vode. V vsaki skupini (tretma) je bilo po 5 živali nastanjenih v isti kletki.

Fuzijski proteini

Primer 5 - Pridobivanje fuzijskega proteina

Transformacija bakterij in selekcija. Za produkcijo fuzijskih proteinov smo uporabili sev bakterij, ki se običajno uporablja za produkcijo proteinov. Transformacijo seva bakterij *E. coli* BL21 (DE3 pLysS) smo opravili po protokolu poznanem strokovnjakom s področja. Kompetentne bakterijske celice smo transformirali po kemičnem postopku in izolirali uspešne transformante na LB ploščah z dodatkom ampicilina. Posamezne bakterijske kolonije smo izolirali in preverili prisotnost plazmida, ki nosi zapis za fuzijski protein. Pozitivne bakterijske kolonije smo uporabili za produkcijo proteina v večjih količinah.

Proizvodnja fuzijskih proteinov. Izbrano kolonijo smo cepili v 100 ml tekočega medija LB z ampicilinom ter inkubirali čez noč pri 37°C in 180 obratih/min. Prekonočno kulturo smo

redčili do gostote bakterij, ki ustreza $A_{600nm} \sim 0,15$. Nadaljevali smo po protokolu, kot že opisano v primeru 3.

Čiščenje fuzijskih proteinov. Tehnike čiščenja proteinov so dobro poznane strokovnjakom in niso predmet izuma. Tu je opisan eden od možnih postopkov čiščenja proteinov. Bakterijske celice smo zbrali, sprali in lizirali z 30 ml pufru za lizo celic (0,1% natrijev deoksiholat, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) z dodanimi proteaznimi inhibitorji (Sigma). Lizirane celice smo dodatno sonicirali in s centrifugiranjem odstranili preostanke celic od supernatanta. Fuzijski protein, ki se je nahajal v supernatantu smo vezali na Ni-NTA kolono kondicionirano s pufrom za nativno vezavo (50 mM Tris/HCl pH 8,0/100 mM NaCl). Po spiranju nespecifično vezanih proteinov s pufrom za nativno vezavo z 20 mM imidazolom smo specifično vezane fuzijske proteine eluirali s pufrom za nativno vezavo z 250 mM imidazolom.

Tabela 3: Konstrukti plazmidov, ki smo jih uporabili za pripravo fuzijskih proteinov. Pomen posameznih fragmentov je razložena v primeru 1.

št. ime	sestava konstrukta
1 UreB	T7 _p -HPUreB-His _{tag} -HIS _t
2 HimFla-UreB	T7 _p -EcNfla-HpVfla-EcCfla-HPUreB-RGD-His _{tag} -HIS _t
3 HimFla-multi	T7 _p -EcNfla-HpVfla-EcCfla-multiepitop-RGD-His _{tag} -T7 _t
5 HimFla	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-RGD-His _{tag} -T7 _t

Fuzijska proteina številka 1 in 2 iz Tabele 3 smo eluirali s pufrom za nativno vezavo s 50 mM imidazolom, fuzijski protein številka 3 iz Tabele 3 pa z 250 mM imidazolom. Proteine smo dokazali z SDS-PAGE ter Western prenosom (Slika 1). Zbrane eluate smo 4 ure dializirali proti dializnem pufru (1xPBS/1mM EDTA) ter čez noč proti 1xPBS v takšnem volumnu, da je bila končna koncentracija imidazola v eluatih nižja od 0,05 mM. Za imunizacijo v miših smo dializirane eluate zmešali z Imject Alumom (Pierce) v razmerju 1:2.

Fuzijske proteine pridobljene iz bakterij transformiranih s plazmidi iz tabele 3 smo pripravili v večjih količinah za imunizacijo miši. Prisotnost proteinov smo potrdili z analizo po Westernu (opisana v primeru 2), kar je prikazano na sliki 2.

Primer 6 - Internalizacija fuzijskih proteinov v celičnih linijah

Internalizacijo fuzijskih proteinov v celice smo določili z mikroskopiranjem s konfokalnim mikroskopom. Tehnike in metode dela s konfokalnim mikroskopom, fiksacija in barvanje celičnih proteinov s protitelesi za upodabljanje proteinov in uporaba barvil za označevanje

organel so splošno poznane strokovnjakom in so tukaj opisane samo podrobnosti pomembne za demonstracijo izuma.

Namen eksperimenta je bil določiti ali je internalizacije fuzijskih proteinov v celico odvisna od prisotnosti receptorja TLR5. Fuzijske proteine smo označili z aktiviranim fluorescenčnim barvilom Alexa555 po navodilih proizvajalca (Molecular Probes). Fuzijske proteine-Alexa555 smo v koncentraciji opisanih v rezultatih dodali celičnim linijam HEK293.

Celične organele smo označevali z ustreznimi označevalci organel: endoplazemski retikulum smo označevali z barvilom ER-tracker (MolecularProbes), endosome in lizosome z barvilom Lyso-Tracker (MolecularProbes), transferin-Alexa633 (MolecularProbes) po navodilih proizvajalca.

Označene žive celice ali fiksirane celice smo pregledovali na konfokalnem mikroskopu Leica TCS SP5 na Leica DMI 6000 CS stojalu. Ta mikroskop je namenjen laserskemu skeniranju fluorescenčno označenih živih ali fiksiranih celic. Uporabljali smo 63× oljni imerzijski objektiv. Slike smo pridobili s programom LAS AF 1.8.0. Leica Microsystems. Uporaba laserjev je bila odvisna od valovnih dolžin, pri katerih smo želeli vzbujati.

Slika 3 prikazuje rezultate internalizacije z Alexo555 označenih proteinov po izumu. Na sliki so prikazani sledeči proteini označeni z barvilom Alexa555: [A,B] Barvilo Alexa555 (MolecularProbe) deaktivirano v Tris pufru pH 8.5; [C] Internalizacija proteina HimMulti označenega z Alexa555 (0.125 µg/µl); [D] Celice [C] dodatno barvane z LysoTrackerGreen (MolecularProbes) (50 mM); [E] Internalizacija proteina HimMulti označenega z Alexa555 (0.125 µg/µl) [F] Celice [E] dodatno barvane s SynptoRed; [G] Internalizacija proteina *Salmonella* FliC označen z Alexa555 (0.1 µg/µl) [H]; Celice [G] dodatno barvane s transferrin633 (MolecularProbes) (0,1 mg/ml). Proteini so bili raztopljeni v 200 µl PBS (25µg) in dodani celicam. Celice smo inkubirali s proteinom 1h inkubacije na 37°C.

Primer 7 - Aktivacija receptorja TLR5 v celičnih linijah s fuzijskimi proteini

Gojenje celičnih linij in transfekcija. Za gojenje celic in transfekcijo so izumitelji uporabili postopke in tehnike, ki so dobro poznane strokovnjakom.

Celične kulture smo gojili pri 37° C in 5 % CO₂ . Za njihovo gojenje smo uporabili gojišče DMEM z 10 % FBS, ki vsebuje vsa potrebna hranila, rastne faktorje. Ob zadostni gostoti celic smo jih presadili oziroma zredčili. Če smo jih želeli uporabiti pri poskusih, smo celice najprej prešteli s hemocitometrom in jih ustrezno število nacepili na mikrotitrsko ploščo s 96

luknjicami, primerno za gojenje celičnih kultur. Nacepljene plošče smo inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂, dokler celice niso dosegle primerne preraščenosti za transfekcijo. Za transfekcijo celic smo uporabili transfekcijske reagente GeneJuice, JetPei ali Lipofectamine. Transfekcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca po prilagojenem postopku za transfekcijo v mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami. Dan pred transfekcijo smo celice nacepili v ustrezno mikrotitrsko ploščo in jih gojili do ustrezne gostote. Na dan transfekcije smo najprej redčili ustrezno količino plazmidne DNA v mediju DMEM brez dodanega FBS. Ravno tako smo v DMEM brez FBS redčili transfekcijski reagent. Mešanici smo nato združili in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da so nastali transfekcijski kompleksi. Transfekcijsko mešanico smo dodali celicam in jih v inkubatorju inkubirali vsaj šestnajst ur.

Luciferazna aktivnost. Za luciferazno aktivnost smo uporabili test z dvema reporterjema: (a) kresničkina luciferaza (Fluc) in (b) Renilla luciferaza (Rluc). Kresničkina luciferaza (Fluc), ki za substrat uporablja CoA, ATP in luciferin, je funkcionalno povezana s promotorjem, ki zaznava aktivacijo NFκB transkripcijskega faktorja. Ob aktivaciji prirojene imunosti preko receptorjev TLR in MyD88 odvisne poti pride do aktivacije NFκB, kar je mogoče detektirati z merjenjem aktivnosti kresničkine luciferaze. Drugi reporter, ki se ga transficira v celice sočasno s plazmidom pFluc in plazmidi, ki nosijo zapis za preiskovane fuzijske proteine, služi kot reporter učinkovitosti transfekcije. Reporterski plazmid nosi zapis za Renillino luciferazo (Rluc), za katero je ustrezen substrat koelenterazin. Rluc se v celicah izraža neodvisno od pogojev.

Za analizo ekspresije reporterskih proteinov smo celice lizirali s pufrom po navodilih proizvajalca (Promega). Najprej smo izmerili aktivnost za kresničkino luciferazo (Fluc-IFNβ-FLUC) nato še aktivnost Renilla luciferaze (Rluc - <http://www.promega.com/vectors/prltk.txt>). Aktivnost Rluc nam torej pove delež transficiranih celic, medtem ko nam aktivnost Fluc kaže aktivacijo prirojene imunosti. Razmerje Fluc/Rluc (RLA – relativna luciferazna aktivnost) nam torej pove normalizirano vrednost stimuliranih celic glede na transficirane celice.

Iz rezultatov prikazanih na sliki 4 je razvidno, da fuzijska proteina HimFla in HimFla-multi (številki 5 in 3 v tabeli 3) aktivirata receptor TLR5 v enaki ali večji meri kakor sama pozitivna kontrola. Kot pozitivno kontrolo smo vzeli komercialen flagelin bakterije *Salmonella typhimurium*, za katerega vemo, da aktivira TLR5 signalno pot. Kot negativno kontrolo smo uporabili vodo. Iz rezultatov je jasno vidno, da je prišlo do aktivacije TLR5 signalne poti v primeru fuzijskega proteina HimFla, ki je aktiviral dvakrat bolje kakor pozitivna kontrola, kot

tudi v primeru fuzijskega proteina HimFla-multi, katerega aktivacija je približno enaka kot za pozitivno kontrolo. Meritve smo opravili 6 ur po aktivaciji. Koncentracije proteinov so bile približno 1 µg za HimFla in 5 µg za HimFla-multi.

Primer 8 - Protitelesa- vakcinacija s proteinsko vakcino (Fuzijski protein)

Testirali smo proteinski vakcini HimFla-UreB in HimFla-multi (številki 2 in 3 v tabeli 3), kot negativna kontrola je služil protein lizocim (Sigma) ter miši, kjer smo aplicirali samo reagente brez proteinov. Proteine smo aplicirali intraperitonealno, kjer je bil antigen v PBS zmešan z adjuvansom aluminijevim hidroksidom (Imject Alum, PIERCE) v razmerju 2 (protein) : 1 (AlOH). Končna količina vbrizganega antigena je bila 100 µg proteina v volumnu 300 µl. Ponovna (ojačevalna) vakcinacija je sledila 10 dni po prvi vakcinaciji za vse 4 zgoraj opisane proteine. Rekombinantni protein »himerni z multiepitopom na koncu« smo vakcinirali tudi na tak način, da smo prvo vakcinacijo izvedli intranazalno (50 ug rekombinantnega proteina v PBS, konc. 5 mg/ml) na žival v volumnu 10 ul – mišim smo z mikropipeto vakcino počasi aplicirali po 5 ul na vsako nosnico. Ojačevalno vakcinacijo smo izvedli intraperitonealno, kot je opisano zgoraj.

Odvzem krvi med poskusom. Miši smo za 15 minut prestavili v posebno ventilirano in ogrevano (40° C) kletko, kar omogoča vazodilatacijo in hitrejšo in lažje zbiranje krvi. Žival smo fiksirali v posebni napravi in na koncu repa aplicirali lokalni anestetik (Etilni klorid). S škarjami smo odrezali 1-2 mm konca repa in kri zbirali v posebne kivete. Živali smo odvzeli do največ 100 ul krvi. Rano na repu smo potem prevlekli s pasto srebrovega nitrata, da smo zaustavili krvavenje in pospešili celjenje. Na koncu poskusa smo kri zbirali po omamljanju s CO₂ s punkcijo srca.

Rezultati analize protiteles po vakcinaciji s proteinsko vakcino s testom ELISA: Da bi ugotovili potencialno profilaktično delovanje vakcinacije z rekombinantnimi fuzijskimi proteini HimFla-UreB in HimFla-multi (proteina št 2 in 3, tabela 3) smo v serumu imuniziranih laboratorijskih miši ugotavljali prisotnost IgG protiteles. Kot antigene smo uporabili sam rekombinanten protein HimFla-multi, rekombinatni protein UreB (protein št. 1, tabela 3) ter celični lizat bakterij *H. pylori*. Redčitveni niz titrov protiteles proti proteinski vakcini HimFla-UreB so prikazani na sliki 5A in proti vakcini HimFla-multi na sliki 5B. Vzorec 4-kratnih redčitvenih nizov (od redčitve 62,5-krat do 16000-krat) kaže pričakovan postopen padec titra protiteles v vsaki nadaljnji redčitvi, kar potrjuje validnost testa. Rezultati prikazani na obeh slikah (5A in 5B) pa nedvomno potrjujejo, da sta oba naša fuzijska proteina HimFla-UreB in HimFla-multi

inducirala močan imunski odziv, ki je statistično značilno odstopa od vrednosti negativnih kontrol ($P > 0,001$) tudi pri 16.000-kratni redčitvi. Dodaten argument, da je bil imunski odziv močan je podatek, da smo meritev opravili že 3 tedne po prvi vakcinaciji oziroma 11 dni po ojačevalni vakcinaciji. Še več, rezultati na obeh slikah (5A in 5B) kažeta, da so protitelesa proti antigenom HimFla-UreB in HimFla-multi reagirala tudi proti antigenom v celičnem lizatu *H. pylori*, kar pomeni, da so serumska protitelesa prepoznala tako očiščene rekombinantne proteine (stolpci z diagonalnimi črtami v histogramih slik 5A in 5B), kot tudi temperaturno-stabilne epitope v lizatu *H. pylori* ("pikčasti stolpci v histogramih slik 5A in 5B). Rezultati tako implicirajo, da vakcinacija z našimi fuzijskimi proteini lahko v imunskem sistemu sproži razvoj spominskih imunskih celic, ki se lahko kasneje mobilizirajo in zaščitijo organizem pred okužbo s *H. pylori*.

Bakterije s fuzijskim proteinom

Primer 9 - Priprava bakterij s fuzijskimi proteini izraženimi na površini za vakcinacijo.

Priprava brezflagelinskih sevov bakterije E. coli. Iz brezflagelinskega seva bakterije Escherichia coli JW1908-1 (CGSC Strain#: 9586) (Kan^r) smo najprej pripravili kompetentne celice, v katere smo vnesli zapis za T7 polimerazo s komercialnim kitom za lizogenijo (λ DE3 Lysogenization Kit, Novagen). Iz teh celic smo pripravili kompetentne celice v katere smo vnesli spodaj naštetе konstrukte.

Tabela 4: Uporabljeni konstrukti za izražanje na bakterijski površini. Sinteza plazmidov in pomen posameznih fragmentov je razložena v primeru 1.

št. ime	sestava konstrukta
1 UreB	T7 _p -HPureB-His _{tag} -HIS _t
2 HimFla-UreB	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-HPureB-RGD-His _{tag} -HIS _t
3 HimFla-multi	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-multiepitop-RGD-His _{tag} -T7 _t
4 HimFla	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-RGD-His _{tag} -HIS _t
5 HimFla	T7 _p -EcNfliC-HpVfla-EcCfliC-RGD-His _{tag} -T7 _t
6 HimFla-multi	T7 _p -EcNfliC HpVfla213-multiepitop- 215HpVfla EcCfliC-HIS _t
7 HimFla-multi	T7 _p -EcNfliC HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCfliC-T7 _t
8 FliC	T7 _p -EcfliC-T7 _t
9 HimFla-ureB	TetRRBS _p -EcNfliC HpVfla213-ureB-215HpVfla EcCfliC- HIS _t
10 HimFla-multi	TetRRBS _p -EcNfliC HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCfliC- HIS _t
12 HimFla-ureB	T7 _p - EcNfliC HpVfla213-ureB-215HpVfla EcCfliC- HIS _t

Priprava bakterij za miške. Na miškah smo testirali bakterije *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) z vnešeno T7 polimerazo in konstruktoma HimFla-multi v pET vektorju ter TetRRBS . Izražanje proteina smo inducirali z dodatkom IPTG. Nato smo izmerili absorbanco in na podlagi umeritvene krivulje izračunali kakšen volumen kulture moramo odpipetirati, da bo št. celic v 1 ml 10⁹. Bakterije smo sprali in resuspendirali v sterilnem 1x PBS. Miške smo cepili oralno in nazalno s pripravljeno bakterijsko raztopino. Kontrolno skupino mišk smo cepili z bakterijami, v katere smo transformirali prazen plazmid (TetRRBS)

Izražanje proteinov v bakterijah. V *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo smo transformirali konstrukte iz tabele 4, št. vzorca v tabeli 4: 4, 5, 9 in 12.

Slika 6 prikazuje izražanje fuzijskih proteinov v bakterijah. Postopek smo izvedli kot je opisano v primeru 2. Proteine smo dokazovali v celičnem lizatu v supernatantu (SN) in v raztopljenih inkluzijskih telescih (RIT). Iz rezultatov je vidno, da so lise za protein HimFla-ureB, (št. 12; tabela 4) (SN1 in RIT1), ki je velik 57,9 kDa na pravi višini, tako v supernatantu, kot v inkluzijskih telescih. Prav tako smo pokazali prisotnost HimFla (št. 4, tabela 4) (SN3), ki je velik 54,8 kDa, ter HimFla-ureB (SN8 in RIT8), (št. 9, tabela 4), ki je velik 57,9 kDa. Na približno enaki višini kot je pričakovano se nahaja tudi lisa za protein HimFla (št. 5, tabela 4) (SN9 in RIT9), ki je velik 54,8 kDa.

Dokaz proteinov na površini bakterij in vivo. Proteine na površini bakterij smo dokazovali na bakterijah, ki smo jih pripravili za dokaz izražanja proteinov (Tabela 4). Zbrane celice smo

najprej dvakrat sprali z 1x PBS in jim dodali 1x PBS/3 % BSA (bovine serum albumin) ter inkubirali 60 min na sobni temperaturi z rahlim stresanjem. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali in zavrgli supernatant. Peletu smo dodali primarna protitelesa (Ab-TLR3 His) v končni koncentraciji 2,5 ng/ μ l, ki se specifično vežejo na histidinski ostanek. Sledila je 60 minutna inkubacija na sobni temperaturi in stresanju. Primarna protitelesa smo 3x sprali z 1xPBS/ 3 % BSA. Vzorcju smo nato dodali sekundarna protitelesa (Anti-mouse IgG-FITC), v končni koncentraciji 1,5 ng/ μ l. Sekundarna protitelesa so označena s fluorescenčnim barvilom in se specifično vežejo na primarna protitelesa. Sekundarna protitelesa smo inkubirali 60 minut pri sobni temperaturi in v temi. Protitelesa smo 3x sprali z 1xPBS/ 3 % BSA. Celice smo resuspendirali v 1xPBS in jih pogledali pod mikroskopom. Za detekcijo barvanih bakterij smo uporabili konfokalni mikroskop (Ar-ion laser, vzbujanje pri 488nm, detekcija pri 500 do 530 nm). Bakterije, ki vsebujejo fuzijski protein so na slik obarvane belo.

Rezultati so prikazani na sliki 7. Prisotnost fuzijskih proteinov na površini bakterij smo določili za fuzijske proteine: (A) HimFla (št. 4), (B) HimFla-ureB (št. 12), (C) HimFla-ureB (št. 9), in (D) HimFla-multi (št. 3, vsi tabela 4). Za negativno kontrol (E) smo vzeli bakterije transformirane z plazmidom brez inserta.

Test gibljivosti brezflagelinskih bakterij s fuzijskim proteinom. Funkcionalnost rekombinantnih flagelinov smo želeli preveriti s testom gibljivosti. V *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo smo transformirali plazmidne konstrukte, ki izražajo fuzijske proteine (Tabela 4). Transformacijsko mešanico smo nacepili na ploščo LB Amp Kan Cm (ampicilin kanamicin kloramfenikol) z dodanim IPTG. Zrasle kolonije smo nato precepili na ploščo LB Amp Kan Cm za test gibljivosti z 0,35 % agarjem. Ploščo smo inkubirali na 30°C 12 ur.

Rezultat gibljivosti je prikazan na sliki 8. Iz rezultatov je vidno, da je bila negativna kontrola (bakterije *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo brez flagelinov) negibljiva (glej desno ploščo). Medtem ko so bakterije, v katere smo transformirali konstrukte za HimFla v pSB1.AK3 (št.4) Vzorci: 1 do 10; HimFla-ureB (št.12) Vzorci: 11 in 12; HimFla-ureB (št.9) Vzorci: 13 do 20; HimFla (št. 5) Vzorci: 21 do 25; HimFla-multi (št. 7) Vzorci: 26 do 30; FliC (št. 8) Vzorci: 35 do 38, HimFla v pSB1.AK3 (št.4) Vzorci: 39 do 42 bile na plošči gibljive. Vzorce od 43 do 49 smo pustili prazne, zato na plošči ni kolonij. Gibljivost bakterij je opazna kot svetel obroč okoli kolonij.

Primer 10 - Aktivacija receptorja TLR5 v celičnih linijah z bakterijami s fuzijskimi proteini

Stimulacija bakterij, ki na površini izražajo transformiran konstrukt.

Priprava celičnih linij z receptorjem TLR5 in merjenje aktivacije reporterskega sistema - luciferazne aktivnosti sta opisana v primeru 7. Dan pred transfekcijo smo celice nacepili na mikrotitrsko ploščo in jih gojili do ustrezne gostote celic. Receptor TLR5 smo stimulirali z *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo v katero smo transformirali ustrezen konstrukt. Aktivacijo smo preverjali za bakterije *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo transformirane s konstrukti za rekombinantne proteine FliC (št. 8), HimFla-ureB (št.9) (vsi tabela 4).

Celice smo pripravili na enak način kot za test izražanja proteinov na površini bakterije. Bakterije, ki smo jih pripravili smo zbrali in jih 3x sprali v 1x PBS. Nato smo pripravili redčitveno vrsto. Na celični liniji HEK 293, v katere smo transficirali TLR5, smo testirali redčitvi 10^8 in 10^4 . Testne bakterije smo razdelili v dve skupini, pri čemer smo eno skupino bakterij inkubirali 20 minut pri 70°C, drugo skupino pa isti čas pri 4°C.

Iz rezultatov ki so prikazani na sliki 9 je vidno, da so bakterije *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo in transformirane s konstruktom za fuzijski protein HimFla-UreB, aktivirale receptor TLR5 v primerjavi s kontrolo. Receptor TLR5 je aktiviral tudi rekombinantni protein FliC, ki smo ga izražali v bakteriji *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo. Protein HimFla-UreB je aktiviral le v primeru bakterij, ki so bile inkubirane 20 min pri 70°C, medtem ko je rekombinantni protein FliC v bakteriji *E. coli* JW1908-1 (Kan^r) s T7 polimerazo, aktiviral TLR5 signalno pot v primeru živih bakterij, ki smo jih 20 min inkubirali na 4°C.

Primer 11 - Internalizacija bakterij

Internalizacijo bakterij v celice smo določili z mikroskopiranjem s konfokalnim mikroskopom.

Namen eksperimenta je bil določiti ali pride do internalizacije bakterij, ki vsebujejo fuzijski protein v celico. Bakterije smo pripravili na enak način kot v primeru 10, z izraženim fuzijskim proteinom z zelenim fluorescirajočim proteinom, ki smo jih v koncentracijah od 10^2 do 10^8 dodali celicam in spremljali internalizacijo bakterij po 24 urah.

Celične organele smo označevali z ustreznimi označevalci organel: endoplazemski retikulum smo označevali z barvilom ER-tracker (MolecularProbes), endosome in lizosome z barvilom Lyso-Tracker (MolecularProbes).

Označene žive celice ali fiksirane celice smo pregledovali na konfokalnem mikroskopu Leica TCS SP5 na Leica DMI 6000 CS stojalu. Ta mikroskop je namenjen laserskemu skeniranju

fluorescenčno označenih živih ali fiksiranih celic. Uporabljali smo 63× oljni imerzijski objektiv. Slike smo pridobili s programom LAS AF 1.8.0. Leica Microsystems.

Na sliki 10 prikazujemo sposobnost internalizacije bakterij v celicah CaCo-2. Preverili smo internalizacijo bakterij, ki so na površini izražale proteinske konstrukte z mCeruleaan označevalcem. [A] bakterije z označevalcem mCerulean; [B] LysoTracker (MolecularProbes); [C] bakterija z mCerulean; [D] prekrivanje slike [C] in slike s presevno svetlobo.

DNA fuzijskega protein

Primer 12 - Izražanje fuzijskega proteina v celičnih linijah HEK293, HEK293T

Z namenom ugotavljanja možne uporabe fuzijskih proteinov po izumu za DNA cepivo smo preverili ali se fuzijski proteini izražajo v celičnih linijah.

Gojenje celic, transfekcija so opisani v poglavju Fuzijski proteini-primer 7. Vzorce (supernatante celic HEK293T, transficiranih z 250 ng plazmida z zapisom za plazmide iz tabele 5) smo najprej centrifugirali 3 min pri 10000 vrt/min, da smo jim odstranili morebitne ostanke celic. Supernatantu smo dodali 4 x reducirajoči vzorčni pufer z SDS in jih denaturirali s segrevanjem 5 min pri 100° C. Proteine smo ločili na SDS-PAGE elektroforezi in fuzijski protein po prenosu na najlonsko membrano detektirali s protitelesi proti heksahistidinskemu repu.

Tabela 5: Konstrukti plazmidov, ki smo jih uporabili za izražanje v celičnih linijah. Pomen posameznih fragmentov je razložen v primeru 1.

št. ime	sestava konstrukta
13 UreB	CMVp-ss- HPUREB-HIS _{tag} -HIS _t
14 ssHimFla-UreB	CMVp-ss -EcNflic-HpVfla-EcCflic-HPUREB-RGD-HIS _{tag} -HIS _t
15 HimFla	CMVp-ss- EcNflic-HpVfla-EcCflic-RGD-HIS _{tag} -HIS _t
16 ssHimFla-multi	CMVp- ss- EcNflic HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCflic- RGD-HIS _{tag} -HIS _t
17 HimFla-UreB	CMVp - EcNflic-HpVfla-EcCflic-HPUREB -RGD-HIS _{tag} -HIS _t
18 HimFla-multi	CMVp- EcNflic HpVfla213-multiepitop-215HpVfla EcCflic - RGD-HIS _{tag} -HIS _t

Primer 13 - Aktivacija receptorja TLR5 v celičnih linijah z DNA fuzijskimi proteini

Namen tega eksperimenta je pokazati, da fuzijski proteini, ki se izražajo v celičnih linijah, aktivirajo receptor TLR5. Z metodo z dvojnim reporterjem, ki je opisana v primeru 7 smo določali celični odziv na prisotnost fuzijskega proteina.

Za transfekcijo celičnih linij smo uporabili sledečo DNA v naslednjih koncentracijah: pFluc 0,42 ng/ μ l , pRluc 0,08 ng/ μ l , tarčne plazmide iz tabele 5 smo dodali v količinah 50 ali 100 ng.

V eksperimentu smo uporabili celice HEK293, ki so bile transficirane s praznim plazmidom, ki služi kot kontrola aktivacije TLR5 signalne poti brez transfekcije receptorja TLR5, ter celice, ki smo jim s transfekcijo vnesli zapis za receptor TLR5 in DNA fuzijske proteine. Iz rezultatov je jasno vidno, da sta fuzijska proteina ss-HimFla-UreB in ss-HimFla-multi aktivirala receptor TLR5 v primerjavi s pozitivno kontrolo, ki je bila v obeh primerih nižja. Celice smo stimulirali s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium* in jih po 6 urah stimulacije lizirali. Nestimuliranim celicam smo kot kontrolo dodali MQ. Kot negativno kontrolo smo celice transficirali s praznim plazmidom in jih stimulirali s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium*. Aktivacija na teh celicah je bila zanemarljiva in je posledica nizkega izražanja receptorja TLR5 v HEK293.

Na celicah smo testirali dve različni koncentraciji DNA fuzijskega flagelina (50 in 100 ng DNA), pri čemer po pričakovanjih, aktivacija receptorja TLR5 naraščala z naraščajočo koncentracijo transficirane DNA.

Aktivacijo TLR5 smo testirali za fuzijska proteina ssHimFla-UreB (št. 2) in ssHimFla-multi (št. 4). Celice smo lizirali 6 ur po stimulaciji in izmerili luciferazno aktivnost. Sam antigen/ureaza od *H. pylori* ne aktivira receptorja TLR5, medtem ko v povezavi s himernim flagelinom in signalno sekvenco za transport iz celice, sproži aktivacijo.

Iz rezultatov na sliki 11 je vidno, da je bila za aktivacijo TLR5 signalne poti potrebna prisotnost signalne sekvence, ki omogoča transport proteinov iz celice. Celice, ki so bile transficirane z DNA fuzijskim flagelinom brez signalne sekvence, niso aktivirale TLR5 signalne poti, medtem ko je aktivacija jasno izražena za DNA fuzijski flagelin, ki je imel zapis za signalno sekvenco. V celice HEK293 smo vnesli naraščajoči koncentraciji konstrukta ss-HimFla-multi in HimFla-multi. Celice smo stimulirali s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium* in jih po 6 urah stimulacije lizirali. Nestimuliranim celicam smo kot kontrolo dodali MQ. Kot negativno kontrolo smo celice transficirali s praznim plazmidom in jih stimulirali s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium*. Aktivacija na teh celicah je bila zanemarljiva in je posledica nizkega izražanja receptorja TLR5 v HEK293.

Stimulacija sosednjih celic, ki same ne proizvajajo fuzijskega proteina s flagelinom

Namen eksperimenta je bi ugotoviti, če vnos vakcine v obliki DNA zapisa za fuzijske proteine s flagelinom, kot so na primer epitelijske ali mišične celice lahko stimulirajo imunski odziv sosednjih celic, ki izražajo receptor TLR5. Ta rezultat je pomemben za ugotovitev uporabnosti DNA vakcine.

Celice, ki izražajo flagelin v citosolu lahko aktivirajo citosolne receptorje družine Ipaf ter NAIP5, ki vodijo do piroptoze ter lokalne nekroze, ki lahko stimulira imunski odziv.

DNA z zapisom za fuzijski protein flagelina in multiepitopa smo vnesli v HEK293 celice in sicer zapis, ki je vseboval pred kodirajočim zaporedjem za flagelin tudi zapis za signalni peptid in brez njega. V kulturo celic smo dodali tudi celice HEK293 v katere smo vnesli zapis za človeški TLR5 ter reporterska plazmida s kresničkino luciferazo pod kontrolo NF-kB odzivnega promotorja in konstitutivni reporter z Renilla luciferazo. Osem 24 ur po transfekciji smo celice zmešali v razmerju 1:1 in jih nasadili v mikrotitrsko ploščo ter po 24 urah izmerili aktivacijo celic s pomočjo dvojnega luciferaznega testa. Aktivnost luciferaze je merilo sposobnost aktivacije TLR5 preko fuzijskega flagelina, ki se je izločal iz celic ter flagelina, ki se je izražal v citosolu celic in verjetno povzročil njihov propad ter sprostitvev celične vsebine. V obeh primerih smo zaznali značilno povečanje aktivacije celic, kar kaže, da v organizmu lahko vnos DNA cepiva, ki vsebuje zapis za himerni flagelin povzroči stimulacijo celic, ki imajo na svoji površini receptor TLR5 ter sprožijo imunski odziv.

Iz rezultatov na sliki 12 je vidno, da so celice, ki so izražale DNA fuzijski flagelin s signalno sekvenco bolje aktivirale sosednje celice, ki so izražale le TLR5 od tistih, ki so se izražali v citosolu. Aktivacijo v celicah brez signalne sekvence lahko razložimo s piroptozo, ki je posledica izražanja flagelina v citosolu celice. Posledično pride do propada celice in sproščanja citosolnega flagelina iz celice, kar povzroči aktivacijo TLR5 signalne poti v sosednjih celicah, ki izražajo le receptor TLR5. Celice smo stimulirali z 10 ng/ml flagelina bakterije *Salmonella typhimurium* in jih po 6 urah stimulacije lizirali. Nestimuliranim celicam smo kot kontrolo dodali MQ. Kot negativno kontrolo smo celice transficirali s praznim plazmidom in jih stimulirali s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium*. Aktivacija na teh celicah je bila zanemarljiva in je posledica nizkega izražanja receptorja TLR5 v HEK293.

Primer 14. Imunizacija z elektroporacijo

Z metodo elektroporacije (Tevž s sod. 2008; Gene electrotransfer into murine skeletal muscle : a systematic analysis of parameters for long-term gene expression. *Technology in cancer*

research and treatment, 2008, vol. 7, no. 2, p. 91-101) smo testirali konstrukte št. 2 in 4 iz tabele 5. DNA konstrukti so bili izolirani s QIAGEN endo free reagenti (Qiagen, Hilden Nemčija) in razredčeni v sterilnem PBS do koncentracije 1 ug / ul. Pri obeh konstruktih smo uporabili subkutano aplikacijo (50 ul) s tanko iglo 29G (Myjector, Terumo Japonska) ter intramuskularno aplikacijo v mišico desne noge musculus tibialis cranialis, kjer smo injicirali 20 ul DNA raztopine.

Miši smo najprej anestezirali z vdihavanjem izoflurana, na mestu aplikacije smo odstranili dlake in injicirali DNA raztopino. Na mesto podkožnega mehurčka (pri subkutani) ter okrog stegna (pri intramuskularni) smo namestili dve paralelni elektrodi iz nerjavečega jekla (dimenzije 30 mm x 10 mm), ki sta si bili oddaljeni 6 mm (IGEA, Carpi, Italija). Električne pulze smo sprožili z napravo Cliniporator (IGEA, Carpi Italija) preko elektrod, katere smo predhodno namazali z gelom za ultrazvok za boljšo prevodnost. Subkutano elektroporacijo smo izvedli z enim pulzom 600 V/cm, 100 us kateremu je sledil en pulz 84 V/cm 400 ms, 1 Hz. Intramuskularno elektroporacijo pa z enim pulzom 360 V/cm, 100 us kateremu so sledili štirje pulzi 48 V/cm, 100 ms, 1 Hz. Vse miši so dobile ojačevalno vakcinacijo 10 dni po prvi vakcinaciji. Po primernem obdobju po zadnji ojačevalni vakcinaciji smo živalim zbirali kri za testiranje prisotnosti protiteles ter jih okužili z bakterijam *H. pylori* za evalvacijo terapevtskega učinka na zmanjšanje kolonizacije ali popolno eradikacijo okužbe iz želodcev.

Pokazali smo povečanje količine protiteles IgG proti antigenom fuzijskega proteina uporabljenim v imunizacij v primerjavi s količino protiteles kontrolnih mišk, ki so bile imunizirane samo s plazmidom brez inserta. Povečanje protiteles je bilo mogoče zaznati tudi v primerjavi s količino protiteles pri miškah imuniziranih samo z ureazo B.

SEQ ID NO: 1

Izvor: Flagelin sredinski del

Organizem: Helicobacter pylori

PRT

ALITASGDIS LTFKQVDGVN DVTLESVKVS SSAGTGIGVL AEVINKNSNR TGVKAYASVI	60
TTSDVAVQSG SLSNLTNGI HLGNIADIKK NDS DGRLVAA INAVTSETGV EAYTDQKGRL	120
NLRSIDGRGI EIKTDSVSNG PSALTMVNGG QDLTKGSTNY GRLSLTRLDA KSINVVSASD	180
SQHLGFTAIG FGESQVAETT VNLRDVTGNF NANVKSASGA NYNAVIASGN QSLGSGVTTL	240
R	241

SEQ ID NO: 2

Izvor: Flagelin sredinski del EcCfliC

Organizem: Escherichia coli

PRT

AVANGKTTDP LKALDDAIAS VDKFRSSLGA VQNR LDSAVT NLNNTTTNLS EAQSRIQDAD	60
YATEVSNMSK AQIIQQAGNS VLAKANQVPQ QVLSLLQG	98

SEQ ID NO: 3

Izvor: Flagelin sredinski del EcCfliC

Organizem: Escherichia coli

DNA

gctgttgcaa atggtaaaac cacggatccg ctgaaagcgc tggacgatgc tatcgcatct	60
gtagacaaat tccgttcttc cctcgggtgcg gtgcaaaaacc gtctggattc cgcggttacc	120
aacctgaaca acaccactac caacctgtct gaagcgcagt cccgtattca ggacgccgac	180
tatgcgaccg aagtgtccaa tatgtcgaaa gcgcagatca tccagcaggc cggtaactcc	240
gtgttggtgcaa aagctaacca ggtaccgcag caggttctgt ctctgctgca ggggttaa	297

SEQ ID NO: 4

Izvor: Flagelin sredinski del EcNfliC213

Organizem: Escherichia coli

PRT

MAQVINTNSL SLITQNNINK NQSALSSSIE RLSSGLRINS AKDDAAGQAI ANRFTSNIKG	60
LTQAARNAND GISVAQTTEG ALSEINNNLQ RVRELTQVAT TGTNSES DLS SIQDEIKSRL	120
DEIDRVSGQT QFNGVNV LAK NGSMKIQVGA NDNQTITIDL KQIDAKTLGL DGFSVKALIT	180
ASGDISLTFK QVDGVNDVTL ESVKVSSSAG TG	212

SEQ ID NO: 5

Izvor: Flagelin sredinski del EcNfliC213

Organizem: Escherichia coli

DNA

atggcacaag tcattaatac caacagcctc tcgctgatca ctcaaaataa tatcaacaag	60
aaccagtctg cgctgtcgag ttctatcgag cgtctgtctt ctggcttgcg tattaacagc	120
gcgaaggatg acgcagcggg tcaggcgatt gctaaccgtt tcacctctaa cattaaaggc	180
ctgactcagg cgccccgtaa cgccaacgac ggtatctccg ttgcgcagac caccgaaggc	240
gcgctgtccg aaatcaacaa caacttacag cgtgtgcgtg aactgacggt acaggccact	300
accggtacta actctgagtc tgatctgtct tctatccagg acgaaattaa atcccgtctg	360
gatgaaattg accgcgtatc tggtcagacc cagttcaacg gcgtgaacgt gctggcaaaa	420
aatggctcca tgaaaatcca ggttggcgca aatgataacc agactatcac tatcgatctg	480
aagcagattg atgctaaaac tcttggcctt gatggtttta gcgttaaagc gttaatcacg	540
gcttctgggg atattagctt gactttttaa caagtggatg gcgtgaatga tgtaacttta	600
gagagcgtaa aagtttctag ttcagcaggc acaggg	636

SEQ ID NO: 6

Izvor: Flagelin sredinski del EcfliC

Organizem: Escherichia coli

PRT

MAQVINTNSL SLITQNNINK NQSALSSSIE RLSSGLRINS AKDDAAGQAI ANRFTSNIKG	60
LTQAARNAND GISVAQTTEG ALSEINNQLQ RVRELTVQAT TGTNSEDLS SIQDEIKSRL	120
DEIDRVSGQT QFNGVNVLA NGSMKIQVGA NDNQTITIDL KQIDAKTLGL DGFSVKNNDT	180
VTTAPVTAF GATTTNNIKL TGITLSTEAA TDTGGTNPAS IEGVYTDNGN DYYAKITGGD	240
NDGKYYAVTV ANDGVTMTAT GATANATVTD ANTTKATTIT SGGTPVQIDN TAGSATANLG	300
AVSLVKLQDS KGNDTDYAL KDTNGNLYAA DVNETTGAVS VKTITYTDSS GAASSPTAVK	360
LGGDDGKTEV VDIGKTYDS ADLNGGNLQT GLTAGGEALT AVANGKTTDP LKALDDAIAS	420
VDKFRSSLGA VQNRLDASVT NLNNTTTNLS EAQSRIQDAD YATEVSNMSK AQIIQQAGNS	480
VLAQANQVPQ QVLSLLQG	498

SEQ ID NO: 7

Izvor: Flagelin sredinski del EcfliC

Organizem: Escherichia coli

DNA

atggcacaag tcattaatac caacagcctc tcgctgatca ctcaaaataa tatcaacaag	60
aaccagtctg cgctgtcgag ttctatcgag cgtctgtctt ctggcttgcg tattaacagc	120
gcgaaggatg acgcagcggg tcaggcgatt gctaaccgtt tcacctctaa cattaaaggc	180

ctgactcagg	cggcccgtaa	cgccaacgac	ggtatctccg	ttgcgcagac	caccgaagge	240
gcgctgtccg	aaatcaacaa	caacttacag	cgtgtgcgtg	aactgacggt	acaggccact	300
accggtacta	actctgagtc	tgatctgtct	tctatccagg	acgaaattaa	atcccgtctg	360
gatgaaattg	accgcgatc	tggtcagacc	cagttcaacg	gcgtgaacgt	gctggcaaaa	420
aatggctcca	tgaaaatcca	ggttggcgca	aatgataacc	agactatcac	tatcgatctg	480
aagcagattg	atgctaaaac	tcttggcctt	gatggtttta	gcgttaaaaa	taacgataca	540
gttaccacta	gtgctccagt	aactgctttt	ggtgctacca	ccacaaacaa	tattaaactt	600
actggaatta	ccctttctac	ggaagcagcc	actgatactg	gcggaactaa	cccagcttca	660
attgagggtg	tttatactga	taatggtaat	gattactatg	cgaaaatcac	cgggtggtgat	720
aacgatggga	agtattacgc	agtaacagtt	gctaattgatg	gtacagtgc	aatggcgact	780
ggagcaacgg	caaatagcaac	tgtaactgat	gcaaatacta	ctaaagctac	aactatcact	840
tcaggcggtg	cacctgttca	gattgataat	actgcagggt	ccgcaactgc	caaccttggg	900
gctgttagct	tagtaaaaact	gcaggattcc	aagggtaatg	ataccgatac	atatgcgctt	960
aaagatacaa	atggcaatct	ttacgctgcg	gatgtgaatg	aaactactgg	tgctgtttct	1020
gttaaaaacta	ttacctatac	tgactcttcc	ggtgccgcca	gttctccaac	cgcgggtcaaa	1080
ctgggcggtg	atgatggcaa	aacagaagtg	gtcgatattg	atggtaaaac	atacgattct	1140
gccgatttaa	atggcggtaa	tctgcaaaca	ggtttgactg	ctgggtggtga	ggctctgact	1200
gctgttgcaa	atggtaaaac	cacggatccg	ctgaaagcgc	tggaacgatgc	tatcgcatct	1260
gtagacaaat	tccgttcttc	cctcgggtgcg	gtgcaaaacc	gtctggattc	cgcggttacc	1320
aacctgaaca	acaccactac	caacctgtct	gaagcgcagt	cccgtattca	ggacgccgac	1380
tatgcgaccg	aagtgtccaa	tatgtcgaaa	gcgcagatca	tccagcaggc	cggtaactcc	1440
gtgttggtg	aaagctaacca	ggtaccgcag	caggttctgt	ctctgctgca	gggttaa	1497

SEQ ID NO: 8

Izvor: Flagelin sredinski del EcNfliC

Organizem: Escherichia coli

PRT

MAQVINTNSL	SLITQNNINK	NQSALSSSIE	RLSSGLRINS	AKDDAAGQAI	ANRFTSNIKG	60
LTQAARNAND	GISVAQTTEG	ALSEINNNLQ	RVRELTIVQAT	TGTNSESCLS	SIQDEIKSRL	120
DEIDRVSGQT	QFNGVNVLAK	NGSMKIQVGA	NDNQTITIDL	KQIDAKTLGL	DGFSVK	176

SEQ ID NO: 9

Izvor: Flagelin sredinski del EcNfliC

Organizem: Escherichia coli

DNA

atggcacaag	tcattaatac	caacagcctc	tcgctgatca	ctcaaaataa	tatcaacaag	60
aaccagtctg	cgctgtcgag	ttctatcgag	cgtctgtctt	ctggcttgcg	tattaacagc	120
gcgaaggatg	acgcagcggg	tcaggcgatt	gctaaccggt	tcacctctaa	cattaaaggc	180

- 45 -

ctgactcagg	cggcccgtaa	cgccaacgac	ggtatctccg	ttgcgagac	caccgaaggc	240
gcgctgtccg	aaatcaacaa	caacttacag	cgtgtgctg	aactgacggt	acaggccact	300
accggtacta	actctgagtc	tgatctgtct	tctatccagg	acgaaattaa	atcccgtctg	360
gatgaaattg	accgcgtatc	tggtcagacc	cagttcaacg	gcgtgaacgt	gctggcaaaa	420
aatggctcca	tgaaaatcca	ggttggcgca	aatgataacc	agactatcac	tatcgatctg	480
aagcagattg	atgctaaaac	tcttggcctt	gatggtttta	gcgttaaa		528

SEQ ID NO: 10

Izvor: Flagelin sredinski del EcCfliC215

Organizem: Escherichia coli

PRT

GVLAEVINKN	SNRTGVKAYA	SVITTSDDAV	QSGSLSNLTL	NGIHLGNIAD	IKKNDSDGRL	60
VAAINAVTSE	TGVEAYTDQK	GRLNLRSIDG	RGIEIKTDSV	SNGPSALTMV	NGGQDLTKGS	120
TNYGRSLSTR	LDKASINVVS	ASDSQHLGFT	AIGFGESQVA	ETTVNLRDVT	GNFNANVKSA	180
SGANYNAVIA	SGNQSLGSGV	TTLRAVANGK	TTDPLKALDD	AIASVDKFRS	SLGAVQNRLD	240
SAVTNLNNTT	TNLSEAQSRI	QDADYATEVS	NMSKAQIIQQ	AGNSVLAKAN	QVPQQVLSLL	300
QG						302

SEQ ID NO: 11

Izvor: Flagelin sredinski del EcCfliC215

Organizem: Escherichia coli

DNA

ggcgtgttag	cagaagtgat	caataaaaac	tctaaccgaa	caggggttaa	agcttatgcg	60
agcgttatca	ccacgagcga	tgtggcggtc	cagtcaggaa	gtttgagtaa	tttaacctta	120
aatgggattc	atttggttaa	tatcgagat	attaagaaaa	acgactcaga	cggaagggtta	180
gtcgcagcga	tcaatgcggt	cacttcagaa	accggtgtgg	aagcttatac	ggatcaaaaa	240
gggcgcttga	atttgcgag	tatagatggt	cgtgggattg	aaatcaaaaac	cgacagcgtc	300
agtaacgggc	ctagcgcttt	aacgatggtc	aatggcggtc	aggatttaac	aaaaggctct	360
actaactacg	gaaggctttc	tctcacacga	ttagacgcta	agagcatcaa	tgtcgtttcg	420
gcttctgact	cacagcattt	aggcttcacg	gcgattggtt	ttggggaatc	tcaagtggca	480
gaaaccacgg	tgaatttgcg	cgatgttact	gggaatttta	acgctaattgt	caaatcagcc	540
agtggcgcgga	actataacgc	cgtgatcgct	agcggtaacc	aaagcttggg	atctgggggtt	600
acaaccttaa	gagctgttgc	aaatggtaaa	accacggatc	cgctgaaagc	gctggacgat	660
gctatcgcat	ctgtagacaa	attccgttct	tccctcgggtg	cggtgcaaaa	ccgtctggat	720
tccgcgggtta	ccaacctgaa	caacaccact	accaacctgt	ctgaagcgca	gtcccgtatt	780
caggacgcgg	actatgcgac	cgaagtgtcc	aatatgtcga	aagcgcagat	catccagcag	840
gccggtaact	ccgtgttggc	aaaagctaac	caggtaccgc	agcaggttct	gtctctgctg	900
cagggttaa						909

SEQ ID NO: 12

Izvor: UreazeB

Organizem: Helicobacter pylori

PRT

MKKISRKEYV SMYGPTTGDK VRLGDTDLIA EVEHDYTIYG EELKFGGGKT LREGMSQSNN	60
PSKEELDLII TNALIVDYG IYKADIGIKD GKIAGIGKGG NKDMQDGVKN NLSVGPATEA	120
LAGEGLIVTA GGIDTHIHFI SPQQIPTAFA SGVTTMIGGG TGPADGTNAT TITPGRRLNK	180
FMLRAAEEYS MNFGFLAKGN VSNDASLADQ IEAGAIGFKI HEDWGTTTPSA INHALDVADK	240
YDVQVAIHTD TLNEAGCVED TMAAIAGRTM HTFHTEGAGG GHAPDIKVA GEHNILPAST	300
NPTIPFTVNT EAEHMDMLMV CHHLDKSIKE DVQFADSRIR PQTIAAEDTL HDMGIFSITS	360
SDSQAMGRVG EVITRTWQTA DKNKKEFGRL KEEKGDNDNF RIKRYLSKYT INPAIAHGIS	420
EYVGSVEVGK VADLVWSPA FFGVKPNMII KGGFIALSQM GDANASIPTP QPVYYREMFA	480
HHGKAKYDAN ITFVSQAAYD KGIKEELGLE RQVLPVKNCR NITKKDMQFN DTTAHIEVNP	540
ETYHVFVDGK EVTSKPANKV SLAQLFSIF	569

SEQ ID NO: 13

Izvor: His_t (E. coli his terminator)

Organizem: Escherichia coli

DNA

tccggcaaaa aaacgggcaa ggtgtcacca ccctgccctt tttctttaa accgaaaaga	60
ttacttcgcg tt	72

SEQ ID NO: 14

Izvor: Multiepitop: UreB epitop; Swiss prot P69997 AK: 314-339

Organizem: Helicobacter pylori

PRT

HMDMLMVCHH LDKSIKEDVQ FADSRI	26
------------------------------	----

SEQ ID NO: 15

Izvor: Multiepitop: VacA epitop; Swiss prot Q48245 AK 368-487

Organizem: Helicobacter pylori

PRT

QKTEVQPTQV IDGPFAGGKD TVVNIDRINT KADGTIKVGG FKASLTTNAA HLNIGKGGVN	60
LSNQASGRTL LVENLTGNIT VDGPLRVNNQ VGGYALAGSS ANFEFKAGVD TKNGTATFNN	120

- 47 -

SEQ ID NO: 16

Izvor: Multiepitop: HpaA epitop; Swiss prot Q48264 134-146

Organizem: Helicobacter pylori

PRT

KRTIQKKSEP GLL

13

SEQ ID NO: 17

Izvor: RGD

Organizem: sintetičen

PRT

RGD

SEQ ID NO: 18

Izvor: T7 promotor

Organizem: pET19b vector

DNA

taatacgact cactat

16

SEQ ID NO: 19

Izvor: T7 terminator

Organizem: pET19b vector

DNA

tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg tttttt

46

SEQ ID NO: 20

Izvor: TetR(RBS)

Organizem: sintetični nukleotid

DNA

tccctatcag tgatagagat actgagcaca ggagg

35

SEQ ID NO: 21

Izvor Terminator BHG_t

Organizem: virus

DNA

- 48 -

ctagagctcg ctgacagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc	60
cctcccccggt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa	120
atgaggaaat tgcacgcac tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg	180
ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gatatgca	238

Zahtevki

1. Protein sestavljen iz himernega flagelina in vezanega antigenskega segmenta, pri čemer je himerni flagelin sestavljen iz:
 - (a) najmanj 100 amino končnih aminokislin flagelina, ki aktivira receptor TLR5;
 - (b) sredinskega variabilnega segmenta flagelina bakterije, ki ne aktivira TLR5;
 - (c) najmanj 100 karboksi končnih aminokislin flagelina, ki aktivira receptor TLR5.
2. Protein po zahtevku 1, označen s tem, da je fuzijski flagelin sestavljen iz:
 - (a) sredinskega segmenta flagelina, ki ne aktivira TLR5, ki je izbran iz flagelinov bakterij skupine alfa proteobakterij ali epsilon proteobakterij, ki vključujejo, vendar ne izključno, bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella sp.*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*;
 - (b) amino- in karboksi- končnega segmenta flagelina, ki aktivira TLR5 in je izbran izmed flagelinov bakterij iz skupine beta proteobakterij ali gama proteobakterij ali spirohet ali firmikut, ki vključujejo, vendar ne izključno, bakterije *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella sp.*, *Borellia burgdorferi*, *Clostridium sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*.
3. Protein po katerem koli zahtevku od 1 do 2, označen s tem, da je himernemu flagelinu dodano zaporedje za antigen, protein ali peptidni segment ali več proteinov ali proteinskih segmentov, na osnovi proteinov organizma proti kateremu želimo sprožiti imunski odziv in je to isti organizem, iz katerega smo izbrali zapis za sredinski segment flagelina, in je zaporedje za protein ali peptidni segment vključeno ali na C-končnem delu proteina ali znotraj sredinskega segmenta flagelina.
4. Protein po katerem koli zahtevku od 1 do 3, označen s tem, da je protein sestavljen iz
 - (a) aminokislin vsaj od 1 do 176 flagelina FliC *E. coli*;
 - (b) sredinskega variabilnega segmenta aminokislin vsaj od 178 do 418 flagelina FlaA bakterije *H. pylori*;
 - (c) aminokislin vsaj od 401 do 498 flagelina FliC *E. coli*; in
 - (d) opcijsko antigenskega segmenta, ki je sestavljen iz proteina ali več segmentov proteinov, ki so kodirani v genomu *Helicobacter pylori*.

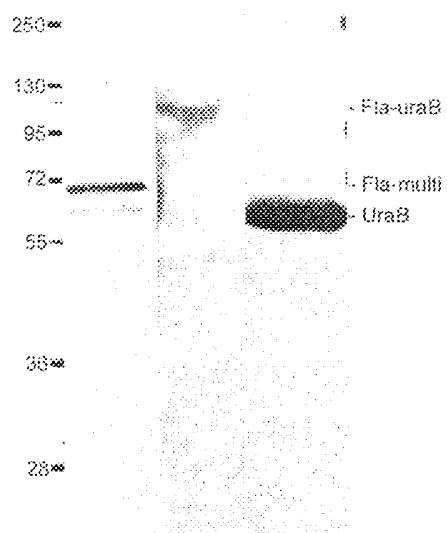
5. Protein po katerem koli zahtevku od 1 do 4, označen s tem, da protein vsebuje flagelin FlaA *H. pylori*, kjer sta amino-terminalni in karboksi-terminalni segment nadomeščena z zaporedjem flagelina bakterije, ki aktivira TLR5 in nadalje opcijsko antigenski segment, ki je sestavljen iz proteina ali več segmentov proteinov, ki so kodirani v genomu *Helicobacter pylori* in se uporablja za pripravo cepiva za zaščito in zdravljenje okužbe z bakterijo *H. pylori*.
6. Protein po katerem koli zahtevku od 1 do 5, označen s tem, da opcijsko vsebuje tudi enega ali več linker peptidov, ki povezujejo posamezne segmente proteina in je vsak linker peptid neodvisno dolg od ene do več aminokislin, dodatno lahko protein vsebuje tudi enega ali več označevalcev in so tako linker peptidi kot tudi označevalci v protein vključeni na način, ki ne spremeni osnovne funkcije proteina.
7. Protein po katerem koli zahtevku od 1 do 6, označen s tem, da se uporablja za pripravo cepiva za stimulacijo imunskega odziva proti bakterijam, katerih flagelin ne aktivira TLR5, za preprečevanje in zdravljenje nalezljivih bolezni, prednostno proti bakterijam iz skupine alfa in epsilon proteobakterij, kot so, vendar ne izključno: bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*, prednostno *Helicobacter pylori*.
8. DNA, ki vsebuje zapis za protein po katerem koli zahtevku od 1 do 7.
9. DNA po zahtevku 8, označena s tem, da vsebuje zapis za protein po katerem koli zahtevku od 1 do 6, ki zapis sestavljajo, v smeri bralnega okvirja:
 - (a) signalna sekvenca, ki omogoča izločanje proteinov ali vezavo proteina na membrano v gostiteljskem organizmu;
 - (b) protein po katerem koli zahtevku od 1 do 7, ki je funkcionalno povezan s signalno sekvenco.
10. DNA po katerem koli zahtevku od 8 do 9, označena s tem, da vsebuje zapis za protein po katerem koli zahtevku od 1 do 7, s signalno sekvenco in je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah.
11. DNA po katerem koli zahtevku od 8 do 10, označena s tem, da se DNA uporabi za pripravo cepiva za vnos v celice človeka ali živali z namenom vzbuditi imunski odziv.

12. DNA po katerem koli zahtevku od 8 do 11 za pripravo cepiva za stimulacijo imunskega odziva proti bakterijam, katerih flagelin ne aktivira receptorja TLR5, za preprečevanje in zdravljenje nalezljivih bolezni, prednostno proti bakterijam iz skupine alfa in epsilon proteobakterij, kot so: bakterije *Helicobacter sp.*, *Campylobacter sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, *Wolnella sp.*, *Brucella sp.*, prednostno *Helicobacter pylori*.
13. Cepivo, ki vsebuje protein po katerem koli zahtevku od 1 do 7 ali DNA po katerem koli zahtevku od 8 do 12 in ustrezne farmacevtsko sprejemljive dodatke.
14. Gostiteljski organizem, ki vsebuje fuzijski protein po katerem koli zahtevku od 1 do 7 ali DNA po katerem koli zahtevku od 8 do 12 in se DNA prepisuje v fuzijski protein in je gostiteljski organizem izbran iz bakterij, kvasovk ali gliv ter sesalskih celic; prednostno je gostiteljski organizem izbran med človeku in živali neškodljivimi organizmi, prednostno neškodljivimi organizmi, ki se običajno nahajajo v človeški ali živalski črevesni flori.
15. Cepivo, ki vsebuje gostiteljski organizem po zahtevku 14, in je protein izražen na površini gostiteljskega organizma v farmacevtski zmesi s farmacevtsko sprejemljivimi dodatki.
16. Metoda za določanje sposobnosti variant flagelinov za aktivacijo receptorjev TLR5, ki vsebuje sledeče korake:
 - (a) gojenje celičnih linij, ki izražajo funkcionalen receptor TLR5;
 - (b) vnos DNA z zaporedjem za fuzijski protein med signalno sekvenco za izločanje flagelinov in preiskovanim flagelinom, ki je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah, v celične linije, ki izražajo receptor TLR5 pod točko (a);
 - (c) analiza aktivacije receptorja TLR5 v celičnih linijah pod točko (a) s pomočjo reporterskih plazmidov ali produkcije vnetnih posrednikov.
17. Metoda za določanje sposobnosti variant flagelinov za aktivacijo receptorjev TLR5, ki vsebuje sledeče korake:
 - (a) gojenje celične linije, ki izražajo funkcionalen receptor TLR5;
 - (b) vnos DNA z zaporedjem za fuzijski protein med signalno sekvenco za izločanje flagelinov in preiskovanim flagelinom, ki je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah, v celične linije, ki niso celične linije pod točko (a);

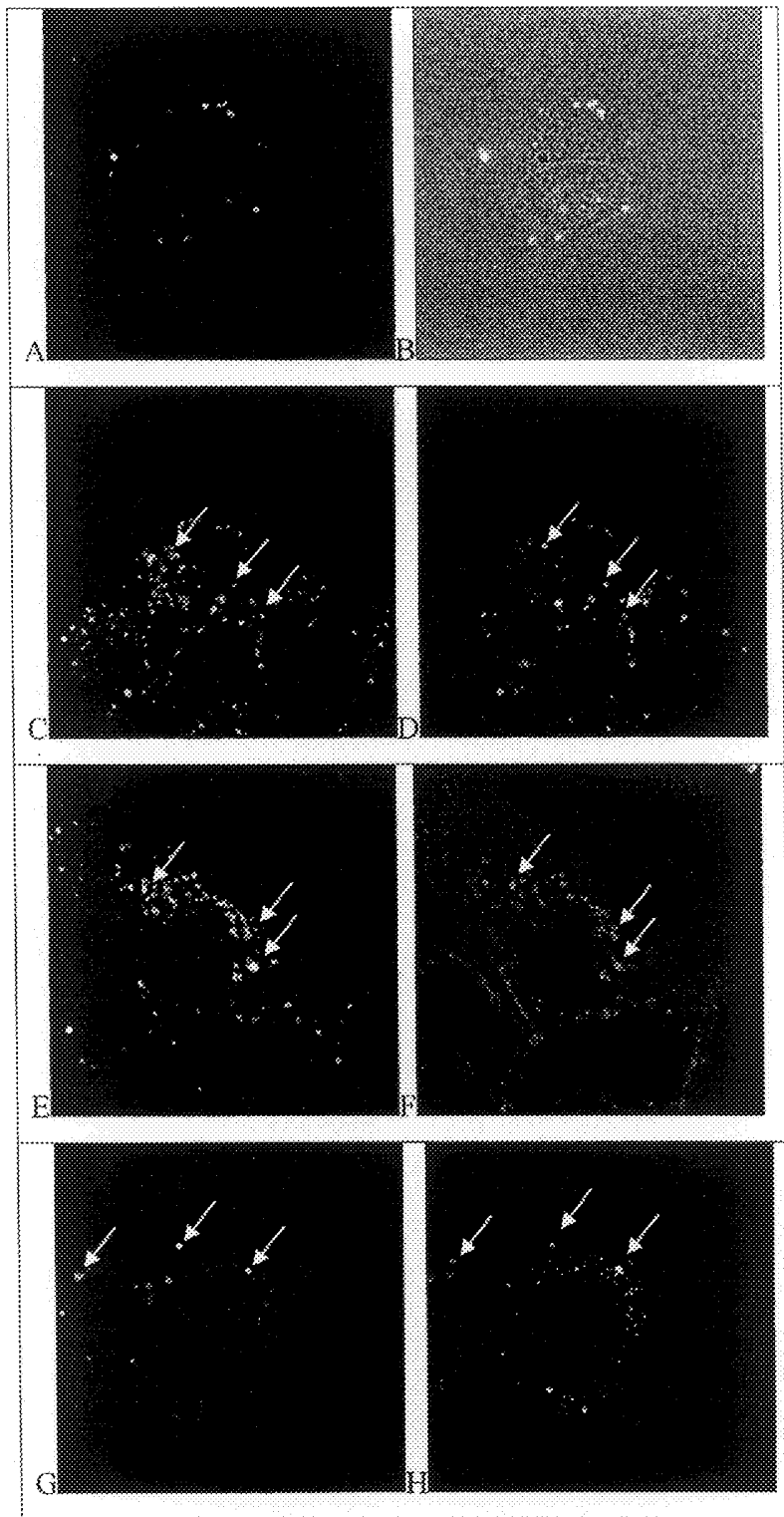
- (d) skupno gojenje mešanice celičnih linij pod točko (a) in (b);
 - (c) analiza aktivacije receptorja TLR5 v celičnih linijah pod točko (a) s pomočjo reporterskih plazmidov ali produkcije vnetnih posrednikov.
18. Metoda za določanje sposobnosti variant flagelinov za aktivacijo receptorjev TLR5, ki vsebuje sledeče korake:
- (a) celične linije, ki izražajo funkcionalen receptor TLR5;
 - (b) dodatek supernatant celic, ki izražajo protein zapisan z zaporedjem za fuzijski protein med signalno sekvenco za izločanje flagelinov in preiskovanim flagelinom, ki je operativno povezana z regulatornimi elementi, promotorjem in terminatorjem, ki omogočajo ekspresijo fuzijskega proteina v gostiteljskih celicah, celičnim linijam pod točko (a);
 - (c) analiza aktivacije receptorja TLR5 v celičnih linijah pod točko (a) s pomočjo reporterskih plazmidov ali produkcije vnetnih posrednikov.
19. Cepivo po katerem koli zahtevku 13 ali 15, ki vsebuje protein po katerem koli zahtevku od 1 do 7 ali DNA po katerem koli zahtevku od 8 do 12 ali gostiteljski organizem po zahtevku 14, označena s tem, da se cepiva za večkratno imunizacijo subjekta razlikujejo po aminokislinski sestavi amino-končnega in karboksi-končnega himernega flagelina, ki aktivira receptor TLR5, tako da protitelesa nastala zaradi predhodne imunizacije ne preprečijo aktivacije TLR5 ob naslednji imunizaciji s spremenjenim cepivom, sredinski segment flagelina v fuzijskem proteinu pa ostane med cepivi nespremenjen.

N	V	C	A
---	---	---	---

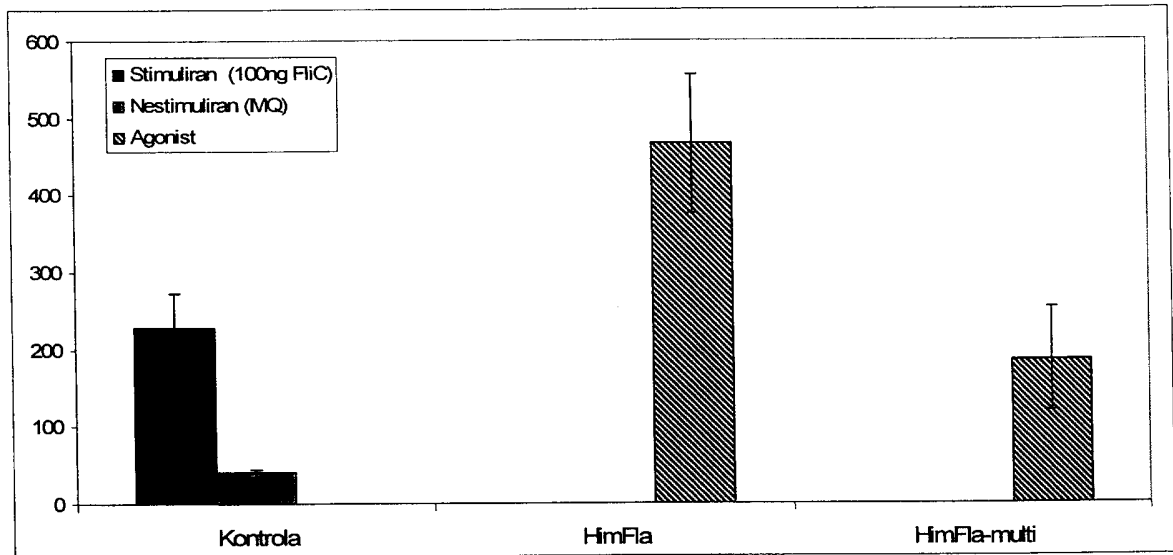
Slika 1



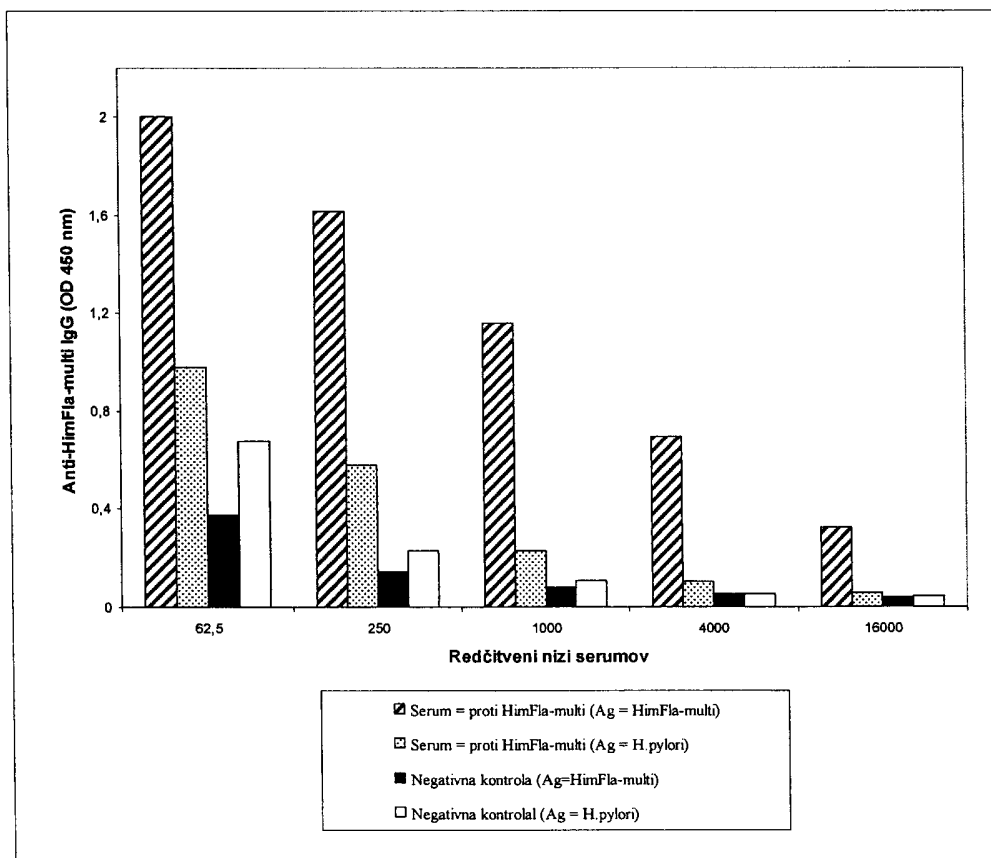
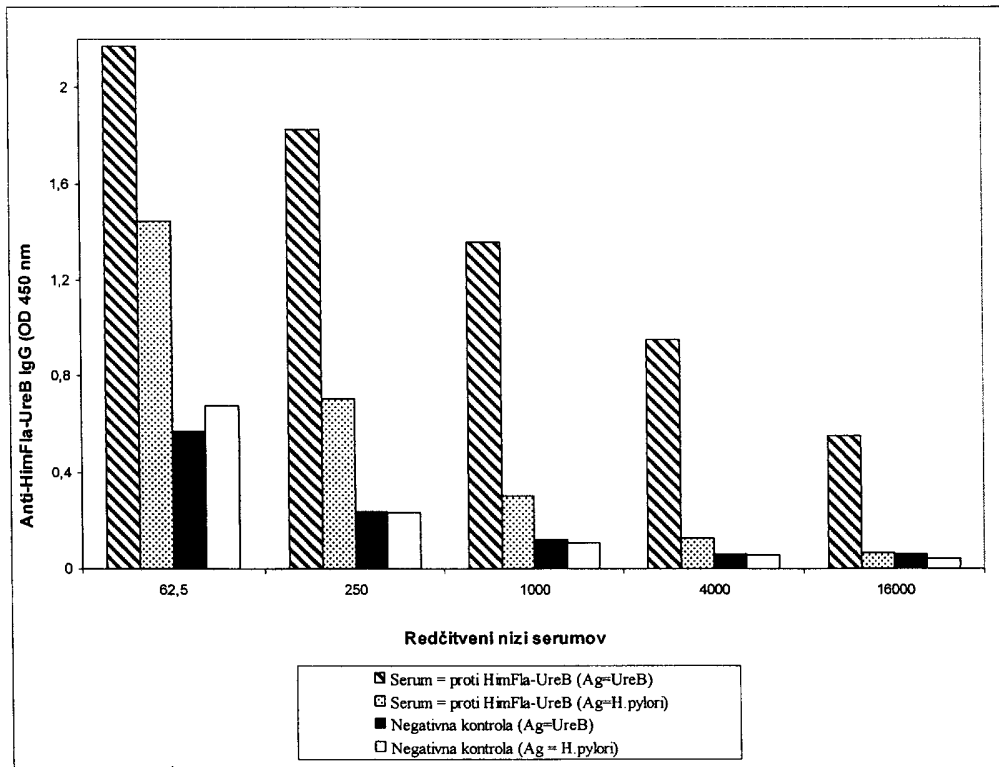
Slika 2



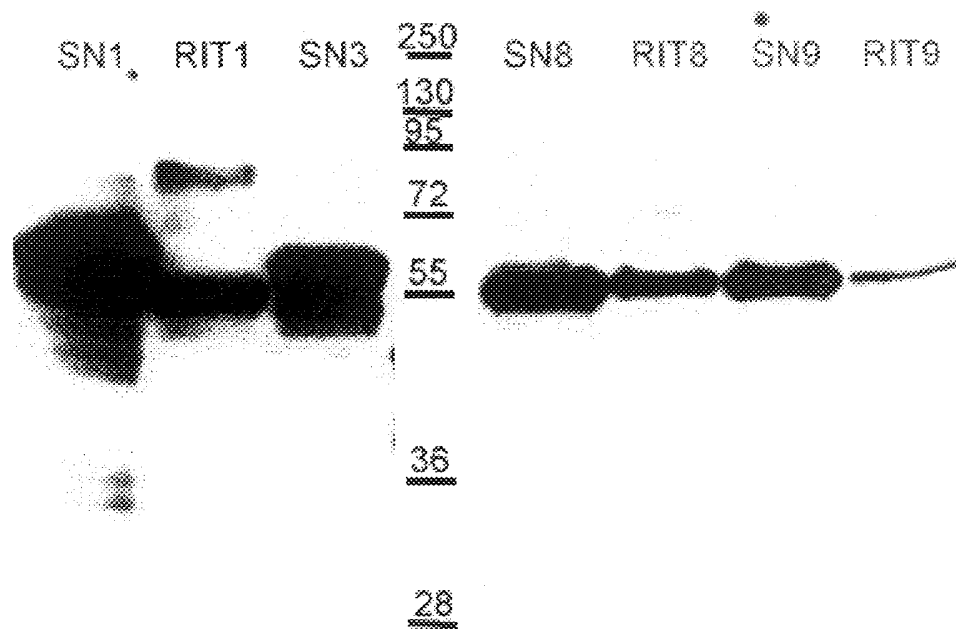
Slika 3



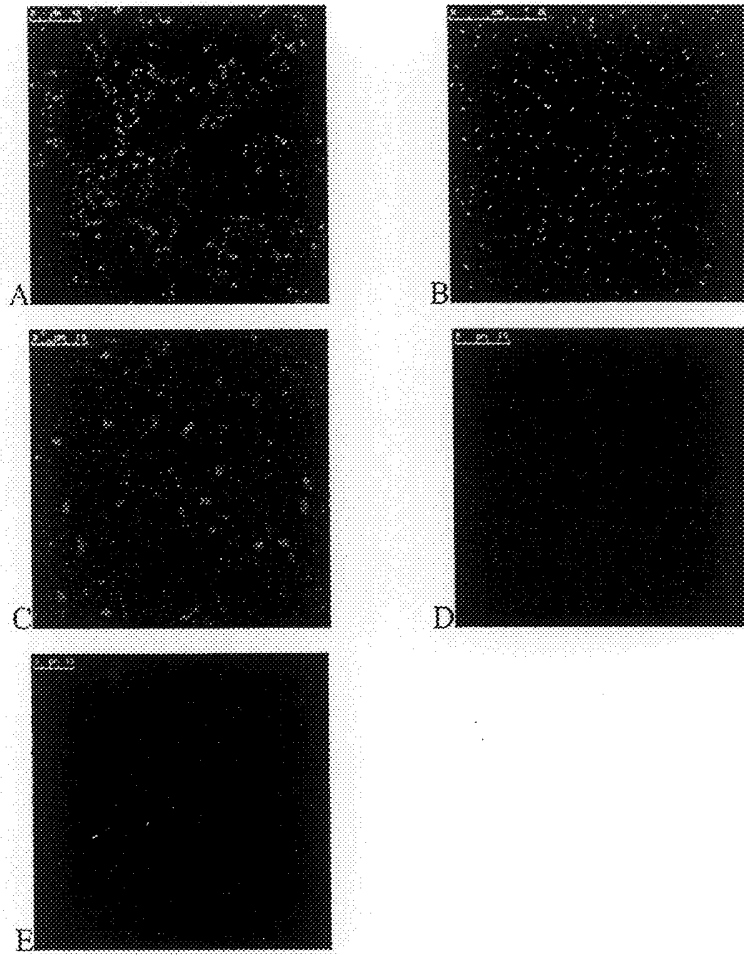
Slika 4



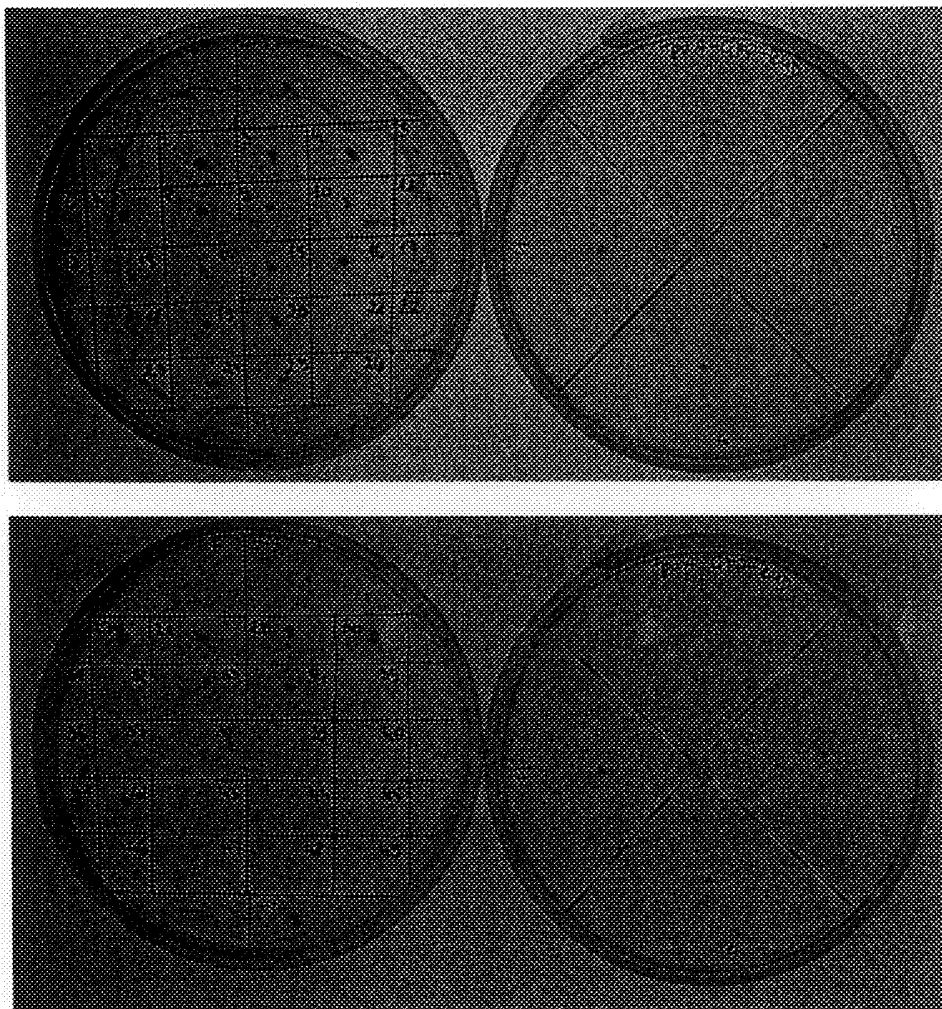
Slika 5



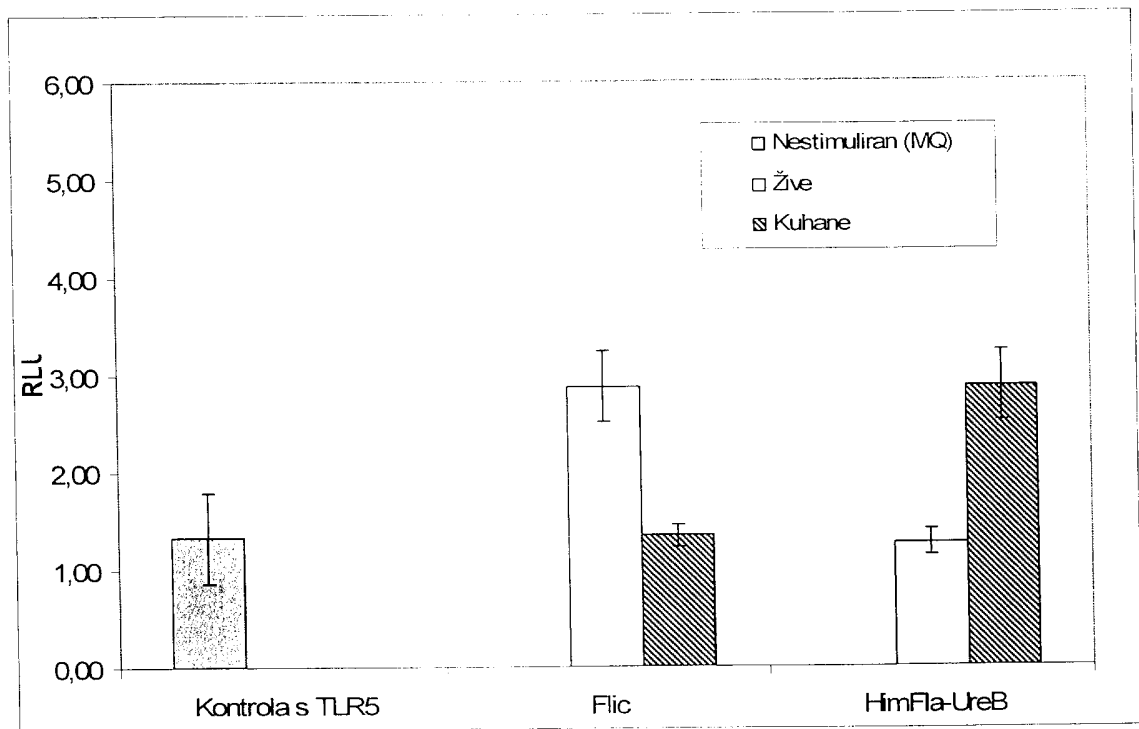
Slika 6



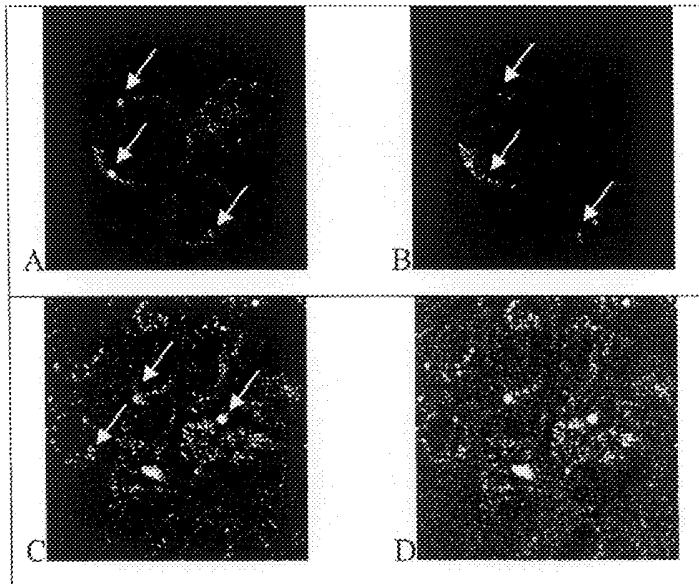
Slika 7



Slika 8

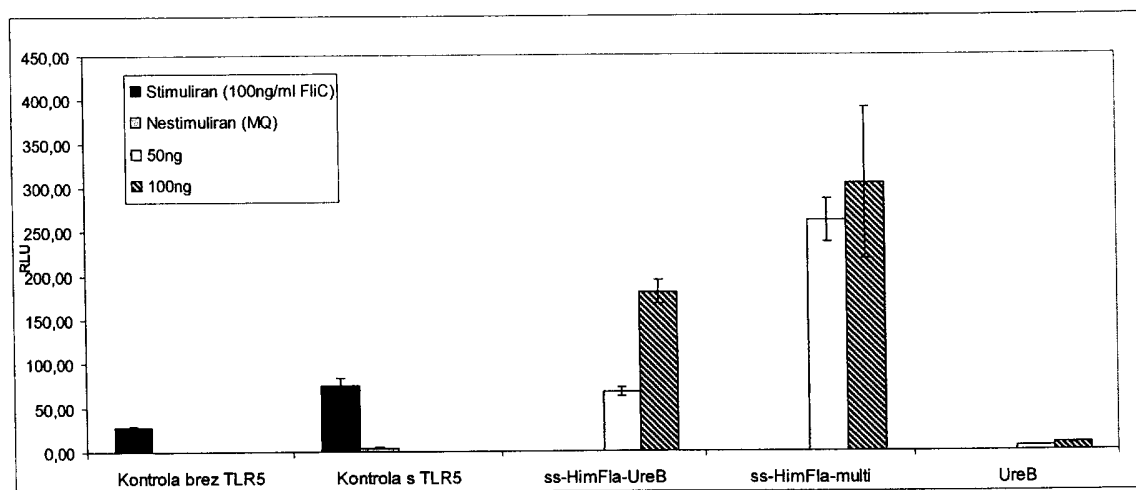


Slika 9

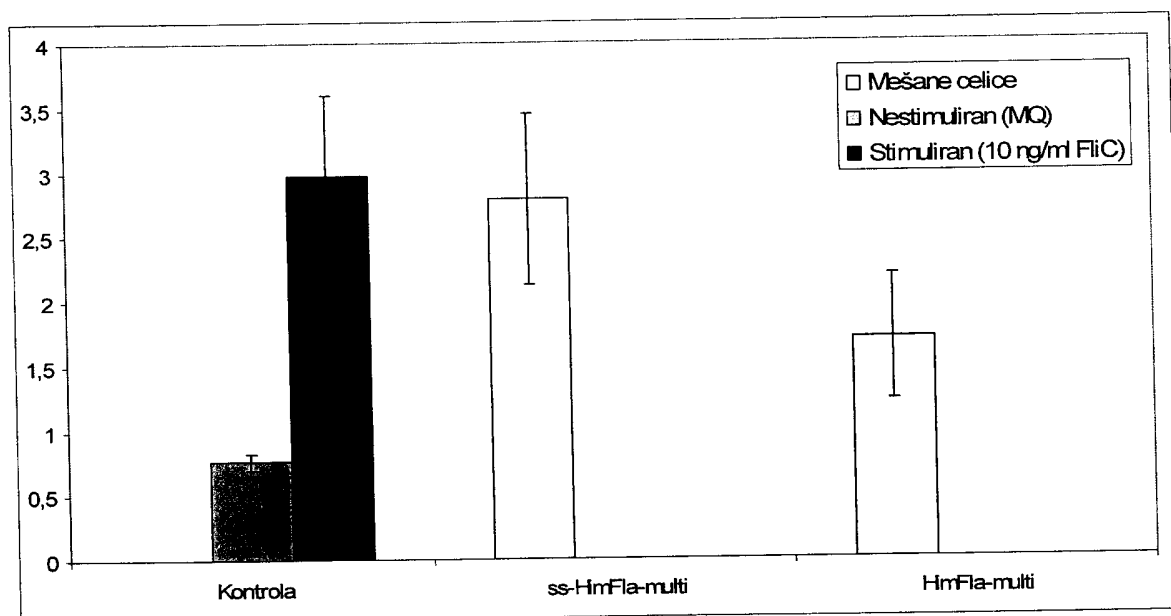


Slika 10

A



Slika 11



Slika 12