

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1571

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.09.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.09.2000 04.09.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0052055 2001/0054005**

(33) Země priority: **KR KR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.09.2002**
(Věstník č. 9/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/KR01/01492**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/20040**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/00

A 61 P 3/04

(71) Přihlašovatel:

KIM Hyo-Joon, Ansan, KR;

(72) Původce:

**Kim Hyo-Joon, Ansan, KR;
Joung Hae-Jung, Seoul, KR;**

(74) Zástupce:

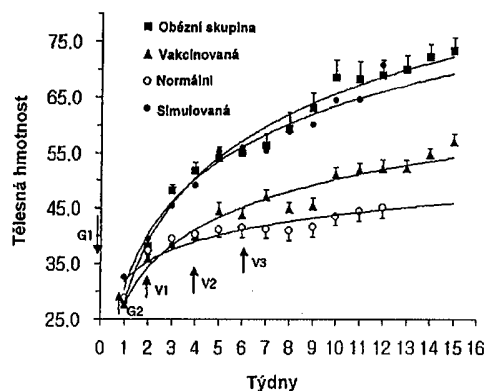
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Mimetické peptidy k epitopu apolipoproteinu B-110, jejich konkatemer a modifikované peptidy, a vakcinační přípravek, který je obsahuje

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká vakcinačního přípravku k léčení obezity. Zejména se předkládané řešení týká vakcinačního přípravku, který obsahuje mimetický peptidový epitop apolipoproteinu B-110, jeho konkatemery a jeho modifikované peptidy.



CZ 2002 - 1571 A3

20.05.02

PV 2002-1541

46545

180 632/HK

- 1 -

Mimetické peptidy k epitopu apolipoproteinu B-110, jejich konkatemer a modifikované peptidy, a vakcinační přípravek, který je obsahuje

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká vakcinačního přípravku k léčení obezity. Zejména se předkládaný vynález týká vakcinačního přípravku, který obsahuje mimetický peptidový epitop apolipoproteinu B-110, jeho konkatemery a jeho modifikované peptidy.

Dosavadní stav techniky

Lipid krevního séra se skládá z cholesterolu, triglyceridů (TG), volných mastných kyselin, fosfolipidů a dalších a existuje v krevním oběhu ve formě lipoproteinu, který je komplexem lipidu a apolipoproteinu.

Z těchto lipoproteinů, lipoprotein s nízkou hustotou (LDL, „low density lipoprotein“) je významný nosič pro TG a cholesterol. Počet pacientů trpících arteriosklerózou, onemocněním koronárních cév nebo infarktem myokardu, kdy příčinou je zvýšená hladina cholesterolu v krvi, se značně zvýšil díky změně stravovacích zvyklostí a jiným faktorům.

Proto byly uskutečněny různé výzkumy, které by ukázaly možnosti snížení hladiny LDL-cholesterolu a prokázaly příčiny výše zmíněných nemocí, aby bylo možné pacienty trpící takovými nemocemi léčit.

LDL-cholesterol, významný etiologický faktor onemocnění dospělých souvisejících s metabolismem lipidů, může být makrofágy konvertován na formu lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL, „high density lipoprotein“). Kromě toho LDL-cholesterol může být také konvertován jiné látky nebo může být konvertován na formu žlučové kyseliny v játrech (Brown, M.S. a Goldstein, J.L., 1983, Annu. Rev. Biochem., 52:223-261).

Apolipoprotein B-100 je významná proteinová složka LDL a vyskytuje se také v lipoproteinu s velmi nízkou hustotou (VLDL, „very low density lipoprotein“) a v chylomikronu. LDL-cholesterol v krvi může být odstraněn pomocí fagocytózy makrofágy v případě, že je protilátka v krevním oběhu indukovaná rozpoznáním apolipoproteinu B-100, jelikož apolipoprotein B-100 vede k tomu, že se LDL částice naváží na LDL-receptory exponované na povrchu buňky (Dalum I., et al., 1997, Mol. Immunol., 34(16-17): 1113-20).

V případě, že se makromolekula jako protilátka naváže na apolipoprotein B-100, který se vyskytuje na povrchu LDL, lipáza, jako je např. lipoproteinlipáza, nemůže hydrolyzovat TG a pod. kvůli stérické zábraně způsobené vazbou makromolekuly na apolipoprotein B-100. V důsledku toho může být tvorba mastných kyselin, významný faktor obezity, inhibovaná prostřednictvím protilátky, která se může vázat na apolipoprotein B-100.

V současné době probíhá řada výzkumů týkajících se snižování hladiny LDL-cholesterolu a možnosti zabránění propuknutí arteriosklerózy pomocí vakcíny na různých zvířecích modelech jako je myš a králík. Například C.R. Alving ukázal, že cholesterol se může modifikovat metabolity nebo jeho oxidací, a že modifikovaný cholesterol může být v některých případech silnou antigenní determinantou (Alving, C.R., et

al., 1989, *Biochem. Soc. Trans.*, 17(4): 637-9; Alving, C.R., et al., 1996, *J. Lab. Clin. Med.*, 127: 40-49; Alving, C.R., et al., 1996, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 210: 181-6).

Kromě toho se uvádí, že se v krevním séru vyskytuje endogenní protilátka k cholesterolu (Wu, J.T., L.L., 1997, *Clin. Lab. Med.*, 17(3): 595-604, Review). Také se uvádí, že v experimentu, kde se u králíka indukovala arterioskleróza a hypercholesterolémie krmením stravou obsahující cholesterol, výskyt hypercholesterolémie a arteriosklerózy u králíka imunizovaného injikováním lipozómů obsahujících cholesterol je potlačen nebo významně snížen ve srovnání s kontrolní skupinou.

Taková protilátka, která je indukovaná cholesterolovou vakcínou je imunoglobulin M (IgM), který se váže na VLDL, na lipoprotein se střední hustotou (IDL, „intermediate density lipoprotein“) a na LDL. Vzhledem k tomu, co bylo již zmíněno výše, se předpokládá, že vakcína k léčení nebo prevenci hyperlipoidémie nebo arteriosklerózy, způsobené vysokou hladinou cholesterolu, bude možná (Bailey, J.M., 1994, *Science*, 264: 1067-1068; Palinksi, W. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(3): 821-5; Wu, k. et al., 1999, *Hypertension*, 33(1): 53-9).

Původci předkládaného vynálezu zjistili, že obezitě je možno účinně předcházet pomocí mimetického peptidového epitopu apolipoproteinu B-100 a na základě výše uvedených skutečností vyvinuli vakcinační přípravek vhodný k léčení obezity.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je mimetický peptid k epitopu apolipoproteinu B-100, jeho konkatermer a také modifikované formy tohoto peptidu.

Dalším předmětem vynálezu je způsob přípravy mimetického peptidu k epitopu apolipoproteinu B-100, jeho konkatermeru a jeho modifikovaných peptidů.

Ještě dalším předmětem vynálezu vakcinační přípravek vhodný k léčení nebo prevenci obezity, který obsahuje výše uvedený mimetický peptid k epitopu apolipoproteinu B-100, jeho konkatermer nebo jeho modifikované peptidy.

Cíle předkládaného vynálezu bylo dosaženo tím, že byl připraven mimetický peptid k epitopu apolipoproteinu B-100, jeho konkatermer a jeho modifikované peptidy.

Ve vynálezu byl pro screening epitopu humánního apolipoproteinu B-100 vázaného na monoklonální protilátku (MabB23) použit systém fágových peptidových knihoven. Peptidy podrobené screeningu byly mimetické peptidy strukturně podobné antigenní determinantě, která je rozpoznávána protilátkou, a tyto mimetické peptidy byly syntetizovány na základě aminokyselinové sekvence screenovaného peptidu.

Systém peptidové knihovny je metoda vhodná k vyhledávání trojrozměrné formy antigenní determinanty. Při této metodě jsou DNA fragmenty, které kódují náhodně sekvencované peptidy, vloženy do DNA kódující malý obalový protein fága a potom se tyto DNA vloží do čtecího rámce (RF) DNA a transformují se do *E. coli*, aby se mohly exprimovat. Peptidy exprimované na povrchu *E. coli* reagují s antigenem, a je tak možné provádět

screening peptidů strukturně podobných antigenní determinantě.

S cílem připravit antisérum byly imunizovány myši podáním výše popsaných mimetických peptidů. Potvrdilo se, že antisérum takto získané rozpoznává současně původní apolipoprotein B-100, mimetické peptidy a LDL (Identification of Antigenic Determinants for the Murine Monoclonal Antibodies Against Apolipoprotein A-1 a Apolipoprotein B-100 by using Phage-displayed Random Peptide Library, Chi-Hoon Kim, Hanyang Univ., 1997).

Mimetický peptid k epitopu apolipoproteinu B-100 podle předkládaného vynálezu může být vybrán z peptidů majících sekvence uvedené v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 1, SEKVENCE ID. Č. 2, SEKVENCE ID. Č. 3 nebo jejich směsí.

Mimetické peptidy podle předkládaného vynálezu se mohou použít ve formě konkateru, aby se zlepšila jejich antigenní determinanta. V dalším provedení předkládaného vynálezu se mohou dva nebo více mimetických peptidů navzájem spojit. Výhodný je konkater složený ze třech (3) až patnácti (15) peptidů. Výhodnější konkater podle vynálezu vynálezu obsahuje čtyři (4) peptidy mající sekvenci uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 1.

Termín „konkater“ mimetického peptidu podle předkládaného vynálezu označuje polymer, kde jsou konce mimetických peptidů navzájem spojené.

Termín „modifikovaný peptid“ mimetického peptidu podle předkládaného vynálezu zahrnuje varianty mimetických peptidů, které jsou rozpoznávány monoklonální protilátkou nebo polyklonální protilátkou proti apolipoprotein B-100. Varianty obsahují substituce, delece, adice a chemické substituce jedné

nebo více aminokyselin z mimetického peptidu podle předkládaného vynálezu.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je způsob přípravy mimetického peptidu, jeho konkatemeru a jeho modifikovaných peptidů, který zahrnuje: i) krok, kdy se vloží DNA kódující mimetický peptid, jeho konkatemer a jeho modifikované peptidy do vektoru, ii) krok, kdy se vektorem transformují hostitelské buňky a potom se inkubují, a iii) krok, kdy se mimetický peptid, jeho konkatemer a jeho modifikované peptidy izolují z hostitelských buněk.

Vakcinační přípravek podle předkládaného vynálezu může být formulován jakýmkoliv konvenčním způsobem užitím mimetického peptidu, jeho konkatemeru nebo jeho modifikovaných peptidů podle vynálezu. Podle vynálezu jsou výhodné takové přípravky, kde je aktivní složka, rozpuštěná v nebo smíchaná s imunologickým adjuvans, léčivem zesilujícím imunitu, nosičem, excipientem a ředidlem, které jsou formulovány do lékové formy vybrané ze skupiny obsahující tabletu, pilulku, granule, prášek, oplatku, suspenzi, emulzi, kapalný přípravek, sirup, aerosol, měkkou nebo tvrdou želatinovou tobolku, sterilní tekutinu vhodnou po injekce, sterilní prášek atd.

Imunologické adjuvans, které je vhodné pro použití v přípravku podle předkládaného vynálezu, je např. určitý druh proteinů obsahujících epitop T lymfocytu (například povrchový protein viru hepatitidy B), inertní nosič jako jsou soli hliníku, bentonit, latex, akrylátové částice a pod.; hydrofóbní antigen (např. lipid), emulze voda-olej nebo olej-voda, složka vhodná pro formulaci depotního přípravku (např. polysacharid), aktivátor T lymfocytů jako je PPD, polyadenin, polyuracil a pod.; aktivátor B lymfocytů (např. mitogen B

lymfocytů), surfaktant jako je saponin, lyzolecitin, retinal, „quil A“, lipozóm a další, látka na zesílení aktivity makrofágů; a aktivátory komplementu alternativní biochemické dráhy jako je inulin, zymozan, endotozin, lebamisol, *C. parvum* a další.

Termín „nosič proteinu“ podle předkládaného vynálezu znamená farmaceuticky přijatelnou látku, jako je protein nebo sůl hliníku, které mohou transportovat mimetický peptid, jeho konkatemer a jeho modifikované peptidy podle předkládaného vynálezu v krevním oběhu.

Soli hliníku, fenoxetyletanol, voda, fyziologický roztok, laktóza, dextróza, sacharóza, sorbitol, manitol, křemičitan vápenatý, celulóza, methylcelulóza, amorfni celulóza, polyvinylpyrolidon, methylhydroxybenzoát, propylhydroxybenzoát, mastek, stearan horečnatý a minerální oleje se mohou použít jako vhodné nosiče, excipienty nebo rozpouštědla v přípravcích podle předkládaného vynálezu.

Kromě toho přípravek podle předkládaného vynálezu může navíc obsahovat plnidla, protispékavá činidla, lubrikanty, zvlhčovače, parfémující přísady, emulgátor a antiseptická činidla.

Přípravek podle předkládaného vynálezu může být formulován obvyklými způsoby, které jsou odborníkům známy, pro indukci imunitní reakce u savce prostřednictvím jednoho nebo více očkování.

Vakcinační přípravek podle předkládaného vynálezu k léčení obezity může být podáván různými způsoby, např. perorálně, topicky na kůži, intradermálně, intravenózně nebo intramuskulárně, přičemž výhodné je intradermální způsob podávání.

Účinná dávka vakcinačního přípravku podle předkládaného vynálezu je 0,1 až 10 μg (aktivního peptidu) na kilogram tělesné hmotnosti, výhodně 0,5 až 1,0 μg na 1 kg. Avšak konkrétní dávka účinné složky vakcinačního přípravku se určí v závislosti na více faktorech., jako je stav imunity, způsob podání, stav pacienta, věk, pohlaví, tělesná hmotnost a pod.. Proto zde uvedený příklad dávky nijak neomezuje rozsah předkládaného vynálezu.

Primárním farmaceutickým účinkem vakcinačního přípravku podle předkládaného vynálezu je prevence a léčba obezity prostřednictvím mechanismu, kdy se humánní protilátka indukovaná mimetickým peptidem, jeho konkatemerem a jeho modifikovanými peptidy, váže k epitopu apolipoproteinu B-100 na povrchu LDL, a tím stéricky zabraňuje a tak inhibuje činnost lipázy, a tudíž brání tvorbě mastných kyselin, což je významný etiologický faktor obezity.

Navíc má vakcinační přípravek podle předkládaného vynálezu také účinek na potlačení hyperlipidémie prostřednictvím mechanismu, kde je LDL detekován a odstraněn makrofágem, a sice prostřednictvím opsonizace, způsobené humánní protilátkou indukovanou mimetickým peptidem, jeho konkatemerem a jeho modifikovanými peptidy, navázanou na epitop apolipoproteinu B-100 na povrchu LDL.

Dalším farmaceutickým účinkem přípravku podle předkládaného vynálezu je prevence a léčba obezity tím, že se inhibuje akumulace lipidů, jako je cholesterol, nebo volných mastných kyselin v buňce prostřednictvím mechanismu, kdy se humánní protilátka indukovaná mimetickým peptidem, jeho konkatemerem a jeho modifikovanými peptidy podle vynálezu, váže k epitopu apolipoproteinu B-100 na povrchu LDL a tím

brání tomu, aby se LDL specificky vázal na LDL receptor exponovaný na buněčném povrchu.

Popis obrázků

Předmět vynálezu výše popsany a další výhody vynálezu budou dále podrobněji vysvětleny pomocí podrobného popisu příkladů výhodných provedení vynálezu s odkazem na připojené výkresy, kde jsou následující obrázky:

Obrázky 1a až 1d představují strukturu a složení vektoru pro expresi mimetického peptidu podle předkládaného vynálezu. Obr. 1a představuje strukturu vedoucí kazety, obr. 1b představuje strukturu LB kazety, obr. 1c představuje strukturu BL kazety a obr. 1d představuje strukturu expresního vektoru pBX4.

Obrázek 2 představuje způsoby přípravy vektorů pBX1 a pBX4 pro expresi mimetického peptidu podle předkládaného vynálezu.

Obrázek 3 představuje výsledek elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (PAGE) pro identifikaci LB kazety.

Obrázek 4 představuje výsledek PAGE pro identifikaci BL kazety vložené do plazmidu pBlue-BL.

Obrázek 5 představuje výsledek PAGE pro potvrzení směru a počtu kopií DNA vložených do plazmidu pBX1 a pBX3.

Obrázek 6 představuje výsledek „western blottingu“ pro identifikaci exprimovaného peptidu PB1₄.

Obrázek 7 představuje výsledek SDS PAGE (s dodecylsulfátem sodným) pro potvrzení purifikovaného peptidu PB1₄.

Obrázek 8 představuje výsledek „western blottingu“ pro potvrzení reaktivity purifikovaného peptidu PB1₄ proti séru anti-PB1₄.

Obrázek 9 představuje výsledek ELISA testu pro měření avidity myší protilátky indukované peptidem PB1₄.

Obrázek 10 je graf, který ilustruje supresivní účinek PB1₄ na zvyšování tělesné hmotnosti myší.

Obrázky 11a a 11b jsou grafy ilustrující změnu tělesné hmotnosti myší v závislosti na podávání PB1₄ vakcíny podle předkládaného vynálezu po 20 týdnech od aplikace injekce léčiva, které vede k destrukci hypotalamu.

Obrázek 12 je graf, který představuje účinek injekce PB1₄ vakcíny na koncentraci lipidů v krevním séru.

Příklady provedení vynálezu

Následně bude předkládaný vynález popsán podrobněji pomocí příkladů. Příklady jsou určeny jen pro ilustraci a vysvětlení a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklad 1

Syntéza a nasednutí („annealing“) oligonukleotidů

Oligonukleotidy byly chemicky syntetizovány firmou Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, CA, USA) podle sekvence požadované původcem vynálezu. Pro fosforylaci 5'-konce oligonukleotidů se 50 μ l roztoku oligonukleotidu o koncentraci 100 pmol/ μ l inkubovalo s 10 μ l 10mM ATP, 3 μ l 10U/ μ l T4

polynukleotidkinázy (Takara, Otsu, Japan) a 7 μ l 10X kinázového pufru po dobu 2 hodin při 37 °C.

10 μ l alikvoty každého z výše uvedených fosforylovaných oligonukleotidů byly společně smíchány, zahřáty na 80 °C na 5 minut a potom se velmi pomalu ochladil na teplotu místnosti, , čímž došlo ke specifickému spárování komplementárních řetězců.

Příklad 2

Ligace

Ligační směs byla připravena smícháním μ l vektorové DNA, 5 μ l DNA inzertu, 1 μ l T4 DNA ligázy (NEB, Beverly, MA, USA), 1 μ l 10X enzymového reakčního pufru (NEB, Beverly, MA, USA) a 2 μ l destilované vody, a potom se inkubovala při 16°C přes noc.

Příklad 3

Konstrukce expresního vektoru pBX pro expresi mimetického peptidu apolipoproteinu B-100

Krok 1. Návrh vektoru

Plazmidový vektor pro expresi mimetického peptidu obecně obsahuje vedoucí kazetu a jeden nebo více genů peptidu PBl. Jak je uvedeno na obr. 1, plazmid pBX1, který obsahuje jeden PBl gen, byl připraven klonováním vedoucí kazety (obr. 1a) do vícečetného klonovacího místa plazmidu pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany). Výsledný plazmid byl naštěpen restriktázami HindIII a SalI a malý fragment byl nahrazen LB kazetou (obr. 1b) za

vzniku plazmidu pBX1, který je snadné vložení většího počtu BL kazet (obr. 1c).

Mezitím byl plazmid pBluescript II SK+ naštěpen SalI a XhoI a ligován s BL kazetami, přičemž došlo k náhodnému výskytu jednotlivých i vícenásobných inzercí BL kazety. Očekávané repetice (opakování) genů PBI peptidu v plazmidu pBlue-BL byly selektovány, vyštěpeny a subklonovány do pBX1 (obr. 1d).

Krok 2. Příprava vektoru pro expresi monopeptidu PBI

Vedoucí kazeta byl připravena komplementárním spojením oligonukleotidů sekvencí SEKVENCE ID. Č. 10 a SEKVENCE ID. Č. 11, které byly syntetizovány jak bylo uvedeno v příkladech 1 a 2. Potom se vektor pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany), který byl naštěpen SalI a BamHI, ligoval s vedoucí kazetou s cílem připravit pQE-vedoucí plazmid. V důsledku exprese ve vektoru pQE30 bylo na N-konec exprimovaného proteinu dodatečně připojeno šest histidinových zbytků, aby byla usnadněna purifikace proteinu. Vedoucí kazeta byla konstruována tak, aby obsahovala rozpoznávací místo (DDDDKI; SEKVENCE ID. Č. 12) pro enterokinázu, aby se dodatečné aminokyseliny zredukovaly na minimum.

Podle postupu v příkladu 1 byly syntetizovány čtyři oligonukleotidy, jejichž sekvence jsou v seznamu sekvencí uvedeny jako SEKVENCE ID. Č. 4 až 7, pak byly fosforylovány a nakonec spojeny s odpovídajícími komplementárními oligonukleotidy, aby vznikla LB kazeta z obr. 1b (SEKVENCE ID. Č. 13 a 14). Pro přípravu ligační směsi bylo smícháno 40 μ l spojených oligonukleotidů s 3 μ l 1U/ μ l T4 ligázy, 5 μ l 10X enzymového pufru a 2 μ l destilované vody. Potom se ligační směs

inkubovala přes noc, aby došlo ke vzájemnému spojení oligonukleotidů.

Po ukončení reakce se reakční směs nanasla na 20% polyakrylamidový gel a nechala se proběhnout elektroforéza. LB kazeta (oligonukleotidy o velikosti 52 párů bází (bp)) (viz obr. 3) byla identifikována obarvením gelu etidiumbromidem (EtBr).

Na obr. 3 dráha M je standard (marker) 20 bp „žebříku“ DNA, dráha 1 je reakční roztok. LB kazeta byla izolována z gelu pomocí soupravy „QIAEX II gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Plazmid pQE-vedoucí byl štěpen HindIII a SalI, a potom ligován s LB kazetou podle příkladu 2 s cílem připravit expresní vektor pro mimetický peptid PBl. Připravený expresní vektor byl nazván pBX1 a peptid exprimovaný tímto vektorem byl nazván peptid PBl₁ (viz obr. 2).

Krok 3. Příprava expresního vektoru pro konkatemer peptidu PBl₁

Podle postupu z příkladu 1 byly syntetizovány čtyři oligonukleotidy se sekvencemi SEKVENCE ID. Č. 4, 5, 8 a 9, fosforylovány a spojeny s odpovídajícími komplementárními oligonukleotidy, s cílem syntetizovat BL kazetu na obrázku 1c (SEKVENCE ID. Č. 15 a 16). Následně byly tyto oligonukleotidy ligovány, jak je uvedeno v kroku 2 a potom byly nanaseny na 20% polyakrylamidový gel na elektroforézu. Oligonukleotid (vedoucí kazeta) velikosti 55 bp byl identifikován obarvením gelu EtBr. BL kazeta byla izolována z gelu pomocí soupravy „QIAEX II gel extraction kit“ a naštěpena SalI a XhoI.

Mezitím byl plazmid pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA, USA) naštěpen SalI a XhoI. Vektor byl nanasen na

0,8% agarózový gel, a po proběhnutí elektroforézy byl vektor izolován pomocí soupravy „QIAEX II gel extraction kit” (Qiagen, Hilden, Germany).

Stejná ligační reakce jako v příkladu 2 byla provedena, s použitím 5 μ l DNA BL kazety a 1 μ l výše popsané naštěpené vektorové DNA, aby se získal plazmid pBLUE-BL

pBlue-BL byl naštěpen SalI a XhoI a byla izolována BL kazeta. Plazmid pBX2 byl připraven inzercí BL kazety do SalI místa vektoru pBX1, který byl připraven v kroku 2. Navíc vektory pBX3 a pBX4 byl připraveny tak, že byl změněn počet BL kazet vložených do SalI místa vektoru pBX1 ze 2 na 3 (viz obr. 2).

Peptidy exprimované z vektorů pBX2, pBX3 a pBX4 byly konkatemery, které obsahovaly dva (2) až čtyři (4) peptidy PB1. Byly označeny PB1₂, PB1₃ a PB1₄, v uvedeném pořadí.

Krok 4. Identifikace inzertu

Hostitelské buňky (*E. coli* M15 [pREP4]; Qiagen, Hilden, Germany) byly transformovány plazmidem pBlue-BL a nanесeny na 1% agarovou plotnu, pak byly inkubovány 16 hodin při 37°C, aby se vytvořili kolonie *E. coli*. Jedna z kolonií, která vyrostla na agarové plotně, byla inokulována do 10 ml LB média a inkubovala se za třepání při 37°C po 16 hodin, a potom byl izolován plazmid pomocí DNA purifikačního systému (Wizard PLUS SV DNA miniprep DNA purification system; Promega, Madison, WI, U.S.A). Plazmid získaný z transformovaných *E. coli* byl inkubován s restrikčními enzymy SalI a XhoI, aby se naštěpil, při 37°C po 1 hodinu, a pak byl analyzován na 20% PAGE (obr. 4) Na obr. 4, dráha M představuje velikostní standard - 20 bp DNA žebřík, dráha 1 představuje oligonukleotidový produkt získaný

v kroku 3, dráha 2 představuje DNA BL kazety izolovanou pomocí 20% PAGE z kroku 3 a dráha 3 představuje rekombinantní plazmid pBLUE-BL ošetřený enzymem. Jak je ukázáno na obr. 4, potvrdilo se, že plazmid pBlue-BL obsahuje BL kazetu.

E. coli (M15 [pREP4]) byly transformovány plazmidem pBX1 nebo plazmidem pBX3 a plazmidová DNA byla izolována postupem, jak byl již výše popsán, s cílem potvrdit počet a orientaci inzertů DNA kazety. Izolovaný plazmid byl štěpen restričními enzymy SalI a HindIII a analyzoval se na 20% PAGE (obr. 5). Na obr. 5, dráha M představuje standard - 20 bp DNA žebřík, dráhy 1 a 3 představují plazmid pBX1 obsahující LB, ale nikoliv BL kazetu, dráha 2 představuje plazmid nesoucí jednu LB a dvě BL kazety ve správné orientaci. Na druhé straně dráha 4 představuje plazmid mající jednu LB a dvě BL kazety, avšak s opačnou orientací. Jak je ukázáno na obr. 5, kolik B kazet (BL nebo LB kazet) se skutečně vložilo do vektoru pBX a v jaké orientaci může být identifikováno pomocí mapování restričními enzymy.

Kromě toho se potvrdilo, že DNA sekvence B kazet inkorporovaných do plazmidu, který byl izolován z transformovaných *E. coli*, je identická s navrženými sekvencemi. Plazmidy byly izolovány pomocí soupravy „Wizard PLUS DNA miniprep kit“ a pak sekvencovány použitím soupravy „Sequennase (Ver. 2.1) DNA sequencing kit“ (Amersham, Cleveland, UK).

Příklad 4

Expresse peptidu PB1₄ v *E. coli* a jeho purifikace

Krok 1. Potvrzení exprese peptidu PB14

Aby se potvrdila exprese peptidu PB1₄, byly 3 typy transformovaných *E. coli* M15 [pREP4] kultivovány na LB agaru obsahujícím ampicilin a kanamycin. Jedna kultura *E. coli* M15 [pREP4] byla transformována plazmidem pBX4, druhá byla modelově transformována pQE30 a další byla netransformovaná kultura *E. coli* M15 [pREP4]. Každá kolonie vzniklá z kultury na pevném médiu byla inokulována do tekutého LB kultivačního média, které obsahovalo 100 µg/ml ampicilinu a 25 µg/ml kanamycinu, a byla inkubována přes noc. Kultura se inkubovala při 37°C jednu hodinu za třepání dokud hodnota optické denzity (O.D) při 600 nm nedosáhla 0,5 až 0,7. Potom se do kultivačního média přidal 1mM IPTG (isopropylthio-β-galaktopyranosid) pro usnadnění exprese rekombinantního proteinu, a potom pokračovala další kultivace při 37°C po dobu 5 hodin. 1 ml kultivačního média se odebral a centrifugoval při 14 000 ot./min. (rpm) po dobu 2 minut, aby se usadily bakteriální buňky. Buněčný pelet se resuspendoval v 50 µl roztoku 2X SDS [100 mM Tris-Cl pH 6,8; 20% glycerol (hmot./obj.), 4% SDS (hmot./obj.), 2% 2-merkaptoetanol, 0,001% bromfenolová modř] pro nanesení na SDS PAGE. Po resuspendování se roztok zahříval 5 minut na 95°C a pak bylo 10 µl roztoku nanášeno do jamky připraveného gelu a nechala se probíhat elektroforéza při 20 mA po dobu 5 hodin (Mighty Small II, Hoefer, USA). Použité koncentrace akrylamidu „srovnávacího“ gelu a dělicího gelu byly 5 % a 15 %, v uvedeném pořadí, a jako velikostní marker byl použit předem obarvený standard SeeBlue (250 kDa až 4 kDa; NOVEX, SanDiego, CA, USA) nebo standard Mark12 (200 kDa až 2,5 kDa). Po elektroforéze byl

gel obarven Coomassie modří „Coomassie brilliant blue R-250“ jednu hodinu a pak se odbarvoval v odbarvovacím roztoku (5% methanol a 7% kyselina octová) 10 hodin.

Pro potvrzení identity exprimovaného peptidu jako PB14, proteiny separované elektroforézou na gelu byly přeneseny membránu a pak byla provedena analýza „western blotting“ králičí protilátky anti-PB1 (obr.6). Antisérum bylo připraveno imunizací králíka ovalbuminem kondenzovaným s chemicky syntetizovaným peptidem PB1 od firmy Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, TX, USA). Na obr. 6 dráha M představuje předem obarvený standard SeeBlue, dráha 1 představuje médium použité k inkubaci *E. coli* M15 [pREP4], které nebyly transformované, dráha 2 představuje médium použité k inkubaci *E. coli* M15 [pREP4] transformovaných vektorem pQE30, dráha 3 představuje médium použité k inkubaci *E. coli* M15 [pREP4] transformovaných vektorem pBX4.

Jak je ukázáno na obr. 6, pouze *E. coli* transformované vektorem pBX4 exprimovaly rekombinantní peptid PB14, který představoval specifickou imunitní reakci s anti-PB1 myším sérem.

Krok 2. Zjištění rozpustnosti exprimovaného peptidu

E. coli M15 [pREP4], které byly transformované vektorem pBX4, byly inkubovány stejně jak bylo popsáno v kroku 1. 10 ml kultivačního média bylo odebráno a centrifugováno, aby se získaly buňky. Buněčný pelet se resuspendoval v 5 ml roztoku pro lyzování buněk (300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 10mM imidazol, pH 8,0), aby se získal z buněk nativní protein. Po ochlazení se roztok s resuspendovaným peletem sonifikoval ve 20 cyklech ultrazvukovými vlnami, aby se buňky lyzovaly. Takto získaný lyzát se centrifugoval při 4°C, 10 000 ot./min. (rpm),

30 minut. Z centrifugovaného lyzátu se odebral supernatant a použil se jako surový extrakt A obsahující rozpustné proteiny. Pelet z centrifugovaného lyzátu se použil jako surový extrakt B obsahující nerozpustné proteiny. Stejný objem roztoku 2X SDS byl smíchán s extraktem a analyzován SDS PAGE jako v kroku 1, po té, co se každý extrakt povařil 5 minut při 95°C. Výsledek SDS PAGE potvrdil, že peptid PB₁₄ může být izolován a purifikován z rozpustného extraktu A, ačkoliv byl obsažen i v nerozpustném surovém extraktu B.

Krok 3. Purifikace peptidu PB₁₄

Krok 3-1. Afinitní chromatografie

Ni-NTA pryskyřice pro purifikaci proteinů značených His byla použita pro purifikaci rekombinantního peptidu v kroku 1. Afinitní chromatografie využívající přitažlivé síly mezi Ni⁺, kterým je satureována pryskyřice, a histidinovými zbytky, které jsou navázány na konci exprimovaného proteinu, je dobře známou metodou pro snadnou purifikaci požadovaného proteinu.

Nejdříve se *E. coli* M15 [pREP4], transformované pBX4, inokulovaly do 1l LB kultivačního média a inkubovaly při 37°C, dokud hodnota optické denzity (O.D) při 600 nm nedosáhla hodnoty vaší než 0,6. Pomer LB kultivačního média k vektoru pBX4 byl padesát (50) ku jedné (1). IPTG byl přidán do konečné koncentrace 1 mM a kultura se inkubovala 5 hodin. Po inkubaci se buněčný pelet získal centrifugací kultivačního média při 6000 x g po 30 minut a pelet se uchoval přes noc v -70°C. Pelet se nechal roztát na ledu a resuspendoval se v rozpouštěcím roztoku (300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 10mM imidazol pH 8,0), přičemž se použilo 5 ml rozpouštěcího roztoku na 1 g peletu. Buňky byly lyzovány sonikací, jak bylo uvedeno v kroku 2 a potom byly centrifugovány při teplotě místnosti 30 minut

při 10000 x g. Použil se stejný objem pufru (8M močovina, 0,1M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl pH 8,0) jako byl pelet na resuspendování buněčných zbytků a na denaturaci proteinů v nich, roztok s resuspendovaným peletem se krátce podrobil účinku ultrazvuku, aby se mohlo v roztoku rozpustit více proteinů. Suspenze se centrifugovala 30 minut při 8000 ot./min. (rpm), aby se odstranili buněčné zbytky, které nebyly solubilizovány 8 M močovinou. Ke 4 ml supernatantu se přidal 1 ml Ni-NTA pryskyřice při 4°C a třepal se při 200 ot./min. 2 hodiny, aby došlo k „vychytání“ proteinů obsahujících značku His.

Tento supernatant obsahující komplex protein/Ni-NTA se opatrně nanasl na chromatografickou kolonu (velikost 2 cm (vnitřní průměr) x 2,7 cm (výška)). Nadbytečný pufr byl odstraněn otevřením víčka po té, co se pryskyřice udadila. Kolona byla promyta 20 ml pufru se středním pH (8M močovina, 0,1M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl pH 8,0) a následně 20 ml dalšího pufru (8M močovina, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl pH 6,3), aby se vymyly proteiny nespecificky navázané na Ni-NTA pryskyřici. Cílové proteiny obsahující značku His se eluovali 2krát 5 ml pufru s nízkým pH (8M močovina, 0,1M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl pH 5,9) a následně 4krát 5 ml silně kyselého pufru (8M močovina, 0,1M NaH_2PO_4 , 0,01M Tris-HCl pH 4,5), a pro verifikaci eluovaných cílových proteinů byla potom užita SDS PAGE s 15% akrylamidovým gelem (viz obr. 7). Na obr. 7 dráha M představuje předem obarvený velikostní standard SeeBlue a dráha 1 představuje purifikovaný peptid PB1₄.

Purifikované proteiny byly dále dialyzovány proti PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l NaH_2PO_4 a 0,24 g/l KH_2PO_4), aby se obnovila jejich původní konformace. Prahová velikost použitého dialyzačního rukávu odpovídala molekulové hmotnosti 3500 Da. Pro prvních 5 hodin dialýzy byly užity 3 l PBS

obsahujícího 2M močovinu, a potom po 2krát 2 hodiny 5 l PBS bez močoviny.

Krok 3-2. Hydrofóbní chromatografie

Hydrofóbní chromatografie byla provedena pro zlepšení čistoty peptidu PB1₄, který byl připraven v kroku 3-1.

K roztoku obsahujícímu peptid PB1₄, který byl eluován z Ni-NTA pryskřice v kroku 3-1 se postupně po malých dávkách přidával síran amonný do výsledné koncentrace 20 % a pH se upravilo na 7,0. Roztok se nechal stát po 3 a více hodin dokud se 10% síran amonný zcela nerozpustil, a potom se roztok nanesl na fenylsefarózovou kolonu [náplň: fenylsefarózová pryskřice, „Phenyl Sepharose Fast Flow Resin (Pharmacia, Sweden); velikost kolony: 1 cm (v.p.) x 3 cm (d.)].

Každá frakce, která se eluovala z kolony po nanesení elučního roztoku (8M močovina, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, pH 6,3) na kolonu s rychlostí průtoku 0,5 ml/min reverzního gradientu síranu amonného od 10 % do 0 % koncentrace, se nanesla na SDS-PAGE gel. Frakce obsahující peptid PB1₄ se odebrala a dialyzovala v pufru, aby se odstranili soli, a současně aby se odstranila močovina, která byla použita jako denaturační činidlo.

Krok 3-3. Odstranění histidinové značky

2M močovina byla přidána k pufru (50mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 2mM CaCl₂, pH 7,4), který byl vhodný pro odstranění denaturačního činidla a imidazolu z purifikovaného proteinu značeného His značkou, a také pro aktivaci enterokinázy. Dialyzovaný peptid PB1₄, který byl připraven v kroku 3-2, se opět dialyzoval užitím pufru obsahujícího močovinu, aby se

odstranily soli z peptidu PB14, přičemž se také postupně snižovala koncentrace močoviny opakovanou dialýzou proti pufru s nízkým obsahem močoviny. K roztoku obsahujícímu peptid PB14, kde byl pufr vyměněn uvedeným druhým pufrům, se přidaly 3 U/ml enterokinázy a roztok se inkuboval při 23°C. Roztok se odebíral každou hodinu a analyzoval na SDS-PAGE, aby se ověřilo množství odstraněné histidinové značky z peptidu PB1 značeného His (PB14^{+his}).

Krok 3-4. Chromatografie na iontoměniči

Nežádoucí proteiny a peptidy, které vznikly v důsledku působení enterokinázy, byly odstraněny iontoměničovou chromatografií.

Roztok obsahující peptid PB14^{-his}, který byl připraven v kroku 3-3, byl dialyzován v dialyzačním pufru (2M močovina, 0,1M NaH₂PO₄, 0,01M Tris-HCl, pH 7,0), při dostatečném vyměňování pufru. Roztok po dialýze se nanášel na DEAE-sefárovou pryskyřici (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Potom byla kolona ekvilibrována ekvilibračním roztokem (50mM pufr fosforečnanu sodného, 2M močovina, pH 7,0) a peptid byl eluován koncentračním gradientem NaCl od 0 do 1M užitím dalšího pufru (50mM fosforečnan sodný, 2M močovina, 1M NaCl (průtok: 0,5 ml/min). Každá frakce byla odebrána a frakce obsahující cílový protein se nakonec sloučily. Přítomnost peptidu PB14^{-his} se potvrdila pomocí SDS PAGE po zakoncentrování vzorků.

Krok 4. Kvantitativní analýza PB1₄

Purifikovaný peptid PB1₄, který se získal v kroku 3, byl kvantitativně analyzován kolorimetrickou analýzou užitím činidla BCA („micro BCA reagent“, Pierce, Rockford, USA).

Krok 5. Potvrzení vlastností rekombinantního peptidu PB1₄

Čistota peptidů PB1₄ purifikovaných v kroku 3 a jejich imunogenicita proti antiséru, které bylo připraveno užitím syntetického peptidu PB1₄ jakožto antigenu, se potvrdila analýzou western-blot od firmy ECL (Amersham, Cleveland, UK). Po SDS PAGE (viz příklad 2, krok 1) se gel inkuboval spolu s PVDF membránou v pufru (0,3% Tris, 1,5% glycin, 20% methanol) při konstantním napětí 60 V po 3 hodiny, aby se protein přenesl z gelu na PVDF membránu. Potom se membrána s přeneseným proteinem inkubovala v 5 ml blokovacího roztoku (TBS pH 7,5, 5% odtučněné mléko v prášku (hmot./obj.), 0,02% Tween 20) po dobu 1,5 hodiny, a potom se promyla 3 krát v TTBS (solný roztok pufovaný Tris obsahující 0,1% Tween 20) po dobu 15, 5 a 5 minut. Antisérum proti peptidu PB1 (viz krok 1 z příkladu 2) se naředilo roztokem TTBS v poměru 1 ku 5 000, a potom se inkubovalo s membránou 1,5 hodiny. Pro potvrzení čistoty proteinu PB1₄ se použilo antisérum proti peptidu PB1₄ (viz příklad 3). Po promytí gelu TTBS 3krát, postupně 15 minut, 5 minut a 5 minut, se membrána inkubovala 1,5 hodiny při teplotě místnosti s roztokem, ve kterém se naředil alkalickou fosfatázou značený fragment F(ab)₂ kozího anti-myšího IgG (H+L) (Zymed, San Francisco, CA) roztokem TTBS v poměru 1 ku 1000. Membrána se opět promyla TTBS 3krát a potom se obarvila přidáním BCIP/NBT (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát/tetrazoliová nitromodř (Sigma)). Roztok BCIP/NBT se po barvení odstranil pomocí roztoku TTBS. Výsledkem analýzy

western-blot bylo to, že exprimovaný peptid PB14 byl rozpoznán sérem anti-PB14.

V případě ECL byla použita PVDF membrána (Gelman Science, BioTraceR) místo nitrocelulózové membrány. Kromě toho se první protilátka použila v poměru 1 ku 10 000 a jako sekundární protilátka se použil králičí anti-myší IgG konjugovaný s HRP (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) v poměru 1 až 10 000. Pro barevnou reakci se užil 1 ml roztoku A z činidla ECL+Plus western-blot (Amersham) na 25 ml roztoku B. Když se vytvořilo dostatečné zbarvení, membrána se vložila do filmové kazety na 5, 10, 20 a 30 sekund, a byl exponován film, aby bylo možné detekovat pásy na gelu (obr.8). Na obr. 8, dráha M představuje ECL detekční značku (Gibco BRL) a dráha 1 představuje peptid PB14. Jak vyplývá z obr. 8, exprimovaný peptid PB14 byl rozpoznán sérem anti-PB14.

Kromě toho, výsledek analýzy western-blotu, ve které byl peptid PB14 detekován s použitím polyklonální protilátky izolované z králičího séra pomocí kolony s proteinem G „Protein G column“ (Bio-Rad, USA), byl shodný.

Příklad 5

Příprava myší protilátky proti peptidu PB14

Peptid PB14 použitý v tomto příkladu byl peptid PB14^{-his}, ze kterého byla odstraněna histidinová značka v kroku 3-3 v příkladu 2.

Krok 1: Ligace peptidu PB14 a OVA

Ovalbumin (OVA) byl jako nosičový protein přidán k purifikovanému peptidu PB14 v kroku 3 z příkladu 2, v molárním poměru 1 ku 10 a byl inkubován 1 hodinu při 4 °C. K roztoku

peptid PBl₄-ovalbumin se přidal shodný objem 2% (obj./obj.) glutaraldehydu a inkuboval se 1 hodinu za stálého třepání. Potom se k reakční směsi přidal glycin do výsledné koncentrace 0,2M, aby se zabránilo pokračování reakce.

Po proběhnutí reakce se zbylý glutaraldehyd a glycin v reakční směsi odstranily dialýzou užitím dialyzační membrány MWCO 12000-14000 (Spectrum, Dominiguez, CA, USA).

Krok 2: Imunizace myši

Peptid, který byl získán v kroku 1 navázaný na OVA byl zakoncentrován a užil se k imunizaci myši. Množství antigenu na injekci myši bylo 5 µg, což bylo množství peptidu PBl₄ před spojením s OVA. Antigen, který se emulgoval se shodným množstvím adjuvans se injikoval do intraperitoneální dutiny myši v množství 0,2 ml.

Úplné Freundovo adjuvans (CFA) bylo použito jako adjuvans při první injekci a neúplné Freundovo adjuvans (IFA) bylo použito jako adjuvans při zesilovací imunizaci 2 krát během dvou týdnů. U kontrolní myši se injikoval hovězí sérový albumin (BSA).

Po 5 dnech od poslední injekce se myši odebral 1 ml krve punkcí srdce a krev se nechala srážet 30 minut při 37 °C. Potom se krev centrifugovala 30 minut při 4 °C, 2500 x g a z krve se odstranila sraženina. Supernatant (krevní sérum) se inkuboval přes noc při 4 °C, aby se krevní koagulanty úplně koncentrovaly, a pak se centrifugoval 20 minut při 10 000 x g. Výsledný supernatant se rozdělil do několika zkumavek. Krevní sérum, které se použilo v experimentu, se skladovalo při 4 °C a zbytek se uložil do -20 °C.

Krok 3. Měření avidity protilátky anti-PB1₄ nepřímým ELISA testem

Avidita protilátky byla měřena použitím krevního séra získaného v kroku 2. 100 μ l peptidu PB1₄ se nanoslo do každé jamky 96jamkové mikrotitrační etičky (Falcon: pro-binding) a nechalo se stát při 4 °C po dobu 6 hodin nebo více, a potom se destičky 3krát promyly TTBS (solný roztok pufru Tris obsahující 0,05% Tween 20). 200 μ l blokovacího roztoku (1 μ BSA v TTBS) se přidalo do každé jamky a inkubovalo při 37 °C jednu hodinu, a potom se destičky opět promyly 3krát TTBS. 100 μ l izolovaného séra, které bylo naředěné blokovacím roztokem v poměru 1 ku 10² až 10⁵, bylo přidáno k reakčnímu roztoku a destičky se inkubovaly při 37 °C jednu hodinu a potom se 3 krát promyly 200 μ l TTBS. 100 μ l kozí anti-králičí protilátky IgG konjugované s HRP (Pierce, Rockford, IL), která byla naředěna blokovacím roztokem v poměru 1 ku 10³, se přidalo k reakčnímu roztoku a destičky se inkubovaly při 37 °C 1 hodinu a 3 krát se promyly 200 μ l TTBS. Roztok A ze soupravy pro detekci „HRP substrate kit“ (Bio-Rad) se smíchal s roztokem B z téže soupravy v poměru 9 ku 1. 100 μ l výsledné směsi se přidalo k reakčnímu roztoku a ten se nechal barvit 30 minut a byla změřena optická absorbance reakční směsi při 405 nm použitím zařízení pro odečet destiček „ELISA reader“ (EL312e, Bio-Tek Ins.) (obr. 9). Na obr. 9 je vidět, že se potvrdilo, že myší protilátka specifická pro peptid PB1₄ naředěná tisíckrát (hodnota 3,0 na ose x na obrázku) byla použitelná pro analýzy western-blot a ELISA.

Příklad 6

Účinek vakcíny PB1₄ proti obezitě na modelu myši

Krok 1. Indukce obezity u myší

V experimentu byly použity 5 dní staré ICR myši (Korea Center for Animal Experiment Ltd., Seoul, Korea). Myši byly chovány na farmě, kde se udržovala teplota 17 °C až 25 °C a byly krmeny smíšenou stravou (Sam Yang Feed Ltd., Seoul, Korea, [složení: voda 11,8 % nebo více, proteiny 20,0 % nebo více, surové tuky 3,0 % nebo více, surová vláknina 10,0 % nebo méně, popeloviny 10,0 % nebo méně, vápník 0,6 % nebo méně a fosfor 0,4 % nebo více]). Thioglukóza zlata (GTG, „goldthioglukose“) se podávala myším s cílem indukovat obezitu. GTG indukuje desenzibilizaci ventromediálních hypotalamických jader (VHM). Z tohoto důvodu se u myši, kterým se podávalo GTG, nedostavoval pocit sytosti a měly neustálou chuť jíst. Užívaná GTG je velmi nestabilní sloučenina, která lehce degraduje ve vodě nebo při zvýšené vlhkosti. Proto bylo 100 mg GTG (Sigma Inc.) naředěno v 1 ml sezamového oleje (Sigma Inc.) a použilo se stejně jak popsali Brecher a kol. (Brecher G. a Waxler, S.H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70: 498-501 (1949)), aby se podalo dostatečné množství GTG.

Myši byly rozděleny na testovací (20 myší) a kontrolní skupinu (4 myši) a myším v testovací skupině bylo injikováno 25 ml GTG, zatímco myším v kontrolní skupině se neinjikovalo nic.

Tělesná hmotnost myší v testovací skupině se měřila před experimentem a myši, u nichž odchylka tělesné hmotnosti nebyla průkazná, byly vybrány do experimentu. Tělesná hmotnost myší změřená jeden týden po injekci GTG byla 26, až 29,5 g.

U sedmi myší ze skupiny, které se injikovala GTG, byla indukována obezita, zatímco u ostatních nikoliv. Myším, u

kterých nevznikla obezita, se opět podala injekce GTG, a potom byla indukována obezita u všech myší.

Všechny myši, u kterých došlo k indukci obezity, byly rozděleny do třech (3) skupin. Týden po druhé injekci GTG se injikoval peptid PBl₄ myším testovací skupiny 1 obsahující sedm myší, stejně jako v kroku 2 z příkladu 5. Myším (testovací skupina 2 obsahující sedm myší) další skupiny byl injikován ovalbumin místo peptidu PBl₄, jako modelový experiment, a vakcína se neinjikovala další skupině (testovací skupina 3 obsahující šest myší), aby se indukovala obezita. Na druhé straně bylo injikováno 0,2 ml PBS kontrolní skupině pro srovnání s testovacími skupinami, aby se potvrdil účinek vakcíny podle předkládaného vynálezu.

Kromě toho se krmivo používané v experimentu míchalo s vaječným žloutkem a sušilo při 50 °C, aby se indukoval vyšší příjem cholesterolu, a tudíž aby se zvýšila hladina cholesterolu v myším séru. Krmivo bylo poskytováno v takovém množství, aby způsobovalo onemocnění spojené se zvýšenou hladinou cholesterolu. Tělesná hmotnost myší byla měřena denně.

Jak je uvedeno na obr. 10, tělesná hmotnost myší injikovaných vakcínou v testovací skupině 1 (-▲-▲-) se zvýšila z $27,4 \pm 0,4$ g na $52,2 \pm 1,7$ g za 12 týdnů po GTG injekci. Tato data opravňují závěr, že nebyl průkazný rozdíl v nárůstu tělesné hmotnosti mezi testovací skupinou 1 a kontrolní skupinou (-o-o-). Avšak tělesná hmotnost myší, jak v testovací skupině 2 (-●-●-), kdy se injikoval ovalbumin po dosažení obezity, tak i v testovací skupině (-■-■-), kde se po indukci obezity neinjikovala žádná vakcína, se zvýšila z $28,3 \pm 0,5$ g na $68,9 \pm 2,8$ g. Tím se potvrdilo, že obezita může být inhibována injekcí peptidové vakcíny PBl₄.

Na obr. 10, G1 a G2 představují okamžiky injekce GTG a V1, V2 a V3 představují čas injekce vakcíny peptidu PB1₄.

Obr. 11 představuje vzhled myši s indukovanou obezitou. 20 týdnů staré myši testovací skupiny 1 (obr. 11a: normální myši) byly porovnávány s myši testovací skupiny 3 (obr. 11b: obézní myši) také ve stáří 20 týdnů. Jak je znázorněno na obr. 11, potvrdilo se, že vakcína podle vynálezu byla účinná při potlačení obezity.

Krok 2. Měření hladiny cholesterolu v krvi

Po první injekci GTG injekci se hladina cholesterolu v krvi u 12 týdnů starých myši kontrolní skupiny srovnávala s hladinou v krvi stejně starých myši, kterým byla injikována GTG v testovací skupině 1 a 2. Koncentrace celkového cholesterolu, triglyceridů, HDL-cholesterolu a LDL-cholesterolu byla měřena enzymatickou metodou použitím souprav „Cholestezyme-V, Triglyzyme-V, HDL-C555" (Shin Yang Chemicals, Seoul, Korea) a „LDL-EX kit" (Denka Bio-Research, Ltd., Tokyo, Japan). V každém experimentu byla připravena kalibrační křivka pro hodnotu O.D. použitím standardu „Calibrater-D" (Denka Bio-Research, Ltd., Tokyo, Japan), aby byla minimalizována experimetální chyba. Hodnoty O.D. se vyhodnocovaly na základě kalibrační křivky, pro potvrzení koncentrace a obsahu lipidů, tento výsledek je uveden v tabulce 1 a na obr. 12.

Jak je uvedeno v tabulce 1 a na obr. 12, výsledek indukce obezity potvrdil, že nebyl průkazný rozdíl v obsahu cholesterolu obou testovacích skupin a kontroly a nezvýšil se, zatímco koncentrace celkového cholesterolu, HDL-C a LDL-C v krvi se mírně zvýšila (obr. 12).

	Celkový cholesterol	TG	HDL-C	
Kontrola	79±3,7	180±26	59±3,4	
Testovací skupina 1	118±3,6	217±47	92±4,7	20±1,7
Testovací skupiny 2 a 3	131±8,8	218±70	119±7,5	30±4,5
TG: triglycerid, HDL-C: HDL-cholesterol LDL-C: LDL-cholesterol				

Předkládaný vynález byl popsán vzhledem k uvedeným příkladům výhodných provedení. Odborníkům je přitom zřejmé, že lze provést různé úpravy a modifikace v rámci předložené vynálezecké myšlenky, aniž by došlo k odchýlení od podstaty a rozsahu předkládaného vynálezu, který je definován v připojených patentových nárocích.

Průmyslová využitelnost vynálezu

Vakcinační přípravek podle předkládaného vynálezu, který obsahuje mimetický peptid k epitopu apolipoproteinu B-100, jeho konkatemer a jeho modifikované peptidy, může inhibovat výskyt obezity, aniž by způsoboval autoimunitní reakci v organizmu.

Proto onemocnění oběhového systému související s LDL může být léčeno vakcínou podle předkládaného vynálezu účinněji než je tomu dosavadním konvenčním způsobem, který léčí jen dočasně a je drahý, a kdy se inhibuje enzym související s metabolismem cholesterolu.

20.05.02

PV 2002-1571

46595

- 30 -

SEZNAM SEKVENCÍ

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mimetický peptid k apolipoproteinu B-100

<400> 1
Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala Phe
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mimetický peptid k apolipoproteinu B-100

<400> 2
Arg Phe Arg Gly Leu Ile Ser Leu Ser Gln Val Tyr Leu Asp Pro
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mimetický peptid k apolipoproteinu B-100

<400> 3
Ser Val Cys Gly Cys Pro Val Gly His His Asp Val Val Gly Leu
1 5 10 15

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Oligonukleotid pro konstrukci BL nebo LB kazety

<400>	4		
		tcgaccgtaa tgttcctcct atc	23
<210>	5		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	Umělá sekvence		
<220>			
<223>	Oligonukleotid pro konstrukci	BL nebo LB kazety	
<400>	5		
		atcattgaag ataggaggaa cattacgg	28
<210>	6		
<211>	29		
<212>	DNA		
<213>	Umělá sekvence		
<220>			
<223>	Oligonukleotid pro konstrukci	LB kazety	
<400>	6		
		ttcaatgatg tttattggat tgcattcta	29
<210>	7		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	Umělá sekvence		
<220>			
<223>	Oligonukleotid pro konstrukci	LB kazety	
<400>	7		
		agcttagaat gcaatccaat aaac	24
<210>	8		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	Umělá sekvence		
<220>			
<223>	Oligonukleotid pro konstrukci	BL kazety	
<400>	8		
		ttcaatgatg tttattggat tgcattcc	28

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Umělá sekvence
<220>
<223> Oligonukleotid pro konstrukci BL kazety

<400> 9
tcgaggaatg caatccaata aac 23

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Horní řetězec vedoucí kazety

<400> 10
gatccgatga tgatgacaag atcg 24

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Umělá sekvence

<223> Dolní řetězec vedoucí kazety

<400> 11
tcgacgatct tgcacatc atcg 24

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Štěpné místo enterokinázy

<400> 12
Asp Asp Asp Asp Lys Ile
1 5

<210> 13
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Horní řetězec LB kazety

<400> 13

<210> 14
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Dolní řetězec LB kazety

<400> 14
 agcttagaat gcaatccaat aaacatcatt gaagatagga ggaacattac gg 52

<210> 15
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Horní řetězec BL kazety

<400> 15
 tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc c 51

<210> 16
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Dolní řetězec BL kazety

<400> 16
 tcgaggaatg caatccaata aacatcattg aagataggag gaacattacg g 51

20.05.02

PV 2002-1541

46/595

- 34 -

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mimetický peptid pro epitop apolipoproteinu B-100 mající sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 1 a jeho konkatamer.
2. Konkatamer mimetického peptidu podle nároku 1, který obsahuje jeden (1) až patnáct (15) mimetických peptidů.
3. Konkatamer mimetického peptidu podle nároku 1, který obsahuje čtyři (4) za sebou spojené mimetické peptidy.
4. Mimetický peptid a jeho konkatamer podle nároku 1 a jeho konkatamer, kde aminokyselinová sekvence mimetického peptidu je modifikována způsobem vybraným ze skupiny obsahující adici, delecí a chemickou substituci.
5. Mimetický peptid pro epitop apolipoproteinu B-100 mající sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2.
6. Konkatamer mimetického peptidu podle nároku 5, který obsahuje jeden (1) až patnáct (15) mimetických peptidů.
7. Konkatamer mimetického peptidu podle nároku 5, který obsahuje čtyři (4) za sebou spojené mimetické peptidy.

8. Mimetický peptid podle nároku 5, kde aminokyselinová sekvence mimetického peptidu je modifikována způsobem vybraným ze skupiny obsahující adici, delecí a chemickou substitucí.
9. Mimetický peptid pro epitop apolipoproteinu B-100 mající sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 3.
10. Konkatamer mimetického peptidu podle nároku 9, který obsahuje jeden (1) až patnáct (15) mimetických peptidů.
11. Konkatamer mimetického peptidu podle nároku 9, který obsahuje čtyři (4) za sebou spojené mimetické peptidy.
12. Mimetický peptid podle nároku 9, kde aminokyselinová sekvence mimetického peptidu je modifikována způsobem vybraným ze skupiny obsahující adici, delecí a chemickou substitucí.
13. Vakcinační přípravek určený k léčení obezity, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptid vybraný ze skupiny obsahující mimetické peptidy pro epitop apolipoproteinu B-100 mající SEKVENCI ID. Č. 1, SEKVENCI ID. Č. 2, SEKVENCI ID. Č. 3, jejich konkatemery, modifikované peptidy a jejich směsi.
14. Vakcinační přípravek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je podáván intradermální injekcí.

15. Vakcinační přípravek podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že léková forma vakcíny je vybrána ze skupiny obsahující tablety, pilulky, granule, oplatky, elixíry, suspenze, emulze, roztoky, sirupy, aerosoly, měkké a tvrdé želatinové tobolky, sterilní roztoky pro injekce a sterilní prášky.
16. Způsob přípravy mimetického peptidu pro epitop apolipoproteinu B-100, jeho konkatemery nebo modifikovaného peptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje
- I) krok, kdy se vloží DNA kódující genetickou informaci mimetického peptidu pro epitop apolipoproteinu B-100 mající SEKVENCI ID. Č. 1, SEKVENCI ID. Č. 2, SEKVENCI ID. Č. 3, jejich konkatemery a modifikované peptidy, do vektoru,
 - II) krok, kdy se transformují hostitelské buňky vektorem připraveným v kroku I a inkubují se,
 - III) krok, kdy se z hostitelských buněk izolují mimetické peptidy pro epitop apolipoproteinu B-100, jejich konkatemery a modifikované peptidy.
17. DNA kódující polypeptid složený ze čtyř (4) za sebou spojených mimetických peptidů pro epitop apolipoproteinu B-100 majících SEKVENCI ID. Č. 1.
18. Expresní vektor, který obsahuje fragment DNA kódující polypeptid složený ze čtyř (4) za sebou spojených

20.05.02

- 37 -

mimetických peptidů pro epitop apolipoproteinu B-100
majících SEKVENCI ID. Č. 1.

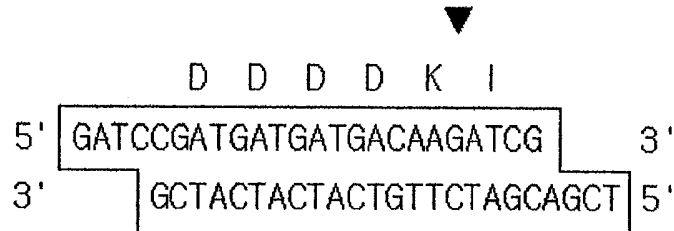
20.05.02

PK 2002-1571

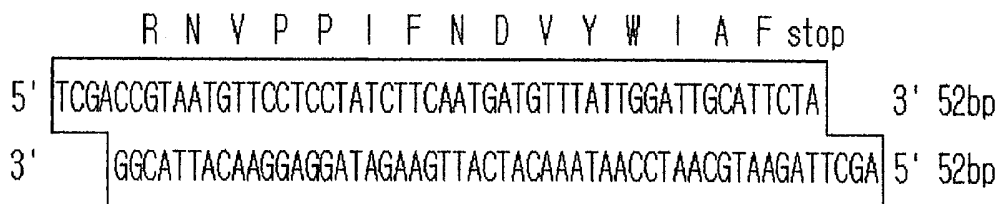
46/595

1/12

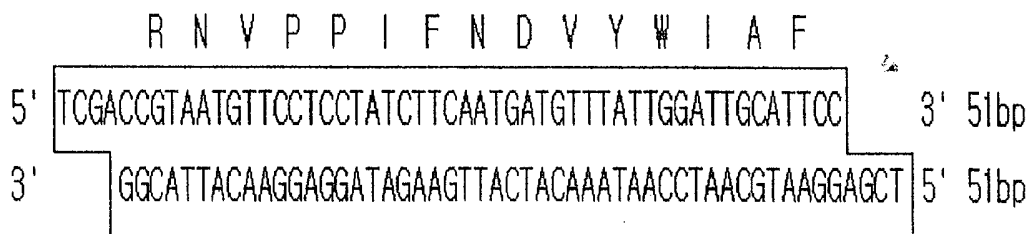
Obr. 1a



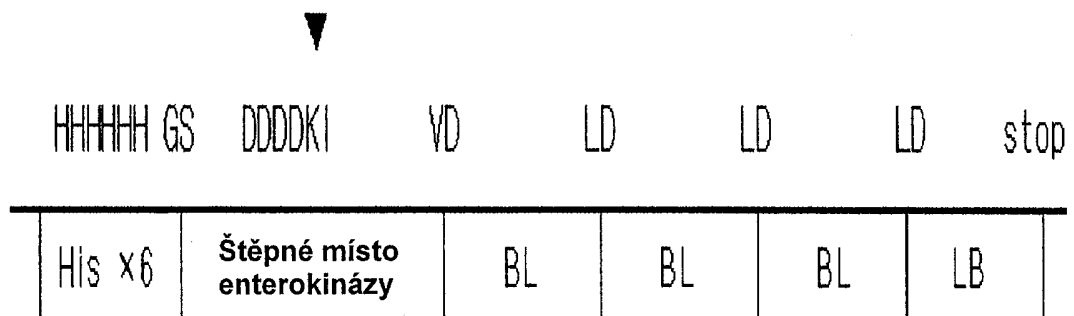
Obr. 1b



Obr. 1c

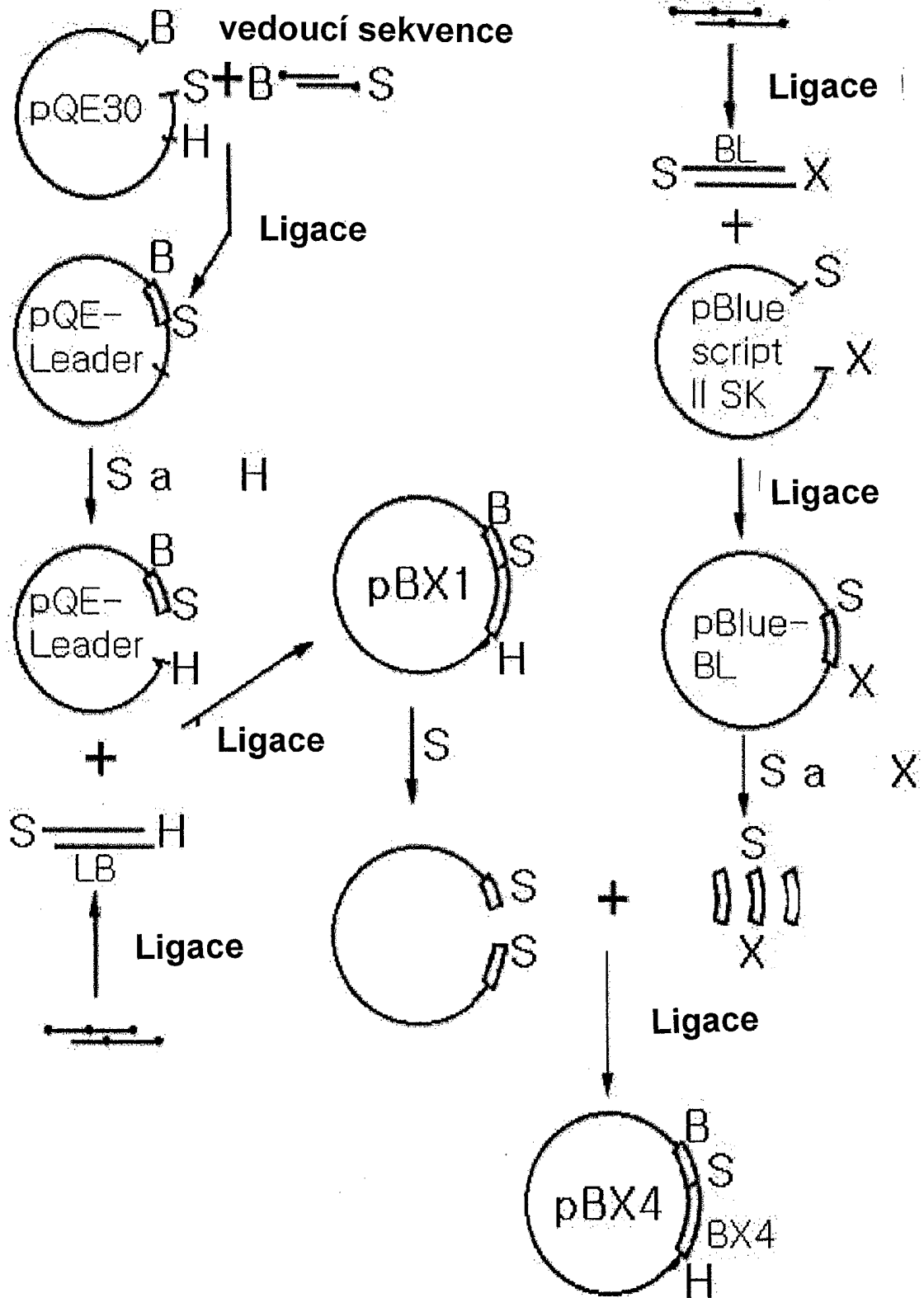


Obr. 1d



Obr. 2

2/12



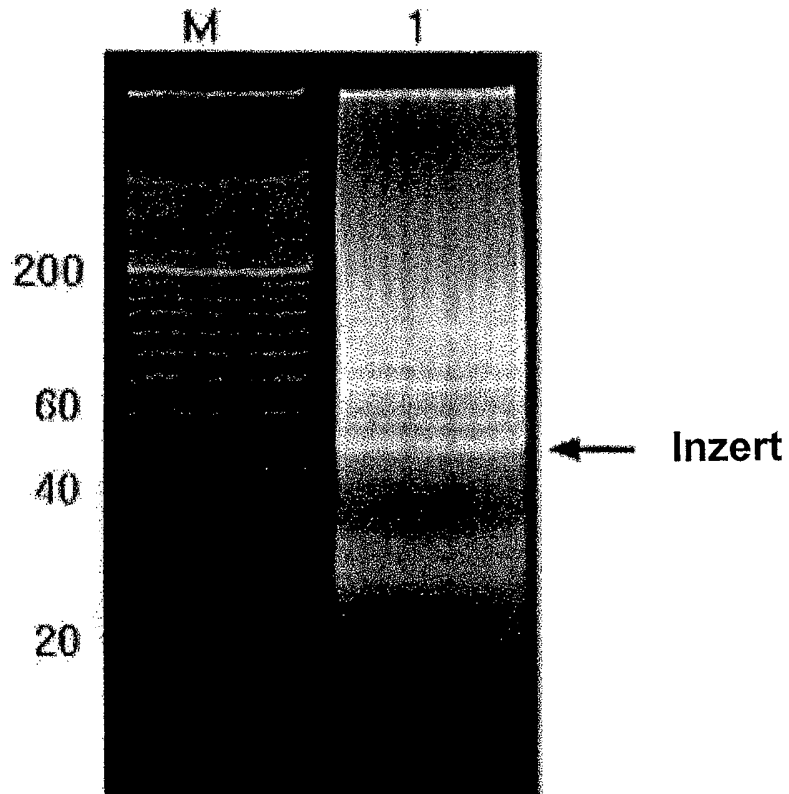
20.08.02

PI 2002-1571

46595

Obr. 3

3/12

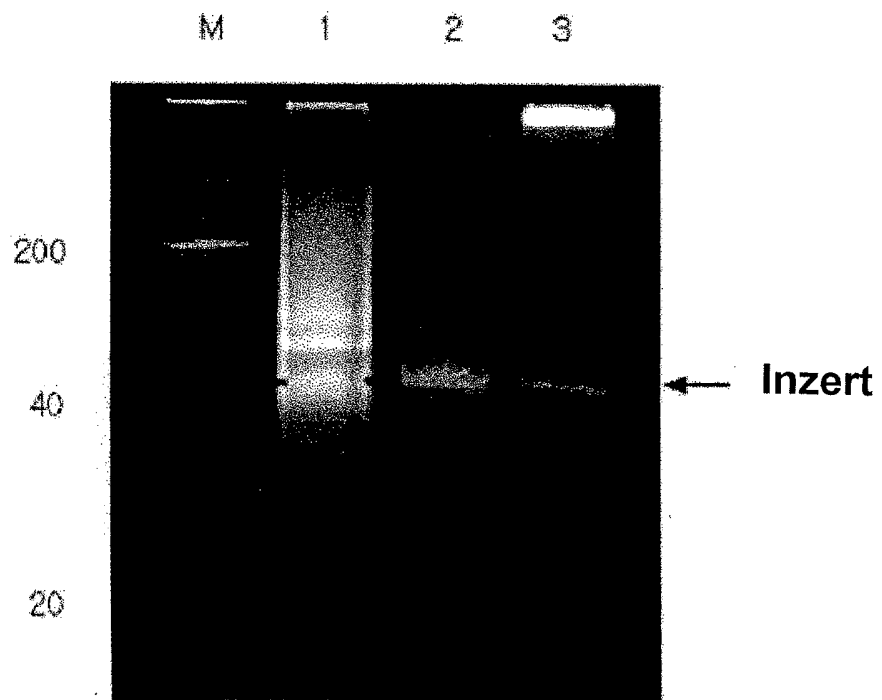


20.08.02

PI 2002-1541
46/595

4/12

Obr. 4



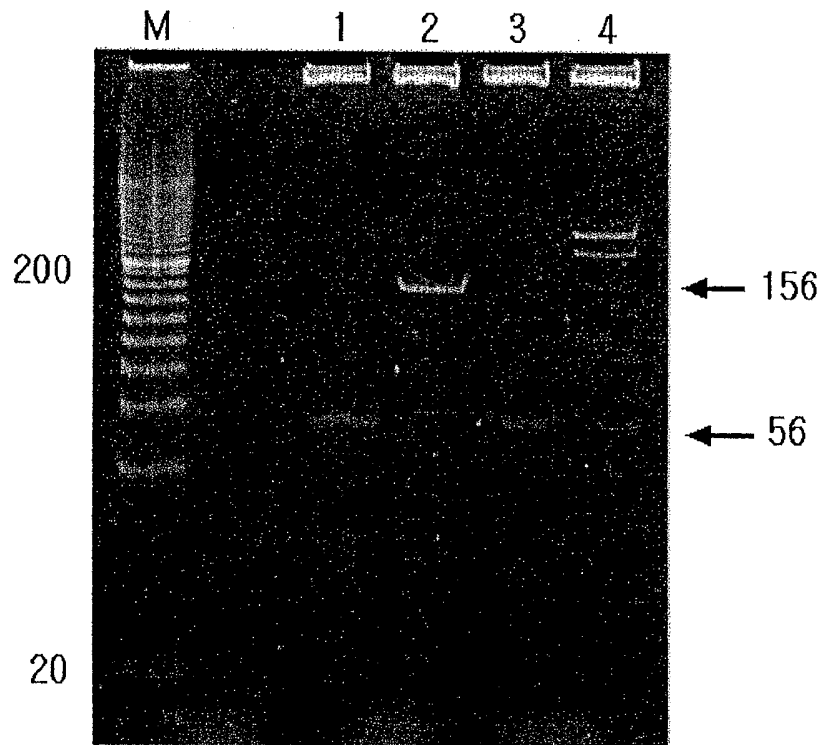
20.08.02

PI 2002 - 1541

46/595

Obr. 5

5/12

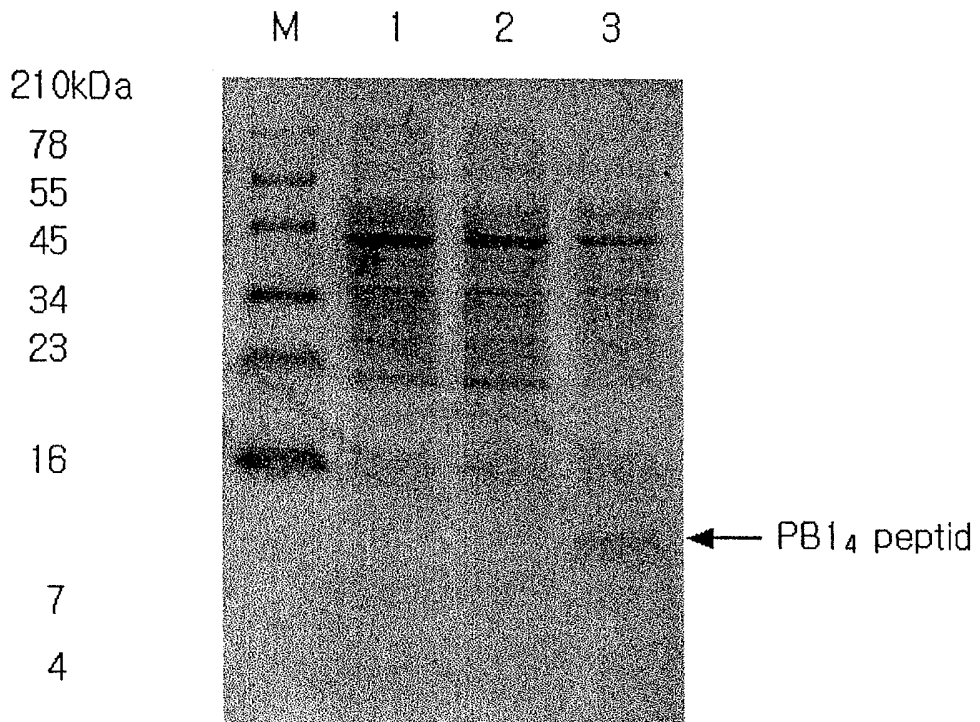


20.05.02

PI 2002-1571
46/595

Obr. 6

6/12



20.08.02

PI 2002-1541

46895

Obr. 7

7/12

A.

210kDa

78

55

45

34

23

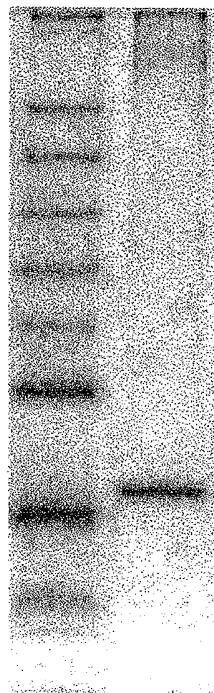
16

7

4

M1

1



← PB14

2005.02

PV 2002 - 1541

46/595

Obr. 8

8/12

B.

M2

2

97.4kDa

68

46

31

20

14.4



← PB14

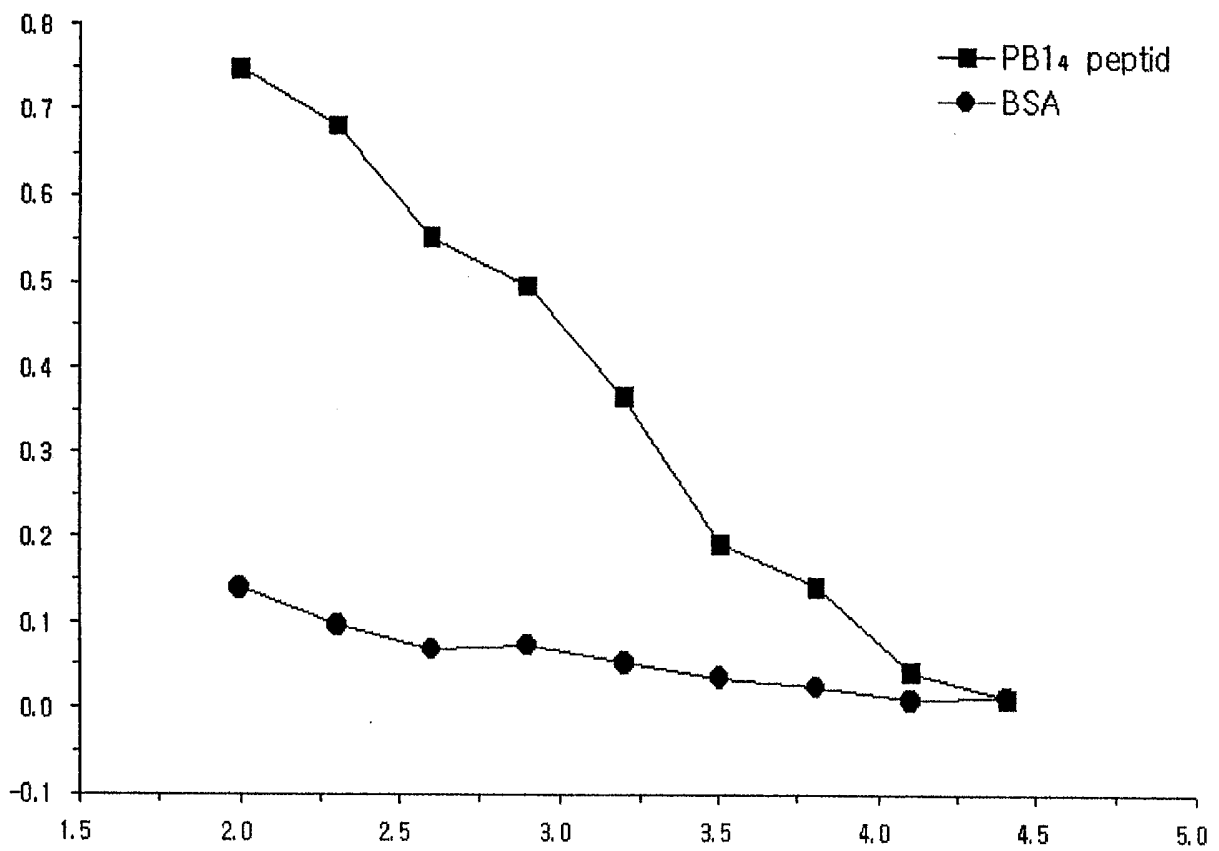
20.06.02

PI 2002-1571

46895

Obr. 9

9/12



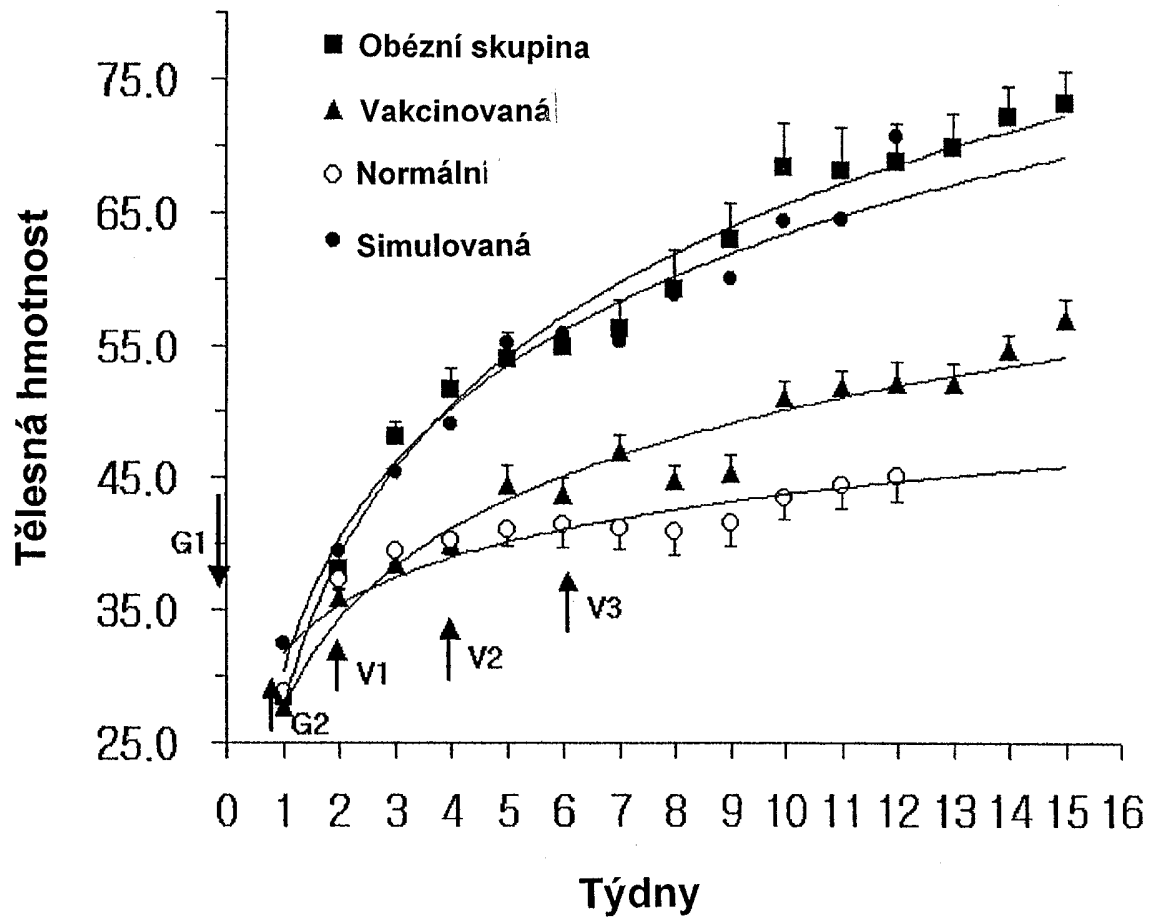
20.05.02

PI 2002-1541

46895

10/12

Obr. 10



20.06.02

PV 2002-1541
46895

Obr. 11a

11/12



Obr. 11b

20.06.02

PV 2002-1541

46595

Obr. 12

12/12

