

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 19.04.2000

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 23.04.1999 06.05.1999

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1999/00552 1999/132811

(33) Země priority: DK US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.11.2002  
(Věstník č. 11/2002)

(86) PCT číslo: PCT/DK00/00205

(87) PCT číslo zveřejnění: WO00/065058

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3709

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 7:

C 12 N 15/24	C 12 N 1/19
A 61 K 39/00	C 12 N 5/10
A 61 K 39/385	C 12 N 15/70
A 61 K 39/39	C 12 N 15/86
A 61 K 31/70	G 01 N 33/68
A 61 K 48/00	A 61 P 37/00
C 07 K 14/54	
C 12 N 1/21	

//(A 61 K 39/08)

(71) Přihlašovatel:  
PHARMEXA A/S, Horsholm, DK;

(72) Původce:  
Klynsner Steen, Hilleroed, DK;

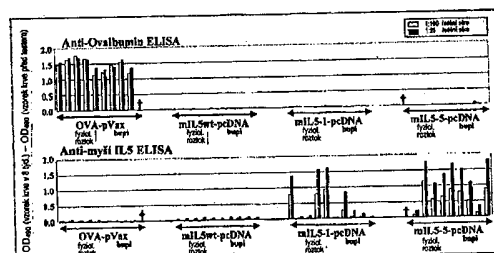
(74) Zástupce:  
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Analog interleukinu 5, fragment nukleové kyseliny, vektor, buňka, přípravky a použití**

(57) Anotace:

Analog interleukinu 5 (IL5), který pochází z IL5 polypeptidu zvířete, do kterého je zavedena modifikace, která má za následek, že imunizace zvířete analogem indukuje produkci protilátek proti IL5 polypeptidu a kde se modifikace týká substituce a/nebo inserce a/nebo delece aminokyseliny kterékoliv z klíčků 1 až 3 nebo C-konce helixu D IL5, kde uvedené klíčky a helix D odpovídají těm, které jsou znázorněny na obr. 3 pro lidský a myší IL5. Řešení je využitelné pro zlepšení léčby a prevence chorobných stavů charakterizovaných zvýšenou hladinou eosinofilních leukocytů, tj. chorobných stavů jako je astma a další chronická alergická onemocnění. Je poskytnut způsob down-regulace interleukinu 5 (IL5) umožněním produkce protilátek proti IL5, a tím snížení stupně aktivity eosinofilů. řešení také poskytuje způsoby výroby modifikovaného IL5, modifikovaný IL5, fragmenty nukleové kyseliny kódující modifikovaný IL5, vektory obsahující tyto fragmenty a jimi transformované hostitelské buňky a buněčné linie, způsob identifikace IL5 analogů, přípravky obsahující modifikovaný IL5 nebo nukleové kyseliny kódující IL5 analogy.



Analog interleukinu 5, fragment nukleové kyseliny, vektor, buňka, přípravky a použití

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká zlepšení terapie a prevence chorobných stavů charakterizovaných zvýšenou hladinou eosinofilních leukocytů, tj. chorobných stavů, jako je například astma a další chronická alergická onemocnění. Konkrétněji předkládaný vynález poskytuje způsob snižování počtu receptorů (down-regulace) interleukinu 5 (IL5) umožněním produkce protilátek proti IL5, a tím snížení stupně aktivity eosinofilů. Vynález také poskytuje způsoby výroby modifikovaného IL5 použitelného v tomto způsobu, a také samotného modifikovaného IL5. Předkládaný vynález se také týká fragmentů nukleové kyseliny kódující modifikovaný IL5, vektorů obsahujících tyto fragmenty nukleové kyseliny a hostitelských buněk a buněčných linií jimi transformovaných. Vynález také poskytuje způsob identifikace IL5 analogů, které jsou použitelné ve způsobu podle vynálezu, a dále přípravky obsahující modifikovaný IL5 nebo obsahující nukleové kyseliny kódující analogy IL5.

### Dosavadní stav techniky

Astma je běžná nemoc dýchacích cest, postihující přibližně 10% populace. Současná léčba je primárně založena na podávání steroidů a představuje cenu na trhu přesahující dobře miliardu dolarů. Zatím z neznámých důvodů se v průběhu posledních dvou dekad na celém světě zvýšila incidence a morbidita astmatiků. V současnosti poskytuje zlepšené

20.05.02

~~37829~~

porozumění imunologickým mechanismům zapojeným do astmatických stavů spojené s bouřlivým rozvojem biotechnologie novou základnu pro rozvoj alternativních a snad lepších léčebných strategií.

Bylo prokázáno, že obecným charakteristickým rysem patogeneze astmatu a dalších chronických alergických onemocnění je zvýšený počet eosinofilů, obzvláště v bronchiální sliznici plic. Po aktivaci eosinofily sekretují velký počet mediátorů, které jsou aktivně zapojeny do zánětlivé reakce dýchacích cest. V aktivaci eosinofilů má důležitou úlohu interleukin 5 (IL5).

IL5 je cytokin zjištěný u mnoha druhů savců a mezi jinými byly klonovány jak humánní tak myší gen pro IL5 (Tanabe et al., 1987, Campbell et al., 1988). humánní gen se skládá ze čtyř exonů s třemi introny umístěnými na chromozomu 5 a kóduje prekurzor s 134 aminokyselinovými zbytky, včetně 19 aminokyselin N-koncové vedoucí sekvence, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekv. id. č. 62. Posttranslační štěpení dává vznik zralému proteinu se 115 aminokyselinovými zbytky (sekv. id. č. 1). myší gen IL5 (mIL5) podobně kóduje prekurzor se 133 aminokyselinovými zbytky s vedoucí sekvencí s 20 aminokyselinami, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v sekv. id. č. 64. Opracovaný zralý mIL5 je tedy dlouhý 113 aminokyselinových zbytků (sekv. id. č. 12), postrádá dva N-koncové aminokyselinové zbytky v porovnání s humánním IL5. aminokyselinové sekvence hIL5 a mIL5 jsou ze 70 % totožné ve srovnání se 77 % identity na úrovni nukleotidů kódujících úseků (Azuma et al., 1986). Větší podobnost byla publikována mezi humánními primáty, 99% identita byla publikována pro kódující úseky humánní nukleotidové sekvence a nukleotidové sekvence opice Rhesus (Villinger et al., 1995).

Humánní aminokyselinová sekvence má dvě potenciální místa N-glykosylace a myší sekvence tři. Bylo prokázáno, že humánní IL5 je jak N-glykosylovaný, tak také O-glykosylovaný, a to v pozici Thr 3. Studie hIL5 prokázaly, že glykosylace není pro biologickou aktivitu nezbytná dokonce i když se zdá, že je stabilita ovlivněna deglykosylací (Tomimaga et al., 1990, Kodama et al., 1993).

#### Struktura IL5

Aktivní IL5 je homodimer a rentgenovou krystalografií byla zjištěna trojrozměrná struktura rekombinantního hIL5 (Milburn et al., 1993). 2 monomery jsou organizovány antiparalelně a kovalentně vázány dvěma meziřetězcovými disulfidovými můstky (44-87' a 87-44'), zapojují tedy všechny 4 cysteiny 2 monomerů.

Sekundární struktura monomerů se skládá ze 4  $\alpha$ -helixů (A-D) přerušených 3 spojovacími úseky (kličky) včetně dvou krátkých úseků se strukturou  $\beta$ -listů. Tento svazek 4 $\alpha$  helixů je znám jako "společný sklad cytokinů", který byl také publikován pro IL-2, IL-4, GM-CSF a M-CSF. Ale ty všechny jsou monomery a struktura homodimeru, kde D-helix doplňuje motiv 4 $\alpha$  helixů protilehlého monomeru je unikátní pro IL5.

Bylo prokázáno, že nativní monomery samotné jsou biologicky inaktivní (přehledy viz Callard & Gearing, 1994, Takutsu et al., 1997). Nicméně je možné vytvořit modifikovaný rekombinantní biologicky aktivní monomer zavedením dalších 8 aminokyselinových zbytků do kličky 3, spojujících helixy C a D. To umožní, že helix D doplní strukturu 4 helixů v jednom polypeptidovém řetězci, a tedy umožní, že monomer interaguje se svým receptorem (Dickason & Huston, 1996, Dickason et al., 1996).

Receptor IL5 se primárně vyskytuje na eosinofilech a je složen z  $\alpha$ -řetězce a  $\beta$ -řetězce.  $\alpha$ -řetězec receptoru je specifický pro IL5 a  $\beta$ -řetězec, který zajišťuje vysokou afinitu vazby a signální transdukci, je sdílen s heterodimerovými receptory pro IL-3 a GM-CSF. Sdílení receptorové složky by mohlo být důvodem pro zkříženou kompetici pozorovanou mezi IL5. IL-3 a GM-CSF (přehled viz Lopez et al., 1992). Ale nedávno bylo prokázáno, že regulace IL5R je odlišná od regulace IL-3R a GM-CSFR, což dále ukazuje vysoce specializovanou úlohu IL5 v regulaci eosinofilní reakce (Wang et al., 1998).

Zdá se, že C-koncová část IL5 je důležitá jak pro vazbu k IL5R, tak pro biologickou aktivitu, protože odstranění více než dvou C-koncových aminokyselinových zbytků má za následek pokles jak afinity vazby k IL5R, tak biologické aktivity v biologických testech pro IL5 (Proudfoot et al., 1996). Bylo zjištěno, že pro vazbu k receptoru jsou důležité také další zbytky, jako je například Glu12, který je zapojen do vazby k  $\beta$ -řetězci, zatímco zbytky Arg90 a Glu109 jsou zapojen do vazby k  $\alpha$ -řetězci receptoru. Obecně se zdá, že vazba k IL5R nastává v úsecích překrývajících se helixů A a D, kde helix D je primárně odpovědný za vazbu ke specifickému  $\alpha$ -řetězci IL5R (Graber et al., 1995, Takastu et al., 1997).

#### Homologie IL5's s jinými proteiny

Tyto dva motivy 4-helixové domény pozorované v homodimeru mají nápadně podobnou sekundární a terciární strukturu ve srovnání k cytokinovým skladem nalezeným u GM-CSF a M-CSF, IL-2, IL-4 a humánní a prasečím růstovým hormonem (Milburn et al., 1993). Ale i když je nápadná podobnost také pozorována v organizaci intronů a exonů a

poloze cysteinů (Tanabe et al., 1987, Cambell et al., 1988), což svědčí pro fylogenetický vztah s IL-2, IL-4 a GM-CSF, nebyla pozorována významná homologie s žádným z těchto cytokinů nebo dalšími cytokiny z aminokyselinové sekvence.

#### Biologická aktivita IL5

IL5 je hlavně sekretován plně diferencovanými buňkami Th2, žírnými buňkami a eosinofily (Cousins et al., 1994, Takutsu et al., 1997). Bylo prokázáno, že působí na eosinofily, basofily, cytotoxické T lymfocyty a na myší B lymfocyty (Callard & Gearing, 1994, Takutsu et al., 1997). účinky IL5 na humánní B lymfocyty jsou ještě předmětem polemiky. Bylo prokázáno zvýšení syntézy imunoglobulinů za určitých okolností a vazba celé řadě humánních B buněčných linií. Dokonce i když byla v humánních B lymfocytech zjištěna mRNA pro hIL5R, skutečná přítomnost receptoru na těchto buňkách ještě musí být ověřena (Baumann & Paul, 1997, Huston et al., 1996).

Účinky IL5 na eosinofily zahrnují chemotaxi, zvýšenou adhezi k endotelovým buňkám, aktivaci a konečnou diferenciaci buněk. Dále bylo prokázáno, že IL5 předchází apoptóze zralých eosinofilů (Yamaguchi et al., 1991). Tato zjištění přispěla k současné představě, že IL5 je nejdůležitější cytokin pro diferenciaci eosinofilů (Corrigan & Kay, 1996, Karlen et al., 1998).

Fyziologicky se uvažuje, že IL5 a s ním spojená aktivace eosinofilů slouží ochranné úloze proti hlístovým infekcím a možná proti určitým nádorům, protože tato onemocnění jsou typicky doprovázena eosinofilií periferní krve (Takutsu et al., 1997, Sanderson et al., 1992). Je to ale poněkud spekulativní, protože ve dvou studiích tito autoři

neprokázali žádný účinek kromě snížení počtu receptorů eosinofilů po podávání protilátky proti IL5 na imunitu (např. hladiny IgE) proti *Nippostrongylus braziliensis* nebo *Schistosoma mansoni* u myši infikovaných těmito parazity (Sher et al., 1990, Coffman et al., 1989).

#### IL5 transgenní zvířata a „knock-out“ zvířata

Studie na transgenních myších exprimujících IL5 nebo „knock-out“ myších bez genu pro IL5 podaly další znalosti o fyziologické úloze IL5.

Bylo publikováno několik IL5 transgenních myši:

Bylo publikováno, že transgenní myši exprimující gen IL5 v T lymfocytech měly zvýšený počet bílých krvinek charakterizovaný expanzí B220+ B lymfocytů a významnou eosinofilií. To bylo doprovázeno masivním buněčným exsudátem do břišní dutiny, kde z buněk převládaly eosinofily a infiltrací eosinofilů v téměř všech orgánových systémech (Lee et al., 1997a).

Pro další transgenní myši exprimující gen IL5 pod kontrolou metalothioninového promotoru bylo charakteristické zvýšení sérových hladin IgM a IgA, masivní eosinofilie v periferní krvi a mnoha dalších orgánech doprovázená expanzí zřetelné CD5+ B lymfocytové populace, která tvořila autoprottilátky (Tominaga et al., 1991).

Třetí studie se týkala transgenních myši konstitutivně exprimujících IL5 v plicích. U těchto zvířat se vyvinuly patofyziologické změny podobné změnám u humánního astmatu, včetně eosinofilní invaze peribronchiálních prostorů, hypertrofie epitelu a zvýšené produkce hlenu. Kromě toho byl pozorován rozvoj nadměrné vnímavosti dýchacích cest v nepřítomnosti antigenů (Lee et al., 1997b).

Byly také studovány myši s nefunkčním IL5 (tzv. „knock-out“ myši). Tyto myši (C57BL/6) nemají žádné zjevné příznaky nemoci a jsou fertilní. Hladiny imunoglobulinů a specifické protilátkové reakce na DNP-OVA byly normální. Jsou vytvářeny bazální hladiny eosinofilů, ale jsou 2-3 krát nižší než u kontrolních zvířat, což ukazuje, že eosinofily mohou být vytvářeny při úplné absenci IL5. Když byly tyto myši infikovány *Mesocestoides corti*, normálně pozorovaná eosinofilie byla odstraněna, a tato absence eosinofilie nepůsobila na infekci červy tvořenou tímto parazitem (Kopf et al., 1996).

Ve studii autorů Foster et al. (1996) byl zkoumán účinek IL5 „knock-out“ na běžný model atopického zánětu dýchacích cest. Senzitivizace a aerosolový podnět myši ovalbuminem má normálně za následek eosinofilii v dýchacích cestách, hyperreaktivitu dýchacích cest na  $\beta$ -methacholin a rozsáhlé poškození plic, což je analogické změnám pozorovaným u astmatu. U myši s deficitem IL5 eosinofilie, hyperreaktivita dýchacích cest a poškození plic nenastaly. Když byla exprese IL5 u těchto myši obnovena, byla aero-alergenem indukovaná eosinofilie a dysfunkce dýchacích cest znovu navrácena.

#### Patofyziologická úloha IL5

Astma postihuje přibližně 10 % populace na celém světě a z doposud neznámých důvodů se v posledních dvou dekádách incidence a morbidita zvyšují (Ortega & Busse, 1997). Je to chronické onemocnění dýchacích cest charakterizované opakující se a obvykle reverzibilní obstrukcí proudění vzduchu, zánětem a nadměrnou vnímavostí (Moxam a Costello, 1990). To tvoří symptomy sípání a dušnosti, které mohou být ve vážných případech fatální.



Pokusy se zvířaty uvedené výše používající transgenní myši konstitutivně exprimující IL5 v plicích (Lee et al., 1997a) a "knock-out" myši s deficitem IL5 (Foster et al., 1996) výrazně podporují úlohu IL5 v patogeneze astmatu. Další důkazy toto podporující mohou být odvozeny z několika studií s astmatiky. Eosinofilie byla identifikována v tekutině bronchoalveolární laváže (BAL) a v biopsiích bronchiální sliznice pacientů s astmatem a koreluje se závažností nemoci. u pacientů s astmatem bylo v tekutině BAL identifikováno několik produktů eosinofilů a počty eosinofilů v periferní krvi korelují se závažností astmatu (Ortega & Busse 1997).

Bylo zjištěno, že sérová koncentrace IL5 byla zvýšena (střední hodnota koncentrace 150 pg/ml) u 15 z 29 pacientů s chronickým vážným astmatem ve srovnání s kontrolními osobami (Alexander et al., 1994).

V další studii zahrnující jak neatopické, tak atopické astmatiky, bylo zjištěno, že zvýšená produkce IL5 pomocnými T lymfocyty způsobovala eosinofilní zánět u atopického i neatopického astmatu (Mori et al., 1997).

Další výsledky také ukazují, že IL5 má nespornou úlohu u dalších atopických onemocnění. Nedávno bylo prokázáno, že alergenem indukované systémové epizody u osob s alergickou rýmou korelují spíše s alergenem indukovanou syntézou IL5 než IgE (Ohashi et al., 1998). Korelace atopických reakcí byla také prokázána ve studii autorů Barata et al. (1998), kde byla prokázána významná exprese IL5 T lymfocyty v pozdní fázi kožní reakce.

Tyto a další výsledky vedly několik autorů, jako Corrigan & Kay (1996), Danzig & Cuss (1997) k identifikaci a doporučení IL5 jako primárního cíle v rozvoji lepší léčby astmatu a atopických onemocnění zahrnujících eosinofilní zánět. Chronická hypereosinofilie poškozující tkáň indukovaná

parazitární infekcí, topická plicní eosinofilie a hypereosinofilní syndrom jsou příklady dalších patogenních chorobných stavů, které by mohly být ovlivněny snížením počtu receptorů IL5.

#### Demonstrace úlohy IL5 *in vivo*

V několika studiích s modely astmatu u hlodavců bylo ukázáno, že léčení monoklonálními protilátkami proti IL5 (anti-IL5 mAb) mělo za následek inhibici eosinofilie závislou na dávce ve srovnání s neošetřenými kontrolami (Nagai et al., 1993a & b, Chand et al., 1992, Coeffier et al., 1994, Kung et al., 1995, Underwood et al., 1996). Ve studii autorů Nagai et al. (1993a) byl také pozorován účinek léčby senzibilizovaných Balb/c myši rozpustným  $\alpha$  receptorem IL5.

V jedné studii s myšmi Balb/c (Hamelmann et al., 1997) a čtyřmi studiemi s morčaty bylo dále ukázáno, že anti-IL5 mAb inhibují hyperreaktivitu dýchacích cest vyvolanou různými látkami u zvířat senzibilizovaných antigenem (Mauser et al., 1993, Akutsu et al., 1995, van Oosterhout et al., 1995 & 1993). V některých studiích byly také prospěšné účinky (srovnej tabulku 1) léčby anti-IL5 mAb pozorovány mikroskopicky (Mauser et al., 1993, Akutsu et al., 1995, Kung et al., 1995). Což je důležité, ve studii autorů Kung et al. (1995) byla pozorována redukce plicního zánětu u B6D2F1 myší, když byla podávána anti-IL5 mAb hodiny před antigenním podnětem, a také když byla podávána až pět dnů po antigenním podnětu, což ukazuje, že účinek anti-IL5 mAb může být u zánětu dýchacích cest jak profylaktický, tak terapeutický. Ale tento účinek nebyl pozorován autory Underwood et al., když byla anti-IL5 mAb podávána morčatům dvě hodiny po antigenním podnětu (Underwood et al., 1996).

Ve studii používající model astmatu u opic publikovali autoři Mauser et al. (1995) inhibici hyperreaktivity dýchacích cest po antigenním podnětu, když potkaní anti-myší-IL5 mAb byla podávána 1 hodinu před antigenním podnětem. Kromě toho bylo 75% snížení počtu eosinofilů v bronchoalveolární laváži (BAL) u zvířat ošetřených protilátkou ve srovnání s neošetřenými kontrolami. Vliv na eosinofilii a nadměrná vnímavost na anti-IL5 mAb byla pozorována až tři měsíce po léčení (Mauser et al., 1995). Co se týče alergické nadměrné vnímavosti, výsledky ze studie autorů Nagai et al. (1993a a 1993b) nedokazují žádnou redukci nadměrné vnímavosti ve spojení se snížením počtu eosinofilů v BAL.

Všechny anti-IL5 mAb pokusy *in vivo* doposud zmíněné byly prováděny s potkaními-anti-myšími monoklonálními protilátkami. Egan et al. (1995) publikovali pokusy s použitím humanizovaných potkaních-anti-humánních IL5 monoklonálních protilátek, nazvaných Sch 55700. Tyto mAbs inhibovaly eosinofilii v plicní laváži o 75 % v dávce 0,3 mg/kg, když byly podávány senzibilizovaným opicím. Když byla podávána Sch 55700 v dávce 1 mg/kg alergickým myším, byla také pozorována inhibice eosinofilie dýchacích cest.

#### Léčení astmatu v současnosti a v budoucnu

Současná léčba astmatu je prováděna, jak bylo uvedeno, kortikosteroidy, které jsou díky svému protizánětlivému účinku jedny z nejsilnějších léků. Kromě nich se prokázaly u pacientů s astmatem nejprospěšnějšími  $\beta_2$  agonisté a methylxantinové deriváty, které všechny způsobují bronchodilaci a kromoglykan sodný, který „stabilizuje“ žírné

buňky, a tím zabraňuje uvolňování mediátoru (Ortega & Busse 1997).

Budoucí léčba astmatu může obsahovat anti-IL5 mAbs, jak bylo diskutováno výše. Firma Celltech ve spolupráci s firmou Schering Plough mají anti-IL5 mAb ve fázi I klinických zkoušek pro léčení astmatu. Ale léčba monoklonálními protilátkami s sebou nese řadu nedostatků. Především rozvoj a produkční náklady pro bezpečnou mAb (např. humanizovanou mAb) jsou velmi vysoké, což má za následek drahý terapeutický produkt pro konečného uživatele. Za druhé mAbs mají z hlediska pacienta nevýhodnou vlastnost, jsou podávány v relativně krátkých intervalech. Za třetí mAbs projevují přirozenou úzkou specifičnost proti jednomu epitopu antigenu. A, konečně, mAbs (dokonce i humanizované) jsou imunogenní, vedou ke stále rychlejší inaktivaci podávaných protilátek, jak léčení časem pokračuje.

Bylo také navrhováno použití antisense IL5 oligonukleotidů pro antisense terapii firmou Hybridon pro léčení astmatu, alergií a zánětů. Ale antisense technologie se prokázala technicky obtížná a ve skutečnosti ještě nebyl podán konečný důkaz uskutečnitelnosti antisense terapie u lidí.

Konečně WO 97/45498 (Bresagen Limited/Medvet Science) navrhuje použití "modifikovaných a různých forem IL5 molekul schopných antagonizovat aktivitu IL5" při zmírnění, zeslabení nebo jiném snížení aberantních účinků vyvolaných nativními nebo mutantními formami IL5. Bylo publikováno, že antagonizující účinek je výsledkem různých forem IL5 vazby k  $\alpha$  řetězci IL5R o nízké afinitě, ale ne k receptorům o vysoké afinitě, tímto způsobem varianty kompetují s IL5 o vazbu k jeho receptorům bez projevů fyziologických účinků IL5.

Další atopická onemocnění zahrnující eosinofilní zánět jsou léčena buď symptomatickými léky uvedenými u léčba astmatu nebo imunitní terapií (IT) s použitím hyposensitizace s alergenovými extrakty. Je známo, že tento typ léčení je účinný u alergií na jeden nebo několik antigenů, zatímco není vhodný pro léčení mnohonásobné alergie. Kromě toho u obvyklé IT je časové období pro dosažení klinického zlepšení u pacientů reagujících na léčbu velmi dlouhé.

Tedy navzdory existujícím a možným budoucím léčbám chronických alergických onemocnění, jako je například astma, existuje nesporná potřeba alternativních způsobů léčby a zmírňování těchto a dalších chronických alergických onemocnění.

#### Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout novou léčbu chronických alergických stavů (jako je například astma) charakterizovaných eosinofilií. Dalším předmětem je vývoj autovakcíny proti IL5, aby se dosáhlo nové léčby astmatu a dalších patologických stavů zahrnujících chronický zánět dýchacích cest.

Cytokin IL5 pocházející z T lymfocytů má, jak bylo uvedeno výše, hlavní úlohu v řízení eosinofilní reakce, ovlivňuje jak produkci, tak i lokalizaci a aktivaci eosinofilů. Protože nebylo publikováno, že IL5 má jinou centrální úlohu v rozvoji protektivní imunitní reakce, je tento konkrétní cytokin dle mínění původců atraktivní terapeutický cíl pro léčbu astmatu.

Obecným cílem předkládaného vynálezu je snížení patogenních hladin eosinofilů v dýchacích cestách pacienta

s astmatem down-regulací hladin IL5. protože eosinofily závisí na IL5. co se týče atrakce a aktivace. Výsledkem sníženého počtu eosinofilů ve sliznici dýchacích cest by bylo současné snížení zánětu v dýchacích cestách odpovídající klinickému zlepšení pacienta s astmatem.

Potenciální účinek tohoto přístupu již byl prokázán ve studiích s použitím anti-IL5 monoklonálních protilátek ve zvířecích modelech zánětu dýchacích cest (srovnej úvod k příkladům).

Předkládaný vynález ale dotahuje výsledky získané pasivní imunizací o jeden krok dále s použitím vyvolání aktivní imunitní reakce způsobem autovakcinace. Dle nejlepší znalosti původce, tento přístup ještě nebyl doposud navržen.

Výhodou léčby astmatiků IL5 autovakcínou ve srovnání se současnou léčbou kortikosteroidy apod., je redukce a/nebo eliminace vedlejších účinků a nejpravděpodobněji lepší účinek, co se týče trvání. Ve srovnání s anti-IL5 mAbs se očekává, že účinek indukované polyklonální Ab reakce je lepší než pasivně injikované monoklonální imunoglobuliny, protože polyklonální reakce je specifičtější. očekává se také zlepšení, co se týče aplikačního režimu (protože účinné autovakcíny popsané v tomto textu typicky vyžadují maximálně 2-6 podávání ročně).

Ve srovnání s hyposenzibilizací poskytuje předkládaný vynález lákavý aspekt, protože je nespecifický, což je obzvláště relevantní při jednání s mnohanásobně alergickými pacienty.

Tudíž ve svém nejširším a nejobecnějším rozsahu se předkládaný vynález týká způsobu *in vivo* down-regulace aktivity interleukinu 5 (IL5) u zvířete i člověka, tento

způsob obsahuje prezentaci imunitnímu systému zvířete imunologicky účinného množství

- alespoň jednoho IL5 polypeptidu nebo jeho subsekvence, který byl formulován tak, že imunizace zvířete IL5 polypeptidem nebo jeho subsekvencí indukuje produkci protilátek proti IL5 polypeptidu, a/nebo

- alespoň jednoho IL5 analogu, do kterého je zavedena alespoň jedna modifikace v IL5 aminokyselinové sekvenci, což má za následek, že imunizace zvířete analogem indukuje produkci protilátek proti IL5 polypeptidu.

Nejpřitažlivější aspekt tohoto přístupu je to, že např. astma může být kontrolováno periodickou, ale nepřiliš častou imunizací, na rozdíl od terapeutického postupu, který vyžaduje podávání anti-IL5 nebo molekul majících s nimi analogickou vazebnou afinitu k IL5. Očekává se, že 1 až 4 roční injekce imunogenního přípravku podle vynálezu budou postačující pro vznik požadovaného účinku, zatímco podávání jiných inhibitorů IL5 aktivity vyžaduje aplikaci denně nebo alespoň týdně.

Vynález se také týká analogů IL5, a také fragmentů nukleové kyseliny kódujících jejich podskupinu. Součástí vynálezu jsou také imunogenní přípravky obsahující analogy nebo fragmenty nukleové kyseliny.

Vynález se také týká způsobu identifikace analogů IL5 a také způsobu výroby přípravku obsahujícího analogy IL5.

Popis obrázků

Obr. 1: aminokyselinová sekvence zralého humánního IL5 (sekv. id. č. 1). Je zahrnuta porovnaná myší sekvence (sekv. id. č. 12), ale jsou zobrazeny pouze pozice, které se liší od humánní sekvence. Dvě "\*" označují chybějící N-koncové zbytky myšího IL5. Pozice N-glykosylace jsou označeny dvojitým podtržením, O-glykosylované threoniny humánního IL5 jsou uvedeny kurzívou a cysteiny tučně.

Obr. 2: dimerní a monomerní struktury humánního IL5.

A: dimerní struktura hIL5. Struktura byla získána pouze pro zbytky 5-112, což znamená, že místo O-glykosylace v Thr3 není zahrnuto.

B: stejná struktura jako v A, s přiřazením helixů (A-D a A'-D').

C: monomer hIL5 s aminokyselinovými zbytky odlišnými od mIL5 ukázanými světle šedě.

Obr. 3: porovnané aminokyselinové sekvence (sekv. id. č. 1 a 12) zralého humánního IL5 (hIL5) a myšího IL5 (mIL5) s označením úseků vhodnými pro substituci. 4  $\alpha$ -helixy A-D jsou obklopeny rámečky s plnou čarou,  $\beta$ -listy jsou dvojitě podtrženy a pozice dvou cysteinů jsou označeny „▼“ Identické zbytky v těchto dvou sekvencích jsou označeny "-" a neidentické zbytky jsou označeny "\*". Klička 1 se překlenuje mezi helixy A a B, klička 2 se překlenuje mezi helixy B a C a klička 3 se překlenuje mezi kličkami C a D. Aminokyselinové sekvence pro substituci peptidy obsahujícími cizorodý  $T_H$  epitop jsou označeny tučně: jedna taková sekvence je



obklopena rámečkem z tečkované čáry díky zbytkům překrývajícím se se zbytky substituovanými v odlišném konstruktu. Aminokyselinové sekvence 10 konstruktů (5 pochází z humánního a 5 pochází z myšního IL5) jsou uvedeny v sekv. id. č. 2 až 11 a 13 až 22.

Obr. 4: výsledky testu ELISA imunizace DNA testováním dvou mIL5 autovakcín DNA.

Myši byly DNA očkovány s nahou plazmidovou DNA kódující buď ovalbumin, mIL5wt, mIL5.1 nebo mIL5.5. Séra získaná 77. den byla testována na reaktivitu proti ovalbuminu a myšimu IL5. Polystyrenové mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc) byly potaženy ovalbuminem (1  $\mu\text{g}$ /jamka, Sigma) nebo purifikovaným rekombinantním myším IL5 (0,1  $\mu\text{g}$ /jamka, E1320). Reaktivita naředěných sér přidávaných do jamek byla vizualizována s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky. Odečty odběrů krve před testem v OD490 byly subtrahovány od odečtů testovaných vzorků v OD490 a výsledné hodnoty byly prezentovány pro každou jednotlivou myš jako sloupce. Odečty odběrů krve před testem v OD490 (ředění 1:25) byly v rozmezí od 0,025 do 0,034. Křížky označují mrtvá zvířata.

Obr. 5: Schematické znázornění konstruktů autovakcín na základě myšního IL5.

Horní obrázek představuje myší monomer IL5 divokého typu s helixy A-C, kličkami 1 až 3 a pohyblivým C-koncovým úsekem. Ostatní obrázky představují odlišné konstrukty autovakcín mající vnitřní substituce epitopů P2 a P30 tetanového toxoidu v různých pozicích. Specifické konstrukty jsou detailně uvedeny v příkladech.

## Definice

V následujícím textu je definována a detailně vysvětlena řada termínů použitých v přítomném popisu a patentových nárocích, aby se objasnily cíle a souvislosti vynálezu.

Termíny "T lymfocyt" a "T buňka" jsou používány zaměnitelně pro lymfocyty pocházející z thymu, které jsou zodpovědné za různé imunitní reakce zprostředkované buňkami a také za pomocnou aktivitu v humorální imunitní reakci. Podobně jsou použity termíny "B lymfocyt" a "B buňka" zaměnitelně pro lymfocyty produkující protilátky.

Termín "IL5 polypeptid" v tomto textu označuje polypeptidy mající aminokyselinovou sekvenci výše diskutovaných IL5 proteinů pocházejících z člověka a myši (nebo jejich zkrácených variant, které sdílí podstatné množství epitopů B lymfocyt s intaktním IL5), ale tímto termínem jsou také obsaženy polypeptidy mající aminokyselinovou sekvenci totožnou s xeno-analogy těchto dvou proteinů izolovanými z dalších živočišných druhů. V mezích termínu jsou také zahrnuty neglykosylované formy IL5, které jsou připravovány v prokaryotickém systému, jako jsou formy mající různý charakter glykosylace díky použití např. Kvasinek nebo dalších jiných než savčích eukaryotických expresních systémů. Je ale nutné poznamenat, že používáním termínu "IL5 polypeptid" je zamýšleno, že uvažovaný polypeptid je normálně neimunogenní, když je prezentován léčenému zvířeti. Jinými slovy IL5 polypeptid je autoprotein nebo je to xenoanalog takového autoproteinu, který nedává normálně vzniknout imunitní reakci proti IL5 u zkoumaného zvířete.

Termín "IL5 analog" označuje IL5 polypeptid, ve kterém byly provedeny změny primární struktury. Tato změna může být např. ve formě fúze IL5 polypeptidu ke vhodnému fúznímu

partnerovi (tj. změna primární struktury zahrnující výlučně C-koncové a/nebo N-koncové přidání aminokyselinových zbytků) a/nebo může být ve formě insercí a/nebo delecí a/nebo substitucí v IL5 polypeptidové aminokyselinové sekvenci. Termín také zahrnuje jsou derivované IL5 molekuly, srovnej diskusi níže o modifikacích IL5.

Je nutné poznamenat, že použití u člověka např. psiho analogu humánního IL5 jako vakcíny může být chápáno tak, že se vytvoří požadovaná imunita proti IL5. Takové použití xenoanalogu pro imunizaci je také považováno za "IL5 analog" tak, jak je definován výše.

Používání zkratky "IL5" v tomto textu se týká aminokyselinové sekvence zralého IL5 divokého typu (v tomto textu také označován "IL5m" a "IL5wt"). Zralý humánní IL5 je označován hIL5, hIL5m nebo hIL5wt a myší zralý IL5 je označován mIL5, mIL5m nebo mIL5wt. V případech, kdy DNA konstrukt obsahuje informaci kódující vedoucí sekvenci nebo jinou látku, to je normálně jasné z kontextu.

Je zamýšleno, že termín "polypeptid" v přítomném kontextu znamená oba krátké peptidy o 2 až 10 aminokyselinových zbytcích, oligopeptidy o 11 až 100 aminokyselinových zbytcích a polypeptidy o více než 100 aminokyselinových zbytcích. Kromě toho je také zamýšleno, že tento termín obsahuje proteiny, tj. Funkční biomolekuly obsahující alespoň jeden polypeptid, když obsahuje alespoň dva polypeptidy, tyto mohou tvořit komplexy, mohou být kovalentně spojeny nebo mohou být spojeny nekovalentně. Polypeptid(y) v proteinu mohou být glykosylovány a/nebo lipidovány a/nebo obsahují prostetické skupiny.

Termín "subsekvence" znamená jakýkoliv nepřetržitý úsek alespoň 3 aminokyselin nebo případně alespoň 3 nukleotidů, pocházející přímo z přirozeně se vyskytující IL5

aminokyselinové sekvence nebo sekvence nukleové kyseliny, v daném pořadí.

Je zamýšleno, že termín "zvíře" v daném kontextu obecně označuje druhy živočichů (výhodně savců), jako je například *Homo sapiens*, *Canis domesticus*, apod. a ne jenom jedno jediné zvíře. Ale termín také označuje populaci takového živočišného druhu, protože je důležité, že všichni jedinci imunizovaní podle způsobu vynálezu obsahují v podstatě stejný IL5. což umožňuje imunizaci zvířat stejným imunogenem(imunogeny). Jestliže například v různých lidských populacích existují genetické varianty IL5. může být nutné použít v těchto různých populacích odlišné imunogeny, aby bylo možné uniknout autotoleranci na IL5 v každé populaci. Odborníkovi je jasné, že zvíře v daném kontextu je živoucí bytost, která má imunitní systém. Je výhodné, když zvíře je obratlovec, jako je například savec.

Termínem "down-regulace IL5 aktivity *in vivo*" je v tomto textu míněno snížení počtu interakcí mezi IL5 a jeho receptory v živém organismu (nebo mezi IL5 a jinými možnými biologicky důležitými vazebnými partnery této molekuly). Down-regulace může být dosažena několika mechanismy: z nich je nejjednodušší jednoduchá interference s vazbou protilátky v aktivním místě IL5. Ale v rozsahu předkládaného vynálezu je také to, že vazba protilátky má za následek odstranění IL5 buňkami se scavengerovými („uklízecími“) receptory (jako jsou například makrofágy a další fagocytující buňky).

Výraz "prezentuje.. imunitnímu systému" označuje to, že imunitní systém zvířete je vystaven řízenému imunogennímu podnětu. Jak bude jasné z popisu uvedeného níže, toto podněcování imunitního systému může být prováděno celou řadou způsobů, z nichž je nejdůležitější vakcinace polypeptidem obsahujícím "farmakologické vakcíny" (tj. Vakcínu, která je

podáván pro léčbu nebo zmírnění stále pokračující nemoci) nebo očkování "farmakologickou vakcínou" nukleovou kyselinou. Dosaženým důležitým výsledkem je, že imunokompetentní buňky zvířete jsou konfrontovány s antigenem imunologicky účinně, zatímco přesný způsob, jak tento výsledek dosáhnout, je pro vynálezeckou myšlenku předkládaného vynálezu méně důležitý.

Termín "imunogenně účinné množství" má svůj obvyklý význam v oboru, tj. označuje množství imunogenu schopné indukovat imunitní reakci, která se významně zabývá patogenními agens, které sdílí imunologické rysy s imunogenem.

Používání výrazu, že IL5 byl "modifikován", se v tomto textu míní chemická modifikace polypeptidu, který vytváří hlavní řetězec IL5. Takovou modifikací může např. být derivatizace (např. alkylace, acylace, esterifikace apod.) určitých aminokyselinových zbytků v IL5 sekvenci, ale jak vyplývá z popisu níže, výhodné modifikace zahrnují změny (nebo přidávání k) primární struktury IL5 aminokyselinové sekvence.

Pojmem "autotolerance k IL5" se rozumí, že i když IL5 je autoprotein v populaci, která má být očkována, normální jedinci v populaci nevyvíjejí imunitní reakci proti IL5. ačkoliv nemůže být vyloučeno, že příležitostní jedinci ve zvířecí populaci by mohli být schopni tvořit protilátky proti nativnímu IL5. např. jako část autoimunitní poruchy. Kdykoliv bude zvíře normálně autotolerantní pouze ke svému vlastnímu IL5. ale nemůže být vyloučeno, že analogy IL5 pocházející z jiných druhů zvířat nebo z populace mající odlišný IL5 fenotyp by také mohly být tolerovány uvedeným zvířetem.

Termíny "cizorodý epitop T lymfocytu" (nebo: "cizorodý T lymfocytární epitop") je peptid, který je schopný vázat MHC molekulu a který stimuluje T lymfocyty v živočišných druzích.

Výhodné cizorodé epitopy T lymfocytu podle vynálezu jsou "všeobecné" (nebo tzv. „promiskuitní“) epitopy, tj. epitopy které vážou podstatnou část konkrétní třídy MHC molekul v živočišných druzích nebo populaci. Je znám pouze velmi omezený počet těchto všeobecných epitopů T lymfocytu a budou diskutovány detailně níže. Je nutné poznamenat, že aby imunogeny, které jsou použity podle předkládaného vynálezu, byly účinné co největší frakce populace zvířat, jak je jen možné, může být nezbytné 1) vložit několik cizorodých epitopů T lymfocytu do stejného IL5 analogu nebo 2) připravit několik analogů IL5. kde každý analog má vložen odlišný všeobecný epitop. Je také nutné poznamenat, že pojem cizorodých epitopů T lymfocytu také obsahuje použití kryptických epitopů T lymfocytu, tj. Epitopů, které pocházejí z autoproteinu a které projevují imunogenní chování pouze tehdy, když existují v izolované formě bez toho, aby byli částí zkoumaného autoproteinu.

Termín "cizorodý epitop pomocného T lymfocytu " (cizorodý  $T_H$  epitop) je cizorodý epitop T lymfocytu, který se váže na molekulu MHC třídy II a může být předložen na povrchu buňky prezentující antigen (APC) navázané k molekule MHC třídy II.

Termín "funkční část" (bio)molekuly v daném kontextu znamená část molekuly, která je zodpovědná za alespoň jeden biochemický nebo fyziologický účinek projevovaný molekulou. V oboru je známo, že mnoho enzymů a jiných efektorových molekul mají aktivní místo, které je zodpovědné za účinky projevované zkoumanou molekulou. další části molekuly mohou sloužit účelům stabilizace nebo zvýšení rozpustnosti a mohou tudíž být vynechány, jestliže tento účel není relevantní pro určité provedení předkládaného vynálezu. například je možné použít určité další cytokiny jako modifikující skupinu v IL5

(srovnej detailní diskusi níže) a v takovém případě může být otázka stability irelevantní, protože kondenzace k IL5 poskytuje nezbytnou stabilitu.

Termín "adjuvans" má svůj obvyklý význam v oboru vakcinační technologie, tj. Znamená předmětnou látku nebo přípravek, který 1) není sám o sobě schopný vyvolat specifickou imunitní reakci proti imunogenu vakcíny, ale který je 2) nicméně schopný zesílit imunitní reakci proti imunogenu. Nebo jinými slovy, vakcinace adjuvans samotným neposkytuje imunitní reakci proti imunogenu, vakcinace imunogenem může nebo nemusí vyvolat imunitní reakci proti imunogenu, ale kombinace vakcinace imunogenem a adjuvans indukuje imunitní reakci proti imunogenu, která je silnější, než reakce indukovaná imunogenem samotným.

Termínem "cílení" molekuly je v daném kontextu označována situace, kdy se molekula po zavedení do zvířete objeví přednostně v určité tkáni (tkáních) nebo je přednostně sdružována s určitými buňkami nebo buněčnými typy. Účinek může být skutečně řadou způsobů včetně formulace molekuly do přípravku usnadňujícího cílení nebo zavedením skupiny usnadňující cílení do molekuly. Tyto otázky budou diskutovány detailně níže.

Termín "stimulace imunitního systému" znamená, že předmětná látka nebo přípravek projevují obecný, nespecifický imunostimulační účinek. Počet adjuvancií a předpokládaných adjuvancií (jako jsou například určité cytokiny) sdílejí schopnost stimulovat imunitní systém. Výsledkem použití imunostimulačního agens je zvýšená "pohotovost" imunitního systému znamenající, že simultánní nebo následná imunizace imunogenem indukuje významně účinnější imunitní reakci ve srovnání s použitím izolovaného imunogenu.

### Výhodná provedení down-regulace IL5 aktivity

Je výhodné, když IL5 polypeptid použitý jako imunogen ve způsobu podle vynálezu je modifikovaná molekula, kde je v IL5 aminokyselinové sekvenci přítomná alespoň jeden změna, protože šance na získání důležitého úniku autotoleranci na IL5 je tímto způsobem výrazně usnadněna. Je nutné poznamenat, že to nevylučuje možnost použití takto modifikovaného IL5 ve formulacích, které dále usnadňují únik autotoleranci na IL5, např. formulace obsahující určitá adjuvantia diskutovaná detailně níže.

Bylo prokázáno (v Dalum I et al., 1996, J. Immunol. 157, 4796-4804), že potenciálně autoreaktivní B lymfocyty rozpoznávající autoproteiny jsou u normálních jedinců fyziologicky přítomné. Ale aby v těchto B lymfocytech byla indukována skutečná tvorba protilátek reagujících s relevantními autoproteiny, je potřebné přispění T pomocných lymfocytů produkujících cytokiny ( $T_H$  buňky nebo  $T_H$  lymfocyty). Normálně tato pomoc není poskytnuta, protože T lymfocyty obecně nerozpoznávají epitopy T lymfocytu pocházející z autoproteinů, když jsou předkládány buňkami prezentujícími antigen (APC). Ale po zajištění prvku "cizorodosti" autoproteinu (tj. Zavedení imunologicky významné modifikace) T lymfocyty rozpoznávající cizorodý prvek jsou aktivovány po rozpoznávání cizorodého epitopu na APC (jako je například původně mononukleární buňka). Polyklonální B lymfocyty (které jsou také specializované APC) schopné rozpoznání autoepitopů na modifikovaném autoproteinu také internalizují antigen a pak prezentují jeho cizorodý epitop(y) T lymfocytu a aktivované T lymfocyty pak poskytují cytokinovou pomoc těmto autoreaktivním polyklonálním B lymfocytům. Protože protilátky vytvořené těmito polyklonálními B lymfocyty jsou reaktivní s odlišnými epitopy modifikovaného polypeptidu, včetně těch,



které jsou také přítomné na nativním polypeptidu, je indukována protilátka zkříženě reagující s nemodifikovaným autoproteinem. Závěrem, T lymfocyty mohou být vedeny k tomu, že jednají tak, jako kdyby populace polyklonálních B lymfocytů rozpoznávala úplně cizorodý antigen, zatímco ve skutečnosti je pro hostitele cizorodý pouze vložený epitop(epitopy). Tímto způsobem jsou indukovány protilátky schopné zkřížené reakce s nemodifikovanými autoantigeny.

V oboru je známo několik způsobů, jak modifikovat peptidový autoantigen, aby se dosáhlo úniku autotoleranci. Tudíž podle vynálezu modifikace může zahrnovat, že

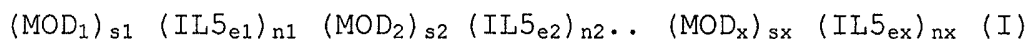
- je zaveden alespoň jeden cizorodý epitop T lymfocytu a/nebo
- je zavedena alespoň jedna první skupina, která provádí cílení modifikované molekuly k buňce prezentující antigen (APC), a/nebo
- je zavedena alespoň jedna druhá skupina, která stimuluje imunitní systém a/nebo
- je zavedena alespoň jedna třetí skupina, která optimalizuje prezentaci modifikovaného IL5 polypeptidu imunitnímu systému.

Ale všechny tyto modifikace by měly být prováděny při udržování podstatné frakce původních epitopů B lymfocytu na IL5. protože je takto zesíleno rozpoznávání nativní molekuly B lymfocyttem.

V jednom výhodném provedení jsou kovalentně nebo nekovalentně zavedeny postranní skupiny (ve formě cizorodých epitopů T lymfocytu nebo výše uvedené první, druhé a třetí skupiny). To znamená, že úseky aminokyselinových zbytků pocházející z IL5 jsou derivovány beze změny primární aminokyselinové sekvence nebo alespoň bez zavedení změn v peptidových vazbách mezi jednotlivými aminokyselinami v řetězci.

Alternativní a výhodné provedení používá substituci a/nebo delecí a/nebo inzerci a/nebo adice aminokyselin (což může být prováděno rekombinantními technikami nebo peptidovou syntézou, modifikace, které se týkají delších úseků aminokyselin mohou dát vznik fúzním polypeptidům). Jedna obzvláště výhodná verze tohoto provedení je technika popsána ve WO 95/05849, která popisuje způsob down-regulace autoproteinů imunizací analogy autoproteinů, kde byl velký počet aminokyselinových sekvencí substituován odpovídajícím počtem aminokyselinových sekvencí, z nichž každá obsahovala cizorodý imunodominantní epitop T lymfocytu, zatímco byla současně udržena obecná terciární struktura autoproteinu v analogu. Pro účely předkládaného vynálezu je ale postačující, jestliže modifikace (ať už to je inserce, adice, delece nebo substituce aminokyseliny) založila cizorodý epitop T lymfocytu a současně uchovala podstatný počet epitopů B lymfocytu v IL5. Ale aby bylo dosaženo maximální účinnosti indukované imunitní reakce, je výhodné, že je udržována v modifikované molekule obecná terciární struktura IL5.

Následující vzorec popisuje IL5 konstrukty obecně spadající do rozsahu vynálezu:



kde  $\text{IL5}_{e_1}$ - $\text{IL5}_{e_x}$  je  $x$  epitopů B lymfocytu obsahujících subsekvence IL5. které jsou nezávisle identické nebo neidentické a které mohou obsahovat nebo neobsahují cizorodé postranní skupiny,  $x$  je celé číslo  $\geq 3$ ,  $n_1$ - $n_x$  jsou  $x$  celá čísla  $\geq 0$  (alespoň jedno je  $\geq 1$ ),  $\text{MOD}_1$ - $\text{MOD}_x$  jsou  $x$  modifikace zavedené mezi zachované epitopy B lymfocytu a  $s_1$ - $s_x$  jsou  $x$  celá čísla  $\geq 0$  (alespoň jedno je  $\geq 1$ , jestliže v  $\text{IL5}_e$

sekvenci nejsou zavedeny žádné postranní skupiny). Tedy za daných obecných funkčních omezení imunogenicity konstruktů, vynález umožňuje všechny druhy permutací původní IL5 sekvence a všechny druhy modifikací. Tedy ve vynálezu jsou zahrnuty modifikované IL5 získané části IL5 sekvence, která např. Projevuje vedlejší účinky *in vivo* nebo vynecháním části, která by mohla založit nežádoucí imunologické reakce.

Udržování podstatné frakce epitopů B lymfocytu nebo dokonce obecné terciární struktury proteinu, který je podroben modifikaci tak, jak bylo v tomto textu popsáno, může být dosaženo několika způsoby. Jedním z nich je jednoduše připravit polyklonální antisérum namířené proti IL5 (např. antisérum připraven v králíkovi) a poté použití tohoto antiséra jako testované reagentie (např. V kompetitivním testu ELISA) proti modifikovaným proteinům, které jsou vytvářeny. Modifikované verze (analogy), které reagují do stejné míry s antisérem jako IL5, musejí mít stejnou obecnou terciární strukturu jako IL5, zatímco analogy projevující omezenou (ale ještě významnou a specifickou) reaktivitu s tímto antisérem si zachovávají podstatnou část původních epitopů B lymfocytu.

Alternativně může být připravena a použita jako testovací panel selekce monoklonálních protilátek reagujících s rozdílnými epitopy IL5. Tento postup výhodně umožní 1) mapování epitopů IL5 a 2) mapování epitopů, které jsou udržovány v připravených analogích.

Ovšem třetím přístupem by bylo rozložit trojrozměrnou strukturu IL5 nebo jeho biologicky aktivní zkrácené varianty (srovnej výše) a srovnat ji s rozloženou trojrozměrnou strukturou připravených analogů. Trojrozměrná struktura může být rozložena prostřednictvím studií rentgenové difrakce a NMR spektroskopii. Další informace týkající se terciární

struktury mohou být do určité míry získány ze studií cirkulárního dichroismu, které mají výhodu, že vyžadují polypeptid pouze v čisté formě (zatímco rentgenová difrakce vyžaduje obstarání krystalizovaného polypeptidu a NMR vyžaduje obstarání isotopových variant polypeptidu), aby byla poskytnuta použitelná informace o terciární struktuře dané molekuly. Ale nakonec rentgenová difrakce a/nebo NMR jsou nezbytné pro získání směrodatných dat, protože cirkulární dichroismus může poskytnout pouze nepřímý důkaz správné trojrozměrné struktury prostřednictvím informace sekundárních strukturních prvků.

Jedno výhodné provedení vynálezu používá mnohonásobné prezentace epitopů B lymfocytu IL5 (tj. Vzorec I, kde alespoň jeden epitop B lymfocytu je přítomný ve dvou pozicích). Tohoto účinku může být dosaženo různými způsoby, např. jednoduchou přípravou fúzních polypeptidů obsahujících strukturu  $(IL5)_m$ , kde  $m$  je celé číslo  $\geq 2$ , a pak zavedením modifikací diskutovaných v tomto textu do alespoň jedné IL5 sekvence nebo alternativně vložením mezi alespoň dvě IL5 aminokyselinové sekvence. Je výhodné, že zavedené modifikace zahrnují alespoň jeden duplikát epitopu B lymfocytu a/nebo zavedení haptenu.

Jak bylo uvedeno výše, zavedení cizorodého epitopu T lymfocytu může být uskutečněno zavedením inserce, adice, delece nebo substituce alespoň jedné aminokyseliny. Ovšem normální bude zavedení více než jedné změny do aminokyselinové sekvence (např. Inserce nebo substituce kompletního epitopu T lymfocytu), ale je důležité dosáhnout, aby IL5 analog, když je zpracováván buňkou prezentující antigen (APC), založil takový cizorodý imunodominantní epitop T lymfocytu, který bude předložen molekule MHC třídy II na povrchu APC. Tedy, jestliže IL5 aminokyselinová sekvence ve

vhodných pozicích obsahuje množství aminokyselinových zbytků, které mohou být také zjištěny v cizorodém  $T_H$  epitopu, pak zavedení cizorodého  $T_H$  epitopu může být uskutečněno poskytnutím zbylých aminokyselin cizorodého epitopu pomocí inserce, adice, delecce a substituce aminokyseliny. Jinými slovy, není nutné zavést insercí nebo substitucí kompletní  $T_H$  epitop.

Je výhodné, když je počet aminokyselinových insercí, delecí, substitucí nebo adicí alespoň 2, například 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 a 25 insercí, substitucí, adicí nebo delecí. Dále je výhodné, když počet aminokyselinových insercí, substitucí, adicí nebo delecí nepřesahuje 150, je například nejvíce 100, nejvíce 90, nejvíce 80 a nejvíce 70. Je obzvláště výhodné, když počet substitucí, insercí, delecí nebo adicí nepřesáhne 60 a konkrétně by počet neměl přesáhnout 50 nebo dokonce 40. Nejvýhodnější je počet ne více než 30. Co se týče adicí aminokyselin, je nutné poznamenat, že počet adicí, když je výsledný konstrukt ve formě fúzního polypeptidu, je často značně vyšší než 150.

Výhodná provedení vynálezu zahrnují modifikace zavedením alespoň jednoho cizorodého imunodominantního  $T_H$  epitopu. Je nutné porozumět, že otázka imunitní dominance  $T_H$  epitopu závisí na zkoumaném živočišném druhu. Termín "imunodominance" používaný v tomto textu se jednoduše týká epitopů, které u očkovaného jedince vyvolají významnou imunitní reakci, ale je známým faktem, že  $T_H$  epitop, který je imunodominantní u jednoho jedince, není nutně imunodominantní u dalšího jedince stejného živočišného druhu, dokonce i když může být schopný vazby MHC-II molekuly u posledně uvedeného jedince.

Dalším důležitým bodem je otázka MHC restrikce  $T_H$  epitopů. Obecně přirozeně se vyskytující  $T_H$  epitopy jsou MHC

omezeny, tj. určitý peptid tvořící  $T_H$  epitop se účinně váže pouze k podskupině molekul MHC třídy II. To má dále ten účinek, že ve většině případů použití jednoho specifického  $T_H$  epitopu má za následek složku vakcíny, která je účinná pouze ve frakci populace a v závislosti na velikosti této frakce, může být nezbytné zahrnout více  $T_H$  epitopů do stejné molekuly nebo alternativně připravit vakcínu s mnoha složkami, kde složky jsou IL5 varianty, které se od sebe liší povahou zavedeného  $T_H$  epitopu.

Jestliže MHC restrikce použitých T lymfocytů je zcela neznámá (například v situaci, kdy má očkované zvíře nedostatečně definovaný MHC přípravek), frakce populace zvířat pokrytá specifickým vakcinačním přípravkem může být určena pomocí následujícího vzorce:

$$f_{populace} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (II)$$

kde  $p_i$  je četnost jedinců v populaci reagujících na  $i$ -tý cizorodý epitop T lymfocytu přítomný ve vakcinačním přípravku a  $n$  je celkový počet cizorodých epitopů T lymfocytu ve vakcinačním přípravku. Tudiž vakcinační přípravek obsahující 3 cizorodé epitopy T lymfocytu mající četnosti reakce v populaci 0,8, 0,7 a 0,6, v daném pořadí, by dal

$$1 - 0,2 \times 0,3 \times 0,4 = 0,976$$

tj. u 97,6 % populace se statisticky vyvine MHC-II zprostředkovaná reakce na vakcínu.

Výše uvedený vzorec nelze použít v situacích, kdy je více nebo méně přesně znám typ MHC restrikce použitých peptidů. Jestliže se například určitý peptid váže pouze na humánní molekuly MHC-II kódované HLA-DR alelami DR1, DR3, DR5 a DR7, pak použití tohoto peptidu spolu s dalšími peptidy,

kteřé se vážou na zbylé molekuly MHC-II kódované HLA-DR alelami dovrší 100% pokrytí ve zkoumané populaci. Podobně, jestliže se druhý peptid váže pouze na DR3 a DR5, přidání tohoto peptidu nezvýší pokrytí všech. Jestliže je kalkulace reakce populace založena pouze na MHC restrikci epitopů T lymfocytu ve vakcíně, frakce populace pokryté specifickým vakcinačním přípravkem může být určena pomocí následujícího vzorce:

$$f_{\text{populace}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \phi_j)^2 \quad (\text{III})$$

kde  $\phi_j$  je suma frekvencí alelických haplotypů v populaci, které kódují MHC molekuly, které vážou jakýkoliv epitop T lymfocytu ve vakcíně a které patří k  $j$ -tému ze 3 známých HLA lokusů (DP, DR a DQ), v praxi je nejdříve určeno, které MHC molekuly rozpoznají každý epitop T lymfocytu ve vakcíně a proto jsou tyto MHC molekuly uvedeny typem (DP, DR a DQ) - pak jsou jednotlivé frekvence odlišných uvedených alelických haplotypů pro každý typ sumarizovány, a tím poskytují  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  a  $\phi_3$ .

Může nastat situace, kdy hodnota  $p_i$  ve vzorci II překročí odpovídající teoretickou hodnotu  $\pi_i$ :

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - v_j)^2 \quad (\text{IV})$$

kde  $v_j$  je suma frekvencí alelických haplotypů v populaci, které kódují MHC molekuly, které vážou  $i$ -tý epitop T lymfocytu ve vakcíně a které patří k  $j$ -tému ze 3 známých HLA lokusů (DP, DR a DQ). To znamená, že v  $1 - \pi_i$ , populace je četnost reagujících osob  $f_{\text{reziduální-}i} = (p_i - \pi_i) / (1 - \pi_i)$ . Tudíž, vzorec III může být upraven tak, že vzniká vzorec V:

$$f_{populace} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left( 1 - \prod_{i=1}^n (1 - f_{reziduál_i}) \right) \quad (V)$$

kde termín  $1 - f_{reziduál_i}$  se rovná nule, jestliže je negativní. Je nutné poznamenat, že vzorec V vyžaduje, aby všechny epitopy byly haplotypy mapované proti identickým sadám haplotypů.

Tudíž při selekci epitopů T lymfocytu, které mají být zavedeny do IL5 analogu, je důležité obsáhnout znalost všech epitopů, které jsou k dispozici: 1) četnost osob v populaci odpovídajících na každý epitop, 2) MHC restriční data a 3) frekvenci relevantních haplotypů v populaci.

Existuje velký počet přirozeně se vyskytujících "všeobecných" epitopů T lymfocytu, které jsou aktivní u velké části jedinců živočišného druhu nebo populace zvířat a ty jsou výhodně zavedeny do vakcíny, a tím snižují potřebu velmi vysokého počtu odlišných analogů IL5 v téže vakcíně.

Všeobecný epitop může být podle vynálezu přirozeně se vyskytující humánní epitop T lymfocytu, jako jsou například epitopy tetanického toxoidu (např. Epitopy P2 a P30), epitop difterického toxoidu, hemaglutinin viru chřipky (HA) a CS antigen *P. Falciparum*.

V průběhu let byl identifikován velký počet dalších všeobecných epitopů T lymfocytu. Byly identifikovány zejména peptidy schopné vázat velký podíl HLA-DR molekul kódovaných odlišnými HLA-DR alelami a všechny z nich jsou možné epitopy T lymfocytu pro zavedení do analogů IL5 použitých podle předkládaného vynálezu. (Srovnej také epitopy diskutované v následujících odkazech, které jsou tímto všechny zahrnuty do odkazů v tomto textu: WO 98/23635 (Frazer IH et al., přidělená University Queensland), Southwood S et. al., 1998, J. Imunol., 160, 3363-3373, Sinigaglia F et al., 1988,



Nature, 336, 778-780, Chicz RM et al., 1993, J. Exp. Med., 178, 27-47, Hammer J et al., 1993, Cell, 74, 197-203 a Falk K et al., 1994, Immunogenetics, 39, 230-242). Poslední odkaz se také zabývá HLA-DQ a -DP ligandy. Všechny epitopy uvedené v těchto 5 odkazech jsou relevantní jako uvažované přírodní epitopy pro použití v předkládaném vynálezu, jakož i epitopy, které s nimi sdílejí společné motivy.

Alternativně epitopem může být každý syntetický epitop T lymfocytu, který je schopný vázat velkou část molekul MHC třídy II. V tomto kontextu „panpeptidy“ DR epitopu ("PADRE") popsané ve WO 95/07707 a v odpovídajícím článku Alexander J et al., 1994, Immunity, 1, 751-761 (oba popisy jsou zahrnuty formou odkazu v tomto textu) jsou zajímavé uvažované epitopy pro použití podle předkládaného vynálezu. Je nutné poznamenat, že nejúčinnější peptidy PADRE popsané v těchto člancích nesou D-aminokyseliny na C-a N-koncích, aby se zlepšila stabilita při podávání. Ale předkládaný vynález primárně usiluje o zavedení relevantních epitopů jako části modifikovaného IL5. které by pak následně byly rozloženy enzymaticky v lyzozomech APC, aby se umožnila následná prezentace molekule MHC-II, a tudíž není prospěšné zavést D-aminokyseliny do epitopů použitých v předkládaném vynálezu.

Jeden obzvláště výhodný PADRE peptid je peptid mající aminokyselinovou sekvenci AKFVAAWTLKAAA (sekv. id. č. 65) nebo jeho imunologicky účinnou subsekvenci. Tento a další epitopy, kterým chybí stejná MHC restrikce, jsou výhodné epitopy T lymfocytu, které by měly být přítomny v analozích IL5 použitých ve vynálezeckém způsobu. Tyto super-všeobecné epitopy by umožnily nejjednodušší provedení vynálezu, kde pouze jeden jediný modifikovaný IL5 je předložen imunitnímu systému očkovaného zvířete.

Jak bylo uvedeno výše, modifikace IL5 může také zahrnout zavedení první skupiny, která cílí modifikovaný IL5 k APC nebo B lymfocytu. Například, první skupina může být specifický vazebný partner pro specifický povrchový antigen B lymfocytu nebo pro specifický povrchový antigen APC. V oboru je známo mnoho takových specifických povrchových antigenů. Například, skupina může být sacharid, pro který je receptor na B lymfocytu nebo na APC (např. mannan nebo mannóza). Alternativně, druhá skupina může být haptén. Jako první skupina může být také použit protilátkový fragment, který specificky rozpoznává povrchovou molekulu na APC nebo lymfocytech (povrchové molekuly mohou např. být FC $\gamma$  receptor makrofágů a monocytů, jako je například FC $\gamma$ RI nebo alternativně každý další specifický povrchový marker, jako je například CD40 nebo CTLA-4). Je nutné poznamenat, že všechny tyto příklady cílicích molekul mohou být také použity jako část adjuvans, srovnej níže.

Jako alternativa nebo doplněk cílení modifikovaného IL5 polypeptidu k určitému buněčnému typu, aby se dosáhlo zesílené imunitní reakce, je možné zvýšit stupeň odpovědnosti imunitního systému zahrnutím výše uvedené druhé skupiny, která stimuluje imunitní systém. Typické příklady takových druhých skupin jsou cytokiny a proteiny tepelného šoku nebo molekulární chaperony, a také jejich účinné části.

Vhodné cytokiny pro použití podle vynálezu jsou ty, které normálně také působí jako adjuvancia ve vakcinačním přípravku, tj. například interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Flt3L, interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), interleukin 13 (IL-13), interleukin 15 (IL-15) a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF), alternativně, funkční část molekuly cytokinu může dostačovat

jako druhá skupina. Co se týče použití těchto cytokinů jako adjuvancií, srovnej diskusi níže. Je nutné poznamenat, že použití obou IL-4 a IL-13 by mělo být prováděno velmi opatrně, jestli vůbec, protože obě molekuly jsou známy jako klíčové efektorové molekuly v patofyziologii atopie a astmatu.

Podle vynálezu mohou být vhodnými proteiny tepelného šoku nebo molekulární chaperony použitými jako druhá skupina HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 (také známý jako gp96, srovnej Wearsch PA et al. 1998, *Biochemistry*, 37, 5709-19) a CRT (kalretikulín).

Alternativně může být druhá skupina toxin, jako je například listeriolysin (LLO), lipid A a tepelně labilní enterotoxin. Zajímavou možností je také celá řada mykobakteriálních derivátů, jako je například MDP (muramyldipeptid) a diestery trehalózy TDM a TDE.

Také možnost zavedení třetí skupiny, která zesiluje prezentaci modifikovaného IL5 imunitnímu systému, je důležité provedení vynálezu. V oboru bylo ukázáno několik příkladů tohoto principu. Například je známo, že palmitoylová lipidační kotva v proteinu OspA *Borrelia burgdorferi* může být použita tak, že poskytne autoadjuvanční polypeptidy (srovnej např. WO 96/40718). Zdá se, že lipidované proteiny vytvářejí struktury podobné micelám s jádrem, které tvoří lipidační části kotvy polypeptidů a zbylé části molekuly z nich vyčnívají, což má za následek mnohonásobnou prezentaci antigenních determinant. Tudiž použití tohoto a příbuzných postupů s použitím různých lipidačních kotev (např. myristylové skupiny, farnesylové skupin, geranyl-geranylové skupiny, GPI-kotvy a N-acylové skupiny diglyceridu) jsou výhodná provedení vynálezu, obzvláště proto že poskytnutí této lipidační kotvy v rekombinantně vytvořeném proteinu je

zcela jasné a vyžaduje pouze použití např. Přirozeně se vyskytující signální sekvence jako fúzního partnera pro modifikovaný IL5 polypeptid. Další možností je použití C3d fragmentu faktoru komplementu C3 nebo samotného C3 (srovnej Dempsey et al., 1996, Science, 271, 348-350 a Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology, 16, 458-462).

Alternativní provedení vynálezu, které má také za následek výhodnou prezentaci mnohočetných (např. alespoň 2) kopií důležitých epitopových úseků IL5 imunitnímu systému, je kovalentní nebo nekovalentní vazba IL5. jeho subsekvence nebo variant k molekulám určitých nosičů. mohou být použity například polymery, např. Sacharidy, jako je například dextrans (srovnej např. Lees A et al., 1994, Vaccine, 12, 1160-1166, Lees A et al., 1990, J Immunol., 145, 3594-3600), ale použitelné alternativy jsou také mannóza a mannan. Úplné membránové proteiny např. Z E. coli a dalších bakterií jsou také použitelní konjugační partneři. Tradiční nosičské molekuly, jako je například hemokyanin z mořské přílipky (KLH), tetanický toxoid, difterický toxoid a albumin bovinního séra (BSA) jsou také výhodní a použitelní konjugační partneři.

Má se za to, že určité oblasti nativního IL5 jsou obzvláště vhodné pro tvoření modifikací. Předpovídá se, že modifikace v alespoň jedné klíčce 1 až 3 nebo v aminokyselinových zbytcích C-koncové části helixu D (uvedené klíčky a uvedený helix D odpovídají těm ukázaným na obr. 3 pro humánní a myší IL5) budou s největší pravděpodobností vytvářet požadované konstrukty a vakcinační výsledky. Důvody pro tyto vybrané úseky jsou a) konzervace známých a predikovaných epitopů B lymfocytu, b) konzervace terciární a kvartérní struktury apod., srovnej také diskusi v úvodu k příkladům. V každém případě, jak je diskutováno výše, je

zcela snadné provádět screening a nastavení modifikovaných IL5 molekul, které byly všechny podrobeny zavedení epitopu T lymfocytu v různých polohách.

Protože nejvýhodnější provedení předkládaného vynálezu se týkají down-regulace humánního IL5. je proto výhodné, že IL5 polypeptid diskutovaný výše je humánní IL5 polypeptid. V tomto provedení, je obzvláště výhodné, že humánní IL5 polypeptid byl modifikován substitucí alespoň jedné aminokyselinové sekvence v sekv. id. č. 1 alespoň jednou aminokyselinovou sekvencí stejné nebo odlišné délky a obsahující cizorodý  $T_H$  epitop, kde substituované aminokyselinové zbytky jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří zbytky 87 až 90, zbytky 32 až 43, zbytky 59 až 64, zbytky 86 až 91 a zbytky 110 až 113. Zdůvodnění těchto konstruktů je detailně diskutováno v příkladech.

#### Formulace IL5 a modifikovaných IL5 polypeptidů

Při prezentaci IL5 polypeptidu nebo modifikovaného IL5 polypeptidu imunitnímu systému zvířete jeho podáváním zvířeti, formulace polypeptidu sleduje principy v oboru obecně přijímané.

Přípravě vakcín, které obsahují peptidové sekvence jako účinné složky, se v oboru obecně dobře rozumí, jak doloženo příklady z patentů Spojených Států č. 4 608 251, 4 601 903, 4 599 231, 4 599 230, 4 596 792 a 4 578 770, všechny zahrnuté formou odkazu v tomto textu. Typicky jsou takové vakcíny připraveny jako injikovatelné, buď jako tekuté roztoky nebo suspenze, mohou také být připraveny pevné formy vhodné pro vytvoření roztoku nebo suspenze v tekutině před injekcí. Přípravek může být také emulgován. Aktivní imunogenní složka je často smíchána s excipienty, které jsou farmaceuticky

přijatelné a kompatibilní s účinnou složkou. Vhodnými excipienty jsou například voda, fyziologický roztok, dextróza, glycerol, ethanol apod. a jejich kombinace. Kromě toho, je-li žádoucí, vakcína může obsahovat menší množství pomocných látek, jako jsou například smáčedla nebo emulgátory, pH pufrů nebo adjuvancia, která zesilují účinnost vakcín, srovnej detailní diskusi o adjuvanciích níže.

Vakcíny jsou obvykle podávány parenterálně injekcí, například buď subkutánně, intrakutánně, intradermálně, subdermálně nebo intramuskulárně. Další formulace, které jsou vhodné pro další způsoby podávání obsahují čípky a v některých případech formulace pro perorální, bukální, sublingvální, intraperitoneální, intravaginální, anální, epidurální, spinální a intrakraniální podávání. Co se týče čípků, mohou obsahovat tradiční pojiva a nosiče například polyalkalenglykoly nebo triglyceridy, takové čípky mohou být vytvořeny ze směsí obsahujících účinnou složku v rozmezí 0,5 % až 10 %, výhodně 1 až 2 %. Perorální formulace obsahují normálně používané excipienty, jako jsou například mannit, laktóza, škrob, stearat hořečnatý, sacharin sodný, celulóza, uhličitan hořečnatý apod. Farmaceutického stupně čistoty. Tyto přípravky mají formy, jako jsou roztoky, suspenze, tablety, pilulky, tobolky, formulace nebo prášky s prodlouženým uvolňováním a obsahují 10 až 95 % účinné složky, výhodně 25 až 70 %. Co se týče perorálních formulací, toxin cholery je zajímavý formulační partner (a také možný konjugační partner).

Polypeptidy mohou být formulovány do vakcíny jako neutrální formy nebo soli. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují kyselé adiční soli (vytvořené s volnými aminoskupinami peptidů) a které jsou tvořeny s anorganickými kyselinami, jako je například chlorovodíková nebo fosforečná

kyselina, nebo takovými organickými kyselinami, jako je octová, oxalová, vinná, mandlová apod. Soli vytvořené s volnými karboxylovými skupinami mohou také pocházet z anorganických bazí, jako je například sodík, draslík, amonium, vápník nebo hydroxid železitý, a takových organických bazí, jako je isopropylamin, trimethylamin, 2-ethylaminoethanol, histidin, prokain apod.

Vakcíny jsou podávány způsobem kompatibilním s lékovou formulací a v takovém množství, jaké je terapeuticky účinné a imunogenní. Podávané množství závisí na léčeném pacientovi, včetně např. Kapacity imunitního systému jednotlivce vyvinout imunitní reakci a stupni požadované protekce. Vhodné rozmezí dávka je řádově několik set mikrogramů účinné složky na vakcinaci s výhodným rozmezím přibližně od 0,1  $\mu\text{g}$  do 2000  $\mu\text{g}$  (třebaže vyšší množství v rozmezí 1 až 10 mg jsou také předpokládána), jako je například v rozmezí přibližně od 0,5  $\mu\text{g}$  k 1000  $\mu\text{g}$ , výhodně v rozmezí od 1  $\mu\text{g}$  do 500  $\mu\text{g}$  a obzvláště v rozmezí přibližně od 10  $\mu\text{g}$  do 100  $\mu\text{g}$ . Vhodné režimy pro počáteční podávání a upomínací dávky jsou také variabilní, ale je pro ně typické počáteční podávání následované dodatečnými inokulacemi nebo dalším podáváním.

Způsob aplikace se může široce odlišovat. Je použitelná každá obvyklá metoda pro podávání vakcíny. Tyto metody zahrnují perorální aplikaci na pevné fyziologicky přijatelné bázi nebo ve fyziologicky přijatelné disperzi parenterálně, injekcí nebo podobně. Dávka vakcíny závisí na způsobu podávání a mění se podle věku očkované osoby a formulace antigenu.

Některé polypeptidy vakcíny jsou dostatečně imunogenní ve vakcíně, ale pro jiné další bude imunitní reakce zesílena, jestliže vakcína dále obsahuje adjuvans.

Jsou známy různé metody, jak pro vakcínu dosáhnout adjuvantní účinek. Obecné principy a metody jsou detailně uvedeny v "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E.S. Stewart-Tull (vyd.), John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0-471-95170-6, a také v "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G et al. (vyd.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, obě publikace jsou tímto zahrnuty formou odkazu v tomto textu.

Je obzvláště výhodné použít adjuvans, u kterého může být prokázáno, že usnadňuje únik autotoleranci k autoantigenům, to je ve skutečnosti esenciální v případech, kdy je použit jako účinná složka autovakcíny nemodifikovaný IL5. Neomezující příklady vhodných adjuvancií jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří imunitně cílicí adjuvans, imunitně modulující adjuvans, jako je například toxin, cytokin a mykobakteriální derivát, olejový přípravek, polymer, adjuvans tvořící micely, saponin, imunostimulační komplexní matrix (ISCOM matrix), částice, DDA, hlinitá adjuvancia, DNA adjuvancia, y-inulin a opouzďrovací adjuvans. Obecně je nutné poznamenat, že výše uvedené popisy, které se týkají sloučenin a přípravků použitelných jako první, druhá a třetí skupina v analozích, se také týkají *mutatis mutandis* jejich použití v adjuvans vakcíny podle vynálezu.

Aplikace adjuvancií zahrnuje použití činidel, jako je například hydroxid nebo fosfát hlinitý (alum), obecně používaných jako 0,05 až 0,1 procentní roztok v pufrovaném fyziologickém roztoku, směs se syntetickými polymery sacharidů (např. Carbopol®) používanou jako 0,25 procentní roztok, agregaci proteinu ve vakcíně zahříváním při teplotách v rozmezí od 70 °C do 101°C po dobu 30 sekund až 2 minuty, v daném pořadí, a je také možná agregace prostřednictvím zkříženě vázajících činidel. Může také být použita agregace



reaktivací s pepsinem ošetřenými protilátkami (Fab fragmenty) k albuminu, směsí bakteriálních buněk, jako je například *C. Parvum* nebo endotoxiny nebo lipopolysaccharidovými složkami gramnegativních bakterií, emulzí ve fyziologicky přijatelném oleji vehikula, jako je například mono-oleát manitu (Aracel A) nebo emulze s 20 procentním roztokem perfluorovaných uhlovodíků (Fluosol-DA) použitým jako bloková substituce. Je také výhodná směs s oleji, jako je například skvalen a IFA.

Podle vynálezu DDA (dimethyldioktadecylamoniumbromid) je zajímavý kandidát adjuvans, jako je DNA a  $\gamma$ -inulin, ale také Freundovo kompletní a nekompletní adjuvans, a také saponiny z *quillaja*, jako je například QuilA a QS21, jsou zajímavá, jako je RIBI. Další možnosti jsou monofosforyllipid A (MPL), výše uvedené C3 a C3d a muramyldipeptid (MDP).

Je také známo, že lipozomové formulace mohou propůjčit adjuvantní účinky, a tudíž podle vynálezu jsou výhodná lipozomová adjuvancia.

Také adjuvancia typu imunostimulační komplexní matrix (ISCOM® matrix) jsou výhodným výběrem podle vynálezu, obzvláště protože bylo ukázáno, že tento typ adjuvans je schopen up-regulace (zvýšení počtu receptorů) exprese APC MHC třídy II. matrix ISCOM® se skládá z (volitelně frakcionovaných) saponinů (triterpenoidů) z *Quillaja saponaria*, cholesterolu a fosfolipidu. Když je přimísen imunogenní protein, výsledná částicová formulace je to, co je známo jako ISCOM částice, kde saponin tvoří 60 až 70 % (hmotnostních), cholesterol a fosfolipid 10 až 15 % (hmotnostních) a protein 10 až 15 % (hmotnostních). Detaily týkající se přípravku a použití imunostimulačních komplexů mohou být zjištěny např. Ve výše uvedených příručkách zabývajících se adjuvancii, ale také práci Morein B et al., 1995, Clin. Immunother., 3, 461-475, a také Barr IG a Mitchell

GF, 1996, *Imunol. and Cell Biol.*, 74, 8-25 (oba zahrnuty formou odkazu v tomto textu) poskytují použitelné instrukce pro přípravu kompletních imunostimulačních komplexů.

Další vysoce zajímavá (a tedy výhodná) možnost dosažení adjuvantního účinku je použití techniky popsané v práci Gosselin et al., 1992 (která je tímto zahrnuta formou odkazu v tomto textu). Stručně, prezentace relevantního antigenu, jako je například antigen podle předkládaného vynálezu, může být zesílena konjugací antigenu k protilátkám (nebo protilátkovým fragmentům vázajícím antigen) proti Fc $\gamma$  receptorům na monocytech/makrofázích. Bylo prokázáno, že zejména konjugáty mezi antigenem a anti-Fc $\gamma$ RI zesilují imunogeničnost pro účely očkování.

Další možnosti se týkají použití cílicích a imunomodulačních látek (*i.a.* cytokinů) uvedených výše jako uvažovaných látek pro první a druhé skupiny v modifikovaných verzích IL5. V tomto spojení jsou možností také syntetické induktory cytokinů, jako jsou poly I:C.

Vhodné mykobakteriální deriváty jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří muramyldipeptid, kompletní Freundovo adjuvans, RIBI a diester trehalózy, jako je například TDM a TDE.

Vhodná imunitně cílicí adjuvancia jsou vybrána ze skupiny, kterou tvoří CD40 ligand a CD40 protilátky nebo její specifické vazebné fragmenty (srovnej diskusi výše), mannóza, Fab fragment a CTLA-4.

Vhodný polymerová adjuvancia jsou vybrána ze skupiny, kterou tvoří sacharid, jako je například dextrans, PEG, škrob, mannan a mannóza, plastický polymer jako takový a latex jako jsou například latexové perličky.

Ještě další zajímavý způsob modulace imunitní reakce je zahrnutí IL5 imunogenu (volitelně dohromady s adjuvancii a

farmaceuticky přijatelnými nosiči a vehikuly) do "virtuální lymfatické uzliny" (VLN) (patentované léčebné zařízení vyvinuté firmou ImunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501). VLN (tenké tubulární zařízení) napodobuje strukturu a funkci lymfatické uzliny. Vložení VLN do kůže vytvoří místo sterilního zánětu s náhlým vzestupem koncentrace cytokinů a chemokinů. T a B lymfocyty, jakož i APC rychle odpovídají na signalizaci nebezpečí, míří do zánětlivého místa a akumulují se v porézní matrix VLN. Bylo ukázáno, že dávka antigenu nutná pro vyvolání imunitní reakce na antigen je redukována při použití VLN a že imunitní protekce získaná vakcinací s použitím VLN předčí obvyklou imunizaci s použitím Ribi jako adjuvans. Technologie je i.a. stručně popsána v práci Gelber C et al., 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using A Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", v: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, 12.-15. říjen 1998, Seascape Resort, Aptos, California".

Očekává se, že vakcína by byla podávána alespoň jednou, jako je například alespoň 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 12 krát ročně. Konkrétněji se očekává podávání jedinci, který to potřebuje, 1 až 12 krát ročně, jako je například 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 nebo 12 krát ročně. Již dříve bylo ukázáno, že paměťová imunita indukovaná použitím výhodných autovakcín podle vynálezu není permanentní a proto imunitní systém potřebuje být periodicky podněcován analogy.

Díky genetickým odchylkám mohou různí jedinci reagovat imunitními reakcemi odlišné síly na stejný polypeptid. Tedy vakcína podle vynálezu může obsahovat několik odlišných polypeptidů, aby se zvýšila imunitní reakce, srovnej také diskusi výše týkající se výběru cizorodého epitopu T

lymfocyty pro zavedení. Vakcína může obsahovat dva nebo více polypeptidy, přičemž všechny polypeptidy jsou, jak je definováno výše.

Vakcína může dále obsahovat 3 až 20 odlišných modifikovaných nebo nemodifikovaných polypeptidů, jako například 3 až 10 odlišných polypeptidů. Ale normálně hledaný počet polypeptidů bude udržován na minimu, jako například 1 nebo 2 polypeptidy.

#### Očkování nukleovou kyselinou

Jako alternativa ke klasickému podávání vakcíny založené na peptidu nabízí technologie vakcinace nukleovou kyselinou (také známa jako "imunizace nukleovou kyselinou", "genetická imunizace" a "genová imunizace") velký počet přitažlivých vlastností.

Za prvé, na rozdíl od postupu s tradiční vakcínou, vakcinace nukleovou kyselinou nevyžaduje zdroje spotřebovávající produkci imunogenního agens ve velkém měřítku (např. ve formě průmyslové fermentace mikroorganismů produkujících modifikovaný IL5). Kromě toho není zapotřebí přístrojová purifikace a schémata skládání (refolding) imunogenu. A nakonec, protože vakcinace nukleovou kyselinou spoléhá na biochemický aparát očkováního jedince pro vytváření expresního produktu zavedené nukleové kyseliny, očekává se, že nastane optimální posttranslační zpracování expresního produktu, což je v případě autovakcinace obzvláště důležité, protože, jak bylo uvedeno výše, může být zachována významná frakce původních IL5 epitopů B lymfocytu v modifikované molekule, a protože epitopy B lymfocytu v principu mohou být tvořeny částí kterékoliv (bio)molekuly (např. Sacharid, lipid, protein apod.). Tudiž, nativní

glykosylace a typy lipidace imunogenu mohou být velmi dobře důležité pro celkovou imunogeničnost, a očekává se, že je to zajištěno tím, že imunogen je produkován hostitelem.

Proto výhodné provedení vynálezu obsahuje prezentaci modifikovaného IL5 imunitnímu systému zavedením nukleové kyseliny(kyselin) kódující modifikovaný IL5 do buněk zvířete, a tím získání *in vivo* exprese zavedené nukleové kyseliny(kyselin) buňkami.

V tomto provedení je zavedená nukleová kyselina výhodně DNA, která může být ve formě nahé DNA, DNA formulované s nabitými nebo nenabitými lipidy, DNA formulované v lipozomech, DNA obsažené ve virovém vektoru, DNA formulované s proteinem nebo polypeptidem usnadňujícím transfekci, DNA formulované s cílícím proteinem nebo polypeptidem, DNA formulované s vápníkovými precipitačními činidly, DNA kondenzované k molekule inertního nosiče, DNA opouzdřené v polymeru, např. V PLGA (srovnej mikroopouzdřovací technologii popsanou ve WO 98/31398) nebo v chitinu či chitosanu a DNA formulované s adjuvans. V tomto kontextu je nutné poznamenat, že prakticky všechny důvody týkající se použití adjuvancií v tradiční vakcinační formulaci lze aplikovat pro formulace DNA vakcín. Proto tedy všechny popisy v tomto textu, které se týkají použití adjuvancií v kontextu vakcín založených na polypeptidech lze aplikovat *mutatis mutandis* na jejich použití v technologii vakcinace nukleovou kyselinou.

Co se týče způsobů podávání a aplikačních schémat vakcín založených na polypeptidech, které byly detailně popsány výše, jsou také použitelné pro vakcíny s nukleovou kyselinou podle vynálezu a všech diskuse uvedené výše týkající se způsobů podávání a aplikačních schémat pro polypeptidy lze aplikovat *mutatis mutandis* na nukleové kyseliny. Mělo by být

přidáno, že vakcíny s nukleovou kyselinou mohou být vhodně podávány intravenózně a intraarteriálně. Kromě toho je v oboru známo, že vakcíny s nukleovou kyselinou mohou být podávány s použitím takzvané „genové pistole“ (biobalistické metody), a tudíž také tento a ekvivalentní způsoby podávání jsou považovány za část předkládaného vynálezu. Konečně bylo také publikováno použití VLN pro podávání nukleových kyselin za vzniku dobrých výsledků, a proto je tento konkrétní způsob podávání zejména výhodný.

Kromě toho nukleová kyselina(kyseliny) použitá jako imunizační agens může obsahovat úseky kódující první, druhou a/nebo třetí skupinu, např. Ve formě imunomodulační látky popsané výše, jako jsou například cytokiny diskutované jako použitelná adjuvancia. Výhodná verze tohoto provedení zahrnuje kódující úsek analogu a kódující úsek imunomodulátoru v odlišných čtecích rámcích nebo alespoň pod kontrolou různých promotorů. Tímto se zabrání tomu, že analog nebo epitop je vytvořen jako fúzní partner k imunomodulátoru. Alternativně, mohou být použity dva rozdílné nukleotidové fragmenty, ale to je méně výhodné oproti výhodě zajištěné koexprese, když jsou oba kódující úseky zahrnuty v téže molekule.

V souladu s tím se vynález také týká přípravku pro indukci produkce protilátek proti IL5. Přípravek obsahuje

- fragment nukleové kyseliny nebo vektor podle vynálezu (srovnej diskusi o vektorech níže) a
- farmaceuticky a imunologicky přijatelné vehikulum a/nebo nosič a/nebo adjuvans, jak bylo diskutováno výše.

Za normálních okolností je nukleová kyselina kódující IL5 variantu zavedena ve formě vektoru, přičemž exprese je pod kontrolou virového promotoru. Pro detailnější diskusi o

vektorech a DNA fragmentech podle vynálezu srovnej diskusi níže. Jsou také k dispozici detailní popisy týkající se formulace a použití vakcín s nukleovou kyselinou, srovnej Donnelly JJ et al, 1997, Annu. Rev. Immunol., 15, 617-648 a Donnelly JJ et al., 1997, Life Sciences, 60, 163-172. Oba tyto odkazy jsou zahrnuty formou odkazu v tomto textu.

### Živé vakcíny

Třetí alternativa pro prezentaci modifikovaného IL5 imunitnímu systému je použití technologie živé vakcíny. Při živém očkování je prezentace imunitnímu systému je prováděna podáváním zvířeti nepatogenních mikroorganismů, které byly transformovány fragmentem nukleové kyseliny kódujícím modifikovaný IL5 nebo vektorem zavádějícím tento fragment nukleové kyseliny. Nepatogenní mikroorganismus může být kterýkoliv vhodný oslabený bakteriální kmen (oslabený pasáží nebo pomocí odstranění patogenních expresních produktů technologií rekombinantní DNA), např. *Mycobakterie bovis* BCG, nepatogenní *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella*, apod. Přehledy týkající se přípravy živých vakcín podle současného stavu techniky lze nalézt např. v publikacích Saliou P, 1995, Rev. Prat., 45, 1492-1496 a Walker PD, 1992, Vaccine, 10, 977-990, oba zahrnuty formou odkazu v tomto textu. Pro detaily o fragmentech nukleové kyseliny a vektorech použitých v těchto živých vakcínách srovnej diskusi níže.

Jako alternativa živých bakteriálních vakcín, fragment nukleové kyseliny podle vynálezu diskutovaný níže může být zaveden do nevirulentního virového vakcinačního vektoru, jako je například kmen vakcinie nebo kterýkoliv další vhodný virus neštovic.

Normálně je nepatogenní mikroorganismus nebo virus podáván zvířeti pouze jednou, ale v určitých případech může být nutné podávat v průběhu života mikroorganismus více než jednou, aby byla udržována protektivní imunita. Dokonce se předpokládá, že imunizační schémata, jako jsou ta uvedena detailně výše pro vakcinaci polypeptidem, budou použitelná při použití živé nebo virové vakcíny.

Alternativně, živá nebo virová vakcinace je spojena s předešlou nebo následnou vakcinací polypeptidem a/nebo nukleovou kyselinou. Například je možné provádět primární imunizaci živou nebo virovou vakcínou, po které následuje posilovací imunizace s použitím postupu s polypeptidem nebo nukleovou kyselinou.

Mikroorganismus nebo virus může být transformován nukleovou kyselinou(kyselinami) obsahující úseky kódující první, druhou a/nebo třetí skupinu, např. Ve formě imunomodulační látky popsané výše, jako jsou například cytokiny diskutované jako použitelná adjuvancia. Výhodná verze tohoto provedení zahrnuje kódující úsek analogu a kódující úsek imunomodulátoru v odlišných čtecích rámcích nebo alespoň pod kontrolou různých promotorů. Tímto se zabrání tomu, že analog nebo epitopy jsou vytvořeny jako fúzní partnery k imunomodulátoru. Alternativně, mohou být použity dva rozdílné nukleotidové fragmenty jako transformační přípravky. Ovšem když je první a/nebo druhá a/nebo třetí skupina ve stejném čtecím rámci, mohou poskytnout expresní produkt, analog podle vynálezu, a takové provedení je obzvláště výhodné podle předkládaného vynálezu.



Použití způsobu podle vynálezu při léčení nemocí

Jak je zřejmé z diskusí uvedených výše, poskytnutí způsobu podle vynálezu umožňuje kontrolu onemocnění charakterizovaných eosinofilií. V tomto kontextu je klíčovým cílem vynálezeckého způsobu astma, ale také další chronické alergické stavy, jako například mnohočetná alergie a alergická rhinitis, jsou vhodný cíle pro léčení/zmírnění příznaků. Proto důležité provedení způsobu podle vynálezu down-regulace IL5 aktivity obsahuje léčbu a/nebo prevenci a/nebo zmírnění příznaků astmatu nebo dalších chronických alergických stavů charakterizovaných eosinofilií, tento způsob obsahuje down-regulaci IL5 aktivity podle způsobu podle vynálezu do takové míry, že počet eosinofilů je významně redukován.

V daném kontextu je taková významná redukce počtu eosinofilů alespoň 20% srovnání s počtem eosinofilů před léčením, ale předpokládají se vyšší procenta, jako je například alespoň 30 %, alespoň 40 %, alespoň 50 %, alespoň 60 %, alespoň 70 %, alespoň 80 % a dokonce alespoň 90 %. Redukce může být systémová nebo častěji lokální, např. V plicích.

Počty eosinofilů jsou zjišťovány metodami v oboru známými, typicky s použitím mikroskopického vyšetření vhodného vzorku (jako je například tekutina z BAL) a počítání počtu eosinofilů manuálně v mikroskopu. Alternativně může být počet eosinofilů počítán s použitím metody průtokové cytometrie nebo jakékoliv jiné vhodné cytometrické metody schopné odlišit eosinofily.

Peptidy, polypeptidy a přípravky podle vynálezu

Jak je zjevné z výše uvedeného, předkládaný vynález je založen na myšlence imunizace jedinců proti IL5 antigenu, aby se nepřímo dosáhlo redukce počtu eosinofilů. Výhodný způsob, jak dosáhnout této imunizace je použití modifikovaných verzí IL5. a takto poskytnout molekuly, které doposud nebyly v oboru popsány.

Má se za to, že modifikované IL5 molekuly diskutované v tomto textu jsou hlavním předmětem vynálezu, a tudíž důležitá část vynálezu se týká IL5 analogu, který pochází ze zvířecího IL5. přičemž je zavedena modifikace, která má za následek to, že imunizace zvířete analogem indukuje produkci protilátek zkříženě reagujících s nemodifikovaným IL5 polypeptidem. Výhodně je povaha modifikace přizpůsobena typům modifikací popsaných výše při diskusi o různých provedeních způsobu podle vynálezu při použití modifikovaného IL5. Proto každý popis předložený v tomto textu týkající se modifikované IL5 molekuly je relevantní pro účel popsání analogů IL5 podle vynálezu a každý takový popis lze aplikovat *mutatis mutandis* pro popis těchto analogů.

Je nutné poznamenat, že výhodné modifikované IL5 molekuly obsahují modifikace, které mají za následek polypeptid mající sekvence identické alespoň ze 70 % s IL5 nebo s jeho subsekvencí dlouhou alespoň 10 aminokyselin. Jsou výhodné sekvence více identické, např. alespoň ze 75 % nebo dokonce alespoň z 80 % nebo z 85 %. Identita sekvencí pro proteiny a nukleové kyseliny může být vypočtena jako  $(N_{ref} - N_{dif}) \cdot 100/N_{ref}$ , kde  $N_{dif}$  je celkový počet neidentických zbytků ve dvou sekvencích při porovnávání a kde  $N_{ref}$  je počet zbytků v jedné sekvenci. Proto DNA sekvence AGTCAGTC má sekvenci identickou ze 75 % se sekvence AATCAATC ( $N_{dif} = 2$  a  $N_{ref} = 8$ ).

Vynález se také týká přípravků použitelných při provádění způsobu podle vynálezu. Proto se vynález také týká imunogenního přípravku obsahujícího imunogenně účinné množství IL5 polypeptidu, který je autoprotein pro zvíře, uvedený IL5 polypeptid je formulován společně s imunologicky přijatelným adjuvans tak, aby se dosáhlo úniku autotoleranci zvířete na IL5 polypeptid, přípravek dále obsahuje farmaceuticky a imunologicky přijatelné vehikulum a/nebo nosič. Jinými slovy, tato část vynálezu se týká formulace přirozeně se vyskytujících IL5 polypeptidů, které byly popsány ve spojení s provedeními způsobu podle vynálezu.

Vynález se také týká imunogenního přípravku obsahujícího imunologicky účinné množství IL5 analogu definovaného výše, uvedený přípravek dále obsahující farmaceuticky a imunologicky přijatelné ředidlo a/nebo vehikulem a/nebo nosič a/nebo excipient a volitelně adjuvans. Jinými slovy, tato část vynálezu se týká formulace modifikovaného IL5 v podstatě tak, jak bylo popsáno v tomto textu výše. Výběr adjuvancií, nosičů a vehikul je v souladu s tím, co bylo diskutováno výše při odkazech na formulace modifikovaného a nemodifikovaného IL5 pro použití ve vynálezeckém způsobu down-regulace IL5.

Polypeptidy jsou připraveny podle metod v oboru známých. Delší polypeptidy jsou normálně připravovány pomocí rekombinantní genové technologie včetně zavedení sekvence nukleové kyseliny kódující IL5 analog do vhodného vektoru, transformace vhodné hostitelské buňky vektorem, exprese sekvence nukleové kyseliny, opětného získání expresního produktu z hostitelských buněk nebo jejich tkáňového supernatantu a následné purifikace a volitelné další modifikace, např. opětného skládání nebo derivatizace.

Kratší peptidy jsou výhodně připraveny pomocí známých technik syntézy peptidu na pevné nebo tekuté fázi. Ale

nedávné pokroky této technologie poskytly možnost produkce kompletních polypeptidů a proteinů těmito prostředky, a tudíž je také v rozsahu předkládaného vynálezu připravit dlouhé konstrukty syntetickými prostředky.

Fragmenty nukleové kyseliny a vektory podle vynálezu

Z výše uvedeného popisu se uznává, že modifikované IL5 polypeptidy mohou být připraveny prostředky rekombinantní genové technologie, ale také prostředky chemické syntézy nebo semisyntézy: tyto dvě druhé uvedené možnosti jsou obzvláště relevantní, když modifikace spočívá v kondenzaci k proteinovým nosičům (jako je například KLH, difterický toxoid, tetanický toxoid a BSA) a neproteinovým molekulám, jako jsou například sacharidové polymery a ovšem také, když modifikace zahrnuje adici postranních řetězců nebo postranních skupin k peptidovému řetězci pocházejícímu z IL5 polypeptidu.

Pro účely rekombinantní genové technologie a ovšem také pro účely imunizace nukleovou kyselinou jsou fragmenty nukleové kyseliny kódující modifikovaný IL5 důležité chemické produkty. Proto se důležitá část vynálezu týká fragmentu nukleové kyseliny, který kóduje IL5 analog, tj. Polypeptid pocházející z IL5. který obsahuje buď přírodní IL5 sekvenci, ke které byl přidán nebo vložen fúzní partner nebo výhodně polypeptid pocházející z IL5. do kterého byl zaveden cizorodý epitop T lymfocytu pomocí inserce a/nebo adice, výhodně pomocí substituce a/nebo delece. Fragmenty nukleové kyseliny podle vynálezu jsou buď DNA nebo RNA fragmenty.

Fragmenty nukleové kyseliny podle vynálezu jsou normálně vloženy do vhodných vektorů za vzniku klonovacích nebo expresních vektorů nesoucích fragmenty nukleové kyseliny

podle vynálezu, tyto nové vektory jsou také částí vynálezu. Detaily týkající se konstrukce těchto vektorů podle vynálezu budou diskutovány v kontextu transformovaných buněk a mikroorganismů níže. Vektory mohou být, v závislosti na účelu a typu aplikace, ve formě plazmidů, fágů, kosmidů, minichromozomů nebo viru, ale také nahá DNA, která je exprimována pouze přechodně v určitých buňkách, je důležitý vektor. Výhodné klonovací a expresní vektory podle vynálezu jsou schopné autonomní replikace, a tím umožní vysoké počty kopií pro účely vysokého stupně exprese nebo vysokého stupně replikace pro následné klonování.

Obecný profil vektoru podle vynálezu obsahuje následující charakteristické rysy ve směru 5'-3' a v operativní vazbě: promotor pro řízení exprese fragmentu nukleové kyseliny podle vynálezu, volitelně sekvenci nukleové kyseliny kódující vedoucí peptid umožňující sekreci (do extracelulárního prostoru nebo, kde použitelné, do periplazmy) nebo integraci polypeptidového fragmentu do membrány, fragment nukleové kyseliny podle vynálezu a volitelně sekvenci nukleové kyseliny kódující terminátor. Při zacházení s expresními vektory v producentských kmenech nebo buněčných liniích je pro účely genetické stability transformované buňky výhodné, když je vektor po zavedení do hostitelské buňky integrován do genomu hostitelské buňky. Na rozdíl od toho při zacházení s vektory, které budou použity pro provádění *in vivo* exprese ve zvířeti (tj. Při použití vektoru pro DNA očkování) je z bezpečnostních důvodů výhodné, když vektor není schopen integrace do genomu hostitelské buňky, typicky jsou použity nahá DNA nebo neintegrující virové vektory, jejichž výběr je odborníkovi znám.

Vektory podle vynálezu jsou použity pro transformaci hostitelských buněk, aby tvořily modifikovaný IL5 polypeptid

podle vynálezu. Tyto transformované buňky, které jsou také částí vynálezu, mohou být pěstované buňky nebo buněčné linie použité pro propagaci fragmentů nukleové kyseliny a vektorů podle vynálezu nebo použité pro rekombinantní produkci modifikovaných IL5 polypeptidů podle vynálezu. Alternativně transformované buňky mohou být vhodné kmeny pro živou vakcínu, kam fragmenty nukleové kyseliny (jedna jediná nebo mnohočetné kopie) byly vloženy tak, aby se provedla sekrece nebo integrace do bakteriální membrány nebo buněčné stěny modifikovaného IL5.

Výhodné transformované buňky podle vynálezu jsou mikroorganismy, jako jsou například bakterie (jako je například druh *Escherichia* [např. *E. coli*], *Bacillus* [např. *Bacillus subtilis*], *Salmonella* nebo *Mycobakterie* [výhodně nepatogenní, např. *M. Bovis* BCG]), kvasinky (jako je například *Saccharomyces cerevisiae*) a protozoa. Alternativně transformované buňky pocházejí z mnohobuněčných organismů, jako jsou například houby, hmyzí buňky, rostlinné buňky nebo savčí buňky. Nejvýhodnější jsou buňky pocházející z člověka, srovnej diskusi o buněčných liniích a vektorech níže. Bylo ukázáno, že nedávné výsledky jsou slibné, co se týče použití komerčně dostupné buněčné linie *Drosophila melanogaster* (Schneider 2 (S<sub>2</sub>) buněčná linie a vektorový systém k dispozici od firmy Invitrogen) pro rekombinantní produkci analogů IL5 podle vynálezu, a tudíž tento expresní systém je obzvláště výhodný.

Pro účely klonování a/nebo optimalizované exprese je výhodné, že transformovaná buňka je schopna replikace fragmentu nukleové kyseliny podle vynálezu. Buňky exprimující nukleový fragment jsou výhodná použitelná provedení vynálezu, mohou být použity pro přípravu modifikovaného IL5 v malém

nebo větším měřítku nebo, v případě nepatogenních bakterií, jako součásti vakcíny v živé vakcíně.

Při produkci modifikovaného IL5 podle vynálezu pomocí transformovaných buněk je pohodlné, ačkoliv není nutné, když je buď expresní produkt exportován do kultivačního média nebo nesen na povrch transformované buňky.

Když byla identifikována účinná producentská buňka, je výhodné na jejím základě založit stabilní buněčnou linii, která nese vektor podle vynálezu a která exprimuje fragment nukleové kyseliny kódující modifikovaný IL5. Výhodně, tato stabilní buněčná linie sekretuje nebo nese IL5 analog podle vynálezu, a tím usnadňuje jeho purifikaci.

Obecně, plazmidové vektory obsahující replikon a kontrolní sekvence, které pocházejí z živočišných druhů kompatibilních s hostitelskou buňkou, jsou použity ve spojení s hostiteli. Vektor obvykle nese místo replikace, a také markerové sekvence, které jsou schopné poskytnout fenotypovou selekci v transformovaných buňkách. Například *E. coli* je typicky transformovaná s použitím pBR322, plazmidu pocházejícího z druhu *E. coli* (viz např. Bolivar et al., 1977). Plazmid pBR322 obsahuje geny pro rezistenci na ampicilin a tetracyklin, a tedy poskytuje snadný prostředek pro identifikaci transformovaných buněk. Plazmid pBR nebo jiný mikrobiální plazmid nebo fág musí také obsahovat nebo být modifikován tak, aby obsahoval, promotory, které mohou být použity prokaryotickým mikroorganizmem pro expresi.

Promotory nejčastěji používané v prokaryotických rekombinantních DNA konstruktech obsahují B laktamázu (penicilinázu) a laktóзовé promotorové systémy (Chang et al., 1978, Itakura et al., 1977, Goeddel et al., 1979) a tryptofanový (*trp*) promotorový systém (Goeddel et al., 1979, EP-A-0 036 776). I když tyto jsou nejčastěji používané, byly

objeveny a používány další mikrobiální promotory a byly publikovány detaily týkající se jejich nukleotidové sekvence, což umožňuje zkušeným odborníkům ligovat je funkčně s plazmidovými vektory (Siebwenlist et al., 1980). Určité geny z prokaryot mohou být exprimovány účinně v *E. coli* z jejich vlastních promotorových sekvencí, což vylučuje potřebu přidávání dalšího promotoru umělými prostředky.

Kromě prokaryot mohou také být použity eukaryotické mikroby, jako jsou například kvasinkové kultury a zde by měl být promotor schopen řízení exprese. Nejčastěji používaný eukaryotický mikroorganismus je *Saccharomyces cerevisiae* nebo běžné pekařské droždí, ačkoliv obecně je k dispozici velký počet dalších kmenů. Pro expresi v *Saccharomyces* je obecně používán například plazmid YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Kingsman et al., 1979, Tschemper et al., 1980). Tento plazmid již obsahuje *trp1* gen, který poskytuje selekční marker pro mutantní kmen kvasinek, který nemá schopnost růstu v tryptofanu, například kmen ATCC č. 44076 nebo PEP4-1 (Jones, 1977). Přítomnost *trp1* léze jako charakteristiky kvasinkového genomu hostitelské buňky pak poskytuje účinné prostředí pro detekci transformace růstem v nepřítomnosti tryptofanu.

Vhodné promotorové sekvence v kvasinkových vektorech obsahují promotory pro 3-fosfoglycerátkinázu (Hitzman et al., 1980) nebo další glykolytické enzymy (Hess et al., 1968, Holland et al., 1978), jako je například enoláza, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, hexokináza, pyruvát-dekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukóza-6-fosfátisomeráza, 3-fosfoglycerátmutáza, pyruvátkináza, triosefosfátisomeráza, fosfoglukózoisomeráza a glukokináza. Při konstrukci vhodných expresních plazmidů jsou terminační sekvence spojené s těmito geny také ligovány do expresního vektoru ve směru 3' od



sekvence, kterou je žádoucí exprimovat, aby byla zajištěna polyadenylace mRNA a terminace.

Jiné promotory, které mají další výhodu transkripce řízené růstovými podmínkami, jsou úsek promotoru pro alkoholdehydrogenázu 2, izocytochrom C, kyselou fosfatázu, degradační enzymy spojené s dusíkovým metabolismem a výše uvedená glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza a enzymy zodpovědné pro využití maltózy a galaktózy. Je vhodný každý plazmidový vektor obsahující promotor kompatibilní s kvasinkami, počátek replikace a terminační sekvence.

Kromě mikroorganismů mohou být také použity jako příjemci kultury buněk pocházejících z mnohobuněčných organismů. V principu je zpracovatelná každá taková buněčná kultura, ať už z tkáňové kultury od obratlovce nebo bezobratlého živočicha. Ale největší zájem je o buňky obratlovců a propagace buněk obratlovců v kultuře (tkáňová kultura) se v současnosti stala rutinním postupem (Tissue Culture, 1973). Příklady těchto použitelných hostitelských buněčných linií jsou buňky VERO a HeLa, buněčné linie z vaječníků čínské křečka (CHO) a buňky W138, BHK, COS-293, *Spodoptera frugiperda* (SF) (komerčně dostupné jako kompletní expresní systémy od i.a. Firmy Protein Sciences, 1000 Reseach Parkway, Meriden, CT 06450, U.S.A. a od firmy Invitrogen) a buněčné linie MDCK. V předkládaném vynálezu je obzvláště výhodná buněčná linie S<sub>2</sub> k dispozici od firmy Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, Holandsko.

Expresní vektory pro tyto buňky obyčejně obsahují (je-li nutné) počátek replikace, promotor lokalizovaný před exprimovaným genem, spolu s kterýmkoliv nezbytným ribozomálním vazebným místem, místy sestřihu RNA, polyadenylačním místem a sekvencí terminátoru transkripce.

Pro použití v savčích buňkách jsou kontrolní funkce expresních vektorů často poskytnuty virovým materiálem. Například obecně používané promotory pocházejí z polyoma, adenovirus 2 a nejčastěji z opičího viru 40 (SV40). Časné a pozdní promotory SV40 viru jsou obzvláště užitečné, protože oba lze snadno získat z viru jako fragment, který také obsahuje počátek replikace SV40 viru (Fiers et al., 1978). Mohou být také použity menší nebo větší SV40 fragmenty za předpokladu, že je zahrnuta sekvence o velikosti přibližně 250 bp šířící se z místa HindIII k místu BglI lokalizovanému ve virovém počátku replikace. Dále je také možné a často žádoucí, použít promotorové nebo kontrolní sekvence normálně sdružené s požadovanou genovou sekvencí, za předpokladu, že tyto kontrolní sekvence jsou kompatibilní s hostitelskými buněčnými systémy.

Počátek replikace může být zajištěn buď konstrukcí vektoru obsahujícího exogenní počátek, jako například může pocházet z SV40 nebo jiných virů (např. Polyoma, adeno, VSV, BPV) nebo může být zajištěn chromozomálním mechanismem replikace hostitelské buňky. Jestliže je vektor integrován do chromozomu hostitelské buňky, je tento často postačující.

#### Identifikace použitelných analogů IL5

Odborníkovi je jasné, že ne všechny varianty nebo modifikace nativního IL5 budou mít schopnost vyvolat tvorbu protilátek u zvířete, které zkříženě reagují s nativní formou. Není ale obtížné sestavit účinný standardní screening modifikovaných IL5 molekul, které splní minimální požadavky na imunologickou reaktivitu diskutovanou v tomto textu. Proto se další část vynálezu týká způsobu identifikace modifikovaného IL5 polypeptidu, který je schopen indukovat protilátky proti nemodifikovanému IL5 u živočišného druhu,

kde je nemodifikovaný IL5 polypeptid autoprotein, tento způsob obsahuje

- přípravu peptidovou syntézou nebo prostředky molekulární biologie sady vzájemně rozdílných modifikovaných IL5 polypeptidů, kde aminokyseliny byly přidány, vloženy, odstraněny nebo substituovány v aminokyselinové sekvenci IL5 polypeptidu živočišného druhu, a tím založit aminokyselinové sekvence v sadě, které obsahují epitopy T lymfocytu, které jsou cizorodé pro živočišný druh nebo přípravu sady fragmentů nukleové kyseliny kódující sadu vzájemně rozdílných modifikovaných IL5 polypeptidů,
- testování členů sady na jejich schopnost indukovat produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 živočišným druhem, a
- identifikaci a volitelně izolaci členu(členů) sady, který významně indukuje produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 v živočišném druhu nebo identifikaci a volitelně izolaci polypeptidových expresních produktů kódovaných členy sady fragmentů nukleové kyseliny, které významně indukují produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 polypeptidu v živočišném druhu.

V tomto kontextu "sada vzájemně rozdílných modifikovaných IL5 polypeptidů" je kolekce neidentických modifikovaných IL5 polypeptidů, které byly vybrány např. na základě kritérií diskutovaných výše (např. V kombinace se studiiemi cirkulárního dichroismu, NMR spekter a/nebo typu rentgenové difrakce). Sada se může skládat z pouze několika členů, ale předpokládá se, sada může obsahovat několik set členů. Podobně sada fragmentů nukleové kyseliny je kolekce neidentických fragmentů nukleové kyseliny, každý fragment kóduje modifikovaný IL5 polypeptid vybraný stejným způsobem.

Test členů sady může být nakonec prováděn *in vivo*, ale může být použit velký počet *in vitro* testů, které zúží počet modifikovaných molekul, které budou sloužit účelu vynálezu.

Protože cílem zavedení cizorodých epitopů T lymfocytu je podporovat reakci B lymfocytů pomocí T lymfocytů, je bezpodmínečně nutné, aby byla modifikovaným IL5 indukována proliferace T lymfocytů. Proliferace T lymfocytů může být testována standardizovanými proliferačními testy *in vitro*. Stručně, od pacienta je získán vzorek bohatý na T lymfocyty a je pak udržován v kultuře. Pěstované T lymfocyty jsou uvedeny do kontaktu s APC pacienta, které již dříve nabraly modifikovanou molekulu a zpracovaly ji pro prezentaci epitopům T lymfocytu. Proliferace T lymfocytů je monitorována a srovnána s vhodnou kontrolou (např. S T lymfocyty v kultuře v kontaktu s APC, které zpracovaly intaktní nativní IL5). Alternativně, proliferace může být hodnocena na základě určování koncentrace relevantních cytokinů uvolňovaných T lymfocyty jako reakce na jejich rozpoznávání cizorodých T lymfocytů.

Je-li vysoce pravděpodobné, alespoň jeden modifikovaný IL5 ze sady je schopen indukovat produkci protilátky proti IL5. je možné připravit imunogenní přípravek obsahující alespoň jeden modifikovaný IL5 polypeptid, který je schopen indukovat protilátky proti nemodifikovanému IL5 u živočišného druhu, kde nemodifikovaný IL5 polypeptid je autoprotein, způsob obsahuje smíchání člena(členů) sady, který významně indukuje produkci protilátek v živočišném druhu, který reaguje s IL5. s farmaceuticky a imunologicky přijatelným nosičem a/nebo vehikulem a/nebo ředidlem a/nebo excipientem, volitelně v kombinaci s alespoň jedním farmaceuticky a imunologicky přijatelným adjuvans.

Podobně je také možné připravit imunogenní přípravek, který jako imunogen obsahuje fragment nukleové kyseliny kódující imunogenní IL5 analog, srovnej diskusi o vakcinaci nukleovou kyselinou výše.

Výše uvedené aspekty vynálezu jsou obvykle prováděny výchozí přípravou velkého počtu vzájemně rozdílných sekvencí nukleové kyseliny nebo vektorů podle vynálezu, jejich zavedení do vhodných expresních vektorů, transformace vhodných hostitelských buněk vektory a exprese sekvencí nukleové kyseliny podle vynálezu. Tyto kroky pak mohou být následovány izolací expresních produktů. Je výhodné, když jsou sekvence nukleové kyseliny a/nebo vektory připraveny metodami používajícími techniku molekulární amplifikace, jako je například PCR, nebo syntézou nukleových kyselin.

#### Příklady provedení vynálezu

##### Návrh vakcíny

Uvažované příklady IL5 autovakcíny jsou konstruovány podle koncepce AutoVac<sup>TM</sup> (popsáno detailně ve WO 95/05849) substitucí známých všeobecných epitopů T lymfocytu proteinu humánního IL5 divokého typu. Substituce jsou peptidové substituce, kde vložený peptid může být stejně nebo rozdílně dlouhý, než odstraněný peptid v sekvenci divokého typu.

Pro počáteční průkaz koncepce *in vivo* testováním a screeningem bylo rozhodnuto připravit konstrukty myši IL5 sekvence. Jako příklad jsou použity jako substituující peptidy epitopy tetanického toxoidu P2 (sekv. id. č. 23) a P30 (sekv. id. č. 24), ale podle předkládaného vynálezu by mohl být použit každý další vhodný peptid obsahující nebo vytvářející všeobecný T<sub>H</sub> epitop.

Je nutné zdůraznit, že velikost molekuly (115 zbytků) ve srovnání s velikostí substitucí (15 nebo 21 zbytků pro P2 a P30, v daném pořadí) silně omezuje možná místa strukturních nedestruktivních inzercí. Protože disulfidové můstky jsou pro dimerizaci důležité, ale ne nutné, jsou některé varianty vytvořeny v párech +/- eliminace cysteinů.

V konstrukci uvažovaných molekul byly brány do úvahy dva základní parametry. Zaprvé, zkoušela se zachovat maximální část trojrozměrné struktury divokého typu hIL5. a tím uchovat nativní repertoár epitopů B lymfocytu. To je podporováno autory Dickason et al., (1994), kteří prokázali, že IL5 epitopy B lymfocytu známé jako neutralizační jsou konformační. Uchování terciární struktury je dosaženo zavedením modifikací v strukturně "neutrálních" místech, jako jsou například klíčky nebo oddělené segmenty. Fakt, že N-koncový helix "A" spolu s helixy "B" a "C" jsou schopny se skládat do kvartérní struktury s druhou molekulou, ukazuje, že tyto 3 helixy vytvářejí stabilně sestavenou strukturní kostru.

Zadruhé byla brána do úvahy biologická aktivita ve vztahu ke koncepci vakcíny. Obecně je výhodný inaktivní konstrukt se zřetelem ke snížení předpokládaných toxických účinků molekul a obecně pro vyhodnocení imunitní reakce. Na druhé straně, optimální neutralizační protilátky by teoreticky měly projevit specifickou pro část IL5. která interaguje s IL5R. To se nejpravděpodobněji dosáhne imunizací aktivní variantou. Konečně, není nemožné, že biologický účinek IL5 na imunitní systém může působit jako zesilovač imunitní reakce, tedy zlepšuje obecný účinek. Ale na základě předešlých zkušeností původce s dalšími molekulami lze očekávat, že většina "teoreticky možných aktivních" konstruktů bude mít nízkou nebo žádnou aktivitu.

Tedy, všechny navrhované varianty jsou potenciálně aktivní ale mohou být, je-li to žádoucí, relativně snadno inaktivovány zabráněním vytvoření aktivního dimeru nebo alteracemi v úsecích "A"- a "D"-helixů, které jsou zapojeny do receptorové vazby/aktivace.

Souhrnem, výše uvedené úvahy o zachování struktury a biologické aktivitě definují jako cílové úseky kteroukoliv z kliček 1 až 3, a také C-koncovou flexibilní oblast.

Klička 3 je vybrána jako primární cílová oblast, protože je strukturně oddělena od předpokládané trojšroubovicové kostry. Protože je dále možné vytvořit biologicky aktivní monomer, elongací kličky 3 (Dickason, 1996), obsahuje tato oblast možnosti pro vytvoření všech typů variant: monomer/dimer a aktivní/inaktivní.

"Klička 1" je druhá oblast obsahující nešroubovicový úsek délky vhodné pro substituce. Varianty z tohoto úseku jsou teoreticky aktivní pouze tehdy, když jsou schopné dimerizace, ale protože délka kličky divokého typu ji činí spíše flexibilní, je racionální očekávat správné složení proteinu po substituci.

Varianty obsahující substituce v oblasti "kličky 2" budou také aktivní pouze jako dimery. Oblast, která může být substituována, je krátká ve srovnání s inzerty a má centrální polohu v předpokládané strukturní kostře, což jsou dvě charakteristické vlastnosti kličky 2, které by mohly zabránit správnému složení proteinu po substituci. Na druhé straně, klička 2 je situována naproti k oblasti interagující s IL5R, což má za následek očekávanou optimální prezentaci neutralizačních epitopů divokého typu, jestliže je modifikovaný protein správně složen.

Nakonec, jsou navrhovány inzerty v C-koncovém flexibilním úseku po "helixu D". Z hlediska proteinové struktury tato koncepce vypadá docela bezpečně, ale je pravděpodobné, že modifikace v tomto úseku ovlivní jak dimerizaci, tak biologickou aktivitu (jestliže je modifikovaný protein dimerizován) protože C-koncová část je lokalizována v oblasti jak vazby receptoru, tak ve styčné ploše dimeru.

Aminokyselinové sekvence 10 variant původně konstruovaných podle výše uvedených úvah jsou uvedeny jako sekv. id. č. 2 až 11 a 13 až 22. Další varianty konstruované později jsou uvedeny v sekv. id. č. 27 až 59 (včetně DNA sekvencí nukleových kyselin a aminokyselinových sekvencí).

Je nutné poznamenat, že všechny inzerty kromě těch podle příkladu 2 jsou připraveny tak, aby obsahovaly hraniční aminokyselinové zbytky, které jsou zachovány z hIL5 do mIL5. aby podporovaly proces úspěšného přenosu pozitivních konstruktů z myši na člověka.

V následujících příkladech jsou pozice pro substituce označované podle čísel aminokyselinových zbytků v myší sekvenci, odpovídající humánní pozice jsou dány v závorkách.

#### Příklad 1

Varianty s P2 substituujícím pozice v kličce 3 při zachování Cys84 (86)

Epitop P2 (sekv. id. č. 23) je substituován v kličce 3 při zabránění eliminaci Cys89(86). Tyto varianty (sekv. id. č. 2 a 28 (humánní), kde aminokyseliny 87-90 nebo 88-91 jsou substituovány, a sekv. id. č. 13 a 46 (myší), kde aminokyseliny 85-88 nebo 86-89 jsou substituovány) jsou



potenciálně aktivní jako monomery (díky elongaci kličky 3) a jako dimery. Sekv. id. č. 28 a 46 jsou také označeny hIL5.1 a mIL5.1, v daném pořadí.

#### Příklad 2

Varianty s P2 substituujícím pozice v kličce 1 při zachování Cys42 (44)

Epitop P2 (sekv. id. č. 23) je substituován v kličce 1 při zabránění eliminaci Cys42(44). Tyto varianty (sekv. id. č. 3 a 36 (humánní), kde aminokyseliny 32-43 nebo 33-43 jsou substituovány, a sekv. id. č. 14 a 56 (myší), kde aminokyseliny 30-41 nebo 31-41 jsou substituovány) jsou potenciálně aktivní pouze jako dimery. Sekv. id. č. 36 a 56 jsou také označeny hIL5.5 a mIL5.5, v daném pořadí.

#### Příklad 3

Varianty s P2 substituujícím pozice v kličce 2

Epitop P2 (sekv. id. č. 23) je substituován v kličce 2. Tyto varianty (sekv. id. č. 4 a 34 (humánní), kde aminokyseliny 59-64 jsou substituovány, a sekv. id. č. 15 a 50 (myší), kde aminokyseliny 57-62 jsou substituovány) jsou potenciálně aktivní pouze jako dimery. Sekv. id. č. 34 a 50 jsou také označeny hIL5.4 a mIL5.4, v daném pořadí.

#### Příklad 4

Varianty s P2 substituujícím pozice v kličce 3 při eliminaci Cys84 (86)

Epitop P2 (sekv. id. č. 23) je substituován v kličce 3 při eliminaci Cys84(86). Tyto varianty (sekv. id. č. 5 a 38 (humánní), kde aminokyseliny 86-91 jsou substituovány, a sekv. id. č. 16 a 54 (myší), kde aminokyseliny 84-89 jsou substituovány) jsou v principu podobné jako varianty typu č. 1 (sekv. id. č. 2 a 28 a 13 a 46), ale vytvoření monomerních produktů bylo usnadněno inhibicí tvorby disulfidových můstků a upravením délky kličky 3. Sekv. id. č. 38 a 54 jsou také označeny hIL5.6 a mIL5.6, v daném pořadí.

#### Příklad 5

Varianty s P2 substituujícím pozice 108-111 (110-113) v C-koncové oblasti

Epitop P2 (sekv. id. č. 23) je substituován v C-koncové oblasti následující po helixu D. Tyto varianty (sekv. id. č. 6 a 17) jsou potenciálně aktivní pouze jako dimer.

#### Příklad 6

Varianty s P30 substituujícím pozice v kličce 3 při zachování Cys84 (86)

Epitop P30 (sekv. id. č. 24) je substituován v kličce 3 při zabránění eliminaci Cys84(86). Tyto varianty (sekv. id. č. 7 a 40 (humánní), kde aminokyseliny 88-91 nebo 87-90 jsou substituovány, a sekv. id. č. 18 a 58 (myší), kde aminokyseliny 85-88 nebo 86-89 jsou substituovány) jsou potenciálně aktivní jako monomery (díky elongaci kličky 3) a jako dimery. Sekv. id. č. 40 a 58 jsou také označeny hIL5.7 a mIL5.7, v daném pořadí.

## Příklad 7

Varianty s P30 substituujícími pozice v kličce 1 při zachování Cys42 (44)

Epitop P30 (sekv. id. č. 24) je substituován v kličce 1, při zabránění eliminaci Cys42(44). Tyto varianty (sekv. id. č. 8 a 30 (humánní), kde aminokyseliny 32-43 jsou substituovány, a sekv. id. č. 19 a 48 (myší), kde aminokyseliny 30-41 jsou substituovány) jsou potenciálně aktivní pouze jako dimery. Sekv. id. č. 30 a 48 jsou také označeny hIL5.2 a mIL5.2, v daném pořadí.

## Příklad 8

Varianty s P30 substituujícími pozice v kličce 2

Epitop P30 (sekv. id. č. 24) je substituován v kličce 2. Tyto varianty (sekv. id. č. 9 a 20, kde aminokyseliny 59-64 a 57-62 jsou substituovány, v daném pořadí) jsou potenciálně aktivní pouze jako dimery.

## Příklad 9

Varianty s P30 substituujícími pozice v C-koncové oblasti

Epitop P30 (sekv. id. č. 24) je substituován v C-koncové oblasti následující po helixu D. Tyto varianty (sekv. id. č. 10 a 21, kde aminokyseliny 110-113 a 108-111 jsou substituovány, v daném pořadí) jsou potenciálně aktivní pouze jako dimery.

## Příklad 10

Varianty s P2 substituujícími pozice 84-89 (86-91) a P30 substituujícími pozice 110-113

Epitop P2 (sekv. id. č. 23) je substituován v kličce 3 při eliminaci Cys84(86) a epitop P30 (sekv. id. č. 24) je substituován v C-koncové oblasti následující po helixu D. Pouze tyto varianty (sekv. id. č. 11 a 22) jsou spolu s variantami typu č. 12 jediné obsahující oba epitopy a jsou potenciálně aktivní monomery.

## Příklad 11

Varianty s P30 substituujícími pozice v kličce 3 při eliminaci Cys84 (86)

Epitop P2 (sekv. id. č. 24) je substituován v kličce 3 při eliminaci Cys84(86). Tyto varianty (sekv. id. č. 42 (humánní), kde aminokyseliny 86-91 jsou substituovány, a sekv. id. č. 58 (myší), kde aminokyseliny 84-89 jsou substituovány) jsou v principu podobné jako varianty typu č. 6, ale vytvoření monomerních produktů bylo usnadněno inhibicí tvorby disulfidového můstku a upravením délky kličky 3. Sekv. id. č. 42 a 58 jsou také označeny hIL5.12 a mIL5.12, v daném pořadí.

## Příklad 12

Varianty s P2 a P30 substituujícími pozice v kličce 3

P2 (sekv. id. č. 23) a P30 (sekv. id. č. 24) epitopy jsou substituovány v kličce 3 při zachování Cys84(86). Tyto varianty (sekv. id. č. 44 a 60, kde aminokyseliny 88-91 a 86-

89 jsou substituovány, v daném pořadí) obsahují oba epitopy a jsou potenciálně aktivní monomery. Sekv. Id. č. 44 a 60 jsou také označeny hIL5.13 a mIL5.13, v daném pořadí.

### Příklad 13

#### Výběr expresního systému

Rekombinantní IL5 byl exprimován v celé řadě odlišných expresních systémů včetně kvasinek, hmyzích buněk a buněk CHO (Tavernier et al., 1989).

Podle předkládaného vynálezu je jedním vhodným expresním systémem *E. coli*, na základě předešlých studií publikujících použití tohoto hostitele pro produkci hIL5 (Proudfoot et al., 1990, Graber et al., 1993). Rekombinantní protein je exprimován jako inkluzní tělíska, která jsou konvertována na biologicky aktivní dimer po purifikaci a opětném složení (např. S použitím obecně použitelné metody opětného složení popsané v patentu Spojených Států č. 5 739 281). Rychlost a jednoduchost exprese v *E. coli* umožňuje okamžitý počátek produkce proteinu, když jsou hotové genetické konstrukty, a tedy usnadnění rychlé tvorby materiálu pro stanovení *in vivo* důkazu koncepce IL5 autovakcíny.

Jestliže je z některého důvodu zjištěno, že proveditelnost je příliš špatná (např. příliš nízký výtěžek opětného složení, nestabilita produktů nebo zlepšené farmakokinetické parametry ve vztahu ke glykosylaci apod.), může být v dalším rozvoji uvažováno o produkci autovakcíny v kvasinkách.

Nedávno byly získány slibné výsledky s použitím expresního systému *Drosophila melanogaster* s použitím S<sub>2</sub> buněk (k dispozici od firmy Invitrogen) a v současnosti

představuje tento systém výhodné provedení pro expresi analogů IL5 podle vynálezu.

IL5 varianta proteinu byla produkována buňkami *S<sub>2</sub>* *Drosophila* trvale exprimujícími IL5 konstrukty. Bylo testováno několik různých transfekčních metod a byly vybrány  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  a Lipofectin. Byly použity dva odlišné subklony *S<sub>2</sub>* buněk a byly transfekovány  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  a Lipofectinem, v daném pořadí. Tyto dva klony byly získány z ATCC a Larse Sondergaard z Univerzity v Kodani, v daném pořadí. S použitím obou metod byly vybrány vhodné stabilní linie exprimující mIL5 a mIL5.1 proteiny v rozmezí 2-10 mg/l.

#### Materiál a metody

*S<sub>2</sub>* buňky byly pěstovány a udržovány v Schneiderově médiu (Sigma) obsahujícím 5 až 10 % fetálního telecího séra (FCS), 0,1 Pluronic F68 (Sigma), penicilin/streptomycin (Life Technologies), pěstovány v třepacích baňkách v 25°C a 120 rpm.

Transfekce Lipofectinem byly prováděny ve 250 ml nebo 1 l třepacích baňkách. *S<sub>2</sub>* buňky byly rozděleny po  $2,5-3 \times 10^6/\text{ml}$  do 50 ml Excell 420 (JRH Biosciences) bez antibiotik a pěstovány přes noc ve 250 ml třepacích baňkách. Příští ráno byly připraveny reagentie Lipofectinu: zkumavka 1) 300-1200  $\mu\text{g}$  plazmidové DNA obsahující zkoumaný gen, plus 15-60  $\mu\text{g}$  pCoHYGRO hygromycinového selekčního plazmidu (20:1 poměr plazmidů) v 15-45 ml séra a médiu bez doplňku, zkumavka 2) 1 ml Lipofectinu v 5 ml séra a médiu bez doplňku. Po 1 hodině při teplotě místnosti byly zkumavky 1 a 2 smíchány a ponechány po dobu 15 minut při teplotě místnosti před pozvolným přidáním k *S<sub>2</sub>* buňkám. Po pěstování buněk přes noc bylo přidáno nové plně doplněné médium plus 150-300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hygromycinu.

Linie s tranzientní a trvalou expresí byly indukovány buď s 500  $\mu\text{M}$  síranu měďnatého nebo 10  $\mu\text{M}$  chloridu kademnatého po dobu 48-72 hodin v médiu Ex-cell 420 bez séra (JRH Biosciences).

#### Výsledky

Pomocí  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  bylo vytvořeno 33 stabilních linií a pomocí Lipofectinu 23. Výtěžky exprese kolísaly od nedetekovatelných až do 11 mg/l. Následující tabulka shrnuje několik linií použitých pro produkci proteinu.

Shrnutí výsledků exprese mIL5 z nejlepších  $\text{S}_2$  buněčných transfekcí

Plazmid	Konstrukt	$\text{S}_2$ buňky	Metoda transfekce	Výtěžek
p612	IL5/His15/mIL5wt	ATCC	$\text{Ca}_2\text{PO}_4$	3,5 mg/l
p767	Bip/His15/mIL5wt	LS	Lipofectin	11 mg/l
p613	IL5/His15/mIL5.1	ATCC	$\text{Ca}_2\text{PO}_4$	2,6 mg/l
p768	Bip/His15/mIL5.1	ATCC	$\text{Ca}_2\text{PO}_4$	0*
p619	IL5/His15/mIL5.5	LS	Lipofectin	0*

\* expresní plazmid obsahoval mutace sekvence.

$\text{S}_2$  buňky mohou být tedy transfekovány buď precipitací s fosforečnanem vápenatým nebo Lipofectinem. Díky rozdílu ve stupni exprese mezi plazmidy p612 a p767 se zdá, že signální peptid Bip je účinnější vedoucí sekvence než endogenní mIL5 vedoucí sekvence v  $\text{S}_2$  buňkách.

#### Příklad 14

##### Screening a selekce modifikovaných molekul

Po expresi je rekombinantní protein purifikován a posouzen. Charakterizace uvažovaných autovakcín zahrnuje

analytickou chromatografií, izoelektrické zaostření (IEF), SDS-PAGE, analýz kompozice aminokyselin, N-koncovou sekvenční analýzu, hmotnostní spektrometrii, analýzu rozptylu laserového záření pod nízkým úhlem, standardní spektroskopii a cirkulární dichroismus do takové míry, že přesně dokumentují relevantní parametry definující zamýšlený proteinový produkt.

Proteiny značené His byly až donedávna purifikovány s použitím dvoustupňového postupu. Ale výtěžek a čistota po konečném kroku s chelátem nebyly tak vysoké, jak bylo očekáváno. Nový jednostupňový postup purifikace zNázevnal 3 hlavní dosažené výhody: vyšší výtěžek, vyšší výkonnost a vyšší čistotu konečného produktu. Byly také stanoveny podmínky štěpení pro odstranění značky His.

Dvoustupňový purifikační postup pro IL5:

Exprese proteinu byla indukována přidáním kovových iontů k médiu. Tyto kovové ionty musely být odstraněny před aplikací protein na chelátovou kolonu. Tak bylo přidáno celkem 20 mM EDTA ke komplexu kovových iontů a supernatant byl pak filtrován nad kolonou SP-sepharose pro zachycení proteinu. Po promytí, aby se odstranil nenavázaný protein, byl vázaný protein eluován stupňovým gradientem NaCl. Tento krok slouží dvěma účelům: jako koncentrační krok redukující objem faktorem 30 a výměna pufru.

Relevantní frakce (jak byly zjištěny pomocí SDS-PAGE) jsou sloučeny a dále purifikovány na koloně s cheláty kovu.

Protein byl nanese na Ni<sup>2+</sup>-nabitou chelátovou kolonu a nenavázaný protein byl odmyt. Vázaný protein pak byl eluován s použitím imidazolového gradientu. Všechny frakce, kolonou proteklé pufrů a proteklý roztok EDTA, pak byly zkontrolovány pomocí SDS-PAGE a metodou bodového přenosu („dot-blot“).



Relevantní frakce (jak byly zjištěny pomocí SDS-PAGE a „dot-blot“) jsou sloučeny a dialyzovány dvakrát proti 10 násobku objemu PBS, pH upraveno na 6,9.

Po filtraci byla dialyzovaná látka koncentrována dokud nebylo dosaženo vhodné koncentrace (výhodně 1 mg/ml). Nakonec byl protein rozdělen do alikvotů a uložen v  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Byl použit následující specifický protokol:

1) získaný supernatant byl stočen v 2500 x g po dobu 15 minut (jestliže se objevila infekce, byla zapotřebí centrifugace ve 22000 x g po dobu 30 minut. Supernatant pak byl filtrován s použitím 0,45  $\mu\text{m}$  filtru, pak následovalo použití 0,22  $\mu\text{m}$  filtru (někdy bylo nezbytné filtrovat nejdříve přes 5  $\mu\text{m}$  filtr). Supernatant pak byl smíchán v poměru 1:1 s pufrem A (viz krok 2) obsahující 40mM EDTA, což mělo za následek konečné složení pufru 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10% glycerol, 20mM EDTA, pH 6,0.

2) filtrovaný supernatant pak byl nanesen na SP-Sepharose kolonu ekvilibrovanou pufrem A. Na 80 ml kolonu může být nanesen celkem 1-2 l (v závislosti na koncentraci proteinu, výše uvedené platí pro 1-10 mg IL5/l). Průtok během aplikace: 1-2 ml/min (obvykle přes noc), proteklý pufr byl sbírán a uložen pro pozdější analýzu. Po aplikaci byla kolona promyta 2-3 objemy kolony (CV) pufrem A, dokud nebylo dosaženo stabilní bazální hodnoty. Vázaný protein byl eluován s použitím stupňového gradientu: 0-100-500-1000mM NaCl, byly sbírány frakce po 10 ml, průtok byl 10 ml/min. Purifikace byla prováděna v  $5^{\circ}\text{C}$ .

Kolona byla čištěna 2 CV 1M NaOH, průtokem 5 ml/min po každém běhu a opět ekvilibrována pufrem A.

Pufr A: 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10% glycerol, pH 6,0

Pufir B: 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 40mM imidazol, 10% glycerol, pH 6,0.

Pro divoký typ i varianty byl použit stejný postup.

Všechny frakce, výchozí látka a proteklý pufir byly testovány metodou „dot-blot“ a SDS-PAGE. Frakce obsahující IL5 byly sloučeny a dále purifikovány s použitím chelátové kolony.

Jednostupňový purifikační postup pro IL5:

Supernatant byl nanesen přímo na 70 ml chelátovou kolonu nabitou ZnCl<sub>2</sub>. Po odstranění nenavázané látky promytím byl navázaný protein (IL5 a kontaminující složky) eluován s použitím gradientu imidazolu. Tato metoda má plně výhodu značky His za poskytnutí jednostupňového purifikačního postupu s konečným produktem o vysokém stupni čistoty (>95%). Relevantní frakce (jak byly zjištěny pomocí SDS-PAGE a dot-blot) jsou sloučeny a dialyzovány dvakrát proti 10 násobku objemu PBS, pH upraveno na 6,9 a koncentrace NaCl upravena na 400 mM.

Po filtraci byla dialyzovaná látka koncentrována dokud nebylo dosaženo vhodné koncentrace (výhodně 1 mg/ml). Nakonec byl protein rozdělen do alikvotů a uložen v -20°C.

Specifický protokol obsahoval tyto kroky:

1) supernatant byl filtrován přes 0,45 µm filtr, aby se odstranily nečistoty, a byl naředěn v poměru 1:1 pufrem A.

Chelátová kolona Fast Flow o objemu 70 ml byla promyta 5 CV vody, a pak nabitá 10 CV 10mM ZnCl<sub>2</sub>, pH 7. Po ekvilibraci 5 CV pufiru A, byl nanesen vzorek s použitím pumpy (průtok 10 ml/minutu). Proteklý pufir byl sbírán a uložen pro pozdější analýzu. Vázaný protein byl eluován s použitím imidazolového gradientu od 0 do 250mM imidazolu více než 30 CV. Nakonec byla kolona opláchnuta 5 CV pufiru C.

Byly sbírány frakce 10 ml.

Pufry:

A: 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 10% glycerol, pH 7.

B: 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 10% glycerol, pH 7, 0,25M imidazol

C: 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 0,1M EDTA, pH 7,0.

Všechny frakce, proteklé pufry a výchozí látka byly testovány SDS-PAGE.

2) nejčistší frakce (jak byly zjištěny pomocí SDS-PAGE) obsahující IL5 byly sloučeny (50 µl bylo uloženo pro pozdější analýzu) a dialyzovány dvakrát proti 10 násobku objemu PBS, pH upraveno na 6,9, v 6°C, MW 12-14 kD. Dialyzát byl filtrován přes 0,22 µm filtr (50 µl bylo uloženo pro pozdější analýzu) a byla měřena A<sub>280</sub> s použitím dialyzačního pufru (filtrován přes 0,45 µm) jako referenční hodnoty. Byl měřen objem před a po dialýze a vzorky byly uloženy pro pozdější analýzu SDS-PAGE (po kroku 3).

3) NaCl byl přidán k dialyzovanému proteinu, dokud nebylo dosaženo celkové koncentrace 400 mM a byl pak koncentrován s použitím buď přístroje Amicon (pro objemy větší než 50 ml) nebo koncentračního zařízení Vivaspin (pro 10 až 50 ml). V obou případech byla membrána saturována 10 ml pufru PBS před tím, než byl nanesen vzorek. Vzorek by měl být koncentrován dokud nebylo dosaženo výhodné koncentrace 1 mg/ml (jak měřeno A<sub>280</sub>). Dialyzovaný koncentrovaný vzorek byl filtrován přes 0,22 µm filtr a značen s E-nr. A<sub>280</sub> byla měřena s použitím proteklého pufru jako referenční hodnoty.

Všechny vzorky z dialýzy a koncentračního kroku byly analyzovány SDS-PAGE a obarveny modří Coomassie. Purifikovaný protein byl uložen zmražený v alikvotech a byl vyplněn list papíru popisující vzorek a vložen do pořadače "IL5-protein".

Výše popsany postup poskytl protein o čistotě přibližně 90 až 95 %, ještě obsahující značku His.

Při sekvencování měl IL5wt a varianta IL5.1 očekávanou N-koncovou sekvencí zahrnující značku His.

Purifikační postup zmíněný výše byl realizován v následujícím specifickém nastavení:

1) sloučené frakce z kolona SP-sepharose byly filtrovány přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr, aby se odstranily nečistoty.

Chelátová kolona 5 ml HiTrap (nutné použít pouze určené kolony) byla promyta 15 ml vody (s použitím injekční stříkačky), a pak nabita 15 ml 0,1M  $\text{NiSO}_4$  a promyta 15 ml vody. Kolona byla připojena k systému Äkta ekvilibrovanému 2-3 CV pufru A. Vzorek byl nanesen s použitím buď kličky nebo pumpy - v závislosti na objemu (průtok 4 ml/min), proteklý pufr byl sbírán a uložen pro pozdější analýzu. Navázaný protein byl eluován s použitím imidazolového gradientu od 0 do 500 mM imidazolu více než 20 CV. Frakce 5 ml byly sbírány. Nakonec byla kolona opláchnuta s použitím 5 CV pufru B2.

Pufr A: 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5M  $\text{NaCl}$ , 10% glycerol, pH 5,0

pufr B1: 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5M  $\text{NaCl}$ , 0,5M imidazol, 10% glycerol, pH 5,0

Pufr B2: 50mM acetát sodný, 0,5M  $\text{NaCl}$ , 0,1M EDTA, 10% glycerol, pH 4,5

Všechny frakce, proteklý pufr a výchozí látka byly testovány dot-blot, všechny relevantní frakce byly testovány SDS-PAGE.

2) nejčistší frakce (jak byly zjištěny pomocí SDS-PAGE) obsahující IL5 byly sloučeny (50  $\mu\text{l}$  bylo uloženo pro pozdější analýzu) a dialyzovány dvakrát proti 10 násobku objemu PBS, pH upraveno na 6,9, v 6°C, MW 12-14 kD. Dialyzát byl filtrován přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr (50  $\mu\text{l}$  bylo uloženo pro pozdější

analýzu) a byla měřena  $A_{280}$  s použitím dialyzačního pufru jako referenční hodnoty. Byl měřen objem před a po dialýze a vzorky byly uloženy pro pozdější analýzu SDS-PAGE (po kroku 3).

3) po přidání dodatečné NaCl až do konečné koncentrace 400 mM, byl dialyzovaný protein koncentrován s použitím buď přístroje Amicon (pro objemy větší než 50 ml) nebo koncentračního zařízení Vivaspin (pro 10 až 50 ml). V obou případech byla membrána saturována 10 ml pufru PBS před tím, než byl nanesen vzorek. Vzorek by měl být koncentrován dokud nebylo dosaženo výhodné koncentrace 1 mg/ml (jak měřeno  $A_{280}$ ). Dialyzovaný koncentrováný vzorek byl filtrován přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr a značen s E-nr.

Všechny vzorky z dialýzy a koncentračního kroku byly analyzovány SDS-PAGE a obarveny modří Coomassie. Purifikovaný protein byl uložen zmražený v alikvotech.

Další purifikační postupy, které byly hodnoceny:

Purifikace s chelátem  $\text{Zn}^{2+}$ : Eluce proteinu s použitím stoupajícího imidazolového gradientu se ukázala být velmi účinnou, protože se protein wt váže silně na kolonu. *Drosophila* supernatant může být nanesen přímo a po promytí může být IL5wt eluován imidazolem. Kolona byla nabita 10 CV 10 mM  $\text{ZnCl}_2$  a promyta vodou. pH vazby a eluční pufrů musí mít pH vyšší než 6,5, protože jinak  $\text{ZnCl}_2$  precipituje.

Con A afinitní chromatografie je ve výzkumu. Možnost použití glykosylace vyskytující se na IL5 jako afinitní značky a eluce s použitím monosacharidového analogu by byla zajímavá, protože by mohla být použita také pro konstrukty neznačené His.

Odstranění značky His:

Odstranění 15 aa značky His (sekv. id. č. 25) bylo prováděno podle instrukcí dodavatele (Unizyme):

Purifikovaný a dialyzovaný/koncentrovaný IL5 značený His byl zbaven značení His postupným přidáním dvou enzymů, DAP1 a glutamincyklotransferázy. DAP1 odstranil dvě aminokyseliny z volného N-konce.

Enzym potřebuje být nejdříve aktivován:

9  $\mu$ l HT-DAP1 (10 U/ml) bylo smícháno s 9  $\mu$ l 20mM cysteamin-HCl. Po 5 minutách inkubace při teplotě místnosti bylo přidáno celkem 108  $\mu$ l HP-GCT (100 U/ml) a 54  $\mu$ l pufru TAGZyme. Tato směs musí být použita během 15 minut.

Tato dávka naštěpí 1 mg proteinu značeného His.

Protein značený His byl smíchán se 150  $\mu$ l aktivovaného enzymu a inkubován ve 37°C po dobu 120 minut. Vzorky byly odebírány pro analýzu SDS-PAGE (10  $\mu$ l) po 0, 10, 30, 60 a 120 minutách. Vzorky byly položeny do ledu, aby se zastavilo štěpení.

Pufry:

1. pufr TAGZyme: 20mM NaPO<sub>4</sub> pufr, pH 7,5, 150mM NaCl
2. 20mM cysteamin-HCl

Naštěpený protein (jak bylo určeno z analýzy SDS-PAGE nebo N-koncovým sekvencováním) byl nanesen na 1 ml Ni-chelátovou kolonu ekvilibrovanou PBS. Bylo sbíráno vše.

Proteklý pufr z aplikace byl uložen pro pozdější analýzu. Kolona byla eluována přidáním 3 CV PBS, byly sbírány frakce 0,5 ml. Kolona byl opláchnuta promytím 2 CV 0,5M imidazolu a frakce byly uloženy pro analýzu.

Všechny frakce byly testovány SDS-PAGE a frakce obsahující IL5 byly sloučeny a A<sub>280</sub> byla měřena s použitím PBS jako referenční hodnoty. Nakonec byl protein koncentrován

s použitím koncentračního zařízení Vivaspin dokud nebylo dosaženo koncentrace 1 mg/ml.

Odstranění značky His bylo prováděno v pokusech v malém měřítku (0,1-1 mg) a měřítko nebylo zvětšováno. Je nutné poznamenat, že odstranění značky vyžaduje odblokovaný a nemodifikovaný N-konec.

Protein značený His byl inkubován s dvěma enzymy, dipeptidylaminopeptidázou, která odstranila najednou dvě aminokyseliny a cyklotransferázou glutamové kyseliny, která katalyzuje konverzi glutamové kyseliny na pyroglutamovou kyselinu. Tato konverze dále blokuje degradaci dipeptidylaminopeptidázy. Štěpená směs pak byla filtrována přes chelátovou kolonu, která by měla zadržet enzymy (které jsou značeny Hisged), kontaminující proteiny vazbou ke koloně a nedegradovaný nebo částečně degradovaný protein. Protein zbavený značení prochází kolonou a byl sbírán v proteklém pufru. Po druhém štěpení s enzymem, který odstranil pyroglutamovou kyselinu, byl protein opět filtrován přes chelátovou kolonu, aby se odstranil druhý enzym. Očekává se, že v tomto konečném stadiu je nutné protein opět koncentrovat.

Obecná zjištění:

pI UniHis-IL5wt bylo 9,5 a optimální hodnota pH pro protein byla 6,5 až 7,0 (nebylo důkladně zkoumáno). Koncentrace NaCl 400 mM stabilizuje protein během koncentrace.

Příklad 15

*In vitro* screening

Primární *in vitro* screening je ve formě enzymatického imunotestu (ELISA): kompetitivní ELISA pro divoký typ IL5

poskytuje zjištění přítomnosti relevantních epitopů B lymfocytu v modifikovaných IL5 konstruktech před jejich zavedením do zvířat.

Pro měření titrů autoprotilátek v séru očkovaných zvířat může být použit obvyklý test ELISA. Prottilátky (jak monospecifické, tak monoklonální) proti lidskému, a také proti myšimu IL5 jsou komerčně dostupné od firmy R&D Systems, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA.

Biologická aktivita produktu a/nebo neutralizační kapacita indukovaných autoprotilátek může být testována v IL5 biologickém testu. Dříve publikované příklady takových biologických testů jsou: vyhodnocení IL5 indukované proliferace TF1 buněk (pro lidské IL5) a vyhodnocení IL5 indukované proliferace BCL1 buněk nebo B13 B lymfocytů (pro myšičí IL5) (Callard & Gearing 1994, Dickason et al., 1994).

Účinek autovakcíny na vnímavost dýchacích cest může být také testován v *in vitro* testu, kdy byly očkovaným myším odstraněny trachey a umístěny na háček v kyvetě pro orgány. Byla měřena tenze trachey po histaminovém podnětu (van Oosterhout et al., 1995).

Proto, aby bylo možno zjistit biologickou aktivitu vzorků rekombinantního mIL5 (a mIL5 AutoVac) proteinu, byl zaveden buněčný test biologické aktivity pro myšičí IL5. Test je založen na schopnosti lymfomové linie BCL1 pocházející z lymfocytů B proliferovat v reakci na mIL5 přidáný do kultivačního média. Dva odlišné BCL1 klony byly získány z ATCC, BCL1 klon 5B1b (ATCC CRL-1669) a BCL1 klon CW13.20.3B3 (ATCC TIB-197).

V typickém experimentu BCL1 proliferace byly buňky naneseny na misky do kompletního RPMI média doplněného fetálním telecím sérem (FCS) na mikrotitrační destičky a inkubovány se sériovým ředěním myšičího IL5. Proliferace BCL1 buněk byla měřena inkorporací thymidinu značeného tritiem.



Několik optimalizačních experimentů bylo prováděno s použitím sériového ředění zakoupeného rekombinantního mIL5 (R&D Systems) pro stimulaci. Variabilní parametry zahrnují: inkubační intervaly,  $^3\text{H}$ -thymidin pulzní intervaly, počet buněk nanesených na misku na jamku, koncentrace fetálního telecího séra (FCS) a koncentrace přidávaného mIL5. Bylo dosaženo na dávce závislé proliferace BCL1 buněk, přičemž maximální proliferace byla přibližně 3 krát vyšší než pozadí (BCL1 buňky bez přidaného mIL5).

Test BCL1 byl použit pro určení biologické aktivity následujících vzorků exprimovaných  $S_2$  buňkami *Drosophila* a purifikových tak, jak bylo popsáno výše: HIS-mIL5wt materiál (E1320), HIS-mIL5wt materiál (E1422), HIS-mIL5.1 materiál (E1396) a "S<sub>2</sub> preparát pozadí" (E0016). Proliferace v reakci na jeden HIS-mIL5wt (E1320) preparát byla významně vyšší než proliferace v reakci na „S<sub>2</sub> preparát pozadí“, zatímco varianta mIL5.1 a jeden preparát divokého typu (E1422) byly určeny jako biologicky inaktivní.

Stále pokračující práce zahrnuje inhibici BCL1 proliferace s anti-mIL5 a pro optimalizační studie byla použita anti-mIL5 monoklonální protilátka TRFK5. Cílem bylo použít tento test pro určení schopnosti anti-mIL5 antiséra z imunizovaných myší inhibovat biologickou aktivitu mIL5.

#### Příklad 16

##### *In vivo* modely

Pro měření účinku autovakcíny *in vivo* existují známé zvířecí modely astmatu. Normálně je zvíře senzibilizováno sloučeninou (alergen/antigen) a po podnětu sloučeninou ve formě aerosolu je měřena bronchokonstrikce (vodivost

dýchacích cest) s použitím tělesného pletysmografu. Jsou také zjišťovány počty eosinofilů v tekutině BAL.

Několik studií zkoumajících účinek anti-IL5 mAb byly úspěšně prováděny na myších. Proti použití myšího modelu je fakt, že IL5 působí jako růstový faktor pro B lymfocyty, což poskytuje možnost interference s myší protilátkovou reakcí. Ale jak bylo ukázáno ve studii s použitím IL5 knock-out myší, protilátková reakce závislá na T lymfocytech proti ovalbuminu, a také rozvoj cytotoxických T lymfocytů se jeví normální (Kopf et al., 1996). Protože myš je také nejpraktičtější a nejekonomičtější model ve srovnání s morčaty nebo opicemi, bude použit model astmatu/přecitlivělosti dýchacích cest myší Bal/c senzibilizovaných ovalbuminem, jak byl použit autory Hamelman et al. (1997).

Jestliže se ale účinek IL5 na B lymfocyty v myším modelu ukáže problematickým, budou použity jiné vhodné zvířecí modely v oboru známé.

#### Příklad 17

Příprava DNA konstruktů kódujících myší IL5 a jeho varianty

Konstrukce varianty v pcDNA3.1+:

Inzerce epitopů P2 a P30 do mIL5 divokého typu byla provedena SOE-PCR s překrývajícími se primery obsahujícími sekvence epitopů. Gen mIL5 divokého typu obsahující vedoucí sekvenci (sekv. id. č. 63), klonovaný do pcDNA3.1+ s kanonickou Kozakovou sekvencí (za získání plazmidu p815), byl použit jako templát pro reakce PCR. Výsledné fragmenty byly štěpeny s NheI a NotI, purifikovány a klonovány do p815 byly použity jako templát pro PCR.

Klonování variant do pMT *Drosophila* vektoru s BiP vedoucí sekvencí a značkou UNI-His:

mIL5 divokého typu byl klonován do série pMT *Drosophila* expresních vektorů (Invitrogen) vytvořením PCR fragmentu s mIL5 specifickými primery obsahujícími vhodná restrikční místa a, kromě toho, obsahujícími sekvence kódující *Drosophila* sekvenci podobnou Kozakově, následovanou *Drosophila* BiP vedoucí sekvencí, následovanou sekvencí kódující značku UNI-His (sekv. id. č. 25) fúzovanou k 5' konci sekvence kódující zralý mIL5. Jako templát byla použita cDNA sekvence mIL5 divokého typu. Výsledný fragment byl štěpen EcoRI a NotI a byl pak klonován do vektoru pMT/V5-HisA (Invitrogen). Výsledný plazmid (p818) byl použit pro klonování variant obsahujících epitop do pMT. Ty byly klonovány štěpením variant vytvořených v pcDNA3.1+ se SacI a NotI a klonováním výsledných fragmentů do p818.

Klonování variant do pAC5:

mIL5 divokého typu a varianty mIL5 byly klonovány do pAC5 konstitutivního *Drosophila* expresního vektoru štěpením variant v pMT s EcoRI a NotI a klonováním výsledných fragmentů do vektoru pAC5.1/V5-HisA (Invitrogen).

#### Příklad 18

Příprava DNA konstruktů kódujících humánní IL5 a jeho varianty

Bylo uvažováno pět linií plazmidů obsahujících nemodifikovaný IL5 a všechny nebo některé z devíti IL5 variant. Linie zahrnují: 1) humánní IL5 pro DNA vakcinaci ve vektoru pCI vhodném pro expresi v humánních buňkách, 2) humánní IL5 s BiP vedoucí sekvencí a 15 aa značkou His (sekv.

id. č. 25, získaná od firmy UNIZYME v Hørsholm, Dánsko, značka je v tomto textu nazvána "UNI" nebo " značka UNI-His") ve vektor pMT/V5/HIS pro indukovatelnou expresi v *Drosophila*, 3) jako v bodu 2, ale bez značky His, 4) jako v bodu 3, ale s myším IL5 a 5) humánní IL5 s DAPI vedoucí sekvencí a 15 aa značka HIS ve vektoru pVL1393 pro expresi v bakulovirovém systému.

Plazmidy pro DNA vakcinaci ve vektoru pCI:

Název	Ref. č.	Kmen č.	Epitop
hIL5 (pCI)	p888	MR č. 1237	žádný
hIL5.1 (pCI)	p889	MR č. 1238	P2, klička 3
hIL5.2 (pCI)	p890	MR č. 1239	P30, klička 1
hIL5.3 (pCI)	p891	MR č. 1240	P30, klička 2
hIL5.4 (pCI)	p892	MR č. 1241	P2, klička 2
hIL5.5 (pCI)	p893	MR č. 1242	P2, klička 1
hIL5.6 (pCI)	p894	MR č. 1243	P2, klička 3
hIL5.7 (pCI)	p895	MR č. 1244	P30, klička 3
hIL5.12 (pCI)	p896	MR č. 1245	P30, klička 3
hIL5.13 (pCI)	p897	MR č. 1246	P2 a P30, klička 3

Plazmidy pro expresi humánního IL5 v *Drosophila* se značkou UNI-His a BiP vedoucí sekvencí v pMT/V5/HIS:

Název	Ref. č.	Kmen č.	Epitop
hIL5m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p899	MR č. 1247	žádný
hIL5.1m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p900	MR č. 1248	P2, klička 3
hIL5.2m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p901	MR č. 1249	P30, klička 1
hIL5.3m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p929	MR č. 1277	P30, klička 2

hIL5.4m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p902	MR č. 1250 P2, klička 2
hIL5.5m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p903	MR č. 1251 P2, klička 1
hIL5.6m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p904	MR č. 1252 P2, klička 3
hIL5.7m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p905	MR č. 1253 P30, klička 3
hIL5.12m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p906	MR č. 1254 P30, klička 3
hIL5.13m-UNI-BiP (pMT/V5-HisA)	p907	MR č. 1255 P2 a P30, klička 3

---

Plazmidy pro expresi humánního IL5 v *Drosophila* s BiP vedoucí sekvencí, ale bez značky UNI-His v pMT/V5/HIS:

Název	Ref. č.	Kmen č.	Epitop
hIL5m-BiP (pMT/V5-HisA)	p908	MR č. 1256	žádný
hIL5.1m-BiP (pMT/V5-HisA)	p909	MR č. 1257	P2, klička 3
hIL5.2m-BiP (pMT/V5-HisA)	p921	MR č. 1269	P30, klička 1
hIL5.3m-BiP (pMT/V5-HisA)	p922	MR č. 1270	P30, klička 2
hIL5.4m-BiP (pMT/V5-HisA)	p923	MR č. 1271	P2, klička 2
hIL5.5m-BiP (pMT/V5-HisA)	p924	MR č. 1272	P2, klička 1
hIL5.6m-BiP (pMT/V5-HisA)	p925	MR č. 1273	P2, klička 3
hIL5.7m-BiP (pMT/V5-HisA)	p926	MR č. 1274	P30, klička 3
hIL5.12m-BiP (pMT/V5-HisA)	p927	MR č. 1275	P30, klička 3
hIL5.13m-BiP (pMT/V5-HisA)	p928	MR č. 1276	P2 a P30, klička 3

---

Plazmidy pro expresi myšního IL5 v *Drosophila* s BiP vedoucí sekvencí, ale bez 15 aa značky His v pMT/V5/HIS:

Název	Ref. č.	Kmen č.	Epitop
mIL5m-BiP (pMT/V5-HisA)	p918	MR č. 1266	žádný
mIL5.1m-BiP (pMT/V5-HisA)	p919	MR č. 1267	P2, klička 3

mIL5.2m-BiP (pMT/V5-HisA)      p920      MR č. 1268 P30, klička 1

---

Plazmidy pro expresi humánního IL-5 v bakulovirovém systému se značkou UNI-His a DAP1 vedoucí sekvencí pVL1393 v pVL1393:

Název	Ref. č.	Kmen č.	Epitop
hIL5m-UNI-DAP1 (pVL1393)	p916	MR č. 1264	žádný
hIL5.1m-UNI-DAP1 (pVL1393)	p917	MR č. 1265	P2, klička 3

#### Příklad 19

##### DNA imunizační studie

Vytvoření vektorů kódujících mIL5wt, mIL5.1 a mIL5.5 s Kozakovými sekvencemi pro pokusy s DNA vakcinací

DNA fragmenty kódující mIL5wt, mIL5.1 a mIL5.5 zahrnující přírodní vedoucí sekvenci (sekv. id. č. 63) byly vloženy do pcDNA3.1, a tak poskytly nové plazmidy p521, 522 a p523. Aby se zvýšila exprese cDNA v savčích buňkách, byly Kozakovy kanonické sekvence vloženy v protisměru od kódujících sekvencí s použitím technologie PCR. PCR reakce byly prováděny s použitím p521, p522 a p523 jako templátů a přímý primer kódující Kozakovu sekvenci hned v protisměru od mIL5 vedoucího startovacího kodonu. Purifikované PCR produkty byly klonovány do vektoru pcDNA3.1+ s použitím restriktivních endonukleáz BamHI a NotI. Výsledné plazmidy p815, p816 a p817, v daném pořadí, byly ověřeny DNA sekvencováním. Všechny další plazmidy použité pro pokusy s DNA vakcinací byly konstruovány s použitím p521 plazmidu jako výchozí látky.

*In vitro* translace DNA vakcinačních plazmidů s použitím soupravy Promega

Komerční souprava používající králičí retikulocytový extrakt k vytvoření *in vitro* translatovaného proteinového produktu plazmidové DNA, byl dříve úspěšně používán v laboratoři původců ke sledování proteinové exprese z pcDNA plazmidu kódujícího např. cDNA ovalbuminu. DNA vakcinační plazmidy s myším IL5 byly přidány k reagensům ze soupravy podle standardního postupu. Ale několik pokusů detekovat exprimovaný mL5 materiál na autoradiogramech selhalo, i když pozitivní kontroly fungovaly. Výsledky z transfekcí COS buněk a DNA vakcinace ukázaly, že byly exprimovány genové produkty, takže původci tyto technické problémy dále nezkoumali.

Přechodná transfekce COS buněk DNA vakcinačními plazmidy pro určení stupně exprese

Aby bylo možné sledovat účinnost transfekce/exprese plazmidů použitých pro DNA vakcinační pokusy, byl zaveden test přechodné transfekce s použitím COS buněk. COS buňky byly ošetřeny trypsinem a naneseny do DMEM média doplněného 10% FCS v kultivačních lahvích T25. Buňky byly transfekovány 2. den s použitím soupravy Dotap (Roche Diagnostics) a sklíženy 5. den. Tkáňový supernatant, lyzát z celých buněk a preparáty bohaté na membrány byly testovány metodou Western blotování, aby se detekoval anti-mIL5 reaktivní expresní produkt. Anti-mIL5 reaktivní produkt v buněčných preparátech se shodně pohyboval jako 2 až 3 oddělené pásy o velikosti 21 až 28 kD při SDS-PAGE, zatímco molekulová hmotnost (MW) mL5 monomeru použitého jako standard (exprimovaný v bakuloviru, R&D Systems) je pouze 15 až 18 kD. Při použití nedenačních podmínek tvořily látky o velikosti 21 až 28 kD dimery, takže původci mají za to, že látka byla mL5,

možná v několika odlišně glykosylovaných formách. Výsledky DNA vakcinace (viz níže) jasně podporují tento závěr.

DNA vakcinace myši s použitím myších konstruktů IL5 AutoVac

Byla prováděna DNA vakcinační studie, aby se vyšetřilo, zda protilátkové reakce specifické pro myši IL5 mohou být indukovány imunizací myši nahou plazmidovou DNA kódující 8 odlišných myši IL5 mutant. Protože dříve bylo publikováno, že IL5 má úlohu v diferenciaci B buněk, bylo nezbytné prokázat, že anti-mIL5 autoprotilátky mohou být tvořeny v myších a tolerance B buněk na mIL5 může být porušena.

Obecné dispozice DNA vakcinačních pokusů používají buď myši C3H/Hen (H-2<sup>k</sup>) nebo myši Balb/cA (H-2<sup>d</sup>), 6 až 8 týdnů staré, rozdělené do skupin po 5 myších. Ve dnech 0, 14, 28, 42, 62 a 76 byla myším podána anestezie používající hypnorm/dormicum s.c. a byla jim podána injekce s expresními plazmidy kódujícími ovalbumin (kontroly), mIL5wt (divoký typ) nebo testované mIL5 varianty. DNA materiál byl připraven s použitím souprav bez endonukleáz Endofree GigaPrep (Qiagen) a rozpuštěn v koncentraci 1 µg/ml v 0,15M NaCl nebo 0,15M NaCl obsahující 0,1% roztok přípravku bupivacain. 100 µl látky bylo injikováno i.d. každé myši do dolní části hřbetu rozděleno do dvou injekčních míst. Předběžné vzorky krve byly získány minus 2. den a vzorky krve v testu byly získávány v týdnech 3, 5, 8 a 11. Séra byla izolována centrifugací a uložena v -20°C až do testování metodou ELISA na reaktivitu proti purifikovanému ovalbuminu a proteinům mIL5.

Typický výsledek DNA vakcinačního pokusu je ukázán na obr. 4. Podle obecných dispozic popsaných výše bylo 40 myši Balb/cA imunizováno kontrolním plazmidem s ovalbuminem, plazmidem kódujícím mIL5wt nebo plazmidy kódující mIL5 AutoVac varianty mIL5.1 nebo mIL5.5. V tomto experimentu 9 z 9 myši imunizovaných plazmidem kódujícím ovalbumin vytvořilo



protilátky proti ovalbuminu, zatímco u myší, které dostaly DNA kódující mIL5 divokého typu nebo mIL5 variantu, nebyla indukována žádná reakce proti ovalbuminu. Injekce plazmidu kódujícího mIL5wt nevyvolala anti-mIL5 reakci, zatímco tolerance B buněk na mIL5 byla porušena u 4 z 10 myší imunizovaných plazmidem mIL5.1 a u 7 z 9 myší imunizovaných plazmidovou DNA kódující mIL5.5.

Podstatný výsledek celých sérií DNA vakcinačních pokusů je shrnut v tabulce uvedené níže. Počet reagujících jedinců v imunizační skupině byl odlišný mezi různými konstrukty mIL5 AutoVac a byl závislý na kmenu myší. Konstrukt mIL5.2 AutoVac byl zřetelně lepší než další varianty, byl schopen indukovat anti-mIL5 protilátkovou reakci u obou kmenů myší s penetrancí 100 %. Tento plazmid (p820) také měl nejvyšší stupeň exprese v COS transfekčním testu.

Dalším příkladem ke zdůraznění byla jasná MHC restrikce pozorovaná při použití plazmidové DNA kódující mIL5.4 jako imunogenu. Zatímco pouze 1/10 myší C3H/Hen odpovídá na DNA vakcínu, reagovalo 9 z 10 myší Balb/cA. Opačný jev (i když ne tak zřetelný) byl pozorován u konstruktu mIL5.6. DNA vakcína mIL5.2 se ale zdála být imunogenní všeobecně.

	OVAwt-pVax	mIL5wt- pcDNA	mIL5.1- pcDNA	mIL5.2- pcDNA	mIL5.9- pcDNA
Balb/cA	28/28	0/28	4/10	9/10	9/10
C3H/Hen	29/29	0/30	3/10	10/10	1/10
	mIL5.5- pcDNA	mIL5.6- pcDNA	mIL5.7- pcDNA	mIL5.12- pcDNA	mIL5.13- pcDNA
Balb/cA	7/9	0/10	2/10	0/10	0/10*
C3H/Hen	5/10	6/10	2/10	2/10	2/10*

Souhrn výsledků DNA vakcinace 280 myší. 6 myší zemřelo v průběhu pokusu z důvodů nesouvisejících s účinky DNA očkování. Počet reagujících jedinců (s vysokými nebo středními anti-mIL5 titry) je ukázán ve vztahu k celkovému počtu myší v každé imunizační skupině. \*) vzorky krve získány v den 55. Všechny další vzorky krve byly získány v den 77.

Další vlastností stojící za zmínku byla tendence mIL5 variant s cizorodým epitopem pomocného T lymfocytu vloženým do mIL5 kličky 1 k tomu, že byly silnější DNA vakcinační imunogeny, než varianty s epitopem pomocného T lymfocytu vloženým v kličce 3. To by mohlo být způsobeno relativně vysokým stupněm exprese. Jediná testovaná varianta kličky 2, mIL5.4-pcDNA, byl silným imunogenem pouze pro kmen Balb/cA, jak bylo uvedeno výše.

Další charakterizace protilátkových reakcí indukovaných DNA očkováním

Experimenty s testem ELISA byly nastaveny tak, aby se určilo, zda by mohly být protilátky specifické pro vložený epitop pomocného T lymfocytu detekovány u anti-mIL5 pozitivních myší. V každé imunizační skupině byla sloučena séra z anti-mIL5 pozitivních myší a testována na reaktivitu proti P2 nebo P30 peptidům, které byly imobilizovány na AquaBind mikrotitrační destičky. Antiséra indukovaná DNA vakcinací proti mIL5.2 u obou myších kmenů nepochybně obsahovala reaktivitu proti vloženému P30, zatímco žádná další antiséra nebyla s P2 nebo P30 reaktivní. To bylo pravděpodobně spojeno s vyššími protilátkovými titry a penetrancí, což bylo obecně pozorováno u mIL5.2 DNA vakcinačního konstruktů. Je nutné se zmínit, že s použitím tohoto nastavení testu ELISA byli původci schopni detekovat anti-P2 reaktivitu v antiséru indukovanou proti mIL5.1.

Pozitivní anti-mIL5 sloučené antisérum z DNA očkovaných myší bylo také testováno v kompetitivním testu ELISA na svou schopnost inhibovat interakci mezi rozpustným nativním myším IL5 a monoklonálními protilátkami TRFK4 nebo TRFK5, což jsou obě neutralizační protilátky. Sériová ředění anti-mIL5 sloučených antisér byla preinkubována s rozpustným nativním mIL5 a vzorek byl přidán k ELISA destičkám potaženým záchytnou protilátkou TRFK5. Navázaný myší IL5 (který nebyl absorbován antisérem) byl dále vizualizován s použitím vrstvy biotinylovaného TRFK4, a pak streptavidinu značeného křenovou peroxidázou. Ne všechna anti-mIL5 pozitivní antiséra indukovaná DNA vakcinací mohla inhibovat interakci mezi rozpustným mIL5 a TRFK4 nebo TRFK5. Antisérum s nejvyšší TRFK9/5 inhibiční schopností bylo z myší C3H/Hen imunizovaných DNA kódující mIL5.2. Nebylo testováno, zda pozorované rozdíly v inhibici byly přímo úměrné titračním rozdílům nebo byly spojeny s jemnou specifičností různých antisér. Nejpravděpodobněji to byla kombinace těchto dvou faktorů.

Zvířecí model eosinofilie u myší imunizovaných mIL5 AutoVac DNA

40 DNA očkovaných myší bylo vybráno pro testování ve zvířecím modelu eosinofilie: 10 myší Balb/cA imunizovaných DNA mIL5wt, 10 myší Balb/cA imunizovaných DNA mIL5.2, 10 myší C3H/Hen imunizovaných DNA mIL5wt a 10 myší C3H/Hen imunizovaných DNA mIL5.2. každé z těchto myší byl podáván senzibilizační/podnětový režim s ovalbuminem, aby se indukovala eosinofilie. Myši byly senzibilizovány subkutánními injekcemi 50  $\mu$ g ovalbuminu (OVA) v 0,9% fyziologickém roztoku smíchaném v poměru 1:1 s Adjuphos jednou týdně po tři týdny. Čtyři dny po poslední OVA senzibilizaci byly myši podněcovány intranazálně s 12,5  $\mu$ g

OVA v 0,9% fyziologickém roztoku každý druhý den do celkového počtu 3 podnětů. Tekutina z bronchoalveolární laváže (BALF) byla sbírána jeden den po poslední senzibilizaci kanylací trachey a promytím lumina dýchacích cest s 1 ml PBS.

Přibližně 30 000-60 000 buněk BALF bylo stočeno na podložních sklíčkách v 1500 rpm po dobu 20 minut. Sklíčka byla usušena přes noc a barvena 2,5 minuty s May-Grunwaldovým barvivem (Sigma), promývána 4 minuty ve fyziologickém roztoku pufrovaném trisem, barvena 20-30 minut s Geimsovým barvivem (1:20 s ddH<sub>2</sub>O, Sigma) a krátce opláchnuta ddH<sub>2</sub>O. Obarvená sklíčka byla sušena přes noc a typy buněk byly identifikovány s použitím světelného mikroskopu. Na každém sklíčku bylo počítáno přibližně 100 až 200 buněk a pro každou myš byla počítána 3 sklíčka. Počty eosinofilů byly vyjádřeny jako počet eosinofilů na 100 počítaných buněk. U myši C3H/Hen očkovaných DNA mIL5.2 byla indukce plicní eosinofilie významně down-regulována ve srovnání se skupinou očkovanou DNA mIL5wt divokého typu (mIL5.2 DNA: 14,6 ± 8,9 eosinofilů na 100 buněk, mIL5wt DNA: 51,1 ± 9,9 eosinofilů na 100 buněk). Ale u kmene Balb/cA nebyl žádný významný rozdíl v počtech eosinofilů mezi imunizačními skupinami (mIL5.2 DNA: 23,3 ± 6,8 eosinofilů na 100 buněk, mIL5wt DNA: 27,7 ± 9,3 eosinofilů na 100 buněk). Možné vysvětlení je, že myši Balb/cA jsou na model pouze slabě citlivé. To bylo podporováno daty z testu anti-ovalbumin ELISA, ukazujícími, že jeden týden před odběrem BALF byly anti-ovalbuminové titry v séru myši Balb/cA nižší než v séru myši C3H/Hen. Bylo publikováno, že podkmen Balb/cJ je citlivý v modelu OVA senzibilizace/podnět.

## Příklad 20

## Studie vakcinace proteinem

Myši Balb/c J byly imunizovány myším IL5 (mIL5) proteinem a podrobeny modelu s intranazálním podáním ovalbuminu, který indukuje eosinofily v plicích ošetřených myší. Oba UniHis-mIL5 a UniHis-mIL5.1 proteiny indukovaly protilátky, které zkříženě reagovaly s mIL-5 tvořeným v buňkách sf9 od firmy R&D Systems. Model eosinofilie indukoval vysoké počty eosinofilů v OVA kontrolní skupině a UniHis-mIL5.1 skupině, zatímco počty eosinofilů byly redukovány jak v PBS skupině, tak v UniHis-mIL5 skupině. Tento výsledek vedl původce k tomu, že měli za to, že mohly být sloučeny.

## Materiál a metody

UniHis-mIL-5	E1320 a E01397
UniHis-mIL-5.1	E01337 a E01396

## Imunizace

6-8 týdnů staré samice myši Balb/c J (M&B) byly imunizovány buď s 1) ničím, 2) PBS, 3) UniHis-mIL5 nebo 4) UniHis-mIL5.1 v kompletním Freundově adjuvans (CFA, Sigma) a upomínány 3 krát v intervalech tří týdnů antigenem v nekompletním Freundově adjuvans (IFA, Sigma). Séra byla sbírána a testována testem ELISA 10 dnů po každé upomínací dávce.

## Testy ELISA

## Anti-UniHis-mIL5 ELISA

Séra byly získána 32. den (krevní vzorek 1) a 54. den (krevní vzorek 2) po 2 a 3 imunizacích, v daném pořadí. Polystyrenové mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc) byly

potaženy purifikovaným HIS-mIL5wt (0,1 µg/jamku, E1320). Reaktivity naředěných sér přidávaných do jamek byly vizualizovány s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky. Hodnoty odečítání OD490 kontrolních sér z myší imunizovaných PBS ve Freundově adjuvans byly subtrahovány od hodnot odečítání OD490 testovaných vzorků.

#### Anti-mIL5 ELISA

Séra byla získána 75. den (krevní vzorek 3). Polystyrénové mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc) byly potaženy se zakoupeným mIL5 (0,1 µg/jamku, R&D kat. č. 405-ML). Reaktivity 1:1000 naředěných sér přidávaných do jamek byly vizualizovány s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky. Reaktivita TRFK5 (2 µg/ml) byla vizualizována s použitím králičí anti-potkaní sekundární protilátky.

#### Kompetitivní ELISA

Ředění antisér byla preinkubována s rozpustným IL5 po dobu 1 hodiny a přidána na polystyrénové mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc), které byly potaženy se záchytnou protilátkou TRFK5. Navázaný mIL5 byl vizualizován s použitím biotinylované TRFK4 a kozí anti-myší sekundární protilátky značené HRP.

#### Anti-P2 ELISA

Sloučená antiséra z HIS-mIL5wt, HIS-mIL5.1 nebo PBS imunizovaných myší byla testována na reaktivitu proti P2 peptidu v testu ELISA. Specializované mikrotitrační destičky (AquaBind, M&E Biotech) byly potaženy s 0,5 µg/jamku syntetického P2 peptidu. Reaktivity naředěných sér přidávaných do jamek byly vizualizovány s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky značené HRP (1:2000, Dako).

#### Anti-UniHis ELISA

Sloučená antiséra z HIS-mIL5wt, HIS-mIL5.1 nebo PBS imunizovaných myší byla testována na reaktivitu proti peptidu se značkou HIS (UNIZYME) v testu ELISA. Specializované mikrotitrační destičky (AquaBind, M&E Biotech) byly potaženy s 0,5 µg/jamku syntetického peptidu se značkou HIS. Reaktivity naředěných sér přidávaných do jamek byly vizualizovány s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky značené HRP (1:2000, Dako).

#### Anti-S<sub>2</sub> protein pozadí ELISA

Sloučená antiséra z HIS-mIL5wt, HIS-mIL5.1 nebo PBS imunizovaných myší byla testována na reaktivitu proti preparátu S<sub>2</sub> pozadí v testu ELISA. Polystyrénové mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc) byly potaženy s 0,1 µg/jamku preparátu S<sub>2</sub> pozadí. Reaktivity naředěných sér přidávaných do jamek byly vizualizovány s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky značené HRP (1:2000, Dako).

#### Anti-BSA ELISA

Sloučená antiséra z HIS-mIL5wt, HIS-mIL5.1 nebo PBS imunizovaných myší byla testována na reaktivitu proti BSA v testu ELISA. Polystyrénové mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc) byly potaženy s 10 µg/jamku BSA (Intergen). Reaktivity naředěných sér přidávaných do jamek byly vizualizovány s použitím kozí anti-myší sekundární protilátky značené HRP (1:2000, Dako).

#### Model eosinofilie

Myši Balb/c J byly senzibilizovány subkutánními injekcemi 50 µg ovalbuminu (OVA) v 0,9% fyziologickém roztoku smíchaném v poměru 1:1 s Adjuvophos jako alumovým adjuvanciem.

OVA imunizace byly opakovány jednou týdně po dobu čtyř týdnů. Jeden týden po poslední OVA senzibilizaci byly myši podněcovány s 12,5  $\mu\text{g}$  OVA v 0,9% fyziologickém roztoku intranazálně každý druhý den do celkového počtu 3 podnětů. Tekutina z bronchoalveolární laváže (BALF) byla sbírána jeden den po poslední senzibilizaci kanylací trachey a promytím lumina dýchacích cest s 1 ml 0,9% fyziologického roztoku nebo PBS.

#### BAL značení

Přibližně 30 000-60 000 buněk BALF bylo stočeno na podložních sklíčkách v 1500 rpm po dobu 20 minut. Sklíčka byla usušena přes noc a barvena 2,5 minuty s May-Grunwaldovým barvivem (Sigma), promývána 4 minuty v TBS, barvena 20-30 minut s Geimsovým barvivem (1:20 s ddH<sub>2</sub>O, Sigma) a krátce opláchnuta ddH<sub>2</sub>O. Obarvená sklíčka byla sušena přes noc a typy buněk byly identifikovány s použitím světelného mikroskopu. Na každém sklíčku bylo počítáno přibližně 100 až 200 buněk a pro každou myš byla počítána 3 sklíčka.

#### Výsledky

##### Detekce anti-mIL5 protilátek

Byla prováděna série experimentů ELISA, aby se zkoumalo, zda protilátkové reakce specifické pro myši IL5 byly indukovány u myši imunizovaných s proteiny HIS-mIL5wt a HIS-mIL5.1. Zprv bylo zjišťováno, zda protilátky proti HIS-mIL5wt imunizačnímu materiálu byly vyvolány testováním ředění antisér z jednotlivých myši na destičkách ELISA potažených s materiálem HIS-mIL5wt. Bylo zjištěno, že již v prvním krevním vzorku vyvinuly všechny myši protilátkovou reakci s vysokými titry proti HIS-mIL5wt (E1320, exprimován



*Drosophila* S<sub>2</sub> buňkami a purifikován), která byla odhadem přibližně z 95 % čistá.

Tento výsledek není pevným potvrzením toho, že antiséra zkříženě reagují s myším IL5. Při těchto dispozicích mohla být také detekována reaktivita proti nečistotám z *Drosophila* S<sub>2</sub> buněk, S<sub>2</sub> médiu (které obsahuje např. BSA z fetálního telecího séra, značku HIS, a také denaturované mIL5 epitopy B lymfocytů). Aby se prokázalo, že indukované protilátky obsahují reaktivity proti nativnímu myšimu IL5, byla séra testována na destičkách ELISA potažených s mIL5 zakoupeným od firmy R&D Systems. Tato látka (R&D kat. č. 405-ML) je biologicky aktivní, neobsahuje žádnou značku HIS, je exprimována v systému bakuloviru Sf21, je také velmi čistá (97 %) a může být zakoupena bez proteinového nosiče (BSA). Sloučená séra z obou imunizačních skupin reagovala s destičkami ELISA potaženými zakoupeným mIL5, zatímco séra z myši imunizovaných PBS nereagovala. To bylo ukázáno při testování sér z krevních vzorků 3 získaných 75. den, 11 dnů po 4. imunizaci, ale také séra z krevního vzorku 1 a 2 reagovala se zakoupeným mIL5 při podobném nastavení testu. Aby se vyloučily signály ze zkřížené reakce s nosičem BSA, byly experimenty opakovány pro krevní vzorky 1 a 2 s použitím verzí bez nosiče zakoupeného mIL5 a pufrů ELISA bez BSA a stále byly pozorovány vysoké reakce anti-mIL5.

Aby se dále potvrdilo, že indukovaná antiséra zkříženě reagují s nativním mIL5, byl sestaven kompetitivní test ELISA. Tento test ELISA testoval schopnost odlišných antisér inhibovat interakci mezi rozpustným nativním myším IL5 a monoklonálními protilátkami TRFK4 nebo TRFK5, které jsou obě neutralizační protilátky. Sériová ředění sloučených antisér byla preinkubována s rozpustným nativním mIL5 a vzorky byly přidány na destičky ELISA potažené zachytnou protilátkou TRFK5. Navázaný myší IL5 (který nebyl absorbován antisérem)

byl dále vizualizován s použitím vrstvy biotinylované TRFK4, a pak streptavidinem značeným křenovou peroxidázou. Jako kontroly bylo zahrnuto anti-mIL5 pozitivní a anti-mIL5 negativní antisérum z DNA očkovaných myší. Bylo prokázáno, že antiséra myší imunizovaných jak HIS-mIL5wt, tak HIS-mIL5.1 mohou inhibovat interakci mezi rozpustným mIL5 a TRFK4 nebo TRFK5.

Na základě výše uvedeného bylo uzavřeno, že mIL5 specifické autoprotilátky byly indukovány u myší imunizovaných buď s HIS-mIL5wt nebo HIS-mIL5.1 proteinovými přípravky (u 100 % testovaných myší). Jinými slovy, tolerance B lymfocytů na mIL5 může být porušena při použití rekombinantních verzí značených HIS jak divokého typu, tak myšího IL5 AutoVac. Pravděpodobné vysvětlení pozorování, že tolerance B lymfocytů je porušena k protein divokého typu je, že značka HIS u těchto myší funguje jako "cizorodý" imunogenní epitop pomocného T lymfocytu. Dalším vysvětlením by mohlo být, že kompletního Freundova adjuvans ruší toleranci B lymfocytů na mIL5. Tyto hypotézy mohou být testovány s použitím antigenů neznačených HIS a/nebo s alternativním méně silným adjuvans, jako je například AdjuPhos.

Další charakterizace protilátkových reakcí u myší imunizovaných s proteiny mIL5 AutoVac

ELISA experimenty byly nastaveny tak, aby určily, zda protilátky specifické pro vložený epitop pomocného T lymfocytu mohou být detekovány v sérech myší imunizovaných proteinem mIL5. Pro každou imunizační skupinu byla sloučena antiséra (krevní vzorek 2) a testována na reaktivitu proti syntetickému P2 peptidu, který byl imobilizován na mikrotitračních destičkách AquaBind. Antisérum anti-HIS-mIL5.1 obsahovalo reaktivitu proti vloženému P2 peptidu,

zatímco ani anti-HIS-mIL5wt nebo anti-PBS/CFA s peptidem nereagovalo.

Bylo také testováno, zda antiséra anti-HIS-mILwt a antiHIS-mIL5.1 obsahovala reaktivitu proti 15-merní značce HIS (UNIZYME značka HIS, sekv. id. č. 25), která byla fúzována k N-koncové části jak divokého typu, tak proteinů mIL5 AutoVac. Peptid byl syntetizován a kovalentně imobilizován na mikrotitrační destičky AquaBind a sloučená antiséra z každé imunizační skupiny (krevní vzorky 1, 2 a 3) byla testována na reaktivitu proti navázanému peptidu. Antiséra ze všech myší imunizovaných proteinem reagovala se syntetickým peptidem se značkou HIS.

Bylo také testováno, zda antiséra anti-HIS-mIL5wt a anti-HIS-mIL5.1 byla reaktivní se složkami  $S_2$  *Drosophila* buněk nebo kultivačního média. Destičky ELISA potažené BSA (hlavní složka média) nebo preparátem  $S_2$  pozadí (vytvořeným podrobením kultivačního supernatantu z Her2 exprimujících *Drosophila*  $S_2$  buněk purifikačním schématu podobnému mIL5 purifikačnímu postupu). Výsledky těchto analýz prokázaly, že zatímco anti-BSA reakce byly velmi nízké, reakce s materiálem  $S_2$  pozadí byly výrazné.

#### Počty eosinofilů v BALF

Aby se určilo, zda protilátky anti-IL5 u očkovaných myší mohou down-regulovat *in vivo* aktivitu IL5, indukovali původci eosinofilii závislou na IL5 v plicích očkovaných myší. Eosinofily byly indukovány podněcováním senzibilizovaných myší intranazálně s OVA. Vysoké počty eosinofilů byly indukovány u kontrolních OVA myší a myší očkovaných s UniHis-mIL5.1, ale ne u myší očkovaných Uni-His-mIL5 nebo PBS. Neshoda počtu eosinofilů mezi kontrolními skupinami (OVA a PBS) a experimentálními skupinami (UniHis-mIL5 a UniHis-mIL5.1), a pozitivní výsledky od DNA očkovaných myší uvedené

výše vedly původce k tomu, že skupiny mohly být zaměněny. Ale žádné pokusy k průkazu záměny nepodpořily tuto interpretaci. Očkování proteiny byly opakovány v identickém nastavení, aby se tato neshoda objasnila.

#### Diskuse

Schopnost obou proteinů UniHis-mIL5 a UniHis-mIL5.1 indukovat protilátky, které zkříženě reagují s myším IL5 divokého typu byla jasně prokázána. Zdali schopnost proteinu UniHis-mIL5 obejít imunologickou toleranci byla způsobena značkou UniHis nebo z některého dalšího důvodu (např. CFA adjuvans) zbývá ověřit. Je překvapivé pozorovat, že pouze konstrukt UniHis-mIL5 byl schopen down-regulovat endogenní *in vivo* aktivitu mIL5 v modelu eosinofilie. Tato neschopnost antiséra vytvořeného při vakcinaci proteinem UniHis-mIL5.1 inhibovat eosinofilii a jeho schopnost inhibovat eosinofilii prostřednictvím DNA očkování svědčí pro to, že se v tomto pokuse mohla objevit technická chyba. To by také podporovalo neobvyklé zjištění, že vakcinace PBS inhibovala eosinofilii. Nejpravděpodobnější vysvětlení je, že tyto dvě skupiny (PBS a UniHis-mIL5.1) byly prohozeny.

#### Seznam literatury

- Akutsu I. Et al., 1995, Immunol. Lett., 45, 109-116.
- Alexander A.G. Et al., 1994, Thorax, 49(12), 1231-1233.
- Azuma C. Et al., 1986, Nucleic Acid Res. 1986, 14(22), 9149-9158.
- Barata L.T. Et al., 1998, J. Alergy and Clin. Immunol, 101, 222-230.
- Baumann M.A. Et al., 1997, Methods, 11, 88-97

- Callard R.E. & Gearing A.J.H., 'IL-5', Cytokine Facts Book 1994, Academic Press.
- Campbell H.D. Et al., 1988, Eur. J. Biochem., 174, 345-352.
- Chand N. Et al., 1992, Eur. J. Immunol., 211, 121-123.
- Coeffier E. Et al., 1994, Br. J. Pharmacol., 113(3), 749-56.
- Coffman R.L. Et al., 1989, Science, 245, 308-310.
- Corrigan C.J. & Kay A.B., 1996, Eur. Resp. J., 9, suppl. 22, 72s-78s.
- Cousins D.J. Et al., 1994, Am. J. Resp. Crit. Care. Med., 150, S50-S53.
- Danzig M. Et al., 1997, Alergy, 52(8), 787-794.
- Dickason R.R. Et al., 1994, Cytokine, 6(6), 647-656.
- Dickason R.R. Et al., 1996a, Nature, 379, 652-655.
- Dickason R.R. Et al., 1996b, J. Mol. Med., 74(9), 535-546
- Egan R.W. Et al., 1995, Int. Arch. Alergy Immunol., 107, 321-322.
- Foster P.S. Et al., 1996, J. Exp. Med., 183, 195-201.
- Graber P. Et al., 1993, Eur. J. Biochem., 212(3), 751-755.
- Graber P. Et al., 1995, J. Biol. Chem., 270(26), 15762-15769.
- Hamelmann E. Et al., 1997, Am. J. Crit. Care Med., 155(3), 819-825.
- Huston M.M. Et al., 1996, J. Immunol., 156(4), 1392-1401.
- Karlen S. Et al., 1998, Int. Rev. Immunol., 16(3-4), 227-247.
- Kodama S. Et al., 1993, Eur. J. Biochem., 211(3), 903-908.
- Kopf M. Et al., 1996, Immunity, 4, 15-24.
- Kung T.T. Et al., 1995, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 13, 360-365.
- Lee N.A. Et al., 1997a, J. Immunol., 158, 1332-1344.

- Lee J.J. Et al., 1997b, J. Exp. Med. 1997b, 185(12), 2143-2156.
- Lopez A.F. Et al., 1992, Immunology Today, 13, 495-500.
- Mauser P.J. Et al., 1993, Am. Rev. Respir. Dis., 148, 1623-1627.
- Mauser P.J. Et al., 1995, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152(2), 467-472.
- Milburn M.V. Et al., 1993, Nature, 363, 172-176.
- Mori A. Et al., 1997, J. Alergy Clin. Immunol., 100(6) Pt 2, S56-64.
- Moxham J. & Costello J.F., 'Respiratory diseases', kap. 14, Textbook of Medicine, Churchill Livingstone 1990, Ed. Souhami R.L. and Moxham J.
- Nagai H. Et al., 1993a, Ann. N.Y. Acad.Sci., 91-96.
- Nagai H. Et al., 1993b, Life Sciences, 53, PL 243-247.
- Ohashi Y. Et al., 1998, Scand. J. Immunol, 47, 596-602.
- Ortega D. & Busse W.W., 'Asthma, Pathogenesis and treatment', kap. 28, Alergy, W.B. Saunders Company 1997, Ed. Kaplan A.P.
- Proudfoot A.E. Et al., 1990, Biochem J., 270(2), 357-361.
- Proudfoot A.E. Et al., 1996, J. Protein Chem., 15(5), 491-499.
- Rose K. Et al., 1992, Biochem J, 286(Pt 3), 825-828.
- Sanderson C.J., 1992, Blood, 79(12), 3101-3109.
- Sher A. Et al., 1990, J. Immunol., 145, 3911-3916.
- Takatsu K. Et al., Interleukin-5, Growth Factors and Cytokines in Health and Disease 1997, díl 2A, JAI Press Inc., vyd. Leroith D. & Bondy C.
- Tanabe T. Et al., 1987, J. Biol. Chem., 262, 16580-16584.
- Tavernier J. Et al., 1989, DNA, 8(7), 49I-501.

- Tominaga A. Et al., 1990, J. Immunol., 144(4), 1345-1352.
- Tominaga A. Et al., 1991, J. Exp. Med., 173(2), 429-437.
- Underwood D.C. Et al., 1996, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 154, 850-857.
- van Oosterhout A.J.M. Et al., 1993, Am. Rev. Resp. Dis., 147, 548-552.
- van Oosterhout A.J.M. Et al., 1995, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 151, 177-183.
- Villinger F. Et al., 1995, J. Immunol., 155, 3946-3954.
- Wang P. Et al., 1998, J. Immunol., 160, 4427-4432.
- Yamaguchi Y. Et al., 1991, Blood, 78(10), 2542-2547.

SEZNAM SEKVENCÍ

<210> 1  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> Disulfid  
 <222> (44)  
 <223> Meziřetězcová disulfidová vazba k Cys-86 ze sekv. id.  
 č.: 1

<220>  
 <221> Disulfid  
 <222> (86)  
 <223> Meziřetězcová disulfidová vazba k Cys-44 ze sekv. id.  
 č.: 1

<400> 1

Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg  
 20 25 30

Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile  
 35 40 45

Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr  
 50 55 60

Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp  
 65 70 75 80

Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe  
 85 90 95

Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile  
 100 105 110

Ile Glu Ser  
 115

<210> 2  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu



<220>  
 <221> Mutagen  
 <222> (32)..(46)  
 <223> Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

<220>  
 <221> Podobná  
 <222> (1)..(86)  
 <223> Identická se zbytky 1-86 ze sekv. id. č.: 1

<220>  
 <221> Podobná  
 <222> (102)..(126)  
 <223> Identická se zbytky 91-115 ze sekv. id. č.: 1

<400> 2

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

<210> 3  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<220>  
 <223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

<220>  
 <221> Mutagen  
 <222> (32)..(46)

<223> Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

<220>

<221> Podobná

<222> (1)..(31)

<223> Identická se zbytky 1-31 ze sekv. id. č.: 1

<220>

<221> Podobná

<222> (47)..(118)

<223> Identická se zbytky 44-115 ze sekv. id. č.: 1

<400> 3

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

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

<220>

<221> Mutagen

<222> (59)..(73)

<223> Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

<220>

<221> Podobná

<222> (1)..(58)

<223> Identická se zbytky 1-58 ze sekv. id. č.: 1

<220>

<221> Podobná

<222> (74)..(124)

<223> Identická se zbytky 65-115 ze sekv. id. č.: 1

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

<220>

<221> Mutagen

<222> (86)..(100)

<223> Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

<220>

<221> Podobná

<222> (1)..(85)

<223> Identická se zbytky 1-85 ze sekv. id. č.: 1

<220>

- <221> Podobná  
 <222> (101)..(124)  
 <223> Identická se zbytky 90-115 ze sekv. id. č.: 1  
 <400> 5

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

- <210> 6  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence  
 <220>  
 <223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu  
 <220>  
 <221> Mutagen  
 <222> (110)..(124)  
 <223> Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)  
 <220>  
 <221> Podobná  
 <222> (1)..(109)  
 <223> Identická se zbytky 1-109 ze sekv. id. č.: 1  
 <220>  
 <221> Podobná  
 <222> (125)..(126)  
 <223> Identická se zbytky 114-115 ze sekv. id. č.: 1

&lt;400&gt; 6

```

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

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (87)..(107)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(86)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-86 ze sekv. id. č.: 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (108)..(132)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 91-115 ze sekv. id. č.: 1

&lt;400&gt; 7

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

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (32)..(52)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-31 ze sekv. id. č.: 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (53)..(124)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 44-115 ze sekv. id. č.: 1

&lt;400&gt; 8

```

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

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (59)..(79)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(58)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-58 ze sekv. id. č.: 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (80)..(130)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 65-115 ze sekv. id. č.: 1

&lt;400&gt; 9

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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (110)..(130)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(129)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-129 ze sekv. id. č.: 1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (131)..(132)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 114-115 ze sekv. id. č.: 1



&lt;400&gt; 10

```

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

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopy P2 a P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (86)..(100)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (119)..(139)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(85)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-85 ze sekv. id. č.: 1

&lt;220&gt;

<221> Podobná  
 <222> (101)..(118)  
 <223> Identická se zbytky 92-109 ze sekv. id. č.: 1

<220>  
 <221> Podobná  
 <222> (140)..(141)  
 <223> Identická se zbytky 114-115 ze sekv. id. č.: 1

<400> 11

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

<210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> Disulfid  
 <222> (42)  
 <223> Meziřetězcová disulfidová vazba k Cys-84 ze sekv. id. č.: 12

<220>  
 <221> Disulfid  
 <222> (84)  
 <223> Meziřetězcová disulfidová vazba k Cys-42 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 12

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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (85)..(99)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(84)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-84 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (100)..(124)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 89-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 13

```

Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Ala Leu Leu
 1                               5 10 15

Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
                20                25                30

Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
          35                40                45

Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asp Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Met
 50                55                60

Arg Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln
 65                70                75                80

Glu Lys Lys Cys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
                85                90                95

Thr Glu Leu Arg Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe
          100                105                110

Leu Gly Ser Met Asn Thr Ala Ala Ile Ile Glu Gly
    115                120

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myši IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (30)..(44)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-29 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (45)..(116)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 42-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 14

```

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

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (57)..(71)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(56)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-56 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (72)..(122)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 63-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 15

```

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

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (84)..(98)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(83)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-83 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (99)..(122)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 90-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 16

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

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopem P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (108)..(122)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(107)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-107 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (123)..(124)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 112-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 17

```

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

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (85)..(105)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(84)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-84 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (106)..(130)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 89-113 ze sekv. id. č.: 12



&lt;400&gt; 18

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

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (30)..(50)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-29 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (51)..(122)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 42-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 19

```

-----
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Ala Leu Leu
 1          5          10          15

Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Phe Asn Asn
          20          25          30

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
          35          40          45

Leu Glu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asp
          50          55          60

Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Met Arg Leu Phe Gln Asn Leu Ser
 65          70          75          80

Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln Glu Lys Lys Cys Gly Glu Glu
          85          90          95

Arg Arg Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly
          100          105          110

Ser Met Asn Thr Ala Ala Ile Ile Glu Gly
          115          120

```

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (57)..(77)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(56)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-56 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (78)..(128)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 63-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 20

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

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopem P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (108)..(128)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(107)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-107 ze sekv. id. č.: 12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (129)..(130)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 112-113 ze sekv. id. č.: 12

&lt;400&gt; 21

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

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopy P2 a P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (84)..(98)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 23)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutagen

&lt;222&gt; (117)..(137)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu (sekv. id. č.: 24)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Podobná

&lt;222&gt; (1)..(83)

&lt;223&gt; Identická se zbytky 1-83 ze sekv. id. č.: 12

<220>  
 <221> Podobná  
 <222> (99)..(116)  
 <223> Identická se zbytky 90-109 ze sekv. id. č.: 12

<220>  
 <221> Podobná  
 <222> (138)..(139)  
 <223> Identická se zbytky 112-113 ze sekv. id. č.: 12

<400> 22

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

<210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium tetani

<400> 23

Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu
1				5					10					15

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Clostridium tetani

<400> 24

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu  
 20

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<220>

<223> Popis umělé sekvence: DNA kódující značku His

<400> 25

atg aaa cac caa cac caa cat caa cat caa cat caa cat caa caa 45  
 Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Gln  
 1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<400> 26

Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Gln  
 1 5 10 15

<210> 27

<211> 381

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<220>

<221> CDS  
 <222> (1)..(381)

<220>  
 <221> Mutace  
 <222> (262)..(306)  
 <223> Epitop P2 tetanického toxoidu

<220>  
 <221> různé  
 <222> (1)..(261)  
 <223> DNA kódující aminokyseliny 1-87 humánního IL5

<220>  
 <221> různé  
 <222> (307)..(378)  
 <223> DNA kódující aminokyseliny 92-115 humánního IL5

<400> 27

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1             5             10             15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
             20             25             30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
             35             40             45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa act gtg caa ggg ggt act 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
             50             55             60

gtg gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat 240
Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
             65             70             75             80

ggc caa aaa aaa aag tgt gga cag tac atc aag gcc aac tcc aag ttc 288
Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
             85             90             95

atc ggc atc acc gag ctg aga gta aac caa ttc cta gac tat ctg cag 336
Ile Gly Ile Thr Glu Leu Arg Val Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln
             100            105            110

gag ttt ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata ata gaa agt tga 381
Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile Glu Ser
             115            120            125

```

<210> 28  
 <211> 126  
 <212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<400> 28

```

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

```

<210> 29

<211> 375

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<220>

<221> Mutace

<222> (94)..(156)

<223> Epitop P30 tetanického toxoidu

<220>

<221> různé

<222> (1)..(93)



<223> DNA kódující aminokyseliny 1-31 humánního IL5

<220>

<221> různé

<222> (157)..(372)

<223> DNA kódující aminokyseliny 44-115 humánního IL5

<400> 29

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca	48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala	
1 5 10 15	
ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc ttc	96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Phe	
20 25 30	
aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc gtg cct aag gtg agc gcc	144
Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala	
35 40 45	
agc cac ctg gag tgc act gaa gaa atc ttt cag gga ata ggc aca ctc	192
Ser His Leu Glu Cys Thr Glu Glu Ile Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu	
50 55 60	
gag agt caa act gtg caa ggg ggt act gtg gaa aga cta ttc aaa aac	240
Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn	
65 70 75 80	
ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat ggc caa aaa aaa aag tgt gga	288
Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly	
85 90 95	
gaa gaa aga cgg aga gta aac caa ttc cta gac tat ctg cag gag ttt	336
Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe	
100 105 110	
ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata ata gaa agt tga	375
Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile Glu Ser	
115 120	

<210> 30

<211> 124

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 30

```

-----
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1           . 5                10                15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Phe
                20                25                30

Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala
                35                40                45

Ser His Leu Glu Cys Thr Glu Glu Ile Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu
 50                55                60

Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn
 65                70                75                80

Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly
                85                90                95

Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe
                100                105                110

Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile Glu Ser
 115                120

```

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(393)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (175)..(237)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (1)..(174)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 1-58 humánního IL5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (238)..(390)

<223> DNA kódující aminokyseliny 65-115 humánního IL5

<400> 31

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
 20 25 30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
 35 40 45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa ttc aac aac ttc acc gtg 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Phe Asn Asn Phe Thr Val
 50 55 60

agc ttc tgg ctg cgc gtg cct aag gtg agc gcc agc cac ctg gag gtg 240
Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Val
 65 70 75 80

gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat ggc 288
Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Gly
 85 90 95

caa aaa aaa aag tgt gga gaa gaa aga cgg aga gta aac caa ttc cta 336
Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe Leu
 100 105 110

gac tat ctg cag gag ttt ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata ata 384
Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile
 115 120 125

gaa agt tga 393
Glu Ser
 130

```

<210> 32

<211> 130

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<400> 32

```

Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
 20 25 30

```



&lt;400&gt; 33

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1           5           10           15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
      20           25           30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
      35           40           45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa cag tac atc aag gcc aac 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Gln Tyr Ile Lys Ala Asn
      50           55           60

tcc aag ttc atc ggc atc acc gag ctg gtg gaa aga cta ttc aaa aac 240
Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn
      65           70           75           80

ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat ggc caa aaa aaa aag tgt gga 288
Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly
      85           90           95

gaa gaa aga cgg aga gta aac caa ttc cta gac tat ctg cag gag ttt 336
Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe
      100           105           110

ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata ata gaa agt tga 375
Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile Glu Ser
      115           120

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 34

```

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

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(357)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (94)..(138)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (1)..(93)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 1-31 humánního IL5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

<222> (139)..(354)

<223> DNA kódující aminokyseliny 44-115 humánního IL5

<400> 35

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca      48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1                   5                   10                   15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cag      96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Gln
                   20                   25                   30

tac atc aag gcc aac tcc aag ttc atc ggc atc acc gag ctg tgc act      144
Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Thr
                   35                   40                   45

gaa gaa atc ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa act gtg caa      192
Glu Glu Ile Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln
                   50                   55                   60

ggg ggt act gtg gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa      240
Gly Gly Thr Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys
                   65                   70                   75                   80

tac atc gat ggc caa aaa aaa aag tgt gga gaa gaa aga cgg aga gta      288
Tyr Ile Asp Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val
                   85                   90                   95

aac caa ttc cta gac tat ctg cag gag ttt ctt ggt gta atg aac acc      336
Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr
                   100                   105                   110

gag tgg ata ata gaa agt tga                                          357
Glu Trp Ile Ile Glu Ser
                   115

```

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 36

```

Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1                    5                10                15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Gln
                20                25                30

Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Thr
          35                40                45

Glu Glu Ile Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln
 50                55                60

Gly Gly Thr Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys
 65                70                75                80

Tyr Ile Asp Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val
          85                90                95

Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr
          100                105                110

Glu Trp Ile Ile Glu Ser
          115

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 375

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(375)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (256)..(300)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (1)..(255)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 1-85 humánního IL5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (301)..(372)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 92-115 humánního IL5



&lt;400&gt; 37

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1                    5                10              15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
                20                25              30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
                35                40              45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa act gtg caa ggg ggt act 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
                50                55              60

gtg gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat 240
Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
  65                70                75              80

ggc caa aaa aaa aag cag tac atc aag gcc aac tcc aag ttc atc ggc 288
Gly Gln Lys Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
                85                90              95

atc acc gag ctg aga gta aac caa ttc cta gac tat ctg cag gag ttt 336
Ile Thr Glu Leu Arg Val Asn Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe
                100                105              110

ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata ata gaa agt tga 375
Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile Glu Ser
                115                120

```

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 38

```

Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1                    5                10              15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
                20                25              30

Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
                35                40              45

```



&lt;400&gt; 39

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1                    5                10                15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
                20                25                30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
                35                40                45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa act gtg caa ggg ggt act 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
  50                55                60

gtg gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat 240
Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
  65                70                75                80

ggc caa aaa aaa aag tgt gga ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg 288
Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp
                85                90                95

ctg cgc gtg cct aag gtg agc gcc agc cac ctg gag aga gta aac caa 336
Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Val Asn Gln
                100                105                110

ttc cta gac tat ctg cag gag ttt ctt ggt gta atg aac acc gag tgg 384
Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp
                115                120                125

ata ata gaa agt tga 399
Ile Ile Glu Ser
  130

```

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<400> 40

```

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

Ile Ile Glu Ser
          130

```

<210> 41

<211> 393

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(393)

<220>

<221> Mutace

<222> (256)..(318)

<223> Epitop P30 tetanického toxoidu

<220>

<221> různé

<222> (1)..(255)

<223> DNA kódující aminokyseliny 1-85 humánního IL5

<220>

<221> různé

<222> (319)..(390)

<223> DNA kódující aminokyseliny 92-115 humánního IL5

<400> 41

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1                    5                      10                15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
                20                      25                30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
          35                    40                      45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa act gtg caa ggg ggt act 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
 50                    55                      60

gtg gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat 240
Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
 65                    70                      75                80

ggc caa aaa aaa aag ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc 288
Gly Gln Lys Lys Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
                85                      90                95

gtg cct aag gtg agc gcc agc cac ctg gag aga gta aac caa ttc cta 336
Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Val Asn Gln Phe Leu
          100                    105                      110

gac tat ctg cag gag ttt ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata ata 384
Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile Ile
          115                    120                      125

gaa agt tga 393
Glu Ser
 130

```

<210> 42

<211> 130

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 42

```

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

Glu Ser
 130

```

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný substitucí s epitopy tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(444)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (262)..(306)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (307)..(369)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

<221> různé  
 <222> (1)..(261)  
 <223> DNA kódující aminokyseliny 1-87 humánního IL5

<220>  
 <221> různé  
 <222> (370)..(441)  
 <223> DNA kódující aminokyseliny 92-115 humánního IL5

<400> 43

```

atc ccc aca gaa att ccc aca agt gca ttg gtg aaa gag acc ttg gca 48
Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
  1                    5                10                15

ctg ctt tct act cat cga act ctg ctg ata gcc aat gag act ctc cgg 96
Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
                20                25                30

att cct gtt cct gta cat aaa aat cac caa ctg tgc act gaa gaa atc 144
Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
                35                40                45

ttt cag gga ata ggc aca ctc gag agt caa act gtg caa ggg ggt act 192
Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
                50                55                60

gtg gaa aga cta ttc aaa aac ttg tcc tta ata aag aaa tac atc gat 240
Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
                65                70                75                80

ggc caa aaa aaa aag tgt gga cag tac atc aag gcc aac tcc aag ttc 288
Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
                85                90                95

atc ggc atc acc gag ctg ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg 336
Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
                100                105                110

cgc gtg cct aag gtg agc gcc agc cac ctg gag aga gta aac caa ttc 384
Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Val Asn Gln Phe
                115                120                125

cta gac tat ctg cag gag ttt ctt ggt gta atg aac acc gag tgg ata 432
Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile
                130                135                140

ata gaa agt tga 444
Ile Glu Ser
145

```

<210> 44  
 <211> 147  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: humánní IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopy tetanického toxoidu

<400> 44

```

Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
 1                               5                               10                               15

Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
                               20                               25                               30

Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
                               35                               40                               45

Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
 50                               55                               60

Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
 65                               70                               75                               80

Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe
                               85                               90                               95

Ile Gly Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu
                               100                              105                              110

Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Val Asn Gln Phe
 115                              120                              125

Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile
 130                              135                              140

Ile Glu Ser
145

```

<210> 45

<211> 375

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<220>

<221> Mutace

<222> (256)..(300)

<223> Epitop P2 tetanického toxoidu

<220>

<221> různé



<222> (1)..(255)

<223> DNA kódující aminokyseliny 1-85 myšního IL5

<220>

<221> různé

<222> (301)..(375)

<223> DNA kódující aminokyseliny 90-113 myšního IL5

<400> 45

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg	48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu	
1 5 10 15	
tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg agg ctt cct	96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro	
20 25 30	
gtc cct act cat aaa aat cac cag cta tgc att gga gag atc ttt cag	144
Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln	
35 40 45	
ggg cta gac ata ctg aag aat caa act gtc cgt ggg ggt acc gtg gaa	192
Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu	
50 55 60	
atg cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc gat aga caa	240
Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln	
65 70 75 80	
aaa gag aag tgt ggc cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt	288
Lys Glu Lys Cys Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly	
85 90 95	
atc acc gag ctg agg acg agg cag ttc ctg gat tat ctg cag gag ttc	336
Ile Thr Glu Leu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe	
100 105 110	
ctt ggt gtg atg agt aca gag tgg gca atg gaa ggc taa	375
Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly	
115 120	

<210> 46

<211> 124

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 46

```

Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
 1              5              10              15

Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
                20              25              30

Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
          35              40              45

Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu
 50              55              60

Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln
 65              70              75              80

Lys Glu Lys Cys Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly
          85              90              95

Ile Thr Glu Leu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe
 100              105              110

Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly
 115              120

```

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 369

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; (1)..(369)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (88)..(150)

&lt;223&gt; Epitóp P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (1)..(87)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 1-29 myšního IL5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (151)..(366)

<223> DNA kódující aminokyseliny 42-113 myšičí IL5

<400> 47

```

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg   48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
  1           5           10           15

tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg ttc aac aac   96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Phe Asn Asn
          20           25           30

ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc gtg ccc aag gtg agc gcc agc cac   144
Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His
          35           40           45

ctg gag tgc att gga gag atc ttt cag ggg cta gac ata ctg aag aat   192
Leu Glu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn
  50           55           60

caa act gtc cgt ggg ggt acc gtg gaa atg cta ttc caa aac ctg tca   240
Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser
  65           70           75           80

tta ata aag aaa tac atc gat aga caa aaa gag aag tgt ggc gag gag   288
Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln Lys Glu Lys Cys Gly Glu Glu
          85           90           95

aga cgg agg acg agg cag ttc ctg gat tat ctg cag gag ttc ctt ggt   336
Arg Arg Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly
          100           105           110

gtg atg agt aca gag tgg gca atg gaa ggc taa   369
Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly
          115           120

```

<210> 48

<211> 122

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myšičí IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu



&lt;400&gt; 49

```

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg 48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
  1                               5 10 15

tcc.gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg agg ctt cct 96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
                20                25                30

gtc cct act cat aaa aat cac cag cta tgc att gga gag atc ttt cag 144
Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
                35                40                45

ggg cta gac ata ctg aag aat caa ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc 192
Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe
  50                55                60

tgg ctg cgc gtg ccc aag gtg agc gcc agc cac ctg gag gtg gaa atg 240
Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Val Glu Met
  65                70                75                80

cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc gat aga caa aaa 288
Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln Lys
                85                90                95

gag aag tgt ggc gag gag aga cgg agg acg agg cag ttc ctg gat tat 336
Glu Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr
                100                105                110

ctg cag gag ttc ctt ggt gtg atg agt aca gag tgg gca atg gaa ggc 384
Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly
                115                120                125

taa 387

```

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myši IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<400> 50

```

Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
 1           5           10           15

Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
           20           25           30

Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
           35           40           45

Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe
 50           55           60

Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Val Glu Met
 65           70           75           80

Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln Lys
           85           90           95

Glu Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr
           100           105           110

Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly
           115           120           125

```

<210> 51

<211> 351

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: myšší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<220>

<221> Mutace

<222> (88)..(132)

<223> Epitop P2 tetanického toxoidu

<220>

<221> různé

<222> (1)..(87)

<223> DNA kódující aminokyseliny 1-29 myššího IL5

<220>

<221> různé

<222> (133)..(348)

<223> DNA kódující aminokyseliny 42-113 myšičí IL5

<400> 51

```

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg   48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
  1                               5                               10                               15

tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg cag tac atc   96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Gln Tyr Ile
                20                               25                               30

aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg tgc att gga gag   144
Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys Ile Gly Glu
                35                               40                               45

atc ttt cag ggg cta gac ata ctg aag aat caa act gtc cgt ggg ggt   192
Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly
  50                               55                               60

acc gtg gaa atg cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc   240
Thr Val Glu Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile
  65                               70                               75                               80

gat aga caa aaa gag aag tgt ggc gag gag aga cgg agg acg agg cag   288
Asp Arg Gln Lys Glu Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Thr Arg Gln
                85                               90                               95

ttc ctg gat tat ctg cag gag ttc ctt ggt gtg atg agt aca gag tgg   336
Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp
                100                               105                               110

gca atg gaa ggc taa                                           351
Ala Met Glu Gly
  115

```

<210> 52

<211> 116

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myšičí IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu





<223> DNA kódující aminokyseliny 90-113 myšičího IL5

<400> 53

```

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg   48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
  1             5             10             15

tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg agg ctt cct   96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
          20             25             30

gtc cct act cat aaa aat cac cag cta tgc att gga gag atc ttt cag   144
Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
          35             40             45

ggg cta gac ata ctg aag aat caa act gtc cgt ggg ggt acc gtg gaa   192
Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu
  50             55             60

atg cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc gat aga caa   240
Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln
  65             70             75             80

aaa gag aag cag tac atc aag gcc aac tcc aag ttc atc ggc atc acc   288
Lys Glu Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
          85             90             95

gag ctg agg acg agg cag ttc ctg gat tat ctg cag gag ttc ctt ggt   336
Glu Leu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly
          100             105             110

gtg atg agt aca gag tgg gca atg gaa ggc taa   369
Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly
          115             120

```

<210> 54

<211> 122

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myšičí IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 54

```

Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
 1           5           10           15

Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
           20           25           30

Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
           35           40           45

Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu
 50           55           60

Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln
 65           70           75           80

Lys Glu Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
           85           90           95

Glu Leu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly
           100          105          110

Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly
 115           120

```

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(393)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (256)..(318)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (1)..(255)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 1-85 myšího IL5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (319)..(390)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 90-113 myšího IL5

&lt;400&gt; 55

```

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg   48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu
  1             5             10             15

tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg agg ctt cct   96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro
             20             25             30

gtc cct act cat aaa aat cac cag cta tgc att gga gag atc ttt cag   144
Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln
             35             40             45

ggg cta gac ata ctg aag aat caa act gtc cgt ggg ggt acc gtg gaa   192
Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu
             50             55             60

atg cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc gat aga caa   240
Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln
             65             70             75             80

aaa gag aag tgt ggc ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc   288
Lys Glu Lys Cys Gly Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
             85             90             95

gtg ccc aag gtg agc gcc agc cac ctg gag agg acg agg cag ttc ctg   336
Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Thr Arg Gln Phe Leu
             100             105             110

gat tat ctg cag gag ttc ctt ggt gtg atg agt aca gag tgg gca atg   384
Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met
             115             120             125

gaa ggc taa   393
Glu Gly
  130

```

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 56

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

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 387

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
 substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(387)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (250)..(312)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (1)..(249)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 1-83 myšího IL5

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; různé

&lt;222&gt; (313)..(384)

&lt;223&gt; DNA kódující aminokyseliny 90-113 myšičího IL5

&lt;400&gt; 57

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg	48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu	
1 5 10 15	
tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg agg ctt cct	96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro	
20 25 30	
gtc cct act cat aaa aat cac cag cta tgc att gga gag atc ttt cag	144
Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln	
35 40 45	
ggg cta gac ata ctg aag aat caa act gtc cgt ggg ggt acc gtg gaa	192
Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu	
50 55 60	
atg cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc gat aga caa	240
Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln	
65 70 75 80	
aaa gag aag ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc gtg ccc	288
Lys Glu Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro	
85 90 95	
aag gtg agc gcc agc cac ctg gag agg acg agg cag ttc ctg gat tat	336
Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr	
100 105 110	
ctg cag gag ttc ctt ggt gtg atg agt aca gag tgg gca atg gaa ggc	384
Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu Gly	
115 120 125	
taa	387

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myšičí IL5 modifikovaný substitucí s epitopem tetanického toxoidu

&lt;400&gt; 58

```

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

```

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 438

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Umělá sekvence

&lt;220&gt;

<223> Popis umělé sekvence: myší IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopy tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(438)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (256)..(300)

&lt;223&gt; Epitop P2 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Mutace

&lt;222&gt; (301)..(363)

&lt;223&gt; Epitop P30 tetanického toxoidu

&lt;220&gt;

<221> různé  
 <222> (1)..(255)  
 <223> DNA kódující aminokyseliny 1-85 myšičího IL5

<220>  
 <221> různé  
 <222> (364)..(435)  
 <223> DNA kódující aminokyseliny 90-113 myšičího IL5

<400> 59

atg gag att ccc atg agc aca gtg gtg aaa gag acc ttg aca cag ctg	48
Met Glu Ile Pro Met Ser Thr Val Val Lys Glu Thr Leu Thr Gln Leu	
1 5 10 15	
tcc gct cac cga gct ctg ttg aca agc aat gag acg atg agg ctt cct	96
Ser Ala His Arg Ala Leu Leu Thr Ser Asn Glu Thr Met Arg Leu Pro	
20 25 30	
gtc cct act cat aaa aat cac cag cta tgc att gga gag atc ttt cag	144
Val Pro Thr His Lys Asn His Gln Leu Cys Ile Gly Glu Ile Phe Gln	
35 40 45	
ggg cta gac ata ctg aag aat caa act gtc cgt ggg ggt acc gtg gaa	192
Gly Leu Asp Ile Leu Lys Asn Gln Thr Val Arg Gly Gly Thr Val Glu	
50 55 60	
atg cta ttc caa aac ctg tca tta ata aag aaa tac atc gat aga caa	240
Met Leu Phe Gln Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp Arg Gln	
65 70 75 80	
aaa gag aag tgt ggc cag tac atc aag gcc aac tcc aag ttc atc ggc	288
Lys Glu Lys Cys Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly	
85 90 95	
atc acc gag ctg ttc aac aac ttc acc gtg agc ttc tgg ctg cgc gtg	336
Ile Thr Glu Leu Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val	
100 105 110	
ccc aag gtg agc gcc agc cac ctg gag agg acg agg cag ttc ctg gat	384
Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp	
115 120 125	
tat ctg cag gag ttc ctt ggt gtg atg agt aca gag tgg gca atg gaa	432
Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu	
130 135 140	
ggc taa	438
Gly	
145	

<210> 60  
 <211> 145  
 <212> PRT  
 <213> Umělá sekvence

<223> Popis umělé sekvence: myši IL5 modifikovaný  
substitucí s epitopy tetanického toxoidu

<400> 60

```

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

Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu Arg Thr Arg Gln Phe Leu Asp
          115          120          125
Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Ser Thr Glu Trp Ala Met Glu
          130          135          140

Gly
145

```

<210> 61

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(57)

<223> DNA kódující přírodní vedoucí sekvenci humánního IL5



&lt;400&gt; 61

```

atg agg atg ctt ctg cat ttg agt ttg ctg gct ctt gga gct gcc tac 48
Met Arg Met Leu Leu His Leu Ser Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Tyr
  1           5           10           15
gtg tat gcc 57
Val Tyr Ala

```

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 62

```

Met Arg Met Leu Leu His Leu Ser Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Tyr
  1           5           10           15
Val Tyr Ala

```

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(60)

&lt;223&gt; DNA kódující přírodní vedoucí sekvenci myšního IL5

&lt;400&gt; 63

```

atg aga agg atg ctt ctg cac ttg agt gtt ctg act ctc agc tgt gtc 48
Met Arg Arg Met Leu Leu His Leu Ser Val Leu Thr Leu Ser Cys Val
  1           5           10           15
tgg gcc act gcc 60
Trp Ala Thr Ala
          20

```

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

<400> 64

```
Met Arg Arg Met Leu Leu His Leu Ser Val Leu Thr Leu Ser Cys Val
  1           5           10           15
Trp Ala Thr Ala
           20
```

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Všeobecný epitop pomocného T  
lymfocytu

<400> 65

```
Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
  1           5           10
```

## P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Analog interleukinu 5 (IL5), který pochází z IL5 polypeptidu zvířete, do kterého je zavedena modifikace, která má za následek, že imunizace zvířete analogem indukuje produkci protilátek proti IL5 polypeptidu a kde se modifikace týká substituce a/nebo inserce a/nebo delece aminokyseliny kterékoliv z klíček 1 až 3 nebo C-konce helixu D IL5, kde uvedené klíčky a helix D odpovídají těm, které jsou znázorněny na obr. 3 pro lidský a myší IL5.

2. Analog interleukinu 5 podle nároku 1, v němž modifikace má za následek, že je zachována podstatná frakce IL5 epitopů B buněk a že

- je zaveden alespoň jeden cizorodý epitop pomocného T lymfocytu ( $T_H$  epitop) a/nebo

- je zavedena alespoň jedna první skupina, která provádí cílení modifikované molekuly k buňce prezentující antigen (APC) nebo B lymfocytu a/nebo

- je zavedena alespoň jedna druhá skupina, která stimuluje imunitní systém a/nebo

- je zavedena alespoň jedna třetí skupina, která optimalizuje prezentaci modifikovaného IL5 polypeptidu imunitnímu systému.

3. Analog interleukinu 5 podle nároku 2, v němž modifikace zahrnuje zavedení cizorodého  $T_H$  epitopu a/nebo první a/nebo druhé a/nebo třetí skupiny jako postranní skupiny navázáním kovalentní nebo nekovalentní vazbou k vhodným chemickým skupinám v IL5 nebo jeho subsekvenci.

4. Analog interleukinu 5 podle nároku 3, v němž modifikace zahrnuje substituci a/nebo delecí a/nebo inzerci a/nebo adici aminokyseliny.
5. Analog interleukinu 5 podle nároku 3 nebo 4, v němž modifikace má za následek poskytnutí fúzního polypeptidu.
6. Analog interleukinu 5 podle nároku 4 nebo 5, v němž zavedení substituce a/nebo delecí a/nebo inzerci a/nebo adice aminokyseliny má za následek podstatnou konzervaci celkové terciární struktury IL5.
7. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v němž modifikace zahrnuje duplikaci alespoň jednoho IL5 epitopu B buňky a/nebo zavedení haptenu.
8. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z nároků 2 až 7, v němž cizorodý  $T_H$  epitop je u zvířete imunodominantní.
9. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z nároků 2 až 8, v němž cizorodý  $T_H$  epitop je promiskuitní.
10. Analog interleukinu 5 podle nároku 9, v němž alespoň jeden cizorodý  $T_H$  je vybrán ze skupiny, kterou tvoří přírodní promiskuitní  $T_H$  epitop a syntetická sekvence vazebného peptidu MHC-II.
11. Analog interleukinu 5 podle nároku 10, v němž přírodní  $T_H$  epitop je vybrán ze skupiny, kterou tvoří epitop tetanického toxoidu, jako je P2 nebo P30, epitop difterického toxoidu, epitop hemaglutininu viru chřipky a CS epitop *P. falciparum*.

12. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z nároků 2 až 11, v němž první skupina je v podstatě specifický vazebný partner pro specifický povrchový antigen B lymfocytu nebo pro specifický povrchový antigen APC, jako je haptén nebo sacharid, pro který je receptor na B lymfocytu nebo APC.

13. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z nároků 2 až 12, v němž druhá skupina je vybrána ze skupiny, kterou tvoří cytokin, hormon a protein tepelného šoku.

14. Analog interleukinu 5 podle nároku 13, v němž cytokin je vybrán ze skupiny, kterou tvoří interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Flt3L, interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), interleukin 13 (IL-13), interleukin 15 (IL-15) a faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) nebo jejich účinné části a protein tepelného šoku je vybrán ze skupiny, kterou tvoří HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 a kalretikulin (CRT) nebo jejich účinné části.

15. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z nároků 2 až 14, v němž třetí skupina je lipidové povahy, jako je palmitoylová skupina, myristylová skupina, farnesylová skupina, geranyl-geranylová skupina, GPI kotva a N-acyldiglyceridová skupina.

16. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde modifikace spočívá v tom, že subsekvence IL5 polypeptidu je modifikována v alespoň jedné klíče 1 až 3 nebo v aminokyselinových zbytcích u C-konce helixu D.

17. Analog interleukinu 5 podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, kde IL5 polypeptid je humánní IL5 polypeptid.

18. Analog interleukinu 5 podle nároku 17, v němž humánní IL5 polypeptid byl modifikován substitucí alespoň jedné aminokyselinové sekvence v sekv. id. č. 1 alespoň jednou aminokyselinovou sekvencí stejné nebo odlišné délky, a tím vznikl cizorodý  $T_H$  epitop, přičemž substituované aminokyselinové zbytky jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří zbytky 87 až 90, zbytky 88 až 91, zbytky 32 až 43, zbytky 33 až 43, zbytky 59 až 64, zbytky 86 až 91 a zbytky 110 až 113.

19. Imunogenní přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

- imunogenně účinné množství IL5 polypeptidu autologního pro zvíře, přičemž IL5 polypeptid je formulován společně s imunologicky přijatelným adjuvans tak, aby porušil autotoleranci zvířete k IL5 polypeptidu, přičemž přípravek dále obsahuje farmaceuticky a imunologicky přijatelný nosič a/nebo vehikulum,

- imunogenně účinné množství IL5 analogu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18, přičemž přípravek dále obsahuje farmaceuticky a imunologicky přijatelný nosič a/nebo vehikulem a volitelně adjuvans.

20. Imunogenní přípravek podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že adjuvans je vybráno ze skupiny, kterou tvoří imunitně cílící adjuvans; imunitně modulující adjuvans, jako je toxin, cytokin a mykobakteriální derivát; olejový přípravek; polymer; adjuvans tvořící micely; saponin; imunostimulační komplexní matrice (ISCOM matrice);

částice; DDA; hliníková adjuvancia; DNA adjuvancia; gamma-inulin; a opouzďřovací adjuvans.

21. Fragment nukleové kyseliny, který kóduje IL5 analog podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18.

22. Vektor nesoucí fragment nukleové kyseliny podle nároku 21.

23. Vektor podle nároku 22, který je schopný autonomní replikace.

24. Vektor podle nároku 22 nebo 23, který je vybrán ze skupiny, kterou tvoří plazmid, fág, kosmid, mini-chromozom a virus.

25. Vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 24, obsahující ve směru 5'→3' a v operabilní vazbě promotor pro pohánění exprese fragmentu nukleové kyseliny podle nároku 21, volitelně sekvenci nukleové kyseliny kódující vedoucí peptid umožňující sekreci nebo integraci polypeptidového fragmentu do membrány, fragment nukleové kyseliny podle nároku 21 a volitelně terminátor.

26. Vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 25, který je po zavedení do hostitelské buňky integrován do genomu hostitelské buňky.

27. Vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 25, který po zavedení do hostitelské buňky není schopen integrace do genomu hostitelské buňky.

28. Vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 27, kde promotor pohání expresi v eukaryotické buňce a/nebo v prokaryotické buňce.
29. Transformovaná buňka nesoucí vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28.
30. Transformovaná buňka podle nároku 29, která je schopná replikace fragmentu nukleové kyseliny podle nároku 21.
31. Transformovaná buňka podle nároku 30, kterou je mikroorganismus vybraný ze skupiny, kterou tvoří bakterie, kvasinky, protozoa, nebo buňka pocházející z mnohobuněčného organismu vybraného z buněk hub, hmyzích buněk, jako jsou buňky S<sub>2</sub> nebo SF, rostlinných buněk a savčích buněk.
32. Transformovaná buňka podle nároku 31, kterou je bakterie rodu *Escherichia*, *Bacillus*, *Salmonella* nebo *Mycobacterium*.
33. Transformovaná buňka podle nároku 32, která je vybraná ze skupiny, kterou tvoří buňky *E. coli* a nepatogenní buňky *Mycobacterium*, jako je *M. bovis* BCG.
34. Transformovaná buňka podle kteréhokoliv z nároků 29 až 33, která exprimuje fragment nukleové kyseliny podle nároku 21.
35. Transformovaná buňka podle nároku 34, která sekretuje nebo nese na svém povrchu IL5 analog podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18.
36. Přípravek pro indukci produkce protilátek proti IL5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje



- fragment nukleové kyseliny kódující IL5 analog, do něhož je zavedena modifikace, jež má za následek imunizaci zvířete, přičemž IL5 je autologní s analogem a indukuje produkci protilátek proti IL5 polypeptidu, jako fragment nukleové kyseliny podle nároku 21 nebo vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28, a

- farmaceuticky a imunologicky přijatelný nosič a/nebo vehikulum a/nebo adjuvans.

37. Přípravek podle nároku 36 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zavedená nukleová kyselina (nukleové kyseliny) je (jsou) vybrána(y) ze skupiny, kterou tvoří nahá DNA, DNA formulovaná s nabitými nebo nenabitými lipidy, DNA formulovaná v lipozomech, DNA obsažená ve virovém vektoru, DNA formulovaná s proteinem nebo polypeptidem usnadňujícím transfekci, DNA formulovaná s cílícím proteinem nebo polypeptidem, DNA formulovaná s vápníkovými precipitačními činidly, DNA kondenzovaná k molekule inertního nosiče, DNA opouzdřená v chitinu nebo chitosanu a DNA formulovaná s adjuvanty, jako je adjuvans vybrané ze skupiny, kterou tvoří imunitně cílící adjuvans; imunitně modulující adjuvans, jako je toxin, cytokin a mykobakteriální derivát; olejový přípravek; polymer; adjuvans tvořící micely; saponin; imunostimulační komplexní matrice (ISCOM matrice); částice; DDA; hliníková adjuvancia; DNA adjuvancia; gamma-inulin; a opouzdřovací adjuvans, a nukleové kyseliny, které jsou obsaženy ve virtuální lymfatické uzlině VLN .

38. Stabilní buněčná linie, která nese vektor podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28 a která exprimuje fragment nukleové kyseliny podle nároku 21 a která volitelně sekretuje nebo nese na svém povrchu IL5 analog podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18.

39. Způsob přípravy buňky podle kteréhokoliv z nároků 29 až 35 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje transformaci hostitelské buňky fragmentem nukleové kyseliny podle nároku 21 nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28.

40. Způsob identifikace modifikovaného IL5 polypeptidu, který je schopen indukovat protilátky proti nemodifikovanému IL5 u živočišného druhu, kde nemodifikovaný IL5 polypeptid je autoprotein, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje

- přípravu, prostřednictvím peptidové syntézy nebo technik genového inženýrství, sady vzájemně rozdílných modifikovaných IL5 polypeptidů, kde byly přidány, vloženy, odstraněny nebo substituovány aminokyseliny do aminokyselinové sekvence IL5 polypeptidu živočišného druhu, a tím vznikly aminokyselinové sekvence v sadě, které obsahují epitopy T buněk, které jsou cizorodé pro živočišný druh nebo přípravu sady fragmentů nukleové kyseliny kódujících sadu vzájemně rozdílných modifikovaných IL5 polypeptidů,

- testování členů sady na jejich schopnost indukovat produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 živočišným druhem, a

- identifikaci a volitelně izolaci členu(členů) sady, který významně indukuje produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 u živočišného druhu nebo identifikaci a volitelně izolaci polypeptidových expresních produktů kódovaných členy sady fragmentů nukleové kyseliny, které významně indukují produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 u živočišného druhu.

41. Způsob výroby imunogenního přípravku obsahujícího alespoň jeden modifikovaný IL5 polypeptid, který je schopný indukovat

protilátky proti nemodifikovanému IL5 u živočišného druhu, kde nemodifikovaný IL5 polypeptid je autoprotein, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje

- přípravu, prostřednictvím peptidové syntézy nebo technik genového inženýrství, sady vzájemně rozdílných modifikovaných IL5 polypeptidů, kde byly přidány, vloženy, odstraněny nebo substituovány aminokyseliny do aminokyselinové sekvence IL5 polypeptidu živočišného druhu, a tím vznikly aminokyselinové sekvence v sadě, které obsahují epitopy T buněk, které jsou cizorodé pro zvíře,

- testování členů sady na jejich schopnost indukovat produkci protilátek proti nemodifikovanému IL5 živočišným druhem, a

- smísení členu(členů) sady, který významně indukuje produkci protilátek u živočišného druhu, které reagují s IL5, s farmaceuticky a imunologicky přijatelným nosičem a/nebo vehikulem, volitelně v kombinaci s alespoň jedním farmaceuticky a imunologicky přijatelným adjuvans.

42. Způsob podle nároku 39 nebo 40 v y z n a č u j í c í s e t í m, že příprava členů sady zahrnuje přípravu vzájemně rozdílných sekvencí nukleové kyseliny, každá sekvence je sekvence nukleové kyseliny podle nároku 21, inzerci sekvencí nukleové kyseliny do vhodných expresních vektorů, transformaci vhodných hostitelských buněk vektory a expresi sekvencí nukleové kyseliny, a volitelně následně pak izolaci expresních produktů.

43. Způsob podle nároku 42 v y z n a č u j í c í s e t í m, že příprava sekvencí nukleové kyseliny a/nebo vektorů je provedena technikou molekulární amplifikace, jako je PCR, nebo syntézou nukleových kyselin.

44. Použití IL5 nebo jeho subsekvence pro přípravu imunogenního přípravku obsahujícího adjuvans pro down-regulaci aktivity IL5 u zvířete.

45. Použití IL5 nebo jeho subsekvence pro přípravu imunogenního přípravku obsahujícího adjuvans pro léčení, profylaxi nebo zmírnění astmatu nebo jiných chronických alergických stavů.

46. Použití IL5 analogu pro přípravu imunogenního přípravku volitelně obsahujícího adjuvans pro down-regulaci aktivity IL5 u zvířete.

47. Použití IL5 analogu pro přípravu imunogenního přípravku volitelně obsahujícího adjuvans pro léčení, profylaxi nebo zmírnění astmatu nebo jiných chronických alergických stavů.

48. Použití podle nároku 46 nebo 47, kde analogem je analog podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18.

49. Použití fragmentu nukleové kyseliny kódujícího analog IL5 pro výrobu imunogenního přípravku pro down-regulaci aktivity IL5 u zvířete.

50. Použití fragmentu nukleové kyseliny kódujícího analog IL5 pro výrobu imunogenního přípravku pro léčení, profylaxi nebo zlepšení stavu u astmatu nebo jiných chronických alergických stavů.

51. Použití podle nároku 49 nebo 50, kde fragmentem nukleové kyseliny je fragment nukleové kyseliny podle nároku 21 nebo fragment nukleové kyseliny zabudovaný ve vektoru podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28.

52. Použití nepatogenního mikroorganismu nebo viru nesoucího fragment nukleové kyseliny kódující analog IL5 pro výrobu imunogenního přípravku pro down-regulaci aktivity IL5 u zvířete.

53. Použití nepatogenního mikroorganismu nebo viru obsahujícího fragment nukleové kyseliny kódující analog IL5 pro výrobu imunogenního přípravku pro léčení, profylaxi nebo zlepšení stavu u astmatu nebo jiných chronických alergických stavů.

54. Použití podle nároku 52 nebo 53, kde fragmentem nukleové kyseliny je fragment nukleové kyseliny podle nároku 21 nebo fragment nukleové kyseliny zabudovaný ve vektoru podle kteréhokoliv z nároků 22 až 28.

20.05.02

2V2001-3709

37829

1/7

10  
 Ile-Pro-Thr-Glu-Ile-Pro-Thr-Ser-Ala-Leu-Val-Lys-Glu-Thr-Leu-Ala-Leu-Leu-Ser-Thr-  
 \* \* Met Thr Val Thr Gln Ala

20  
 His-Arg-Thr-Leu-Leu-Ile-Ala-Asn-Glu-Thr-Leu-Arg-Ile-Pro-Val-Pro-Val-His-Lys-Asn-  
 Ala Thr Ser Met Leu Thr

30  
 His-Gln-Leu-Cys-Thr-Glu-Glu-Ile-Phe-Gln-Gly-Ile-Gly-Thr-Leu-Glu-Ser-Gln-Thr-Val-  
 Ile Gly Leu Asp Ile Lys Asn

40  
 Gln-Gly-Gly-Thr-Val-Glu-Arg-Leu-Phe-Lys-Asn-Leu-Ser-Leu-Ile-Lys-Lys-Tyr-Ile-Asp-  
 Arg Met Gln

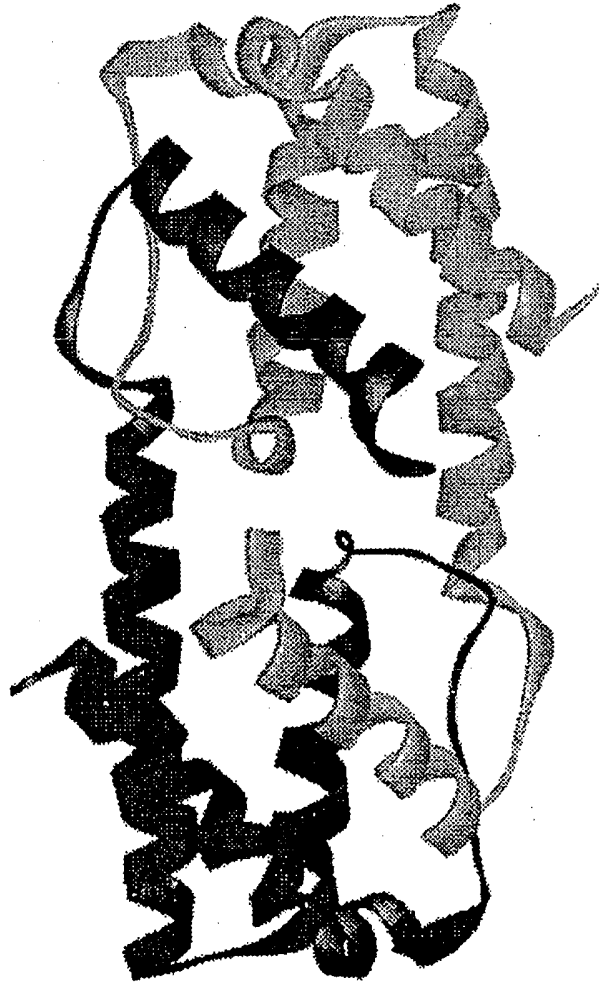
50  
 Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Cys-Gly-Glu-Glu-Arg-Arg-Val-Asn-Gln-Phe-Leu-Asp-Tyr-Leu-  
 Arg Glu Thr Arg

60  
 Gln-Glu-Phe-Leu-Gly-Val-Met-Asn-Thr-Glu-Trp-Ile-Ile-Glu-Ser  
 Ser Ala Met Gly

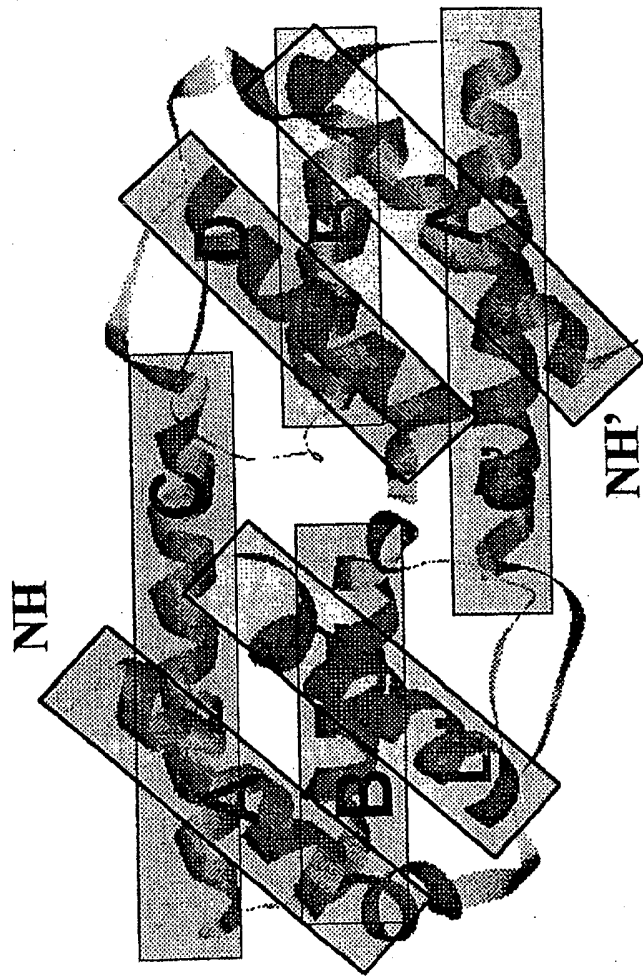
Obr. 1

20.05.02

217



Obr. 2A

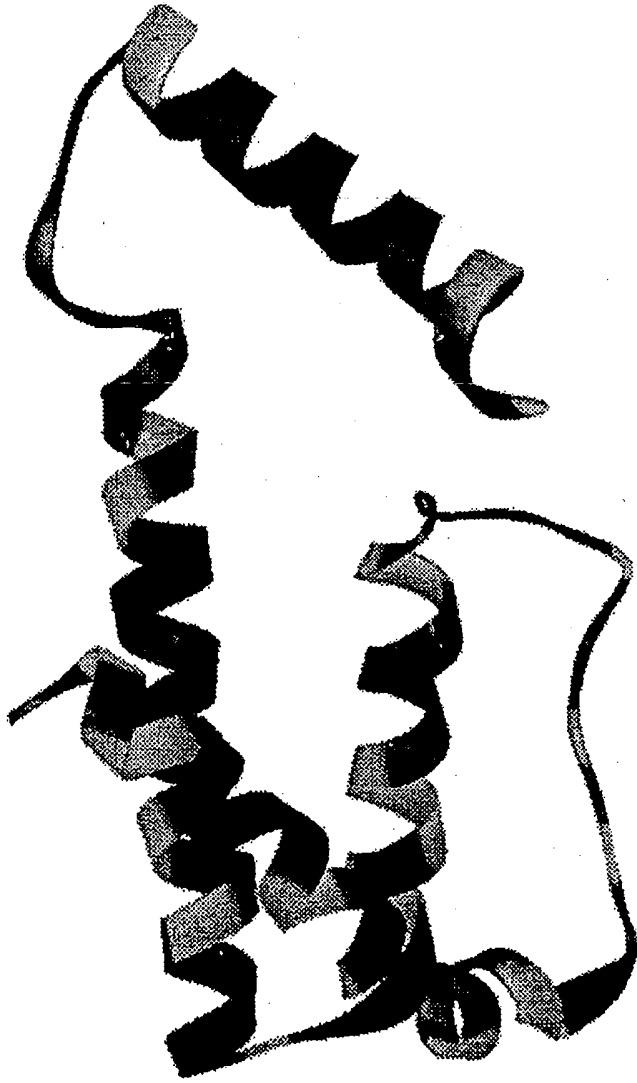


Obr. 2B



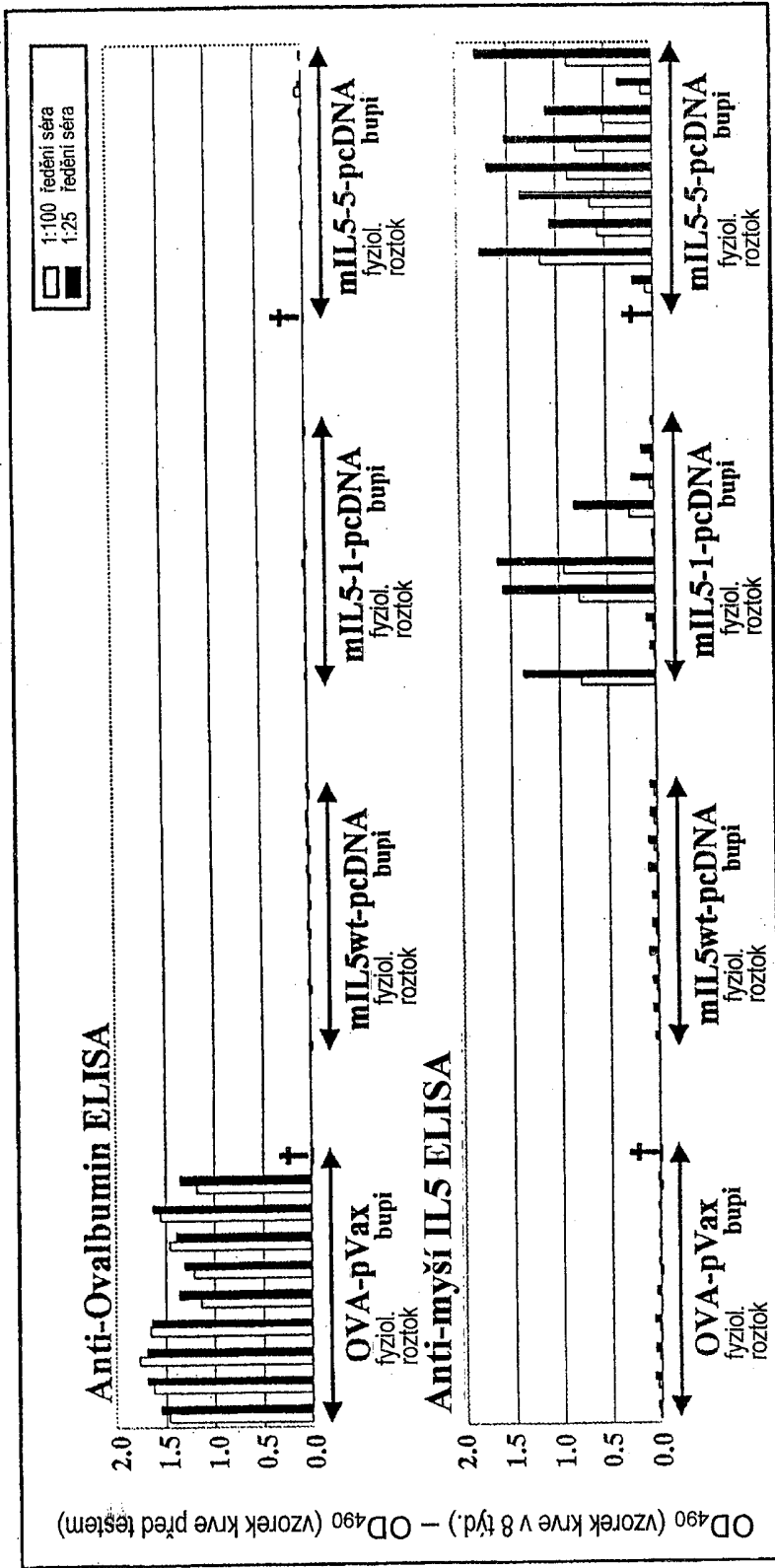
20.05.02

4/7



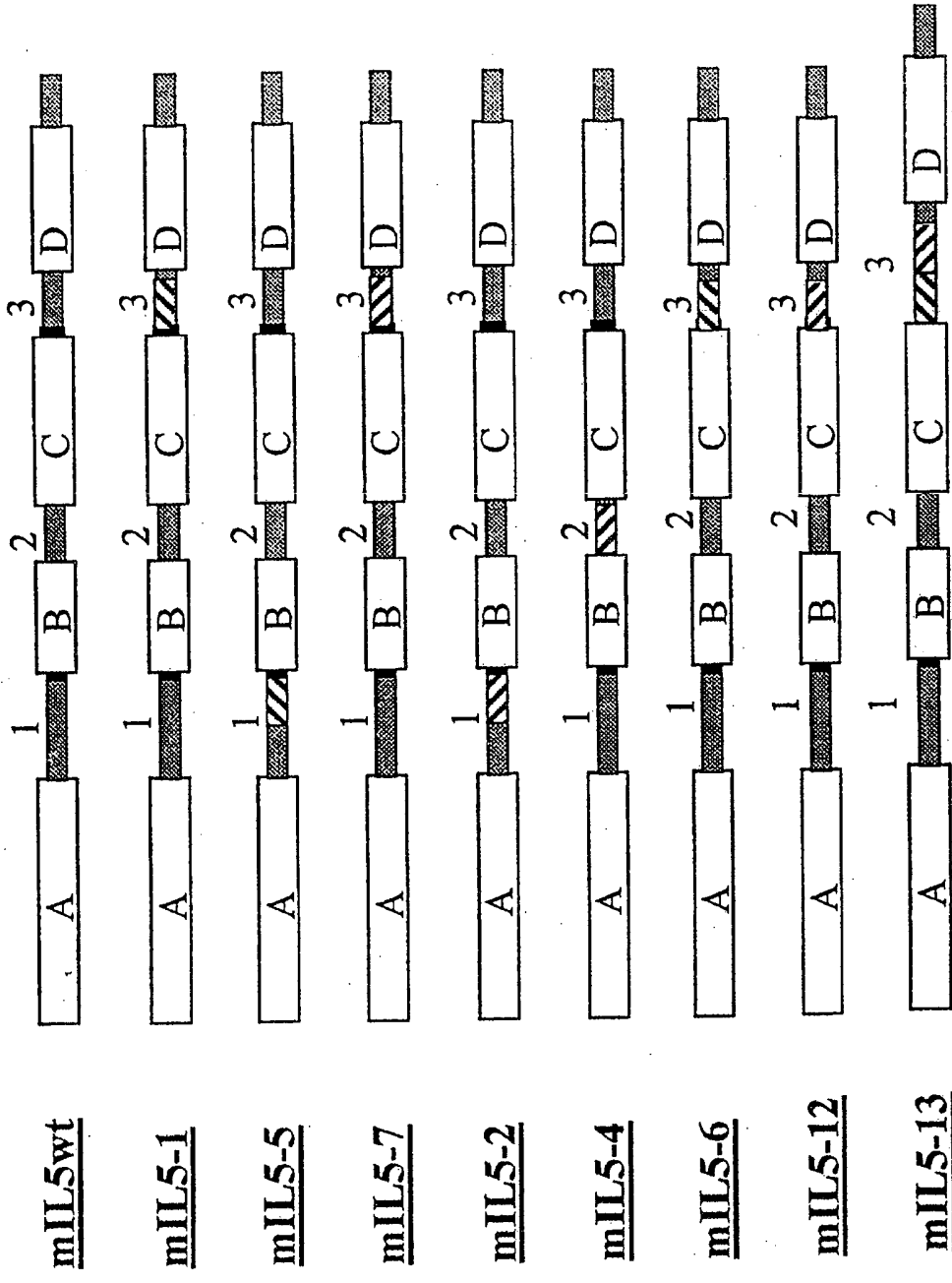
Obr. 2C





Obr. 4

□ Helix   ■ Klička   ■ Cystein   ▨ P2   ▩ P30



Obr. 5