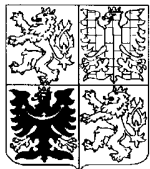


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.08.1998**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.08.1997**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9717953**
(33) Země priority: **GB**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/EP98/05285**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/10375**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 634

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/00

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A.,
Rixensart, BE;

(72) Původce:
Bruck Claudine, Rixensart, BE;
Cabezón Silva Teresa, Rixensart, BE;
Delisse Anne-Marie Eva Fernande, Rixensart, BE;
Gerard Catherine Marie Ghislaine, Rixensart, BE;
Lombardo-Bencheikh Angela, Rixensart, BE;

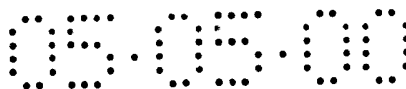
(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vakcína

(57) Anotace:

Řešení se týká fúzních proteinů lidského papilomaviru (HPV) spojených s imunologickým fúzním partnerem, který poskytuje antigenu HPV epitopy pomocných T buněk. Vakcíny je možné použít při léčbě nebo profylaxi lézí vyvolaných HPV.

PV 2000-634
Č.J. 33 158

Vakcína

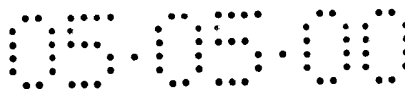
Oblast techniky

Vynález se týká fúzních proteinů, které obsahují protein nebo část proteinu, jenž poskytují epitopy pomocných T buněk a antigen vhodný pro lidský papilomavirus, což nachází využití při léčbě nebo profylaxi nádorů vyvolaných lidskými papilomaviry. Vynález se zvláště týká fúzních proteinů, které obsahují protein E6 nebo E7 z HPV 16 nebo 18 spojený s proteinem D pocházející z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* B.

Dosavadní stav techniky

Papilomaviry jsou malé viry způsobující nádory. Obsahují samotnou DNA (o velikosti 7,9 kilobází, dvouřetězcová), která jsou vysoce druhově specifická. Je popsáno více jak 70 jednotlivých genotypů lidských papilomavirů. Papilomaviry se klasifikují na základě původu (lidské, bovinní atd.) a stupně genetické příbuznosti s jinými papilomaviry ze stejných druhů. HPV jsou v obecném případě specifické pro kůži nebo pro povrch sliznice a dělí se na málo nebezpečné a vysoce nebezpečné na základě časté nebo řídké detekce v abnormální nebo nádorové tkáni. Málo nebezpečné HPV většinou způsobují benigní léze (bradavice nebo papilomy), které přetrvávají několik měsíců nebo let. Vysoce nebezpečné HPV jsou spojovány s výskytem zhoubného bujení. Nejsilnější pozitivní spojení mezi papilomavirem a zhoubným bujením u lidí existuje mezi HPV 16 a 18 a karcinomem děložního čípku. S karcinomem děložního čípku se spojuje více než deset jiných typů HPV. Tyto typy zahrnují HPV 31 a HPV 33, ačkoli frekvence jejich výskytu je nižší.

Genitální infekce HPV u mladých sexuálně aktivních žen je běžná. U většiny uvedených žen buď infekce zmizí nebo jestliže vzniknou léze, dojde k regresi. Pouze u některých infikovaných



jednotlivců dojde k vytvoření lézí, které se přemění na intraepiteliální neoplázie vysokého stupně a dále pouze část z nich se přemění na invazivní karcinom.

Molekulární příčiny vedoucí k infekci HPV nejsou zcela jasné. Zatím neexistuje systém *in vitro* pro pomnožení lidských papilomavirů, což zpomaluje postup k získání informací o virovém cyklu.

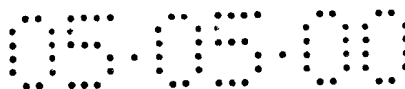
V současné době se informace získávají izolací a charakterizací pomocí klonovacího systému vhodného pro bakterie a PCR amplifikací. Molekulová organizace genomů HPV se identifikovala na základě porovnání s dobře charakterizovanými bovinními papilomaviry typu 1 (BPV1).

Ačkoli se objevují minoritní variace, všechny popsané genomy HPV mají alespoň sedm časných genů E1 až E7 a dva pozdní geny L1 a L2. Navíc regulační sekvence proti směru exprese genu kotví regulační sekvence, které řídí většinu kroků transkripce v genomu HPV.

Geny E1 a E2 se podílejí na řízení virové replikace a transkripce a existují tendence jejich poškození virovou integrací. Geny E6 a E7 se podílejí na virové transformaci. Na tomto procesu se také podílí gen E5.

V případě HPV, které se podílejí na zhoubném bujení děložního čípku, jako je HPV 16 a 18, onkogenní proces začíná po integraci virové DNA. Výsledkem integrace je deaktivace genů kódujících kapsidové proteiny L1 a L2 a ztráta represorové funkce E2, která vede k deregulaci otevřeného čtecího rámce E6/E7 podílejícího se na nadměrné expresi dvou časných proteinů E6 a E7, což povede k postupné ztrátě normální diferenciaci buněk a k vývoji zhoubného bujení. E6 a E7 obcházejí normální buněčný cyklus deaktivací hlavních nádorových supresorových proteinů p53 a pRB, což je produkt genu retinoblastomu.

Karcinom děložního čípku je běžný u žen a vzniká tak, že ze stádia prekarcinomu se vyvine invazivní karcinom, který



často znamená úmrtí. Stádium prekarcinomu je známé jako cervikální intraepiteliální neoplázie a hodnotí se třemi stupni I až III podle narůstající vážnosti onemocnění (CIN I až III).

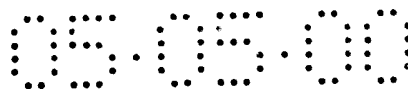
Klinicky se infekce HPV ženského genitálního traktu projevuje jako cervikální rovné kondylomy, jejichž charakteristickými znaky jsou koilocytóza ovlivňující superficiální a intermediální buňky cervikálního dlaždicového epitelu.

Koilocyty, které vznikají důsledkem cytopatického účinku viru, se jeví jako vícejaderné buňky s perinukleárním jasným ohraničením. Epitel se zeslabuje abnormální keratinizací, která odpovídá za objevení lézí.

Takové ploché kondylomy, v případě, že jsou pozitivní na sérotypy HPV 16 a 18 jsou vysoce nebezpečnými faktory pro vývoj cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN) a karcinomu *in situ* (CIS), který je sám o sobě prekurzor lézí invazivního karcinomu děložního čípku.

Vývoj onkogenní infekce HPV znamená 3 fáze, jmenovitě:

- (1) latentní infekční fáze
- (2) fáze nitrojaderné virové replikace s produktem kompletních virionů, které odpovídá výskytu koilocytů. V tomto stádiu HPV produkuje plné rozmezí proteinů, které zahrnují E2, E5, E6, E7, L1 a L2.
- (3) fáze virové integrace do buněčného genomu, který způsobuje počátek maligní transformace a odpovídá CIN II a CIN III/CIS s progresivním vymizením koilocytů. V tomto stádiu exprese E2 je regulována negativně a exprese E6 a E7 se zvýší. Mezi fázemi CIN II/III a CIN III/cervikální karcinom virová DNA přestává být epizomální v bazálních buňkách, ale začleňují se pouze geny E6 a E7 (nádorové buňky). 85 % cervikálních karcinomů jsou karcinomy dlaždicovitých buněk, které jsou ve většině případů spojeny se sérotypem HPV 16. 10 % a 5



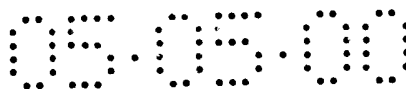
% jsou adenokarcinomy respektive adenokarcinomy dlaždicovitých buněk a oba typy jsou převážně spojeny se sérotypem HPV 18. Existují však i další onkogenní HPV.

V dokumentu patentové přihlášky č. WO 96/19496 se popisují varianty lidského papilomavirového proteinu E6 a E7, zvláště fúzní proteiny E6/E7 s delecí v obou proteinech E6 a E7. Uvádí se, že tyto deleční fúzní proteiny jsou imunogenní.

Vynález poskytuje kompozice obsahující buď E6 nebo E7 nebo E6/E7 fúzní protein spojený s imunologickým fúzním partnerem, který má epitopy T buněk.

V preferované formě vynálezu imunologický fúzní partner se získal z proteinu D mikroorganismu *Haemophilus influenzae* B. Upřednostňuje se, aby derivát proteinu D obsahoval přibližně první třetinu proteinu, zvláště přibližně prvních 100 až 110 aminokyselin N-konce. Protein D může být lipidován (lipoprotein D). Mezi jiné imunologické fúzní partnery patří nestrukturální protein z viru chřipky NS1 (hemagglutinin). V typickém případě se využívá 81 N-terminálních aminokyselin, ačkoli se mohou použít různé fragmenty, které poskytují epitopy pomocných buněk T.

V jiném provedení vynálezu imunologickým fúzním partnerem je protein známý jako LYTA. Přednostně se používá C-terminální část molekuly. Protein lyta se získal z mikroorganismu *Streptococcus pneumoniae*, který syntetizuje N-acetyl-L-alaninamidázu, (amidáza LYTA, kódovaný genem *lytA* (popisuje se v publikaci *Gene*, 43 (1986) page 265-272)). Jde o autolyzin, který specificky degraduje jisté vazby v peptidoglykanovém řetězci. C-terminální doména proteinu LYTA je odpovědná za afinitu vůči cholinu nebo k některým analogům cholinu, jako je DEAE. Tato vlastnost se využívá k vývoji plazmidů vhodných pro expresi C-LYTA v *E. coli*, které jsou také použitelné pro expresi fúzních proteinů. Popisuje se čištění hybridních proteinů obsahujících na svém N-konci fragment C-LYTA (*Biotechnology*: 10, (1992) page 795-798). V preferovaném



provedení vynálezu se využívá část repetice molekuly Lyta nalezené na C-konci začínající zbytkem 178. Zvláště preferované formy zahrnují zbytky 188-305.

V preferovaném provedení vynálezu se popisují fúzní proteiny obsahující protein D-E6 pocházející z HPV 16, protein D-E7 pocházející z HPV 16, protein D-E7 pocházející z HPV 18, protein D-E6 pocházející z HPV 16 a protein D-E6E7 pocházející z HPV 16 a 18. Část proteinu D přednostně obsahuje první třetinu proteinu D. Je výhodné, že se mohou využívat proteiny E6 a E7 pocházející z jiných subtypů HPV.

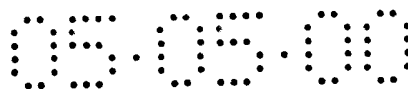
Proteiny podle vynálezu se přednostně exprimují v mikroorganismu *E. coli*. V preferovaném provedení vynálezu se proteiny exprimují s histidinovým ocasem, který obsahuje 5 až 9 a s výhodou šest histidinových zbytků. To je výhodné při čištění.

Protein E7 může v preferovaném provedení vynálezu nést mutaci, aby se redukovalo navázání na rb místo (produkt genu retinoblastomu) a tak se eliminuje libovolná potenciální transformační kapacita. Preferované mutace HPV 16 E7 zahrnují nahrazení Cys₂₄ glycinem nebo kyselinu glutamovou₂₆ glutaminem. V preferovaném provedení vynálezu protein E7 obsahuje obě tyto mutace.

Preferované mutace HPV 18 E₇ zahrnují nahrazení Cys₂₇ glycinem a/nebo kyselinu glutamovou₂₉ glutaminem. Opět je výhodné, aby byly přítomné obě mutace. Jedna nebo obě mutace se mohou také zavést do oblasti p53 E₆, aby se eliminovala potenciální schopnost transformace.

V dalším provedení vynálezu se popisuje fúzní protein E6/E7 pocházející z HPV spojený s imunologickým fúzním partnerem. Preferovaný imunologický fúzní partner je protein D, více se upřednostňuje první třetina proteinu D.

Vynález také poskytuje DNA kódující proteiny podle vynálezu. Takové sekvence se mohou začlenit do vhodného



expresivního vektoru a mohou se exprimovat ve vhodném hostiteli.

Sekvence DNA kódující proteiny podle vynálezu se mohou syntetizovat za použití standardních postupů syntézy DNA, jako je enzymatická ligace, jak se popisuje v publikaci D. M. Roberts et al. *Biochemistry* 1985, 24, 5090-5098, chemickou syntézou, enzymatickou polymerizací *in vitro* nebo technologií PCR využívající například tepelně stabilní polymerázu nebo použitím kombinací všech uvedených technik.

Enzymatické polymerizace DNA se může provést *in vitro* za použití DNA polymerázy, jako je DNA polymeráza I (Klenow fragment) ve vhodném pufru, který obsahuje nukleozid-trifosfáty dATP, dCTP, dGTP a dTTP, při teplotě 10 až 37 °C. Reakce probíhá v objemu 50 µl nebo menším. Enzymatická ligace fragmentů DNA může proběhnout za použití DNA ligázy, jako je T4 DNA ligáza ve vhodném pufru, jako je 0,05 M Tris (pH 7,4), 0,01 M MgCl₂, 0,01 M dithiotritol, 1 mM spermidin, 1 mM ATP a 0,1 mg/ml bovinního sérového albuminu při teplotě 4 °C až teplota místnosti. V obecném případě reakce probíhá v objemu 59 ml nebo méně. Chemická syntéza polyméru nebo fragmentů DNA se může provést běžnými chemii fosfotriesteru, fosfitu nebo fosforamiditu za použití metody na pevné fázi, jak se popisuje v publikaci *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments- A Laboratory Manual* (ed. H. G. Gassen and A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982) nebo v jiné vědecké literatuře na příklad v publikacích M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat and R. C. Titmas, *Nucleic Acids Research*, 1982, 10, 6243, B. S. Sproat, and W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*, 1983, 24, 5771, M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1980, 21, 719, M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 3 185, S. P. Adams, et al., *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 661, N. D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus, and H. Koester, *Nucleic*

Acids Research, 1984, 12, 4539, a H. W. D. Matthes et al., EMBO Journal, 1984, 3, 801.

Způsob podle vynálezu se může provést běžnou rekombinantní metodou, jak se popisuje v publikaci Maniatis et al., Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982-1989.

Tento způsob může zahrnovat kroky:

- i) příprava replikovatelného nebo začlenitelného expresivního vektoru schopného v hostitelské buňce exprimovat polymer DNA obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje protein nebo jeho imunogenní derivát.
- ii) transformaci hostelské buňky uvedeným vektorem.
- iii) kultivaci uvedené transformované hostitelské buňky za podmínek, které umožňují expresi uvedeného polyméru DNA za vzniku uvedeného proteinu a
- iv) získání uvedeného proteinu.

Termín „transformace“ znamená zavedení cizorodé DNA do buňky hostitele. Toho je možné dosáhnout například transformací, transfekcí nebo infekcí s vhodným plazmidovým nebo virovým vektorem za použití běžných metod, jak se popisuje v publikaci Genetic Engineering, Eds. S. M. Kingsman and A.J. Kingsman, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1988. Termín „transformovaný“ nebo „transformant“ znamená výslednou hostitelskou buňku obsahující nebo exprimující cizorodý gen.

Rekombinantní antigen podle vynálezu se s výhodou exprimuje v mikroorganismu *E. coli*. Strategie exprese zahrnuje fúzi E6, E7 nebo fúzi E6/E7 s 1/3-N-terminální části proteinu D pocházející z mikroorganismu *Haemophilus influenzae* B, což je imunologický fúzní partner, který poskytuje epitopy pomocných buněk T. Afinitní polyhistidinový ocas se navrhl na karboxylovém konci fúzního proteinu, což umožňuje zjednodušit

čištění. Takový rekombinantní antigen se nadměrně exprimuje v mikroorganismu *E. coli* jako nerozpustný protein.

Protein podle vynálezu se s výhodou exprimují spolu s thioredoxinem v uspořádání trans (TIT). Společná exprese thioredoxinu v uspořádání trans versus cis je výhodná, aby antigen zůstal bez thioredoxinu, aniž je nutná proteáza. Společná exprese thioredoxinu zjednoduší rozpustnost proteinů podle vynálezu. Společná exprese thioredoxinu má také podstatný vliv na výtěžek čištění proteinu, na rozpustnost čištěného proteinu a na jeho kvalitu.

Expresivní vektory jsou nové a také tvoří součást vynálezu. Replikovatelné expresivní vektory se mohou připravit v souladu s vynálezem tak, že se vektor kompatibilní s hostitelskou buňkou štěpí za vzniku lineárního segmentu DNA, který nese neporušený replikon a kombinováním uvedeného lineárního segmentu s jednou nebo více molekul DNA, které spolu s uvedeným lineárním segmentem kóduje požadovaný produkt, jako je polymér DNA kódující protein podle vynálezu nebo jeho derivát za ligačních podmínek.

Je-li to nutné, během konstrukce vektoru je možné upravit nebo vytvořit polymér DNA.

Volba vektoru je zčásti dána hostitelskou buňkou, která může být prokaryontní nebo eukaryontní, upřednostňuje se však mikroorganismus *E. coli*. Vhodné vektory zahrnují plazmidy, bakteriofágy, kozmidy a rekombinantní viry.

Příprava replikovatelného expresivního vektoru se může provést běžným způsobem vhodnými restrikčními enzymy, polymerizací a ligací DNA. Tyto postupy se popisují například v publikaci Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1982-1989.

Rekombinantní hostitelská buňka se připravila v souladu s vynálezem transformací hostitelské buňky replikovatelným expresivním vektorem podle vynálezu za podmínek transformace. Vhodné transformační podmínky se popisují například

v publikaci Maniatis et al., Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982-1989 nebo „DNA Cloning“ Vol. II, D. M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

Volba transformačních podmínek závisí na hostitelské buňce. Tak bakteriální hostitel, jako je *E. coli*, se může ošetřit roztokem CaCl_2 (Cohen et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) nebo roztokem obsahujícím směs RbCl , MnCl_2 , acetát draselný a glycerol a pak kyselinou 3-[N-morfolino]-propansulfonovou, RbCl a glycerolem. Savčí buňky v kultuře se mohou transformovat vektorem DNA, který se společně srážel s vápníkem. Vynález také popisuje hostitelskou buňku transformovanou replikovatelným vektorem podle vynálezu.

Kultivace transformované hostitelské buňky za podmínek, které umožňují expresi polyméru DNA, jak se popisuje například v publikaci Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982-1989 nebo „DNA Cloning“ Vol. II, D. M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985. Upřednostňuje se, aby se buňky doplnily nutriem a kultivovaly se při teplotě nižší než 50°C .

Produkt se získal běžnými metodami, které závisí na volbě hostitele. V případě, že hostitelskou buňkou je bakterie, jako je například *E. coli*, mohou se lyzovat fyzikálním způsobem, chemicky nebo enzymaticky a proteinový produkt se izoluje z výsledného lyzátu.

V případě, že hostitelskou buňkou je savčí buňka, produkt se může v obecném případě izolovat z nutričního média nebo extraktů, které neobsahují buňky. Běžná metoda izolace proteinu zahrnuje selektivní precipitaci, adsorpční chromatografii a afinitní chromatografii zahrnující afinitní kolonu s monoklonálními protilátkami.

V případě, že se proteiny podle vynálezu exprimují s histidinovým ocasem (His tag). Proteiny se mohou jednoduše čistit afinitní chromatografií za použití afinitní chromatografické kolony za použití kovových iontů (IMAC).

Sekundární chromatografické čištění, jako je například za použití Q-sefary, se může využít buď před nebo po použití kolony IMAC s výtěžkem vysoce čištěného proteinu. Jestliže imunologický fúzní partner je C-LYTA, pak je možné využít afinitu C-LYTA k cholinu a/nebo k DEAE za účelem čištění uvedeného produktu. Produkty obsahující C-LYTA a his tag se mohou jednoduše a účinně čistit v procesu se dvěma kroky, které zahrnují diferenciální afinitní chromatografii. Jeden krok zahrnuje afinitu His tag vůči koloně IMAC. Druhý krok zahrnuje afinitu C-terminální oblasti LYTA k cholinu nebo DEAE.

Proteiny obsahující C-LYTA a his tag jsou nové a jsou zahrnuty ve vynálezu. Při čištění uvedených proteinů je možné dosáhnout vysokého stupně čistoty (vyšší než 80 %, s výhodou vyšší než 90 %) pomocí jednoduchého dvoustupňového diferenciálního afinitního postupu.

Proteiny podle vynálezu se připravují alespoň z 80 % čisté. Více se upřednostňuje 90 % čistota. Čistota se posuzuje na SDS PAGE. Při testu SDS PAGE za redukčních podmínek protein představuje hlavní jediný pruh a analýza westernovým přenosem vykazuje méně než 5 % kontaminace proteinem hostitelské buňky.

Vynález popisuje farmaceutickou kompozici obsahující protein podle vynálezu ve farmaceuticky přijatelném excipientu. Kompozice preferované vakcíny obsahuje alespoň protein D-E6 pocházející z HPV 16 nebo jeho derivát spolu s proteinem D-E7 pocházející z HPV 16. V jiném případě E6 a E7 se mohou vyskytovat v jedné molekule, přičemž se upřednostňuje fúze proteinu D E6/E7. Taková vakcína může obsahovat buď protein E6 nebo E7 nebo oba tyto proteiny pocházející z HPV 18. Upřednostňuje se forma fúzního proteinu protein D-E6 nebo protein D-E7 nebo fúzní protein protein D E6/E7. Vakcíny podle vynálezu mohou obsahovat buď HPV antigeny pocházející z HPV 16 nebo 18. Vakcína může zvláště obsahovat antigenní monoméry L1 nebo L2. V jiném případě takové antigeny L1 nebo L2 se mohou

vyskytovat společně jako částice podobné viru nebo samotný protein L1 se může vyskytovat jako partikule podobné viru nebo jako kapsomérovou strukturu. Takové antigeny, částice podobné viru a kapsoméry jsou dobře známy v oboru (popisují se například v dokumentech WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 a WO 93/02184.

Tako se mohou zahrnout časné proteiny, jako je E2 nebo s výhodou E5. Vakcína podle vynálezu může navíc obsahovat antigeny z jiných kmenů HPV. Upřednostňují se antigeny z kmenů HPV 6, HPV 11, HPV 31 nebo HPV 33.

Příprava vakcíny se v obecném případě popisuje v publikaci Vaccine Design-The subunit and adjuvant approach (Ed. Powell and Newman) Pharmaceutical Biotechnology Vol. 6 Plenum Press 1995. Kapsulizace s lipozómy se popisuje v dokumentu Fullerton, US patent č. 4,235,877.

Proteiny podle vynálezu se přednostně vyskytují ve vakcinačních formulacích podle vynálezu. Vhodné adjuvans zahrnuje sole hliníku, jako je gel hydroxidy hlinitého (alum) nebo fosforečnan hlinitý. Mohou to také být sole vápníku, železa nebo zinku nebo může jít o nerozpustnou suspenzi acetylovaného tyrozinu nebo acetylovaného cukru, kationicky nebo anionicky derivatizovaných polysacharidů nebo polyfosfazenů.

Ve formulaci podle vynálezu se preferuje, aby adjuvans v kompozici indukovalo odezvu TH1. Vhodné systémy adjuvans zahrnují například kombinaci monofosforyl-lipidu A. Upřednostňuje se 3-de-O-acetylovaný monofosforyl-lipid A (3D-MPL) spolu se solemi hliníku.

Zesílený systém zahrnuje kombinaci monofosforyl-lipidu A a derivát saponinu zvláště v kombinaci QS21 a 3D-MPL, jak se popisuje v dokumentu WO 94/00153 nebo méně reaktogenní kompozici, kde QS21 je doplněn cholesterolem, jak se popisuje v dokumentu WO 96/33739.

Zvláště silné adjuvans zahrnuje QS21, 3D-MPL a tokoferol v emulzi olej ve vodě, jak se popisuje v dokumentu WO 95/17210 a je preferovanou formulací.

V jednom provedení vynálezu vakcína obsahuje protein D (nebo jeho derivát)-E6 nebo protein D (nebo jeho derivát)-E7 a adjuvans je monofosforyl-lipid A nebo jeho derivát.

Upřednostňuje se, aby vakcína obsahovala saponin, více se upřednostňuje QS21.

Upřednostňuje se formulace, která obsahuje emulzi olej ve vodě a tokoferol. Vynález popisuje způsob produkce vakcinační formulace obsahující směs proteinu podle vynálezu spúolu s farmaceuticky přijatelným excipientem, jako je 3D-MPL.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Konstrukce fúze protein D1/3-E7-His(HPV16)

kmene mikroorganismu exprimující se v E. coli

1. Konstrukce expresivního plazmidu

- a) Plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z Influenzae se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 → Thr 127 zralého proteinu D Haemophilus influenzae, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His). Tento plazmid se použil pro expresi fúzního proteinu D1/3-E7-His.
- b) HPV genomové sekvence E6 a E7 typ HPV 16 (popisuje se v publikaci Dorf et al., Virology 1985, 145, p.181-185) se amplifikovaly genomu HPV 16 plné délky klonovaného do pBR322 (získal se z instituce Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum für human

pathogen Papillomaviruses-D 69120-Heidelberg) a subklonoval se do pUC19 za vzniku TCA 301 (=pRIT14462).

Konstrukce plazmidu TCA 308 (=pRIT14501), jde o plazmid exprimující fúzní protein-D1/3-E7-His

Nukleotidové sekvence odpovídající aminokyselinám 1 → 98 proteinu E7 se amplifikovaly z pRIT14462. Během polymerázové řetězcové reakce vznikly na 5' a 3' koncích sekvencí E7 restriční místa NcoI a SpeI, která umožňují inzerci do stejných míst plazmidu pMGMC5 Prot D1/3 za vzniku plazmidu TCA308 (=pRIT14501). Inzert se sekvenoval, aby se ověřilo, zda během polymerázové řetězcové reakce nedošlo k žádným modifikacím. Sekvence uvedené fúze protein-D1/3-E7-His (HPV 16) se popisuje na obrázku č. 1.

1) transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14501 se zavedl do E. coli AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL.

2) Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese Prot-D1/3-E7-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14501 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 μ g/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E7-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

Příklad 2: Charakterizace fúze protein D1/3-E7-His (HPV 16)

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem. Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 33 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním anti-protein D a Ni-NTA konjugátem spojeným s telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 5 % celkového proteinu, jak se zobrazilo na SDS-polyakrylamidovém gelu barveného podle Coomassie.

Příklad 3: Čištění protein-D1/3-E7-His (HPV 16)

Jeden litr kultury bakterií exprimujících protein-D1/3-E7-His se centrifugoval při 11 300 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C a buněčný pelet se uchovával při teplotě -80 °C až do doby ošetření. Po resuspenzaci v pufru PBS o objemu 75 ml se buňky mikroorganismu *E. coli* poruší na zařízení French pressure cell press (SLM Aminco®) při tlaku 140 MPa. Lyzované buňky se peletovaly centrifugací při 17 000 g po dobu 30 minut. Pelet obsahující protein -D1/3-E7-His su pH 7,5, pak dvakrát ve 30 ml 50 mM se promyl jednou ve 30 ml 2M NaCl, 50 mM fosforečnanu pH 7,5. Proteiny se rozpustí po dvou hodinách inkubace peletu ve 30 ml 8 M močoviny, 50 mM fosforečnanu pH 7,5 při teplotě místnosti. Buněčný debris se odstraní centrifugací po dobu 15 minut při 17 000 g a při teplotě 4 °C. Čištění proteinu se provedlo při teplotě místnosti. 15 ml rozpustného proteinu se aplikovalo na 5 ml Ni²⁺NTA (Qiagenu) pryskyřice (kolona Pharmacia XK 16/20), která se uvedla do rovnováhy 8 M močovinou, 50 mM fosforečnanem pH 7,5 při průtokové rychlosti 0,2 ml/min. Kolona se promývala stejným pufrem až absorbance při vlnové délce 280 nm dosáhla základní hodnoty. Protein se vymyl gradientem 0 až 600 mM imidazolu v 8 M močoviny, 50 mM fosforečnanu pH 7,5. Průtoková rychlost

těchto dvou posledních kroků je 1 ml/min. Vymyté frakce se analyzovaly elektroforézou na SDS polyakrylovém gelu a westernovým blotem. ProtD1/3-E7-His se zviditelnil barvením Coomassieovou modří, polyklonálním anti-proteinem D nebo monoklonálními protilátkami proti E7. Tento pruh se jeví jako hlavní jediný pruh o molekulové hmotnosti 32 000 a odhadl a jeho čistota se odhadla na 95 %. Polyklonální protilátky proti proteinu E. coli neobsahovaly žádné kontaminanty z bakterií E. coli.

Za účelem odstranit močovinu se 9 ml čištěného antigenu v koncentraci 1,33 g/ml (Bradford) se dialyzovalo proti 3 litrům pufru PBS přes noc při teplotě místnosti. Pak následuje dialýza po dobu 4 hodin proti čerstvému pufru PBS. 80 % protein, který není kontaminován močovinou, se získal jako rozpustný protein. Aby se odstranily kontaminující endotoxiny 6 ml dialyzovaného proteinu se inkubovalo s 1 ml gelu Affiprep (Biorad) po dobu 3 hodin při teplotě 4 °C za jemného míchání. Druhá inkubace s pryskyřicí Affiprep o objemu 500 µl se uskutečnila za účelem minimalizace množství endotoxinu na hodnotu 8,8 EU/µg proteinu. Po sterilní filtraci na filtračním zařízení s póry o velikosti 0,22 µm (Millex 0,22 GV, Millipore) se u prot-D1/3-E7-His při koncentraci 0,665 mg/ml testovala jeho stabilita. Analýza na SDS PAGE naprokovála žádný vývoj proteinu po 7 dnech inkubace při teplotě -20 °C, 4 °C, teplotě místnosti nebo 37 °C.

Příklad 4: Konstrukce fúze protein-D1/3-E6-his/HPV 16, který se exprimuje v kmeni mikroorganismu E. coli

1. Konstrukce expresivního plazmidu

- a) Plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu WO97/01640, kde kodony 4-81 kódující oblasti NS1 pocházející z Influenza se nahradily kodony, které odpovídají zbytkům Ser 20 → Thr 127 zralého proteinu D mikroorganismu Haemophilus influenzae kmen 722,

biotyp 2 (H. Janson et al., 1991, *Infection and Immunity*, Jan. p. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového konce (6 His). Tento plazmid se používá při expresi fúzního proteinu D1/3-E6-his.

- b) HPV genomové sekvence E6 a E7 typu HPV 16 (popisuje se v publikaci Dorf et al., *Virology* 1985, 145, p. 181-185) se amplifikovaly z genomu HPV 16 v celé délce klonovaného do pBR322 (který se získal v instituci Deutches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum für human pathogen Papillomaviruses - D 69120 - Heidelberg)
- c) subklonovaly se do pUC19 za vzniku TCA 301 (=pRIT14462).

Konstrukce plazmidu TCA 307 (=pRIT14497): plazmid exprimující fúzi protein-D1/3-E6-His/HPV16

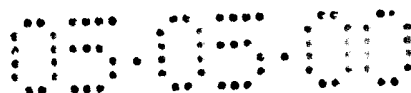
Nukleotidové sekvence odpovídající aminokyselině.

Oblast 1 → 151 proteinu E6 se amplifikovala z pRIT14462. Během polymerázové řetězcové reakce se na 5' a 3' koncích sekvencí E6 vytvořily restrikční místa NcoI a SpeI, které umožňují začlenění stejných míst plazmidu pMGMCs protD1/3 za vzniku plazmidu TCA307 (=pRIT14497) (zobrazeno na obrázku č. 2). Inzert se sekvenoval za účelem ověření, že během polymerázové řetězcové reakce nedošlo žádné modifikaci. Kódující sekvence fúze protein-D1/3-E6-His se popisuje na obrázku č. 3.

2. Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14497 se zavedl do *E. coli* AR58 (popisuje se v publikaci Mott et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 88) defektního lysogenu λ , který obsahuje represor promotoru λ pL citlivého na teplo.

3. Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese Prot-D1/3-E6-His



Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14497 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 µg/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E6-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovával se při teplotě -20 °C.

4. Charakterizace fúze protein D1/3-E6-His (HPV 16)

Příprava extraktů

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Analýza SDS-polyakrylamidových gelů barvených podle Coomassie a westernovy bloty

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.

Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 32 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním anti-proteinem D a Ni-NTA konjugátem spojeným telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 5 % celkového proteinu.

5. Společná exprese s thioredoxinem

Analogickým způsobem jako v případě exprese prot D1/3 E7 His z HPV 18 (příklad 13) se mikroorganismus E. coli kmen AR58 transformoval plazmidem kódujícím thioredoxin a protein D 1/3 E7 His (HPV 16).

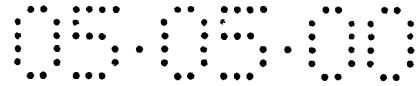
Příklad 5: Čištění prot D 1/3 E6 His (HPV 16)

Rekombinantní antigen HPV-16 ProtD1/3E6 se exprimoval v mikroorganismu *E. coli* (AR58). Strategie exprese zahrnuje fúzi E6 s 1/3-N-terminální částí proteinu D z *Haemophilus influenzae*, což je imunologický fúzní partner poskytující epitopy pomocných T buněk. Na carboxylovém konci fúzního proteinu se vytvořil afinitní polyhistidinový konec. Rekombinantní antigen se nadměrně exprimoval v *E. coli* jako nerozpustné proteiny.

Při rozpouštění antigenů jsou nutná denaturační činidla. Při nepřítomnosti denaturačního činidla ProtD1/3-E6-His se sráží při neutrálním pH. Za účelem obejít problémy rozpustnosti se provedla společná exprese těchto proteinů s thioredoxinem v poloze trans (TIT).

Bakteriální exprese se provedla v kultivačním médiu LB v přítomnosti 0,05 mg/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. V případě, že se společně exprimuje thioredoxin přidá se 0,2 mg/ml ampicilinu. Exprese rekombinantního proteinu se termálně indukuje při teplotě 42 °C, přičemž optická hustota (OD 600 nm) dosahuje hodnoty 0,4. Exprese proteinu se udržuje po dobu 4 hodin. Čištění se provádí podle následujícího protokolu.

Pelet buněčné kultury	60 OD 600 nm 1 mM pefabloc, 2 M NaCl, PBS pH 7,4 (pufr A)
Zařízení na otevření buněk „French press“	Tři pasáže, 140 MPa
Centrifugace	17 000 g, 30 minut, 4 °C
Promytí peletu	2 M NaCl, PBS pH7,4 (pufr B) x1 PBS pH 7,4 (pufr C) x2
Centrifugace	17 000 g, 30 minut, 4 °C
Rozpouštění peletu	6 M guanidinchlorid, 20 mM PO ₄ , pH7,0 (pufr D) přes noc při teplotě 4 °C
Centrifugace	17 000 g, 30 minut, 4 °C
Aplikace supernatantu na IMAC	Ekvilibrace: 6 M guanidinchlorid, 20 mM PO ₄ , pH 7,0 (pufr D) Eluce: imidazolové kroky (0,025M, 0,1M, 0,5 M) v 8 M



	močovně, 20 mM PO ₄ , pH 7,0
Affiprep polymixin	8 M močovina, 20 mM PO ₄ , pH 7,0 (pufr E), 2 hod. při teplotě místnosti
Dialýza	4 M močovina, 0,5 M arginin, 150 mM NaCl, 10 mM PO ₄ , pH 6,8 (pufr I) 2 M močovina, 0,5 M arginin, 150 mM NaCl, 10 mM PO ₄ , pH 6,8 (pufr J) 0 M močovina, 0,5 M arginin, 150 mM NaCl, 10 mM PO ₄ , pH 6,8 (pufr K)

Buňky se účinně porušily homogenizací za vysokého tlaku za použití zařízení „French pressure device“. Antigen se extrahoval s vysokou koncentrací denaturačního činidla. Tento první krok otevírá buněčnou stěnu bakterie a antigen se extrahuje z bakteriální nerozpustné frakce. Následující čištění probíhá z kultury o objemu 4 litry.

Pufry:

- A. PBS/ 2M NaCl / 1 mM Pefabloc
- B. PBS / 2 M NaCl
- C. PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM NaH₂PO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ pH 7,4.
- D. 6 M guanidinchlorid, 20 mM PO₄ (NaH₂PO₄(2H₂O)/K₂HPO₄(3H₂O) pH 7,0

Počáteční materiál je 10 lahví, kdy každá obsahuje 400 ml kultury.

Buněčná pasta se suspenduje v pufru A, aby hodnota optické hustoty při vlnové délce 600 nm byla 60 (v tomto případě 240 ml pufru A). Pak následuje lyze třemi průchody zařízením „French press disruptor“ (při tlaku 140 MPa). Lyzované buňky se peletovaly po dobu 30 minut při 15 000 g při teplotě 4 °C. Bakteriální buněčný pelet obsahující rekombinantní protein se

promyje jednou pufrem B při objemu 240 ml, pak dvakrát 240 ml pufrem C.

Prot D E6-His(TIT) se rozpouští ve 240 ml pufrem D přes noc při teplotě 4 °C na rotujícím kole. Buněčný debris se odstraní centrifugací při 15 000 g po dobu 30 minut a při teplotě 4 °C. Supernatant (230 ml) se uchovával při teplotě -20 °C. Materiál se pak aplikoval na chromatografii AMAC.

Chelatační ligand NTA (kyselina nitrilo-tri-octová) se přichytil na agarózový podklad (Qiagen). Ligand NTA se nabil iontem niklu, se kterým interaguje přes 4 ze 6 koordinačních míst niklu. Dvě zbývající koordinační místa niklu silně interagují s histidinovými zbytky proteinu, který obsahuje 6x His-tag. Eluce se dosáhlo kompeticí s imidazolem, který se váže na Ni-NTA a nahrazuje antigen s tag.

Použil se Ni-NTA agaróza firmy Qiagen (kat. č. 30 250).

Roztoky:

D: 6 M guanidinchlorid, 20 mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O)/K₂HPO₄(3H₂O)) pH 7,0

E: 8 M močovina, 20 mM PO₄ ((NaH₂PO₄ (2H₂O)/K₂HPO₄(3H₂O)) pH 7,0

F: E + 0,025 M imidazol

G: E + 0,1M imidazol

H: E + 0,5 M imidazol

0,5 M NaOH

deionizovaná voda

0,02 % NaN₃

Čištění:

a) Kolona se naplnila pryskyřicí (15 ml pryskyřice/230 ml vzorku) a uvedla se do rovnováhy 10 objemy kolony (C.V.) pufrem D při rychlosti průtoku 15 cm/hod.

b) Supernatant s rozpouštěné frakce se vnesl injekcí do kolony při rychlosti 15 cm/hod.



- c) Kolona se promyla při rychlosti 15 cm/hod. pufrem D až hodnota OD při vlnové délce 280 nm dosáhla hodnoty pozadí.
- d) Kolona se promývá 2 objemy kolony pufru E při rychlosti průtoku 15 cm/hod. Shromažďují se promývací frakce.
- e) Kolona se nejprve vymývá 5 objemy kolony pufru F. Odstraní se hlavní kontaminant s molekulovou hmotností 25 000.
- f) Kolona se vymývá 2 objemy pufru G.
- g) Kolona se nakonec vymyje 3 objemy pufru H. Dojde k eluci antigenu.

Frakce obsahující antigen se spojí (30 ml).

Endotoxin se odstraní chromatografií na Affiprep.

Podklad Affi-Prep® Polymixin obsahuje polymixin B odpovídající stupni čistotě USP spojený s Affi-Prep® Matrix. To způsobuje jeho vysoká afinita k části lipidu A endotoxinů. Polymixin B váže molekuly endotoxinu s vysokou kapacitou a selektivitou.

Roztoky:

E: 8M močovina, 30 mM PO₄ ((NaH₂PO₄ (2H₂O)/K₂HPO₄(3H₂O)) pH 7,0 (apyrogenní).

0,5 M NaOH

deionizovaná apyrogenní voda

Postup:

- 1) pryskyřice Affi-Prep® Polymixin se promyje 10 objemy 0,1 M roztokem NaOH, pak následuje promytí 10 objemy vody bez pyrogenů.
- 2) Pryskyřice se přivede do rovnováhy 10 objemy pufru E.
- 3) 15 ml (polovina shromážděného eluátu) vzorku eluovaného z kolony IMAC se inkubuje s 3 ml pryskyřice Affi-Prep® Polymixin ve vsádkovém modu.
- 4) Inkubace probíhá při teplotě místnosti po dobu 4 hodin nebo přes noc při teplotě 4 °C na otáčejícím se kole.

- 5) Vzorek se centrifuguje po dobu 10 minut při 2 000 g (Beckman GS-6R).
- 6) Shromažďuje se supernatant obsahující antigen a provedou se testy analyzující endotoxiny a protein.
- 7) Pryskyřice je vyřazena.

Malé molekuly procházejí semi-permeabilní membránu, zatímco velké molekuly zůstávají. Proces dialýzy je řízen rozdílem koncentrace rozpuštěné látky na dvou stranách membrány. Zavádí se nový roztok pufru až složení pufru se na každé straně vyrovná.

Pufry:

I: 4 M močovina, 0,5 M arginin, 10 mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O)/K₂HPO₄ (3H₂O)) pH 6,8

J: 2 M močovina, 0,5 M arginin, 0,15 M NaCl, 10 mM PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O)/K₂HPO₄ (3H₂O)) pH 6,8

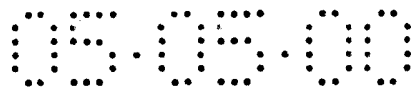
K: 0 M močovina, 0,5 M arginin, 0,15 M NaCl, 10 M PO₄ (NaH₂PO₄ (2H₂O)/K₂HPO₄ (3H₂O)) pH 6,8

- 1) Vzorek (o objemu 15 ml) se zavedl do dialyzační trubice (průměr 20,4 mm a výška 6 cm).
- 2) Dialyzační trubice se umístila do 2 litrového cylindru, který obsahuje pufr I za stálého míchání při teplotě 4 °C a po dobu 2 hodin.
- 3) Dialyzační trubice se umístila do 2 litrového cylindru, který obsahuje pufr J za stálého míchání při teplotě 4 °C po dobu 2 hodin.
- 4) Dialyzační trubice se umístila do 2 litrového cylindru, který obsahuje pufr K za stálého míchání při teplotě 4 °C a přes noc. Pufr se vyměnil a dialýza probíhá další 2 hodiny při teplotě 4 °C.

(Použilo se Mollipore Sterile Millex-GV 0,22 μ, 13 mm.

Kat. č. SLGV0130S.

Všechny kroky se uskutečnily při teplotě místnosti (≈22 °C). Antigen se jeví být stabilní.



Roztok antigenu se filtruje skrz filtr s póry 0,2 μm , aby se předešlo libovolnému bakteriálnímu růstu. Antigen se uchovává při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve zkumavkách Nunc.

Charakterizace:

ProteinD1/3E6His je charakterizován následujícím způsobem:

ProteinD1/3E6His je peptid obsahující 273 aminokyselin, přičemž 112 aminokyselin pochází z části proteinu D. Teoretická molekulová hmotnost fúze proteinD1/3E6His je 32 000 a migruje na gelu SDS-PAGE jako protein s molekulovou hmotností 33 000. Teoretický bod fúze proteinD1/3E6His je 8,17.

Virový protein E6 je základní protein obsahující 14 cysteinových zbytků, přičemž 8 z nich (Cys 30, 33, 63, 66 a Cys 103, 106, 136, 139) se podílí na dvou C-terminálních vazebných motivech zinku.

ProteinD1/3E6His se exprimuje v nerozpustné formě v mikroorganismu *E. coli* kmen AR58 spolu thioredoxinem v poloze trans. Buněčná kultura se produkuje v kultivačních lahvích o objemu 400 ml. Z jednoho litru kultury je možné získat 5,4 mg proteinu o čistotě 95 %.

Příklad 6: : Konstrukce fúze protein D1/3-E6E7-His(HPV16)

kmene mikroorganismu exprimující se v *E. coli*

1) Konstrukce expresivního plazmidu

a) Plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z *Influenzae* se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 \rightarrow Thr 127 zralého proteinu D *Haemophilus influenzae*, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, *Infection and Immunity*, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a



kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His). Tento plazmid se použil při expresi fúzního proteinu D1/3-E6E7-his.

- b) HPV genomové sekvence E6 a E7 typ HPV 16 (popisuje se v publikaci Dorf et al., Virology 1985, 145, p.181-185) se amplifikovaly z genomu HPV 16 plné délky klonovaného do pBR322 (získal se z instituce Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum für human pathogen Papillomaviruses-D 69120-Heidelberg) a subklonovaly se do pUC19 za vzniku TCA 301 (=pRIT14462).
- c) Kódující sekvence E6 a E7 v TCA301 (=pRIT14462) se upravily syntetickým oligonukleotidovým adaptorem (začleněným mezi restriční místa AflIII a NsiI), který vytváří delecii 5 nukleotidů mezi geny E6 a E7 za účelem odstranění stop kodonu E6 a vzniku kódujících sekvencí E6 a E7 v plazmidu TCA309 (=pRIT14556) (zobrazuje obrázek č. 4).

Konstrukce plazmidu TCA311(=pRIT14512): plazmid exprimující fúzi protein-D1/3-E6E7-His/HPV16

Nukleotidové sekvence odpovídající aminokyselinám 1 → 249 proteinu E6E7 se amplifikovaly z pRIT14556. Během polymerázové řetězcové reakce vznikly na 5' a 3' koncích sekvencí E6E7 restriční místa NcoI a SpeI, která umožňují inzerci do stejných míst plazmidu pMGMCs Prot D1/3 za vzniku plazmidu TCA311(=pRIT14512). Inzert se sekvenoval, aby se ověřilo, zda během polymerázové řetězcové reakce nedošlo k žádným modifikacím. Kódující sekvence uvedené fúze protein-D1/3-His se popisuje na obrázku č. 6.

2. Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14501 se zavedl do E. coli AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahující represor promotoru λ pL citlivého na teplo.



3) Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese Prot-D1/3-E6E7-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14512 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 µg/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E6E7-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

4) Charakterizace fúze protein D1/3-E6E7-his

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzovaly elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.

Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 48 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním anti-proteinem D a Ni-NTA konjugátem spojeným s telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 1 % celkového proteinu.

Příklad 6b:

Fúzní protein Lipo D1/3 a E6-E7 pocházející z HPV16 se exprimoval *E. coli* v přítomnosti thioredoxinu.

N-konec pre-proteinu obsahuje (388 aminokyselin) obsahuje MDP zbytky, po kterých následuje 16 aminokyselin signálního peptidu lipoproteinu D (z *Haemophilus influenzae*), který se štěpí *in vivo* za vzniku zralého proteinu (370 aminokyselin). Lipoproteinovou část (aminokyselina 1 až 127) následují

proteiny E6 a E7 spojené ve fúzi. C-konec proteinu je prodloužen motivem TSGHHHHH.

Protein se čistil podle následujícího protokolu:

Příklad 7: Čištění fúze lipoprotein D1/3-E6-E7-His(TIT)

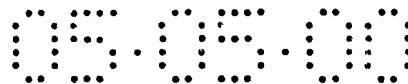
A) Rozpouštění:

Buněčná pasta se suspenzovala v pufru 2 M NaCl, 20 mM fosforečnanu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot (2\text{H}_2\text{O})/\text{K}_2\text{HPO}_4(3\text{H}_2\text{O})$) pH 7,5 v přítomnosti 1 mM Pefabloc, který slouží jako inhibitor proteáz před lyzí buněk, tak, aby se dosáhla hodnota OD při 600 nm 60. Lyze buněk se provedla třemi průchody zařízením „French press disruptor“ (140 MPa). Lyzované buňky se peletovaly po dobu 30 minut při 15 000 g při teplotě 4 °C. Za účelem redukovat množství endotoxinu, se bakteriální buněčný pelet obsahující rekombinantní protein dvakrát promyl 4M močovinou, 2 M NaCl, 20 mM fosforečnanem pH 7,5, jednou 2 % Empigen BB, 20 mM fosforečnan pH 7,5 a nakonec dvakrát 20 mM fosforečnanovým pufrem pH 7,0, aby se odstranily stopy detergentu (každé promytí se uskutečnilo v objemu, jako byl objem buněčné suspenze). LipoProt.D1/3-E6-E7-His(TIT) se rozpustil (ve stejném objemu, jako byl objem buněčné suspenze) v 8 M močovině s 0,2 M β -merkaptotanolem (βMeOH), 20 mM PO_4 pH 12 přes noc při teplotě 4 °C. Pak následují dvě hodiny inkubace při teplotě místnosti. Buněčný debris se odstranil centrifugací po dobu 30 minut při 15 000 g při teplotě 4 °C. Supernatant se uchovával při teplotě -20 °C.

B) Čištění:

1) Chromatografie s výměnou aniontů na Q-sefaróze s rychlým průtokem

Zmrazený vzorek o objemu 225 ml se rozmrazil při teplotě místnosti v lázni se studenou vodou a aplikoval se na kolonu s Q-sefarózou s rychlým průtokem (Pharmacia, XK 26/20), které se uvedla do rovnováhy 8 M močovinou, 0,2 M βMEOH , 20 mM PO_4



pH12 (30 ml pryskyřice/225 ml supernatantu) při rychlosti průtoku 45 cm/hod.. Kolona se promývala 8 M močovinou, 0,2 M β MEOH, 20 mM PO₄ pH 12, až do doby, kdy hodnota optické hustoty při vlnové délce 280 nm dosáhla základní hodnoty. Pak následuje druhé promytí 8 M močovinou, 20 mM fosforečnanem pH 12 (objemem, který odpovídá dvěma objemům kolony). Eluce se provedla NaCl (0,1 M, 0,25 M, 0,5 M NaCl, kdy v každém kroku se použil objem odpovídající 2 objemům kolony) v 8 M močovinně, 20 mM fosforečnanem pH 12 při rychlosti průtoku 45 cm/hod.. Shromáždily se frakce eluované 0,5 M NaCl.

2) Afinitní chromatografie s ionty kovu (IMAC)

Shromáždily se frakce eluované z Q sefarózy 0,5 M NaCl a dialyzovaly se proti 0,2 M NaCl, 8 M močovinně, 20 mM fosforečnanu pH10 dříve než se nanesly na kolonu s Ni²⁺+NTA (Qiagen) (XK 26/20, Pharmacia), která se uvedla do rovnováhy 8 M močovinou, 20 mM PO₄ pH 12 (30 ml pryskyřice/ 61 ml vzorku) při rychlosti průtoku 5,6 cm/hod. Kolona se promyla 8 M močovinou, 20 mM PO₄ pH 12 až se dosáhlo základní hodnoty optické hustoty. Pak se kolona promyla 8 M močovinou, 20 mM PO₄ pH 10. Antigen se eluoval imidazolovými kroky (0,025 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,5 M imidazolem v každém kroku se použil objem odpovídající dvou objemům kolony) v 8 M močovinně, 20 mM PO₄ pH 10 při rychlosti průtoku 45 cm/hod. Shromáždily se frakce eluované 0,05 M imidazolem.

C) Koncentrace

Na membráně Filtron Omega (Amicon), která odděluje molekuly o molekulové hmotnosti 5 000, za stálého míchání při teplotě místnosti se zvýšila koncentrace vzorku přibližně 5 krát (0,407 mg/ml)

D) Dialýza



Koncentrovaný vzorek se dialyzoval při teplotě místnosti v krocích proti snižující se koncentraci močoviny (4M, 2 M močovina) v 0,5 M argininu, 150 mM NaCl, 10 mM PO₄ pH 6,8. Poslední dialýza proti 0,5 M argininu, 150 mM NaCl, 10 mM PO₄ pH 6,8 proběhla při teplotě 4 °C.

Výsledky:

Krok IMAC je schopen odstranit kontaminanty s molekulovou hmotností 32 000 v 0,0025 M imidazolu, který eluuje také stejný antigen. Čistota antigenu eluovaného 0,05 M imidazolem se odhaduje na gelu SDS-PAGE obarveným Coomassieovou modří na 90 %. Po tomto kroku čištění vzorek neobsahuje žádné kontaminanty mikroorganismu *E. coli*. Analýza westernovým přenosem užívající protilátky specifické k N- a/nebo C-konci antigenu vykazuje heterogenní patern pruhů s vyšší a nižší molekulovou hmotností proteinu v plné délce. Tento patern naznačuje přítomnost agregátů a neúplně zpracovaného proteinu a/nebo degradovaného proteinu, který se společně čistily s proteinem v plné délce.

Příklad 8: Konstrukce fúze ProtD1/3-E7, která se exprimuje v *E. coli* kmen B1002

Mutovaný (cys24 → gly, glu26 → gln) typ HPV16

1) konstrukce expresivního plazmidu

Počáteční materiál:

- a) plazmid pRIT14501 (=TCA 308), který kóduje fúzi ProtD1/3-E7-His
- b) plazmid LITMUS 28 (New England Biolabs kat. č. 306-28) klónovací vektor odvozený od pUC
- c) plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z *Influenzae* se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 → Thr 127 zralého

proteinu D Haemophilus influenzae, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His).

Konstrukce plazmidu pRIT 14733(=TCA347): plazmid exprimující fúzi protein-D1/3-E7 mutovaný (cys24 → gly, glu26 → gln) s koncem His

Fragment NcoI-XbaI z pRIT14501(=TCA 308) nesoucí kódující sekvenci genu E7 pocházející z HPV 16 prodloužený koncem His se subklonoval do vektoru Litmus 28 použitelného pro mutagenezi za vzniku pRIT 14909(=TCA337). Dvojitá mutace cys24 → gly (popisuje se v publikaci Edmonds and Vousden, J. Virology 63: 2650 (1989) a glu26 → gln (popisuje se v publikaci Phelps et al., J. Virology 66: 2418-27 (1992) se vybrala za účelem omezení navázání antionkogenního produktu genu retinoblastomu (pRB). Zavedení mutací genu E7 se realizovalo kitem „Quick Change Site directed Mutagenesis (Stratagene kat. č. 200518) za vzniku plazmidu pRIT 14681(=TCA343). Po ověření přítomnosti mutací a integrity celého genu E7 sekvenováním se mutovaný gen zavedl do vektoru pRIT 14589 (=pMG MCS ProtD1/3) za vzniku plazmidu pRIT 14733 (=TCA347) (obrázek č.7).

Sekvence fúze protein-D1/3-E7 mutovaný (cys24 → gly, glu26 → gln)-His se popisuje na obrázku č. 8.

2) Konstrukce fúze protD1/3-E7mutovaný(cys24 → gly, glu26 → gln)-His/HPV16

Plazmid pRIT14733 se zavedl do E. coli AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahující represor promotoru λ pL citlivého na teplo za vzniku kmene B1002. Selekcce transformantů se provedla na základě rezistence na kanamycin.

3) Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese Prot-D1/3-E7-mutovaný(cys24 → gly, glu26 → gln)-His/HPV16

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14733 (kmen B1002) se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 µg/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E7mutovaný-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

4) Charakterizace fúze protein D1/3-E7-mutovaný(cys24 → gly, glu26 → gln)-His typ HPV16

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

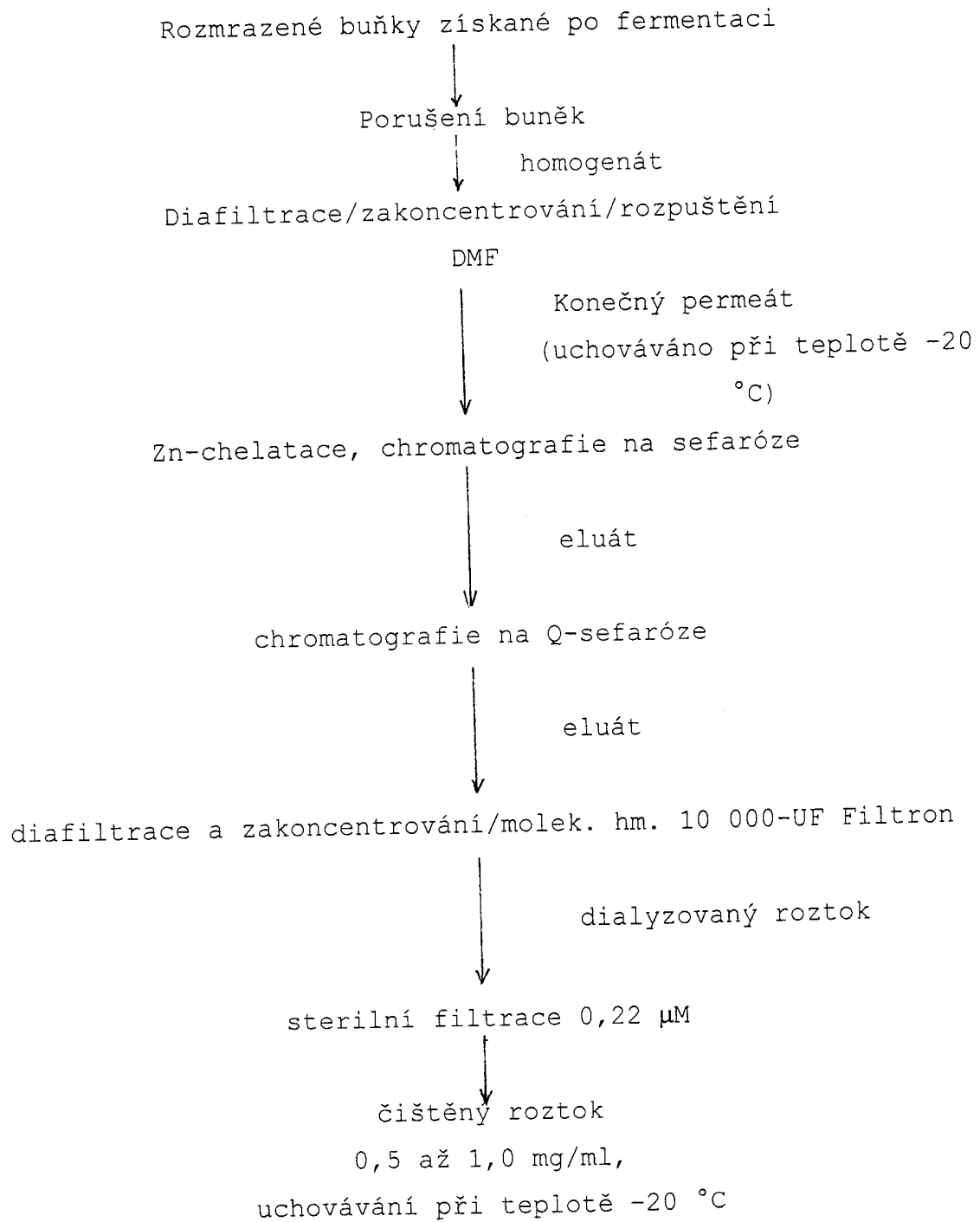
Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzovaly elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.

Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 33 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním 22 J 70 anti-proteinem D, monoklonálním anti-E7/HPV16 z Zymed a Ni-NTA konjugátem spojeným s telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 3 až 5 % celkového proteinu.

Buňky B1002 se separovaly z kultivační půdy centrifugací. Koncentrované buňky B1002 se uchovávaly při teplotě -65 °C.

Příklad 9: Čištění PROTD1/3E7(Dmutant)HPV16

Obecné schéma čištění -HPV16E7





a) Příprava buněčné suspenze

Zmrazené koncentrované buňky B1002 se rozmrazily a při teplotě 4 °C se resuspendovaly v pufru vhodném pro otevření buněk (tabulka č. 1) tak, aby konečná hodnota optické hustoty při vlnové délce 650 nm byla 60 (což odpovídá koncentraci buněk přibližně 25 g DCW/l).

b) Otevření buněk

Buňky se otevřely dvěma průchody vysokotlakového homogenizéru (Rannie) (1 000 barů). Suspenze otevřených buněk se umístila do nádoby a uchovávala se při teplotě 4 °C.

Puftr vhodný pro otevření buněk má následující složení: Na₂HPO₄ (0,02N), NaCl (2M) pH se upravilo na hodnotu 7,5 pomocí 3M HCl (Merck).

Čištění:

2a) dynamická filtrace přes membránu (DMF®-Pall Filtron)

Suspenze otevřených buněk o objemu 2 l se nanasla na DMF®, což je dynamický filtrační systém od firmy Pall, který obsahuje membránu, jenž odděluje částice o velikosti 0,2 μm..

Zakoncentrováním z objemu 2 litry na 1 litr vzniká vzorek PCC1.

Promýváním při konstantním objemu se třemi objemy (3L) pufru obsahující empigen-EDTA (koncentrace EDTA 1,86 g, empigen (30 %) 3,33 ml, PO₄³⁻ 0,5 M 40 ml) vznikne vzorek PD1.

Zakoncentrováním objemu 1l na 300 ml vznikne vzorek PCC2.

Promýváním při konstantním objemu s deseti objemy (3L) pufrům pH 7,5 obsahující empigen (v jednom litru je obsažen empigen (30 %) 3,33 ml, PO₄³⁻ 0,5 M 40 ml) vznikne vzorek.

Rozpuštěním proteinu přidáním stejného množství (300 ml) pufru pH 7,5, který obsahuje 8 M guanidinhydrochlorid (v jednom litru je obsažen empigen (30 %) 3,33 ml, Gu.HCl 764 g, PO₄³⁻ 0,5 M 40 ml).

Získání proteinu : shromážděním dialyzovaného roztoku (vzorek P3) během zakoncentrování na počáteční objem (300 ml) a diafiltrací s třemi objemy pufru pH 7,5, který obsahuje 4 M guanidinyhydrochlorid (množství v jednom litru: Gu-HCl 328,1 g, empigen (30 %) 3,33 ml, PO_4^{3-} 0,5 M 40 ml).

Všechny tyto kroky se uskutečnily v chladničce (při teplotě 2 až 8 °C), pH se upravilo 0,5 M PO_4^{3-} .

Frakce P3 se uchovávala při teplotě -20 °C do dalšího kroku čištění.

2b) Zn-chelatační sefarózová chromatografie

Frakce P3 se rozmrazila a injekcí se zavedla do kolony naplněné Zn-chelatační sefarózou, která je v rovnováze.

Kolona se promyje:

Třemi objemy pufru 4M guanidinu hydrochloridu (popisuje se shora v textu) vznikne vzorek Zn-FT a

5 objemy pufru tvořeného 4M močovinou (v jednom litru obsahuje 240,24 g močoviny, 3,33 ml empigenu, 40 ml 0,5 M PO_4^{3-} vzniklý vzorek se označí Zn-W.

Kolona se eluuje 3 objemy pufru, který obsahuje 4M močovinu a 29 mM imidazol (v jednom litru obsahuje 240,24 g močoviny, 3,33 ml empigenu (1,35g), 40 ml 0,5 M PO_4^{3-} pH je 7,5) vzniklý vzorek se označí. Pufr je stejný, jako ten uvedený shora v textu, ale množství imidazolu v jednom litru je 34,04 g. Vznikne vzorek Zn-20.

Kolona se dále eluuje 4M močovinou a 500 mM imidazolem až do konce UV píku . Vznikne vzorek Zn-500.

Kolona se promyje 50 mM EDTA a 0,5 M NaOH.

Eluát Zn-chelatační sefarózy (Zn-500) se uchovává při teplotě 2 až 8 °C až do dalšího kroku čištění.

Zn-chelatační sefarózová chromatografie se provádí při teplotě místnosti.

2c) Q-sefarózová chromatografie

Frakce Zn-500 se vnesla injekcí do kolony naplněné Q-sefarázou FF, která je v rovnováze.

Kolona se promyje:

7 objemy pufru 4M guanidin hydrochloridu (popisuje se shora v textu) vznikne vzorek QS-FT.

10 objemy pufru tvořeného 4M močovinou (v jednom litru obsahuje 240,24 g močoviny, 40 ml 0,5 M PO_4^{3-} vzniklý vzorek se označí QS-W1.

10 objemy pufru tvořeného 6M močovinou (v jednom litru obsahuje 360,3 g močoviny) vzniklý vzorek se označí QS-W2.

Kolona se eluuje 5 objemy pufru, který obsahuje 6M močovinu a 200 mM NaCl (v jednom litru obsahuje 360,3 g močoviny, 11,69 g NaCl, 40 ml 0,5 M PO_4^{3-} pH je 7,5)

Kolona se dále eluuje 3 objemy 6M močoviny a 500 mM NaCl (stejný jako shora v textu popsáný s výjimkou, že množství NaCl v jednom litru je 29,22 g). Skutečný konec frakce se stanovil koncem UV píku. Vznikl vzorek QS-500.

Kolona se dále eluuje 4 objemy 4M močoviny a 1M NaCl (množství NaCl v jednom litru je 58,44 g, 360,36 g močoviny, 40 ml 0,5 M PO_4^{3-}). Vznikl vzorek QS-1M.

Kolona se promyje 0,5 M NaOH.

Eluát z QS-sefarázy (QS-500) se uchovává při teplotě 2 až 8 °C až do dalšího kroku čištění.

Q-sefarázová chromatografie se provádí při teplotě místnosti.

2d) Ultrafiltrace

Frakce QS-500 se pak ošetřila na ultrafiltrační jednotce dělicí molekuly s molekulovou hmotností 10 000 (Ultrasette-Pall Filtron)

Produkt se nejdříve zakoncentruje na koncentraci 1 mg/ml proteinu a pak se diafiltruje proti 10 objemům fosforečnanového pufru.

Permeát (frakce UF-P) se znehodnotí a dialyzovaný roztok (frakce UF-R) se uchovává při teplotě 2 až 8 °C až do konečné filtrace.

Ultrafiltrace se provede při teplotě 2 až 8 °C.

2e) Konečná filtrace

Konečná frakce (frakce UF-R) se filtruje sterilním filtrem o velikosti pórů 0,22 μm (Millipak-Millipore) při laminárním průtoku v aseptické místnosti třídy 100.

Konečná koncentrace proteinu je mezi 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Sterilní frakce se uchovává při teplotě -20 °C.

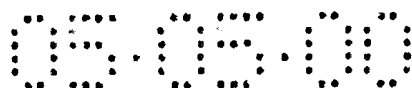
Příklad 10: Konstrukce fúze clyta-E6-his(HPV16), která se exprimuje v kmenu E. coli

1. konstrukce expresivního plazmidu

- a) Plazmid pRIT14497 (=TCA307), který kóduje fúzi ProtD1/3-E6-His/HPV16
- b) Plazmid pRIT14661(=DVA2 je vektor obsahující kódující sekvenci 117 C-terminálních kodonů LytA mikroorganismu Streptococcus pneumoniae. LytA se získala z mikroorganismu Streptococcus pneumonia, který syntetizuje N-acetyl-L-alaninamidázu (amidáza LYTA) (kódovaná genem LytA (Gene, 43 (1986) pag. 265-272). Je to autolyzin, který specificky degraduje jisté vazby v řetězci peptidoglykanu. C-terminální oblast proteinu LYTA je odpovědná za afinitu cholinu nebo některých cholinových analogů, jako je DEAE.

1.b Konstrukce plazmidu pRIT14634(=TCA332): plazmid exprimující fúzi clyta-E6-His/HPV16

- a) Prvním krokem je čištění velkého restričního fragmentu NcoI - AflII z plazmidu pRIT14497 a čištění malého restričního fragmentu AflIII-AflIIz pRIT14661.
- b) Druhým krokem je spojení sekvencí clyta se sekvencemi E7-His (NcoI a AflIII jsou kompatibilní restriční místa),



která dávají vzniku plazmidu pRIT 14634(=TCA332), jenž kóduje fúzní protein clyta-E6-His řízený promotorem pL (obrázek č. 9).

- c) Kódující sekvence fúzního proteinu clyta-E6-His se popisuje na obrázku č. 10.

Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14634 se zavedl do *E. coli* AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL.

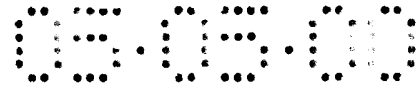
Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese clyta-E6-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14364 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 μ g/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu clyta-E6-his. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

Charakterizace fúze clyta-E6-his

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem. Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 33 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičími polyklonálními anti-clyta protilátkami a Ni-NTA konjugátem spojeným s telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510),



keré detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 3 % celkového proteinu.

Příklad 11: Konstrukce fúze clyta-E7-his (HPV16) exprimující se v kmeni E. coli.

1. konstrukce expresivního plazmidu

1.a počáteční materiály

- a) Plazmid pRIT14501(=TCA308), který kóduje fúzi PortD1/3-E7-His/HPV16
- b) Plazmid pRIT14661 (=DVA2) obsahuje kódující sekvenci 117 C-terminálních kodonů LytA mikroorganismu Streptococcus Pneumoniae.

1.b Konstrukce plazmidu pRIT14626 (=TCA330): plazmid exprimující fúzi clyta-E7-His/HPV 16

- a) Prvním krokem je čištění velkého restričního fragmentu NcoI - AflII z plazmidu pRIT14501 a čištění malého restričního fragmentu AflIII-AflIII z pRIT14661.
- b) Druhým krokem je spojení sekvencí clyta se sekvencemi E7-His (NcoI a AflIII jsou kompatibilní restriční místa), která dávají vzniku plazmidu pRIT 14626(=TCA330), jenž kóduje fúzní protein clyta-E7-His řízený promotorem pL (obrázek č. 11).

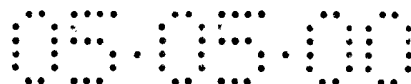
Kódující sekvence fúzního proteinu clyta-E7-His se popisuje na obrázku č. 12.

2. Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14626 se zavedl do E. coli AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL.

3. Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese clyta-E7-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14626 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 μ g/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se



teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu clyta-E7-his. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

4. Charakterizace fúze clyta-E7-his

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem. Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 35 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičími polyklonálními anti-clyta protilátkami a Ni-NTA konjugátem spojeným s telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 5 % celkového proteinu.

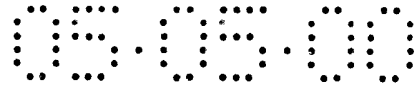
Příklad 12: Konstrukce fúze clyta-E6E7-his(HPV16), která se exprimuje v kmeni E. coli

1. konstrukce expresivního plazmidu

1.a počáteční materiály

- (a) Plazmid pRIT14512(=TCA311), který kóduje fúzi ProtD1/3-E6E7-His/HPV16
- (b) Plazmid pRIT14661 (=DVA2) obsahuje kódující sekvenci 117 C-terminálních kodonů LytA mikroorganismu Streptococcus Pneumoniae.

1.b Konstrukce plazmidu pRIT14629 (=TCA331): plazmid exprimující fúzi clyta-E6E7-His/HPV 16



- a) Prvním krokem je čištění velkého restrikčního fragmentu NcoI - AflIII z plazmidu pRIT14512 a čištění malého restrikčního fragmentu AflIII-AflIII z pRIT14661.
- b) Druhým krokem je spojení sekvencí clyta se sekvencemi E7-His (NcoI a AflIII jsou kompatibilní restrikční místa), která dávají vzniku plazmidu pRIT 14629(=TCA331), jenž kóduje fúzní protein clyta-E6E7-His řízený promotorem pL (obrázek č. 13).

Kódující sekvence fúzního proteinu clyta-E6E7-His se popisuje na obrázku č. 14.

2. Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14629 se zavedl do E. coli AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL.

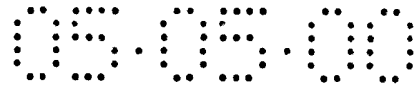
3. Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese clyta-E7-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14629 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 μ g/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu clyta-E6E7-his. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

4. Charakterizace fúze clyta-E6E7-his

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.



Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 48 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičími polyklonálními anti-clyta protilátkami a Ni-NTA konjugátem spojeným s telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 1 % celkového proteinu.

Příklad 13: ProtD1/3E7his(HPV18) (E. coli B1011)

ProteinD1/3E7hisHPV exprimovaný thioredoxinem v poloze trans (E. coli B1012)

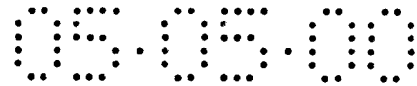
1) Konstrukce expresivních plazmidů

1.a. Konstrukce plazmidu TCA316(=pRIT14532) plazmid exprimující fúzi protein-D1/3-E7-His/HPV18

Počáteční materiál

a) Plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z Influenzae se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 → Thr 127 zralého proteinu D Haemophilus influenzae, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His) (obrázek č. 15). Tento plazmid se použil při expresi fúzního proteinu D1/3-E7-His.

b) HPV genomové sekvence E6 a E7 typ HPV 18 (popisuje se v publikaci Cole et al., J. Mol. Biol. (1987) 193, 599-608) se amplifikovaly z genomu HPV 18 plné délky klonovaného do pBR322 (získal se z instituce Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum für human



pathogen Papillomaviruses-D 69120-Heidelberg) a subklonoval se do pUC19 za vzniku TCA 302 (=pRIT14467).

Konstrukce plazmidu TCA 316 (=pRIT14532)

Nukleotidové sekvence odpovídající aminokyselinám 1 → 105 proteinu E7 se amplifikovaly z pRIT14467. Během polymerázové řetězcové reakce vznikly na 5' a 3' koncích sekvencí E7 restrikční místa NcoI a SpeI, která umožňují inzerci do stejných míst plazmidu pMGMS Prot D1/3 za vzniku plazmidu TCA316(=pRIT14532). Inzert se sekvenoval, aby se ověřilo, zda během polymerázové řetězcové reakce nedošlo k žádným modifikacím. Srovnáním se sekvencí prototypu E7/HPV18 se identifikovaly modifikace genu E7 (nukleotid 128 G→A), které generují substituci glycinu kyselinou glutamovou (aminokyselina 43 v E7, poloha 157 ve fúzním proteinu). Sekvence uvedené fúze protein-D1/3-E7-His/HPV 18 se popisuje na obrázku č. 16.

1.b. Konstrukce plazmidu TCA313(=pRIT14523): plazmid exprimující thioredoxin

Počáteční materiál

- a) Plazmid pBBR1MCS4 (Antoine R. and C. Locht, Mol. Microbiol. 1992, 6, 1785-1799, M. E. Kovach et al., Biotechniques 16: (5), 800-802), který je kompatibilní s plazmidy obsahujícími počátky replikace ColE1 nebo P15a.
- b) Plazmid pMG42 (popisuje se v dokumentu W093/04175) obsahující sekvenci promotoru pL fágu lambda.
- c) Plazmid pTRX (Invitrogen, kit Thiofusion K350-01) nesoucí kódující sekvenci thioredoxinu následovanou terminátorem transkripce AspA.

Konstrukce plazmidu TCA313(=pRIT14523)



Fragment EcoRI-NdeI pocházející z pMG42 nesoucí promotor pL a fragment NdeI-HindIII pocházející z pTRX nesoucí kódující sekvenci thioredoxinu, po níž následuje terminátor AspA, se čistily a ligovaly do restrikčních míst EcoRI a HindIII plazmidového vektoru pBBR1MCS4 za vzniku plazmidu TCA313(=pRIT14523) (zobrazeno na obrázku č. 17).

Sekvence thioredoxinu se popisuje na obrázku č. 18.

2) Transformace kmene AR58

2.a. Získání kmene B1011 exprimujícího ProtD1/3-E7-His/HPV18

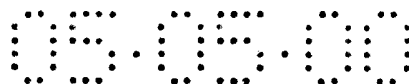
Plazmid pRIT14532 se zavedl do *E. coli* AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL. Selektce transformantů proběhla v závislosti na rezistenci na kanamycin.

2.b. Konstrukce kmene B1012 exprimující ProtD1/3-E7-His/HPV18 a thioredoxin

Plazmid pRIT14532 a pRIT14523 se zavedl do *E. coli* AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL. Selektce transformantů proběhla v závislosti na rezistenci na kanamycin a ampicilin.

3. Růst a indukce bakteriálních kmenů B1011 a B1012 - Expresí fúze Prot-D1/3-E7-His/HPV18 aniž se exprimuje thioredoxin v poloze trans a nebo se společnou expresí s thioredoxinem v poloze trans.

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14532 (kmen B1011) a buňky AR58 transformované plazmidy pRIT14532 a pRIT14523 (kmen B1012) se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 μ g/ml kanamycinu při teplotě 30 °C (v případě buněk kmene B1012 se přidalo 100 μ g/ml kanamycinu a



ampicilinu). Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E7-his/HPV18 a thioredoxinu. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

Charakterizace fúze protein D1/3-E7-his/HPV18

Příprava extraktu

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Analýza SDS-polyakrylamidových gelů barvených podle Coomassie a westernovy bloty

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.

Fúze protD1/3-E7-His (o molekulové hmotnosti přibližně 31 000) lokalizovaný v peletové frakci B1012 se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie. V případě kmene B1012 se tato fúze identifikovala částečně (30 %) ve frakci supernatantu. Fúze se identifikovala na westernových blotech králičím polyklonálním anti-proteinem D a Ni-NTA konjugátem spojeným telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 1 až 3 % celkového proteinu, jak se potvrdilo na SDS-polyakrylovém gelu obarveném podle Coomassie.

V případě extraktu kmene B1012 se thioredoxin (o molekulové hmotnosti přibližně 12 000) vizualizoval v supernatantu barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se westernovými bloty monoklonálním anti-thioredoxinem (Invitrogen R920-25).

Čištění ProtD1/3E7-his/HPV18

Rekombinantní fúze HPV 18-ProtD1/3-E7-His se exprimovala v mikroorganismu *E. coli* (jak se popisuje shora v textu) kmen AR58. Všechny kroky se uskutečnily při teplotě místnosti (RT přibližně 22 °C). Proteiny se sledují monitorováním hodnoty OD při vlnové délce 280 nm. Mezi jednotlivými kroky frakce pozitivní na antigen se uchovávají při teplotě -20 °C.

Čištěný antigen je stabilní po dobu jednoho týdne při teplotě -20 °C a 4 °C (nedochází k degradaci), ale jeví se být více citlivý vůči oxidaci po inkubaci při teplotě 37 °C.

d) Rozpustnost

Rozpustnost proteinu je závislá na pH (popisuje se dále v textu), přičemž při hodnotě pH nižší než 7,4 rozpustnost klesá:

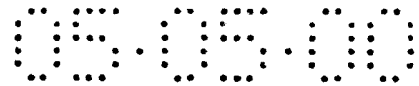
PBS pH 7,4	686 µg/ml	100 %
PBS pH 7,2	560 µg/ml	81 %
PBS pH 7,0	498 µg/ml	72 %
PBS pH 6,8	327 µg/ml	48 %

e) Protein HPV 18 Prot D1/3 E7 se skládá z 227 aminokyselin. Jeho teoretická molekulová hmotnost je 25 900 a teoretický izoelektrický bod je 5,83. Při SDS PAGE v redukčním prostředí tento protein migruje do vzdálenosti odpovídající molekulové hmotnosti 31 500.

Příklad 14: Čištění HPV 18 protein D1/3 E7

a) rozpustnost:

Buněčná pasta se suspendovala v pufru 2 M NaCl, 20 mM fosforečnanu (NaH₂PO₄/K₂HPO₄) pH 7,6. Lyze buněk se provedla dvěma průchody zařízením „Rannie disruptor“. Lyzované buňky se peletovaly po dobu 30 minut při 9 000 ot./min. v rotoru JA 10 při teplotě 4 °C. Za účelem redukovat množství endotoxinu, se bakteriální buněčný pelet obsahující rekombinantní protein



jednou promyl v pufru obsahujícím 5 mM EDTA, 2 M NaCl, PBS pH 7,4, dále se jednou promyl 4M močovinou, 20 mM fosforečnanem pH 7,4, a nakonec PBS pH 7,4, aby se odstranily stopy EDTA (každé promytí se uskutečnilo v objemu, odpovídajícím objemu buněčné suspenze). HPV18-Prot-D1/3-E7-His(TIT, thioredoxin v poloze trans) se rozpustil (ve stejném objemu, jako byl objem buněčné suspenze) v 6 M guanidinchloridu, 50 mM PO₄ pH 7,6 přes noc při teplotě 4 °C. Buněčný debris se odstranil centrifugací po dobu 30 minut při 9 000 ot./min. při teplotě 4 °C na rotoru JA 10. Supernatant se doplnil 0,5 % empigenem BB a inkuboval se po dobu 30 minut při teplotě místnosti.

b) Čištění:

1.a. Imobilizovaná kovová afinitní chromatografie

Vzorek o objemu 125 ml se nanasl na Zn²⁺-chelatační sefárovou FF kolonu (XK 26/20 Pharmacia, 50 ml gelu /125 ml), která se předem uvedla do rovnováhy 0,5 % empigenem BB, 6 M guanidinchloridem, 50 mM PO₄ pH 7,6 při průtokové rychlosti 4 ml/min. Kolona se promyje 6M guanidinchloridem, 50 M PO₄ pH 7,6, 50 mM PO₄ pH 7,6 až se dosáhne základních hodnot, pak 6 M močovinou, 0,5 M NaCl, 50 mM PO₄ pH 7,6. Antigen se eluoval 0,25 M imidazolem obsaženým v 6 M močovně, 0,5 M NaCl, 50 mM PO₄ pH 7,6 při průtokové rychlosti 2 ml/min (obrázek č. 1B). Vzorek eluovaný z IMAC se dialyzoval při teplotě 4 °C proti PBS pH 7,4.

1.b. Affi-Prep® Polymixin (Bio-Rad)

Za účelem redukovat množství endotoxinu se 28 mg (37 ml) antigenu inkubovalo ve vsádkovém módu s 2 ml pryskyřice Affiprep Polymyxin, která se uvedla do rovnováhy PBS pH 7,4 přes noc při teplotě místnosti. Získalo se přibližně 60 % proteinu a obsah endotoxinu se snížil 6,5 krát.

1.c. Analýza



Čištěný antigen se analyzoval na redukčním SDS-PAGE a zobrazil se jako dva pruhy odpovídající molekulové hmotnosti 30 000 respektive 55 000. Gel se obarvil Coomassieovou modří nebo stříbrem. Při jednom SDS-PAGE při podmínkách, které nejsou redukční se HPV-18-ProtD1/3-E7-His jevil jako šmouha, přičemž molekulová hmotnost se odhaduje na hodnotu větší nebo rovno 175 000. Tato oxidace se však může vrátit přidáním 5 mM β -merkapto-etanolu. Tento patern se potvrdil na westernových blotech použitím anti-ProtD nebo anti-His.

c) Stabilita

Čištěný antigen je stabilní po dobu jednoho týdne při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nedochází k degradaci), ale jeví se být více citlivý k oxidaci po inkubaci při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

d) Rozpustnost

Rozpustnost proteinu je závislá na pH (popisuje se dále v textu), přičemž při hodnotě pH nižší než 7,4 rozpustnost klesá:

PBS pH 7,4	686 $\mu\text{g/ml}$	100 %
PBS pH 7,2	560 $\mu\text{g/ml}$	81 %
PBS pH 7,0	498 $\mu\text{g/ml}$	72 %
PBS pH 6,8	327 $\mu\text{g/ml}$	48 %

Protein HPV 18-Prot D1/3-E7-His se skládá z 227 aminokyselin. Jeho teoretická molekulová hmotnost je 25 900 a teoretický izoelektrický bod je 5,83. Při SDS PAGE v redukčním prostředí tento protein migruje do vzdálenosti odpovídající molekulové hmotnosti 31 500.

Příklad 15: Konstrukce fúze ProtD1/3-E7, která se exprimuje v mikroorganismu E. coli kmen B1098

Mutovaný (cys27→gly, glu29→gln) typ HPV18

1) Konstrukce expresivního plazmidu

Počáteční materiál

- a) plazmid pRIT14532 (=TCA 316), který kóduje fúzi ProtD1/3-E7-His
- b) plazmid LITMUS 28 (New England Biolabs kat. č. 306-28) klónovací vektor odvozený od pUC
- c) plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z Influenzae se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 → Thr 127 zralého proteinu D Haemophilus influenzae, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His).

Konstrukce plazmidu pRIT14831(=TCA355): plazmid exprimující fúzi protein-D1/3-E7 mutovaný(cys27→gly, glu29→gln) s His ocasem

Fragment NcoI-XbaI z pRIT14532(=TCA 316) nesoucí kódující sekvenci genu E7 pocházející z HPV 18 prodloužený koncem His se subklonoval do vektoru Litmus 28 použitelného pro mutagenезi za vzniku pRIT 14910(=TCA348). Na základě anoligie s mutagenезí E7/HPV16 se dvojitá mutace cys27 → gly a glu29 → gln vybrala za účelem omezení navázání antionkogenního produktu genu retinoblastomu (pRB).

Zavedení mutací genu E7 se realizovalo kitem „Quick Change Site directed Mutagenesis (Stratagene kat. č. 200518). Sekvenování pRIT14532 vyjevilo přítomnost kyseliny glutamové v poloze 43 genu E7 místo glycinu, jak je tomu u prototypové sekvence HPV18. Druhý cyklus mutagenезe se realizoval zavedením glycinu do polohy 43. Získaly jsme plazmid pRIT14829(=TCA353). Po ověření přítomnosti mutací a integrity

celého genu E7 sekvenováním se mutovaný gen E7 zavedl do vektoru pRIT 14589 (=pMG MCS ProtD1/3) za vzniku plazmidu pRIT 14831(=TCA355) (obrázek č.7).

Sekvence fúze protein-D1/3-E7 mutovaný (cys27 → gly, glu29 → gln)-His se popisuje na obrázku č. 18.

2) Konstrukce ProtD1/3-E7 mutovaný(cys27 → gly, glu29 → gln)-His/HPV18

Plazmid pRIT14831 se zavedl do E. coli AR58 (Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 88) defektivního λ lysogenu obsahujícího represor citlivý na teplo promotoru λ pL za vzniku kmene B1098. Selekcce transformantů se provedla na základě rezistence na kanmycin.

3) Růst a indukce bakteriálního kmene B1098-Expresse ProtD1/3-E7mutovaný(cys27 → gly, glu29 → gln)-His/HPV18

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14831 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 µg/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E7-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

4) Charakterizace fúze ProtD1/3-E7mut((cys27 → gly, glu29 → gln)-His/HPV16

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Analýza na SDS polyakrylových gelech barvených podle Coomassie a westernovy bloty

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem. Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 31 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním 22J70 anti-protein D a monoklonálním Panta-His (Qiagen kat. č. 34660), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 3 až 5 % celkového proteinu.

Příklad 16: Konstrukce fúze Protein-D1/3-E6-his/HPV18, která se exprimuje v mikroorganismu *E. coli*

1. Konstrukce expresivního plazmidu

a) Plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z Influenzae se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 → Thr 127 zralého proteinu D Haemophilus influenzae, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His). Tento plazmid se použil při expresi fúzního proteinu D1/3-E6-His.

HPV genomové sekvence E6 a E7 typ HPV 16 (popisuje se v publikaci Cole et al., J. Mol. Biol. 1987, 193, p.599-608) se amplifikovaly genomu HPV 18 plné délky klonovaného do pBR322 (získal se z instituce Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum für human pathogen Papillomaviruses-D 69120-Heidelberg) a subklonoval se do pUC19 za vzniku TCA 301 (=pRIT14467).

Konstrukce plazmidu TCA302 (=pRIT14526): plazmid exprimující fúzi Protein-D1/3-E6-His/HPV18

Nukleotidové sekvence odpovídající aminokyselinám 1 → 158 proteinu E6 se amplifikovaly z pRIT14467. Během polymerázové řetězcové reakce vznikly na 5' a 3' koncích sekvencí E6 restrikční místa NcoI a SpeI, která umožňují inzerci do stejných míst plazmidu pMGMC5 Prot D1/3 za vzniku plazmidu TCA314 (=pRIT14526). Inzert se sekvenoval, aby se ověřilo, zda během polymerázové řetězcové reakce nedošlo k žádným modifikacím. Sekvence uvedené fúze protein-D1/3-E6-His se popisuje na obrázku č. 22.

Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14526 se zavedl do E. coli AR58 (popisuje se v publikaci Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 88) defektního lysogenu λ , který obsahuje represor promotoru λ pL citlivého na teplo.

3. Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese Prot-D1/3-E6-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT1426 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E6-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

6. Charakterizace fúze protein D1/3-E6-His

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.

Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 32 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním anti-proteinem D a Ni-NTA konjugátem spojeným telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 3 až 5 % celkového proteinu.

Příklad 17: Konstrukce fúze Protein-D1/3-E6E7-his/HPV18

1. Konstrukce expresivního plazmidu

- a) Plazmid pMG MCS prot D1/3 (=pRIT14589) je derivát pMG81 (popisuje se v dokumentu přihláška UK patentu č. 951 3261.9, který se zveřejnil jako WO97/01640), ve kterém kodony 4-81 NS1 kódující oblasti z Influenzae se nahradily kodony korespondujícími se zbytky Ser 20 → Thr 127 zralého proteinu D Haemophilus Influenzae, kmen 772, biotyp 2 (popisuje se v publikaci H. Janson et al., 1991, Infection and Immunity, Jan. P. 119-125). Po sekvenci Prot-D1/3 následuje vícenásobné klonovací místo (11 zbytků) a kódující oblast C-terminálního histidinového ocasu (6 His). Tento plazmid se použil při expresi fúzního proteinu D1/3-E6E7-his.
- b) HPV genomové sekvence E6 a E7 typ HPV 18 (popisuje se v publikaci Cole et al., J. Mol. Biol. 1987, 193, p.599-608) se amplifikovaly z genomu HPV 18 plné délky klonovaného do pBR322 (získal se z instituce Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Referenzzentrum für human pathogen Papillomaviruses-D 69120-Heidelberg) a subklonoval se do pUC19 za vzniku TCA 302 (=pRIT14467).
- c) Kódující sekvence E6 a E7 v TCA302 (=pRIT14467) se upravily syntetickým oligonukleotidovým adaptorem (začleněným mezi

restrikční místa HgaI a NsiI), který vytváří deleci 11 nukleotidů mezi geny E6 a E7 za účelem odstranění stop kodonu E6 a vzniku kódujících sekvencí E6 a E7 v plazmidu TCA320 (=pRIT14618) (zobrazuje obrázek č. 23).

Konstrukce plazmidu TCA328 (=pRIT14567): plazmid exprimující fúzi Protein-D1/3-E6E7-His/HPV18

Nukleotidové sekvence odpovídající aminokyselinám 1 → 263 fúzovaného proteinu E6E7 se amplifikovaly z pRIT14618. Během polymerázové řetězcové reakce vznikly na 5' a 3' koncích sekvencí E6E7 restrikční místa NcoI a SpeI, která umožňují inzerci do stejných míst plazmidu pMGMS Prot D1/3 za vzniku plazmidu TCA328 (=pRIT14567) (obrázek č. 24). Inzert se sekvenoval, aby se ověřilo, zda během polymerázové řetězcové reakce nedošlo k žádným modifikacím. Sekvence uvedené fúze protein-D1/3-E6E7-His se popisuje na obrázku č. 25.

Transformace kmene AR58

Plazmid pRIT14567 se zavedl do E. coli AR58 (popisuje se v publikaci Mott et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 88) defektního lysogenu λ , který obsahuje represor promotoru λ pL citlivého na teplo.

3. Růst a indukce bakteriálního kmene - exprese Prot-D1/3-E6E7-His

Buňky AR58 transformované plazmidem pRIT14512 se kultivovaly ve 100 ml kultivačního média LB doplněném 50 μ g/ml kanamycinu při teplotě 30 °C. Během logaritmické fáze růstu se teplota zvýšila na 39 °C, aby se deaktivoval represor λ a začala syntéza proteinu D1/3-E6E7-His. Inkubace při teplotě 39 °C pokračovala po dobu 4 hodin. Vytvořil se pelet bakterií a uchovávaly se při teplotě -20 °C.

4. Charakterizace fúze protein D1/3-E6E7-his

Zmrazené buňky se nechaly roztát a resuspendovaly se v 10 ml pufru PBS. Buňky se otevřely působením tlaku podle Frenche zařízením SLM Amicon při tlaku 140 MPa (tři pasáže). Extrakt se centrifugoval při 16 000 g po dobu 30 minut při teplotě 4 °C.

Po centrifugaci extraktů, které se popisují shora v textu, se alikvoty supernatantu a pelet analyzoval elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu a westernovým přenosem.

Hlavní pruh o molekulové hmotnosti 48 000 lokalizovaný v peletové frakci se zviditelnil barvením gelu podle Coomassie a identifikoval se na westernových blotech králičím polyklonálním anti-proteinem D a Ni-NTA konjugátem spojeným telecí intestinální alkalickou fosfatázou (Qiagen kat. č. 34510), které detekují přístupný histidinový konec. Síla exprese reprezentuje přibližně 1 % celkového proteinu.

Příklad 18: Vakcinační formulace

Vakcíny se vytvořily z proteinu pocházejícího ze shora v textu popsáných vzorků exprimovaných v mikroorganismu *E. coli* kmene AR58 a adjuvans. Mezi adjuvans patří formulace obsahující směs 3 de-O-acetylovaného monofosforyllipidu A (3D-MPL) a hydroxidu hlinitého nebo 3D-MPL a/nebo QS21 v emulzi olej/voda. Často obsahují také cholesterol.

3D-MPL: je detoxifikovaná forma lipolysacharidu (LPS) gram-negativní bakterie *Salmonella minnesota*.

Experimenty provedené v instituci Smith Kline Beecham Biologicals vykazují, že 3D.MPL kombinovaný s různými vehikly silně zvyšuje jak humorální a buněčnou imunitu tak i buněčnou imunitu TH1.

QS21: je saponin čištěný ze surového extraktu kůry stromu *Quillaja Saponaria Molina*, který má silnou aktivitu adjuvans. Aktivuje jak lymfoproliferaci specifickou pro antigen tak i CTL na několik antigenů.

Vakcína obsahující antigen podle vynálezu spolu s 3D-MPL a alum se může připravit analogickým způsobem, jak se popisuje v dokumentu WO93/19780 nebo 92/16231.

Experimenty provedené v instituci Smith Kline Beecham Biologicals vykazují jasný synergický účinek kombinací 3D-MPL a QS21 při vyvolání humorální imunitní odezvy a buněčné imunitní odezvy typu TH1. Vakcíny obsahující antigen se popisují v dokumentu US 5750110.

Emulze olej/voda obsahuje dva oleje (tokoferol a skvalen) a PBS obsahující jako emulgační prostředek Tween 80. Emulze obsahuje 5 % skvalenu, 5 % tokoferolu, 0,4 % Tween 80 a průměrná velikost partikulí je 180 nm. Tato emulze je známa jako SB62 (popisuje se v dokumentu WO 9/17210).

Experimenty provedené v instituci Smith Kline Beecham Biologicals prokázaly, že adjunkce emulze O/V spolu s MPL/QS21 zvyšuje jejich imunostimulační vlastnosti.

Příprava emulze SB62 (2 x koncentrováno)

Tween 80 se rozpustil ve fyziologickém roztoku pudrovaném fosforečnanem (PBS) za vzniku 2 % roztoku PBS. Aby vzniklo 100 ml dvakrát koncentrované emulze, 5g DL alfatokoferolu a 5 ml skvalenu se míchalo na vortexu. Přidalo se 90 ml roztoku PBS/Tween a zamíchalo se. Výsledná emulze pak prošla stříkačkou a nakonec se mikrofluidizovala za použití mikrofluidizačního přístroje. Výsledné kapičky oleje mají velikost přibližně 180 nm.

Příprava oleje Prot.D1/3E7QS21/3DMPL ve vodní formulaci

ProtD1/3-E7 (5 μ g) se naředil desekrát koncentrovaný PBS pH 6,8 a vodou a pak se přidalo SB62 a 3D MPL (5 μ g) a v pětiminutových intervalech se jako konzervační činidlo přidávalo 50 μ g/ml thiomersalu. Objem emulze se rovná 50 % celkového objemu (50 μ l v případě dávky 100 μ l). Všechny inkubace se provedly při teplotě místnosti za stálého míchání.

Kontroly obsahující adjuvans bez antigenu se připravily nahrazením proteinu PBS.

Experimenty regrese nádoru (HPV16) s PROT D E7

Vakcinační antigen: fúze protein ProtDE7

Protein D je lipoprotein na povrchu gram negativní bakterie *Haemophilus influenzae*.

Za účelem vzniku antigenu vakcíny s kolemjdoucími pomocnými vlastnostmi se začlení inkluze prvních 109 zbytků proteinu D, který je fúzním partnerem. Antigen se připravil s QS21 3D-MPL a SB62, jak se popisuje shora v textu.

Příklad 19: Experimenty regrese nádoru *in vivo*

Nádorová buněčná linie TC1:

Primární epiteliální buňky plic pocházející z myši C57BL.6 se imortalizovaly HPV16 E6 a E7 a pak se transformovaly s aktivovaným onkogenem ras za vzniku tumorogenní buněčné linie exprimující E6 a E7 (Lin KY et al., 1996). Expres E7 se ověřila analýzou FACS fixovaných a permeabilizovaných buněk TC1 za použití myšního anti-HPV 16E7 Mab (Triton Corp. Alameda, CA).

Růst nádoru

Buňky TC1 rostoucí v kultuře *in vitro* se ošetřily trypsinem, dříve se promyly v médiu, které neobsahuje sérum a podkožní injekcí se zavedly do pravého boku myši. Aby se mohla hodnotit léčba vzniklých nádorů, buňky TC1 se zavedly injekcí v dávce třikrát 10^4 buněk na jednu myš. Jeden a dva týdny po injektování nádorových buněk se myši vakcinovaly 5 μ g protD1/3E7His v objemu 100 μ l PBS nebo 3D-MPL, QS21 a SB62 do šlapky končetiny (50 μ l do šlapky končetiny) PBS nebo s PBS nebo se samotným adjuvans. V každé skupině bylo 5 myši C7BL/6 (Iffa Credo). U myši se dvakrát týdně monitoroval růst. Průměrná hmotnost nádoru na skupinu je uvedena na obrázku č. 26. U myši vakcinovaných protD1/3E7His v PBS nebo PBS nebo

samotným adjuvans se vyvinul progresivně rostoucí nádory (0-1 zvířat bez nádoru/skupina). Naopak u čtyř z pěti myší vakcinovaných protD1/3E7His v adjuvans se nádor nevyvinul. U jednoho zvířete se vyvinul velmi malý a stabilní nádor po 40 dnech. Tyto výsledky ukazují, že protein protD1/3E7His pocházející z HPV 16 připravený v adjuvans je schopný vyvolat regresi malých nádorů exprimujících uvedený antigen.

Imunologické testy

Proliferační test:

V případě testu *in vitro* se lymfocyty připravily rozdrcením sleziny popliteálních lymfatických žláz získaných z vakcinovaných myší v den 69.

Alikvoty 2×10^5 buněk se nanasly na plotnu s 96 prohlubněmi ve třech provedeních se snižujícími se koncentracemi (10, 1, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) protD1/3E7His, který byl nebo nebyl na latexových mikročasticích (Sigma), aby se buňky restimulovaly *in vitro* (72 hodin). Proliferace T buněk se měřila začleněním 3H thymidinu.

Na obrázku č. 27 a 28 se porovnává schopnost protD E7 stimulovat proliferaci splenocytů a buněk lymfatických žláz *in vivo* pomocí PBS, 3D-MPL, QS21 SB62, ProtD1/3 E7 His a ProtD1/3 E7 His plus adjuvans 3D-MPL, QS21, SB62 a ukazují vysokou proliferační odezvu ve slezině se ve srovnání s jinými skupinami detekovaly pouze u myší imunizovaných protD1/3 E7 His v adjuvans.

Protilátková odezva

Ve stejnou dobu jako orgány se izolovaly jednotlivá séra a podrobily se testu nepřímá ELISA.

Jako antigen potažený na povrchu prohlubní se použilo 5 $\mu\text{g/ml}$ čištěného proteinu E7. Po saturaci v PBS s 1% sérem právě narozených telat po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C se séra sériově naředila (počáteční ředění 1/100) v saturačním pufru

a inkubovala se přes noc při teplotě 4 °C nebo 90 minut při teplotě 37 °C. Po promytí v PBS s Tween 20 se použily jako sekundární protilátky kozí anti-myší Ig (1/1 000) nebo antiséra podtřídy kozích anti-myších Ig (celý IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) (1/5 000). Po inkubaci po dobu 90 minut při teplotě 37 °C se přidal streptavidin spojený s peroxydázou a jako substrát se použil TMB (tetra-methyl-benzidin/peroxid). Po deseti minutách se reakce zastavila 0,5 M H₂SO₄ a stanovila se hodnota optické hustoty při vlnové délce 450 nm.

Na obrázku č. 29 jsou uvedeny titry podtřídy specifických anti-E7 vyvolané vakcinací v různých skupinách s relativním průměrným středním ředěním séra.

Tyto výsledky ukazují, že slabou protilátkovou odezvu spouští aplikace samotného ProtD 1/3 E7 HPV16 ve formě dvou injekcí.

Daleko více protilátek proti E7 se vytvořilo, když se ProtD1/3 E7 aplikoval injekcí v přítomnosti adjuvans SB62, QS21 a 3D-MPL.

V žádném séru, dokonce ani v séru myší, kterým se aplikoval ProtD 1/3 E7 v adjuvans SB62, QS21 a 3D-MPL (data nejsou uvedena), se nezjistily IgA nebo IgM. Naopak množství celkového IgG se slabě zvýšilo vakcinací myší samotným ProtD 1/3 E7 a silně se zvýšilo, když se k proteinu přidalo adjuvans SB62, QS21 a 3D-MPL. Analýza koncentrací různých podtříd IgG vykazuje, že smíšená protilátková odezva se vyvolala, jak se zvýšila koncentrace všech typů analyzovaných podtříd IgG (IgG1, IgG2a a IgG2b) v séru myší, kterým se aplikovalo antigen s adjuvans, což se porovnává s koncentracemi pozorovanými v séru myší, kterým se aplikoval antigen nebo samotné adjuvans. IgG2 je převažující izotop, který reprezentuje více než 80 % celkového množství IgG. Tento izotop je v obecném případě spojen se zavedením imunitní odezvy typu TH1.

Příklad 20: *In vivo* experimenty ochrany proti nádoru

Myši se imunizovaly dvakrát ve 14-ti denních intervalech buď PBS, adjuvans podle příkladu 1, 5 μg fúze protD1/3 E7 His nebo 5 μg protD 1/3 E7 His v adjuvans podle příkladu 1 do polštářku končetiny při objemu 100 μl (50 μl do polštářku končetiny).

Růst nádoru:

Čtyři týdny po vakcinaci se myším do boku aplikovalo podkožně 2×10^5 buněk TC1 na jednu myš. Buňky TC1 rostoucí v kultuře *in vivo* se ošetřily tripsinem a dvakrát se promyly v médiu bez séra a aplikovaly se injekcí. V každé skupině bylo 5 myší. U myší se dvakrát za týden sledoval růst nádoru.

Z obrázku č. 30 vyplývá, že vakcinace s proteinem E7 v adjuvans SB62, QS21, 3D-MPL chrání myši proti vývoji nádoru (pouze jedno zvíře z pěti mělo velmi malý a stabilní nádor) ve všech skupinách, kterým se aplikoval protein E7 bez adjuvans. Jestliže se aplikovalo samotné adjuvans vyvinul se rostoucí nádor.

Imunologický test

Tři týdny po poslední vakcinaci dříve než se vyvinul nádor se pět myší v každé skupině usmrtilo, aby se mohly provést imunologické testy.

Proliferační test

V případě testu *in vitro* se lymfocyty připravily rozdrčením sleziny popliteálních lymfatických žláz.

Alikvoty 2×10^5 buněk se nanosly na plotnu s 96 prohlubněmi ve třech provedeních se snižujícími se koncentracemi (10, 1, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) protD1/3E7His, který byl nebo nebyl na latexových mikročasticích (Sigma), aby se buňky restimulovaly *in vitro* (72 hodin). Proliferace T buněk se měřila začleněním 3H thymidinu.

Na obrázku č. 31 a 32 ukazují, že jak u splenocytů tak u buněk poplietálních lymfatických žláz, jak se pozorovalo při terapeutickém zavedení, se lepší lymfoproliferační aktivita získala u myši, kterým se aplikoval protein E7 v adjuvans SB62 QS21, 3D-MPL

Obrázek č. 33 ukazuje, že jako při terapeutickém zavedení se lepší protilátková odezva pozorovala v séru myši vakcinovaných proteinem ProtD1/3E7 připraveném v 3D-MPL, QS21 (objem /hmotnost). Byla vyvolána smíšená protilátková odezva. Vyskytovaly se všechny testované podtřídy IgG (IgG2a, IgG2b, IgG1). V tomto případě převažuje izotyp IgG2b a reprezentuje 7 % celkového IgG.

Příklad 21: Vakcinační experimenty s proteinem ProtD1/3E7(HPV18)

Myši se vakcinovaly dvakrát v rozmezí dvou týdnů 5 μ g ve 100 μ l protD1/3 18 E7 His do polštářku končetiny (50 μ l do polštářku končetiny v PBS nebo QS21, 3D-MPL a SB62, DQ MPL, jak se popisuje v dokumentu W096/33739 nebo DQ alum MPL, jak se popisuje v dokumentu W098/15827. V každé skupině bylo 8 myši Balb/c (Iffa Credo) 6 až 8 týdnů starých. 14 dní po druhé imunizaci se získala slezina a lymfatické žlázy za účelem imunologického vyšetření a krev se rozdělila na vzorky za účelem serologického vyšetření.

- Imunologické testy:

- Proliferační test:

V případě testu *in vitro* se lymfocyty připravily rozdrčením sleziny poplietálních lymfatických žláz získaných z vakcinovaných myši 28 den.

Alikvoty 2×10^5 buněk se nanesly na plotnu s 96 prohlubněmi ve třech provedeních se snižujícími se koncentracemi (10, 1, 0,1 μ g/ml) proteinu protD1/3 18 E7 His, který byl nebo nebyl na latexových mikročasticích (Sigma), aby

se buňky restimulovaly *in vitro* (72 hodin). Proliferace T buněk se měřila začleněním 3H thymidinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako stimulační index (cpm vzorku/cpm pozadí).

Na obrázku č. 34 a 35 se porovnává schopnost proteinu protD1/3 18 E7 stimulovat proliferaci splenocytů a buněk lymfatických žláz *in vivo* primárně imunizovaných ProtD1/3 18 E7 His nebo ProtD1/3 18 E7 His plus adjuvans. Z obrázků je zřejmé, že u myši, kterým se aplikoval pouze protein je možné vidět pouze základní proliferaci a naopak u myši imunizovaných protD1/3 18 E7 His v adjuvans je možné pozorovat velmi vysokou proliferaci odezvu ve slezině a v lymfatických žlázách.

Produkce cytokinů

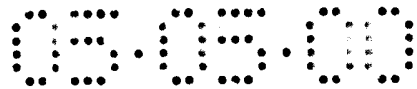
- Cytokiny (IL-5 a IFN γ) produkované v supernatantu kultury po 96 hodinách *in vitro* restimulace sleziny nebo buněk lymfatických žláz médiem nebo proteinem ProtD1/3 18 E7 (1 nebo 3 $\mu\text{g/ml}$) se měřily testem ELISA, jak se popisuje:
- IFN γ (Genzyme)

Kvantifikace IFN γ se uskutečnila testem ELISA za použití činidel od firmy Genzyme. Vzorky a roztoky protilátek se použily v množství 50 μl na jednu prohlubeň. Mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dánsko) se potáhly přes noc při teplotě 4°C 50 μl anti-myšního séra křečka IFN γ ředěného v 1,5 $\mu\text{g/ml}$ uhličitanovém pufru pH 9,5. Destičky se pak inkubovaly po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C se 100 μl PBS, které obsahuje 1 % albuminu bovinního séra a 0,1 % Tween 20 (saturační pufr). Dvojnásobné ředění supernatantu ze stimulace *in vitro* (počínající ředění 1/2) v saturačním pufru se přidalo na plotny potažené anti-IFN γ a inkubovalo se po dobu 1 hodiny 30 minut při teplotě 37 °C. Plotny se promyly čtyřikrát PBS Tween 0,1 % (promývací pufr) a přidaly se kozí anti-myší IFN γ konjugované s biotinem ředěné v saturačním pufru tak, aby konečná koncentrace v každé

prohlubni byla 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Vše se inkubovalo po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C. Po kroku promytí se přidal konjugát AMDEX (Amersham) ředěný 1/10 000 v saturačním pufru a následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Plotny se promyly jak se popisuje shora v textu a inkubovaly se s 50 μl TMB (Biorad) po dobu 15 minut. Reakce se zastavila přidáním 0,4 N H₂SO₄ a stanovila se optická hustota při vlnové délce 450 nm. Koncentrace se vypočítaly za použití standardní křivky (myší IFN γ standard) pomocí SoftmaxPro (rovnice se čtyřmi parametry) a vyjádřily se jako pg/ml.

- IL5 (Pharmingen)

Kvantifikace IL5 se provedla testem ELISA za použití činidel od firmy Pharmingen. Vzorky a roztoky protilátek se použily v množství 50 μl na jednu prohlubeň. Mikrotitrační destičky s 96 prohlubněmi (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Dánsko) se potáhly přes noc při teplotě 4°C 50 μl krysího anti-myšího IL5 ředěného v 1 $\mu\text{g/ml}$ uhličitánovém pufru pH 9,5. Destičky se pak inkubovaly po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C se 100 μl PBS, které obsahuje 1 % albuminu bovinního séra a 0,1 % Tween 20 (saturační pufr). Dvojnásobné ředění supernatantu ze stimulace in vitro (počínající ředění 1/2) v saturačním pufru se nanoslo na plotny potažené anti-IFN γ a inkubovalo se po dobu 1 hodiny 30 minut při teplotě 37 °C. Plotny se promyly čtyřikrát PBS Tween 0,1 % (promývací pufr) a přidaly se krysí anti-myší IL5 konjugované s biotinem ředěné v saturačním pufru tak, aby konečná koncentrace v každé prohlubni byla 1 $\mu\text{g/ml}$. Vše se inkubovalo po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C. Po kroku promytí se přidal konjugát AMDEX (Amersham) ředěný 1/10 000 v saturačním pufru a následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Plotny se promyly jak se popisuje shora v textu a inkubovaly se s 50 μl TMB (Biorad) po dobu 15 minut. Reakce se zastavila přidáním 0,4 N H₂SO₄ a stanovila se



optická hustota při vlnové délce 450 nm. Koncentrace se vypočítaly za použití standardní křivky (rekombinatní myši IL5) pomocí SoftmaxPro (rovnice se čtyřmi parametry) a vyjádřily se jako pg/ml.

Počínajíc s buňkami sleziny v žádné ze skupin se nemohl detekovat IL-5. Naopak ve všech skupinách se pozorovala se pozorovala velmi vysoká produkce IFN γ . Ve srovnání s ostatními skupinami se pozorovalo u skupiny myši, kterým se aplikovalo protein s adjuvans SBAS1c, pouze malé zvýšení IFN γ . To naznačuje indukci imunitní odezvy typu TH1.

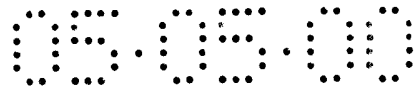
Co se týče buněk lymfatických žláz, velmi slabá produkce IFN γ se získala ve skupině myši, kterým se aplikoval samotný protein a 5-ti násobné až 10-ti násobné zvýšení se pozorovalo u protein s adjuvans. IL5 se mohlo detekovat ve skupině myši, kterým se aplikoval protein s adjuvans SBAS2.

Obrázky 36 a 37 porovnávají schopnost ProtD1/3 18 E7 His stimulovat produkci cytokinů IFN γ a IL5 po in vitro restimulaci buněk sleziny a lymfatických žláz.

Prottilátková odezva

Ve stejnou dobu jako orgány se izolovaly jednotlivá séra a podrobily se testu nepřímá ELISA.

Jako antigen potažený na povrchu prohlubní se použilo 2,5 μ g/ml čištěného proteinu protD1/3 18E7 HPV18. Po saturaci v PBS s 1% sérem právě narozených telat po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C se séra sériově naředila (počáteční ředění 1/100) v saturačním pufru a inkubovala se přes noc při teplotě 4 °C nebo 90 minut při teplotě 37 °C. Po promytí v PBS s Tween 20 se použily jako sekundární prottilátky kozí anti-myši Ig (1/1 000) nebo antiséra podtřídy kozích anti-myších Ig (celý IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) (1/5 000). Po inkubaci po dobu 90 minut při teplotě 37 °C se přidal streptavidin spojený s peroxydázou a jako substrát se použil TMB (tetra-methyl-benzidin/peroxid).



Po deseti minutách se reakce zastavila 0,5 M H₂SO₄ a stanovila se hodnota OD při vlnové délce 450 nm.

Velmi slabá protilátková odezva se vyvolala 2 injekcemi samotného ProtD1/3 18 E7. Celkové množství IgG se značně zvýšilo přidáním adjuvans do proteinové vakcíny.

Analýza koncentrací různých podtříd IgG vykazuje, že když se protein aplikuje injekcí v přítomnosti adjuvans DQS21 3D-MPL nebo SB62, QS21/3D-MPL, dojde ke slabému zvýšení procenta subtypu IgG2a: 28 % IgG1, 48 % IgG2a a 43% IgG1, 44% IgG2a ve srovnání s 46 % IgG1, 32 % IgG2a v případě, že se aplikoval protein bez adjuvans. Nejsilnější protilátková odezva se získala s proteinem připraveným v DQ alum s jasným posunem v koncentraci izotypu (80 % IgG1, 8 % IgG2a). Uvažuje se, že izotyp IgG2a u Balb/c myši je v obecném případě spojen s indukci imunitní odezvy typu TH1.

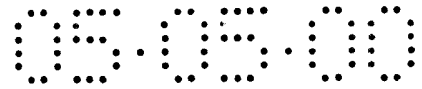
Tyto výsledky ukazují, že adjuvans DQS21, 3D-MPL a SB62 QS21/3D-MPL mají trend zvýšit profil humorální odezvy typu TH1, zatímco SBAS5 vyvolává jasno odezvu typu TH2.

Obrázek č. 38 porovnává střední ředění séra a relativní procento různých izotypů vyvolaných vakcinací u různých skupin myši.

Závěr:

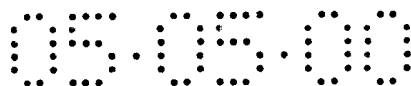
Ukázalo se, že fúzní protein 1/3 Prot D a časný protein E7 viru HPV 16 vyvolává silnou systémovou anti-nádorovou imunitu. Dále se ukázalo, že fúzní protein ProtD1/3 a E7 viru HPV 18 je pro myši imunogenní. Vakcinace fúzním proteinem protD1/3 E7 HPV 16 chrání myši před vytvořením nádoru s buňkami, které exprimují protein E7, a eliminovala malé předem vytvořené nádúrky exprimující E7 viru HPV 16, které se zavedly injekcí v odlišném místě než je místo vakcinace.

Ukázalo se, že protein protD1/3 E7 HPV16 v adjuvans je schopný zvýšit proliferaci pomocných buněk T, což naznačuje,



že se touto vakcinací indukpovala anti-nádorová odezva, která je alespoň s částí spojená s odezvou buněk CD4+T.

Také se ukázalo, že lepší protilátková buněčná odezva se vyvolala vakcinací s proteinem protD1/3E7 v přítomnosti 3D-MPL obsahujícím adjuvans. Převládajícím izotopem v séru myši C57BL/6 je IgG2b, což naznačuje, že došlo k imunitní odezvě typu TH1.



1. Fúzní protein obsahující antigen lidského papilomaviru vybraný ze skupiny zahrnující E6, E7 a fúzní protein E6E7 spojený s proteinem D nebo s jeho derivátem z Haemophilus influenzae B.
2. Protein podle nároku 1, kde proteiny E6 nebo E7 se získaly z HPV16 nebo HPV18.
3. Protein podle nároku 1 nebo 2, kde proteiny E7 se mutovaly, aby se omezilo navázání produktu genu retinoblastomu.
4. Protein podle nároku 1 nebo 2, kde se do oblasti p53 E6 zavedla mutace.
5. Protein podle libovolného z nároků 1 až 4, který dále obsahuje histidinový tag, který obsahuje alespoň 4 histidinové zbytky.
6. Sekvence DNA kódující protein podle libovolného z nároků 1 až 5.
7. Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje protein podle libovolného z nároků 1 až 5 a farmaceuticky přijatelné ředidlo a excipient.
8. Vakcína podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje adjuvans.
9. Vakcína podle nároku 7 nebo 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e protein je přítomen ve vehiklu, kterým je emulze olej ve vodě.
10. Vakcína podle nároku 8 nebo 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e adjuvans obsahuje 3D-MPL nebo QS21 nebo obě uvedené látky.
11. Vakcína podle libovolného z nároků 7 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje další antigen HPV.

12. Vakcína podle libovolného z nároků 7 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se může použít v medicíně.
13. Použití proteinu podle libovolného z nároků 7 až 11 při výrobě vakcíny vhodné pro imunoterapeutické ošetření pacienta, který trpí nádorovými lézemi (benigní nebo maligní) vyvolanými HPV.
14. Použití proteinu podle libovolného z nároků 7 až 11 při výrobě vakcíny, která brání infekci virem HPV.
15. Vektor obsahující sekvenci DNA podle nároku 6.
16. Vektor obsahující sekvenci DNA podle nároku 6 a sekvenci DNA kódující thioredoxin.
17. Host, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se transformoval sekvencí DNA podle nároku 6.
18. Host, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se transformoval vektorem podle nároku 15 nebo 16.
19. Host podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se dále transformoval sekvencí DNA kódující thioredoxin.
20. Způsob produkce proteinu podle libovolného z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje transformaci buňky hostitele sekvencí DNA podle nároku 6, expresi uvedené sekvence a izolaci požadovaného produktu.
21. Způsob produkce vakcíny podle libovolného z nároků 7 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje smíšení proteinu s vhodným adjuvans, ředidlem nebo s jiným farmaceuticky přijatelným excipientem.

Obr. 1a
Protein D1/3 E7 his

PV 2000-634
C.J. 4897H

1 MDPSSHSSNM ANTQMKSDKI IAHRGASGY LPEHTLESKA LAFAQQADYL

51 EQDLAMTKDG RLVVIHDHFL DGLTDVAKKF PHRHRKDGRY YVIDFTLKEI

101 QSLEMTENFE TMAMHGDTPT LHEYMLDLQP ETTDLICYEQ LNDSSSEEEDE

151 IDGPAGQAEP DRAHYNIVTF CCKCDSTLRL CVQSTHVDIR TLEDLLMGTL

201 GIVCPICSQK PTSGHHHHHH *

Obr. 1b

Sekvence plasmidu pro expresi fúzní bílkoviny ProtDthr126-
-E7-His (E7 z HPV16).

1 ATGGATCCAA GCAGCCATTC ATCAAATATG GCGAATACCC AAATGAAATC

51 AGACAAAATC ATTATTGCTC ACCGTGGTGC TAGCGGTTAT

TTACCAGAGC

101 ATACGTTAGA ATCTAAAGCA CTTGCGTTTG CACAACAGGC

TGATTATTTA

151 GAGCAAGATT TAGCAATGAC TAAGGATGGT CGTTTAGTGG

TTATTCACGA

201 TCACTTTTTA GATGGCTTGA CTGATGTTGC GAAAAAATTC
CCACATCGTC

251 ATCGTAAAGA TGGCCGTTAC TATGTCATCG ACTTTACCTT
AAAAGAAATT

301 CAAAGTTTAG AAATGACAGA AAACTTTGAA ACCATGGCCA
TGCAATGGAGA

351 TACACCTACA TTGCATGAAT ATATGTTAGA TTTGCAACCA
GAGACAACCTG

401 ATCTCTACTG TTATGAGCAA TTAAATGACA GCTCAGAGGA
GGAGGATGAA

451 ATAGATGGTC CAGCTGGACA AGCAGAACCG GACAGAGCCC
ATTACAATAT

501 TGTAACCTTT TGTTGCAAGT GTGACTCTAC GCTTCGGTTG TGCGTACAAA

551 GCACACACGT AGACATTCGT ACTTTGGAAG ACCTGTTAAT
GGGCACACTA

601 GGAATTGTGT GCCCCATCTG TTCTCAGAAA CCAACTAGTG

GCCACCATCA

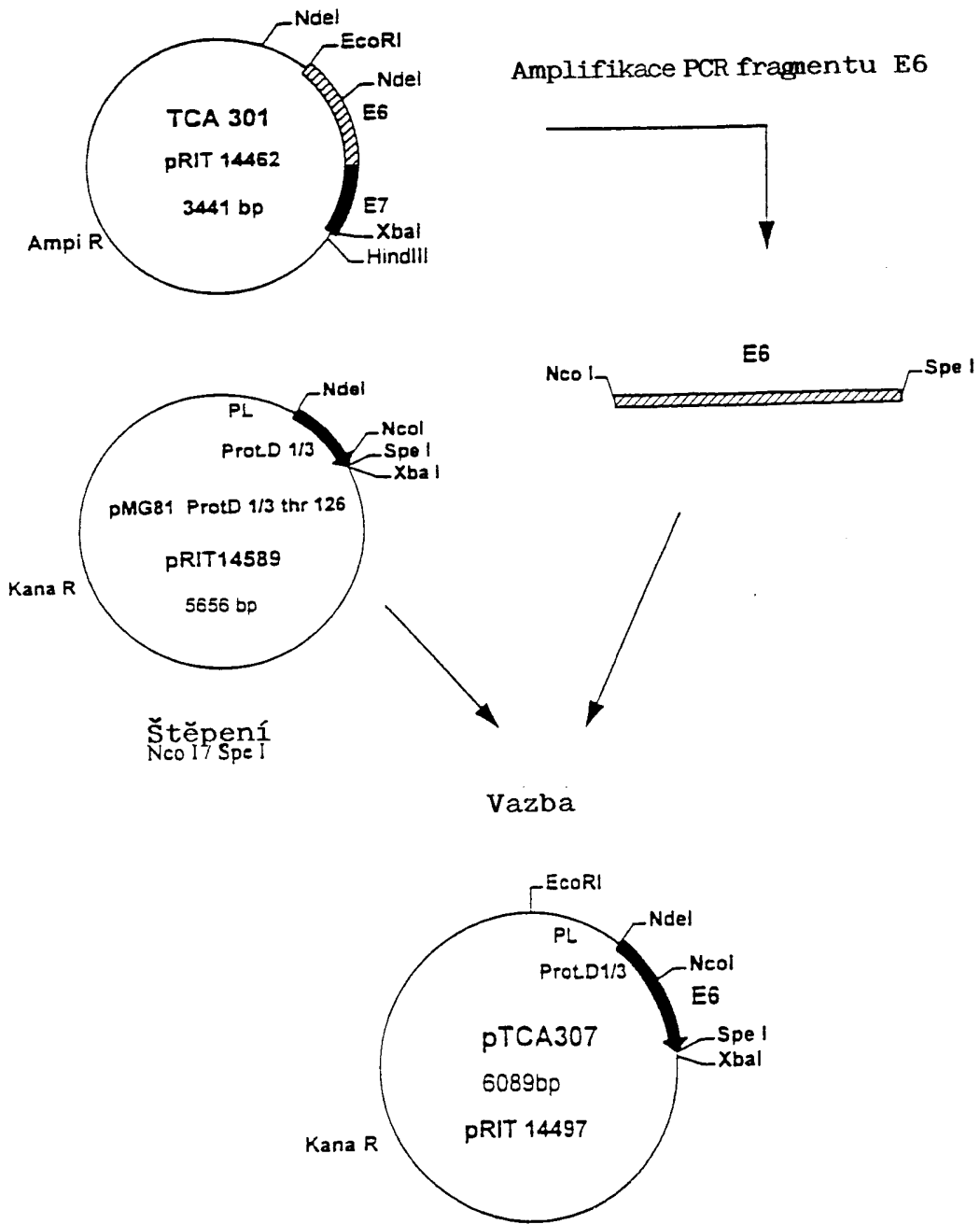
651 CCATCACCATTAA

04-07-00

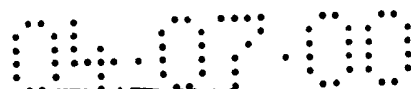
Obr. 1

04.07.00

Konstrukce plasmidu pRIT 14497 (TCA 307)



Obr. 2

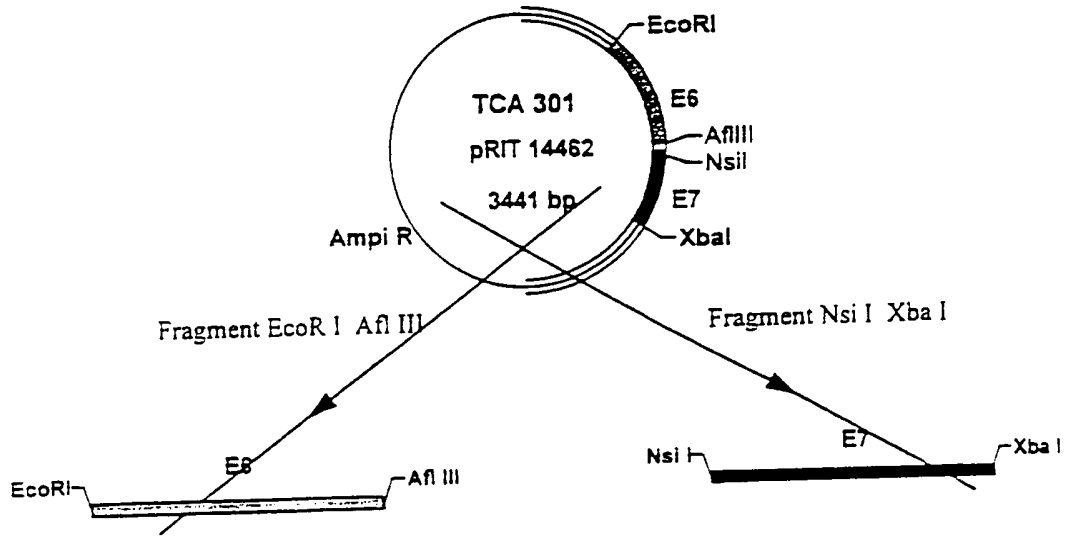
**Nukleotidová sekvence**

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGA 200
TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATCCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTTAGAAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGCCATGTTTCAGGA 350
CCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAA 400
CAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTA 450
CTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATA 500
TAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATT 550
CTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACA 600
TTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTAT 650
TAACTGTCAAAGCCACTGTGTCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACA 700
AAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTCGATGTATG 750
TCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGACTAGTGG 800
CCACCATCACCATCACCATTAA 822

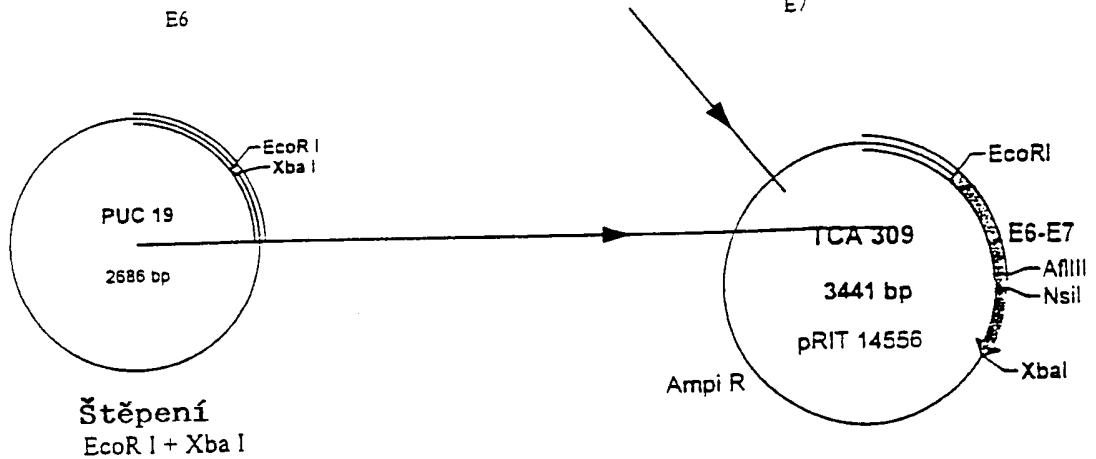
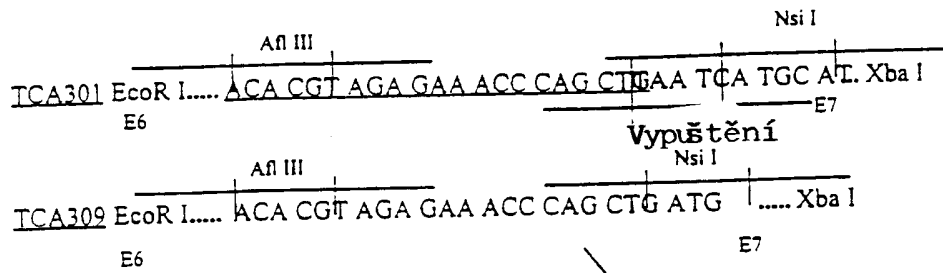
Peptidová sekvence

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
EQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMTENFETMAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL 150
LRREVDYDFAFRDLICIVYRDGNPYAVCDKCLKFYKISEYRHYCYSLYGTT 200
LEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCM 250
SCCRSSRTRRETQLTSGHHHHHH. 274

Konstrukce plasmidu pRIT 14556 (TCA 309)



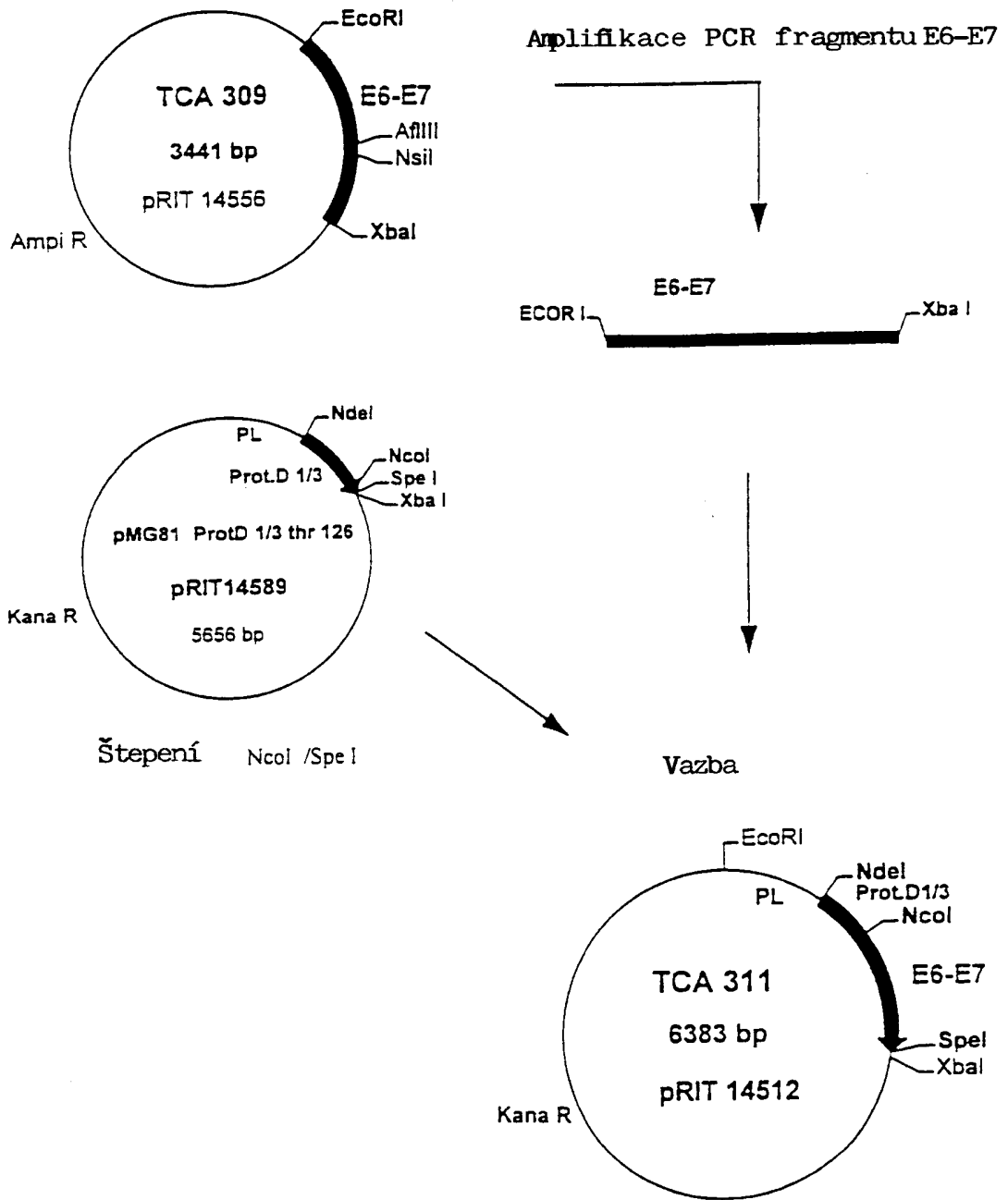
Konstituce fúzního proteinu mezi E6 a E7: vypuštění 5 nukleotidů uložením syn adaptoru mezi Afl III a Nsi I



Obr. 4

04.07.00

Konstrukce plasmidu pRIT14512 (TCA311)



Obr. 5

Nukleotidové sekvence

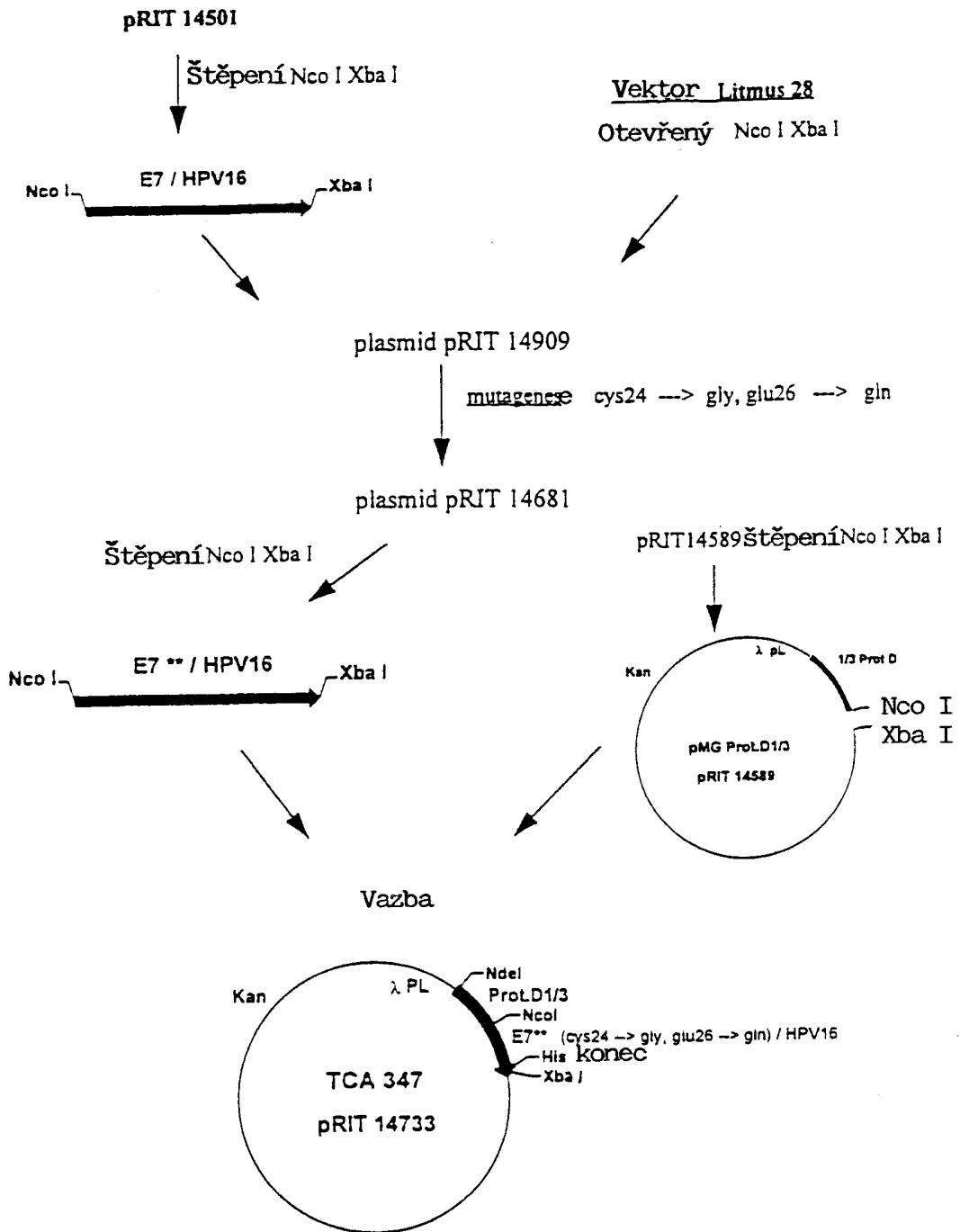
ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
 GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGA 200
 TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATTCCCACATCGTC 250
 ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
 CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGCCATGTTTCAGGA 350
 CCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAA 400
 CAACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTAAGCAACAGTTA 450
 CTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATA 500
 TAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATT 550
 CTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACA 600
 TTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTAT 650
 TAACTGTCAAAGCCACTGTGTCCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACA 700
 AAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTGGTGGACCGGTTCGATGTATG 750
 TCTTGTTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGATGCATGG 800
 AGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAA 850
 CTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGAT 900
 GAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAA 950
 TATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTAC 1000
 AAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACA 1050
 CTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTGGCCACCA 1100
 TCACCATCACCATTAA 1116

Peptidové sekvence

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
 EQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
 QSLEMTENFETMAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIIIECVYCKQQL 150
 LRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTT 200
 LEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCM 250
 SCCRSSRTRRETQLMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEED 300
 EIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGT 350
 LGIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 372

04.07.00

Konstrukce plasmidu pRIT 14733



Obr. 7

04.07.00

Sekvence proteinu D1/3 - E7 mut. (cys24 → gly, glu26 → gln) HPV16.

Nukleotidové sekvence:

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCGTTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGA 200
TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATTCCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTGAACCATGGCCATGCATGGAGA 350
TACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACA ACTG 400
ATCTCTACGGTTATCAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAA 450
ATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATAT 500
TGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAA 550
GCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTA 600
GGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTGGCCACCATCA 650
CCATCACCATTAA 663

Mutace: T409 → G

G415 → C

Peptidová sekvence:

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQQADYL 50
EQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMTENFETMAMHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYGYQQLNDSSEEEDE 150
IDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRCLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTL 200
GIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 221

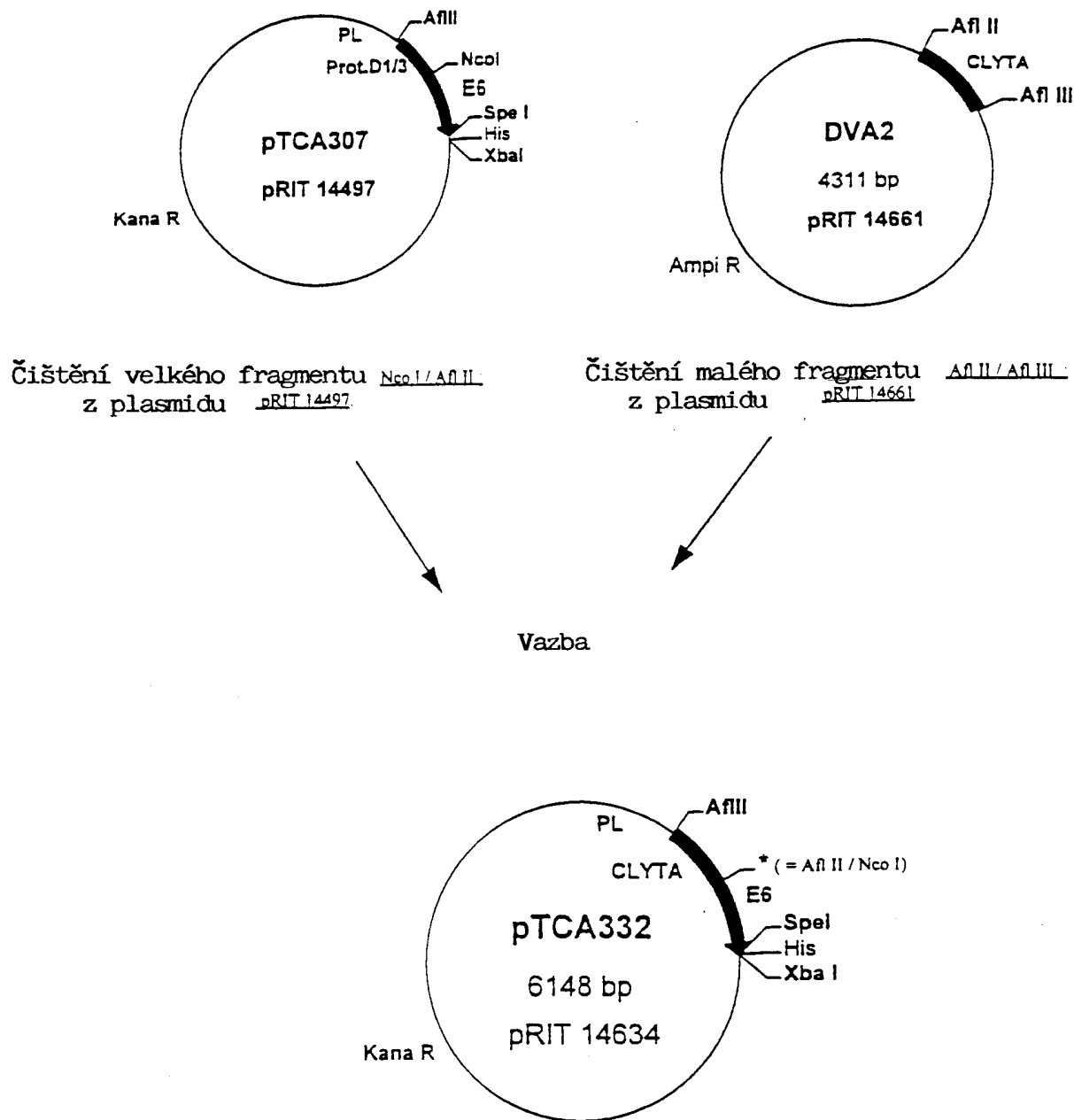
Mut. aminokyseliny cys24 → gly (=C24→G), glu26 → gln (=E26→Q) z E7 jsou zbytky 137 a 139 fúzního proteinu

Nikonec M D P -ProtD1/3(aa4 --> 111)-M A- mut. E7(aa 114 --> 211)-

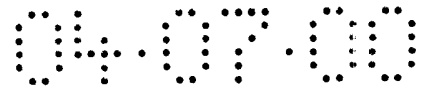
TSGHHHHHH C konec.

Obr. 8

Konstrukce plasmidu pRIT 14634 (TCA332)



Obr. 9



SEKVENCE CLYTA - E6 - His

Nukleotidová sekvence

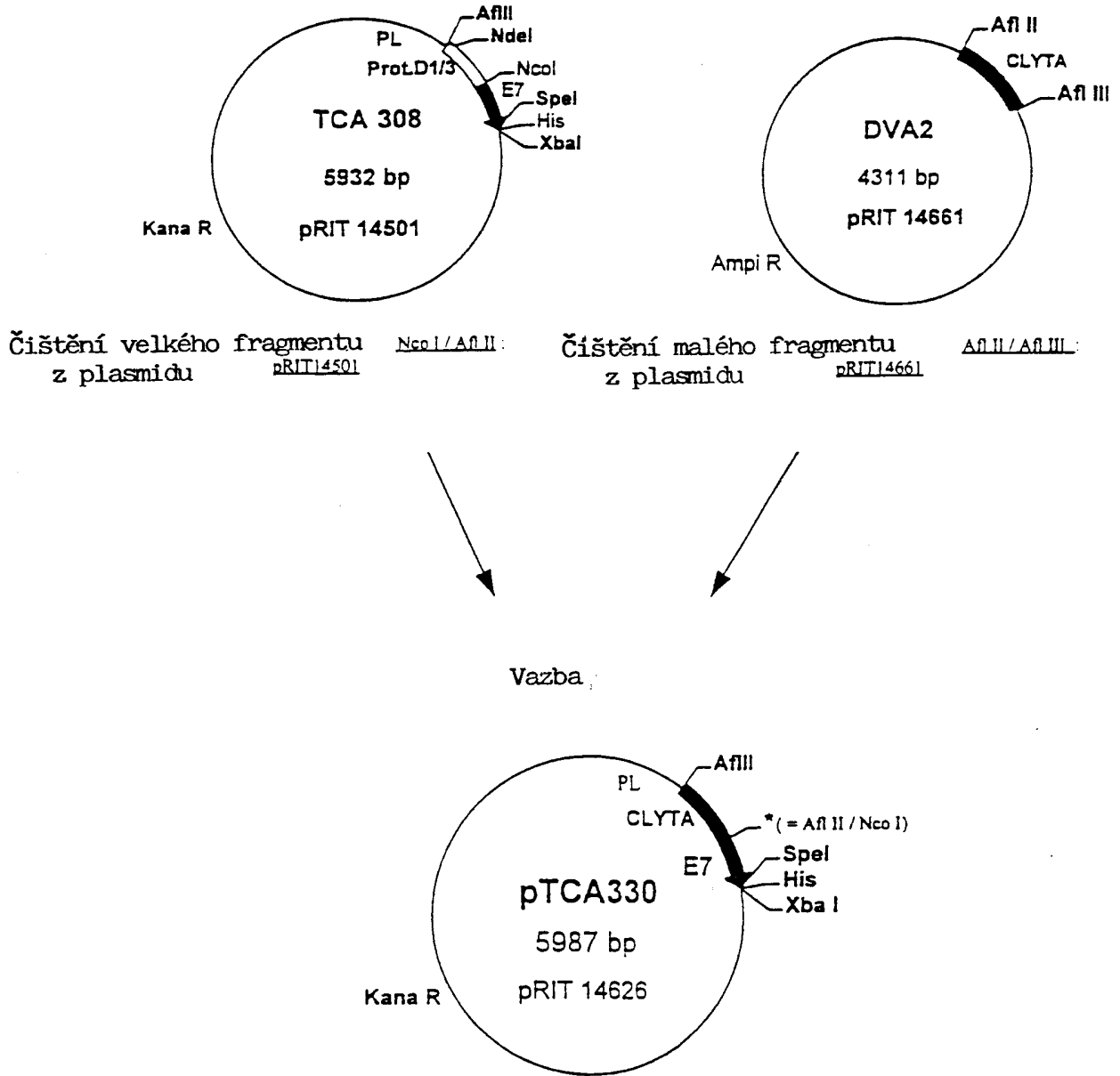
ATGAAAGGGGGAATTGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGC 100
TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150
AACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTA 200
CTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGG 250
ACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGGTATCAAATGCC 300
TTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGG 350
AACACTGGCAGACAGGCCAGAATTGGCCAGCATGCTGGACATGGCCATGT 400
TTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAG 450
CTGCAAACAACACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCA 500
ACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCA 550
TAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAG 600
TTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGG 650
AACAACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTA 700
GGTGTATTAAGTGTCAAAAAGCCACTGTGTCTGAAGAAAAGCAAAGACAT 750
CTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTCG 800
ATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGA 850
CTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 879

Peptidová sekvence

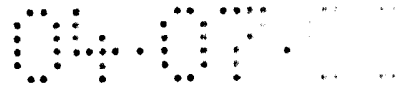
MKGGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWFD 50
NSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMVSNA 100
FIQSADGTGWYYLKPDLADRPELASMLDMAMFQDPQERPRKLPQLCTE 150
LQTTIHDIILECVYCKQQLLRREYDFAFRDLICIVYRDGNPYAVCDKCLK 200
FYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRH 250
LDDKQRFHNIRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQLTSGHHHHHH. 293

Fig. 10

Konstrukce plasmidu pRiT 14626 (TCA330)



Obr. 11

**SEKVENCE****CLYTA - E7 - His.****Nukleotidová sekvence**

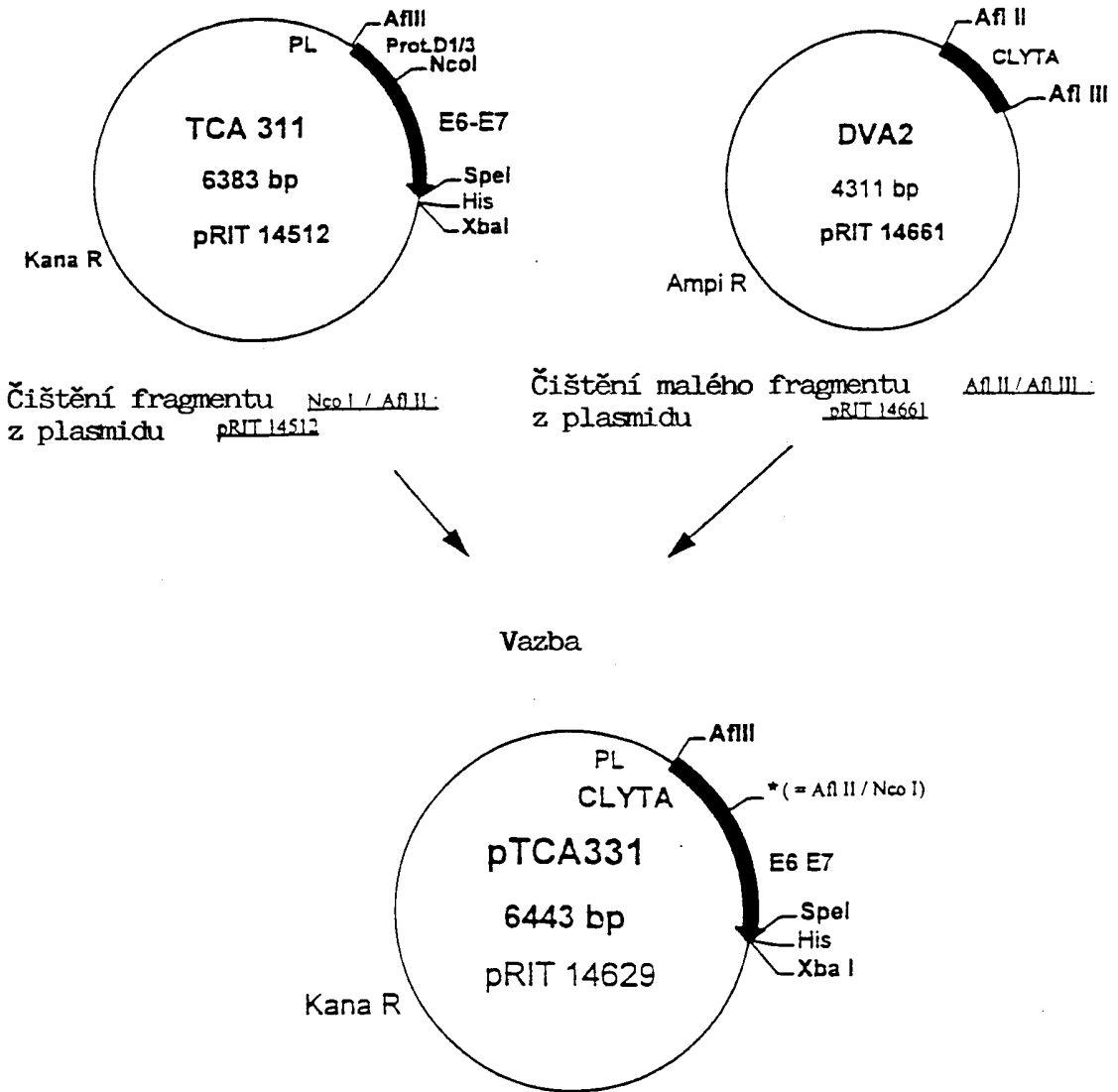
ATGAAAGGGGGAATTGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGC 100
TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150
AACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTA 200
CTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGG 250
ACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGGTATCAAATGCC 300
TTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGG 350
AACACTGGCAGACAGGCCAGAATTGGCCAGCATGCTGGACATGGCCATGC 400
ATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAG 450
ACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGA 500
GGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCAT 550
ACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGC 600
GTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGG 650
CACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTGGCC 700
ACCATCACCATCACCATTAA 720

Peptidová sekvence

MKGGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWFD 50
NSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMVSNA 100
FIQSADGTGWYYLKP DGT LADRPELASMLDMAMHGD TPTLHEYMLDLQPE 150
TTDL YCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRLC 200
VQSTHVDIRTLEDLLMGT LGIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 240

Obr. 12

Konstrukce plasmidu pRIT 14634 (TCA331)



Obr. 13

04.07.00

SEKVENCE CLYTA - E6E7 - His.

Nukleotidové sekvence

ATGAAAGGGGGAATTGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTT 50
TGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGC 100
TTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGAC 150
AACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTA 200
CTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGG 250
ACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGGTATCAAATGCC 300
TTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGG 350
AACACTGGCAGACAGGCCAGAATTGGCCAGCATGCTGGACATGGCCATGT 400
TTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAG 450
CTGCAAACAACACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCA 500
ACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCA 550
TAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAG 600
TTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGG 650
AACAAACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTA 700
GGTGTATTAAGTGTCAAAAAGCCACTGTGTCTGAAGAAAAGCAAAGACAT 750
CTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTCG 800
ATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGA 850
TGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCA 900
GAGACAACTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGA 950
GGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCC 1000
ATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTG 1050
TGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTIONTTGGAAGACCTGTTAAT 1100
GGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCAACTAGTG 1150
GCCACCATCACCATCACCATTAA 1173

Peptidové sekvence

MKGGIVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWFD 50
NSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMVSNA 100
FIQSADGTGWYYLKPDLADRPPELASMLDMAMFQDPQERPRKLPQLCTE 150
LQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLK 200
FYSKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRH 250

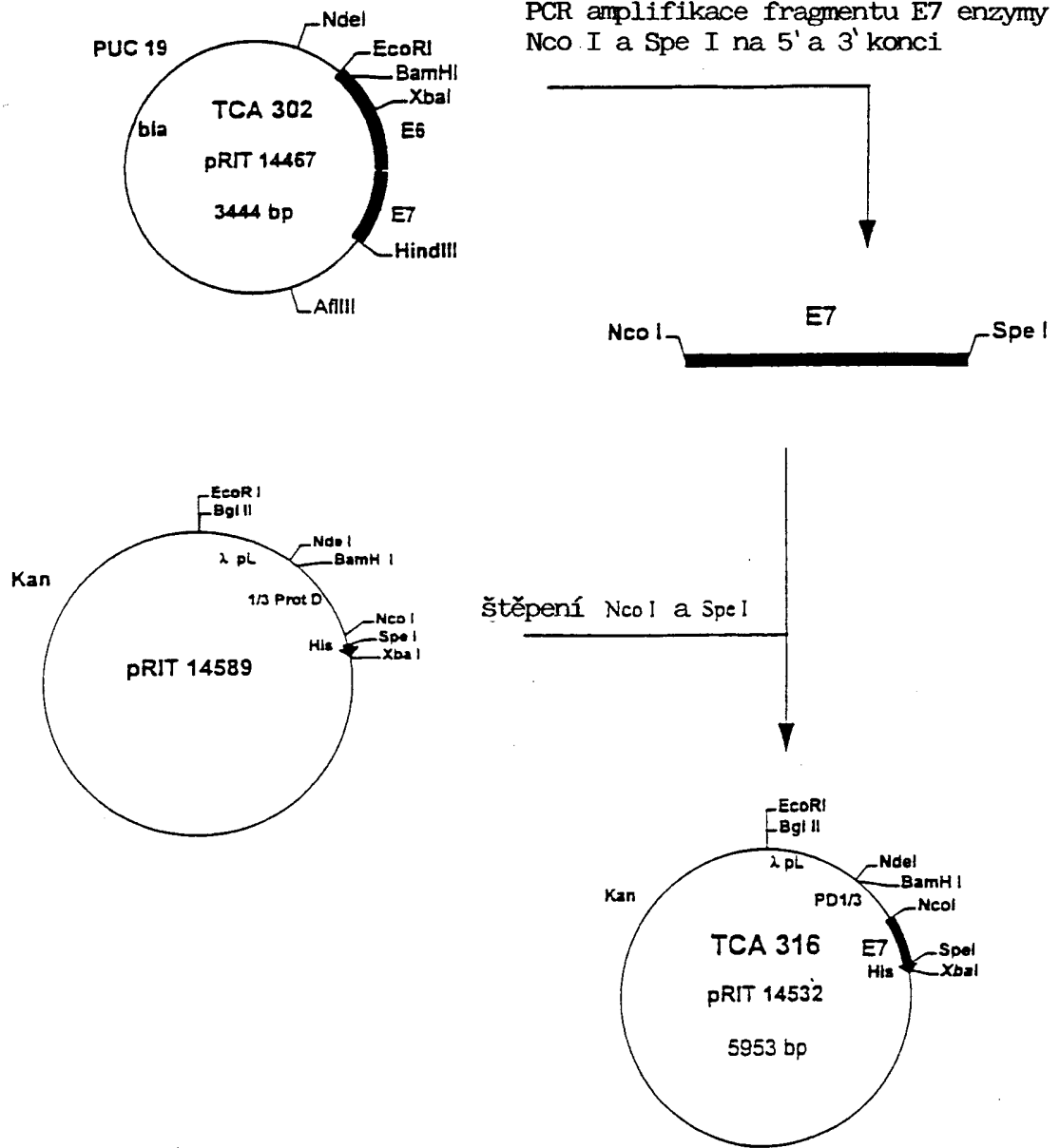
040701

LDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQLMHGDTPTLHEYMLDLQP 300
ETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKCDSTLRL 350
CVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKPTSGHHHHHH. 391

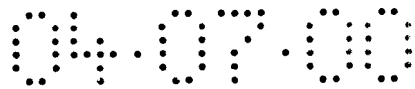
Obr. 14

04.07.00

Konstrukce plasmidu pRIT 14532 (TCA 316).



Obr. 15



SEKVENCE PROTEINU D1/3 -E7-HIS /HPV18

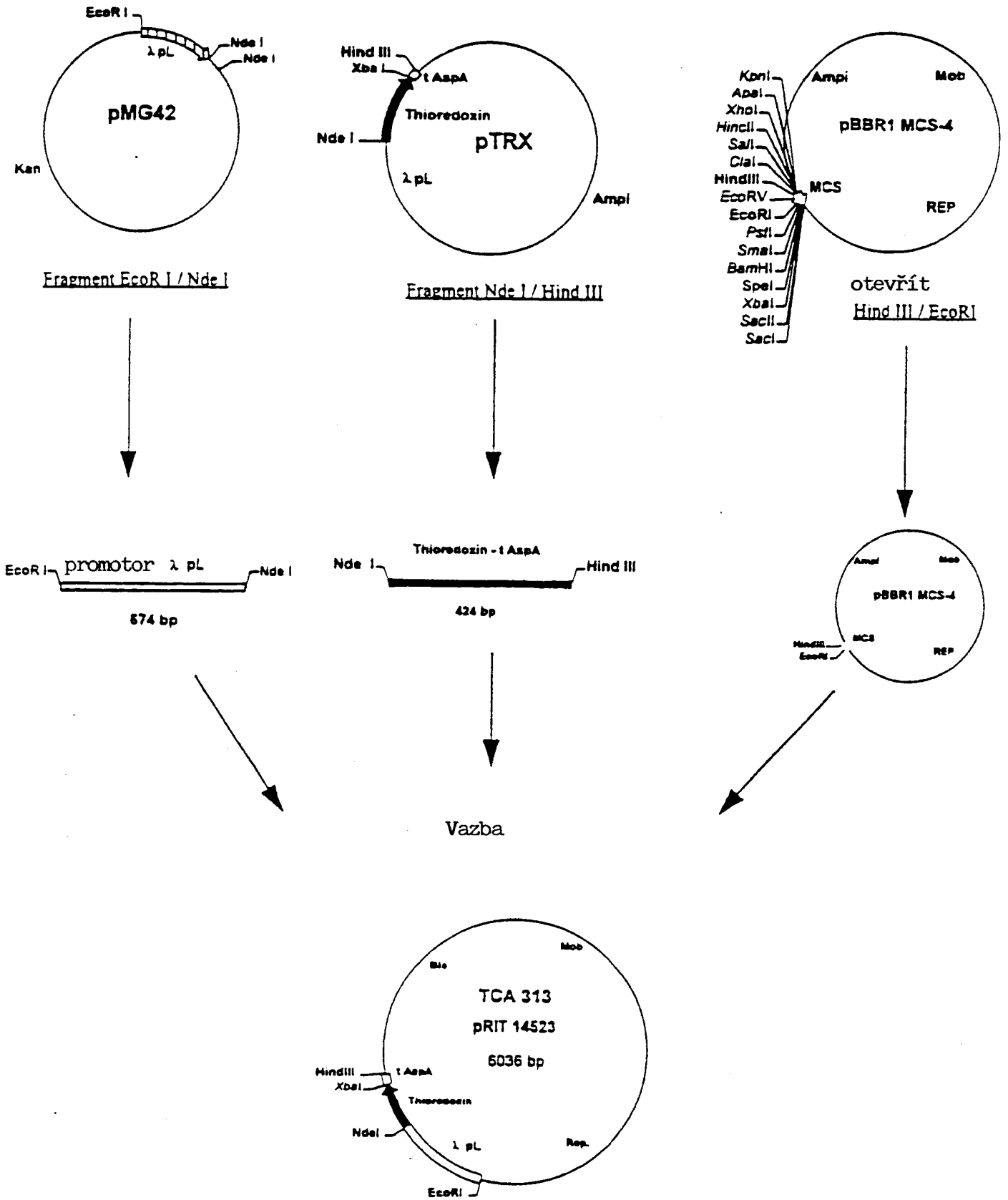
Nukleotidová sekvence

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCGTTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGA 200
TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATTCCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGCCATGCATGGACC 350
TAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCCCAAAATGAAA 400
TTCCGGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450
AACGATGAAATAGATGAAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCCGACGAGC 500
CGAACCACAACGTCACACAATGTTGTGTATGTGTTGTAAGTGTGAAGCCA 550
GAATTGAGCTAGTAGTAGAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAG 600
CAGCTGTTTCTGAACACCCTGTCTTTGTGTGTCCGTGGTGTGCATCCCA 650
GCAGACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 684

Peptidová sekvence

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKA 40
LAFQQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKF 80
PHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETMAMHGPKAT 120
LQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDEVNHQ 160
HLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARJELVVESSADDLRAFQ 200
QLFLNNTLSFVCPWCASQQTSGHHHHHH. 228

Obr. 16



Obr. 17

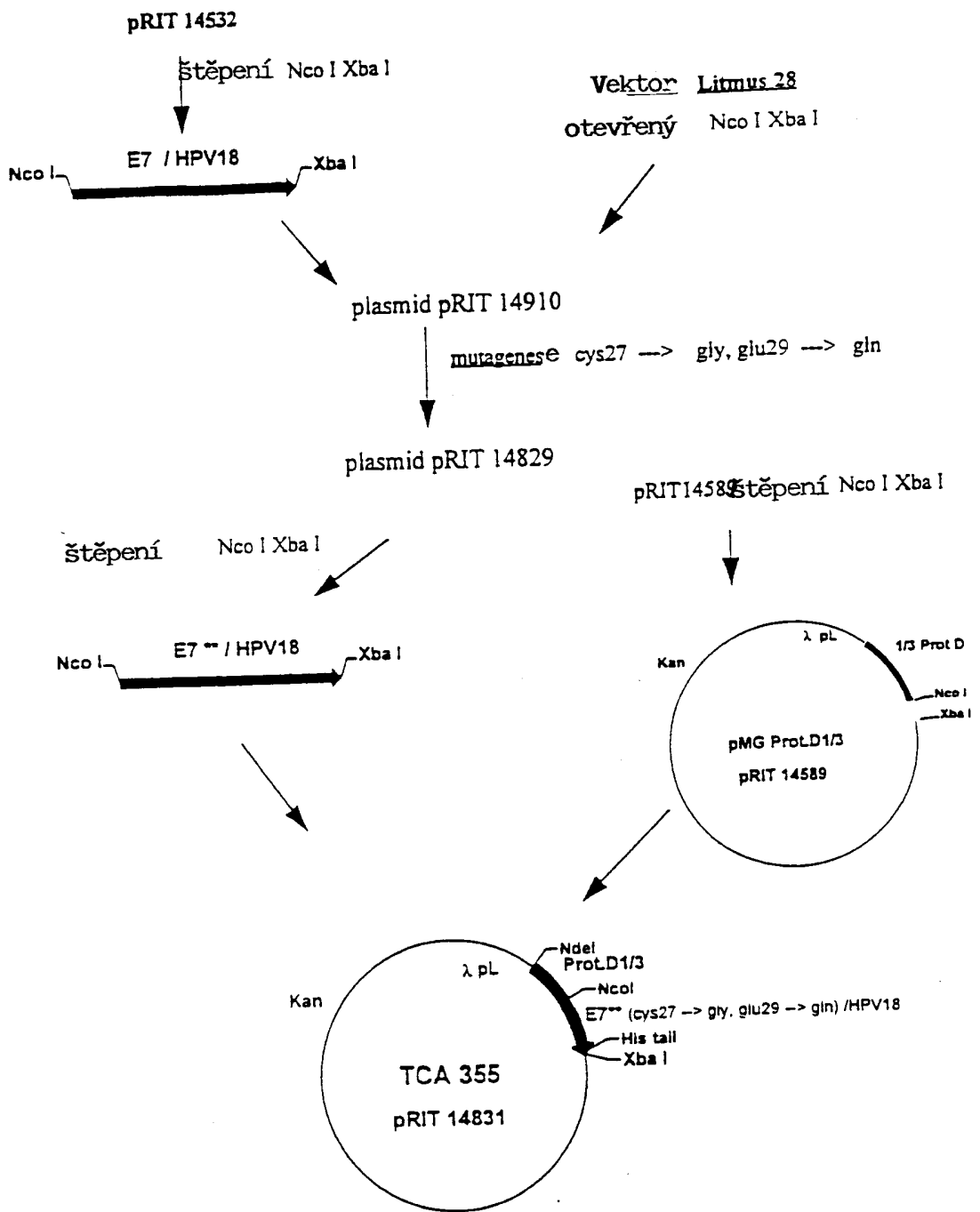


SEKVENCE THIOREDOXIN

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIA 40
PILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLL 80
LFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLA. 110

Obr. 18

Konstrukce plasmidu pRIT 14831



Obr. 19

Sekvence proteinu D1/3 - E7 mut. (cys27 → gly, glu29 → gln) HPV18.

Nukleotidová sekvence:

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
 AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
 ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGC GTTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
 GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGA 200
 TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATTCCCACATCGTC 250
 ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
 CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAAC TTTGAAACCATGGCCATGCATGGACC 350
 TAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCCCAAAATGAAA 400
 TTCCGGTTGACCTTCTAGGTCACCAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAA 450
 AACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACATTTACCAGCCCGACGAGC 500
 CGAACCACAACGTCACACAATGTTGTGTATGTGTTGTAAGTGTGAAGCCA 550
 GAATTGAGCTAGTAGTAGAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAG 600
 CAGCTGTTTCTGAACACCCTGTCCTTTGTGTGTCCGTGGTGTGCATCCCA 650
 GCAGACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 684

Mutace: T418 → G

G424 → C

Peptidová sekvence:

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
 EQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDG RYYVIDFTLKEI 100
 QSLEMTENFETMAMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLGHQQLSDSEEE 150
 NDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCCCKCEARIELVVESSADDLRAFQ 200
 QLFLNNTLSFVCPWCASQQTSGHHHHHH. 228

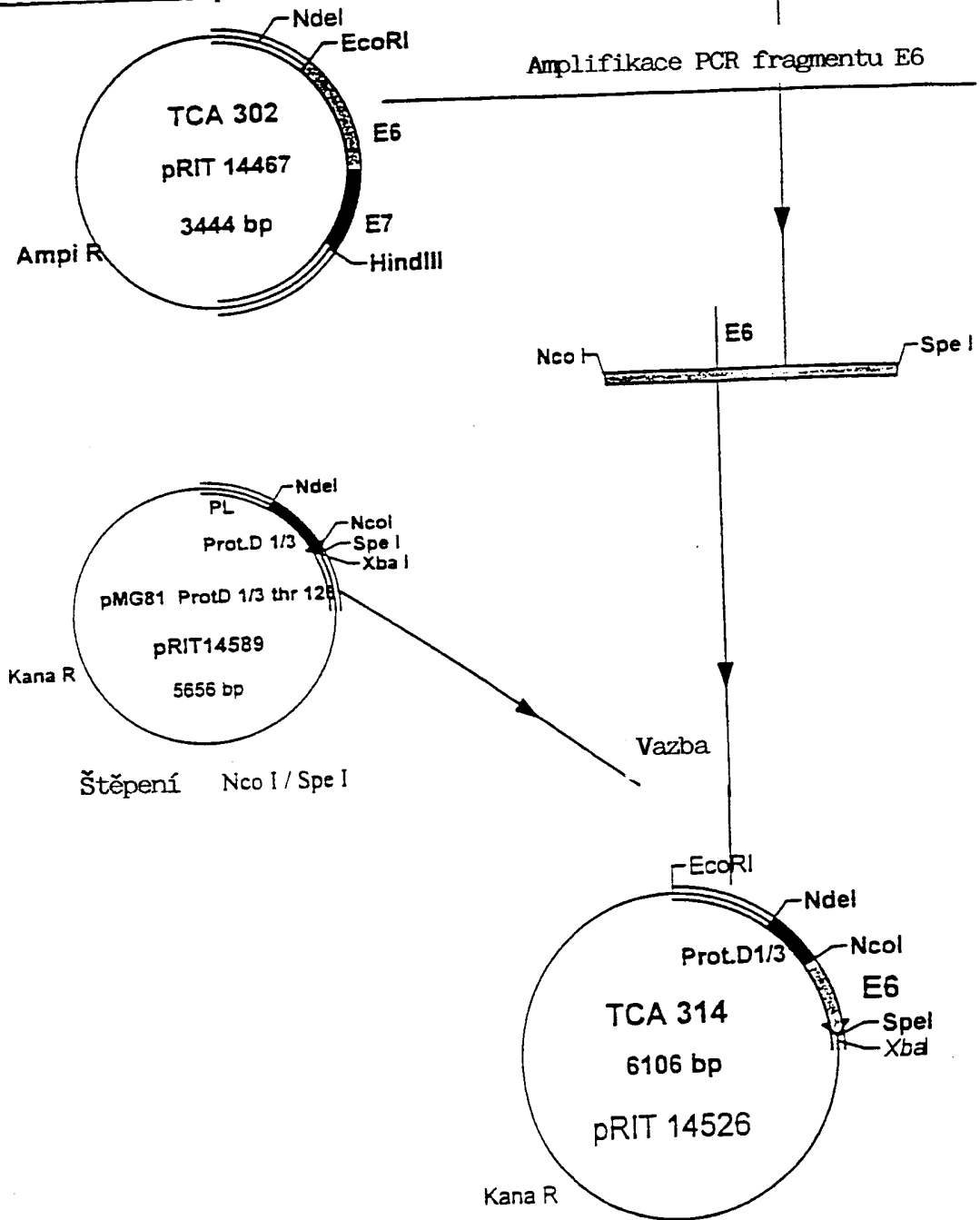
mut. aminokysel.: cys27 → gly (=C27→G), glu29 → gln (=E29→Q)z E7 jsou zbytky 140 a 142 fúzního proteinu.

N kon. MDP -ProtD1/3(aa4 --> 111)-M A- mut. E7(aa 114 --> 218)-TSGHHHHHH

C konec.

Obr. 20

Konstrukce plasmidu **pRIT 14526 (TCA 314)**



Obr. 21

04.07.00

SEKVENCE PROTEINU D1/3 - E6 - His / HPV18.

Nukleotidová sekvence

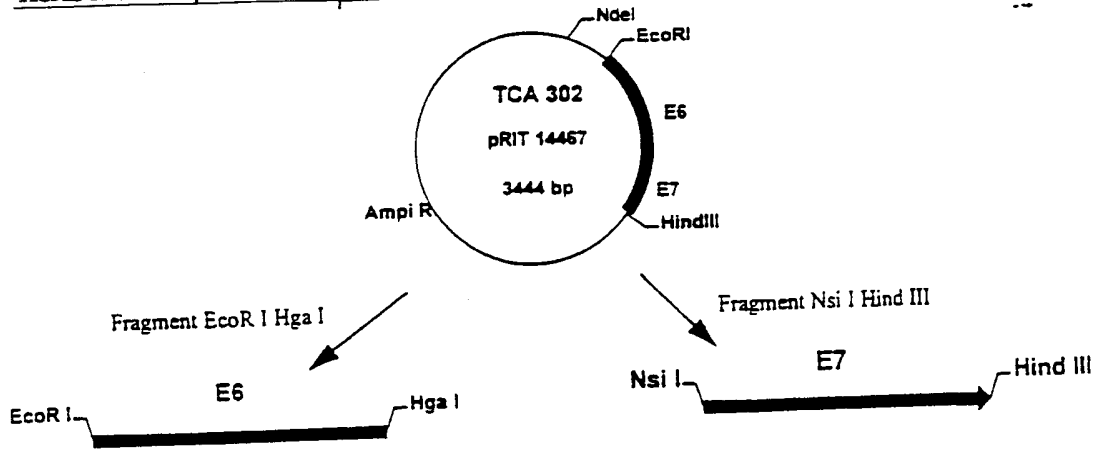
ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTTAGTGGTTATTCACGA 200
TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATTCCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTTGAAACCATGGCGCGCTTTGAGGA 350
TCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAAGTGAACA 400
CTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATTG 450
GAACTTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTA 500
TAGAGACAGTATAACCGCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTTATT 550
CTAGAATTAGAGAATTAAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACA 600
TTGGAAAACTAACTAACACTGGGTTATACAATTTATTAATAAGGTGCCT 650
GCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAGACACCTTAATG 700
AAAAACGACGATTTACACAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCAT 750
TCGTGCTGCAACCGAGCACGACAGGAACGACTCCAACGACGCAGAGAAAC 800
ACAAGTAACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATTAA 837

Peptidová sekvence

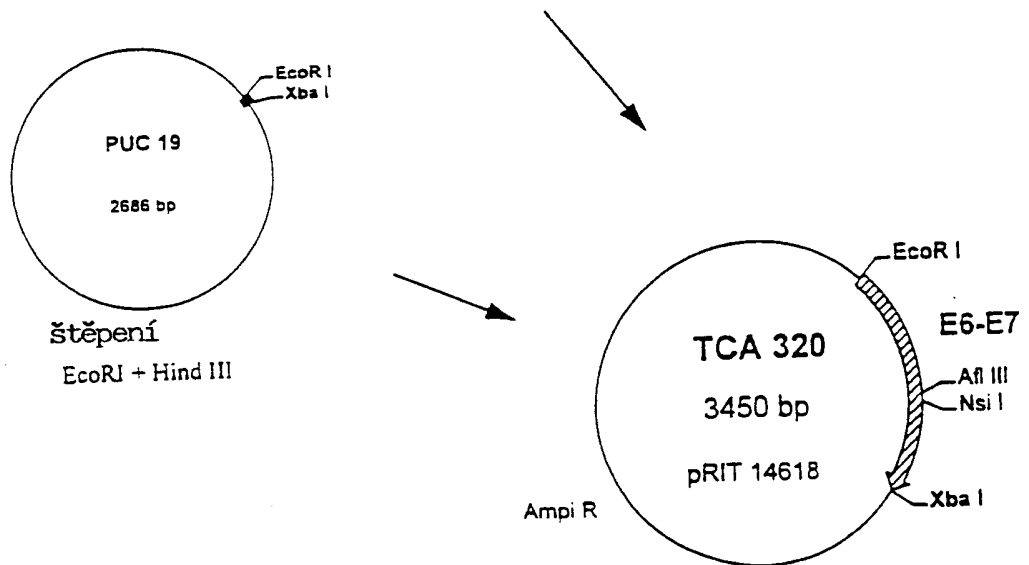
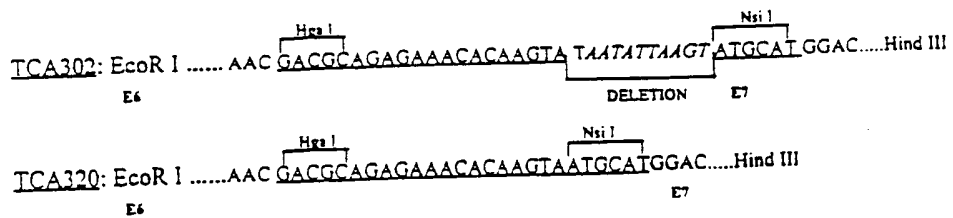
MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
EQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEI 100
QSLEMTENFETMARFEDPTRRYPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150
ELTEVFEFKDFVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDT 200
LEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLNEKRRFHNIAGHYRGQCH 250
SCCNRARQERLQRRRETQVTSGHHHHHH. 279

Obr. 22

Konstrukce plasmidu pRIT 14618 (TCA 320)



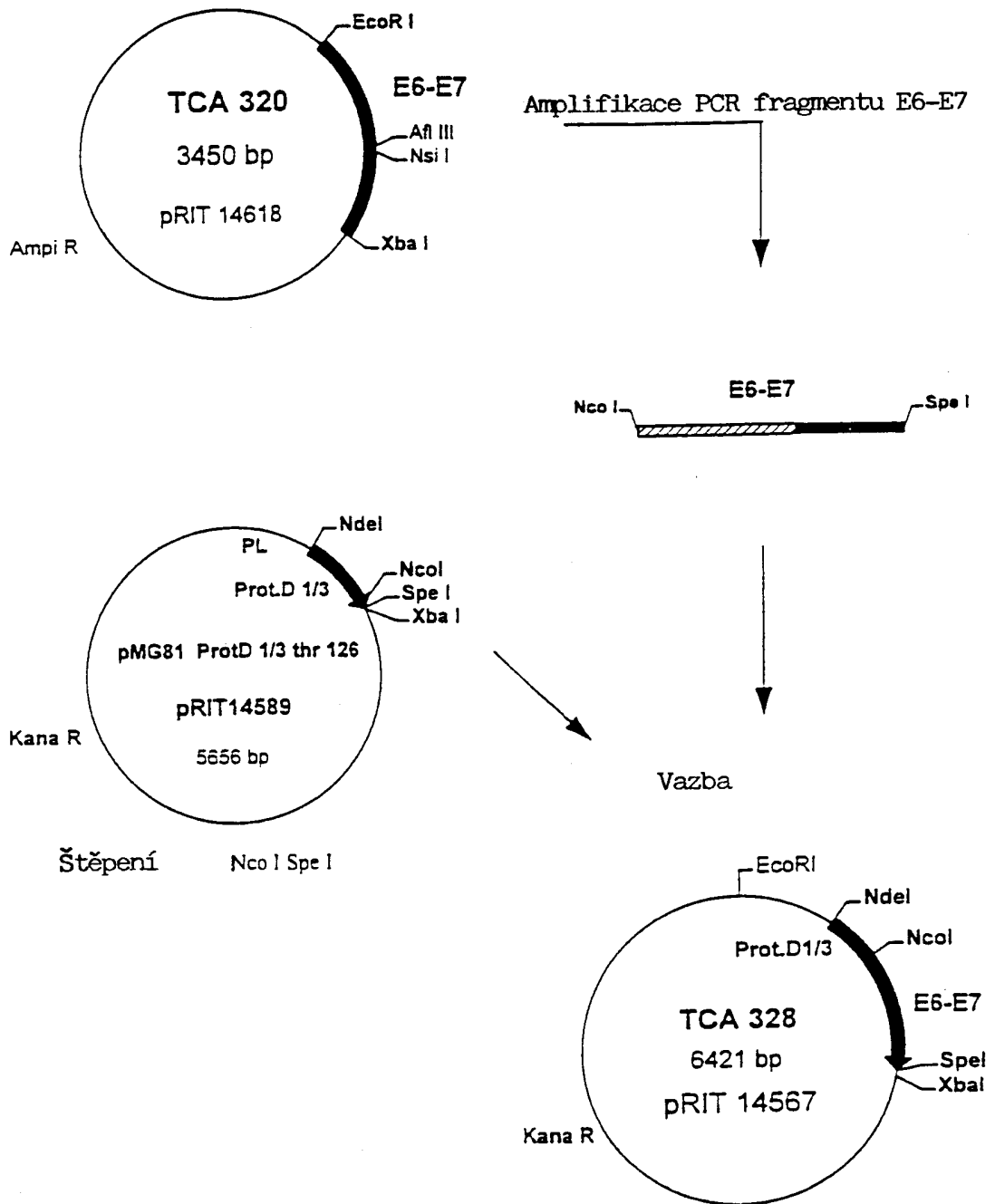
Konstituce fúze mezi E6 a E7: vypuštění 11 nukleotidů uložením
synthetického adaptoru mezi Hga I a Nsi I



Obr. 23

04.07.00

Konstrukce plasmidu pRIT 14567 (TCA328)



Obr. 24

04.07.00

SEKVENCE PROTEINU D1/3 - E6 - E7 - His / HPV18.

Nukleotidová sekvence

ATGGATCCAAGCAGCCATTCATCAAATATGGCGAATACCCAAATGAAATC 50
AGACAAAATCATTATTGCTCACCGTGGTGCTAGCGGTTATTTACCAGAGC 100
ATACGTTAGAATCTAAAGCACTTGCCTTGCACAACAGGCTGATTATTTA 150
GAGCAAGATTTAGCAATGACTAAGGATGGTCGTTTAGTGGTTATTCACGA 200
TCACTTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATCCACATCGTC 250
ATCGTAAAGATGGCCGTTACTATGTCATCGACTTTACCTTAAAAGAAATT 300
CAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTGAACCATGGCGCGCTTTGAGGA 350
TCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACCTGAACA 400
CTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATTG 450
GAACTTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTA 500
TAGAGACAGTATACCGCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTTIATT 550
CTAGAATTAGAGAATTAAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACA 600
TTGGAAAACTAACTAACACTGGGTTATACAATTTATTAATAAGGTGCCT 650
GCGGTGCCAGAAACCGTTGAATCCAGCAGAAAACTTAGACACCTTAATG 700
AAAAACGACGATTTACAACATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGTGCCAT 750
TCGTGCTGCAACCGAGCACGACAGGAACGACTCCAACGACGCAGAGAAAC 800
ACAAGTAATGCATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATT 850
TAGAGCCCCAAAATGAAATTCCGGTTGACCTTCTATGTCACGAGCAATTA 900
AGCGACTCAGAGGAAGAAAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCATCAACA 950
TTTACCAGCCCGACGAGCCGAACCACAACGTCACACAATGTTGTGTATGT 1000
GTTGTAAGTGTGAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGAAAGCTCAGCAGAC 1050
GACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTCTGAACACCCTGTCCTTTGTGTG 1100
TCCGTGGTGTGCATCCCAGCAGACTAGTGGCCACCATCACCATCACCATT 1150
AA 1152

Peptidová sekvence

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYL 50
EQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEI 100
QSLEMTENFETMARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVL 150
ELTEVFEFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIREL RHYSDSVYGD 200
LEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLNEKRRFHNIAGHYRGQCH 250

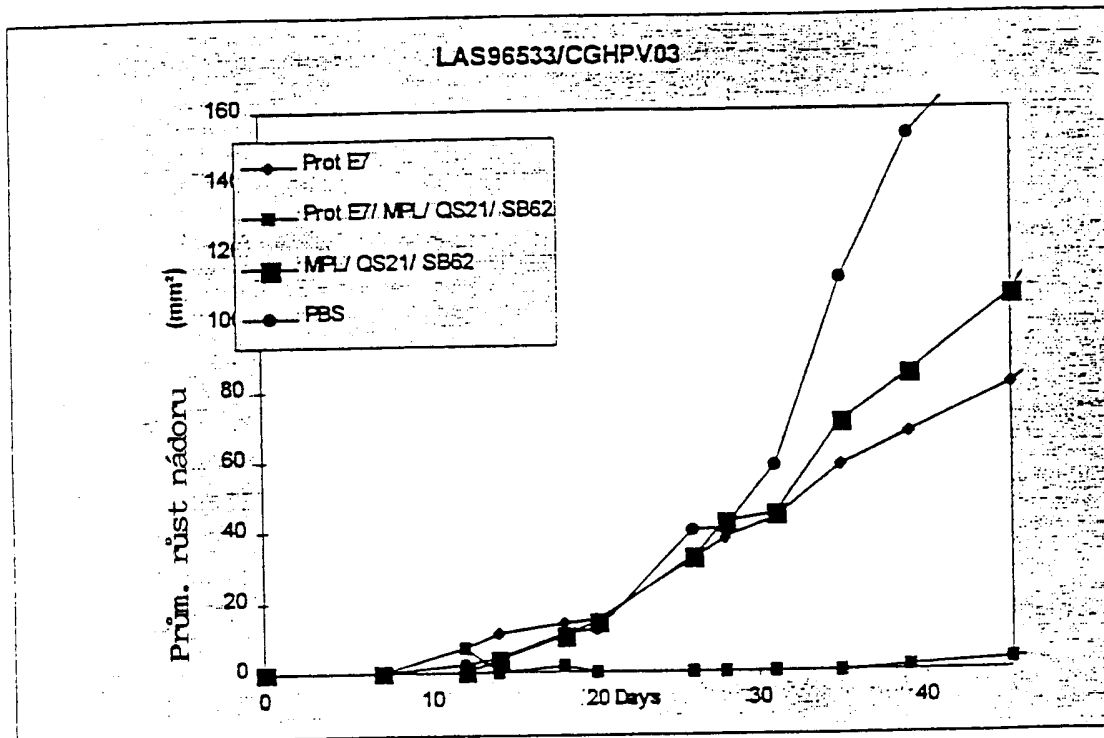
04.07.00

SCCNRARQERLQRRRETQVMHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQL 300
SDSEEENDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSAD 350
DLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQTSGHHHHH. 384

Obr. 25

Obr. 26

Léčebný účinek vakcinace proteinu ProtD1/3 E7, HPV16 na růst nádoru TC1



Obr. 27

Lymfoproliferace slezinných buněk (stimulační index) SI

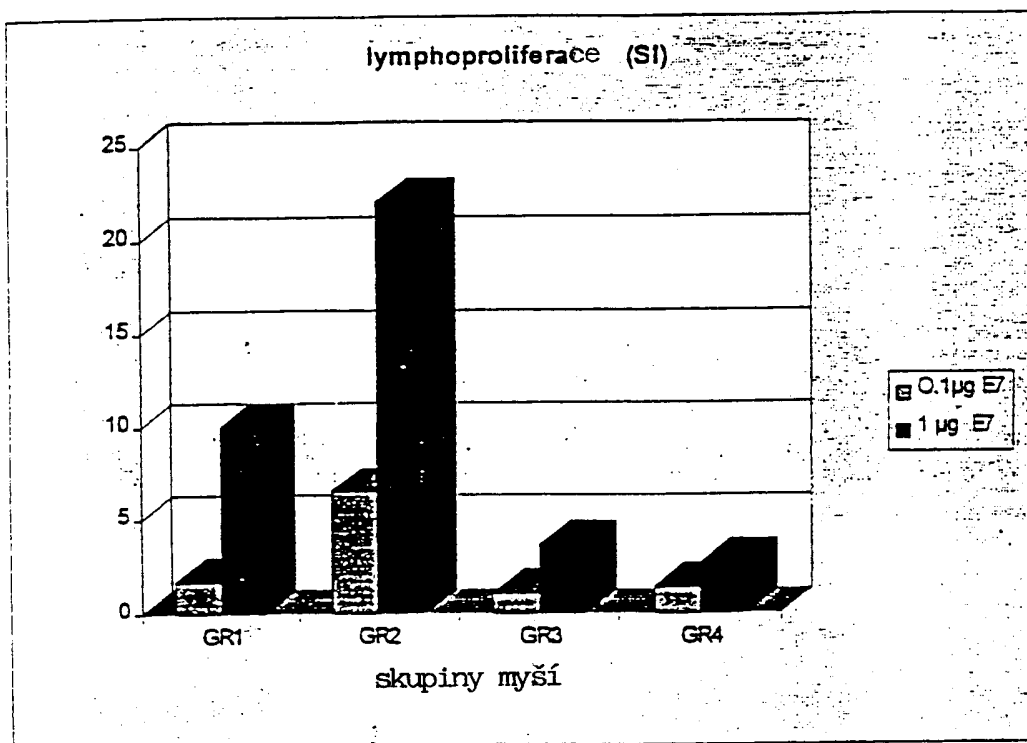
72 h in vitro restimulace ProtD1/3E7 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Skupina 1: ProtD 1/3 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 E7 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 4: PBS



Obr. 28

Lymfoproliferace buněk lymfatických žláz (stimulační index) SI
72 h in vitro restimulace ProtD1/3E7 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

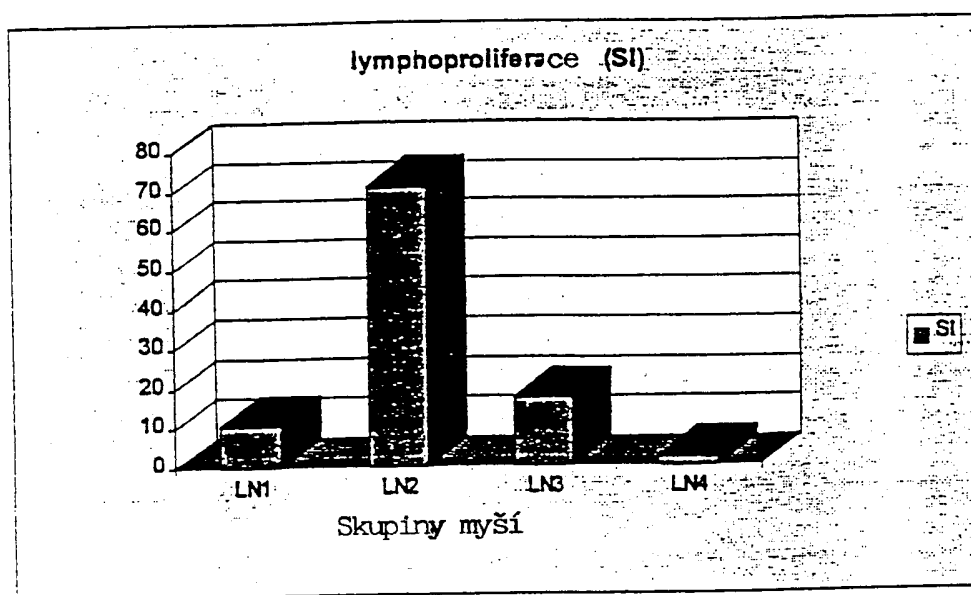
(exp 96533)

Skupina 1: ProtD 1/3 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 E7 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 4: PBS



Obr. 29

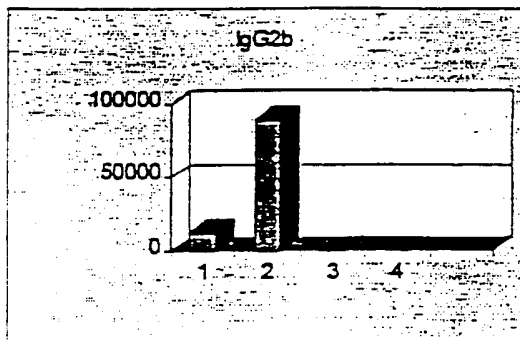
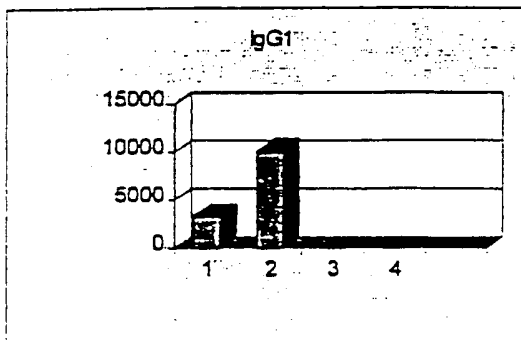
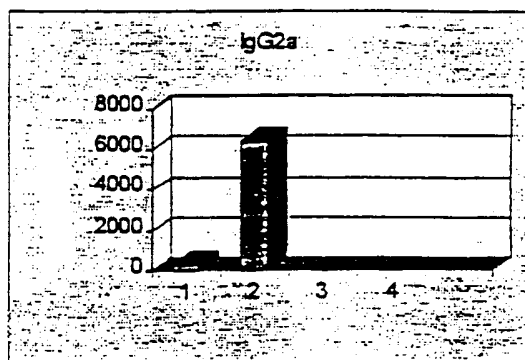
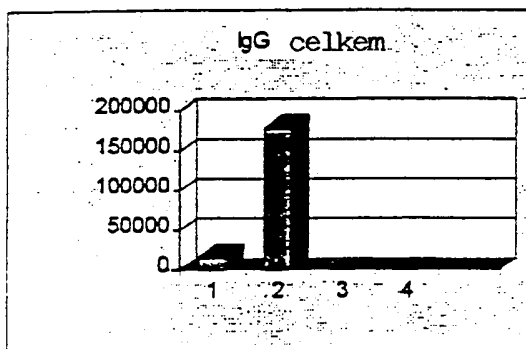
Titry podtříd specifických protilátek (exp 96533)

Skupina 1: ProtD1/3 E7 HPV16

Skupina 2: ProtD1/3 E7 HPV16+ SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 4: PBS



Obr. 31

Lymfoproliferace slezinných buněk (stimulační index) (Exp. 96532)

72 h in vitro re-stimulace

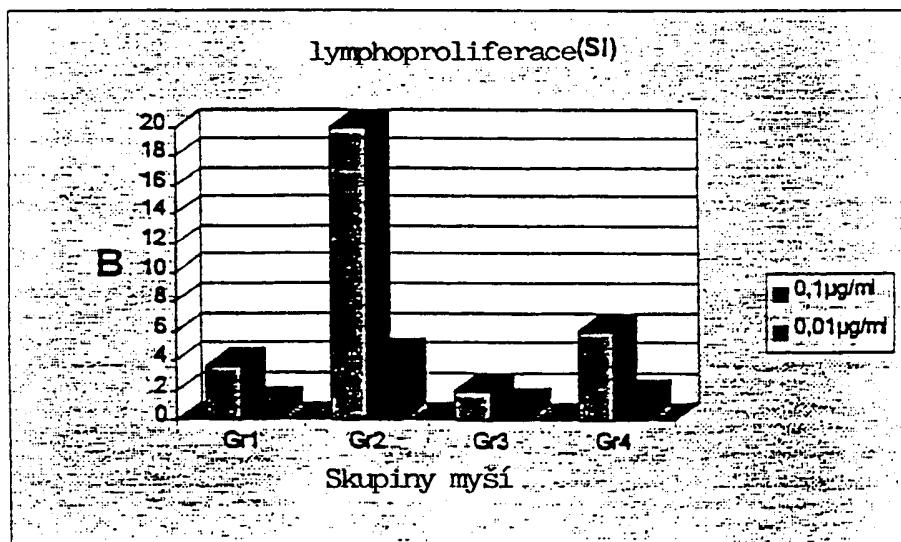
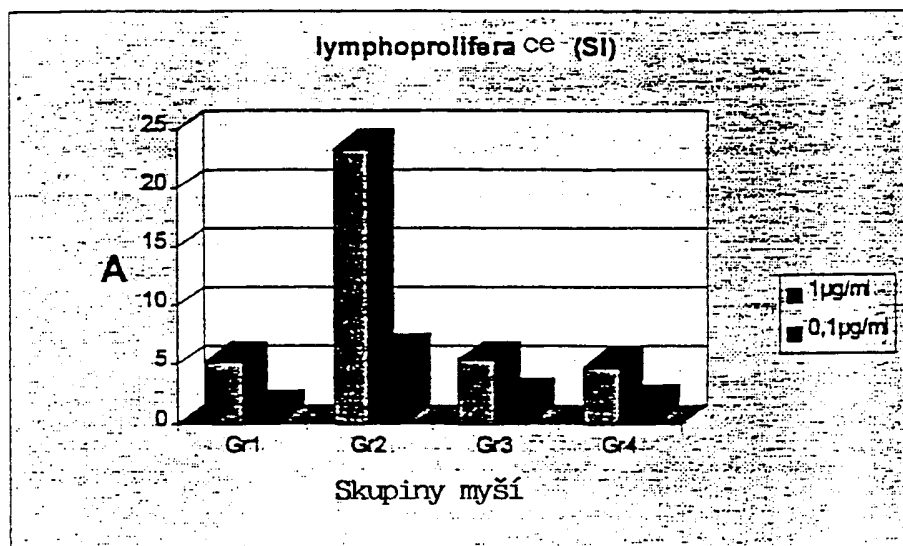
A) ProtD1/3 E7 (1; 0.1 $\mu\text{g/ml}$)B) ProtD1/3 E7 (0.1; 0.01 $\mu\text{g/ml}$) jako povlak na latexových mikrokuličkách

Skupina 1: ProtD1/3 E7 HPV16

Skupina 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 4: PBS



Obr. 32

Lymfoproliferace buněk lymfatických žláz (stimulační index)

(Exp. 96532)

72 h in vitro re-stimulace

A) ProtD1/3 E7 (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$)B) ProtD1/3 E7 (0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) jako povlak na latexových mikrokuličkách

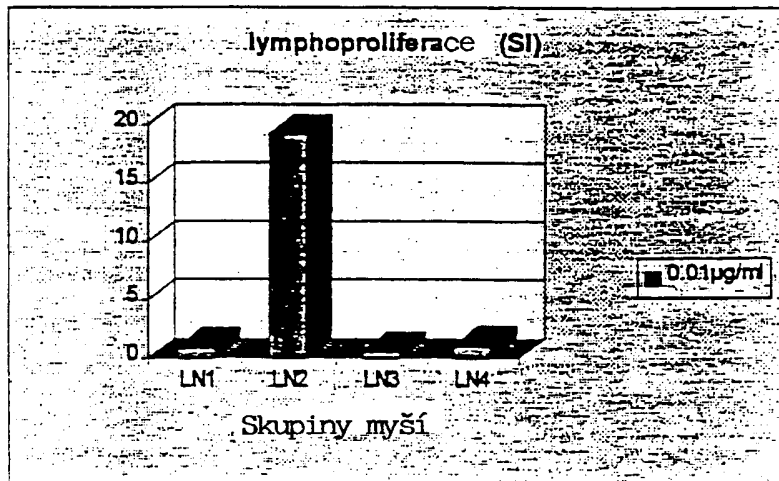
Skupina 1: ProtD1/3 E7 HPV16

Skupina 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

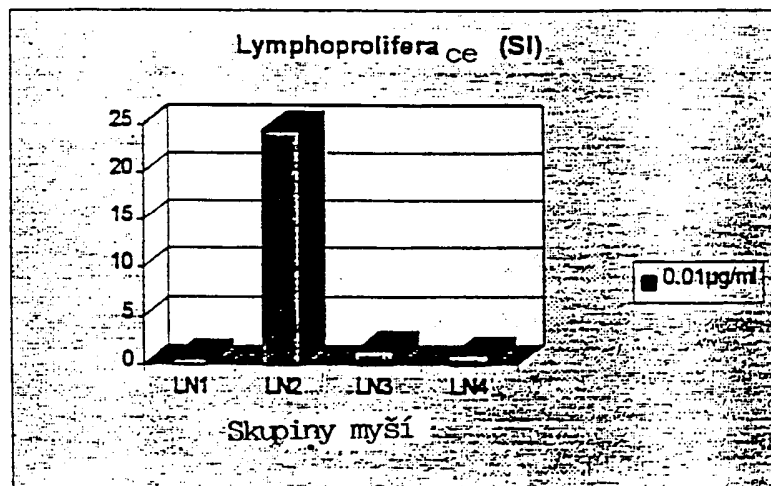
Skupina 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 4: PBS

A



B



Obr. 33

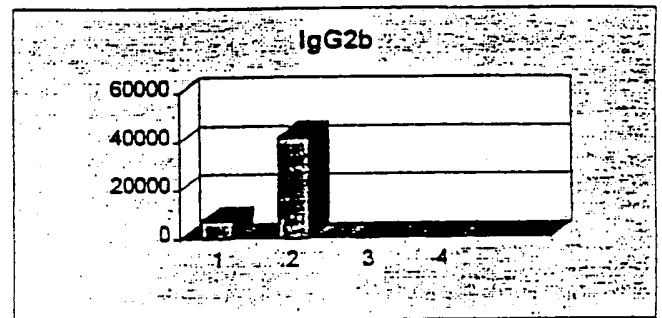
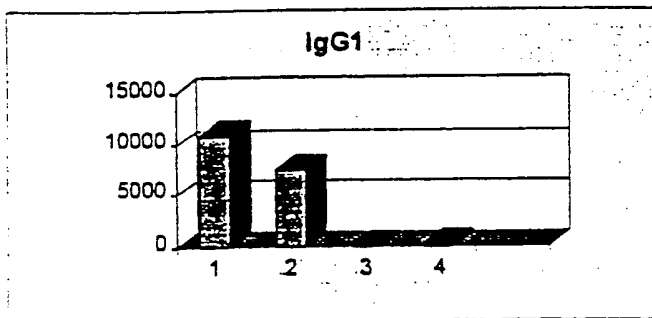
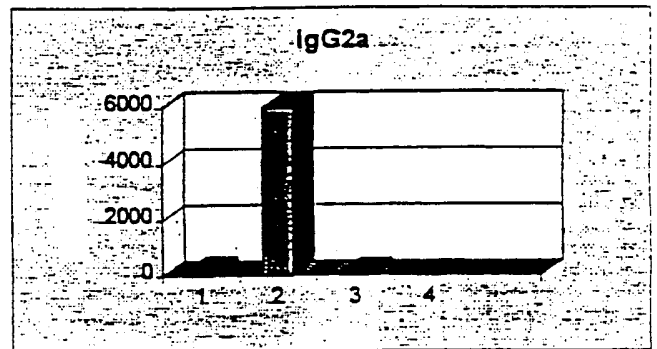
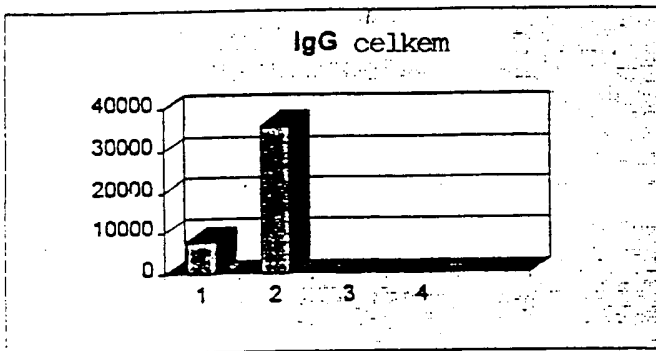
Podtřída specifických protilátek (exp 96532)

Skupina 1: ProtD/3 E7 HPV16

Skupina 2: ProtD1/3 E7 HPV16 + SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 3: SB 62 Qs21 & 3 D MPL

Skupina 4: ředidlo



Obr. 34

Lymfoproliferace slezinných buněk (stimulační index)

72 h in vitro re-stimulace PD1/3 18E7 (10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$)

(Exp 98038)

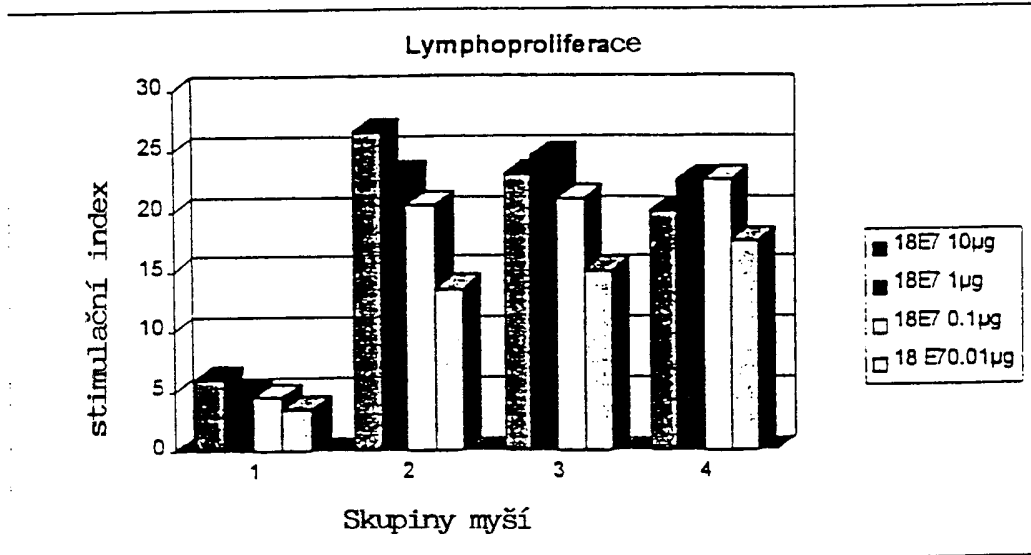
Skupina 1: ProtD 1/3 18 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 + 3D-MPL

Skupina 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21 + 3D-MPL + SB62 O/W

Skupina 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 alum

slezina - skupina	1	2	3	4
18E7 10 μg	6	27	23	20
18E7 1 μg	5	23	25	23
18E7 0.1 μg	5	21	21	23
18 E7 0.01 μg	4	14	15	18
pozadí $\sqrt{\text{cpm}}$	1168	1359	1025	1268



Obr. 35

Lymfoproliferace buněk popliteálních lymfatických žláz

72 h in vitro re-stimulace PD1/3 18E7 (10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$)

(Exp 98038)

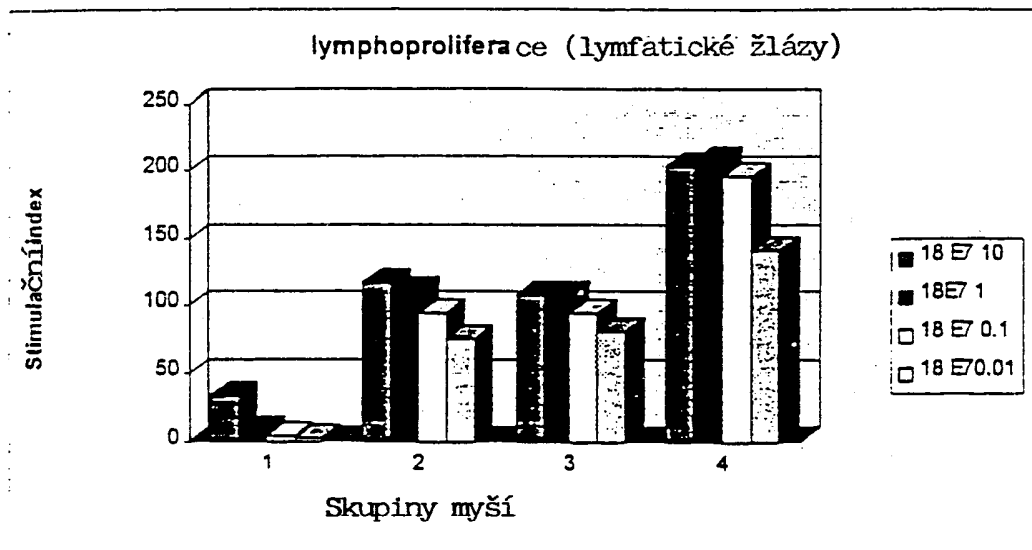
Skupina 1: ProtD 1/3 18 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 + 3D-MPL

Skupina 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21 + 3D-MPL + SB62 O/W

Skupina 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 alum

LN skupina	1	2	3	4
18 E7 10	33	117	108	203
18E7 1	8	110	108	208
18 E7 0.1	4	95	95	196
18 E70.01	2	75	81	141
pozadí	325	161	131	607



Obr. 36

Produkce cytokinu v supernatantu kultury slezinných buněk po 96 h
invitro re-stimulace (ProtD1/3 18E7 1, 3 μ g/ml)

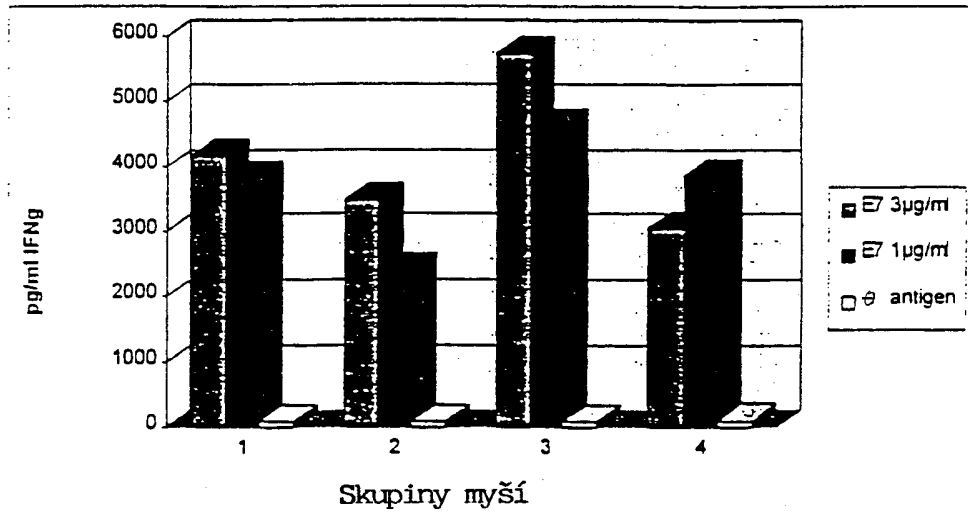
Skupina 1: ProtD 1/3 18 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQ 3D-MPL

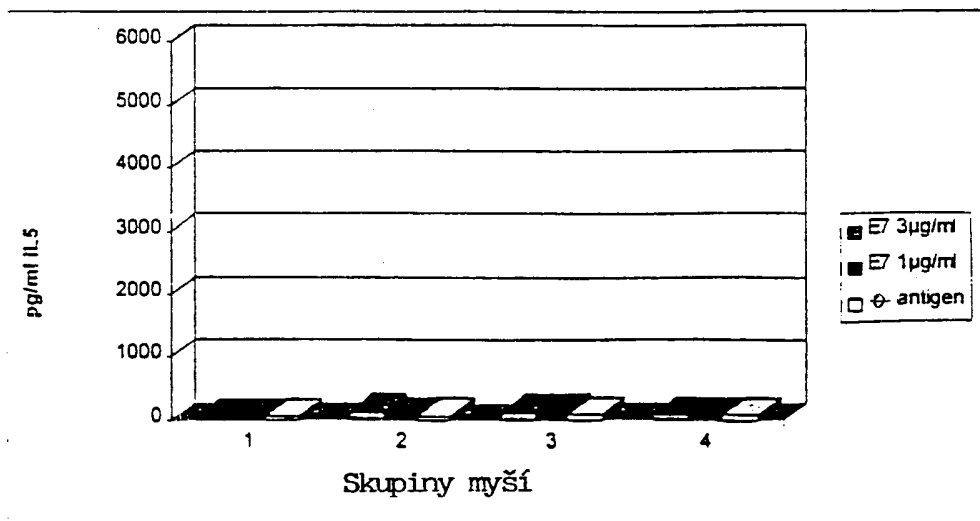
Skupina 3: ProtD 1/3 18 E7 + QS21, 3D-MPL, SB62 O/W

Skupina 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQ, 3D-MPL alum

IFN γ produkce



IL5 produkce



Obr. 37

Produkce cytokinu v supernatantu kultury slezinných buněk po 96 h
in vitro re-stimulace ProtD1/3 18E7

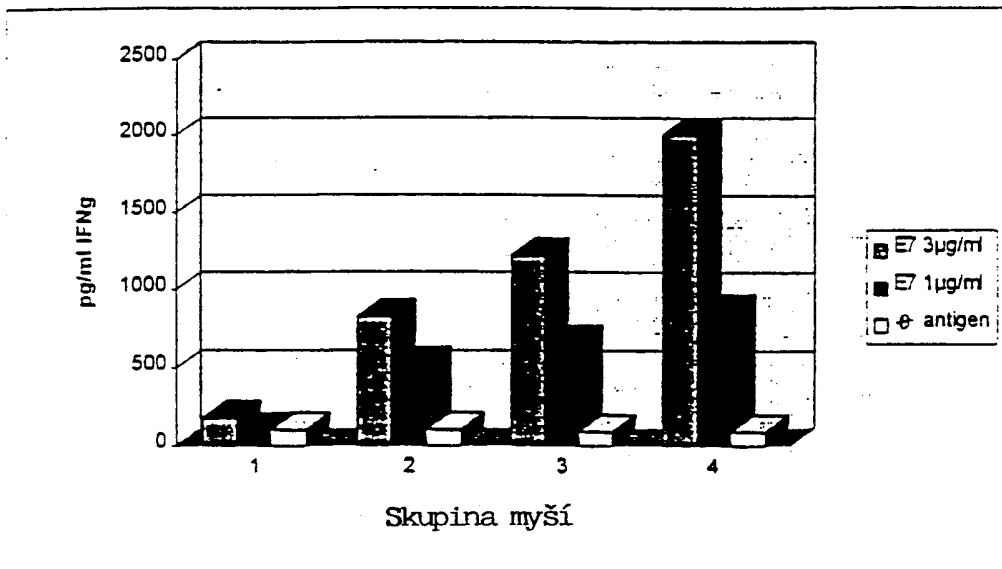
Skupina 1: ProtD 1/3 18 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 3DMPL +

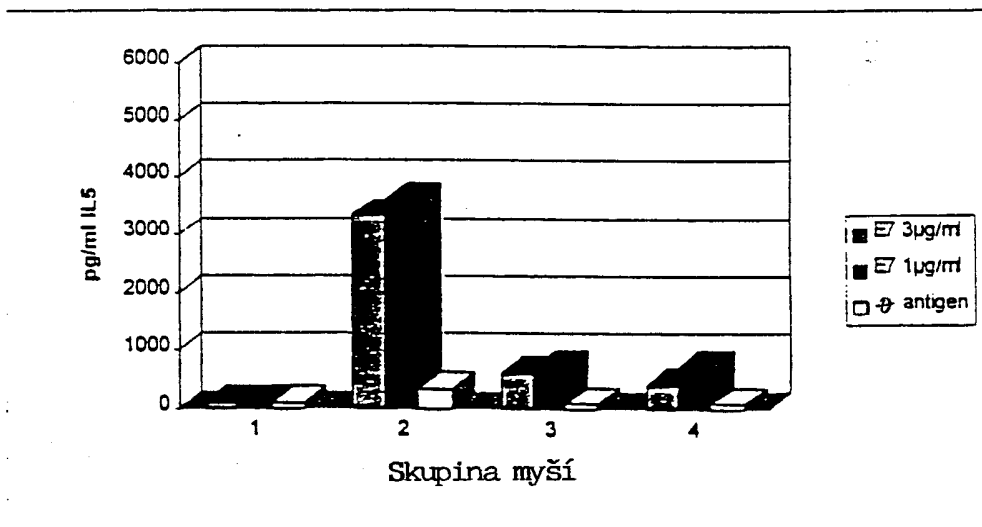
Skupina 3: ProtD 1/3 18 E7 + SB62 QS21/3DMPL

Skupina 4: ProtD 1/3 18 E7 + DQ Alum

IFN γ produkce



IL5 produkce



Obr. 38

Relativní % isotopů protilátek (exp 98038)

Skupina 1: ProtD 1/3 18 E7

Skupina 2: ProtD 1/3 18 E7 + DQS21 3DMPL

Skupina 3: ProtD 1/3 18 E7 + SB62 QS21/3DMPL

Skupina 4: ProtD 1/3 18 E7 + MPL DQ alum

skupiny	IgGt celkem	IgG1 %	IgG2a %	IgG2b %
1	1500	46	32	22
2	84172	28	48	23
3	80545	43	44	13
4	213685	82	8	10

