

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.03.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.03.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/0105360**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.01.2004**
(Věstník č. 1/2004)

(86) PCT číslo: **PCT/GB02/00900**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/070711**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 2373

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1.⁷ :

C 12 N 15/24

(71) Přihlašovatel:

GLAXO GROUP LIMITED, Greenford, GB;

(72) Původce:

Ashman Claire, Stevenage, GB;
Crowe James Scott, Stevenage, GB;
Ellis Jonathan Henry, Stevenage, GB;
Lewis Alan Peter, Stevenage, GB;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) **Název přihlášky vynálezu:**

Vakcinační prostředek

(57) Anotace:

Popisuje se izolovaný polypeptid použitelný při imunizaci proti vlastním antigenům. Zvláště se popisuje vlastní protein, který, když se aplikuje in vivo, je schopen vyvolat autoprotilátky. Prokázalo se, že lidské cytokiny jsou u člověka imunogenní. Dále se popisují farmaceutické prostředky obsahující takové sloučeniny a jejich použití v lékařství a způsoby jejich produkce.

```

5      1      GGGCGGAGGUGCCACAGATGCTGTCTCTCTCTCTACAGTTAGGAGCTGATTCAGGAGCTG
60      G P V P R S V S L P L T L A S L L T E E L

10     61     GTCCACATCGACACAGACAGCACTCCCGCTTGCACGCGGCATCGAGTGTGTGAC
120     V N I T Q D Q T P L C N G I H Y N S V D

15     121    CTGGCGCGTCCGCGGCTACTGTGCAGCGCTGGAGTGGTACCAACATCTTCCAAATGCAAT
180     L A A G G Y C A A E S S T N I S N C N

20     241    GGCATCGAGAGACACTAGAGTACTGTCTGGCGGAGTCTTACCGCAAGCGCCGCTACTAG
260     A I E K T Q R M E L G G L C H R K A P T T

25     281    GTCTCCAGCGCTCCCGGATACCAAAATGGAGGTGGCAATTTGTAAAGGACCTGTCTCAGC
300     V S S L F P D T K I E V A C F V K D L D S

30     321    TACACAGACAGCATGTTTGGCAGCTGCGCCCTCTTAA
360     Y T K Q L F R H G P P .

-23    381    NGHTGQLPVPFPLACAHNVHG
400     1      HKCDGSHRRIQSLMEVDTKTL
420     25     CTETLTVDTPAMGCTTISELUCR
440     49     ASKVIRIFLYFLKNDTSCGATCA
460     73     NSGVIMELQLTALFQCLDGLNSC
480     97     PVKRANGSLCHHPSLGSIMQD
500     121    ----- 126
520     YGKCSG

```

Vakcinační prostředek

Oblast techniky

Popisují se izolované peptidy, které je možné použít při imunizaci proti vlastním antigenům. Zvláště se popisují vlastní proteiny, které jsou schopny zvyšovat množství auto-protilátek v případě, že se aplikují *in vivo*. Dále se popisuje vznik lidských cytokinů, které jsou u člověka imunogenní. Dále se popisují farmaceutické prostředky obsahující uvedené sloučeniny a jejich použití v lékařství a způsoby jejich produkce.

Dosavadní stav techniky

Astma je chronické onemocnění plic způsobené zánětem dolních cest dýchacích a je charakterizováno opakujícími se dýchacími problémy. Dýchací cesty pacienta jsou citlivé a v každém okamžiku vykazují určitý stupeň otoku nebo zánětu, dokonce i když se neprojevují žádné příznaky. Záněty vedou k zúžení dýchacích cest a redukuje se průtok vzduchu vstupující a vystupující z plic, což stěžuje dýchání a vede k sípání, svíravým pocitům na prsou a kašláním. Astma je způsobeno velkou citlivostí vůči alergenům (jako jsou například roztoči, pyl, plísně), dráždivým látkám (jako jsou například kouř, výpary, intenzivní zápachy), dalšími podněty jsou respirační infekce, cvičení a suchý vzduch. Podněty dráždí dýchací cesty a dochází k zesílení zánětů dýchacích cest, sliznice pak ucpává dýchací cesty a svaly obklopující dýchací cesty se stahují, dýchání se stává obtížné a stresující a objeví se symptomy astma.

COPD je zastřešovací termín popisující onemocnění dýchacích cest, které vykazují podobné symptomy jako astma a léčí se stejnými léky. COPD je charakterizováno, chronickou,

progresivní a do velké míry nevratnou obstrukcí proudění vzduchu. Jak jednotlivec přispívá k průběhu onemocnění není známo, ale uvažuje se, že kouření cigaret způsobuje 90 % případů. Symptomy zahrnují kašel, chronickou bronchitidu, dušnost a respirační infekce. Nemoc pacienta silně ochromuje a může vést až k smrti.

Na základě různých problémů spojených s produkcí, aplikací a tolerancí monoklonálních protilátek, se věnuje velká pozornost metodám, které umožňují vlastnímu imunitnímu systému pacienta vytvořit endogenní protilátky správné specifity pomocí vakcinace. Savci však v obecném případě nemají v séru vysoký titr protilátek proti vlastním proteinům, protože imunitní systém obsahuje homeostatické mechanismy, které brání jejich tvorbě. Důležitost těchto tolerančních mechanismů je ilustrována onemocněním, jako je myasthenia gravis, kde auto-protilátky proti receptoru nikotinového acetylcholinu kosterních svalů způsobují slabost a únavu (popisuje se v publikaci Drachman, 1994, N. Engl. J. Med. 330: 1797-1810). Je nutné proto vytvořit vakcinační systém, který je schopen obejít protilátkové toleranční mechanismy, aniž dojde k indukci patologických stavů vyvolaných auto-protilátkou.

Navrhla se řada postupů s cílem porušit toleranci B buněk, aniž se vyvolá nepříjemná autoimunitní toxicita. Avšak všechny uvedené postupy vykazují podstatné nevýhody.

Jedna metoda zahrnuje chemické řetězení vlastního proteinu (nebo z něho získaných peptidů) s vysoce imunogenním nosičovým proteinem, jako je hemocyanin přílipkovitých plžů (popisuje se v publikaci Antibodies: A laboratory manual, Harlow, E. and Lane D. 1988. Cold Spring Harbor Press). Tento přístup je varianta široce užívaného hapténového nosičového systému pro vytvoření protilátek vůči málo imunogenním cílům, jako jsou chemické látky s nízkou molekulovou hmotností. Způsob chemické

konjugace může poškodit potencionálně dostupné epitopy a vyvolaná protilátková odezva je řízena proti nosičovému proteinu. Tento přístup je možné aplikovat při proteinové vakcinaci a není kompatibilní s imunogeny nukleových kyselin.

Varianta metody nosičového proteinu zahrnuje konstrukci genu kódujícího fúzní protein obsahující nosičový protein (například jaderný protein hepatitidy B a vlastní protein (popisuje se v publikaci „The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides,” *Biological Chemistry*. 380(3):277-83, 1999). Fúzní gen je možné aplikovat přímo jako část vakcíny tvořenou nukleovou kyselinou. V jiném případě se může exprimovat ve vhodné hostitelské buňce *in vitro*, genový produkt se izoluje a pak se zavede vhodnou metodou jako běžná vakcína buď s adjuvans nebo bez adjuvans. Fúze velkého nosičového proteinu s vlastním proteinem může deformovat uspořádání vlastního proteinu, což redukuje jeho účinnost při vyvolání protilátkové zkřížené reaktivitě s přirozenou molekulou. Stejně jako tradiční řetězené nosičové systémy je protilátková odezva určená vůči nosičové části fúze. Odezvy proti nosiči mohou omezit účinnost následného podání posilující aplikace vakcíny nebo zesílit možnost vzniku alergických nebo anafylaktických reakcí.

Zdokonalený přístup popisuje Dalum a jeho kolegové, kdy se do cílové molekuly zavede epitop omezený jedinou třídou II MHC. V publikacích Dalum et al., 1996, *J. Immunol.* 157:4796-4804, Dalum et al., 1997, *Mol. Immunol.* 34:1113-1120 se popisuje použití uvedené metody a vyvolání protilátek proti ubichitinu a cytokinu TNF (popisuje se v publikaci Dalum et al., 1999, *Nature Biotech* 17:666-669). Výsledkem je, že pomoc všech T buněk musí pocházet buď z uvedeného jediného epitopu nebo z připojené sekvence. Tento přístup může velmi dobře pracovat u subjektů, které vykazují vhodný haplotyp MHC třídy II, pro který se vakcína navrhla, nebo u těch subjektů, které

mají v normální populaci molekuly třídy II schopné vázat se na zavedené epitopy. Existuje však podstatná část populace, kde vakcína nefunguje. Navíc, vzhledem k tomu, že začleněný epitop pochází s poměrně nepříbuzného proteinu, jako je vaječný albumin nebo lysozym, je pravděpodobné, že další sekvence bude do určitého stupně interferovat s balením cílového proteinu, což brání přijetí zcela přirozeného uspořádání cílového proteinu.

Na rozdíl od toho, co zde bylo popsáno vynález umožňuje připravit velké množství potencionálních T buněčných epitopů, které udržují cílovou molekulu v uspořádání, které je podobné přirozené formě. Tyto vlastnosti umožňují vakcínám podle vynálezu být účinnými imunogeny v populacích, jako jsou ty zahrnující lidské pacienty. Tyto vlastnosti je možné dosáhnout vytvořením mutace ve vlastním proteinu tak, aby vznikla sekvence, kterou je možné najít v analogovém proteinu.

Řada článků popisuje důležitou úlohu Th2 cytokinu IL-13 při vytvoření patologického stavu v modelu vaječného albuminu alergického astma (popisuje se v publikaci Wills-Karp et al., 1998, Grunig et al., 1998). Myši se nejdříve ošetřily tak, aby byly citlivé vůči vaječnému albuminu a pak se jim injekcí zavedl rozpustný receptor IL-13, který se váže a neutralizuje IL-13. Silná odpověď dýchacích cest na vakcinaci acetylcholinem byla ve skupině ošetřených zvířat zcela odstraněna. Histologická analýza ukázala, že ošetřené myši zvrátily metaplázie pohárkových buněk, které je možné vidět u kontrolních zvířat. V doplňkových experimentech vzrostlo množství plicního IL-13 nadměrnou expresí v transgenní myši nebo zavedením proteinu do trachei u myši divokého typu. V obou případech je možné vidět nadměrně silnou odezvu dýchacích cest, invazi eozinofilních leukocytů a zvýšenou produkci hlenu (popisuje se v publikaci Zhu et al., 1999). Tyto data ukazují, že aktivita IL-13 je nezbytná a dostatečná

k produkci několika hlavních klinických a patologických jevů alergického astma v dobře zavedeném modelu.

Vakcína schopná řídit neutralizační odezvu vůči IL-13 by proto mohla tvořit použitelný terapeutický prostředek pro léčbu alergického astma u lidí. Také je možné tuto vakcínu použít při léčbě jistých poruch spojených s nákazou červy (popisuje se v publikaci Brombacher, 2000) a onemocnění, kde produkce IL-13 se podílí na vzniku fibrózy (Chiaramonte et al., 1999), jako je chronické obstruktivní pulmonární onemocnění.

Jsou dány koncepty a principy vynálezu s ohledem na IL-13, ale mohou se aplikovat na libovolný savčí vlastní protein, který má analogický protein v jiném druhu.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje izolovaný peptid, který je alespoň z 30 %, ale méně než ze 100 %, shodný s lidským proteinem, jehož polypeptid:

- a) obsahuje alespoň jednu mutaci, která je charakteristická pro analogický protein, který není lidský a
- b) je schopný vytvořit v člověku protilátky a
- c) je dostatečně strukturálně podobný lidskému proteinu tak, že se protilátky váží na lidský protein a polypeptid a
- d) kde polypeptid není protilátkou.

V jednom provedení vynálezu se tak popisuje protein vykazující epitopy B buněk ze savčího vlastního antigenu a mutaci, která odpovídá za vznik sekvence analogického proteinu z dalších savčích druhů tak, že protein je schopen vyvolávat v druzích, ze kterých se získaly epitopy B buněk, imunitní odezvu, která rozeznává přirozený protein, ze kterého se získaly epitopy B buněk.

Sekvence analogového proteinu s výhodou obsahuje více než 5 sousedících aminokyselin, výhodnější je, když obsahuje více než 8 sousedících aminokyselin. Pak protein podle vynálezu obsahuje sekvenci, která je shodná s analogickou sekvencí v alespoň pěti s výhodou s alespoň v osmi sousedících aminokyselinách. V jiném provedení vynálezu se popisuje protein, který vykazuje epitopy B buněk vlastního proteinu, které jsou zavedeny substitucí do základní struktury analogického proteinu, který pochází z druhých savčích druhů tak, že protein je schopný vyvolat v druzích, ve kterých se získaly epitopy B buněk, imunitní odezvu, která rozeznává přirozený protein, ze kterého se získaly epitopy B buněk.

Je vhodné, když protein podle vynálezu není protilátkou. Vyvolaná imunitní odezva je s výhodou protilátková odezva, výhodnější je, když jde o neutralizační protilátkovou odezvu.

V obecném případě se s výhodou mutace zavede do oblasti molekuly, která není exponována na povrchu tak, že oblasti exponované na povrchu jsou konzervativní. Oblasti exponované na povrchu jsou přístupné imunitnímu systému a v důsledku toho často obsahují epitopy B buněk. Vynález popisuje protein obsahující konzervativní oblasti exponované na povrchu vlastního proteinu a mutaci zavedenou do oblasti, která není exponována na povrchu molekuly. Uvedenou mutací vzniká sekvence analogického proteinu tak, že protein je schopen vyvolat imunitní odezvu vůči vlastnímu proteinu vyvolanou v druzích, ze kterých se získal vlastní protein.

Vlastní protein je s výhodou lidský protein, ale může to být protein pocházející z libovolného savce, který vyvolává autoimunitní odezvu vůči uvedenému proteinu. Imunitní odezva je s výhodou specifická vůči přirozenému proteinu a imunogenu podle vynálezu. Imunitní odezva vykazuje minimální zkříženou

reaktivitu nebo neutralizační kapacitu s ohledem na jiné vlastní proteiny.

Vlastní antigen je s výhodou cytokin, výhodnější je cytokin obsahující čtyři šroubovice, výhodněji IL-4 nebo IL-13, nejvýhodnější je IL-13. Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje chimerický protein obsahující epitopy B buněk pocházející z lidského IL-13 přítomného v základní struktuře myšího IL-13. Taková konstrukce je schopná vyvolat u lidí specifickou protilátkovou odezvu proti IL-13. Taková konstrukce je zobrazena na Obr. 9 (SEQ ID NO: 21 a 22). Podobně je na Obr. 13 zobrazena konstrukce IL-4 (SEQ ID NO: 25) obsahující povrchové oblasti lidského IL a základní kostru myšího IL.

Vynález také popisuje:

- expresivní vektor, který obsahuje polynukleotid podle vynálezu a je schopen exprimovat polypeptid podle vynálezu,
- hostitelskou buňku obsahující expresivní vektor podle vynálezu,
- způsob produkce polypeptidu podle vynálezu, který zahrnuje udržování hostitelské buňky podle vynálezu za podmínek vhodných pro dosažení exprese polypeptidu a izolaci uvedeného polypeptidu,
- vakcinační prostředek obsahující polypeptid nebo polynukleotid podle vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič.

Vynález dále popisuje způsob navržení a přípravy polypeptidu podle vynálezu, který zahrnuje:

1. identifikaci jedné nebo více oblastí vlastního, v typickém případě lidského, proteinu, proti kterému je požadována protilátková odezva,
2. identifikaci aminokyselinové sekvence vlastního proteinu,

3. identifikaci aminokyselinové sekvence konstrukce analogického proteinu vytvořené postupy rekombinace DNA chimerické molekuly obsahující alespoň jednu cílovou oblast uvedenou identifikovanou v kroku 1, jejíž aminokyselinová sekvence se vzala ze sekvence identifikované v kroku 2, a dostatečné aminokyseliny ze sekvence(í) identifikované v kroku 3, aby umožnily, sbalení výsledného proteinu do tvaru podobného tvaru vlastního proteinu tak, že mutovaný protein může vyvolat imunitní odezvu, která rozeznává vlastní protein.

V sekcích popisu a patentových nároků, pokud není uvedeno jinak, termíny „obsahovat“ a „zahrnovat“ nebo jejich variace, jako je „obsahující“, „zahrnující“, „obsahuje“ nebo „zahrnuje“ atd. znamená, že použití těchto slov bude předpokládat možné zahrnutí celků nebo elementů, které nejsou specificky vyjmenovány.

Vynález popisuje izolované polypeptidy a izolované polynukleotidy. Termín „izolovaný“ znamená, že polypeptid nebo polynukleotid není ve svém přirozeném stavu, do té míry, že byl do určité míry čištěn nebo se synteticky produkoval například rekombinantními metodami nebo mechanickou syntézou. Termín „izolovaný“ proto zahrnuje možnost polypeptidů nebo polynukleotidů být v kombinaci s jiným biologickým nebo nebiologickým materiálem, jako jsou buňky, suspenze buněk nebo buněčné fragmenty, proteiny, peptidy, expresivní vektory, organická nebo anorganická rozpouštědla nebo jiné vhodné materiály. Tento termín vylučuje situaci, kdy se polynukleotid vyskytuje ve stádiu, jak se nachází v přírodě.

Výhodou vynálezu je, že polypeptid podle vynálezu obsahuje vlastní oblasti, například lidského proteinu, proti kterému je požadována protilátková odezva, ve spojení s oblastmi, které jsou charakteristické pro analogický protein a které se

dostatečně liší od lidského proteinu, aby vyvolaly významnou pomoc T buněk, ale ještě jsou optimalizovány uvolněním, aby se sbalily do tvaru vysoce podobného lidskému proteinu. To umožňuje vznik protilátek, které rozeznávají vlastní antigen. V typickém případě vzniklá imunitní odezva zahrnuje vznik neutralizační protilátkové odezvy.

Lidský protein podle vynálezu může být protein plné délky kódovaný lidským genomem nebo oblastí nebo podjednotkou proteinu plné délky kódované lidským genomem. Je-li nutné vytvořit neutralizační protilátky proti funkční oblasti vlastního antigenu nebo oblasti vázající se na receptor, může se připravit chimerický antigen zahrnující pouze uvedené oblasti. Pak exponovaná oblast takové domény nebo epitopy B buněk takové domény jsou konzervativní a do epitopu, který nepochází z buněk, nebo do oblastí exponovaných na povrchu se zavede mutace analogického proteinu.

Termín „protein“ zahrnuje například kratší sekvence aminokyselinových zbytků, které se nazývají peptidy, jako jsou neuropeptidy. Lidský protein bude v typickém případě subjektem post-translační úpravy, jako je glykosylace, proteolytické štěpení, fosforylace a jinými metodami, které jsou dobře známy v oboru. Lidským proteinem je s výhodou cytokin, hormon, růstový faktor nebo extrabuněčný protein, s výhodou 4-helikální cytokin, nejvýhodnější je IL-13. Cytokiny zahrnují například IL1, IL2, IL3, IL-4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL21, IL25, TNF, TGF, GMCSF, MCSF a OSM. 4-helikální cytokiny zahrnují IL2, IL3, IL-4, IL5, IL13, GMCSF a MCSF. Hormony zahrnují například luteinizující hormon (LH), hormon stimulující folikule (FSH), chorogonadotropin (CG), VGF, GHrelín, agouti, protein příbuzná agouti a neuropeptid Y. Růstové faktory zahrnují například VEGF. Extracelulární proteiny zahrnují například APP nebo B-amyloid.

Analogický protein je ten, který je ortologní nebo paralogní k vlastnímu proteinu, například lidský protein. Ortologní protein může být u různých organismů přenášen z předka na potomka a je proto možné provést podobné konzervativní funkce v různých organizmech. Pak ortologní gen znamená geny, jejichž sekvence si jsou velmi podobné a pocházejí z jediného výchozího genu a takže tvoří v různých speciích ekvivalentní gen a podílejí se na specifikaci běžných předchůdců. Zvláště v případě člověka ortologní protein je strukturně ekvivalentní molekula u savce, kterým není člověk. Paralogní protein je ten, který se vyskytuje v daném organismu ve více než v jedné kopii, k čemuž dochází duplikací (popisuje se v publikaci Venter, Science, 1336, vol. 291, 2001). Paralogní protein obsahuje homologní sekvenci (sdílejí ji běžní vývojoví předci), která se odlišila duplikací genu. Analogický protein je s výhodou ortologní protein. Ortologní protein bude v typickém případě mít stejný název jako lidský protein a bude v typickém případě provádět stejnou funkci. Například myší IL-13 je ortologní protein vzhledem k lidskému IL-13. Analogický protein je v typickém případě savčí nebo ptačí, například bovinní, ovčí, hlodavčí, jako je myší, prasečí, opičí, psí, kočičí nebo lidský. Je výhodné, aby analogický protein byl myší. Pak podle vynálezu je myší IL-13 analogickým (a ortologním) proteinem vzhledem k lidskému IL-13. Podobně opičí IL-4 je analogickým (a ortologním) proteinem vzhledem k lidskému IL-4.

Polypeptid podle vynálezu s výhodou obsahuje 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 nebo více mutací charakteristických pro analogický protein. Je výhodnější, aby polypeptid obsahoval alespoň tři mutace. Každá mutace může být charakteristická pro stejné nebo odlišné analogické proteiny. Tak první mutace může být charakteristická pro myší analog a druhá mutace může být charakteristická pro opičí analog. Vzhledem k uvedenému rysu polypeptid obsahuje alespoň tři mutace, kde každá mutace je

charakteristická pro odlišný analog. Každá mutace je s výhodou charakteristická pro stejný analog. Mutace je změna aminokyselinové sekvence proteinu a zahrnuje například delece, inserce a substituce. Mutace je s výhodou substituce. Je výhodné, aby v každé oblasti, která není exponována na povrchu, se nahradila více než jedna aminokyselina.

Mutace, která je charakteristická pro analogický protein je ta, jejímž výsledkem je sekvence lidského proteinu, která je více shodná se sekvencí analogického proteinu po mutaci, která se provedla v lidském proteinu. Například, když lidská sekvence je ProProArgVal a myší analog má sekvenci ProProTyrVal, pak mutace charakteristická pro analogický protein je nahradit Tyr pomocí Arg. Je výhodné, aby se mutace neprovedla na zbytcích, které jsou povrchovými zbytky v přirozeném sbaleném aktivním proteinu ve vodném roztoku za fyziologických podmínek. Tyto fyziologické zbytky, zvláště ty, které tvoří smyčkové struktury jsou často epitopy B buněk a je výhodné, aby všechny tyto jednotky byly konzervativní. Takto zavedené mutace mají funkci porušit toleranci vůči vlastnímu proteinu a být imunogenní v druzích, ze kterých se nemutovaný protein získal.

V jiném provedení vynálezu jsou polypeptidy podle vynálezu alespoň z 30 % a méně než ze 100 % shodné s lidským proteinem, s výhodou po celé délce lidského proteinu. Je výhodné, aby polypeptidy byly alespoň ze 40 %, alespoň z 50 % shodné s lidským proteinem. Je výhodnější, když polypeptidy jsou alespoň z 60 %, například ze 70 % shodné s lidským proteinem. Nejvýhodnější je, když polypeptidy jsou alespoň z 85 % shodné s lidským proteinem, například přibližně z 90 % shodné. Takové proteiny jsou schopné aktivovat imunitní systém u lidí, který rozeznává lidský protein.

UWGCG poskytuje například program BESTFIT, který je možné použít při výpočtu homologie (například užívaný při jeho standardním nastavení) (popisuje se v publikaci Devereux et al., (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395). Algoritmy PILEUP a BLAST se mohou použít k výpočtu homologie nebo při uspořádání sekvencí (v typickém případě pro jejich standardní uspořádání), jak se například popisuje v publikaci Altschul (1993) J. Mol. Evol. 36: 290-300, Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10.

Software provádějící analýzy BLAST je veřejně dostupný prostřednictvím instituce National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tento algoritmus zahrnuje první identifikační pár sekvence, který vykazuje vysoké skóre (HSP), identifikací krátkých slov s délkou W ve zkoumané sekvenci, které buď splňují nebo uspokojují prahové skóre T dosahující pozitivních hodnot uspořádaných se slovem se stejnou délkou v sekvenci vybrané z databáze. Hodnota T se označuje jako prahové skóre okolních slov (popisuje se v publikaci Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10). Tyto počáteční párování okolních slov působí jako základ pro počáteční vyhledávání za účelem najít HSP, které tato slova obsahují. Párování slov se rozšiřují do obou směrů podél každé sekvence dokud roste hodnota kumulativního skóre uspořádání. Rozsah párování slov v každém směru se zastaví když: kumulativní skóre uspořádání klesne o hodnotu X ze své maximální dosažené hodnoty, kumulativní skóre klesne na nulu nebo pod tuto hodnotu, což je způsobeno hromaděním jednoho nebo více uspořádání zbytků s negativním skóre nebo se dojde na konec sekvence. Parametry algoritmu BLAST W, T a X charakterizují citlivost a rychlost uspořádání. Když se program BLAST používá pro porovnání obou řetězců v případě polynukleotidů, používají se standardní slova o délce (W) 11, matrice skóre BLOSUM62 (popisuje se v publikaci Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919)

uspořádání (B) má hodnotu 50, pravděpodobnost (E) dosahuje hodnoty 10, $M=5$, $N=4$. Algoritmus BLAST provádí statistickou analýzu podobnosti dvou sekvencí (popisuje se například v publikaci Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787). Jednou mírou podobnosti, kterou poskytuje algoritmus BLAST je nejmenší hodnota součtu pravděpodobnosti ($P(N)$), která označuje pravděpodobnost, s jakou dojde k párování dvou nukleotidů nebo aminokyselinových sekvencí. Sekvence se například považuje za podobnou s jinou sekvencí, jestliže součet pravděpodobnosti při porovnání první sekvence s druhou sekvencí je nižší než přibližně hodnota 1, s výhodou nižší než přibližně hodnota 0,1, více výhodné je nižší než hodnota přibližně 0,01 a nejvýhodnější je, když hodnota je nižší než přibližně 0,001.

Úspěšný návrh polypeptidu podle vynálezu se může ověřit například demonstrací, že, když se polypeptid exprimuje ve vhodné hostitelské buňce, upraví své uspořádání, aby bylo dostatečně podobné uspořádání vlastního proteinu, přičemž se tvoří protilátky, jenž zkříženě reagují s přirozeným vlastním proteinem. To je možné ukázat použitím imunologických postupů, jako je navázání monoklonálních nebo polyklonálních protilátek v testu ELISA nebo fyzikálněchemických metod, jako cirkulární dichroizmus nebo krystalografickými postupy, jako je krystalografie používající rentgenové záření nebo počítačové modelování nebo řada dalších přístupů, které jsou dobře známy v oboru.

Další uspořádání úspěšného návržení je možné získat aplikací výsledného polypeptidu ve vhodném vakcinačním režimu a pozorováním, že vyvolané protilátky jsou schopné se vázat na protein. Toto navázání je možné odhadnout použitím testu ELISA, který používá rekombinantní nebo izolovaný přirozený protein, nebo prostřednictvím biologických testů, které testují účinek proteinu na citlivou buňku nebo tkáň. Zvláště

výhodné hodnocení je pozorování jevu kauzálně spojeného s aktivitou proteinu v intaktním hostiteli a stanovení, zda přítomnost protilátek vyvolaných metodami podle vynálezu upravuje tento jev. Pak protein podle vynálezu bude schopen vyvolat protilátky na přirozený antigen ve specifických specie, ze kterých se získal přirozený protein.

Polypeptid podle vynálezu se může dále upravit mutací, například substitucí, inzercí nebo delecí aminokyselin za účelem dodat požadované vlastnosti (jako je adice dodatkové sekvence, která umožňuje izolaci nebo zvýšenou imunogennost) nebo odstranit nežádoucí vlastnosti (jako je nežádoucí agonistická kapacita receptoru) nebo transmembránové domény. Vynález specificky popisuje fúzní partnery, které se jednoduše izolují, jako je doplňkový polyhistidinový řetězec nebo partneři exprese GST, kteří zesilují expresi.

Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje lidský IL-13, který vykazuje jednu nebo více z následujících mutací nebo konzervativní substituci charakteristickou pro myši IL-13. Následující číslování platí v případě IL-13 exprimovaného se svou signální sekvencí v bakteriích E. coli.

R → K v poloze 30
V → S v poloze 37
Y → F v poloze 63
A → V v poloze 65
E → D v poloze 68
E → Y v poloze 80
K → R v poloze 81
M → I v poloze 85
G → H v poloze 87
Q → H v poloze 113
V → I v poloze 115
D → K v poloze 117

Výhodnější je, když lidský IL-13 obsahuje alespoň dvě, výhodněji alespoň 3, 4, 5, 6 nebo více shora v textu uvedených mutací nebo konzervativní substituci. Je výhodné, když je přítomno všech dvanáct mutací.

Termín „konzervativní substituce“ znamená, když aminokyselina se substituuje jinou aminokyselinou, která má podobné vlastnosti, kdy odborník chemie peptidů očekává, že sekundární struktura a hydropatická podstata polypeptidu se v podstatě nezmění.

Jisté aminokyseliny ve struktuře proteinu se mohou nahradit jinými aminokyselinami, aniž dojde ke ztrátě interaktivní vazebné kapacity se strukturami, jako jsou například oblasti protilátek, na které se váže antigen nebo vazebná místa na molekulách substrátu. Vzhledem k interaktivní kapacitě a podstatě proteinu, která definuje biologickou funkční aktivitu proteinu, je možné provést v proteinové sekvenci jisté substituce aminokyselinové sekvence a samozřejmě v její sekvenci kódující DNA a přesto získat protein s podobnými vlastnostmi. Předpokládá se, že se mohou v peptidových sekvencích popsaných prostředků nebo v odpovídajících sekvencích DNA, které kódují uvedené peptidy, provést různé změny, aniž dojde k nežádoucí ztrátě biologické využitelnosti nebo aktivity.

Při takových změnách se zvažuje hydropatický index aminokyselin. V oborou je známa důležitost hydropatického indexu aminokyselin pro udělení interaktivní biologické funkce proteinu (popisuje se v publikaci Kyte and Doolittle, 1982). Je známo, že relativní hydropatický charakter aminokyseliny se podílí na sekundární struktuře výsledného proteinu, která naopak definuje interakci proteinu s jinými molekulami, jako jsou například enzymy, substráty, receptory, DNA, protilátky,

antigeny a podobně. Pro každou aminokyselinu se stanovil její hydropatický index na základě její hydrofóbnosti a náboji (popisuje se v publikaci Kyte and Doolittle, 1982). Tyto hodnoty jsou v případě izoleucinu (+4,5), valinu (+4,2), leucinu (+3,8), fenylalaninu (+2,8), cysteinu/cystinu (+2,5), methioninu (11,9), alaninu (+1,8), glycinu (-0,4), threoninu (-0,7), serinu (-0,8), tryptofanu (-0,9), tyrozinu (-1,3), prolinu (-1,6), histidinu (-3,2), glutamátu (-3,5), glutaminu (-3,5), aspartátu (-3,5), asparaginu (-3,5), lyzinu (-3,9) a argininu (-4,5).

V oboru je známo, že jisté aminokyseliny se mohou nahradit jinými aminokyselinami s podobným hydropatickým indexem nebo skóre a stále vzniká protein s podobnou biologickou aktivitou, stále je možné získat protein s ekvivalentní biologickou funkcí. Při přípravě takových změn jsou výhodné substituce aminokyselin, jejíž hydropatické ukazatele jsou ± 2 , zvláště je výhodné, když hydropatické indexy jsou ± 1 , dokonce zvláště výhodné jsou ty s hydropatickými indexy $\pm 0,5$. V oboru je známo, že substituci podobných aminokyselin je možné účinně provést na základě hydrofilnosti. Americký patentový dokument 4 554 101 uvádí, že nejvyšší lokální průměrná hydrofilnost proteinu řízená hydrofilností aminokyselin koreluje s biologickou vlastností proteinu.

V Americkém patentovém dokumentu č. 4 554 101 jsou v případě aminokyselinových zbytků uvedeny následující hodnoty hydrofilnosti: arginin (+3,0), lyzin (+3,0), aspartát (+3,0 $\pm$ 1), glutamát (+3,0 $\pm$ 1), serin (+0,3), asparagin (+0,2), glutamin (+0,2), glycin (0), threonin (-0,4), prolin (-0,5 $\pm$ 1), alanin (-0,5), histidin (-0,5), cystein (-1,0), methionin (-1,3), valin (-1,5), leucin (-1,8), izoleucin (-1,8), tyrozin (-2,3), fenylalanin (-2,5), tryptofan (-3,4). Je známo, že aminokyselina se může nahradit jinou, která má podobnou hodnotu hydrofilnosti a stále se získá biologický ekvivalent a

zvláště pak imunologický ekvivalent proteinu. Při takových změnách je výhodná substituce aminokyselin, jejíž hodnoty hydrofilnosti jsou v rozmezí ± 2 , zvláště výhodné jsou ty, jejíž hodnoty hydrofilnosti jsou ± 1 a dokonce více výhodné jsou ty, jejíž hodnoty hydrofilnosti jsou $\pm 0,5$.

Jak se uvádí shora v textu, substituce aminokyselin jsou proto v obecném případě založeny na relativní podobnosti substituentů bočního řetězce aminokyselin například jejich hydrofobnosti, hydrofilnosti, náboji, velikosti a podobně. V oboru jsou známy příklady substitucí, kde je nutné zvažovat různé popsané charakteristiky, které zahrnují arginin a lyzin, glutamát a aspartát, serin a threonin, glutamin a asparagin a valin, leucin a izoleucin. To jsou výhodné konzervativní substituce.

Aminokyselinové substituce se mohou dále připravit na základě podobnosti polarit, náboje, rozpustnosti, hydrofóbnosti, hydrofilnosti a/nebo amfipatické podstaty zbytků. Například negativně nabitě aminokyseliny zahrnují kyselinu asparágovou a glutamovou, pozitivně nabitě aminokyseliny zahrnují lysin a arginin a aminokyseliny s polárními skupinami bez náboje, které vykazují podobné hodnoty hydrofilnosti zahrnují leucin, izoleucin a valin, glycin a alanin, asparagin a glutamin a serin, threonin, fenylalanin a tyrozin. Jiné skupiny aminokyselin, které reprezentují konzervativní změny zahrnují:

- 1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr
- 2) cys, ser, tyr, thr
- 3) val, ile, leu, met, ala, phe
- 4) lys, arg, his a
- 5) phe, tyr, trp, his.

Ve výhodném provedení vynálezu mutovaný IL-13 podle vynálezu obsahuje jednu nebo více následujících sekvencí nebo její variantu obsahující konzervativní substituci:

L K E L I E E L S N; (SEQ ID No 1)

F C V A L D S L; (SEQ ID No 2)

A I Y R T Q R I L H G; (SEQ ID No 3)

K I E V A H F I T K L L; (SEQ ID No 4)

Polypeptid podle vynálezu je kódován polynukleotidem podle vynálezu. Odborník je schopen snadno stanovit sekvenci polynukleotidu, který kóduje polypeptid aplikací genetického kódu. Když se stanovila požadovaná sekvence nukleové kyseliny, polynukleotid s požadovanou sekvencí se může produkovat způsobem popsaných v sekci příkladů. Pro odborníka je snadné upravit libovolné nezbytné parametry, jako jsou primery a podmínky PCR. Odborníkovi je jasné, že na základě degenerace genetického kódu existuje potencionálně více jak jeden nukleotid, který kóduje polypeptid podle vynálezu.

Polynukleotid podle vynálezu je v typickém případě RNA, jako je například mRNA nebo DNA, například genomová DNA, cDNA nebo syntetická DNA. Je výhodné, aby polynukleotid byl DNA. Zvláště výhodná je cDNA.

Vynález dále popisuje expresivní vektor, kterým je konstrukce nukleové kyseliny obsahující polynukleotid podle vynálezu. Navíc konstrukce nukleové kyseliny bude obsahovat vhodné iniciátory, promotory, zesilovače a jiné elementy, jako například polyadenylační signály, které mohou být nezbytné a které jsou umístěné ve správné orientaci za účelem umožnit expresi proteinu v savčí buňce.

Promotorem může být eukaryontní promotor, jako je například promotor CD68, Gall, Gall0 nebo promotor NMT, prokaryontní promotor, jako je například Tac, Trc nebo Lac nebo virový promotor, jako je například cytomegalovirový promotor, promotor SV40, promotor polyhedrinu, promotor P10 nebo promotor LTR respiračního syncytiálního viru. S výhodou promotorem je virový promotor. Zvláště výhodné je, když promotorem je časný promotor cytomegaloviru, který může obsahovat exon 1 z genu HCMV IE.

Elementy regulující transkripci mohou obsahovat zesilovač, jako je například povrchový antigen hepatitidy B 3' nepřekládané oblasti, zesilovač CMV, introny, například intron CD68 nebo intron A CMV nebo regulační oblasti například 5' nepřekládaná oblast CMV.

Polynukleotid je s výhodou operativně spojený s promotorem v konstrukci nukleové kyseliny tak, že když se konstrukce začlení do savčí buňky, polynukleotid se exprimuje za vzniku kódovaného polypeptidu.

Konstrukce hlavního řetězce polymeru může být RNA nebo DNA, jako je například plazmidová DNA, virová DNA, bakteriální DNA, bakteriální umělá chromozomová DNA, kvasinková umělá chromozomová DNA, syntetická DNA. Také je možné, aby konstrukce nukleové kyseliny byla umělá nukleová kyselina, například fosforothioát RNA nebo DNA. Konstrukcí je s výhodou DNA. Zvláště výhodné je, když jde o plazmidovou DNA.

Vynález popisuje hostitelskou buňku obsahující expresivní vektor podle vynálezu. Takové buňky zahrnují dočasnou nebo s výhodou stabilní buněčné linie vyšších eukaryontů, jako jsou savčí buňky nebo hmyzí buňky za použití bakulovirového expresivního systému, nižších eukaryontních buněk, jako jsou buňky kvasinek, nebo prokaryontních buněk, jako jsou bakteriální buňky. Příklady takových buněk, které se mohou

upravit začleněním vektorů, které kódují polypeptid podle vynálezu zahrnují savčí buňky HEK293T, CHO, HeLa, NS0 a COS. Výhodnou vybranou buněčnou linií bude ta, která není pouze stabilní, ale také umožňuje zralou glykosylaci polypeptidu. Exprese je možné dosáhnout transformovanými oocyty. Polypeptid podle vynálezu se může exprimovat v buňkách transgenního savce, kterým není člověk. Je výhodné, aby uvedeným savcem byla myš. Nebo je výhodné, aby se polypeptid exprimoval do mléka většího zvířete, jako je koza, ovce a kráva. Vynález dále popisuje transgenní zvíře, kterým není člověk a které exprimuje polypeptid podle vynálezu. Polypeptid podle vynálezu může také být exprimován v oocytech organismu *Xenopus laevis*.

Vynález dále zahrnuje farmaceutické nebo vakcinační prostředky, které obsahují terapeuticky účinné množství konstrukce nukleové kyseliny nebo polypeptidu podle vynálezu, které mohou být v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem s výhodou v kombinaci s farmaceuticky přijatelnou pomocnou látkou, jako je fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem (PBS), dextrózou, vodou, glycerolem, etanolem, lipozómy nebo jejich kombinací. Vakcinační prostředek může v jiném případě obsahovat terapeuticky účinné množství konstrukce nukleové kyseliny podle vynálezu vytvořeného na kovových částicích s výhodou částicích zlata. Vakcinační prostředek podle vynálezu může také obsahovat adjuvans jako je například forma vynálezu, imichimod, tukaresol nebo síran hlinoto-draselný.

Výhodné jsou prostředky obsahující proteinové adjuvans, které vyvolávají odezvy s vysokým titrem protilátek.

Adjuvans se s výhodou aplikuje ve stejný okamžik jako prostředek podle vynálezu a ve výhodných provedeních vynálezu jsou připraveny společně. Takové pomocné látky podle vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny syntetickými imidazochinoliny,

jako je imichimod [S-26308, R-837] (popisuje se v publikaci Harrison, et al., Reduction of recurrent HSV disease using imichimod alone or combined with a glycoprotein vaccine, Vaccine 19: 1820-1826, (2001)) a resichimod [S-28463, R-848] (popisuje se v publikaci Vasilakos, et al., Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN, Cellular immunology 204: 64-74 (2000)), Schiffovy báze karbonylů a aminů, které se podstatně exprimují na buňkách prezentujících antigen a na povrchu T buněk, jako je tukaresol (popisuje se v publikaci Rhodes, J. et al., Therapeutic potential of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs, Nature 377: 71-75 (1995)), cytokiny, chemokiny a kostimulační molekuly, indukční činidla odezvy Th1, jako je interferon gamma, IL-2, IL-12, IL-15 a indukční činidlo odezvy Th2, jako je IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 a jiný chemokin a kostimulační geny, jako je MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, Rantes, TCA-3, CD80, CD86 a CD40L, jiné imunostimulační cílené ligandy, jako je CTLA-4 a L-selektin, proteiny stimulující apoptózu a peptidy jako je Fas, (49), adjuvans založená na syntetických lipidech, jako je vaxfektin (popisuje se v publikaci Reyest et al., Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type Immune responses to plasmid DNA immunization, Vaccine 19: 3778-3786), skvalen, alfa-tokoferol, polysorbát 80, DOPC a cholesterol, endotoxin, [LPS], (popisuje se v publikaci Beutler, B., Endotoxin, Toll-like receptor 4 and the afferent limb of innate immunity, Current Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000)), CpG oligonukleotidy a dinukleotidy (popisuje se v publikaci Sato, Y et al., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization, Science 273 (5273): 352-354 (1996), Hemmi, H. et al., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, Nature 408: 740-745, (2000)) a jiné potencionální ligandy, které dávají podnět Tollovým receptorům k produkci cytokinů vyvolávající odezvu Th1, jako jsou

syntetické mykobakteriální lipoproteiny, mykobakteriální protein p19, peptidoglykan, kyselina teichoová a lipid A.

Jisté výhodné adjuvans pro vyvolání převládající odezvy typu Th1 zahrnuje například derivát lipidu A nebo s výhodou 3-de-O-acylovaný monofosforyllipid A. Pomocné látky MPL® jsou dostupné u firmy Corixa Corporation (Seattle, WA, popisuje se například v patentovém dokumentu 4 436 727, 4 877 611, 4 866 034 a 4 912 094). Oligonukleotidy obsahující CpG (ve kterém dinukleotid CpG není metylován) také vyvolává převážně odezvu Th1. Takové oligonukleotidy jsou dobře známy v oboru a popisují se například v patentovém dokumentu WO 96/02555, WO 99/33488 a v americkém patentovém dokumentu č. 6 008 200 a 5 856 462. V publikaci Sato et al., Science 273:352, 1996 se také popisují imunostimulační sekvence DNA. Jiné výhodné adjuvans obsahuje saponin, jako je Quil A nebo jeho deriváty, které zahrnují QS21 a QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), escin, digitonin nebo saponiny z *Gypsophila* nebo *Chenopodium quinoa*.

Vynález dále popisuje způsoby léčby nebo prevence onemocnění zprostředkovaných IL-13, libovolných symptomů nebo onemocnění spojených s IL-13 obsahující aplikací účinného množství proteinu, polynukleotidu, vektoru nebo farmaceutického prostředku podle vynálezu. Aplikace farmaceutického prostředku může mít formu jedné nebo více individuálních dávek, například při terapeutickém vakcinačním režimu „senzibilizace-posilující imunizace“. V jistých případech primární vakcinace může probíhat prostřednictvím zavedení DNA polynukleotidů podle vynálezu, které jsou s výhodou začleněny do vektoru odvozeného z plazmidu, zprostředkované částicemi. „Posilující imunizace“ se provádí aplikací rekombinantního virového vektoru obsahující stejnou polynukleotidovou sekvenci nebo proteinem obsaženým v adjuvans. Naopak senzibilizace se může provést virovým

vektorem nebo proteinovým přípravkem v typickém případě proteinem připraveným v adjuvans a posilující imunizace se provede DNA vakcínou podle vynálezu.

Za účelem ošetření onemocnění způsobené vlastním antigenem, jako je například IL-13 je výhodné, když adjuvans je indukčním činidlem odezvy TH1. Adjuvans zvláště obsahuje imunostimulační oligonukleotid CpG, jak se popisuje v dokumentu WO 96/102555. Typické imunostimulační oligonukleotidy budou obsahovat 8 až 100 bazí a obsahují obecný vzorec $X_1 \text{ CpGX}_2$, kde symbol X_1 a X_2 jsou nukleotidové báze a C a G nejsou metylovány.

Oligonukleotidy výhodné pro použití v adjuvans nebo ve vakcínách podle vynálezu s výhodou obsahují dva nebo více dinukleotidových motivů CpG, které jsou s výhodou odděleny alespoň třemi, výhodněji alespoň šesti nebo více nukleotidy. Oligonukleotidy podle vynálezu jsou v typickém případě deoxynukleotidy. Ve výhodném provedení vynálezu internukleotid v oligonukleotidu je fosforodithioát nebo s výhodou fosforothioátová vazba, ačkoliv fosfodiester a jiné internukleotidové vazby jsou obsahem vynálezu zahrnujícím oligonukleotidy se smíchanými internukleotidovými vazbami, jako jsou například smíchané fosforothioát/fosfodiester. Mohou se použít jiné internukleotidové vazby, které stabilizují oligonukleotid. Způsoby produkce fosforothioátových oligonukleotidů nebo fosforodithioátů se popisují v americkém patentovém dokumentu č. 5 666 153, 5 278 302 a WO 95/26204.

Příklady výhodných oligonukleotidů mají následující sekvence. Sekvence s výhodou obsahují fosforothioát upravený internukleotidovými vazbami.

OLIGO 1: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) (SEQ ID NO 5)
OLIGO 2: TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) (SEQ ID NO 6)
OLIGO 3: ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO 7)
OLIGO 4: TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) (SEQ ID NO 8)
OLIGO 5: TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668) (SEQ ID NO 9)

Alternativní CpG oligonukleotidy mohou obsahovat shora popsané výhodné sekvence, ve kterých jsou nedůležité delece nebo adice. Oligonukleotidy CpG využívané podle vynálezu se mohou syntetizovat libovolným způsobem popsaným v oboru (například v patentovém dokumentu EP 468520). Takové oligonukleotidy se mohou běžně syntetizovat využitím automatického syntetizéru. Adjuvantní prostředek obsahující oligonukleotid CpG se může získat od firmy Qiagen pod názvem „ImmunEasy“.

Prostředky podle vynálezu se mohou použít v případě profylaxe a terapie. Vynález dále popisuje polypeptid nebo polynukleotid podle vynálezu, který je vhodný pro použití v lékařství. Vynález dále obsahuje použití polypeptidu nebo polynukleotidu podle vynálezu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu alergií, respiračních poruch, jako je astma a COPD, poruch spojených s nákazou červi, fibrózy nebo cirhózy jater.

Vynález také popisuje způsob vakcinace, která obsahuje aplikaci účinného množství vakcinačního prostředku podle vynálezu pacientovi a vyvolání imunitní odezvy vůči vakcinačnímu prostředku.

Vynález dále popisuje vakcinační prostředky vhodné pro vakcinaci savce proti poruchám způsobených IL-13, jako jsou alergie, respirační onemocnění, onemocnění spojené s nákazou červi, fibróza a cirhóza jater. Respirační onemocnění zahrnují například astma, jako je alergické astma a chronické obstruktivní pulmonární onemocnění (COPD). Vakcinační

prostředek schopný řídit neutralizační odezvu vůči IL-13 bude zahrnovat použitelný terapeutický prostředek pro léčbu astma, zvláště alergické astma u lidí. Uvedený vakcinační prostředek se bude také aplikovat při léčbě jistých poruch spojených s nákazou červi (popisuje se v publikaci Brombacher, 2000 Bioessays 22: 646-656) a onemocnění, kde produkce IL-13 je důsledek fibrózy (Chiaramonte et al., 1999, J. Clin. Inv. 104: 777-785), jako je chronické obstruktivní pulmonární onemocnění (COPD) a cirhóza jater. Vakcinační prostředky podle vynálezu se mohou aplikovat různými způsoby, například prostřednictvím sliznice, jako orální a nosní sliznice, pulmonární cestou, intramuskulárně, subkutánně nebo intradermálně. V případě, že se antigen aplikuje jako vakcína založená na proteinu, pak se vakcína vytvoří s adjuvans a může se lyofilizovat a těsně před použitím se resuspenduje ve vodě. Takové prostředky se mohou aplikovat jedinci pomocí injekce, například jako sterilní vodná disperze s výhodou izotonická. V typickém případě takové prostředky se budou aplikovat do svalu, ale jsou možné také jiné způsoby aplikace.

Jednou metodou intradermální aplikace je bombardování částicemi (tato metoda je známa jako technologie „genové dělo“ a popisuje se v americkém patentovém dokumentu č. 537 1015). Proteiny se mohou tvořit s cukry, přičemž vznikají malé částice, nebo inertní částice se mohou potáhnout DNA kódující antigen (jako jsou částice zlata) a jsou urychleny na rychlost dostatečnou k penetraci povrchu příjemce (kterým je například kůže), například vystřelením za vysokého tlaku z vyčnívajícího zařízení. (Částice potažené vakcinačními konstrukcemi nukleové kyseliny podle vynálezu a proteinové cukerné částice jsou obsahem vynálezu, stejně jako zařízení, které slouží k vystřelování takových částic.). Jiné metody aplikace konstrukcí nukleových kyselin nebo prostředků obsahujících uvedené konstrukce přímo příjemci zahrnují ultrazvuk,

stimulace elektrickým proudem, elektroporace a mikroočkování, jak se popisuje v americkém patentovém dokumentu č. 5 697 901.

Konstrukce nukleové kyseliny podle vynálezu se může také aplikovat pomocí specializovaných zaváděcích vektorů, které je možné použít při genové terapii. Přístupy genové terapie se diskutují například v publikaci Verme et al., Nature 1997, 389:239-242. Je možné použít virové a nevirové systémy. Systémy založené na virech zahrnují retrovirové, lentivirové, adenovirové, adeno-asociované virové systémy, systémy viru herpes a systémy založené na viru vakcinie. Systémy, které nejsou virové zahrnují přímou aplikaci nukleových kyselin a systémů založených na lipozomech. Vektory se mohou například uzavírat do lipozomů nebo do polylaktidových ko-glykolidových částic (PLG).

Konstrukce nukleové kyseliny podle vynálezu se může také aplikovat transformovanými hostitelskými buňkami. Takové buňky zahrnují buňky získané ze subjektu. Vakcinační konstrukce nukleových kyselin se mohou zavést do takových buněk *in vitro* a transformované buňky se mohou později vrátit subjektu. Konstrukce nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou začlenit do nukleové kyseliny, která je přítomná v buňce homologní rekombinací. Transformovaná buňka, je-li to nutné, se nechá růst *in vitro* a jedna nebo více výsledných buněk se může použít podle vynálezu. Buňky se pak mohou vnést do vhodného místa pacienta známými chirurgickými nebo mikrochirurgickými metodami (jako je například ve formě štěpů, mikroinjekcí, atd.). Vhodné buňky zahrnují dendritické buňky.

Množství zaváděného vakcinačního prostředku podstatně kolísá v závislosti na druhu a hmotnosti savce, který se imunizuje, podstatě onemocnění, které je léčeno nebo proti kterému se vyvolává ochrana, na upraveném vakcinačním protokolu (to znamená jediná aplikace proti opakovaným dávkám, způsobu aplikace a síle a dávce vybrané pomocné sloučenině. Na

základě uvedených proměnných je pro lékaře a veterináře snadné stanovit vhodnou dávku. Když je vakcínou například nukleová kyselina, pak dávka bude 0,5 až 5 μg /kg konstrukcí nukleových kyselin nebo prostředku, který je obsahuje. Dávka kolísá v závislosti na způsobu aplikace. Když se použije intradermální aplikace na částicích zlata, celková dávka bude s výhodou mezi 1 μg až 10 ng, zvláště výhodné je, když celková dávka je v rozmezí 10 μg až 1 ng. V případě, že konstrukce nukleové kyseliny se aplikuje přímo, celková dávka je v obecném případě vyšší, pohybuje se například v rozmezí 50 μg až 1 mg nebo více miligramů. Shora v textu uvedené dávky jsou příklady průměrného případu.

V případě proteinové vakcíny množství proteinu v každé vakcinační dávce se vybralo jako množství, které zahrnuje imunoprotektivní odezvu aniž vykazuje podstatné nežádoucí vedlejší účinky typických vakcín. Takové množství bude kolísat v závislosti na použitém specifickém imunogenu. V obecném případě se očekává, že každá dávka bude obsahovat 1 až 1 000 μg proteinu, s výhodou 1 až 500 μg , s výhodou 1 až 100 μg , nejvýhodněji 1 až 50 μg . Optimální množství určité vakcíny může být zjištěno standardní studií, která zahrnuje pozorování vhodné imunitní odezvy vakcinačního subjektu. Při následující počáteční vakcinaci se subjektům může aplikovat jedna nebo více adekvátně umístěných zesilujících imunizačních dávek. Takový vakcinační prostředek se může aplikovat buď ve vakcinačním režimu se senzibilizací nebo ve vakcinačním režimu s posilovacími imunizačními dávkami. Vakcinační prostředek se může aplikovat systematicky, například transdermální, subkutánní nebo intramuskulární cestou nebo se může aplikovat sliznicí například intranasální nebo orální cestou.

Mohou samozřejmě existovat individuální případy, kde je možné použití vyšší nebo nižší rozmezí dávek a takové jsou v rozsahu vynálezu.

Vakcinační prostředek je možné aplikovat jednou nebo opakovaně, přičemž výhodné je 1 až 7 krát, s výhodou 1 až 4 krát v intervalech 1 den až 18 měsíců, výhodný je v intervalu jednoho měsíce. Pak je možné pokračovat v aplikaci dávky v pravidelných intervalech mezi jedním a 12 měsíci po zbytek života pacienta. V určitém provedení vynálezu se pacientovi aplikuje antigen v různých formách ve vakcinačním režimu se senzibilizací a s aplikací zesilovací dávky. Pak se například antigen nejdříve aplikuje jako vakcína založené na DNA a pak se následně aplikuje prostředek s proteinovým adjuvans. Avšak tento léčebný režim bude podstatně kolísat v závislosti na velikosti a druhu uvažovaného zvířete, množství vakcíny obsahující nukleovou kyselinu a/nebo aplikovaném proteinovém prostředku, způsobu aplikace, síle a dávce libovolných pomocných sloučenin a jiných faktorech, které budou zjevné veterinárnímu a praktickému lékaři.

Následující příklady ilustrují teoretické úvahy podle vynálezu v případě myši, spíše než v případě lidí tak, že protein je myši a obsahuje mutace charakteristické pro lidský protein, ale výsledky je možné snadno převést na léčbu lidí, přičemž protein bude mít epitopy T buněk pocházejících z člověka s mutacemi charakteristickými pro myš, nebo jiný analogický protein.

V příkladech podle vynálezu se použití provede různými dobře známými metodami molekulární a buněčné biologie. Praktické detaily těchto metod se popisují v publikaci Sambrook et al., 1989, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press: New York). Aminokyselinové sekvence nebo označení je dáno buď jednopísmenným nebo třípísmenným kódem. Předpona „h“ se používá k označení proteinu nebo genu lidského původu, symbol „m“ znamená myši původ a „c“ znamená chimerickou konstrukci. Symbol „r“ se používá pro označení rekombinantního proteinu.

Přehled obrázků na výkrese

Zkratka GST znamená glutathionová S-transferáza. Zkratka rmIL-13 znamená rekombinantní myší IL-13. Zkratka rhIL-13 znamená rekombinantní lidský IL-13. Zkratka cIL-13 znamená chimerický IL-13.

Obr. 1 zobrazuje sekvenci vakcinační konstrukce myšího chimerického IL-13. Podtržené symboly aminokyselin značí sekvenci lidského IL-13, neoznačené symboly pochází z myšího IL-13.

Obr. 2 zobrazuje analýzu GST cIL-13 provedenou SDS-PAGE na 4 až 20 % Tris-glycinovém gelu (Novex), který se barvil Coomassieovou modří, aby se zjistilo celkové množství proteinu.

Obr. 3 zobrazuje analýzu GST-cIL-13 westernovým přenosem.

Obr. 4 zobrazuje analýzu testem ELISA pomocí interakce cIL-13 a GST-cIL-13 s polyklonální protilátkou proti mIL-13, s polyklonální protilátkou proti hIL-13 a s polyklonální protilátkou proti GST.

Obr. 5 zobrazuje analýzu testem ELISA pomocí interakce cIL-13 a GST-cIL-13 s receptory mIL-13, mIL-13R α 1 a mIL-13R α 2.

Obr. 6 zobrazuje anti-fosfo-STAT6 westernův přenos lyzátu A549.

Obr. 7 zobrazuje protilátkové odezvy vyvolané imunizací s GST-cIL-13 (myší F5) nebo cIL-13 (myší E5).

Obr. 8 zobrazuje anti-fosfo-STAT6 westernův přenos lyzátů A549.

Obr. 9 zobrazuje vakcinační prostředek obsahující chimerický IL-13, kterou je možné použít u lidí. Podtržené symboly aminokyselin značí sekvenci nalezenou v myším IL-13, neoznačené symboly pochází z lidského IL-13.

Obr. 10 zobrazuje profily protilátek proti myšimu IL-13, které vznikly po aplikaci cIL-13 v kombinaci s různými adjuvans.

Obr. 11 zobrazuje neutralizační kapacitu myšího séra po aplikaci cIL-13.

Obr. 12 zobrazuje alternativní cIL-13 vhodné pro použití jako myšího imunogenu.

Obr. 13 zobrazuje chimerický IL-4 vhodný pro použití v lidském vakcinačním prostředku proti IL-14.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Návrh vakcíny proti myšimu IL-13

IL-13 patří do rodiny 4-helikálních cytokinů (popisuje se v publikaci Murzin et al., 1995, J. Mol. Biol. 247: 536-540). Jednotlivý členové této super rodiny jsou příbuzní strukturou, ale je obtížné je srovnávat na úrovni sekvencí. Struktura 3D IL-13 nebyla ještě stanovena, ale vytvořily se struktury v případě řady 4-helikálních cytokinů. V případě ortologů IL-13 se vytvořilo srovnání více sekvencí a také v případě dalších cytokinů se stanovila struktura alespoň jednoho člena (IL-4, GM-CSF, IL-5 a IL-2). Za použití DSC (popisuje se v publikaci King and Sternberg, 1996, Prot. Sci. 5: 2298-2310), SIMPA96 (popisuje se v publikaci Levin, 1997, Prot. Eng. 7:771-776) a Pred2ary (popisuje se v publikaci Chandonia and Karplus, 1995, Prot. Sci. 4: 275-285) se vytvořil předpoklad sekundární struktury uspořádání více sekvencí proteinu IL-13. Uspořádání více sekvencí jednotlivých

cytokinových proteinů se vzájemně porovnaly za použití informace o sekvenci a struktuře (vycházejíc ze známých krystalických struktur a sekundárních struktur).

Antigenní místa, specificky epitopy B buněk, se předpověděly v případě myšího IL-13 za použití software Cameleon (Oxford Molecular) a mapovaly se v případě struktury IL-4 (přístupové číslo 1RCB v Brookhavenově databázi) za použití uspořádání více sekvencí proteinu, aby se objasnilo, kde se nacházejí ve struktuře IL-13. Na základě uvedené analýzy se vybraly exponované oblasti, které byly obě antigenní a podílely se na navázání receptoru.

Na základě tohoto modelu se navrhla chimerická sekvence IL-13, kde sekvence předpokládaných antigenních smyček se vzaly z myšího IL-13 a sekvence předpokládaných strukturních (převážně helikálních) oblastí se vzaly z lidského IL-13. Účelem tohoto návrhu je identifikace cílových epitopů z myšího IL-13, proti kterým vznikají neutralizační protilátky, a jejich prezentace v základní struktuře, která je podobná přirozenému proteinu. Tato struktura dále obsahuje dostatečnou sekvenční variaci vzhledem k přirozenému (myšímu) proteinu, aby se zajistilo, že je přítomen jeden nebo více CD4 T pomocných epitopů. Sekvence nukleových kyselin a proteinů vybraných pro tento případ vakcinačního prostředku obsahující chimerický IL-13 jsou zobrazeny na Obr. 1 (SEQ ID NO: 19 a 20). Podtržené sekvence odpovídají sekvencím nalezeným v lidském ortologu. Substituovalo se dvanáct aminokyselin, aby se dosáhlo sekvence na Obr. 1. Rozumí se, že degenerace genetického kódu umožňuje řadě možných sekvencí nukleových kyselin kódovat identické proteiny. Dále je vhodné, aby vynález popisoval další možné vakcíny obsahující chimerický IL-13, které vykazují jiné ortologní mutace v neexprimovaných oblastech.

1.2 Příprava chimerického IL-13

DNA sekvence chimerického IL-13 (cIL-13) se syntetizovala ze série částečně přesahujících DNA oligonukleotidů se sekvencemi cIL-13-1 až cIL-13-6 zobrazenými v tabulce č. 1. Tyto oligonukleotidy se hybridizovaly a DNA cIL-13 se vytvořila pomocí PCR s cykly: 1 cyklus při teplotě 94 °C po dobu 1 minuty a pak následuje 25 cyklů při teplotě 94 °C po dobu 30 vteřin, 55 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 2 minuty. Pak následuje 72 °C po dobu 2 minuty a po ukončení cyklů následuje ochlazení na teplotu 4 °C. Reakční produkt obsahoval pruh očekávané velikosti 361 párů bazí, který se subklonoval do klonovacího vektoru T/A pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, Holandsko) za vzniku pCR2.1-cIL-13. Fragment cIL-13 získaný štěpením pCR2.1-CIL-13 pomocí restrikčních enzymů BamH1 a Xho1 se subklonoval do restrikčních míst BamH1 a Xho1 vektoru pGEX4T3 (Amersham Pharmacia, Amersham, Bucks, UK) za vzniku pGEX4T3-cIL-13/1. Sekvenováním konstrukce pGEX4T3-cIL-13/1 se zjistilo, že mezi sekvencí GST a cIL-13 se nachází navíc 39 párů bazí (získané z vektoru pCR2.1). Aby se tato chyba opravila, opakovalo se v případě cIL-13 PCR za použití pGEX4T3-cIL-13/1 a primerů cIL-13new a cIL-13R. Získaný produkt PCR se pak klonoval zpátky do pGEX4T3 za použití restrikčních míst BamH1 a Xho1 za vzniku expresivního vektoru pGEX4T3-cIL-13. Sekvence této konstrukce se ověřila sekvenací s dideoxy-terminátorem. Tento vektor kóduje genetický fúzní protein obsahující glutathion-S-transferázu a cIL-13 (GST-cIL-13). Dvě části proteinu jsou spojené krátkým mezerníkem, který obsahuje místo, které rozeznává trombinu. Fúzní protein je možné snadno čistit afinitní chromatografií s glutathionovou sefarázou a pak se používá přímo nebo se připraví volný cIL-13 produkovaný štěpením trombinem.

Tabulka č. 1. Oligonukleotidy používané ke konstrukci chimerického IL-13.

Oligo	sekvence (5'-3')
cIL-13-1R (SEQ ID NO 10)	TGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGCTCCCTAAGGG TCAGAGGGAGAGACACAGATCTTGGCACCGGCCC
cIL-13-2F (SEQ ID NO 11)	AGGAGCTGGTCAACATCACACAAGACCAGACTCCCT GTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGACCTGGC
cIL-13-3R (SEQ ID NO 12)	GCAATTGGAGATGTTGGTCAGGGATTCCAGGGCTGCA CAGTACCCGCCAGCGGCCAGGTCCACACTCCATAC
cIL-13-4F (SEQ ID NO 13)	TGACCAACATCTCCAATTGCAATGCCATCGAGAAGACC CAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACCGCAAGGC
cIL-13-5R (SEQ ID NO 14)	AAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTATCGGGGAGGCTG GAGACCGTAGTGGGGGCCTTGCGGTTACAGAGTCC
cIL-13-6F (SEQ ID NO 15)	AAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAGGACCTGCTCAG CTACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCCCTTC
cIL-13F (SEQ ID NO 16)	CGCGGATTCGGGCCGGTGCCAAGATCTG
cIL-13R (SEQ ID NO 17)	CTCCGCTCGAGTCGACTTAGAAGGGGCCGTGGCGAAA
cIL-13Fnew (SEQ ID NO 18)	CGCGGATCCGGGCCGGTGCCAAGATCTG

Exprimovaný vektor pGEX4T3-cIL-13 se transformoval do kmene *E. coli* BLR (Novagen, získaný z instituce Cambridge Bioscience, UK). Exprese GST-cIL-13 se vyvolala přidáním 0,5 mM IPTG do kultury v logaritmické fázi růstu, pak následuje další kultivace po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Bakterie se shromáždily centrifugací a GST-cIL-13 se izoloval metodou popsanou shora v textu pro izolaci podobného fúzního proteinu GST-lidský IL-13 (popisuje se v publikaci McKenzie et al., 1993, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 3735-3739).

Charakterizace vlastností cIL-13

Vzorky izolovaného GST-cIL-13 se analyzovaly elektroforézou SDS-PAGE. Obr. 2 zobrazuje, že izolovaný přípravek obsahuje protein, jehož velikost odpovídá očekávané velikosti GST-cIL-13. Menší pruh reprezentuje malé množství

GST, který vznikl částečným štěpením fúzního proteinu během přípravy.

Aby se potvrdilo, že izolovaný protein byl GST-cIL-13, vzorky se oddělily pomocí SDS-PAGE, nanesly se na membránu PVDF a pak se analyzovala přítomnost IL-13 a imunoreaktivita GST pomocí westernovým přenosem. Poněvadž cIL-13 obsahuje sekvenci vzniklou z lidského a myšího IL-13, očekává se, že ho bude rozeznávat specifické antisérum určené proti lidskému IL-13 a myšímu IL-13. Bloty se pak blokovaly 3 % bovinním sérovým albuminem (BSA) v TBS (50 mM Tris-HCl, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH8,0) obsahující 0,05 % Tween-20 (TBST) přes noc při teplotě 4 °C a inkubovaly se s primární protilátkou po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti (RT) za stálého míchání, pak se 4 krát promyly s TBST. Pak se přidala za stálého míchání po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti sekundární protilátka. Pak se bloty čtyřikrát promyly a zviditelnily se chemoluminiscenčním činidlem SuperSignal (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

Obr. 3 (popis shora v textu) ilustruje výsledky uvedené analýzy, která ukazuje, že izolovaný protein je rozeznáván protilátkami proti lidskému IL-13, myšímu IL-13 a GST, což potvrzuje, že tvoří očekávanou strukturu.

dráha	vzorek	primární protilátka
1	GST-clL-13	Anti-mIL-13
2	rhIL-13	Anti-mIL-13
3	rmIL-13	Anti-mIL-13
4	Markers	-
5	GST-clL-13	Anti-hIL-13
6	rhIL-13	Anti-hIL-13
7	rmIL-13	Anti-hIL-13
8	Markers	-
9	GST-clL-13	Anti-GST
10	rhIL-13	Anti-GST
11	rmIL-13	Anti-GST
12	GST	Anti-GST

Primární protilátky používané v tomto experimentu jsou: anti-hIL-13 (kat. č. AF-213-NA, R&D Systems, Abingdon, Oxford, UK používané v koncentraci 1 µg/ml), anti-mIL-13 (kat. č. AF-413-NA, R&D Systems, Abingdon, Oxford, UK používané v koncentraci 1 µg/ml) a Anti-GST (kat. č. 27-4590D, Pharmacia, používané v koncentraci 1/200). Sekundární protilátky používané v tomto experimentu byly protilátky proti kozímu IgG konjugované s HRP (kat. č. A-5420, Sigma-Aldrich Company, Ltd. Poole, Dorset, používané v koncentraci 1/40 000).

Vzorky proteinu byly GST-cIL-13 připravené způsobem popsáním v příkladu 2, rekombinantní lidský IL-13 (rhIL-13) (kat. č. CH1-013, Cambodge Bioscience, Cambridge, UK), rekombinantní myší IL-13 (mIL-13) (kat. č. 413-ML-025, R&D Systems) a GST připravený z mikroorganismu *E. coli* transfekovaného prázdným vektorem pGEX4T3 (popisuje se v publikaci Sambrook et al., 1989, 2nd. Cold Spring Harbor Press: New York).

1.3. Konformace chimerického IL-13

Aby se potvrdilo, že GST-cIL-13 vytvoří podobnou konformaci v roztoku, jako je konformace přirozeného IL-13, vzorky GST-cIL-13 a cIL-13 (vytvořené z GST-cIL-13 štěpením trombinem) se analyzovaly testem ELISA. Destičky Maxisorp obsahující 96 prohlubní (Life Technologies, Ltd., Paisley, UK) se potáhly cIL-13, GST-cIL-13, mIL-13, hIL-13 nebo gst v uhličitan-hydrogenuhličitanovém pufru přes noc při teplotě 4°C. Destičky se blokovaly 3% BSA/TBST po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti, promyly se tři krát v TBST, inkubovaly se s primární protilátkou po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti a pak se promyly 3 krát TBST. Přidaly se sekundární protilátky a vše se inkubovalo o dobu jedné hodiny, promylo se

3 krát v TBST, pak se došlo ke zviditelnění pomocí 0-fenylendiamindihydrochloridperoxidázového substrátu (OPD, Sigma Aldrich) po dobu 30 minut. Primární a sekundární protilátky používané v tomto experimentu se například popisují shora v textu. Jak je zobrazeno na Obr. 4, GST-cIL-3 a cIL-13 jsou specificky rozeznávány protilátkami s lidským IL-13 a myším IL-13. Tato data potvrzují, že při postupu chimerizace nedošlo k velkým změnám konformace proteinu.

1.4 Navázání chimerického IL-13 na receptory.

Test ELISA se použil ke stanovení, zda cIL-13 by se mohl vázat na známé myší receptory IL-13 (mIL-13R1 nebo mIL-13R2). Destičky Maxispor s 96 prohlubněmi se potáhly protilátkami proti lidskému IgG (kat. č. I-3382, Sigma Aldrich) v pufru uhličitán-hydrogenuhličitán při teplotě 4 °C. Destičky se pak blokovaly 3 % BSA/TBST po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, promyly se v TBST a inkubovaly se s mIL-13R1-Fc nebo mIL-13R2-Fc (kat. č. 491-IR-200 a 539-IR-100, R+D Systems) po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Po promytí se destičky inkubovaly s ředěním mIL-13 nebo cIL-13 nebo GST-cIL-13 po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, pak se destičky opět promyly a inkubovaly se s biotinylovanými protilátkami proti mIL-13 (kat. č. BAF413, R+D Systems). Následuje další promývání a inkubace se streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou, přičemž se destičky zviditelnily použitím substrátu pro 0-fenylendiamindihydrochloridperoxidázu po dobu 30 minut. Jak je zobrazeno na Obr. 5 cIL-13 a GST-cIL-13 jsou schopny se vázat na libovolný z receptorů mIL-13. Tato data potvrzují, že při chimerizačním postupu nedošlo ke změně konformace proteinu.

1.5 Biologická aktivita chimerického IL13

Biologická aktivita GST-cIL-13 se odhadla na základě schopnosti proteinu fosforylovat STAT6 v buněčné linii

lidských plicních fibroblastů A549. Tyto buňky exprimují receptor lidského IL-4 typ-2, který odpovídá za IL-4 a IL-13. Stimulace těchto buněk s hIL-4, hIL-13 nebo mIL-13 vyvolává fosforylaci signalizačního proteinu STAT6. Buňky A549 v množství 5×10^5 se nanasly na destičky pro kultivaci tkání o průměru 60 mm (Life Technologies) do RPMI (Life technologies) a nechaly se růst až do dosažení 70 % konfluentnosti. Buňky se pak inkubovaly s cytokinem v koncentraci 2 až 150 ng/ml nebo s izolovaným cIL-13 po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Protože přítomnost fúzního partnera GST může změnit biologickou aktivitu cytokinů, chimerický IL-13 se testoval jako fúzní protein GST-cIL-13 a volný cIL-13 se uvolnil z fúzního proteinu štěpením trombinem. Také se testoval rmIL-13 a GST. Buněčný lyzát se pak připravoval a analyzoval westernovým přenosem v přítomnosti fosfo-STAT6 za použití králíčí polyklonální protilátky proti fosfo-STAT6 (NEB, Hitchin, Herst, UK, kat. č. 9361S). Bloty se blokovaly přes noc 5 % BSA/TBST (BSA musí být A-7906 od firmy Sigma, jako primární protilátka je fosfo-specifická, 0,1 % Tween-20), primární protilátka se přidala v koncentraci 1/1 000 po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti a pak se promyla 3 krát s TBST. Anti-králíčí sekundární protilátka konjugovaná s HRP (A-4914, Sigma Aldrich) se přidala v koncentraci 1/5 000, směs se inkubovala po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti a pak se promyla 4 krát s TBST dříve než se ke zviditelnění použil chemoluminiscenční substrát HRP činidlo ECL (Amersham Pharmacia). Výsledky tohoto experimentu jsou zobrazeny na Obr. 6.

Do každé dráhy se nanaslel následující protein:

dráha	lyzáty buněk A549 ošetřené:
1	50 ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)

2	10 ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
3	2 ng/ml rmIL-13 (R&D Systems)
4	50 ng/ml cIL-13
5	10 ng/ml cIL-13
6	2 ng/ml cIL-13
7	150 ng/ml GST-cIL-13
8	30 ng/ml GST-cIL-13
9	6 ng/ml GST-cIL-13
10	není ošetřeno
11	1 µg/ml GST
12	0,25 µg/ml GST
13	markery molekulové hmotnosti

Použila se rekombinantní proteinová činidla jak se popisuje na Obr. 3.

Ošetření buněk A549 s 50 nebo 10 ng/ml (ale nikoliv 2 ng/ml) rmIL-13 vyvolalo fosforylaci STAT6, což indikuje biologickou aktivitu. Ošetření buněk A549 s 50 ng/ml (ale nikoliv s 10 nebo 2 ng/ml) cIL-13 vyvolalo fosforylaci STAT6, což indikuje biologickou aktivitu. Podobně 150 ng/ml GST-cIL-13 (což je přibližně ekvivalent koncentrace vyjádřené v molech s 50 ng/ml cIL-13) je biologicky aktivní, zatímco koncentrace 30 a 6 ng/ml není biologicky aktivní. cIL-13 je proto agonistou vůči uvedenému receptoru, ale za těchto experimentálních podmínek je přibližně pět krát méně biologicky aktivní ve srovnání s mIL-13.

1.6 Imunizace s cIL-13

cIL-13 a GST-cIL-13 se pak použily jako imunogeny, aby došlo k vytvoření auto-protilátek proti myšímu IL-13 u myši Balb/c. Samicím myši ve věku 6 až 8 týdnů se aplikovala do místa spojení ocasu s tělem jedna podkožní injekce (sc) obsahující 30 μ g proteinu v kompletním Freundově adjuvans (CFA). Pak následovaly tři zesilující imunizace do stejného místa, přičemž každá obsahuje přibližně 10 μ g proteinu v neúplném Freundově adjuvans (IFA). Každá ošetřená skupina obsahovala 5 zvířat a ty se imunizovaly podle protokolu uvedeného v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2

skupina	imunizace
A	kontrolní fyziologický roztok v CFA/IFA s/c
B	30/10 μ g GST v CFA/IFA s/c
C	neimunizované myši
D	30/10 μ g GST-hIL-13 v CFA/IFA s/c
E	30/10 μ g cIL-13 v CFA/IFA s/c
F	30/10 μ g GST-cIL-13 v CFA/IFA s/c

dny	ošetření
-12	předchozí odběr krve
0	primární imunizace
14	první zesilující imunizace
27	odběr krve z ocasu

42	odběr krve z ocasu
49	druhá posilující imunizace
70	odběr krve z ocasu
97	odběr krve z ocasu
99	třetí posilující imunizace
113	odběr krve z ocasu
140	odběr krve z ocasu

Vzorky séra se získaly venepunkcí ocasní cévy v čase specifikovaném v tabulce č. 2. Po vyčiření centrifugací se vzorky testovaly testem ELISA za účelem zjištění přítomnosti specifické IgG odezvy vůči myšimu IL-13, lidského IL-13 a GST. Žádná zvířata ve skupinách 1 až D nevykazují v libovolném časovém okamžiku protilátky proti myšimu IL-13. Všechna zvířata ve skupinách B, D a F vykazovala silnou IgG odezvu vůči GST (zvířata ve skupině E také vykazují silnou protilátkovou odezvu vůči GST, protože ve vzorku cIL-13 užívaném při imunizaci uvedených myši zbyl GST). Protilátkové odezvy proti myšimu IL-13 se vyvolaly u všech z pěti zvířat ve skupině F a u čtyř z pěti zvířat ve skupině E. Obr. 7 (a i b) ukazuje serologickou analýzu v případě jednoho z uvedených zvířat ve skupině F a jednoho z uvedených zvířat ve skupině E 7b (imunizovaný gst-cIL-13 a imunizovaný cIL-13). Tyto výsledky ukazují, že imunizace s GST-cIL-13 nebo cIL-13 je schopna porušit toleranci vůči mIL-13 za vzniku myších protilátek proti mIL-13.

V případě sér ze dvou myší (F1d70 a F5d97), které vykazovaly silnou IgG odezvu proti mIL-13, se testovala

kapacita neutralizovat biologickou aktivitu rmIL-13 v testu A549/fosfo-STAT6. 20 ng/ml nebo 10 ng/ml rmIL-13 (R&D Systems) se inkubovalo s 1 % sérem v kultivačním médiu pro tkáňové kultury RPMI bez séra po dobu 15 minut při teplotě místnosti a pak následuje inkubace s buňkami A549 po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Připravil se buněčný lyzát a analyzoval se westernovým přenosem v přítomnosti fosfo-STAT6, jak se popsalo dříve v textu. Jako negativní kontrola se získalo sérum z myši Balb/c imunizovaných s GST-hIL-13 obsahující protilátky proti hIL-13 a jak vykazuje test ELISA došlo k vyvolání silné odezvy proti hIL-13. Toto sérum neobsahuje protilátky proti mIL-13. Jako pozitivní kontrola slouží normální myši sérum, kam se přidaly protilátky proti mIL-13 (R&D Systems, kat. č. AF-413-NA) tak, aby konečné koncentrace byla 1 µg/ml.

Výsledky uvedeného experimentu jsou zobrazeny na Obr. 8.

dráha	cytokin	protilátka
1	20 ng/ml rmIL-13	normální myši sérum
2	10 ng/ml rmIL-13	normální myši sérum
3	0 ng/ml rmIL-13	normální myši sérum
4	20 ng/ml rmIL-13	vzorek séra F1d70
5	10 ng/ml rmIL-13	vzorek séra F1d70
6	0 ng/ml rmIL-13	vzorek séra F1d70
7	20 ng/ml rmIL-13	myši sérum obsahující protilátku proti hIL-13
8	10 ng/ml rmIL-13	myši sérum obsahující protilátku proti hIL-13
9	0 ng/ml rmIL-13	myši sérum obsahující

		protilátku proti hIL-13
10	markery molekulové hmotnosti	
11	0 ng/ml rmIL-13	normální myší sérum + protilátka proti mIL-13
12	20 ng/ml rmIL-13	vzorek séra F5d97
13	10 ng/ml rmIL-13	vzorek séra F5d97
14	0 ng/ml rmIL-13	vzorek séra F5d97
15	20 ng/ml rmIL-13	normální myší sérum + protilátka proti mIL-13
16	10 ng/ml rmIL-13	normální myší sérum + protilátka proti mIL-13

Imunizace s chimerickým imunogenem IL-13 podle vynálezu vyvolává produkci autoprotiilátek proti myšímu IL-13 schopných neutralizovat biologickou aktivitu myšího IL-13 (dráhy 4, 5, 12, 13) způsobem, který je porovnatelný s exogenně přidanou protilátkou proti myšími IL-13 (dráhy 15, 16). Tato aktivita není přítomna v normálním myším séru (dráhy 1,2) ani v séru ze zvířat imunizovaných s GST-hIL-13 (dráhy 7,8).

Tyto data poskytují základ pro léčbu savců s onemocněním způsobených IL-13 vakcinací s cIL-13 a tak dojde k vyvolání endogenní neutralizační protilátkové aktivity.

1.7 Alternativní konstrukce

1.7.1 Návrh cIL-13 značeného šesti molekulami his

GST-cIL-13 je bakteriálně produkováný protein nerozpustný ve vodě, který vyžaduje rozpuštění a opětné sbalení *in vitro*. Chromatografie založená na exkluzi podle velikosti ukazuje, že opětné sbalení vyvolává několik odlišně sbalených forem, které naznačují, že část imunitní odezvy je řízena proti formám, které mohou být vytvořeny irelevantními protilátkami, které se neváží na přirozený myší IL-13.

Proto tento kandidát nemůže tvořit nejsilnější možnou neutralizační protilátkovou odezvu proti IL-13.

Z toho důvodu se 6 his-cIL-13 klonoval do savčího expresivního vektoru, který se exprimoval v savci jako rozpustný 6 his-cIL-13 a nevyžaduje opětné sbalení *in vitro*.

1.7.2

Na Obr. 12 (SEQ ID NO: 23 a 24) je zobrazen vakcinační antigen, kde se vytvořily různé analogické mutace. Číslování proteinové sekvence podle schéma, kde glycinový zbytek v sekvenci „GPVPR“ je zbytek 1. Jednoduché podtržené sekvence odpovídají předpokládaným helikálním oblastem ze zkoumaného strukturálního modelu. Dvojitě podtržené zvýrazněné sekvence označují body, kde mutace jsou začleněny do myší sekvence:

- 11 myší Leu se změnil na Val (krysí)
- 21 myší Ser se změnil na Thr (není ortologní)
- 63 myší Tyr se změnil na Phe (není ortologní)
- 71 myší Gly se změnil na Ala (pes/prase/kráva)
- 100 myší Ser se změnil na Thr (pes)
- 104 myší Gln se změnil na Asn (není ortologní)
- 108 myší His se změnil na Arg (není ortologní)

1.8 Aplikace terapie u lidí

Obr. 9 zobrazuje jeden možný vakcinační antigen podle vynálezu určený k produkci protilátek proti lidskému hIL-13 u lidí. Tuto protilátku je možné použít při léčbě onemocnění charakterizované nadbytkem IL-13 nebo nevhodným IL-13, takovým onemocněním je například astma. Sekvence odpovídající myšimu IL-13 je podtržena. Konstrukce obsahuje 12 substituentů aminokyselin, které jsou analogické s myším IL-13.

Jsou to :

R → K v poloze 30
 V → S v poloze 37
 Y → F v poloze 63
 A → V v poloze 65
 E → D v poloze 68
 E → Y v poloze 80
 K → R v poloze 81
 M → I v poloze 85
 G → H v poloze 87
 Q → H v poloze 113
 V → I v poloze 115
 D → K v poloze 117

Na Obr. 13 (SEQ ID NO: 25) je zobrazena jeden možný vakcinační prostředek vhodný pro člověka připravený na základě chimerického IL-4. To je příklad vakcinačního proteinu, kterým je chimerický lidský IL-4. Podtržené aminokyselinové zbytky obsahují alfa-helikální strukturální oblasti a získaly se z myšího IL-4 začleněním aminokyseliny 21 do prvního helixu. Symboly naznačují aminokyselinové zbytky získané z lidského IL-4. Polohy alfa-helikálních oblastí se získaly z publikace Zuegg, J. et al. (2001) Immunol. and Cell Biol. 79: 332-339.

Příklad 2: Imunitní odezvu proti gst-cIL-13 je specifická pro myši IL-13 a nereaguje zkříženě s myším IL-4

Stejně jako myši IL-13 je strukturálně podobný myšimu IL-4, tak se v případě séra z myši imunizovaných GST-cIL-13 (které obsahují vysoký titr auto-protilátek proti myšimu IL-13) zkoumala zkřížená reaktivita myšeho IL-4 za použití testu ELISA s protilátkou proti myšimu IL-4 a *in vitro* mIL-4 neutralizačního biotestu.

2.1 Test ELISA za použití protilátek proti myšimu IL-4

Destičky Maxisorp s 96 prohlubněmi se potáhly monoklonálními protilátkami proti myšimu IL-4 (kat. č. MAB404, R+D Systems) v uhličitanovém-hydergenuhličitanovém pufru přes noc při teplotě 4 °C. Destičky se pak blokovaly s 3 % BSA/TBST po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Destičky se třikrát promyly v TBST a inkubovaly se s myším IL-4 (kat. č. 40-ML-005, R+D Systems) po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Po promytí se destičky inkubovaly s myším sérem po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, opět se promyly a inkubovaly se s polyklonální protilátkou proti myšimu IgG konjugovanou s HRP (kat. č. A-9309, Sigma). Následuje další promytí a destičky se zviditelnily použitím substrátu 0-fenylendiamindihydrochloridperoxidázy po dobu 30 minut.

Množství protilátek proti myšimu IL-4 v séru se vyjádřilo jako titr v koncovém bodě. Titr v koncovém bodě se definuje jako ředění séra, které je ekvivalentní dvojnásobné hodnotě pozadí testu ELISA.

myš	konečný titr protilátky proti myšimu IL-4	konečný titr protilátky proti myšimu IL-3
C2 (vzorek séra odebraný v den 125	1/900	1/80 000

po aplikaci 4. vakcinační dávky GST-cIL-13)		
---	--	--

V tomto vzorku séra se stanovila velmi slabá zkřížená reaktivita s myším IL-4. Naopak se v tomto vzorku stanovil daleko vyšší titr protilátek proti myšimu IL-13 v koncovém bodě za použití testu ELISA s protilátkou proti myšimu IL-13. Neočekávalo se, že síla zkřížené reaktivity myšího IL-4 stanovená testem ELISA bude mít neutralizační účinky *in vivo* v případě myšího IL-4. V tomto vzorku séra se hodnotila neutralizační kapacita myšího IL-4 v biologickém testu s myším IL-4 *in vitro*.

2.2 Neutralizační biologický test *in vitro* s myším IL-4

Myší IL-4 stimuluje množení buněk CTLL *in vitro*. Za použití uvedených buněk se proto vyvinul test k posouzení neutralizační kapacity séra pocházejícího z myší vakcinovaných GST-cIL-13 proti myšimu IL-4.

Za účelem měření schopnosti myšího séra neutralizovat biologickou aktivitu rekombinantního myšího IL-4 na myších buňkách CTLL (kat. č. 87031904, ECACC), se rekombinantní myší IL-4 v koncentraci 3 ng/ml inkuboval s různými koncentracemi séra po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C na destičkách s 96 prohlubněmi vhodnými pro kultivaci tkáňových kultur (Invitrogen). Po této pre-inkubaci se přidaly buňky CTLL. Testovací směs obsahující různá ředění séra, rekombinantní myší IL-4 a buňky CTLL se inkubovala při teplotě 37 °C po dobu 70 hodin v inkubátoru s CO₂ s vysokou vlhkostí. Substrát MTT (kat. č. G4000, Promega) se přidal během 4 hodin inkubace, pak se reakce zastavila přidáním kyselého roztoku za účelem rozpuštění metabolizovaného modrého formazanového produktu. Za

použití odečítacího zařízení pro destičky s 96 prohlubněmi se při vlnové délce 570 nm stanovila absorbance roztoku v každé prohlubni.

Je nutné poznamenat, že tento test je schopen měřit neutralizační kapacitu myšího IL-4 pouze při ředění séra vyšším nebo shodným s ředěním 1/100. Při ředění séra nižším než 1/100 dochází k vyvolání nespecifických proliferačních účinků v případě buněk CTLL.

Kapacita séra neutralizovat biologickou aktivitu myšího IL-4 se vyjádřila jako ředění séra nutné k neutralizaci biologické aktivity definované množstvím myšího IL-4 o 50 % (ND_{50}). Čím vyšší je nutné ředění, tím silnější je neutralizační kapacita.

Nejvyšší koncentrace testovaného myšího séra C2 byla při ředění 1/100. Tato koncentrace nepůsobí neutralizaci biologické aktivity 3 ng/ml myšího IL-4 o 50 %, proto hodnota ND_{50} se vyjádřila jako nižší než ředění 1/100.

myš	neutralizační kapacita myšího IL-4 (ND_{50})	neutralizační kapacita myšího IL-3 (ND_{50})
C2 (vzorek séra odebraný v den 125 po aplikaci 4. vakcinační dávky GST-cIL-13)	<1/100	1/5 300

V tomto vzorku séra při ředění testovaného séra se nestanovila žádná neutralizační kapacita myšího IL-4. Naopak (když se odhaduje neutralizační kapacita myšího IL-13) tento vzorek séra silně neutralizoval biologickou aktivitu myšího IL-13.

Tato data demonstrují, že ačkoliv se v séru stanovila testem ELISA za použití protilátek proti myším IL-4 velmi slabá zkřížená reaktivita s myším IL-4, sérum nevykazuje neutralizační kapacitu myšího IL-4.

2.3 Nové biologické testy neutralizace IL-13 za účelem stanovení neutralizační kapacity vzorků myšího séra vůči myším IL-13

Za účelem stanovení schopnosti myšího séra neutralizovat biologickou aktivitu rekombinantního myšího IL-13 v případě lidských buněk TF-1 (získaných v instituci) se rekombinantní myší IL-13 v koncentraci 5 ng/ml inkuboval s různými koncentracemi séra po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti na destičkách s 96 prohlubněmi vhodnými pro kultivaci tkáňových kultur (Invitrogen). Po době pre-inkubace se přidaly buňky TF-1. Testovací směs obsahující různá ředění séra, rekombinantní myší IL-13 a buňky TF-1 se inkubovala při teplotě 37 °C po dobu 70 hodin v inkubátoru s atmosférou CO₂ ve vlhkém prostředí. Během posledních 4 hodin inkubace se přidal substrát MTT (kat. č. G4000, Promega) a pak se reakce zastavila přidáním roztoku kyseliny, aby se rozpustil metabolizovaný modrý formazánový produkt. Absorbance roztoku v každé prohlubni se stanovila pomocí zařízení vhodného pro odečítání destiček s 96 prohlubněmi při vlnové délce 570 nm.

Je nutné poznamenat, že tento test je schopen měřit neutralizační kapacitu myšího IL-13 pouze při ředění séra vyšším nebo shodném s ředěním 1/100. Při ředění séra nižším než 1/100 dochází k vyvolání nespecifických proliferčních účinků v případě buněk TF-1.

Kapacita séra neutralizovat biologickou aktivitu myšího IL-13 se vyjádřila jako ředění séra nutné k neutralizaci biologické aktivity definované množstvím myšího IL-13 o 50 %

(ND₅₀). Čím vyšší je nutné ředění, tím silnější je neutralizační kapacita.

Neutralizační kapacita myšího séra získaného z myší imunizovaných GST-cIL-13 proti IL-13 se měřila shora uvedenou metodou. Došlo k silné neutralizaci IL-13, jak se uvádí dále v textu.

myš (vzorky séra odebrané v den 125 po aplikaci 4. vakcinační dávky GST-cIL-13)	neutralizační kapacita myšího IL-13 (ND ₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670

2.5 Stanovení síly neutralizace myšího IL-13 nutné pro působení v myším modelu astma při aplikaci vaječného albuminu

Za účelem stanovení požadované síly autovakcíny IL-13 při léčbě astma, se myším (myší model astma s aplikací vaječného albuminu) aplikovaly během aplikace vaječného albuminu různé dávky králičí polyklonální protilátky proti myšímu IL-13 (aplikovaly se pasivně intraperitoneální injekcí). Na konci uvedeného experimentu se měřily parametry modelu, jako jsou hyper-odezva dýchacích cest (AHR), metaplazie pohárkových buněk (GCM) a obsah plicních zánětlivých buněk. Účinnost modelu se vztahovala na sílu neutralizace myšího IL-13

dosažené v myším séru. Biologický test neutralizace myšího IL-13 se použil ke stanovení síly neutralizace myšího IL-13 ve vzorcích séra.

ošetřená skupina (dávka pasivně aplikované králičí protilátky proti myšímu IL-13)	neutralizační kapacita proti myšímu IL-13 (ND ₅₀)
nejvyšší dávka	1/4 100
vysoká dávka	1/2 670
střední dávka	1/476
nejnižší dávka	1/207

Všechny skupiny, který se aplikovaly nejvyšší tři dávky protilátky, se chovaly podobně. Všechny tři uvedené skupiny vykazují účinnost stejnou (v případě AHR) nebo vyšší ve srovnání (v případě GCM) se standardní léčbou (dexametazon aplikovaný intraperitoneální cestou v koncentraci 1,5 mg/kg ve třech dávkách) užívanou v případě uvedeného modelu. Nejnižší aplikovaná dávka vykazuje účinnost mezi účinností dosažené léčbou dexametazonem a výsledků dosažených u neošetřených pozitivních kontrolních skupin.

Síla neutralizace IL-13 dosažené ve skupině, které se aplikovala střední dávka reprezentuje požadovanou hraniční sílu v případě autovakcíny IL-13 v tomto zvířecím modelu. Hraniční síla se definuje jako nejnižší neutralizace IL-13 v myším séru nutná k vykázání 100 % účinnosti v modelu astma (ED₁₀₀). 1xED₁₀₀ je proto ekvivalent hodnotě ND₅₀ při koncentraci 1/476.

Důležitost definované hraniční síly

Síla neutralizace IL-13 nutná k dosažení účinnosti v myším modelu astma s aplikací vaječného albuminu se definovala shora v textu. Síla neutralizace IL-13 vyvolaná GST-cIL-13 u myši C1-3 a C5 je vyšší než hraniční síla neutralizace nutná k dosažení účinnosti v modelu astma. Tyto výsledky jsou zobrazeny na Obr. 11.

Proto se očekává, že vakcinační prostředek GST-cIL-13 je účinný v myším modelu astma.

Příklad 3: Profil imunogenosti GST-cIL-13 v kombinaci s různými adjuvans

3.1 Protokol imunizace

GST-cIL-13 se použil jako imunogen při vyvolání tvorby auto-protilátek proti myšimu IL-13 u myši Balb/c. Samičím myši ve věku 6 až 8 týdnů se aplikovala jedna injekce obsahující přibližně 100 µg proteinu v adjuvans. Pak následují čtyři posilující imunizace, kdy každá obsahuje 50 µg proteinu v adjuvans (popisuje se dále v textu v případě přípravků obsahující imunogen + adjuvans). Každá ošetřená skupina obsahovala 5 zvířat imunizovaných podle protokolu uvedeného v tabulce dále v textu.

Vzorky séra se získaly venepunkcí ocasní cévy ve specifikovaných konečných bodech. Po vyčiření centrifugací se ve vzorcích zjišťovala testem ELISA přítomnost specifických IgG odezev na myš IL-13.

skupina	imunizace
A	GST-cIL-13 v AS03 i/m
B	GST-cIL-13 v síranu hlinito-draselném i/m
C	GST-cIL-13 v přípravku „ImmunEasy“ i/m

D	GST-cIL-13 v CFA/IFA s/c
E	GST-cIL-13 v PBS s/c
F	bez imunizace

den	ošetření
-7	předchozí odběr krve
0	primární imunizace
21	první zesilující imunizace
35	odběr krve z ocasu
49	druhá posilující imunizace
63	odběr krve z ocasu
77	třetí posilující imunizace
92	odběr krve z ocasu
106	čtvrtá posilující imunizace
125	odběr krve z ocasu

3.2 Prostředek obsahující imunogen a adjuvans

Příprava emulze adjuvans AS03:

Tween 80 se rozpustil ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosforečnanem (PBS) za vzniku 2 % roztoku v PBS. Aby se získalo 100 ml dvakrát koncentrované emulze se 5 g D,L-alfa-tokoferolu a 5 ml skvalenu míchalo na vortexu. Přidalo se 90 ml roztoku PBS/Tween a vše se promíchalo. Výsledná směs pak

prošla injekční stříkačkou a nakonec se mikrofluidizovala za použití mikrofluidizačního zařízení M110S. Výsledné olejové kapky vykazují velikost přibližně 180 nm.

Směs adjuvans s roztokem proteinu 1:1 se míchala na vortexu (10 vteřin střední rychlostí) a inkubovala se po dobu 10 minut při teplotě místnosti na orbitalním míchacím zařízení. Před aplikací injekce se vše krátce promíchalo na vortexu a myším se aplikovalo 100 μ l celkové suspenze intramuskulární cestou do dvou oddělených míst (jedné myši se aplikovalo 2x50 μ l, jedna injekce do každého čtyřhlavého svalu). Před každou imunizací se připravuje čerstvý obsah injekce.

Síran hlinito-draselný

Síran hlinito-draselný se získal od firmy Sigma (kat. č. A-1577). Připravila se suspenze síranu hlinito-draselného v koncentraci 2 mg/ml v PBS. Adjuvans s roztokem proteinu se smíchalo v poměru 1:1. Směs se krátce zamíchala na zařízení vortex a inkubovala se za stálého míchání po dobu 10 minut při teplotě místnosti. Před aplikací injekce se směs zamíchala na vortexu a jedné myši se aplikovalo 100 μ l celkové suspenze i/p. Před každou imunizací se připravila čerstvá směs.

Prostředek CpG-ImmunEasy

Získal se od firmy Qiagen (kat. č. 303101). Směs adjuvans se promíchala na zařízení vortex a směs adjuvans a proteinu v poměru 1:1 se jemně promíchala 5x opětovým nasáním do pipety a vypuštěním. Směs se inkubovala po dobu 15 minut při teplotě místnosti a pak se jemně promíchala 5x opakovaně nasáním do pipety a vypuštěním. Jedné myši se aplikovalo do 2 oddělených míst 100 μ l suspenze intramuskulárně (to znamená, že jedné myši se aplikuje 2x 50 μ l, přičemž do každého čtyřhlavého

svalu se aplikuje jedna injekce). Prostředek se připravuje čerstvý vždy před každou imunizací.

CFA/IFA

Prostředky poskytla firma Sigma (kat. č. F-5881, F-5506). V případě primární imunizace se připravila směs v poměru 1:1 s CFA, který se předem promíchal. V případě zesilující dávky se připravila stejná směs s IFA. Vzorek se dobře promíchal, aby vznikla bílá suspenze s CFA/IFA. Před použitím se suspenze uchovávala po dobu alespoň 30 minut na ledu a těsně před aplikací dávky se směs promíchala.

3.3 Protilátkové odezvy proti myšímu IL-13

Za použití detekce protilátek proti myšímu IL-13 pomocí testu ELISA se sledovaly protilátkové odezvy proti myšímu IL-13. 96 prohlubní destiček Maxisorp se potáhlo monoklonální protilátkou proti myšímu IL-13 (kat. č. MAB, R+D Systems) v pufru uhličitán-hydrogenuhličitán přes noc při teplotě 4 °C. Destičky se pak blokovaly 3% BSA/TBST po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti, promyly se 3 krát TBST a inkubovaly se s myším IL-13 (kat. č. 413-ML-025, firma R+D Systems) po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Po promytí se destičky inkubovaly s myším sérem po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Pak se opět promyly a inkubovaly se polyklonální protilátkou proti myšímu IgG konjugovanou s HRP (Sigma, Kat. č. A-9309). Po dalším promytí destiček se reakce zviditelnila substrátem 0-fenylendiamindihydrochloridperoxidázy po dobu 30 minut.

Množství protilátek proti myšímu IL-13 v séru se vyjádřilo jako titr v koncovém bodě. Titr v koncovém bodě se definoval jako ředění séra, které je ekvivalentní s dvojnásobnou odečtenou hodnotou v testu ELISA.

myš	titr protilátky proti myšimu IL-13 v koncovém bodě			
	AS03	síran hliníto- draselný	CpG	CFA/IFA
1	1/875	1/7 250	1/67 500	1/67 500
2	1/9 250	1/800	1/80 000	1/975
3	1/160	1/9 000	1/54 000	1/6 000
4	1/9 000	1/6 500	1/62 500	1/16 000
5	1/3 600	1/10 000	1/77 500	1/31 000

Obr. 10 zobrazuje profily protilátek proti myšimu IL-13 v různých ošetřených skupinách v den 125 v případě vzorků séra ředěného 1/100.

Všech pět myší imunizovaných GST-cIL-13 v kombinaci s adjuvans CpG vyvolalo silnou auto-protilátkovou odezvu proti myšimu IL-13. To je v kontrastu s dalším adjuvans, kde odezvy byly v každé skupině méně konzistentní. U některých myší došlo k velmi slabým odezvám.

Tyto výsledky ukazují, že adjuvans CpG je daleko účinnější při vyvolání silného titru auto-protilátek proti myšimu IL-13 ve srovnání s jinými testovanými adjuvans.

V těchto vzorcích sér se analyzovala schopnost neutralizovat IL-13 v *in vitro* neutralizačním biologickém testu.

3.4 Neutralizační kapacita IL-13

Za účelem stanovení schopnosti myšího séra neutralizovat biologickou aktivitu rekombinantního myšího IL-13 v případě

lidských buněk TF-1 (získaných v instituci) se rekombinantní myší IL-13 v koncentraci 5 ng/ml inkuboval s různými koncentracemi séra po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti na destičkách s 96 prohlubněmi vhodnými pro kultivaci tkáňových kultur (Gibco BRL). Po době pre-inkubace se přidaly buňky TF-1. Testovací směs obsahující různá ředění séra, rekombinantní myší IL-13 a buňky TF-1 se inkubovala při teplotě 37 °C po dobu 70 hodin v inkubátoru s atmosférou CO₂ ve vlhkém prostředí. Během posledních 4 hodin inkubace se přidal substrát MTT (kat. č. G4000, Promega) a pak se reakce zastavila přidáním roztoku kyseliny, aby se rozpustil metabolizovaný modrý formazánový produkt. Absorbance roztoku v každé prohlubni se stanovila pomocí zařízení vhodného pro odečítání destiček s 96 prohlubněmi při vlnové délce 570 nm.

Je nutné poznamenat, že tento test je schopen měřit neutralizační kapacitu myšího IL-13 pouze při ředění séra vyšším nebo shodném s ředěním 1/100. Při ředění séra nižším než 1/100 dochází k vyvolání nespecifických proliferčních účinků v případě buněk TF-1.

Kapacita séra neutralizovat biologickou aktivitu myšího IL-13 se vyjádřila jako ředění séra nutné k neutralizaci biologické aktivity definované množstvím myšího IL-13 o 50 % (ND₅₀). Čím je nutné vyšší ředění, tím silnější je neutralizační kapacita.

Nejvyšší testovaná koncentrace myšího séra D5 bylo ředění 1/100. Při tomto ředění nedochází k neutralizaci biologické aktivity 5 ng/ml myšího IL-13 o 50 %, proto se hodnota ND₅₀ vyjádřila jako nižší než ředění 1/100.

myš (vzorky séra odebrané v den 125)	neutralizační kapacita myšího IL-13 (ND ₅₀)
--	--

C1	1/1 250
C2	1/5 230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1 670
D5	nižší než 1/100

Vzorky séra odebrané v den 125 ze všech 5 myší imunizovaných GST-cIL-13 v kombinaci s adjuvans CpG byly schopny silně neutralizovat biologickou aktivitu myšího IL-13 v biologickém testu *in vitro*. Naopak vzorky séra odebrané v den 125 z myší D5 (imunizovaných GST-cIL-13 v CFA/IFA) nebyly schopny neutralizovat biologickou aktivitu myšího IL-13 ve všech testovaných ředěních.

Tyto výsledky ukazují, že adjuvans CpG je účinnější při vyvolání neutralizačních auto-protilátkových odezev proti myšímu IL-13 ve srovnání s dalšími testovanými adjuvans.

Seznam sekvencí

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 10 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „mutovaný epitop, umělá sekvence“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Leu	Ser	Asn
1				5					10

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 8 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „mutovaný epitop, umělá sekvence“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

Phe	Cys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Leu
1				5			

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 11 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „mutovaný epitop, umělá sekvence“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

Ala	Ile	Tyr	Arg	Thr	Gln	Arg	Ile	Leu	His	Gly
1				5					10	

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 12 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „mutovaný epitop, umělá sekvence“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Lys	Ile	Glu	Val	Ala	His	Phe	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu
1				5					10		

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 20 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „syntetický imunostimulační
oligonukleotid“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

tccatgacgt tcttgacgtt

20

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „syntetický imunostimulační
oligonukleotid“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

tctcccagcg tgcgcat

18

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka= „syntetický imunostimulační
oligonukleotid“/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

accgatgacg tcgcgggtga cggcaccacg

30

(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí

- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
- (ix) ZNAKY:
 - (E) Jiné informace:
 - /poznámka= „syntetický imunostimulační
oligonukleotid“/
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

tcgtcggtttt gtggttttgt cgtt

24

- (2) Informace o SEQ ID NO: 9:
 - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 20 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE:
 - (D) TOPOLOGIE:
 - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
 - (ix) ZNAKY:
 - (D) Jiné informace:
 - /poznámka= „syntetický imunostimulační
oligonukleotid“/
 - (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

tccatgaagt tctgatgct

20

- (2) Informace o SEQ ID NO: 10:
 - (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 72 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
 - (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
 - (ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

```
tgtgatgttg accagctcct caatgagctc cctaagggtc agagggagag acacagatct 60
tggcaccggc cc                                     72
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 73 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

```
aggagctggg caacatcaca caagaccaga ctccctgtg caacggcagc atggtatgga 60
gtgtggacct ggc                                     73
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 72 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

```
gcaattggag atgttggtca gggattccag ggctgcacag tacccgccag cggccaggtc 60
cacactccat ac                                     72
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 73 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myší, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

```
tgaccaacat ctccaattgc aatgccatcg agaagaccca gaggatgctg ggcggactct 60
gtaaccgcaa ggc                                     73
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 72 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myší, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

```
aaactgggcc acctcgattt tggatcggg gaggtggag accgtagtgg gggccttgcg 60
gttacagagt cc                                     72
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 71 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

```
aaatcgaggt ggcccagttt gtaaaggacc tgctcagcta cacaaagcaa ctgttttcgcc 60
acggcccctt c 71
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 28 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

```
cgcggttcg ggccggtgcc aagatctg
```

28

(2) Informace o SEQ ID NO: 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 37 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

- (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
- (ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

ctccgctcga gtcgacttag aaggggccgt ggcgaaa

37

(2) Informace o SEQ ID NO: 18:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 28 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA

- (ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="PCR oligoprimer pro chimerický IL-13,
použití u myši, umělá sekvence"

- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

cgcggtatccg ggccgggtgcc aagatctg

28

(2) Informace o SEQ ID NO: 19:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 336 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA

- (ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="chimerický IL-13 pro použití u myši, umělá
sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19:

```

gggcgggtgc caagatctgt gtctctccct ctgaccetta gggagctcat tgaggagctg 60
gtcaacatca cacaagacca gactcccttg tgcaacggca gcatggtatg gactgtggac 120
ctggccgctg ggggtactg tgcagccctg gaatccctga ccaacatctc caattgcaat 180
gccatcgaga agaccagag gatgctgggc ggactctgta accgcaaggc cccactacg 240
gtctccagcc tcccgatac caaatcgag gtggcccagt ttgtaaagga cctgctcagc 300
tacacaaagc aactgtttcg ccacggcccc ttctaa 336

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 111 aminokyselinových zbytků
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka=" chimerický IL-13, použití u myši, umělá
sekvence"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 20 :

```

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

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 399 párů bází

- (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
- (ix) ZNAKY:
- (D) Jiné informace:
- /poznámka=" chimerický IL-13 pro použití u lidí,
 umělá sekvence"/
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 21:

```

atggcgcttt tggtgaccac ggtcattgct ctcaattgcc ttggcgggctt tgccctcccca 60
ggccctgtgc ctccctctac agcccttaag gagcttattg aggagctgag caacatcacc 120
cagaaccaga aggtcccgct ctgcaatggc agcatgggtt ggagcatcaa cctgacagct 180
ggcatgttct gtgtagccct ggattccctg atcaacgtgt caggctgcag tgccatctac 240
aggacccaga ggatattgca tggcttctgc ccgcacaagg tctcagctgg gcagttttcc 300
agcttgcattg tccgagacac caaaatcgaa gtagcccaact ttataacaaa actgctctta 360
catttaaaga aactttttcg cgagggacgg ttcaactga 399
  
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 22:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 132 aminokyselinových zbytků
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE:
 (D) TOPOLOGIE:
- (ii) DRUH MOLEKULY: protein
- (ix) ZNAKY:
- (D) Jiné informace:
- /poznámka=" chimerický IL-13, použití u lidí, umělá
 sekvence"
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22:

```

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

Gly	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	His	Val	Arg	Asp	Thr	Lys	Ile	Glu	Val	Ala
			100					105					110		
His	Phe	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Arg	Glu
		115					120						125		
Gly	Arg	Phe	Asn												
		130													

(2) Informace o SEQ ID NO: 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 396 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="chimerický IL-13, použití u myši, umělá
sekvence"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 23:

```

atggcgctct ggggtgactgc agtcctggct cttgcttgcc ttggtggtct cgccgcccc 60
gggcccgtgc caagatctgt gtctctccct gtgacctta aggagcttat tgaggagctg 120
accaacatca cacaagacca gactccccctg tgcaacggca gcatgggtatg gagtgtggac 180
ctggccgctg gggggttctg tgtagccctg gattccctga ccaacatctc caattgcaat 240
gccatcttca ggaccagag gatattgcat gccctctgta accgcaaggc cccactacg 300
gtctccagcc tccccgatac caaaatcgaa gtagccact ttataacaaa actgtcacc 360
tacacaaaga acctgtttcg ccgcgcccc ttctaa 396

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 131 aminokyselinových zbytků
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="chimerický IL-13, použití u myši, umělá
sekvence"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 24:

```

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

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 150 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="chimerický IL4 pro použití u lidí, umělá
sekvence"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 25:

```

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

```

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití chimerického rekombinantního proteinu, který vykazuje B-buněčné epitopy z vlastního proteinu prvního savčího druhu a mutaci, která vede ke vzniku sekvence analogického proteinu savčího druhu, který se liší od uvedeného prvního savčího druhu tak, že protein je schopen vyvolat imunitní odezvu, která rozeznává přirozený protein, ze kterého se získaly v prvním savčím druhu epitopy buněk B, při výrobě vakcinačního prostředku pro porušení tolerance buněk B a vyvolání imunitní odezvy proti uvedenému vlastního proteinu v uvedeném prvním savčím druhu.
2. Použití chimerického rekombinantního proteinu, který má epitopy B buněk vlastního proteinu prvního savčího druhu, které jsou vneseny substitucí do základní kostry analogického proteinu z druhého savčího druhu tak, že protein je schopen vyvolat v druhu, za kterého jsou epitopy B buněk získány, imunitní odezvu, jenž rozeznává přirozený protein, ze kterého jsou epitopy buněk B získány, při výrobě vakcinačního prostředku pro porušení tolerance buněk B a vyvolání imunitní odezvy proti uvedenému vlastního proteinu v uvedeném prvním savčím druhu.
3. Použití podle libovolného z nároků 1 nebo 2, přičemž protein obsahuje konzervativní povrchovou oblast a mutaci zavedenou do oblasti, která není exponována na povrchu, přičemž výsledkem uvedené mutace je sekvence analogického proteinu, který je schopný vyvolat imunitní odezvu vůči vlastního proteinu v druhu, ze kterého se vlastní protein získal, při výrobě vakcinačního prostředku pro porušení tolerance buněk B a vyvolání imunitní odezvy proti

uvedenému vlastnímu proteinu v uvedeném prvním savčím druhu.

4. Použití podle libovolného z nároků 1 až 3, kde proteinem je lidský protein a jeho aminokyselinová sekvence je mutována za vzniku sekvence obsahující více než 5 sousedících aminokyselin z analogického proteinu, který není lidským proteinem, a kde také uvedená mutace nahradí více než jednu aminokyselinu přirozené lidské aminokyselinové sekvence v každé oblasti lidského proteinu, která není exponována na povrchu, a mutace není přítomna ve zbytcích, které jsou ve vodném roztoku za fyziologických podmínek v přirozeném sbaleném aktivním proteinu povrchovými zbytky.
5. Použití podle libovolného z nároků 1 až 4, kde imunitní odezva je neutralizační protilátkovou odezvou.
6. Použití podle libovolného z nároků 1 až 5, kde protein nebo epitop buněk B se získal z lidského cytokinu.
7. Použití podle nároku 6, kde lidským cytokinem je 4-helikální cytokin.
8. Použití podle nároku 7, kde lidským cytokinem je IL-4 nebo IL-13.
9. Použití podle nároku 8, kde lidským cytokinem je IL-13 a vakcinační prostředek je pro léčbu astma.
10. Rekombinantní chimerický protein obsahující aminokyselinovou sekvenci lidského proteinu, která je mutována za vzniku sekvence obsahující více než 5 sousedících aminokyselin z analogického proteinu, který není lidským proteinem, a kde se také v každé oblasti lidského proteinu, která není exponována na povrchu, nahradila více než jedna aminokyselina přirozené lidské sekvence, a nikoliv ve zbytcích, které jsou ve

vodném roztoku za fyziologických podmínek v přirozeném sbaleném aktivním proteinu povrchovými zbytky.

11. Rekombinantní protein podle nároku 10, kde aminokyselinová sekvence lidského proteinu je mutována, aby se nahradily oblasti lidského proteinu, které nejsou exponovány na povrchu, ekvivalentními sekvencemi z analogického proteinu, který není lidským proteinem, zatím co epitopy buněk B exponované na povrchu jsou konzervativní.
12. Rekombinantní protein podle nároku 10 nebo 11, kde lidským proteinem je IL-4.
13. Rekombinantní protein podle nároku 10 nebo 11, kde lidským proteinem je IL-13.
14. Rekombinantní mutovaný lidský IL-13 podle nároku 13, který vykazuje jednu nebo více z následujících substitucí nebo substitucí zahrnující konzervativní substituci z:

R → K v poloze 30
V → S v poloze 37
Y → F v poloze 63
A → V v poloze 65
E → D v poloze 68
E → Y v poloze 80
K → R v poloze 81
M → I v poloze 85
G → H v poloze 87
Q → H v poloze 113
V → I v poloze 115
D → K v poloze 117

15. Mutovaný lidský IL-13 podle nároku 14, vykazující velké množství uvedených substitucí.

16. Rekombinantní mutovaný lidský IL-13 podle nároku 14 obsahující všechny uvedené substituce nebo substituce zahrnující konzervativní substituci z uvedených substitucí.

17. Mutovaný lidský IL-13 podle nároku 12, který obsahuje jednu nebo více z následujících sekvencí

L K E L I E E L S N

F C V A L D S L

A I Y R T Q R I L H G

K I E V A H F I T K L L

nebo variantu uvedené sekvence obsahující jednu nebo více konzervativních substitucí.

18. Mutovaný lidský IL-13 podle nároku 17 obsahující sekvenci zobrazenou na Obr. 9.

19. Polynukleotid kódující protein podle nároků 10 až 18.

20. Polynukleotid podle nároku 19, kterým je DNA a je operativně spojená s promotorem.

21. Vektor obsahující polynukleotid podle nároku 19 nebo 20.

22. Hostitel, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e j e transformovaný polynukleotidem podle nároku 19 nebo 20 nebo vektorem podle nároku 21.

23. Vakcinační prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje protein, polynukleotid nebo vektor podle libovolného z nároků 10 až 22 a farmaceuticky přijatelný nosič nebo pomocnou látku vhodný pro použití v lékařství.

24. Vakcinační prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje imunostimulační oligonukleotid.

25. Vakcinační prostředek podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e imunostimulační oligonukleotid se vybral ze skupiny zahrnující:

OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

26. Použití proteinu podle nároku 10 nebo 11 při výrobě vakcinačního prostředku pro porušení tolerance buněk B a vyvolání imunitní odezvy proti uvedenému vlastnímu antigenu u člověka.

27. Použití proteinu podle libovolného z nároků 12 až 18 při výrobě léčebného prostředku pro léčbu onemocnění zprostředkovaných IL-13.

28. Použití podle nároku 27 při léčbě astma.

29. Způsob profylaxe onemocnění zprostředkovaného IL-13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci bezpečného a účinného množství prostředku podle nároku 21 pacientovi, který to potřebuje.

30. Způsob přípravy proteinu podle libovolného z nároků 10 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

1. identifikaci jedné nebo více oblastí vlastního, v typickém případě lidského proteinu, proti kterému je nutná protilátková odezva,
2. identifikace aminokyselinové sekvence vlastního proteinu,
3. identifikaci aminokyselinové sekvence konstrukce analogického proteinu postupy rekombinace DNA chimerické molekuly obsahující alespoň jednu cílovou oblast identifikovanou v kroku 1, jejíž aminokyselinová sekvence

se vzala ze sekvence identifikované v kroku 2, a dostatečné aminokyseliny ze sekvence(i) identifikované v kroku 3, aby umožnily sbalení výsledného proteinu do tvaru podobného tvaru vlastního proteinu tak, že mutovaný protein může vyvolat imunitní odezvu, která rozeznává vlastní protein.

31. Způsob výroby vakcinačního prostředku proti vlastnímu proteinu pro porušení tolerance buněk B a vyvolání imunitní odpovědi proti vlastnímu antigenu u člověka, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje a) získání lidského proteinu a b) mutaci aminokyselinové sekvence lidského proteinu za vzniku sekvence obsahující více než 5 sousedících aminokyselin z analogického proteinu, který není lidským proteinem, a také kde v každé oblasti lidského proteinu, která není exponována na povrchu, je nahrazena více než jedna aminokyselina přirozené lidské sekvence a ne ve zbytcích, které jsou ve vodném roztoku za fyziologických podmínek v přirozeném sbaleném aktivním proteinu povrchovými zbytky.

32. Způsob výroby vakcinačního prostředku proti vlastnímu proteinu podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje a) získání lidského proteinu a b) substituci aminokyselin, které nejsou exponovány na povrchu, ekvivalentními aminokyselinami z analogického proteinu ze savčího druhu, kterým není člověk, zatím co epitopy buněk B exponované na povrchu jsou konzervativní.

33. Způsob výroby vakcinačního prostředku proti vlastnímu proteinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje výrobu chimerického rekombinantního proteinu obsahujícího konzervativní povrchové oblasti lidského proteinu a mutaci zavedenou do oblasti, která není exponována na povrchu, přičemž na základě uvedené mutace vzniká sekvence analogického proteinu, který je schopen u člověka vyvolat

imunitní odezvu proti lidskému proteinu, a začlenění chimerického rekombinantního antigenu do vakcinačního prostředku.

- 34. Použití polynukleotidu nebo vektoru, který obsahuje uvedený polynukleotid, kódující chimerický rekombinantní protein podle libovolného z nároků 1 až 3 při výrobě vakcinačního prostředku pro porušení tolerance buněk B.

04.11.03

PV2003-2373

~~74546~~

1/13

Obr. 1

5 GGGCCGGTGCCAAGATCTGTGTCTCTCCCTCTGACCCCTAGGGAGCTCATTGAGGAGCTG 60
1 -----+-----+-----+-----+-----+
G P V P R S V S L P L T L R E L I E E L

10 GTCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCTGTGCACCGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGAC 120
61 -----+-----+-----+-----+-----+
V N I T Q D Q T P L C N G S M V W S V D

15 CTGGCCGCTGGCGGGTACTGTGCAGCCCTGGATCCCTGACCAACATCTCCAATTGCAAT 180
121 -----+-----+-----+-----+-----+
L A A G G Y C A A L E S L T N I S N C N

20 GCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTACCGCAAGGCCCCCACTACG 240
181 -----+-----+-----+-----+-----+
A I E K T Q R M L G G L C N R K A P T T

25 GTCTCCAGCCTCCCCGATACCAAAATCGAGGTGCCCCAGTTTGTAAGGACCTGCTCAGC 300
241 -----+-----+-----+-----+-----+
V S S L P D T K I E V A Q F V K D L L S

30 TACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCCCTTCTAA 336
301 -----+-----+-----+-----+-----+
Y T K Q L F R H G P F *

2/13

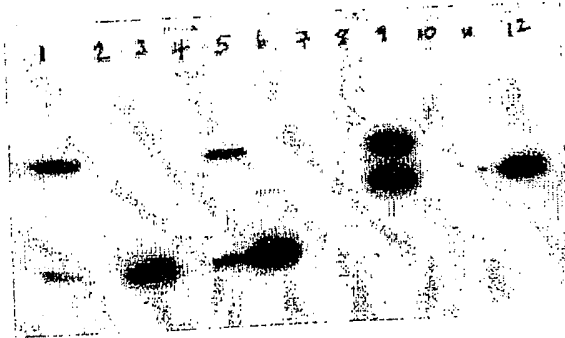
Obr. 2



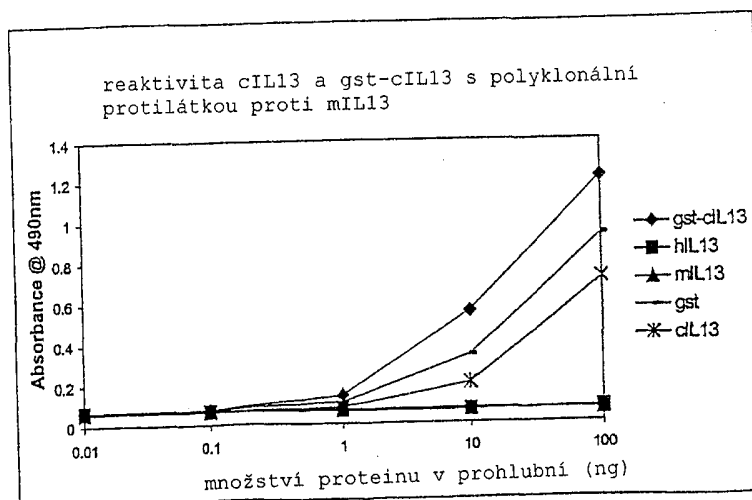
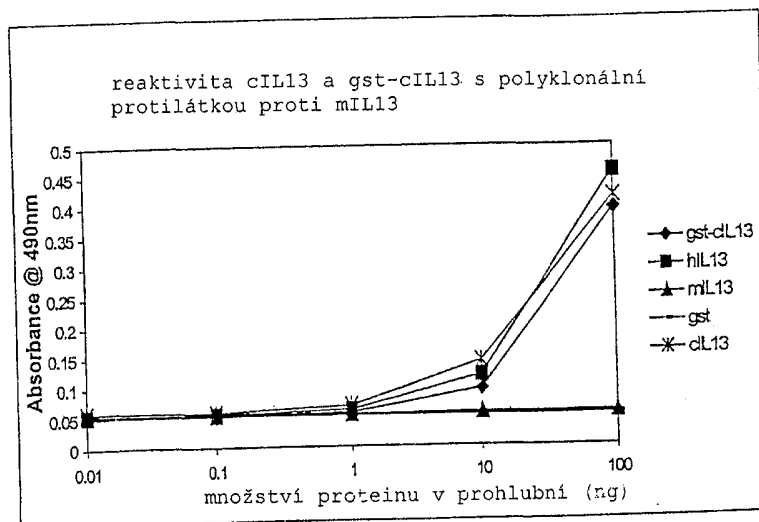
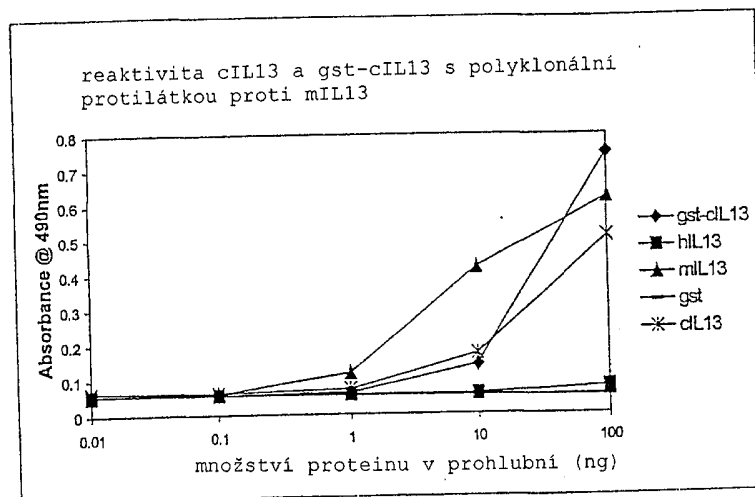
04.11.03

3/13

Obr. 3

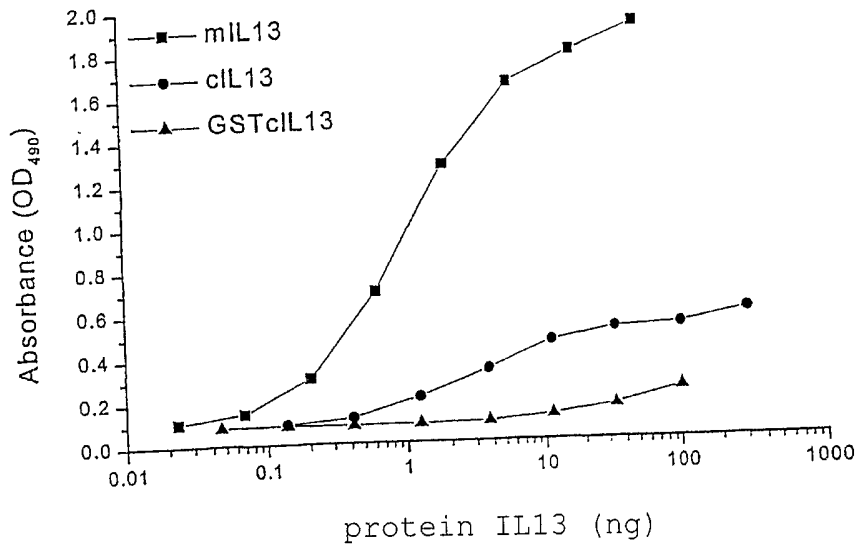
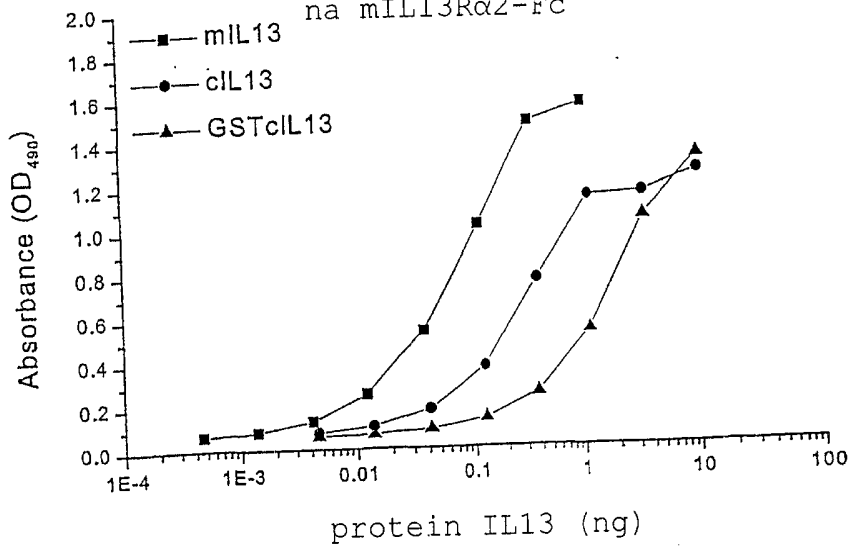


Obr. 4



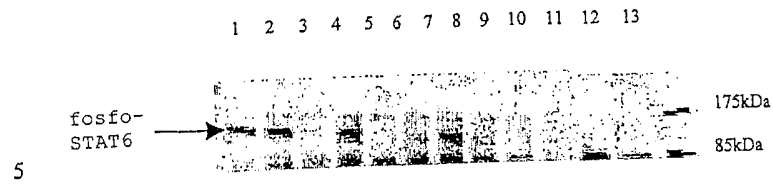
5/13

Obr. 5

Navázání chimerických proteinů IL13
na mIL13 α 1-FcNavázání chimerických proteinů IL13
na mIL13 α 2-Fc

6/13

Obr. 6



10

15

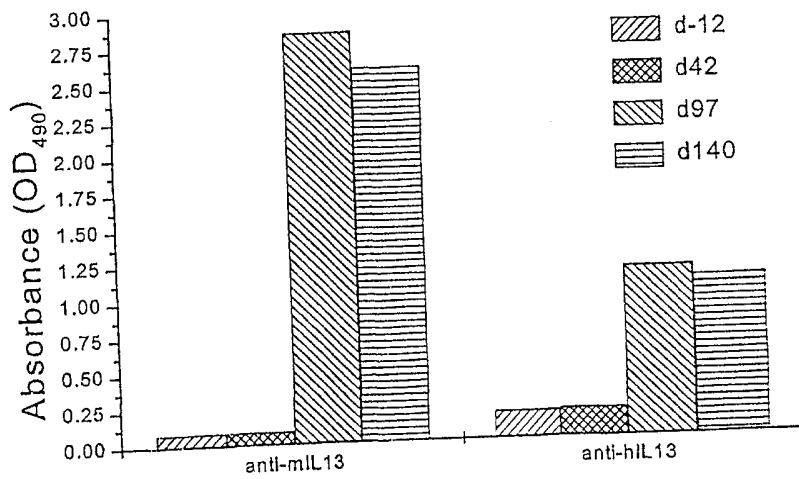
20

25

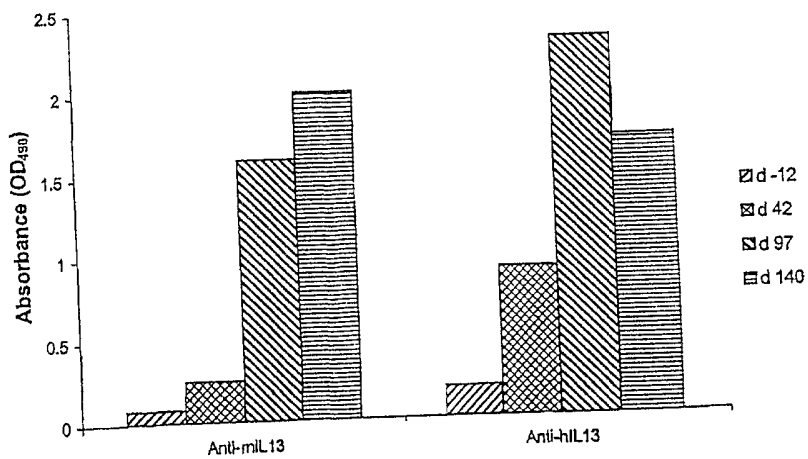
30

7/13

Obr. 7a



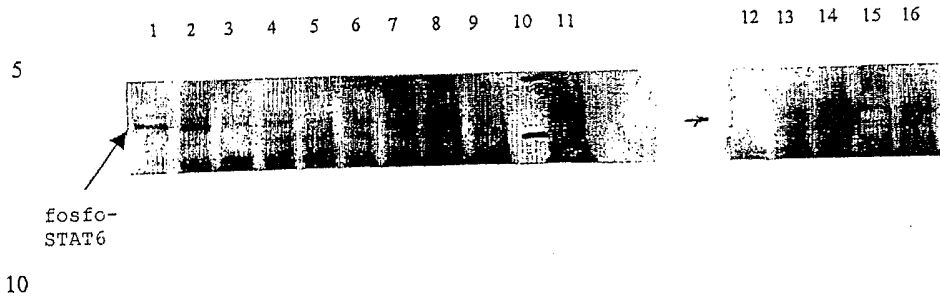
Obr. 7b



04.11.03

8/13

Obr. 8



9/13

Obr. 9

5 1 ATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTTGCCTCCCCA 60
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P

10 61 GGCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTGAGCAACATCACC 120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G P V P P S T A L K E L I E E L S N I T

15 121 CAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTTGGAGCATCAACCTGACAGCT 180
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q N Q K A P L C N G S M V W S I N L T A

20 181 GGCATGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGATCAACGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCTAC 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G M F C V A L D S L I N V S G C S A I Y

25 241 AGGACCCAGAGGATATTGCATGGCTTCTGCCCGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTCC 300
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
R T Q R I L H G F C P H K V S A G Q F S

30 301 AGCTTGCAATGTCGAGACACCAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAAGTCTCTTA 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
S L H V R D T K I E V A H F I T K L L L

35 361 CATTTAAAGAACTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTGA 399
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
H L K K L F R E G R F N *

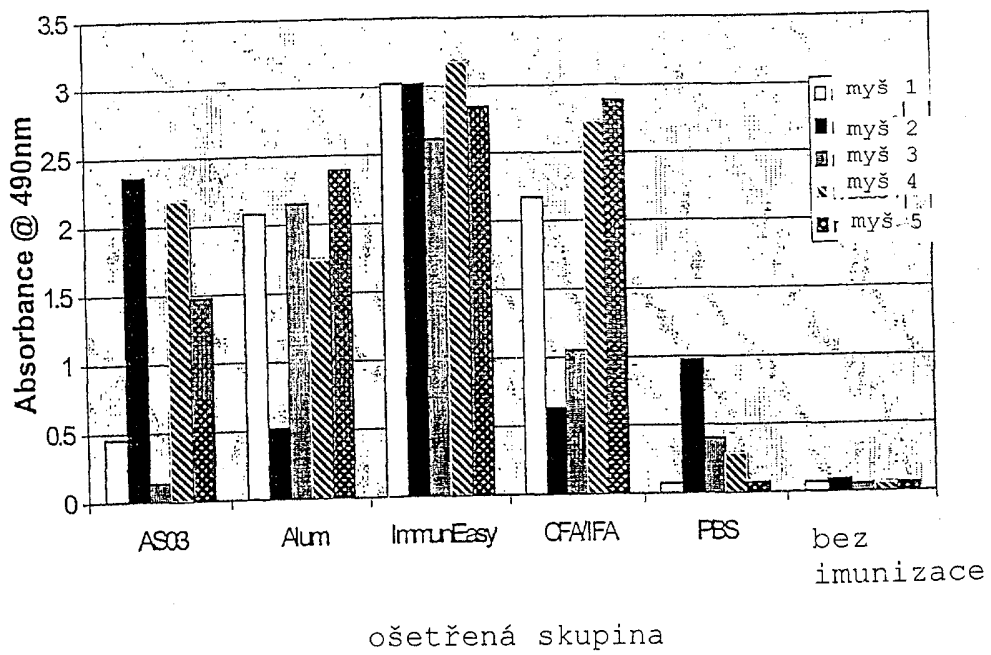
40

45

50

10/13

Obr. 10



5

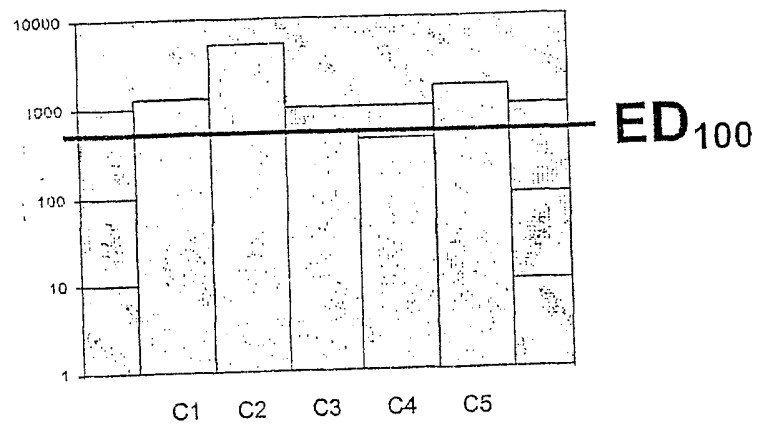
10

15

11/13

Obr. 11

5
sérová neutralizační
kapacita
(faktor ředění)



jednotlivé myši

10

15

20

25

30

12/13

Obr. 12

5 atggcgctctgggtgactgcagtcctggctcttgcttgcccttggtggtctcgcgcgcccc
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
-19 M A L W V T A V L A L A C L G G L A A P 0

 GGGCCCGGTGCCAAGATCTGTGTCTCTCCCTGTGACCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
10 1 G P V P R S V S L P V T L K E L I E E L 20

 ACCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCTGTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
15 21 T N I T Q D Q T P L C N G S M V W S V D 40

 CTGGCCGCTGGCGGGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGACCAACATCTCCAATTGCAAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
41 L A A G G F C V A L D S L T N I S N C N 60

 GCCATCTTCAGGACCCAGAGGATATTGCATGCCCTCTGTAACCGCAAGGCCCCCACTACG
20 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
241 61 A I F R T Q R I L H A L C N R K A P T T 80

 GTCTCCAGCCTCCCCGATACCAAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACCTGCTCACC
25 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
81 V S S L P D T K I E V A H F I T K L L T 100

 TACACAAAGAACCTGTTTCGCCGCGGCCCTTCTAA
30 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 396
101 Y T K N L F R R G P F * 112

35

40

13/13

Obr. 13

5	-23	---+-----+-----+ MGLTSQLLPPLFFILLACAGNFVHG	0
	1	-----+-----+----- HKCDKNHLREIIGILNEVTGEKTL	24
10	25	-----+-----+----- CTELTVTDIFAASKNTTESELVCR	48
	49	--+-----+-----+-- ASKVLRIFYLKHEKDTRCLGATAK	72
15	73	-----+-----+----- NSSVLMELQRLFRAFRCLDGLNSC	96
20	97	---+-----+-----+ PVKEANQSSLKDFLESLSIMQMD	120
	121	----- 126 YSKCSS	
25			