

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

301 021

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-3738**
 (22) Přihlášeno: **26.05.1995**
 (30) Právo přednosti: **26.05.1995** WO 1995US 9506750
 (40) Zveřejněno: **17.02.1999**
 (Věstník č. 2/1999)
 (47) Uděleno: **03.09.2009**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **14.10.2009**
 (Věstník č. 41/2009)
 (86) PCT číslo: **PCT/US1995/006750**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/037624**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Kuroda K. et al.: „Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector“, EMBO J., Vol. 5(6), 1359-1365, 1986;
 Possee R.D.: „Cell-surface expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector“, Virus Res., Vol. 5(1), 43-59, 1986; Matsuura Y. et al.: „Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins“, J. Gen. Virol., 68 (Pt 5), 1233-50, 1987.

(73) Majitel patentu:

PROTEIN SCIENCES CORPORATION, Meriden, CT, US

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

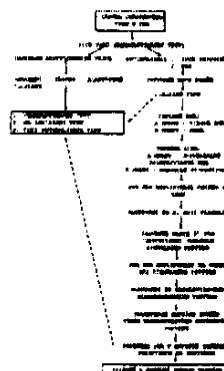
Dr. Karel Čermák, Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**V podstatě čistý, rekombinantní, zralý,
 glykosylovaný chřipkový HAO
 hemagglutininový protein, vektor pro výrobu
 rekombinantního HAO hemagglutininového
 proteinu, způsob výroby uvedeného proteinu a
 vakcína obsahující uvedený protein**

(57) Anotace:

Řešení se týká v podstatě čistého, rekombinantního, zralého, glykosylovaného chřipkového HAO hemagglutininového proteinu, exprimovaného v bakulovirovém expresním systému v kultivovaných hmyzích buňkách, který je purifikovaný do 95% nebo vyšší čistoty a je imunogenní a indukuje ochrannou imunitní odezvu při použití jako vakcína, jakož i vektoru pro výrobu tohoto proteinu, způsobu výroby uvedeného proteinu a vakcíny obsahující uvedený protein.



CZ 301021 B6

V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemagglutininový protein, vektor pro výrobu rekombinantního HAO hemagglutininového proteinu, způsob výroby uvedeného proteinu a vakcína obsahující uvedený protein

5

Oblast techniky

Vynález se týká v podstatě čistého, rekombinantního, zralého, glykosylovaného chřipkového HAO hemagglutininového proteinu, vektoru pro výrobu rekombinantního HAO hemagglutininového proteinu, způsoby výroby uvedeného proteinu a vakcíny obsahující uvedený protein

10

Dosavadní stav techniky

Každoročně v celém světě propukají epidemie chřipky, které způsobují značnou nemocnost a úmrtnost. Chřipkový vir nejčastěji napadá děti, které se velkou měrou podílí na přenosu virů chřipky ve společnosti. U starých osob a osob se zdravotními problémy existuje v případě infekce chřipkovým virem zvýšené riziko vzniku možných komplikací a s nimi spojené hospitalizace. V samotných Spojených státech amerických způsobil zápal plic a chřipka v letech 1956 až 1988 během každé chřipkové sezóny více než 10 000 úmrtí a každou druhou sezónu bylo zaznamenáno dokonce více než 40 000 úmrtí (Update: Influenza Activity – United States and Worldwide, and Composition of the 1992–1993 Influenza Vaccine, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 41/No. 18: 315–323, 1992). Chřipkové viry jsou vysoce pleomorfní částice, tvořené dvěma povrchovými glykoproteiny, hemagglutininem (HA) a neuraminidázou (NA). HA zprostředkovává navázání viru na hostitelskou membránu a fúzi viro–buněčné membrány během pronikání viru do buňky. Genom chřipkového viru je tvořen osmi jednořetězcovými protismyslnými RNA segmenty z nichž čtvrtý největší segment kóduje HA gen. Chřipkové viry jsou rozděleny na základě antigenových diferenciací na typ A, B a C. Viry chřipky A popisuje nomenklatura, jejíž součástí je označení podtypu nebo typu, geografické místo původu, počet řetězců a rok izolace, například A/Beijing/353/89. Existuje alespoň 13 podtypů HA (H1–H13) a devět podtypů NA (N1–N9). Všechny tyto podtypy byly nalezeny u ptáků, ale u lidí, prasat a koní byly zjištěny pouze H1–H3 a N1–N2 (Murphy and Webster, „Orthomyxoviruses“, in *Virology*, ed. Fields, B. N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., 1091–1152 (Raven Press, New York, (1990)).

35

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

40

Trojrozměrná struktura HA a interakce s jejím celulárním receptorem, kyselinou sialovou, byla extenzivně studována (Wilson a kol., „Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution“ *Nature* 289: 366–378 (1981); Weis a kol., „Structure of the influenza virus hemagglutinin completed with its receptor, sialic acid“ *Nature*, 333: 426–431 (1988); Murphy and Webster, 1990). HA molekula je ve virionu přítomna jako trimer. Každý monomer existuje ve formě řetězců HA1 a HA2, vázaných jednoduchou disulfidovou vazbou. Infikované hostitelské buňky produkují prekurzorový glykosylátovaný polypeptid (HAO) s molekulovou hmotností přibližně 85 000, který se následně rozštěpí na HA1 a HA2.

50

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

55

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

Vakcíny proti chřipce, na které bylo uděleno povolení, jsou tvořeny formalinem inaktivovanými
podtypy virů (H1N1 a H3N2) influenzy A a jedním podtypem virů influenzy B nebo přípravky,
tvořenými podjednotkami získanými chemickým štěpením těchto virů. Před každým chřipkovým
15 obdobím doporučuje „U.S. Food and Drug Administration's Vaccines and Related Biologicals
Advisory Committee“ pro nadcházející období použití trojvalenční vakcíny proti chřipce. Vakcíny,
používané v letech 1992 až 1993 obsahovaly viry podobné virům A/Texas/36/91–(H1N1),
A/Beijing/353/89–H3N2 a B/Panama/45/90. FDA navrhla, aby v letech 1993 až 1994 vakcína
proti chřipce obsahovala stejné texaské a panamské kmeny a nový kmen influenzy A Beijing
20 (A/Beijing/32/92).

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

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

Zárodečné viry pro vakcíny influenzy A a B jsou přirozeně se vyskytující kmeny, které se
replikují do vysokých titrů v alantoické dutině vajec kuřat. Alternativně je kmenem viru influen-
zy A přeuspořádaný vir se správnými povrchovými antigenními geny. Přeuspořádaný vir je tako-
vý vir, který má v důsledku segmentace virového genomu vlastnosti všech parentálních kmenů.
40 Pokud buňku infikuje více než jeden kmen viru influenzy, potom se tyto segmentované viry smísí
a vytvoří progenní virion, který obsahuje virová přeskupení genů z obou rodičovských kmenů.

Ochrana pomocí současně používaných vakcín proti chřipce, tvořených celými podtypy virů nebo
jejich segmenty, je krátkodobá a její účinnost ještě snižuje výskyt antigenního posunu v epide-
45 mických kmenech chřipky. Viry influenzy podléhají antigennímu posunu, který je výsledkem
imunitní selekce virů se změnami aminokyselinové sekvence v molekule hemagglutininu. V ideál-
ním případě virové kmeny vakcíny odpovídají virovým kmenům influenzy, které způsobují one-
mocnění. Nicméně současná produkce chřipkových vakcín je omezena propagací viru v oplodně-
ných kuřecích vejcích. Ne všechny kmeny viru influenzy se dobře replikují ve vejcích; je tedy
50 třeba viry přizpůsobit nebo realizovat virová přeskupení. V hemagglutininu virů influenzy vypěs-
tovaných ve vejcích se objevila extenzivní heterogenita v porovnání s primárními izoláty, izolo-
vanými z infikovaných jedinců, rostoucími v savčích buňkách (Wang a kol., *Viriol.* 171: 275–279
(1989); Rajakumar a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4 154–4 158 (1990)). Změny v HA
55 v průběhu selekce a produkce chřipkových vakcín mohou mít za následek vznik směsi antigeno-

vě distrinktních subpopulací viru. Viry ve vakcíně se mohou tedy lišit od variant přítomných v epidemických kmenech, což může mít za následek nižší úroveň ochrany.

5 U osob trpících vážnou alergií na vejce může zbytek vaječného proteinu ve vakcíně způsobit střední hypersenzitivní reakce. Prasečí chřipková vakcína byla v roce 1976 dávana do souvislosti se zvyšující se četností výskytu Guillain-Barré syndromu. U následných vakcín, připravených z dalších virových kmenů influenzy, nebyl již dále pozorován zvýšený výskyt tohoto vzácného onemocnění.

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

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

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

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

Podstata vynálezu

30 Předmětem vynálezu je v podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemagglutininový protein exprimovaný v bakulovirovém expresním systému v kultivovaných hmyzích buňkách, který je purifikovaný do 95% nebo vyšší čistoty a je imunogenní a indukuje ochrannou imunitní odezvu při použití jako vakcína. Výhodně v podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemagglutininový protein dále zahrnuje bakulovirový
35 signální peptid, který se váže přímo na HAO protein bez intervenujících aminokyselin. Výhodně v podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemagglutininový protein je dále sdružen s farmaceuticky přijatelným nosičem pro podání ve formě vakcíny. Výhodně v podstatě čistý, rekombinantní zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemagglutininový protein je dále sdružen s adjuvans a farmaceuticky přijatelným nosičem pro podání ve formě vakcíny.
40 Výhodně je farmaceuticky přijatelným nosičem polymerní systém pro dopravu proteinu. Výhodně se chřipkový HAO hemagglutininový protein zvolí z množiny sestávající z kmenů chřipky A, kmenů chřipky B, kde výhodně virový kmen chřipky infikuje lidi. Výhodně v podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemagglutininový protein je dále sloučen s druhým proteinem, který se váže na hemagglutinin. Výhodně je druhý protein zvolen z množiny
45 sestávající z virových proteinů hepatitidy B, HIV proteinů, karcinoembryonálního antigenu a neuraminidasy.

Předmětem vynálezu je rovněž vektor pro výrobu rekombinantního chřipkového HAO hemagglutininového proteinu obsahujícího následující R'→3' sekvence: polyhedrinový promotor signální
50 z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, peptid, sekvence kódující zralý hemagglutinin z chřipkového kmene, translační terminační kodon a polyhedrinový RNA polyadenylační signál. Výhodně je signálním peptidem bakulovirový protein mající molekulovou hmotnost přibližně 61 kDa a aminokyselinovou sekvenci tvořenou prvními aminokyselinami sekvence ID No. 7. Výhodně je signálním peptidem chřipkový hemagglutininový proteinový promotor. Výhodně sekvence kódující signální peptid a hemagglutinin nekódují žádnou intervenující aminokyselinu.
55

Výhodně vektor pro výrobu rekombinantního chřipkového HAO hemagglutininového proteinu dále zahrnuje sekvenci kódující druhý protein, který se exprimuje jako fúzní protein s hemagglutininem. Výhodně je vektor transfekován v kultivovaných hmyzích buňkách.

- 5 Předmětem vynálezu rovněž způsob výroby výše definovaného rekombinantního chřipkového hemagglutininového proteinu, jehož podstata spočívá v tom, že se kultivované hmyzí buňky infikují vektorem obsahujícím následující 5' → 3' sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, signální peptid, sekvence kódující hemagglutinin z chřipkového kmene zvoleného ze skupiny sestávající z chřipkového kmenu A a chřipkového kmenu B, translační terminační kodon a polyhedrinový RNA polyadenilační signál, buňky se následně kultivují v živném prostředí a protein se izoluje z hmyzích buněk.

- Výhodně se HAO chřipkový hemagglutininový protein izoluje z buněk v alespoň 95% čistotě. Výhodně se protein izoluje separací hemagglutininu z membránových proteinů při alkalickém pH, 15 promytím proteinů navázaných na membránu, při kterém se eluuje hemagglutinin, separováním hemagglutininu od dalších proteinů navázáním na aniontoměničovou pryskyřici změnou pH, a separováním hemagglutininu od ostatních proteinů navázáním na kationtoměničovou pryskyřici změnou koncentrace soli. Výhodně se vektor připraví tak, že se vir sklídí z buněčného média a v případě chřipkových kmenů A se izoluje virová RNA, nebo v případě chřipkových kmenů B 20 se izoluje mRNA; cDNA se syntetizuje za použití univerzálního primeru (5'-AGCAAAA-GCAGG-3' (SEQ ID No. 1) pro virovou RNA z chřipkových kmenů A nebo se z chřipkových kmenů B syntetizuje nahodilý primer tvořící mRNA, přičemž primery 5' a 3' mají na koncích, které se nenalézají uvnitř hemagglutininových genů, restrikční enzymová místa; chřipkové A nebo B primery a chřipková cDNA smíšená se segmenty hemagglutininového genu se amplifikují za 25 vzniku dvouřetězcových DNA fragmentů obsahujících celé sekvence kódující zralý hemagglutidin; identifikuje se signální peptid hemagglutininových genů, načež se amplifikují hemagglutininové geny bez signálního peptidu; a klonují do vektoru obsahujícího AcNPV polyhedrinový promotor. Výhodně se hemagglutininové geny klonují do vektoru za použití PCR tak, že vektor kóduje signální peptid navázaný přímo na hemagglutinin bez intervenujících aminokyselin. Výhodně se 30 vektor transfekuje do hmyzích buněk a vyberou se buňky pro hemagglutininovou expresi.

- Předmětem vynálezu je také vakcína, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje zralý glykosylovaný hemagglutininový protein, který dále obsahuje bakulovirový signální peptid navázaný přímo na hemagglutininový protein bez intervenujících aminokyselin, jakož i farmaceuticky přijatelný 35 nosič. Výhodně vakcína dále obsahuje adjuvans. Výhodně je farmaceuticky přijatelným nosičem polymerní systém pro dopravu.

- Předmětem vynálezu je rovněž vakcína, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje zralý glykosylovaný hemagglutininový protein obsahující druhý protein, který je navázaný na hemagglutinin, 40 jakož i farmaceuticky přijatelný nosič. Výhodně je druhým proteinem neuraminidasa. Výhodně vakcína obsahuje dále adjuvans.

- Vynález rovněž popisuje obecný přístup pro účinnou extrakci a purifikaci rekombinantního proteinu produkovaného v hmyzích buňkách, konkrétně pro purifikaci rHA proteinů z A podtypů 45 a B typu chřipkových virů. Rekombinantní vakcínu lze vyvinout spíše z primárních zdrojů chřipky, například z nazálních sekretů infikovaných jedinců, než z viru přizpůsobeného a kultivovaného v kuřecích vejcích. To umožňuje rychlý vývoj vakcíny přímo z epidemických kmenů chřipky a eliminuje problémy spojené s přizpůsobováním viru kultivaci ve vejcích a rovněž eliminuje reakci pacientů na vaječnou kontaminaci ve výsledné vakcíně.

- 50 Příklady demonstrují formulaci a klinickou účinnost vakcíny v imunizující dávkové formě, zahrnující purifikované rHA antigeny ze tří kmenů chřipkového viru, doporučených FDA pro 1993/1994 a 1994/1995 chřipková epidemická období. Funkční imunita se měřila pomocí testů, které kvantifikovaly protilátky, které se váží na chřipkový hemagglutinin blokuující schopnost 55 chřipkového viru srážet červené krvinky nebo které neutralizují chřipkový virus. Ochranné imu-

nitní odpovědi na rHA vakcíny se měřily u živočichů, kteří jsou citliví na chřipkovou infekci nebo v rámci humánních imunologických studií.

5 Přehled obrázků na výkresech

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

FDA – Food and Drug Administration;
MDCK – (Madin Darby Canine Kidney) ledviny psa Madin Darby;
TPCK – tosylfenylalanylchloromethylketon;
RNA – ribonukleová kyselina;
cDNA – komplementární deoxyribonukleová kyselina;
HA – hemagglutinin;
FBS – fetální bovinní sérum;
PCR – polymerázová řetězová reakce; a
BV – bakulovirus.

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

Obr. 3 znázorňuje graf anti-HA imunitní odezvy u myší ve 42. dni, n=5, na titr protilátky pro čistý rHAO; vakcíny Fluzone; a rHAO–kamence; při dávkách 0,5 µg (černé sloupce), 0,1 µg (stínované sloupce), 0,02 µg (tečkované sloupce) a 0,004 µg (bílé sloupce).

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

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

Použití rekombinantní DNA chřipkových vakcín nabízí řadu chřipkovou vakcínu lze vyrábět technologie při výrobě výhod: rekombinantní DNA za bezpečných a přísněji kontrolovaných podmínek; není zapotřebí propagace infekční influenzy ve vejcích; rekombinantní HA protein je

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

10

Bakulovirový expresní systém

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

Nejvýhodnější hostitelskou buněčnou linií pro produkci proteinů z rekombinantních bakulovirů je Sf900+. Další výhodnou hostitelskou buněčnou linií pro produkci proteinů z rekombinantních bakulovirů je Sf9. Sf900+ a Sf9 představují netransformované, netumorigenové kontinuální buněčné linie odvozené ze *Spodoptery frugiperdy* (Lepidoptera; Noctuidae). Buňky Sf900+ a Sf9 se propagují při 28 ± 2 °C bez obohacení oxidem uhličitým. Kultivačním médiem použitým pro buňky Sf9S je TNMFH, prostá směs solí, vitaminů, cukrů a aminokyselin, doplněná 10% fetálním bovinním sérem. S výjimkou fetálního bovinního séra se žádné další produkty odvozené ze

55

zvířat (tj. trypsin atd.) při buněčné propagaci nepoužívají. Pro růst buněk Sf9 lze rovněž použít séra prosté kultivační médium (dostupné jako Sf900 kultivační médium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD), které je vhodné zejména pro propagaci buněk Sf900+.

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

- 10 Odborníkům v daném oboru je zřejmé, že expresní vektor se neomezuje pouze na bakulovirový expresní systém. Rekombinantní HA proteiny se rovněž mohou exprimovat v dalších expresních vektorech, například virech Entomopox (virus hmyzího moru) a hmyzí buňky se potom mohou transformovat konstituční expresí rekombinantního HA genu nebo genů.

Izolace kmenů influenzy

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

Propagace kmenů influenzy

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

35 Purifikace viru

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

45 Klonování hemaglutininových chřipkových genů

- 50 Přehled způsobů klonování HA genů poskytuje obrázek 1. Buňky jsou v podstatě infikovány chřipkovým kmenem, který se má klonovat. Virus se sklídí z buněčného média a izoluje se buď virová RNA pro kmeny influenzy A, nebo mRNA pro kmeny influenzy B. Virová RNA (–RNA) se extrahuje z purifikovaných virionů a pomocí standardních metod analyzuje na formaldehyd–agarózových gelech. cDNA se syntetizuje, buď za použití univerzálního primerového systému v případě virové RNA izolované z kmenů influenzy A, nebo za použití nahodilých primerů v případě mRNA izolované z kmenů influenzy B. Plus–standardní komplementární DNA (cDNA) se připraví za použití univerzálního oligonukleotidového primeru (5'–AGCAAAGCAGG–3'

(SEQ ID NO: 1)), který je homologický se všemi hemagglutininovými RNA segmenty ve virech
influenzy A a B (Davis a kol., „Construction and characterization of a bacterial clone containing
the hemagglutinin gene of the WSN strain (HON1) of influenza virus“ *Gene*, 10: 205–218
(1980)). primery jsou navrženy tak, aby byly homologické se zachovanými úseky na 5' a 3' kon-
ci chřipkových hemagglutininových genů. Jak 5', tak 3' primer má na svých koncích rovněž rest-
riční enzymatická místa, která se nacházejí v hemagglutininových genech.

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

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

Kmeny influenzy A

HA geny z kmenů influenzy A se klonovaly z purifikovaných virových RNA přípravků. Virová
RNA se extrahovala ze 100 až 200 µl purifikovaných virionů influenzy A, obsahujících 1000 až
2000 hemagglutinačních jednotek (HAU) influenzy. Jedna HAU odpovídá množství viru, které
bude srážet 50 % červených krvinek ve standardním testu srážlivosti (Rosen, 1969). Viriony se
ošetří proteinázou K, jejímž úkolem je digerovat protein a potom se virová DNA extrahuje shod-
nými objemy fenolu a chloroformu a vysráží ethanolem v přítomnosti tRNA nosiče. Virová RNA
se resuspenduje v pufru a digeruje RNAzy–prostou DNázou, jejímž úkolem je odstranit veške-
rou kontaminující DNA, načež se extrakční a srážecí krok zopakuje. Virová RNA (vRNA) se
následně analyzuje za použití formaldehydoagarózových gelů způsobem, který popisuje Maniatis
a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. str. 86–96 a 366367 (Cold Spring Harbor Lab.,
Cold Spring, N.Y. 1982).

Kmeny influenzy B

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

Expres a zpracování rekombinantního hemagglutininu v hmyzích buňkách

Rekombinantní hemagglutininové antigeny se exprimovaly ve vysoké koncentraci, v buňkách
S. frugiperda infikovaných AcNPV–hemagglutininovými vektory. Hlavním genovým produktem

je nezpracovaný celodélkový hemaglutinin (rHAO), který se nesekretuje ale zůstává spojen s periferními membránami infikovaných buněk. Tímto rekombinantním HAO je protein s molekulovou hmotností 68 000, který je glykosylátovaný N–navázaným vysokomanozovým typem glykanů, které se liší od glykanů produkovaných expresí virových proteinů v savčích nebo ptačích buňkách. To dokazuje, že rHAO tvoří posttranslační trimery, které se akumulují v cytoplazmatických membránách.

Vektory pro exprese HAO a dalších proteinů

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

Jak zmiňují níže uvedené příklady, pokud se HA geny klonovaly vpMGS12 přes restrikční místa, potom se HA zralý signální peptid odstranil a nahradil bakulovirovým chitinázovým signálním peptidem, označeným jako 61 kD signální peptid. Vzhledem k tomu, že HA gen je na chitinázový signální peptid navázán přes restrikční místa, jsou mezi zralým HAO proteinem a 61 kD signálním peptidem, v závislosti na zvoleném restrikčním místě, tři až pět aminokyselin. Přesto, že s kmenem influenzy A nebyly žádné problémy, kmen HAO B exprimovaný dalšími aminokyselinami se nesbalil správným způsobem.

Pro řešení tohoto problému byly vyvinuty dva způsoby. Prvním je použití nového vektoru, pMGS3, který nekóduje 61 kD signální peptid. HAO se svým přirozeným signálním peptidem se naklonuje do vektoru a exprimuje. Při SDS–PAGE charakterizaci HAO B kmene exprimovaný v tomto vektoru, vykazuje lepší glykosylaci a zpracování, než pokud je exprimován v pMGS12. Tento HAO je sbalen tak dokonale, že ho lze kvantitativně převést na HA1/HA2. Naneštěstí, jak ukázal westernový přenos, výtěžek není tak vysoký. Druhý způsob zvyšuje výtěžek použitím 61 kD signálního peptidu v pMGS12 pro řízenou expresi, při které se HAO gen inzertuje bez použití restrikčních enzymů. Nový vektor zahrnující 61kD signální peptid a HAO gen bez sekvence, kódující zevně intervenující aminokyseliny, je označen jako pMGS27.

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

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

Purifikace rekombinantního HAO

Několik dní po infekci lze rHAO selektivně extrahovat z periferních membrán AcNPV–hemaglutininem infikovaných buněk nedenaturačním noniovým detergentem nebo dalšími způsoby,

5 které jsou pro purifikaci rekombinantních proteinů z hmyzích buněk včetně afinitní nebo geťové chromatografie a navázání protilátek odborníkům v daném oboru známy. rHAO rozpustný v detergentu může být dále purifikován pomocí DEAE iontoměničové a čočkové lektinové afinitní chromatografie nebo dalších ekvivalentních metod, odborníkům v daném oboru známých.

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

10 HAO protein, který tvoří nedílnou součást membrány hmyzích buněk se separuje z rozpustných proteinů, periferních membránových proteinů a většiny DNA a RNA extrakcí buněk v relativně viskózním roztoku alkálie, přičemž pH alkálie se pohybuje přibližně v rozmezí od 9,5 do 10,5. Viskóza se zvyšuje v důsledku inkluze sacharózy při koncentraci přibližně 250 mM. Disulfid-redukující činidlo, například β -merkapt ethanol, je použito v takové koncentraci, která účinně brání navázání proteinu ze směsi na disulfid. Buňky se suspendují v extrakčním pufru, homogenizují a následně odstředí. Peleta se promyje homogenizací v pufru s nízkou iontovou silou, který obsahuje disulfid-redukující činidlo při alkalickém pH (vodivost je zpravidla menší než 1 mS, pH 10,5) a odstředí se. HAO se následně extrahuje z pelety v pufru, který obsahuje 0,3 až 1,5 % detergentu, například Tritonu a disagregační činidlo v množství, které brání tvorbě komplexů způsobené vzájemnými reakcemi mezi náboji, například 0,3 až 1,0 M betainu nebo paurinu, při alkalickém pH (výhodně 9,5). HAO v supernatantu se následně purifikuje aniontoměničovou chromatografií a následnou kationtoměničovou chromatografií. HAO se ve stejném pufru, ve kterém se extrahoval ale který se naředí alespoň 1:2 dalším pufrem, aplikuje na iontoměničovou kolonu, například DEAE nebo Q-Sepharosa (agarózová kuličková kolona s kvartérními aminoskupinami), která se před tím uvedla do rovnovážného stavu pufrem, který obsahoval 25 přibližně 1/10 koncentrace detergentu a disulfid-redukujícího činidla. HAO se následně eluuje snížením pH přibližně na 8,5. Eluovaný HAO se aplikuje na kationtoměničovou kolonu ve v podstatě stejném pufru. Kontaminující látky se eluují snížením pH přibližně na 7,4, a následně se HAO eluuje zvýšením koncentrace soli na 0,15 M NaCl.

30 Tento výhodný způsob purifikace bude podrobněji popsán níže.

Preparace rekombinantní HA—obsahující membránové frakce

35 Buňky exprimující rekombinantní HA (6,2 g buněk z 0,34 l kultury) se suspendují při 100 mg/ml v ledově studeném 100 mM pyrofosfátu sodném, 100 mM chloridu sodného, 250 mM sacharózy, 0,1% β -merkapt ethanol, pH 10,5. Buňky se rozruší pomocí homogenizéru Polytron (Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) při dvouminutovém nastavení 4. Pro zvýšení rozpustnosti kontaminujících proteinů a zvýšení čistoty membránového přípravku je třeba použít alkalické pH homogenizačního média. Homogenizát se odstředí 30 minut při 9 200 g. Supernatant se rozruší 40 a pelety se shromáždí. Po preparaci membránové frakce následuje promývací krok, ve kterém se membránová frakce promývá roztokem s nízkou iontovou silou. Peleta se resuspenduje do původního objemu v ledově studeném 0,1% β -merkapt ethanolu, 10,5, a homogenizuje za použití homogenizéru Polytron při dvou minutovém nastavení 4. Homogenizát se odstředí 30 minut při 9200 g. Supernatant se odstraní a pelety se seberou. Tento průplach s nízkou iontovou silou 45 odstraní další část periferních membránových proteinů. Preparace membránové frakce vede ke značnému obohacení rekombinantního HA a k odstranění kontaminujících nukleových kyselin.

Extrakce rekombinantního HA

50 Rekombinantní HA se následně selektivně extrahuje z membránové pelety za podmínek, které nenedaturují antigen. Membránová peleta se homogenizuje ve 41 ml ledově studeného 10 mM ethanolaminu, pH 9,5, 1% Tritonu N101, 0,1% β -merkapt ethanolu, 25 mM NaCl a 400 mM betainu za použití homogenizéru Polytron při dvouminutovém nastavení 4. Po čtyřicetiminutové inkubaci při 23 °C se směs odstředí 30 minut při 9200 g. Supernatant obsahující rekombinantní HA se oddekantuje a naředí na dvojnásobek stejným pufrem.

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

Chromatografická purifikace

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

Aniontoměničová chromatografie

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

Kationtoměničová chromatografie

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

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

Strukturní a biochemické vlastnosti rekombinantního HAO

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

Purifikovaný rHAO neaglutinuje před odstraněním detergentu buňky, z čehož vyplývá, že aby se antigen mohl křížově navázat na červené krvinky kuřete, musí vytvořit komplexy (růžice). Kvantitativní schopnost purifikovaného rHAO aglutinovat buňky se využívá jako (lot–to–lot) míra konzistence antigenu. Hemaglutininná jednotka se definovala jak množství antigenu, které je

potřebné pro dosažení 50% aglutinace ve standardním hemaglutininovém testu, prováděném na červených krvinkách kuřete. Srovnávací data ukázala, že purifikované rHAO antigeny aglutinují červené krvinky s účinností, srovnatelnou s účinností pozorovanou v souvislosti s celkovými chřipkovými viriony.

5

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

20 Produkce fúzních proteinů

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

35

Fúzní geny HA–cílového antigenu se modifikují pro správnou expresi hmyzích buněk delecí přirozených hydrofobních signálních peptidových sekvencí a jejich náhradou novým bakulovirovým signálním peptidem. Fúzní protein se zavede do bakulovirového expresního vektoru tak, že bakulovirový polyhedronový promotor řídí transkripci fúzních proteinů v infikovaných hmyzích buňkách. Osmnáctiaminokyselinový bakulovirový signální peptid řídí transkripci fúzního polypeptidu HA–cílového antigenu do glykosylační dráhy hmyzí buňky a není přítomen na zralém fúzním proteinu.

Například plasmid pA9440, který obsahuje HA gen A/Beijing/32/92 kmene v níže popsaném pMGS12 bakulovirovém transferovém plasmidu se použije jako matrice pro amplifikaci HA genu polymerační řetězovou reakcí (PCR) a za použití protokolu doporučeného dodavatelem (Gene Amp PCR cloning kit, Perkin Elmer Cetus). Reakční směs (100 µl), obsahovala 20 pmol primerů navržených pro temperaci částí HA genu. 5' a 3' primer byly navrženy s endonukleázovými místy na koncích, které se nenacházely v HA genu. 5' PCR primer (0 až 567) pro HAO a HA1 fragmenty začíná 52 bazických párů za 5' koncem sekvencí kódujících přirozený HA gen, které postrádají přirozenou signální peptidovou sekvenci, a přidává *Sma*I místo bezprostředně za 5' na sekvenci kódující HA. 5' PCR primer (0 až 651) pro HA2 začíná na nukleotidu 1108 zralého HA genu, bezprostředně následujícím za kodonem kódujícím argininový zbytek, který se odstranil během rozštěpení HAO na HA1 a HA2. Byl navržen 3' PCR primer (0 až 680) pro HAO a HA2 fragmenty, který zavede *Kpn*I místa bezprostředně za HA kódující sekvence, které

55

odstraňují přirozený koncový kodon. 3' PCR primer pro HA1 (0 až 679) upravuje gen bezprostředně před argininovým zbytkem odstraněným během HAO štěpení. Amplifikace fragmentu HA genu se prováděla ve třiceti cyklech, z nichž každý sestával z jednodominutové denaturace 94 °C, dvouminutového temperování primerů při 55 °C a dvouminutové extenze při 72 °C. Výsledné amplifikované fragmenty HA genu se podrobily elektroforéze na agarózovém gelu, purifikovaly z gelu pomocí sady GeneClean (Bio 101, Inc.) a ligovaly do plasmidu, navrženého tak, aby přijal PCR-generované fragmenty (pCRII; Invitrogen). Takže se získají plasmidy pB142, pB144 a pB330, které obsahují HAO, HA1, resp. HA2 genové fragmenty.

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

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

Příprava peptidu ve velkém měřítku se prováděla pomocí plasmidu pB806 a DNA se digerovala buď pomocí *SmaI*, nebo *KpnI*. CEA-kódující fragmenty se purifikovaly elektroforézou na agarózovém gelu pomocí sady GeneClean a purifikované fragmenty se ligovaly do každého ze tří HA-kódujících konstruktů (pB879, pB1201 nebo pB1205), stejným restričním enzymem. Například digerovaných CEA-kódující fragmenty s *SmaI*-sestřiženými konci se ligovaly do HAO-, HA1- a HA2-kódujících konstruktů (pB879, pB1201, resp. pB1205) sestřižených *SmaI* tak, že vytvořily plasmidy pB1250, pB1555, resp. pB1584. CEA-kódující fragmenty s *KpnI*-sestřiženými konci se ligovaly do HAO-, HA1- a HA2-kódujících konstruktů, sestřižených *KpnI* tak, že vytvořily plasmidy pB1264 resp. pB1564 a pB1593. Inzerce CEA genu na *SmaI* místě zavede CEA-kódující sekvence za HA-kódující sekvence. V případě všech konstruktů byly navrženy PCR primery tak, aby se EA gen vložil v rámci HA a aby se fúzní genová translace ukončila na univerzálním translačním koncovém signálu (TAATTAATTAA) (SEQ ID NO: 4) v pMGS12 vektorových sekvencích *KpnI* místem.

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

5 Formulace a balení vakcíny

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

U zvláště výhodného provedení se HA sloučí s adjuvansem, který se použije v množství, účinném pro zvýšení imunogenní odezvy proti HA proteinům. V současnosti je jediným, v širším měřítku používaným, adjuvansem u lidí kamenec (fosforečnan hlinitý nebo hydroxid hlinitý). Saponin a jeho purifikovaná složka Quil A, Freundův kompletní adjuvans a další adjuvansy používané při výzkumu a při veterinárních aplikacích mají toxicitu, která omezuje jejich potenciální použití v lidských vakcínách. Nicméně nově chemicky definované přípravky, jakými jsou například muramyl-dipeptid, monofosforyl lipid A, fosfolipidové konjugáty, například konjugáty, které popsal Goodman-Snitkoff a kol., *J. Immunol.* 147: 410–415 (1991), a rovněž by se mělo použít zapouzdření proteinu v proteoliposomu, jak popisuje Miller a kol., *J. Exp. Med.* 176: 1739–1744 (1992), a zapouzdření proteinu v lipidových vehikulech, například lipidových vehikulech Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH).

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

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

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

Často voleným nosičem pro farmaceutika a v poslední době častěji pro antigeny je poly(D,L-laktid-ko-glykolid) (PLGA), což je biologicky degradovatelný polyester, který se v lékařské praxi již dlouhou dobu používá, například v případě vstřebávacích stehů, kostních plotének a dalších dočasných implantátů, kde nevykazuje žádnou toxicitu. Do PLGA mikrokapslí se formuluje celá řada různých farmaceutik. K tomu, aby bylo možné upravit PLGA tak, aby kontrolovaně uvolňovala antigen, je třeba shromáždit určitá tělesná data, jak uvádí například

- Eldridge, J. H. a kol., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1989, 146: 59–66. Zachycení antigenů v PLGA mikrokuličkách o průměru 1 až 10 μm ukázalo, že mají značně adjuvansní účinek, pokud se podají orálně. PLGA mikrozapouzdřovací proces používá fázovou separaci emulze typu „voda v oleji“. Sledovaná sloučenina se připraví jako vodný roztok a PLGA se rozpustí ve vhodných organických rozpouštědlech, například v methylenchloridu a ethylacetátu. Tyto dva nemísitelné roztoky se ko-emulgují vysokorychlostním mícháním. Potom se přidá nerozpouštědlo pro polymer, což způsobí vysrážení polymeru okolo vodných kapiček za vzniku embryonálních mikrokapslí. Mikrokapsle se ochladí a stabilizují jedním z činidel, která zahrnují polyvinylalkohol (PVA), želatinu, algináty, polyvinylpyrrolidon (PVP) a methylcelulózu, a buď sušením ve vakuu, nebo extrakcí rozpouštědla se zbaví rozpouštědla.

Vynález se stane zřejmějším po prostudování následujících příkladů.

15 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

20 Propagace a purifikace chřipkových virů

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

- 25 A/Beijing/353/89–podobný (H3N2)
- A/Beijing/32/92–podobný (H3N2)
- A/Texas /36/91–podobný (H1N1)
- 30 B/Panama/45/90.

- Pro propagaci původní zásoby chřipkového viru, získaného z FDA, se MDCK buňky infikovaly v přítomnosti TPCK–ošetřeného trypsinu (Sigma Chemical Co., st. Louis, MO) a koncentracích fetálního bovinního séra, které jsou optimální pro přípravu nejvyšších titrů viru první choroby. MDCK buňky se infikovaly chřipkovými kmeny při nízké multiplicitě infekce (0,1 až 0,5), jak určil standardní HA test (Rosen, „Hemagglutination with Animal Viruses“ in *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel a N.P. Salzman, str. 276–28 (Academic Press, New York 1969)). Infikované buňky se inkubovaly 48 hodin při 33 °C a u média se provedl test hemagglutininové aktivity stanovující produkci viru. Podmínky poskytující nejvyšší HA aktivitu se použily pro přípravu velkých zásob chřipkového viru. Optimální koncentrace TPCK trypsinu a fetálního bovinního séra pro výše uvedené chřipkové viry jsou shrnuty v níže uvedené tabulce 1.

Tabulka 1 Optimální koncentrace TPCK trypsinu a fetálního bovinního séra

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

Purifikace chřipkového viru

Virus se 24 až 48 hodin po infekci sklídl z 10 T175 kultivačních nádob klarifikačního média (1000 x g po dobu 10 minut), chřipkou infikovaných MDCK buněk. Virus se peletoval z média při 100 000 x g po dobu 1 hodiny. Výsledná virová peleta se resuspendovala v 1 ml fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS) pH 7,4 a odstředovala přes 20 ml 20 až 60 % (hm./obj.) sacharóзовého gradientu v PBS. Pás chřipkového viru se sklídl ze 40 až 45 % sacharóзовé oblasti gradientu, naředil PBS a peletoval při 100 000 x g. Purifikovaná virová peleta se resuspendovala v 0,5 ml PBS, skladovaného při -70 °C.

Příklad 2

Klonování HA genu influenzy A/Texas/36/91

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

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

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

Nový 5' PCR primer byl navržen z 5' konce genu: 5'-GGG GGT ACC CCC GGG GAC ACA ATA TGT ATA GGC TAC CAT-3' (SEQ ID NO: 4) a 3' konce genu: 5'-GA AAC GTC ACG TCT TAT ACG/T TAG/T ACT CCA TGG CCC-3' (SEQ ID NO: 5). Tyto primery se použily při PCR k získání HA genu bez sekvence signálního peptidu. Ten se následně vložil do TA vektoru rozštěpeného *Kpn*I. 61K signální peptid pro bakulovirovou expresi a polyhedrinový promotor se následně vložil do TA vektoru, obsahujícího HA gen postrádající sekvenci chřipkového signálního peptidu. Výsledný bakulovirový rekombinantní vektor obsahoval polyhedrinový promotor, 61K bakulovirový signální peptid a HA gen pro influenzy A/Texas/36/91.

HA geny z chřipkových kmenů influenzy B se klonovaly z celkové mediátorové RNA (mRNA), extrahované z MDCK buněk infikovaných chřipkovým kmenem B, B/Panama/ 45/90. Celková RNA se připravila z 5 T175 láhví infikovaných buněk. Sklizené buňky se lyzovaly v přítomnosti guanidiniumthiokyanátu a celková RNA se purifikovala výše popsáním způsobem. Celková

mRNA se extrahovala z celulární RNA za použití výše popsaných oligo-(dT)-celulózových odstředovaných kolon.

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

Tabulka 2 Primery použité pro PCR amplifikaci

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

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

Tabulka 2 pokračování

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

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

Příklad 3

Klonování HA genů do bakteriálních plasmidů

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

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

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

SEQ ID NO. 8 kóduje sekvenci 5' konce HA genu pro A/Texas/36/91 (sekvenční rozmezí 1-481). SEQ ID NO: 9 je odpovídající aminokyselinovou sekvenci (začínající na startovacím kodonu „ATG“ [nukleotidu 21] SEQ ID NO: 8). Aminokyselinová sekvence 61K signálního peptidu je uvedena v SEQ ID NO: 9 jako aminokyseliny 1-18.

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

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

5 Příklad 4

Expresce rekombinantního HA ve hmyzích buňkách

Chimerické rekombinantní plasmidy, obsahující klonované HA geny se purifikovaly a 2 µg se smísily s 1 µg standardního typu DNA AcNPV. DNA se vysrážely s vápníkem a transfektovaly do buněk *S. frugiperda* za použití standardních postupů (Smith, Summers a Fraser, *Mol. and Cello Biol.* 3: 2 156–2 165 (1983)). Rekombinantní bakuloviry se identifikovaly na základě morfologie plak a následně dále purifikovaly dalšími cykly purifikace plak. Plakově purifikované rekombinantní bakuloviry se prohledávaly s cílem analyzovat expresi rHA a pro další vývoj se zvolil jediný bakulovirový expresní vektor.

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

25

Příklad 5

Produkce a purifikace rekombinantního HA

Bakulovirový expresní vektor A8611, který obsahuje gen pro influenzi A/Beijing/353/89, produkován v podstatě výše popsáním způsobem pro A/Beijing/32/92 hemagglutinin pod kontrolou polyhedrinového promotoru, se použil pro infikování buněk *S. frugiperda*. Buňky se nechaly narůst při 27 °C do hustoty 1×10^6 buněk/ml v TNMFH médiu (Gibco BLR, Gaithersburg, MD) obohaceném 10% fetálním bovinním sérem a infikovaly se při multiplicitě infekce (MOI) 1 A8611 rekombinantním bakulovirem. Během infekce se hemagglutinin influenzy A/Beijing/353/89 produkoval za transkripční kontroly bakulovirového polyhedrinového promotoru. Buňky se sklídily 72 hodin po infekci patnáctiminutovým odstředováním při 3400 x g a promyly resuspenzí v séru prostém TNMFH médiu a následně třicetiminutovým odstředováním při 10 400 x g. Supernatant se oddekantoval a infikované buněčné pelety se skladovaly při –70 °C.

40

Vyvinul se způsob, ve kterém se rekombinantní HA za podmínek, které nedenaturují antigen selektivně extrahoval z infikovaných buněk. Není-li stanoveno jinak, provádí se všechny extrakční kroky při 4 °C. Buněčná peleta z 0,5 l kultury (přibližně 5×10^8 buněk) se rozrušovala 2 minuty ve 40 ml ledově studených 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 1% (obj./obj.) Tweenu-20, 1 mg/ml leupeptinu za použití homogenizátoru Polytron (Brinkmann Instrumens Inc. Westbury, NY). Homogenát se odstředoval třicet minut při 9200 x g. Supernatant se vypustil a pelety se sebraly. Tento krok odstranil rozpustné a periferní membránové proteiny z hmyzích buněk bez extrakce integrálním membránovým proteinům podobného rHA. rHA se z pelet extrahoval dvouminutovou homogenizací při nastavení 4 ve 40 ml ledově studeného 30 mM Tris, 10 mM ethanolaminu, pH 11, 25 mM LiCl a 2% Tweenu-20. Po šedesátiminutové inkubaci na ledu se pH hodnota homogenátu nastavila na 8,4 pomocí 1 N HCl a nerozpustný materiál se odstranil třicetiminutovým odstředováním při 9200 x g. Supernatant obsahující rozpustný rHA se oddekantoval a pH hodnota se zkontrolovala, a pokud to bylo nezbytné, tak se nastavila na 8,4 při pokojové teplotě. Nerozpustný materiál se pro analytické účely resuspendoval ve 40 ml vody.

50

HA integrální membránový protein se solubilizoval při vysokém pH v přítomnosti detergentu Tween-20 a zůstal v roztoku potom, co pH pokleslo.

Proteiny se analyzovaly SDS elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Vzorky se rozrušily ve vroucí vodní lázni, kde se ponechaly 10 minut v přítomnosti 2% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 5% beta-merkaptoethanolu, načež se podrobily elektroforéze na 11% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti 0,1% SDS, načež se zabarvily modří Coomassie.

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

Chromatografickými gelovými matricemi, použitými pro purifikaci HA z 0,5 l infikovaných buněk *S. frugiperda*, bylo 30 ml Pharmacia DEAE Sepharose Fast Flow (v koloně Pharmacia C16/20) a 4 ml Pharmacia Lentil Lectin Sepharose 4B (v koloně Pharmacia C10/10). Výstup DEAE kolony je spojen se vstupem čočkové lektinové kolony a SiN 2 buněčný extrakt, připravený výše popsaným způsobem, se aplikoval do spojených kolon rychlostí 1 ml/minutu. Kolony se promyly 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,5% Tween-20 dokud se hodnota UV absorpce při 280 nm proudu vytékajícího z čočkové lektinové kolony navrátila na výchozí hodnotu. Za těchto podmínek se většina kontaminujících proteinů navázala na DEAE, ale rekombinantní HA proudí kolonou. Zbývající kontaminující látky prochází čočkovou kolonou a glykosylátovaný rHA se váže na čočkovou lektinovou afinitní matici. DEAE kolona se rozpojí a lektinová kolona se promyje dalšími 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,5% Tween-20. Lektinová kolona se následně promyla 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,4% (obj/obj) deoxycholátu sodného (DOC). Tento krok nahradí detergent Tween-20 detergentem, jako je DOC, který lze z proteinu odstranit dialýzou. Rekombinantní HA se následně z lektinové kolony eluovala pomocí přibližně 20 ml 40 ml 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM LiCl, 0,4% (obj/obj) deoxycholátu sodného, obsahujícího 0,3 M α -D-methylmannosidu. Výsledky se analyzovaly pomocí 11% PAGE.

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

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

Příklad 6

Analýza proteázové rezistence rHA

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

Dva alikvotní podíly purifikovaného rHA (A/Beijing/353/89) při koncentraci 60 μ g/ml se inkubovaly po dobu 30 minut na ledu, v 30 mM Tris-HCl, pH 8,4, 150 mM NaCl, v přítomnosti a za absence 50 μ g/ml TPCK-ošetřeného trypsinu. Reakce se ukončila přidáním 57,4 mM fenyl-

methylsulfonylfluoridu v isopropanolu do konečné koncentrace 1 mM. Alikvotní podíly každého vzorku se denaturovaly varem v 3% SDS za redukčních podmínek, podrobily elektroforéze na 11,5% polyakrylamidových gelech a pomocí westernového přenosu přenesly na nitrocelulózový filtr. HA polypeptidy se detekovaly za použití anti-HA séra morčete, připraveného proti purifikovanému rHA a koziho anti-morčecího IgG alkalinfosfatázového konjugátu.

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

15

Příklad 7

Stanovení imunogenicity rHA pomocí standardizovaného testu myší potence

Jedním způsobem měření imunogenicity antigenu je stanovení množství, nezbytného pro indukci detekovatelné odezvy na protilátku u myší (test myší potence). Standardizovaný test myší potence se používá pro měření imunogenicity rHAO vakcín. Skupiny pěti až deseti myší se imunizovaly jednou vakcínou, obsahující postupná naředění rHA, tj. 0,500 μ g, 0,1 μ g, 0,02 μ g a 0,004 μ g purifikovaného rHA. Séra se odebrala 28 dní po imunizaci a protilátky proti rHA antigenu se měřily pomocí standardního testu (ELISA) v 96jamkových mikrotitračních plotnách. Myši jsou sérokonvertované, pokud je OD450 při 1:100 na ředění 28denního antiséra vyšší, než průměrná hodnota OD450 myšího pre-imunního séra, zvýšená o tři standardní odchylky. Účinná dávka vakcíny, potřebná pro 50% sérokonverzi myší (ED₅₀) je mírou imunogenicity antigenu.

Například čtyři skupiny zahrnující 10 myší se imunizovaly 0,1 μ g, 0,02 μ g, 0,004 μ g nebo 0,0008 μ g (pětinásobné naředění), rHAO vakcínou. Séra se shromáždila 28 dnů po imunizaci a pomocí ELISA testu se měřila proti každému rHAO antigenu ve vakcíně, s cílem určit sérokonverzi. Vypočetla se dávka, potřebná pro 50% sérokonverzi myší (ED₅₀), a pro každý rHAO antigen se určila minimální hodnota ED₅₀.

35

Předběžná data ukázala, že jedna dávka 0,004 μ g rHAO bude sérokonvertovat alespoň 50 % myší.

40 Příklad 8

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

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

50

Výsledky jsou znázorněny na obrázku 3. Za nepřítomnosti adjuvansu indukovala pouze dávka 0,5 μ g produkci podstatnějšiho titru protilátky (200 000). V přítomnosti adjuvansů produkovaly podstatnější množství protilátky již dávky 0,004 μ g rHAO. Zvířata, imunizovaná rHA (bez kamence) produkovala přibližně stejné koncentrace anti-HA protilátek jako komerční vakcína.

Kamenec zvýšil imunogenicitu rHA, přičemž v přítomnosti adjuvansu se generovaly minimálně desetinasobně vyšší anti-HA titry než v nepřítomnosti adjuvansu.

Srovnání imunogenicity purifikovaných rHAO s komerční celovirionovou chřipkovou vakcínou FLUZONE (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) ukazuje, že rHAO vyvolává po dobu 48 dnů podobnou imunitní odezvu u myši. Adsorpce rHAO na kamenec podstatně zvyšuje imunogenicitu purifikovaného rHAO u myši, jak ukazují výsledky testu, popsaného v příkladu 7. Kombinace s kamencem způsobuje vyšší tvorbu IgG hemagglutininových protilátek než chřipkové vakcíny FLUZONE.

Příklad 9

Studie hemaglutinační inhibice

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

Studie, porovnávající schopnost purifikovaného rHAO připraveného z chřipkového kmene A/Beijing/353/89 a chřipkové vakcíny FLUZONE (Connaught Laboratories, Inc. Swiftwater, PA) vyvolávat tvorbu HAI protilátek, se prováděly na myších. Skupiny pěti myši se injektovaly nultý a dvacátý osmý den 0,05 µg, 0,1 µg, 0,02 µg nebo 0,004 µg rHAO nebo třikrát stejnými množstvími vakcíny FLUZONE, takže se podala stejná množství rekombinantního nebo virového A/Beijing/353/89 hemagglutininu. Například myši v nejvyšší dávkové skupině byly imunizovány 1,5 µg FLUZONE hemagglutininu (0,5 µg hemagglutininu z každého kmene) a 0,5 µg rHAO. Přítomnost dalšího hemagglutininového antigenu ve vakcíně FLUZONE ze dvou dalších chřipkových kmenů může vést k určitým křížově reaktivním protilátkám.

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

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

Tabulka 3 HAI titry proti rHAO a FLUZONE

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

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

10

Příklad 10

Formulace a klinická účinnost chřipkové vakcíny 1993/1994

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

20

Materiály a metody

25

Vakcíny

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

30

35

40

Klinické testy

45 Institucionálními posudkovými týmy Univerzity Saint Louis a Univerzity v Rochesteru schválily identické studijní protokoly. Studií na obou univerzitách se účastnily zdraví dospělí jedinci ve věku 18 až 45 let. Subjekty se nahodile rozdělily do skupin, kterým se následně aplikovala jedna z následujících pěti vakcínových přípravků dvojím slepým způsobem: (1) 15 µg rHAO, (2) µg rHAO plus kamenec, (3) 90 µg rHAO, (4) schválená trojvalenční inaktivovaná chřipková vakcína, nebo (5) fyziologické placebo. Vakcíny se podávaly intramuskulární injekcí v objemu 0,5 ml. Pro počáteční odhad bezpečnosti tří vakcínových přípravků obsahujících rHAO, se zvolilo nahodile a nezávisle na ostatních subjektech prvních 25 jedinců, kteří měli být vakcinováni, (tj. 5 osob na studii) a tyto jedinci byli 48 hodin po vakcinaci před tím, než se aplikovaly zbývající vakcíny, nepřetržitě telefonicky sledováni. Všichni zvolení jedinci byli instruováni tak, aby vyplňovali denní zprávu a v ní uvedli veškeré nežádoucí reakce včetně lokálních a systemických příznaků, které se u nich projevíly během prvních šesti dní po vakcinaci. Pokud jde o povahu příznaků,

50

55

jedinci sami tyto příznaky hodnotili jako mírné, střední nebo vážné. Pokud sledovaní jedinci cítili, že mají zvýšenou teplotu, potom rovněž zaznamenali hodnoty orálně měřené teploty. Pokud se na místě po injekci objevilo lokální zduření nebo erytém, potom se hodnotilo zda je plocha zduření nebo erytému menší, resp. větší než čtvrt dolar. Všechny vakcíny se aplikovaly v průběhu posledního týdnu měsíce listopadu a prvního týdne měsíce prosince 1993. Vzorky séra se odebraly každému jedinci v okamžiku vakcinace, tři týdny po vakcinaci a znovu koncem března nebo v měsíci dubnu 1994 alespoň dva až tři týdny potom, co již viry necirkulovali v místních komunitách. Účastníci studie byly rovněž instruovány, aby kontaktovali studijní centrum, pokud během zimního chřipkového epidemického období prodělají chřipce podobnou chorobu. Chřipce podobná choroba byla definována jako výskyt jakéhokoli v respiračního příznaku trvajícího déle než dva dny a doprovázeného horečkou a/nebo systemickými příznaky myalgie nebo nachlazení. Jedincům, kteří zaznamenali chřipkové příznaky, se provedly nosohltanové výtěry za účelem získání a identifikace virové kultury. Klinické vzorky se opatřily identifikačními kódy a zpracovaly slepým způsobem.

15

Sérologie

Pro jednotlivé typy sérologických testů se všechny vzorky shromážděné v obou institucích testovaly najednou v jediné laboratoři. Hemaglutinačně inhibiční (HAI) protilátky proti antigenu chřipkového viru A/Beijing/32/93 (H3N2) se měřily v séru standardním mikrotitračním testem, načež následovalo odstranění nespecifického inhibitoru pomocí enzymu ničícího receptor a odstranění studených aglutininů hemadsorpcí při 4 °C. Titr se definoval jako nejvyšší naředění séra, které zcela zabránilo hemaglutinaci způsobené čtyřmi antigenovými jednotkami viru, přičemž jako výchozí na ředění se zvolilo naředění 1:4. Protilátky sérového HA-specifického imunoglobulinu G (IgG) se měřily pomocí testu ELISA, při kterém se jako potahový antigen použil purifikovaný rHAO chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N2). Sled reakčních činidel směrem ven z pevné fáze tvořil (1) purifikovaný rHAO antigen, (2) vzorek séra, (3) alkalinfosfatáza-konjugovaná s kozím anti-humánním IgG a (4) substrát na bázi p-nitrofenylfosfátu disodného. ELISA titr se exprimoval jako nejvyšší naředění, při kterém byla optická hustota obsahu jamky obsahující antigen alespoň dvakrát vyšší, než optická hustota obsahu odpovídající kontrolní jamky bez antigenu. Neutralizované protilátky se měřily za použití mikroneutralizačního testu, který již popsal Treanor J.J. a Betts R.F., *J. Infect. Dis.* 168: 455–459 (1993). Postupná naředění tepelně inaktivovaného séra se smísila s přibližně 100 TCID₅₀ chřipkového viru A/Beijing/32/92 (H3N2) a inkuboval jednu hodinu při 37 °C. Směs viru a séra se následně adsorbovala při pokojové teplotě v průběhu jedné hodiny na splývající monovrstvu ledvinových buněk psa Madin–Darby (MDCK) v jamkách devadesátijamkových ploten. Plotny se promyly za účelem odstranění zbytkového inokula a opět naplnily séra prostým Dulbeccovým MEM s 2 µg/ml trypsinu a sedmdesát dva hodin inkubovaly v 5% CO₂ při 33 °C. Buňky se následně fixovaly methanolem a virová replikace se vyhodnotila za použití seznamu myších monoklonálních protilátek specifických pro matici a nukleoproteiny chřipkového viru A (Centers for Disease Control, Atlanta, GA), a následně alkalinfosfatázou-konjugovanou s anti-myším IgG. Poslední titr séra se definoval jako nejvyšší naředění, které způsobuje 50% signálu v porovnání s neneutralizovanými kontrolními jamkami.

45 Virologie

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

50

Statistické analýzy

Reciproký HAI, ELISA IgG a titry neutralizační protilátky se logaritmicky transformovaly pro účely statistické analýzy. Jako významná odpověď na vakcinaci se definovalo čtyřnásobné nebo větší zvýšení titru protilátky mezi vzorky séra odebranými před vakcinací a po vakcinaci. Laboratorní důkaz chřipkového virové infekce A (H3N2) se definoval jako izolace viru z nosohltanových sekretů a/nebo čtyřnásobné a větší zvýšení titru HAI protilátky v séru mezi tří týdním post-vakcinačním vzorkem (presezonní) odebraným v prosinci a odpovídajícím (postsezonním) vzorkem, odebraným následující jaro. Rozdíly mezi vakcinovanými skupinami se analyzovaly pomocí Fisherova exaktního testu, jehož cílem je porovnat podíly subjektů s nežádoucími reakcemi, s podstatnou protilátkovou odezvou nebo laboratorně potvrzenou chřipkovou nemocí nebo infekcí, a analyzováním rozdílu (ANOVA), a porovnat postvakcinační průměrný reciproký log₂ titrů protilátky. Modifikovaný test Bonferroniho nepravdělnosti a Tukey–Kramerův test se aplikovaly v případě, kdy bylo pro dosažení konečného výsledku vhodné provést více možných srovnání.

Výsledky

Reaktogenicitá

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

Imunogenicitá

Základní titry sérové HAI protilátky proti chřipkovému viru A/Beijing/32/92 (H3N2) dosahovaly maximálně 1:8 u 64 (50%) ze 127 zúčastněných subjektů. Většina subjektů v každé ze čtyř vakcinovaných skupin poskytla HA-specifickou sérologickou odpověď, měřeno pomocí HAI a testu ELISA (tabulka 4). Postvakcinační titry sérové HAI protilátky dosahovaly u všech osob, kterým byla podána vakcína maximálně 1:32 s výjimkou dvou osob, kterým bylo podáno 15 µg rHAO a jedné osoby, která byla podána již schválená vakcína. Vakcinace byla jinak u většiny dobrovolníků spojena s produkcí neutralizační protilátky. Průměrné zvýšení titrů protilátky a hodnoty sérokonverze po imunizaci 15 µg rHAO bylo poněkud nižší než v případě imunizace již schválenou vakcínou, nicméně tyto rozdíly neměly statistický význam. Protilátková odezva na rHAO se přidáním kamence nezvýšila. Subjekty imunizované 90 µg rHAO dosáhly po vakcinaci průměrného titru HAI a ELISA IgG protilátky, který byl dvakrát až pětikrát vyšší než v případě zjištěné zbývajících tří vakcinačních skupin (rozdíly při porovnávání titrů sérového HAI byly statisticky významné).

Ochranná účinnost

V průběhu sledované periody, zaznamenalo celkem 28 subjektů chorobu podobnou chřipce. Čtyřem z těchto jedinců (z nichž třem bylo aplikováno placebo a jednomu, který byl imunizován 15 µg rHAO) byl z nosohltanových kultur izolován chřipkový virus typu A (H3N2). Podstatné zvýšení titru HAI protilátky proti chřipkovému viru A/Beijing/32/92 (H3N2) mezi předsezonním a postsezonním vzorkem séra bylo rovněž zjištěn ve třech ze čtyřech případech, kdy byl v kultuře potvrzen virus, ale u žádného dalšího jedince, který zaznamenal chorobu. Jediný rHAO příjemce,

u kterého se následně vyvinula laboratorně potvrzená chřipková choroba, měl pozitivní kulturu získanou 31 dní po imunizaci a sérokonvertoval se z prevakcinačního HAI titru, který byl menší než 1:4, na postvakcinační (předsezónní) titr, který dosahoval 1:32. Dvě další osoby, kterým se podávalo placebo, a jeden dobrovolník imunizovaný již schválenou vakcínou měl sérologický
 5 důkaz infekce chřipkovým virem A (H3N2) v průběhu epidemického období při absenci klinické nemoci. Při srovnání všech vakcinovaných subjektů (neboli všech subjektů, kteří přijali libovolnou rHAO vakcínu) se zjistilo, že u jedinců, kterým bylo aplikováno pouze placebo, bylo zaznamenáno podstatně vyšší procento jedinců, kteří prodělali laboratorně potvrzenou chřipku typu A (H3N2) ($p < 0,05$) nebo kteří byly infikovány jejím virem ($p < 0,005$).

10 Výše uvedené výsledky naznačují, že chřipkové vakcíny obsahující purifikovaný rHAO antigen, připravené způsobem popsaným ve výše uvedené patentové přihlášce, jsou tolerantní a schopné vyvolávat ochranné imunitní odezvy u lidských subjektů. I při dávce 90 μg nebyl rHAO, hodnocený v této studii, reaktogeničtější než placebo na bázi fyziologického roztoku a způsoboval podstatně méně místních nežádoucích reakcí než již schválená a patentovaná trojvalenční subvirionová vakcína obsahující poloviční množství (tj. 45 μg) celkového HA antigenu.
 15

Odezvy neutralizačních HA-specifických protilátek na 15 μg rHAO přípravku byly srovnatelné s odezvami vyvolanými subvirionovou vakcínou a podstatně se zvýšily zvýšením dávky rHAO na 90 μg .
 20

Celková četnost infekce a nemoci, způsobená přirozenou expozicí cirkulujícímu epidemickému chřipkovému kmenu A (H3N2), byla podstatně nižší u vakcinovaných subjektů než u jedinců, kterým se podalo placebo. Z těchto výsledků vyplývá, že ochranná imunita poskytnutá rHAO, zejména pokud je podán ve vyšších dávkách, je srovnatelná nebo vyšší než ochranná imunita, získaná aplikací v současnosti dostupných vakcín.
 25

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

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

HAI, hemaglutinační inhibice; HA, hemaglutinin. Vzorky postvakcinačního séra se získaly tři týdny po imunizaci. Titry protilátky se vyjádřily jako průměry reciprokého $\log_2 \pm \text{SEM}$. Statistická srovnání se provedla mezi průměrným postvakcinačním HAI titrem navrhované skupiny a průměrným postvakcinačním titrem 90 µg rHA0 vakcinační skupiny analýzou rozdílu pomocí Dunnettova testu pro vícečetná srovnání. *, $P < 0,1$; +, $P < 0,05$; #, $P < 0,01$.

Příklad 11

Způsob výroby zlepšeného HAO klonujícího vektoru

5

Byl navržen vylepšený klonovací vektor pro expresi zralého HA, ve kterém se gen kódující HA lokalizoval bezprostředně za sekvencí kódující chitinázový signální peptid.

Vytvořil se lineární pMGS27 s jednořetězcovými konci

10

V pMGS12 plasmidu se HA naklonoval do *Sma*I nebo *Kpn*I místa bezprostředně za chitinázovým signálním peptidem. Nukleokyselinová a aminokyselinová sekvence jsou znázorněny jako SEQ ID NO: 22, resp. SEQ ID NO: 23:

5' -chitinázový signální peptid *Sma*I *Kpn*I
 TGG TTG GTC GCC GTT TCT AAC GCG ATT CCC GGG GGT ACC
 TRP LEU VAL ALA VAL SER ASN ALA ILE PRO GLY GLY THR

15

Tento úsek se změnil pomocí oligo řízené mutagenese za vzniku pMGS27 (změněné báze jsou podtržené) (SEQ ID NO: 24):

5' -
 TGG TTA GTC GCC GTG TCCTGCAGGCCAGAGAGGCCTT GGT ACC
 PstI

Plasmid pMGS27 se linearizoval *Pst*I sestríhem (znázorněné zbytky 6 až 35 SEQ ID NO. 24):

A GTC GCC GTG TCC TGCA 5' GGCCAGAGAGGCC T
 T CAG CGG CAC AGG 5' ACGTCCGGTCTCTCCGG A

20

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

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

Cílový HA gen se naklonoval do pMGS27

25

Krok 1 Syntetizovaly se PCR primery

Původní oligo (SEQ ID NO: 25):

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

Reverzní oligo (doplněk SEQ ID NO:26):

(3' konec 20 bází zralého HA) ATT AA
 CCGGTCTCTCCGG 5'

PCR HA genu

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

5' GTC GCC GTG TCC AAC GCG (zralý HA)
CAG CGG CAC AGG TTG CGC (zralý HA)

TAA TTGGCCAGAGAGGCC 3'

ATT AACCGGTCTCTCCGG

5

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

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

SEQ ID NO: 24.

GTCGCCGTGTCCAACGCG (zralý HA) TAATT

TTGCGC (zralý HA) ATTAACCGGTCTCTCCGG

+

A

GGCCAGAGAGGCCT

TCAGCGGCACAGG

A

15 až

chitinázový signální peptid

konec

GTCGCCGTGTCCAACGCG

(zralý HA

TAATTGGCCAGAGAGGCCT

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

20

Příklad 12

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

25

Chřipková vakcína, purifikovaný rekombinantní hemagglutinin, trojvalenční chřipková vakcína typu A a B A/Texas/36/92/1 (H1N1), A/Johannesburg/33/94 (H3N2) a B/Harbin/7/94 je neinfekční podjednotka odvozená z purifikovaných rekombinantních chřipkových hemagglutininových antigenů (HA). HA geny se klonovaly z výše popsaných kmenů chřipkových virů A a B, doporučených institucí pro kontrolu léčiv a k identifikaci jednotlivých klonovaných genů se použila

30

DNA sekvenční analýza. Bakulovirové expresní vektory obsahující klonované HA geny z chřipkových virových kmenů A/Texas/36/91 (H1N1), A/Johannesburg/33/94 (H3N2), B/Harbin/7/94 se použily pro výrobu rekombinantních HA antigenů v kultivovaných hmyzích buňkách. Rekombinantní HA proteiny jsou celodélkové, neštěpené hemagglutinininy (rHAO) s molekulovou hmotností přibližně 69 000. rHAO se produkují v buněčné linii *Spodoptery frugiperdy* (řád motýlů) uchová-

- 5 vané v séru prostém kultivačním médiu. Trívalenční vakcíny jsou tvořeny purifikovaným (s více než 95% čistotou, pravděpodobněji s 99% čistotou) rHAO ze dvou chřipkových A kmenů a jednoho B kmene, smíchanými ve stejném poměru. Vakcína, která se dodává pro klinické použití, je tvořena purifikovanými typy A B rHAO proteinů ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku bez konzervačních látek.

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

- 15 V jedné studii se skupiny deseti myší imunizovaly 15 µg purifikovaného rHAO A/Beijing/32/92 (H3N2) vyrobeného v buňkách přizpůsobených médiu obsahujícímu 10% fetální bovinní sérum nebo rHAO, vyrobeným v hmyzích buňkách přizpůsobených médiu obsahujícímu 10% fetální bovinní sérum nebo rHAO vyrobeném v hmyzích buňkách přizpůsobených séra prostému médiu (rHAO-SF). Dva a tři týdny po infekci se myším odebrala krev a připravily se vzorky séra.
20 U každého séra se stanovoval obsah anti-HA IgG a HAI protilátek. Jak rHAO, tak rHAO-SF antigeny poskytují podobné titry anti-HA a HAI protilátek. Dva týdny po imunizaci měla většina myší značné titry HAI protilátek a do tří týdnů osm z deseti myší v každé skupině mělo HAI titry 32 nebo vyšší. Tyto a další biochemické a imunologické studie ukázaly, že rHAO produkovaný v séra prosté hmyzí buněčné kultuře, je nerozlišitelný od rHAO vyrobeného za sérum obsahujících fermentačních podmínek.
25

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

Tabulka 5

Srovnání trojvalenční rHAO vakcíny s Fluvirinem

Srovnání trojvalenční rHAO vakcíny s Fluvirinem

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

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

Sekvenční protokol

(1) údaje k SEQ ID NO: 1:

5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

- (A) DÉLKA: 12 bazických párů
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

15

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

20

(A) ORGANIZMUS: chřipkový vir

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

AGCAAAAGCA GG

12

25

(1) údaje k SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

30

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

35

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 2

GGGGGTACCC CCGGGAGCAA AAGCAGGGGA AAATAAAAA

39

(1) údaje k SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

10 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 3

CCCGGTACCT CAAATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

35

15 (1) údaje k SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

25 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 4

GGGGGTACCC CCGGGGACAC AATATGTATA GGCTACCAT

39

(1) údaje k SEQ ID NO: 5:

30 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 5

40 CCCGGTACCT CAAATKCATA TTCTGCACTG CAAAG

35

(1) údaje k SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 1 793 bazických párů
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Beijing/32/92 rHA

20

(ix) ZNAKY

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

25

(ix) ZNAKY

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

30

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
(B) POZICE. 73 až 11 728

35

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
(B) POZICE. 1 771 až 1 777

40

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
(B) POZICE. 1 776 až 1 782

45

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
(B) POZICE. 1 783 až 1 793

50

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 6

TAAAAAACC TATAATAAT GCCCTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GGACTTTCCA GGAAATGACA ACAGCACAGC AACGCTGTGC	120
CTGGGACATC ATGCAGTGCC AAACGGAACG CTAGTGAAAA CAATCAGGAA TGATCAAAT	180
GAAGTGAATA ATGCTACTGA GCTGGTTCAG AGTTCCTCAA CAGGTAGAAT ATGCGACAGT	240
CCTCACCGAA TCCTTGATGG AAAAACTGC AACTGATAG ATGCTCTATT GGGAGACCCT	300
CATTGTGATG GCTTCCAAAA TAAGGAATGG GACCTTTTTG TTGAACGCAG CAAAGCTTAC	360
AGCAACTGTT ACCCTTATGA TGTACCGGAT TATGCCTCCC TTAGGTCACT AGTTGCCTCA	420
TCAGGCACCC TGGAGTTTAT CAATGAAGAC TTCAATTGGA CTGGAGTCGC TCAGGATGGG	480
GGAAGCTATG CTTGCAAAAG GGGATCTGTT AACAGTTTCT TTAGTAGATT GAATTGGTTG	540
CACAAATCAG AATACAAATA TCCAGCGCTG AACGTGACTA TGCCAAACAA TGGCAAATTT	600
GACAAATTGT ACATTGGGG GGTTCACCAC CCGAGCACGG ACAGAGACCA AACCAGCCTA	660
TATGTTGAG CATCAGGGAG AGTCACAGTC TCTACCAAAA GAAGCCAACA AACTGTAACC	720
CCGAATATCG GGTCTAGACC CTGGGTAAGG GGTCACTCCA GTAGAATAAG CATCTATTGG	780
ACAATAGTAA AACCAGGAGA CATACTTTTG ATTAATAGCA CAGGGAATCT AATTGCTCCT	840
CGGGGTTACT TCAAAATACG AAATGGGAAA AGCTCAATAA TGAGGTCAGA TGCACCCATT	900
GGCACCTGCA GTTCTGAATG CATCACTCCA AATGGAAGCA TTCCAATGA CAAACCTTTT	960
CAAAATGTAA ACAGGATCAC ATATGGGGCC TGCCCCAGAT ATGTTAAGCA AAACACTCTG	1020
AAATTGGCAA CAGGGATGCG GAATGTACCA GAGAAACAAA CTAGAGGCAT ATTCCGCGCA	1080
ATCGCAGGTT TCATAGAAAA TGGTTGGGAG GGAATGGTAG ACGGTTGGTA CGGTTTCAGG	1140
CATCAAAATT CTGAGGGCAC AGGACAAGCA GCAGATCTTA AAAGCACTCA AGCAGCAATC	1200
GACCAAATCA ACGGGAAACT GAATAGGTTA ATCGAGAAAA CGAACGAGAA ATTCCATCAA	1260
ATCGAAAAAG AATTCTCAGA AGTAGAAGGG AGAATTCAGG ACCTCGAGAA ATATGTTGAA	1320
GACACTAAAA TAGATCTCTG GTCTTACAAC GCGGAGCTTC TTGTTGCCCT GGAGAACCAA	1380
CATACAATTG ATCTAACTGA CTCAGAAATG AACAACTGT TTGAAAAAC AAGGAAGCAA	1440
CTGAGGGAAA ATGCTGAGGA CATGGGCAAT GGTGCTTCA AAATATACCA CAAATGTGAC	1500
AATGCCTGCA TAGGGTCAAT CAGAAATGGA ACTTATGACC ATGATGTATA CAGAGACGAA	1560
GCATTAAACA ACCGGTTCCA GATCAAAGGT GTTGAGCTGA AGTCAGGATA CAAAGATTGG	1620
ATCCTATGGA TTTCCTTTGC CATATCATGC TTTTGTCTT GTGTTGTTTT GCTGGGGTTC	1680
ATCATGTGGG CCTGCCAAAA AGGCAACATT AGGTGCAACA TTGCATTTC AGTGTATTAA	1740
TTAAAAACAC CCTTGTCTCT AGGATGATTC GGTACCAGAT CTTAATTAAT TAA	1793

(1) údaje k SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 570 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15 (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 20 (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Beijing/32/92 rHA

(ix) ZNAKY

- 25 (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence
 (B) POZICE: 1 až 18

(ix) ZNAKY

- 30 (A) NÁZEV/KLÍČ: Zralá rHA
 (B) POZICE: 19 až 552

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

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

```

Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu Asp
130                      135                      140
Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys Lys
145                      150                      155                      160
Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Lys
165                      170                      175
Ser Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Gly
180                      185                      190
Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr Asp
195                      200                      205
Arg Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr Val
210                      215                      220
Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser Arg
225                      230                      235                      240
Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile
245                      250                      255
Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile
260                      265                      270
Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile Met
275                      280                      285
Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Thr Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr Pro
290                      295                      300
Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile
305                      310                      315                      320
Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu
325                      330                      335
Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe
340                      345                      350
Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp
355                      360                      365
Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala
370                      375                      380

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

```

(1) údaje k SEQ ID NO: 8:

5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1 766 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

5 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

10 (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Texas/36/91 rHA

15 (ix) ZNAKY

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

20 (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinového signálního peptidu
(B) POZICE. 19 až 72

25 (ix) ZNAKY

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

30 (ix) ZNAKY

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

35 (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
(B) POZICE. 88 až 93

40 (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
(B) POZICE. 73 až 1 734

45 (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
(B) POZICE. 1 744 až 1749

50 (ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
(B) POZICE. 1750 až 1755

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál

(B) POZICE. 1756 až 1766

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 8:

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

(1) údaje k SEQ ID NO: 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 572 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- 10 (ii) DRUH MOLEKULY: peptid
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) PROTISMYSLNÝ: ne
- 15 (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 20 (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Texas/36/91 rHA

(ix) ZNAKY

- 25 (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová sekvence
 (B) POZICE: 1 až 18

(ix) ZNAKY:

- 30 (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
 (B) POZICE: 19 až 554

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 9:

```

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

```

Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu
 165 170 175
 Thr Glu Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Val Asn
 180 185 190
 Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu Trp Gly Val His His Pro Ser
 195 200 205
 Asn Ile Arg Asp Gln Arg Ala Ile Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val
 210 215 220
 Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala
 225 230 235 240
 Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp
 245 250 255
 Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn
 260 265 270
 Leu Ile Ala Pro Trp Tyr Ala Phe Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser
 275 280 285
 Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Ser Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys
 290 295 300
 Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val
 305 310 315 320
 His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys
 325 330 335
 Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg
 340 345 350
 Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly
 355 360 365
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser
 370 375 380
 Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile
 385 390 395 400
 Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr
 405 410 415

 Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu
 420 425 430
 Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala
 435 440 445
 Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Gly Arg Thr Leu Asp Phe His Asp
 450 455 460
 Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn
 465 470 475 480

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

(1) údaje k SEQ ID NO: 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 1 799 bazických párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Panama/45/90 rHA

20

(ix) ZNAKY

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

25

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K signální peptidové sekvence
 (B) POZICE. 16 až 69

30

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa
 (B) POZICE. 22 až 27

35

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
 (B) POZICE. 70 až 1773

40

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
 (B) POZICE. 1777 až 1782

45

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
 (B) POZICE. 1783 až 1788

50

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
 (B) POZICE. 1 789 až 1 799

55

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 10:

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

(1) údaje k SEQ ID NO: 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 585 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

20

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Panama/45/90 rHA

(ix) ZNAKY

25

- (A) NÁZEV/KLÍČ: HA signální peptid
 (B) POZICE. 1 až 17

(ix) ZNAKY

30

- (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
 (B) POZICE. 18 až 568

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 11:

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

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

 Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln Thr Cys Leu Asp
 500 505 510
 Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe Ser Leu Pro Thr
 515 520 525
 Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn Asp Asp Gly Leu
 530 535 540
 Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu
 545 550 555 560

 Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr Met Val Ser Arg
 565 570 575
 Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
 580 585

(1) údaje k SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 1 811 bazických párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Netherlands/13/94 rHA

20

(ix) ZNAKY

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

25

(ix) ZNAKY

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

30

(ix) ZNAKY

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

35

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
 (B) POZICE. 73 až 1785

40

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restriční místa
 (B) POZICE. 1789 až 1794

45

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restriční místa
 (B) POZICE. 1795 až 1800

50

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
 (B) POZICE. 1801 až 1811

55

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 12:

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

(1) údaje k SEQ ID NO: 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 589 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15 (v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- 20 (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Netherlands/13/94 rHA

(ix) ZNAKY

- 25 (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence
(B) POZICE. 1 až 18

(ix) ZNAKY

- 30 (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
(B) POZICE. 19 až 571

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

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

```

Met Ala Trp Ala Val Pro Arg Asp Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu
      180      185      190
Thr Val Glu Val Pro Tyr Ile Cys Thr Lys Gly Glu Asp Gln Ile Thr
      195      200      205
Val Trp Gly Phe His Ser Asp Asn Lys Thr Gln Met Lys Asn Leu Tyr
      210      215      220

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

Val Asp Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Thr Lys His Lys Cys Asn Gln
      500      505      510
Thr Cys Leu Asp Arg Ile Ala Ala Gly Thr Phe Asn Ala Gly Glu Phe
      515      520      525
Ser Leu Pro Thr Phe Asp Ser Leu Asn Ile Thr Ala Ala Ser Leu Asn
530      535      540

Asp Asp Gly Leu Asp Asn His Thr Ile Leu Leu Tyr Tyr Ser Thr Ala
545      550      555      560
Ala Ser Ser Leu Ala Val Thr Leu Met Ile Ala Ile Phe Ile Val Tyr
      565      570      575
Met Val Ser Arg Asp Asn Val Ser Cys Ser Ile Cys Leu
      580      585

```

5 (1) údaj k SEQ ID NO: 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 10 (A) DĚLKA: 1 557 bazických párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

5 (iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

10 (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Shandong/9/93 rHA

(ix) ZNAKY

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

(ix) ZNAKY

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

(ix) ZNAKY

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

(ix) ZNAKY

30 (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
(B) POZICE. 73 až 1 728

(ix) ZNAKY

35 (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
(B) POZICE. 1 735 až 1 740

(ix) ZNAKY

40 (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
(B) POZICE. 1 741 až 1 746

(ix) ZNAKY

45 (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
(B) POZICE. 1 741 až 1 757

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 14:

TAAAAAACC TATAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAAGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG	120
TGCCTGGGAC ATCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA	180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGTTGGTT CAGAGTTCCT CAACAGGTAG AATATGCGGC	240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAAAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC	300
CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT	360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC	420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAATGAA GACTTCAATT GGACTGGAGT CGCTCAGGAT	480
GGGGGAAGCT ATGCTTGCAA AAGAGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG	540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAAA	600
TTTGACAAAT TGTACATTG GGGGGTTCAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAACCAGC	660
CTATATGTTT GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACTGTA	720
ACCCCGAATA TCGGGTCTAG ACCCTGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AAGCATCTAT	780
TGGACAATAG TAAACCGGG AGACATACTT TTGATTGATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT	960
TTTCAAAATG TAAACAGAAT CACATATGGG GCCTGCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT	1020
CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTGGC	1080
GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC	1140
AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCAGCAGATC TTAAGACAC TCAAGCAGCA	1200
ATCGACCAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAATCGAGA AAACGAACGA GAAATTCAT	1260
CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT	1320
GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AACGCGGAGC TTCTTGTTGC CCTGGAGAAC	1380
CAACATACAA TTGATCTAAC TGAATCAGAA ATGAACAAAC TGTTTGAAAA AACAGGAAG	1440
CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGCT TCAAAATATA CCACAAATGT	1500
GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGAACCTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC	1560
GAAGCATTA ACAAACGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT	1620
TGGATCCTAT GGATTCCTT TGCCATATCA TGCTTTTGC TTTGTGTTGT TTTGCTGGGG	1680
TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTGTCAT TTGAGGTACC	1740
AGATCTTAAT TAATTAA	1757

(I) údaje k SEQ ID NO: 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

5

- (A) DÉLKA: 571 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIE: lineární

10

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) SDRUH FRAGMENTU: fragment N–konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

20

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
- (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Shandong/9/93 rHA

(ix) ZNAKY

25

- (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence
- (B) POZICE. 1 až 18

(ix) ZNAKY

30

- (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
- (B) POZICE. 19 až 553

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

```

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

Asp Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Gly Ser Tyr Ala Cys
145      150      155      160
Lys Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His
165      170      175
Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn
180      185      190
Gly Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr
195      200      205
Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr
210      215      220
Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Thr Pro Asn Ile Gly Ser
225      230      235      240
Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr
245      250      255
Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Asn Leu
260      265      270
Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile
275      280      285
Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Asn Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr
290      295      300
Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg
305      310      315      320
Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
325      330      335
Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile
340      345      350
Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val
355      360      365
Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
370      375      380
Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
385      390      395      400
Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile
405      410      415
Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys
420      425      430

```

Tyr	Val	Glu	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Leu	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu
		435					440					445			
Leu	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	Ser	Glu
	450					455					460				
Met	Asn	Lys	Leu	Phe	Glu	Lys	Thr	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala
465					470					475					480
Glu	Asp	Met	Gly	Asn	Gly	Cys	Phe	Lys	Ile	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn
				485					490					495	
Ala	Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu
		515					520					525			
Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser
	530					535					540				
Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys
545					550					555					560
Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile					
				565					570						

(1) údaje k SEQ ID NO: 16:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1 814 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

10 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

20

(A) ORGANISMUS: chřipkový vir

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Shanghai/4/94 rHA

(ix) ZNAKY

25

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

(B) POZICE. 1 až 18

(ix) ZNAKY

30

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

(B) POZICE. 19 až 72

(ix) ZNAKY

35

(A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restrikční místa

(B) POZICE. 76 až 81

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa

5 (B) POZICE. 82 až 87

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA

10 (B) POZICE. 73 až 1 794

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál

15 (B) POZICE. 1 804 až 1 814

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

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

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

(1) údaje k SEQ ID NO: 17:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 592 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

20

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

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

25

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinový signální peptid
 (B) POZICE. 1 až 18

30

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
 (B) POZICE. 19 až 574

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 17:

```

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

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

```

Cys	Asn	Gln	Thr	Cys	Leu	Asp	Arg	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala		
		515					520					525					
Gly	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Thr	Phe	Asp	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ala	Ala		
		530					535				540						
Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly	Leu	Asp	Asn	His	Thr	Ile	Leu	Leu	Tyr	Tyr		
		545			550					555					560		
Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Met	Ile	Ala	Ile	Phe		
			565						570					575			
Ile	Val	Tyr	Met	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Val	Ser	Cys	Ser	Ile	Cys	Leu		
			580				585						590				

(1) údaje k SEQ ID NO: 18:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1 802 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

10 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

20

(A) ORGANISMUS: chřipkový vir

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

(ix) ZNAKY

25

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

(B) POZICE. 1 až 18

(ix) ZNAKY

30

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast HA signální peptidové sekvence

(B) POZICE. 19 až 69

(ix) ZNAKY

35

(A) NÁZEV/KLÍČ: SmaI restriční místa

(B) POZICE. 22 až 27

(ix) ZNAKY

40

(A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA

(B) POZICE. 70 až 1776

(ix) ZNAKY

45

(A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restriční místa

(B) POZICE. 1780 až 1785

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restriční místa

(B) POZICE. 1786 až 1791

(ix) ZNAKY

(A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál

(B) POZICE. 1792 až 1802

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 18:

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCGGAAG GCAATAATTG TACTACTCAT GGTAGTAACA	60
TCCAACGCAG ATCGAATCTG CACTGGGATA ACATCTTCAA ACTCACCTCA TGTGGTCAAA	120
ACAGCTACTC AAGGGGAAGT CAATGTGACT GGTGTGATAC CACTGACAAC AACACCAACA	180
AAATCTCATT TTGCAATCT AAAAGGAACA AAGACCAGAG GGAAACTATG CCCAACTGT	240
CTCAACTGCA CAGATCTGGA TGTGGCCTTG GGCAGACCAA TGTGTGTGGG GACCACACCT	300
TCGGCAAAAG CTTCAATACT CCACGAAGTC AGACCTGTTA CATCCGGGTG CTTTCCTATA	360
ATGCACGACA GAACAAAAT CAGACAGCTA CCAATCTTC TCAGAGGATA TGAAATATC	420
AGATTATCAA CCCAAACGT TATCAATGCA GAAAAGCAC CAGGAGGACC CTACAGACTT	480
GGAACCTCAG GATCTTGCCC TAACGCTACC AGTAGAAGCG GATTTTTTGC AACATGGCT	540
TGGGCTGTCC CAAGGGACGA CAACAAAACA GCAACGAATC CACTAACAGT AGAAGTACCA	600
TACGTTTGTA CAGAAGGAGA AGACCAAATT ACTGTTTGGG GGTTCCATTC TGATAACAAA	660
GCCCAAATGA AAAACCTCTA TGGAGACTCA AATCCTCAA AGTTCACCTC ATCTGCTAAT	720
GGAGTAACCA CACATTATGT TTCTCAGATT GCGGCTTCC CAGATCAAAC AGAAGACGGA	780
GGGCTACCAC AAAGCGGCAG AATTGTTGTT GATTACATGG TGCAAAAACC TGGGAAAACA	840
GGAACAATTG TCTATCAAAG AGGTGTTTGG TTGCCTCAA AGGTGTGGTG CGCGAGTGGC	900
AGGAGCAAAG TAATAAAAGG GTCCTTGCCT TTAATTGGTG AAGCAGATTG CTTTCAGAA	960
AAATACGGTG GATTAAACAA AAGCAAGCCT TACTACACAG GAGAACATGC AAAAGCCATA	1020
GGAAATTGCC CAATATGGGT GAAAACACCT TTGAAGCTTG CCAATGGAAC CAAATATAGA	1080
CCTCCTGCAA AACTATTAAA GGAAAGGGGT TTCTTCGGAG CTATTGCTGG TTTCTTAGAA	1140
GGAGGATGGG AAGGAATGAT TGCAGGTTGG CACGGATACA CATCTCACGG AGCACATGGA	1200
GTGGCAGTGG CAGCAGACCT TAAGAGTACG CAAGAAGCCA TAAACAAGAT AACAAAAAAT	1260
CTCAATTCTT TGAGTGAGCT AGAAGTAAAG AATCTTCAA GACTAAGTGG TGCCATGGAT	1320
GAACTCCATA ACGAAATACT CGAGCTGGAT GAGAAAGTGG ATGATCTCAG AGCTGACACT	1380
ATAAGCTCGC AAATAGAACT TGCAGTCTTG CTTTCCAACG AAGGAATAAT AAACAGTGAA	1440
GATGAGCATC TATTGGCACT TGAGAGAAAA CTAAAGAAAA TGCTGGGTCC CTCTGCTGTA	1500
GACATAGGGA ATGGATGCTT CGAAACCAA CACAAGTGCA ACCAGACCTG CTTAGACAGG	1560
ATAGCTGCTG GCACCTTTAA TGCAGGAGAA TTTCTCTCC CCACTTTTGA TTTACTGAAT	1620

```

ATTACTGCTG CATCTTTAAA TGATGATGGA TTGGATAATC ATACTATACT GCTCTACTAC 1680
TCAACTGCTG CTTCTAGTTT GGCTGTAACA TTGATGATAG CTATTTTAT TGTTTATATG 1740
GTCTCCAGAG ACAATGTTTC ATGCTCCATC TGTCTGTGAG GTACCAGATC TTAATTAATT 1800
AA 1802

```

(1) údaje k SEQ ID NO: 19:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 586 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 10 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

20

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: B/Harbin/7/94 rHA

25

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: HA signální peptid
 (B) POZICE. 1 až 17

30

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
 (B) POZICE. 18 až 569

35

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

```

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

```

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

(1) údaje k SEQ ID NO: 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 1 757 bazických párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
 (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Johannesburg/33/94 rHA

20

(ix) ZNAKY

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

25

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast AcNPV 61K proteinového signálního peptidu
 (B) POZICE. 19 až 72

30

(ix) ZNAKY

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

35

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: kódující oblast zralé rHA
 (B) POZICE. 73 až 1 731

40

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: KpnI restrikční místa
 (B) POZICE. 1 735 až 1 740

45

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: BglII restrikční místa
 (B) POZICE. 1 741 až 1 747

50

(ix) ZNAKY

- (A) NÁZEV/KLÍČ: univerzální translační terminační signál
 (B) POZICE. 1 747 až 1 757

55

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

TAAAAAAACC TATAAATAAT GCCCTTGTAC AAATTGTTAA ACGTTTTGTG GTTGGTCGCC	60
GTTTCTAACG CGATTCCCGG GCAGGACCTT CCAGGAAATG ACAACAGCAC AGCAACGCTG	120
TGCCTGGGAC ACCATGCAGT GCCAAACGGA ACGCTAGTGA AAACAATCAC GAATGATCAA	180
ATTGAAGTGA CTAATGCTAC TGAGCTGGTT CAGAGTTCCC CAACAGGTAG AATATGCGAC	240
AGTCCTCACC GAATCCTTGA TGGAAAGAAC TGCACACTGA TAGATGCTCT ATTGGGAGAC	300
CCTCATTGTG ATGGCTTCCA AAATAAGGAA TGGGACCTT TTGTTGAACG CAGCAAAGCT	360
TACAGCAACT GTTACCCTTA TGATGTGCCG GATTATGCCT CCCTTAGGTC ACTAGTTGCC	420
TCATCAGGCA CCCTGGAGTT TATCAACGAA AACTTCAATT GGA CTGGAGT CGCTCAGGAT	480
GGGAAAAGCT ATGCTTGCAA AAGGGGATCT GTTAACAGTT TCTTTAGTAG ATTGAATTGG	540
TTGCACAAAT TAGAATACAA ATATCCAGCG CTGAACGTGA CTATGCCAAA CAATGGCAA	600
TTTGACAAAT TGTACATTG GGGGGTTTAC CACCCGAGCA CGGACAGTGA CCAAACCAGC	660
CTATATGTCC GAGCATCAGG GAGAGTCACA GTCTCTACCA AAAGAAGCCA ACAAACTGTA	720
ATCCCGGATA TCGGGTATAG ACCATGGGTA AGGGGTCAGT CCAGTAGAAT AGGCATCTAT	780
TGGACAATAG TAAACCGGG AGACATACTT TTGATTATA GCACAGGGAA TCTAATTGCT	840
CCTCGGGGTT ACTTCAAAAT ACGAAATGGG AAAAGCTCAA TAATGAGGTC AGATGCACCC	900
ATTGGCAACT GCAGTTCTGA ATGCATCACT CCAAATGGAA GCATTCCCAA TGACAAACCT	960
TTTCAAAATG TAAACAGGAT CACATATGGG GCCTGCCCA GATATGTTAA GCAAAACACT	1020
CTGAAATTGG CAACAGGGAT GCGGAATGTA CCAGAGAAAC AACTAGAGG CATATTGGC	1080
GCAATCGCAG GTTTCATAGA AAATGGTTGG GAGGGAATGG TAGACGGTTG GTACGGTTTC	1140
AGGCATCAAA ATTCTGAGGG CACAGGACAA GCTGCAGATC TAAAAGCAC TCAAGCAGCA	1200
ATCGACAAA TCAACGGGAA ACTGAATAGG TTAGTCGAGA AAACGAACGA GAAATCCAT	1260
CAAATCGAAA AAGAATTCTC AGAAGTAGAA GGGAGAATTC AGGACCTCGA GAAATATGTT	1320
GAAGACACTA AAATAGATCT CTGGTCTTAC AATGCGGAGC TTCTTGTGTC TCTGGAGAAC	1380
CAACATACAA TTGATCTAAC TGA CTGAGAA ATGAACAAAC TGT TTGAAAG AACAAGGAAG	1440
CAACTGAGGG AAAATGCTGA GGACATGGGC AATGGTTGTT TCAAAATATA CCACAAATGT	1500
GACAATGCCT GCATAGGGTC AATCAGAAAT GGA ACTTATG ACCATGATGT ATACAGAGAC	1560
GAAGCATTAA ACAACCGGTT CCAGATCAAA GGTGTTGAGC TGAAGTCAGG ATACAAAGAT	1620
TGGATTCTAT GGATTTCTT TGCCATATCA TGCTTTTTCG TTTGTGTTGT TTTGCTTGGG	1680
TTCATCATGT GGGCCTGCCA AAAAGGCAAC ATTAGGTGCA ACATTTGCAT TTGAGGTACC	1740
AGATCTTAAT TAATTAA	1757

(1) údaje k SEQ ID NO: 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 571 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) PROTISMYSLNÝ: ne

15

(v) DRUH FRAGMENTU: fragment N-konce

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

20

- (A) ORGANISMUS: chřipkový vir
(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: A/Johannesburg/33/94 rHA

(ix) ZNAKY

25

- (A) NÁZEV/KLÍČ: AcNPV 61K proteinová signální sekvence
(B) POZICE. 1 až 18

(ix) ZNAKY

30

- (A) NÁZEV/KLÍČ: zralá rHA
(B) POZICE. 19 až 569

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

```

Met Pro Leu Tyr Lys Leu Leu Asn Val Leu Trp Leu Val Ala Val Ser
1      5      10      15
Asn Ala Ile Pro Gly Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala
20      25      30
Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Leu Val Lys
35      40      45
Thr Ile Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val
50      55      60
Gln Ser Ser Pro Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Arg Ile Leu
65      70      75      80
Asp Gly Lys Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His
85      90      95
Cys Asp Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser
100      105      110
Lys Ala Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
115      120      125
Leu Arg Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Ile Asn Glu
130      135      140
Asn Phe Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asp Gly Lys Ser Tyr Ala Cys
145      150      155      160
Lys Arg Gly Ser Val Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His
165      170      175
Lys Leu Glu Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn
180      185      190
Gly Lys Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Ser Thr
195      200      205
Asp Ser Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Val Arg Ala Ser Gly Arg Val Thr
210      215      220
Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asp Ile Gly Tyr
225      230      235      240
Arg Pro Trp Val Arg Gly Gln Ser Ser Arg Ile Gly Ile Tyr Trp Thr
245      250      255
Ile Val Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu
260      265      270
Ile Ala Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Asn Gly Lys Ser Ser Ile
275      280      285
Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Asn Cys Ser Ser Glu Cys Ile Thr
290      295      300
Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg
305      310      315      320
Ile Thr Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys
325      330      335
Leu Ala Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile
340      345      350
Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val
355      360      365
Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
370      375      380
Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly
385      390      395      400
Lys Leu Asn Arg Leu Val Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile
405      410      415
Glu Lys Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys
420      425      430
Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu
435      440      445
Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu
450      455      460
Met Asn Lys Leu Phe Glu Arg Thr Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala
465      470      475      480
Glu Asp Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn
485      490      495

```

Ala	Cys	Ile	Gly	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asp	His	Asp	Val	Tyr
			500					505					510		
Arg	Asp	Glu	Ala	Leu	Asn	Asn	Arg	Phe	Gln	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Leu
		515					520					525			
Lys	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Trp	Ile	Leu	Trp	Ile	Ser	Phe	Ala	Ile	Ser
		530				535					540				
Cys	Phe	Leu	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Ile	Met	Trp	Ala	Cys
545					550					555					560
Gln	Lys	Gly	Asn	Ile	Arg	Cys	Asn	Ile	Cys	Ile					
				565					570						

(1) údaje k SEQ ID NO: 22:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 39 bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

10 (D) TOPOLOGIE: lineární

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

TGGTTGGTCG CCGTTTCTAA CGCGATTCCC GGGGGTACC

39

15 (1) údaje k SEQ ID NO: 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 13 aminokyselinaminokyselina kyselina

20 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

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

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

1

5

10

25

(1) údaje k SEQ ID NO: 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

30 (A) DÉLKA: 43 bazických párů

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

35 (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 24:

TGGTTAGTCG CCGTGTCCTG CAGGCCAGAG AGGCCTTGGT ACC

43

(1) údaje k SEQ ID NO: 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 18 bazických párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 25:

GTCGCCGTGT CCAACGCG 18

(1) údaje k SEQ ID NO: 26:

15 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 bazických párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 20 (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 26:

TAATTGGCCA GAGAGGCC 18

25 (1) údaje k SEQ ID NO: 27:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

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

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 27:

35 GGGGGATCCG GTACCAGCAA AAGCAGGGGA TAATTCTAT 39

(1) údaje k SEQ ID NO: 28:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 40 (A) DÉLKA: 38 bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

45 (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 28:

GGGGGTACCC CCGGGGACTT TCCAGGAAAT GACAACAG 38

(1) údaje k SEQ ID NO: 29:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 44 bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 29:

CCCGGTACCG AATCATCCTA GAAACAAGGG TGTTTTAAAT TAAT

44

(1) údaje k SEQ ID NO: 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 47 bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 30:

GGGGAATTCG GTACCCCCCG GAAGGCAATA ATTGTACTAC TCATGGT

47

(1) údaje k SEQ ID NO: 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 36 bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 31:

GGTACCCCCG GGGATCGAAT CTGCACTGGG ATAACA

36

(1) údaje k SEQ ID NO: 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 50 bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) DRUH ŘETĚZCE: jednoduchý
(D) TOPOLOGIE: lineární

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

GGGGAATTCG GATCCGGTAC CTCACAGACA GATGGARCAA GAAACATTGT

50

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein exprimovaný v bakulovirovém expresním systému v kultivovaných hmyzích buňkách, který je purifikovaný do 95% nebo vyšší čistoty, je imunogenní a indukuje ochrannou imunitní odezvu při použití jako vakcína.
- 10 2. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 1, který dále zahrnuje bakulovirový signální peptid, který se váže přímo na HAO protein bez intervenujících aminokyselin.
3. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 1, který je dále sdružen s farmaceuticky přijatelným nosičem pro podání ve formě vakcíny.
- 15 4. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 1, který je dále sdružen s adjuvans a farmaceuticky přijatelným nosičem pro podání ve formě vakcíny.
- 20 5. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 3, kde farmaceuticky přijatelným nosičem je polymerní systém pro dopravu proteinu.
- 25 6. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 1, kde se chřipkový HAO hemaglutininový protein zvolí z množiny zahrnující kmeny chřipky A a kmeny chřipky B.
- 30 7. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 6, kde virový kmen chřipky infikuje lidi.
8. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 1, který je dále sloučen s druhým proteinem, který se váže na hemaglutinin.
- 35 9. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný chřipkový HAO hemaglutininový protein podle nároku 8, kde je druhý protein zvolen z množiny zahrnující virové proteiny hepatitidy B, HIV-proteiny, karcinoembryonální antigen a neuraminidasy.
- 40 10. Vektor pro výrobu proteinu rekombinantního chřipkového HAO hemaglutininového proteinu podle nároku 1, obsahujícího následující 5' → 3' sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, signální peptid, sekvence kódující zralý hemaglutinin z chřipkového kmene, translační terminační kodon a polyhedrinový RNA polyadenylační signál.
- 45 11. Vektor podle nároku 10, kde je signálním peptidem bakulovirový protein mající molekulovou hmotnost okolo 61 kDa a aminokyselinovou sekvenci tvořenou prvními 18 aminokyselinami sekvence ID No. 7.
- 50 12. Vektor podle nároku 10, kde je signálním peptidem chřipkový hemaglutininový proteinový promotor.
13. Vektor podle nároku 10, kde sekvence kódující signální peptid a hemaglutinin nekódují žádnou intervenující aminokyselinu.

14. Vektor podle nároku 10, který dále zahrnuje sekvenci kódující druhý protein, který se expri-
muje jako fúzní protein s hemaglutininem.

15. Vektor podle nároku 10, který je transfekován v kultivovaných hmyzích buňkách.

16. Způsob výroby rekombinantního chřipkového hemaglutininového proteinu podle nároku 1,
v y z n a ě n ý t í m , že se kultivované hmyzí buňky infikují vektorem obsahujícím 5'→3'
sekvence: polyhedrinový promotor z bakuloviru, ATG translační startovací kodon, signální
peptid, sekvence kódující hemaglutinin z chřipkového kmene zvoleného ze skupiny zahrnující
chřipkové kmeny A a chřipkové kmeny B, translační terminační kodon a polyhedrinový RNA
polyadenylační signál, a buňky se následně kultivují v živném prostředí a protein se izoluje
z hmyzích buněk.

17. Způsob podle nároku 16, v y z n a ě n ý t í m , že se HAO chřipkový hemaglutininový
protein izoluje z hmyzích buněk v alespoň 95% čistotě.

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

19. Způsob podle nároku 16, v y z n a ě n ý t í m , že se vektor připraví tak, že se vir sklídí
z buněčného média a v případě chřipkových kmenů A se izoluje virová RNA, nebo v případě
chřipkových kmenů B se izoluje mRNA; cDNA se syntetizuje za použití univerzálního primeru
(5'-AGCAAAAGCAGG-3' (SEQ ID No. 1)) pro virovou RNA z chřipkových kmenů A nebo se
z chřipkových kmenů B syntetizuje nahodilý primer tvořící mRNA, přičemž primery 5' a 3' mají
na koncích, které se nenalézají uvnitř hemaglutininových genů, restrikční enzymová místa; chřip-
kové A nebo B primery a chřipková cDNA smíšená se segmenty hemaglutininového genu se
amplifikují za vzniku dvouřetězcových DNA fragmentů obsahujících celé sekvence kódující
zralý hemaglutinin; identifikuje se signální peptid hemaglutininových genů, načež se amplifikují
hemaglutininové geny bez signálního peptidu; a klonují do vektoru obsahujícího AcNPV poly-
hedrinový promotor.

20. Způsob podle nároku 19, v y z n a ě n ý t í m , že se hemaglutininové geny klonují za
použití PCR tak, že vektor kóduje signální peptid navázaný přímo na hemaglutinin bez interve-
nujících aminokyselin.

21. Způsob podle nároku 19, v y z n a ě n ý t í m , že se vektor transfekuje do hmyzích
buněk a vyberou se buňky pro hemaglutininovou expresi.

22. Vakcína, v y z n a ě n á t í m , že obsahuje zralý glykosylovaný hemaglutininový protein
podle nároku 2 a farmaceuticky přijatelný nosič.

23. Vakcína podle nároku 22, v y z n a ě n á t í m , že dále obsahuje adjuvans.

24. Vakcína podle nároku 22, v y z n a ě n á t í m , že farmaceuticky přijatelným nosičem je
polymerní transportní systém.

25. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný hemaglutininový protein podle náro-
ku 8 z viru influenzy zvolené ze skupiny zahrnující chřipkové kmeny A a chřipkové kmeny B.

26. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný hemaglutininový protein podle náro-
ku 25 z viru infikujícího lidi.

27. Vakcína, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje zralý glykosylovaný hemagglutininový protein podle nároku 8 a farmaceuticky přijatelný nosič.

5 28. Vakcína podle nároku 17, **v y z n a ě n á t í m**, že v jejím zralém hemagglutininovém proteinu je druhým proteinem neuraminidáza.

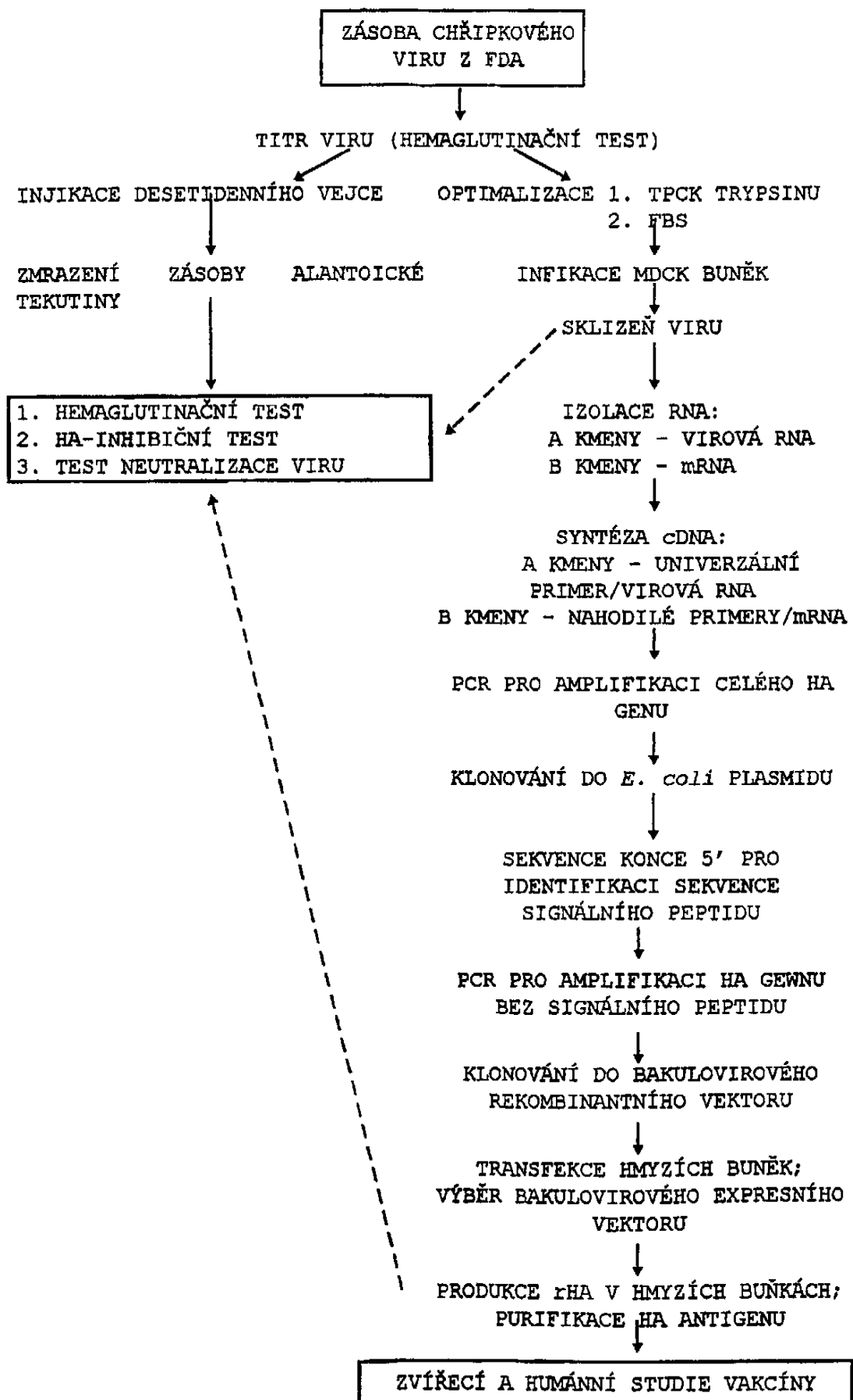
29. Vakcína podle nároku 28, **v y z n a ě n á t í m**, že dále obsahuje adjuvans.

10 30. V podstatě čistý, rekombinantní, zralý, glykosylovaný hemagglutininový protein podle nároku 8, ve kterém je druhým proteinem neuraminidáza.

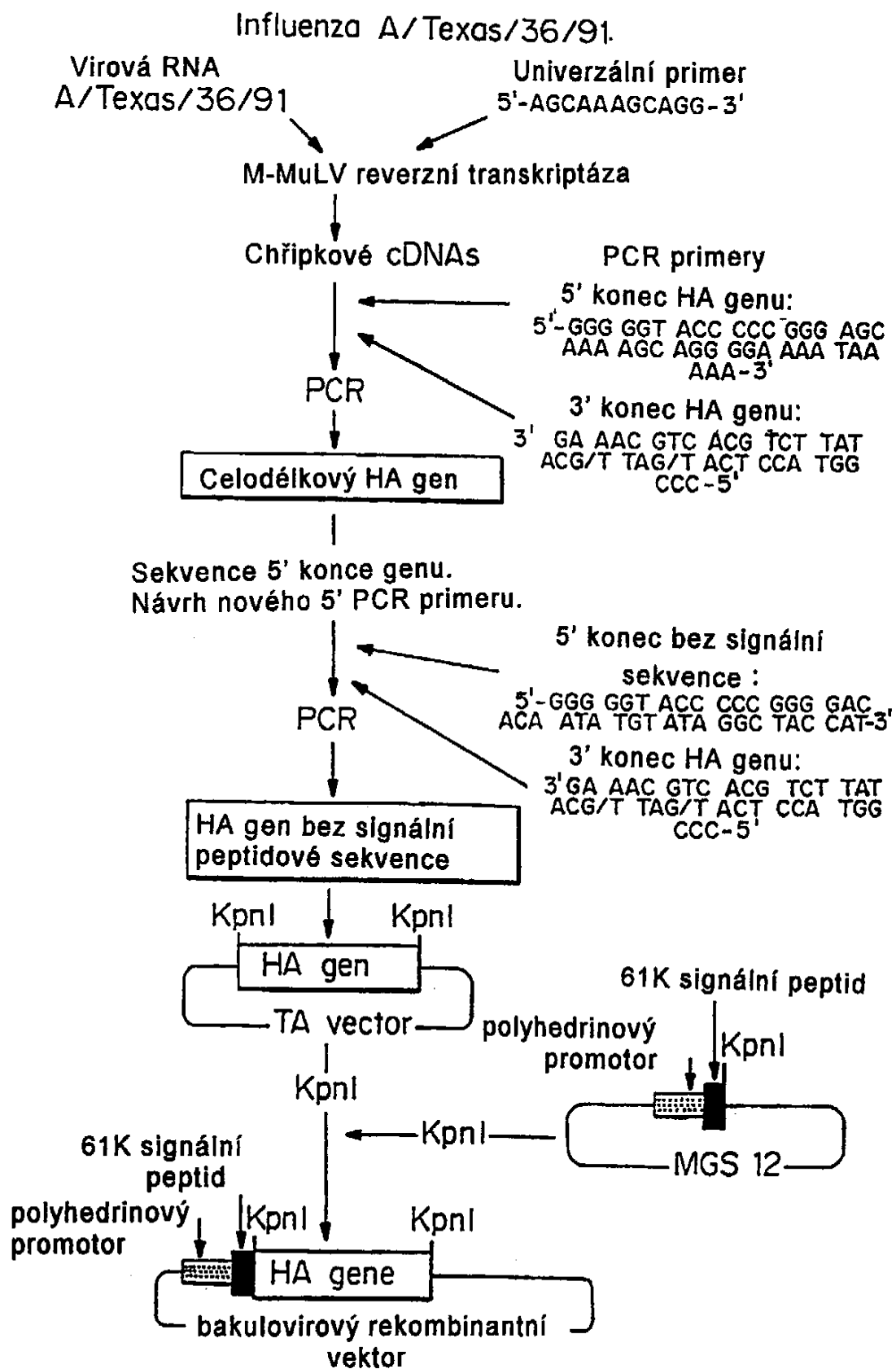
15

5 výkresů

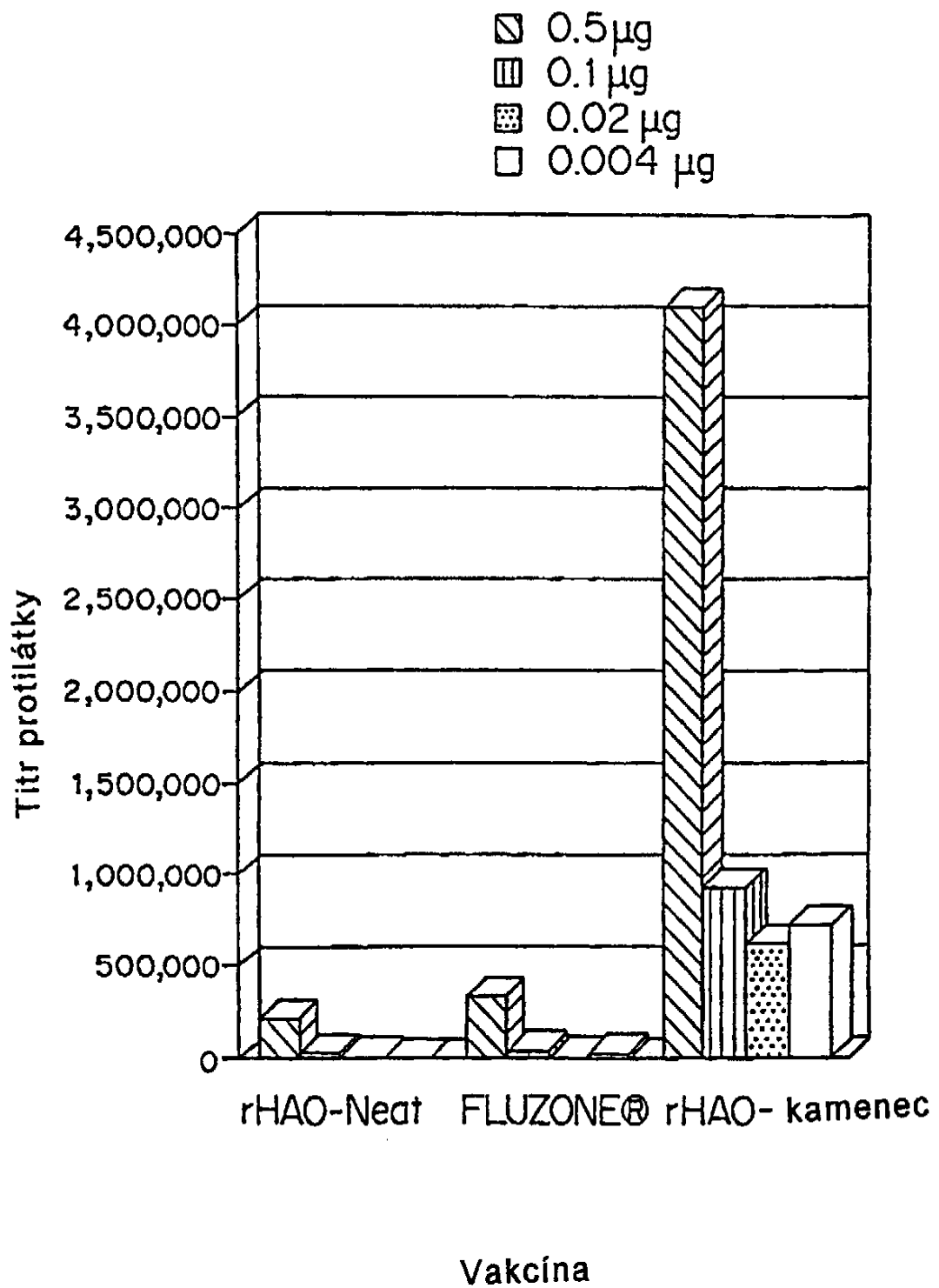
OBR. 1



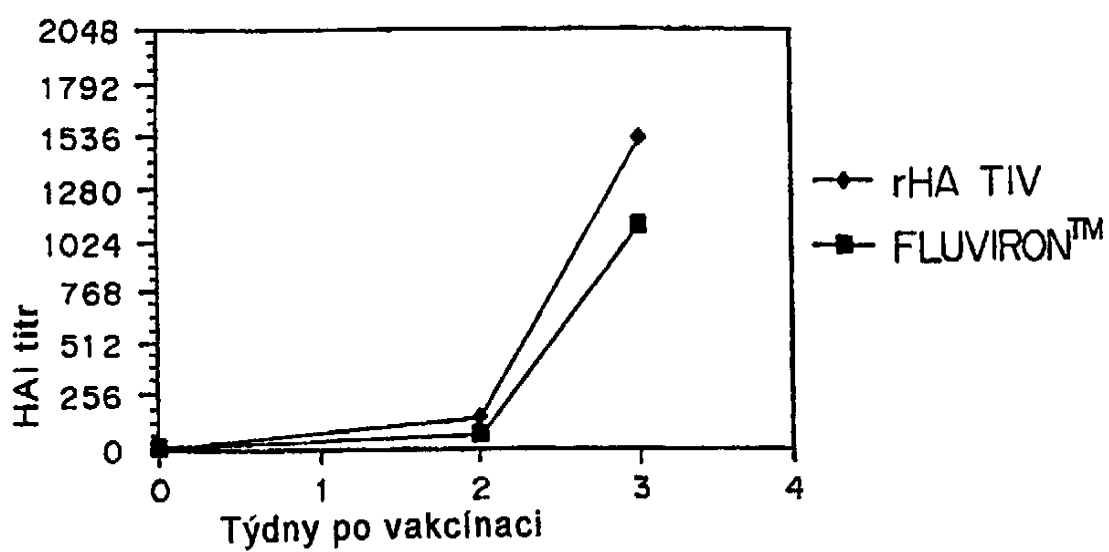
OBR. 2



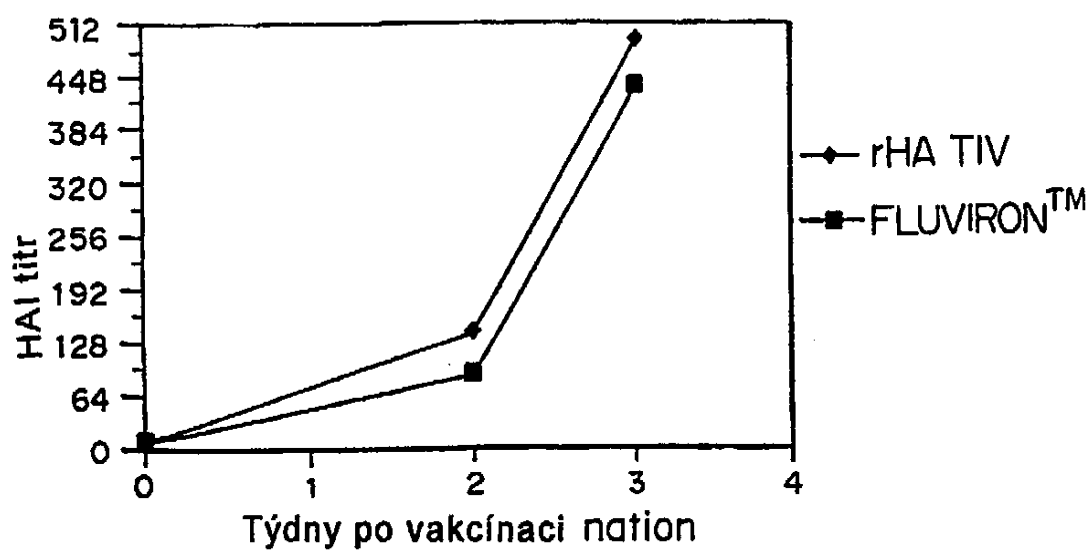
OBR. 3



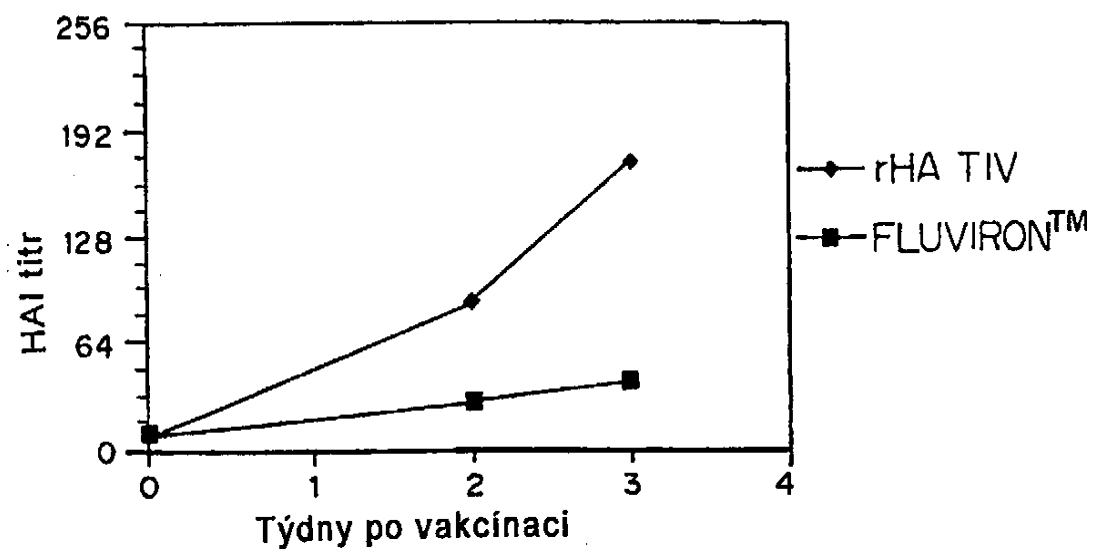
OBR: 4a



OBR: 4b



OBR. 4c



Konec dokumentu
