SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 13.11.95

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 338 992

(32) Dátum priority: 14.11.94

(33) Krajina priority: US

(40) Dátum zverejnenia: 14.01.98

(86) Číslo PCT: PCT/US95/14899, 13.11.95

(21) Číslo dokumentu:

597-97

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

C 12N 15/11
C 12N 15/31
A 61K 39/04

(71) Prihlasovateľ: Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, US;
N.V. INNOGENETICS S.A., Ghent, BE;

(72) Pôvodca vynálezu: Liu Margaret A., Rahway, NJ, US;
Montgomery Donna, Rahway, NJ, US;
Ulmer Jeffrey, Rahway, NJ, US;
Content Jean, Ghent, BE; Huygen Kris, Ghent, BE;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Polynukleotid, vakcína a ich použitie**

(57) Anotácia:
Gény kódujúce proteíny *Mycobacterium tuberculosis (M. tb)* boli klonované do eukaryotických expresných vektorov s cieľom expresie kódovaných proteínov v cicavčích svalových bunkách *in vivo*. Zvieratá boli imunizované injekciou týchto DNA konštrukcií, označovaných ako polynukleotidové vakcíny alebo PNV, do svalov. Boli produkované imunizačné antiséra proti antigénom *M. tb*. V slezinnných bunkách vakcinovaných myší boli detegované špecifické odpovede T-buniek a profil sekrécie cytokínu ako odpoveď na antigén (85) ukazoval na T_h1 typ odpovede pomocných T-buniek (t. j. vysoký IL-2 a IFN-γ). Ochranná účinnosť *M. tb*.DNA vakcíny bola ukázaná na myšiach po infekcii *M. bovis* BCG, ako bolo zmerané znížením rozmnožovania mykobaktérií v slezinách a pľúcach myší, vakcinovaných *M. tb* DNA v porovnaní s kontrolnými myšiami vakcinovanými DNA alebo primárnou infekciou myší, s ktorými dosiaľ neboli uskutočňované pokusy.

Polynukleotid, vakcína a ich použitie

Oblasť techniky

Gény, kódujúce proteíny *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) boli klonované do eukaryotických expresných vektorov za účelom expresie kódovaných proteínov v cicavčích svalových bunkách *in vivo*.

Doterajší stav techniky

Hlavnou prekážkou pri vývoji vakcín proti vírusom a baktériám, zvlášť tým s viacerými sérotypmi alebo vysokou rýchlosťou mutácie, proti ktorým je potrebné získanie neutralizačných protilátok a/alebo ochranné bunkou sprostredkované imunologické odpovede, je rôznorodosť vonkajších proteínov medzi rôznymi izolátmi alebo kmeňmi. Pretože cytotoxické T-lymfocyty (CTL) tak u myší, ako aj u človeka, sú schopné rozpoznávať epitópy, odvodené od konzervovaných vnútorných vírusových proteínov [J. W. Yewdell a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 1785 (1985); A. R. M. Townsend a ďalší, Cell 44, 959 (1986); A. J. McMichael a ďalší, J. Gen. Virol. 67, 719 (1986); J. Bastin a ďalší, J. Exp. Med. 165, 1508 (1987); A. R. M. Townsend a H. Bodmer, Annu, Rev. Immunol. 7, 601 (1989)] a sú pravdepodobne dôležité pri imunologickje odpovedi proti vírusom [Y.-L. a B. A. Askonas, J. Exp. Med. 154, 225 (1981); I. Gardner a ďalší, Eur. J. Immunol. 4, 68 (1974); K. L. Yap a G. L. Ada, Nature 273, 238 (1978); A. J. McMichael a ďalší, New Engl. J. Med. 309, 13 (1983); P. M. Taylor a B. A. Askonas, Immunol. 58, 417 (1986)], bolo úsilie zamerané smerom k vývoju CTL vakcín, schopných poskytnúť heterológnu ochranu proti rôznym vírusovým kmeňom.

Je známe, že CTL zabíjajú bunky, infikované vírusmi alebo baktériami, keď ich T bunkové receptory rozpoznávajú cudzie peptidy, spojené s molekulami MHC triedy I a/alebo

triedy II. Tieto peptidy môžu byť odvodené z endogénne syntetizovaných cudzích proteínov bez ohľadu na umiestnenie proteínov alebo ich funkciu vo vnútri patogénu. Rozpoznaním epitópov konzervovaných proteínov môžu CTL poskytnúť heterológnu ochranu. V prípade intracelulárnej baktérie sú proteíny, sekretované baktériou alebo uvoľňované z baktérie spracované a vyjadrené molekulami MHC triedy I a II, čím sú generované odpovede T buniek, ktoré môžu hrať úlohu pri znížení alebo odstránení infekcie.

Väčšina snáh o vyvolanie odpovede CTL používala na produkciu proteínových antigénov vo vnútri bunky buď replikačné vektory [J. R. Bennink a ďalší, vyššie 311, 578 (1984); J. R. Bennink a J. W. Yewdell Cur. Top. Microbiol. Immunol. 163, 153 (1990); C. K. Stover a ďalší, Nature 351, 456 (1991); A. Aldovini a R. A. Young, Nature 351, 479 (1991); R. Schafer a ďalší, J. Immunol. 149, 53 (1992); C. S. Hahn a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89, 2679 (1992)], alebo sa sústredila na zavedenie peptidov do cytozolu [R:F. R. Carbobe a M. J. Bevan, J. Exp. Med. 169, 603 (1989); K. Deres a ďalší, Nature 342, 561 (1989); H. Takahashi a ďalší, vyššie, 344, 873 (1990); D. S. Collins a ďalší, J. Immunol. 148, 3336 (1992); M. J. Newman a ďalší, vyššie, 148, 2357 (1992)]. Oba tieto prístupy majú obmedzenia, ktoré môžu obmedziť ich použiteľnosť ako vakcín. Retrovirálne vektory majú obmedzenie veľkosti a štruktúry polypeptidov, ktoré môžu byť exprimované ako fúzne proteíny pri zachovaní schopnosti replikácie rekombinantného vírusu [A. D. Miller, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 1 (1992)], a účinnosť vektorov ako je vakcinie pre následné imunizácie musí byť kompromisom vzhľadom na imunologickú odpoveď proti vakcinii [E. L. Cooney a ďalší, Lancet 337, 567 (1991)]. Virálne vektory a modifikované patogény tiež majú vážne riziká, ktoré môžu zabrániť ich použitiu u ľudí [R. R. Redfield a ďalší, New Engl. J. Med. 316, 673 (1987); L. Mascola a ďalší, Arch. Intern. Med. 149, 1569 (1989)]. Voľba peptidových epitópov, ktoré majú byť prítomné, je ďalej závislá na štruktúre MHC antigénov jednotlivca a peptidové vakcíny preto môžu mať ob-

medzenú účinnosť vzhľadom na rôznorodosť MHC u nepríbuzných populácií.

Benvenisty, N. a Reshef, I., [PNAS 83, 9551 až 9555, (1986)] ukázali, že by mohla byť exprimovaná DNA, vyzrážaná $CaCl_2$, zavedená do myší intraperitonálne (i.p.), intravenózne (i.v.) alebo intramuskulárne (i.m.). Ukázalo sa, že intramuskulárne (i.m.) injekcie DNA expresného vektora do myší vedie k absorpcii DNA svalovými bunkami a expresii proteínu, kódovaného DNA [J. A. Wolf a ďalší, Science 247, 1465 (1990); G. Ascadi a ďalší, Nature 352, 815 (1991)]. Ukázalo sa, že plazmidy sa zachovávajú epizomálne a nereplikujú sa. Následne bola pozorovaná perzistentná expresia po i.m. injekcii do kostrového svalstva krýs, rýb a primátov a srdcového svalu krýs [H. Lin a ďalší, Circulation 82, 2217 (1990); R. N. Kitsis a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88, 4138 (1991); E. Hansen a ďalší, FEBS Lett. 290, 73 (1991); S. Jiao a ďalší, Hum. Gene Therapy 3, 21 (1992); J. A. Wolf a ďalší, Human Mol. Genet. 1, 363 (1992)]. Technika použitia nukleových kyselín ako terapeutických prostriedkov sa opisuje vo WO90/11092 (4. októbra 1990), v ktorej boli použité na vakcináciu stavovcov nahé polynukleotidy.

Nedávno boli opísané koordinačné úlohy B7 a hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) epitópov na povrchu buniek s antigénmi pri aktivácii CTL na odstránenie tumorov [Edgington, Biotechnology 11, 1117 až 1119, 1993]. Hneď ako molekula MHC na povrchu bunky s antigénom (antigen presenting cell APC) vystaví epitóp receptoru T-bunky (TCR), B7, exprimované na povrchu rovnakej APC pôsobia ako druhý signál svojou väzbou na CTLA-4 alebo CD28. Výsledkom je rýchle rozdelenie CD4+ pomocných T-buniek, ktoré signalizuje CD8+ T-bunkám, že majú proliferovať a zabíjať APC.

Pre úspech tejto metódy nie je nutné, aby imunizácia bola intramuskulárna. Tang a ďalší [Nature, 356, 152 až 154 (1992)] ukázali, že zavedenie zlatých mikroprojektilov, pokrytých DNA, kódujúce bovinný rastový hormón (BGH) do kože myší, malo za následok produkciu protilátok anti-BGH v tele myší. Furth a ďalší [Analytical Biochemistry, 205, 365 až

368, (1992)] ukázali, že na transfekciu kože, svalov, tuku a prsných tkanív živých zvierat by mohol byť použitý tryskový injektor. V poslednej dobe bol opísaný rad metód na zavedenie nukleových kyselín [Friedman, T. Science, 244, 1275 až 1281 (1989)], viď. aj Robinson a ďalší [Abstracts of Papers Presented at the 1992 Meeting on Modern Approaches to New Vaccines, Including Prevention of AIDS, Cold Spring Harbor, str. 92; Vaccine 11, 957 (1993)], pri ktorej bola podávaná DNA vtáčej chrípky kurčatám im, ip a iv, čím bola dosiahnutá ochrana proti letálnej expozícii.

Intravenóznu injekciu komplexu DNA: katiónový lipozóm myši ukázali Zhu a ďalší [Science 261, 209 až 211 (9. júl 1993); viď tiež WO 93/24640, 9. december 1993], pričom táto injekcia mala za následok systémovú expresiu klonovaného transgénu. V poslednej dobe ohlásili Ulmer a ďalší, [Science 259, 1745 až 1749, (1993)] heterológnu ochranu proti infekcii vírusom chrípky injekciou DNA, kódujúcou vírusové proteíny chrípky.

Wang a ďalší, [P.N.A.S. USA 90, 4156 až 4160 (máj 1993)] ukázali vytvorenie imunologickej odpovede u myší proti HIV intramuskulárnej injekcii klonovaného genomického (neštiepeného) génu HIV. Avšak úroveň imunologických odpovedí, ktorá bola dosiahnutá, bola veľmi nízka a systém využíval časti LTR (long terminal repeat) promótora vírusu myšacieho tumoru prsníkov (MMTV) a časti promótora a terminátora opičieho vírusu 40 (SV40). O víruse SV40 je známe, že transformuje bunky, pravdepodobne integráciou do bunkovej DNA hostiteľa. Systém, opisovaný Wangom a ďalšími, je teda celkom nevhodný na podávanie človeku, ktoré je hlavným predmetom predkladaného vynálezu.

WO 93/17706 opisuje spôsob vakcinácie zvieraťa proti vírusu, pričom nosné častice boli pokryté génovou konštrukciou a pokryté častice boli vpravené do buniek zviereťa.

Štúdie Volffa a ďalších (vyššie) pôvodne ukázali, že intramuskulárne injekcie plazmidovej DNA, kódujúcej reportérový gén, má za následok expresiu tohto génu v myocytoch v mieste injekcie a jeho blízkosti. Posledné správy ukázali

úspešnú imunizáciu myší proti chrípke injekciou plazmidu, kódujúceho hemaglutinín chrípky typu A. (Montgomery, D. L. a ďalší, 1993, Cell Biol., 12, str. 777 až 783) alebo nukleoproteínu (Montgomary, D. L. a ďalší, vyššie; Ulmer, J. B. a ďalší, 1993, Science, 259, str. 1745 až 1749). Prvé použitie DNA na imunizáciu pre herpetický vírus opisujú (Cox a ďalší, 1993, J. Virol., 67, str. 5664 až 5667).

U myší a teliat spôsobila injekcia plazmidu, kódujúceho bovinný herpes vírus 1 (BHV-1) glykoproteín g IV vytvorenie protilátok anti-g IV. Po intranazálnom podaní vírusu BHV-1 mala imunizované teľatá znížené príznaky a podstatne menej vírusu, ako kontroly.

Tuberkulóza (TB) je chronické infekčné ochorenie pľúc, spôsobené patogénom *Mycobacterium tuberculosis*. TB je vo svete jedna z klinicky najvýznamnejších infekcií s každoročným výskytom troch miliónov úmrtí a 10 miliónov nových prípadov. Odhaduje sa, že až jedna tretina svetovej populácie môže byť tuberkulózou infikovaná, pričom v rozvojových krajinách je hlásených 55 miliónov prípadov aktívnej TB. Do začiatku tohto storočia bola úmrtnosť na tuberkulózu v USA na prvom mieste. Avšak so zlepšenými hygienickými podmienkami a s príchodom antimikrobiálnych liekov výskyt a mortalita stále klesali až k bodu, kedy bolo predpokladané, že choroba by mohla byť do roku 2000 zlikvidovaná. Avšak v najviac vyvinutých štátoch počet prípadov aktívnej TB každoročne od 80. rokov stúpal. Časť tohto návratu bola pripisovaná prisťahovalectvu a rastúcemu počtu jedincov s imunologickou nedostatočnosťou, infikovaných HIV. Pokiaľ nedôjde k poklesu, predpokladá sa, že TB si vyžiada v budúcich desiatich rokoch viac než 30 miliónov ľudských životov. Čo je na týchto číslach alarmujúce je to, že sa stále viac týkajú kmeňov *M. tuberculosis*, rezistentných na väčší počet liečiv (multidrug-resistant, MDR). Tieto kmene MDR nie sú liečiteľné pomocou tradičných liekov a boli zodpovedné za niekoľko vypuknutí ochorení TB v poslednej dobe, zvlášť v mestských centrách.

Preto jednou z kľúčových zložiek v dlhodobom prístupe k liečeniu TB bude účinná vakcína [pre prehľad viď Bloom and

Murray, 1993, Science 257, 1055].

M. tuberculosis je intracelulárny patogén, ktorý infikuje makrofágy a je schopný prežívať v nepriaznivom prostredí fagolyzozómu v tomto type bunky. Väčšina vdychnutých bacilov je zničená aktivovanými alveolárnymi makrofágmi. Bacily, ktoré prežili, sa však môžu pomnožiť v makrofágoch a po smrti bunky sa uvoľniť, čo signalizuje miestna infiltrácia lymfocytov, monocytov a makrofágov. Lýzia makrofágov, naplnených bacilmi, je sprostredkovaná hypersenzitivitou oneskoreného typu (DTH) a má za následok vyvinutie pevného kazeozného tuberkulu, obklopujúceho oblasť infikovaných buniek. Pokračujúca DTH spôsobí skvapalnenie tuberkulu, a tým uvoľnenie zachytených bacilov. Veľká dávka extracelulárnych bacilov spustí ďalšiu DTH, čo spôsobuje poškodenie bronchov a disemináciu lymfatickými, hematogénnymi a bronchiálnymi cestami a prípadne dovolí infekčným bacilom šíriť sa respiračnou cestou.

Imunita proti TB zahrnuje niekoľko typov efektorových buniek. Účinným prostriedkom minimalizácie intracelulárneho pomnožovania mykobaktérií je aktivácia makrofágov cytokínmi, ako je interferón-γ. Úplná eradikácia bacilov týmto spôsobom sa však často nedosiahne. Získanie ochrany proti TB vyžaduje T-lymfocyty. Medzi nimi sa zdajú dôležité T bunky CD8+ a CD4+ [Orme a ďalší, 1993, J. Infect. Dis. 167, 1481)]. Bunky tohto typu sekretujú ako odpoveď na mykobaktérie interferón-γ, čo svedčí o imunologickej odpovedi T_h1 a majú cytotoxickú aktivitu voči cieľovým bunkám mykobaktérií. V novších štúdiách, kde sa používal β-2 mikroglobulín- a CD8-deficientné myši, sa na poskytnutie ochrany proti *M. tuberculosis* ukázali ako kritické odozvy CTL [Flynn a ďalší, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12013; Flynn a ďalší, 1993, J. Exp. Med. 178, 2249; Cooper a ďalší, 1993, J. Exp. Med. 178, 2243]. Naopak sa zdá, že B-lymfocyty sa procesu nezúčastňujú a pasívny prenos antimykobakteriálnych protilátok ochranu neposkytuje. Preto musia účinné vakcíny proti TB vytvoriť imunologické odpovede, sprostredkované bunkami.

Antigénna stimulácia T buniek vyžaduje prítomnosť MHC-

molekúl. Aby získali mykobakteriálne antigény prístup k dráham, ktorými sa antigény vytvárajú, musia byť uvoľnené z baktérie. V infikovaných makrofágoch by toto mohlo byť dosiahnuté sekréciou alebo bakteriálnou lýziou. Mykobaktérie majú veľa potenciálnych T bunkových antigénov a niekoľko z nich je už identifikovaných [Anderson 1994, Dan. Med. Bull. 41, 205]. Niektoré z týchto antigénov sú baktériou vylučované. Všeobecne sa predpokladá, že imunita proti TB je sprostredkovaná CD8+ a CD4+T bunkami, zameranými proti týmto sekrenovaným antigénom. Na modeloch myší a morčaťa bola dosiahnutá ochrana proti infekcii baktériami TB, merané znížením úbytku telesnej hmotnosti, použitím zmesi vylučovaných mykobakteriálnych antigénov [Pal a Horowitz, 1992 Infect. Immunity 60, 4781; Anderson 1994, Infect. Immunity 62, 2536; Collins, 1994, Veterin. Microbiol. 40, 95].

V baktérii *M. tuberculosis* bolo infikovaných niekoľko potenciálne protektívnych T bunkových antigénov a niektoré z nich sú skúmané ako cieľové miesta pre vakcíny. Posledné práce naznačujú, že prevažujúce T bunkové antigény sú tie proteíny, ktoré sú sekvenované mykobaktériou počas ich pobytu v makrofágoch, ako i) komplex proteínov antigénu 85 (85A, 85B, 85C) [Viker a Harboe, 1992, Microbiol. Rev. 56, 648], ii) 6 kDa proteín zakončený ESAT-6 [Anderson 1994, Infect. Immunity 62, 2536], iii) 38 kDa lipoproteín s homológiou k PhoS [Young a Garbe, 1991, Res. Microbiol. 142, 55;, Andersen, 1992, J. Infect. Dis. 166, 874], iv) 65 kDa GroEL heat-shock proteín [Siva a Lowrie, 1994, Immunol. 82, 244], v) 55 kDa proteín bohatý na prolín a treonín [Romain a ďalší, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5322], a vi) 19 kDa lipoproteín [Faith a ďalší, 1991, Immunol. 74, 1].

Gény pre každý z troch proteínov antigénu 85 (A, B a C) boli klonované a sekvenované [Borremans a ďalší 1989, Infect. Immunity 57, 3123; Content a ďalší, Infect. Immunity 59, 3205; DeWit a ďalší 1994, DNA Seq. 4, 267]. Naviac sú tieto štruktúrne príbuzné proteíny cieľovými miestami pre silné odpovede T-buniek tak po infekcii, ako aj vakcinácii [Huygen a ďalší, 1988, Scand. J. Immunol. 27, 187; Launois

a ďalší, 1991, Clin. Exp. Immunol. 86, 286; Huygen a ďalší, 1992, Infect. Immunity 60, 2880; Munk a ďalší, 1994, Infect. Immunity 62, 726; Launois a ďalší, 1994, Infect. Immunity 62, 3679]. Preto sa proteíny antigénu 85 považujú za dobré cieľové miesta pre vakcíny.

Podstata vynálezu

Na testovanie účinnosti DNA imunizácie pri prevencii ochorenia *M. tb* boli do eukaryotických expresných vektorov klonované sekvencie DNA, kódujúce proteín *M. tb*. Tieto DNA konštrukcie vyvolávajú, pokiaľ sa injikujú zvieratám, imunologickú odpoveď. Imunizované zvieratá sú infikované mykobaktériou, aby bolo možné vyhodnotiť, či priama imunizácia DNA génom (alebo inými génmi *M. tb*) je možné ochrániť pred ochorením, Predmetom tohto vynálezu sú teda nukleové kyseliny, vrátane DNA konštrukcií a RNA transkrriptov, schopné po priamom zavedení do tkaniva zvieraťa injekciou alebo iným spôsobom indukovať expresiu proteínov *M. tb in vivo*. Injekcia týchto nukleových kyselín môže vyvolať imunologickú odpoveď, ktorá má za následok produkciu cytotoxických T-lymfocytov (CTL), špecifických pre antigény *M. tb*, rovnako ako vyvolanie odpovede *M. tb* - špecifických pomocných lymfocytov, ktoré po následnom napadnutí baktériou majú ochranný účinok. Tieto nukleové kyseliny je možné použiť ako vakcíny na indukciu imunity voči *M. tb*, ktorá môže zabrániť infekcii a/alebo zlepšiť priebeh ochorenia, súvisiaceho s *M. tb*.

Tento vynález poskytuje polynukleotidy, ktoré po priamom zavedení stavovcovi *in vivo*, vrátane cicavcov, ako je človek, indukujú expresiu kódovaných proteínov v tele zvieraťa. Termín polynukleotid tu označuje nukleovú kyselinu, ktorá obsahuje nevyhnutné regulačné prvky, takže po zavedení do živého tkaniva stavovca je schopná zamerať bunkové mechanizmy na produkciu translačných produktov, kódovaných génmi, ktoré polynukleotid obsahuje. V jednom z predmetov vynálezu je polynukleotidom polydeoxyribonukleová kyselina, obsahujúca gény *Mycobacterium tuberculosis (M. tb)*, operatívne pri-

pojené k transkripčnému promótoru. V ďalšom uskutočnení vynálezu obsahuje polynukleotidová vakcína polyribonukleovú kyselinu, kódujúcu gény *M. tb*, ktoré sú schopné translácie mechanizmami eukaryotickej bunky (ribozómy, tRNA a inými translačnými faktormi). V prípade, že proteín, kódovaný polynukleotidom, je taký, ktorý sa normálne vo zvieracej bunke s výnimkou patologických stavov nevyskytuje (t.j. nejaký heterológny proteín), napríklad proteín, spojený s *M. tb*, je aktivovaný imunitný systém zvieraťa za vzniku ochrannej imunologickej odpovede. Pretože tieto exogénne proteíny sú produkované vlastnými tkanivami zvieraťa, exprimované proteíny sú spracované hlavným histokompatibilným systémom (MHC) analogickým spôsobom, ako sa vyskytuje pri skutočnej infekcii *M. tb*. Ako ukazuje tento vynález, má to za následok indukciu imunologickej odpovede proti *M. tb*. Polynukleotidy na účely vytvorenia imunologických odpovedí na kódovaný proteín sa tu označujú ako polynukleotidové vakcíny alebo PNV.

Veľa uskutočnení predmetného vynálezu môže odborník v danej oblasti techniky vyvodiť zo špecifikácie. Tak napríklad môžu byť úspešne použité iné transkripčné promótory, terminátory, nosné vektory alebo špecifické génové sekvencie.

Predkladaný vynález poskytuje spôsob použitia polynukleotidu, ktorý po zavedení do tkaniva cicavca indukuje expresiu polynukleotidu *in vivo* a tým je produkovaný kódovaný proteín. Odborníkovi v danej oblasti techniky zrejmé, že je možné vytvoriť variácie a deriváty nukleotidovej sekvencie, kódujúce proteín, ktoré menia sekvenciu aminokyselín kódovaného proteínu. Zmenený exprimovaný proteín môže mať pozmenenú sekvenciu aminokyselín, ale stále ešte vyvolávať imunologickú odpoveď, reagujúcu s mykobakteriálnym proteínom, t.j. byť funkčným ekvivalentom. Naviac môžu byť tiež konštruované fragmenty úplných génov, kódujúce časti alebo úplný proteín. Tieto fragmenty môžu kódovať proteín alebo peptid, vyvolávajúci vznik protilátok, reagujúcich s mykobakteriálnym proteínom a sú preto považované za funkčné ekvivalenty.

V jednom z uskutočnení tohto vynálezu je do expresného vektora zaradený gén, kódujúci génový produkt *M. tb.* Vektor obsahuje transkripčný promótor, rozpoznávaný eukaryotickou RNA polymerázou a terminátor transkripcie, umiestnený na konci sekvencie, kódujúci gén *M. tb.* Vo výhodnom uskutočnení vynálezu je promótorom promótor cytomegalovírusu so sekvenciou intrónu A (CMV-intA), avšak odborníkom v danej oblasti techniky bude zrejmé, že môže byť použité akékoľvek množstvo z veľkého množstva iných známych promótorov ako je silný imunoglobulínový promótor alebo promótory iného eukaryotického génu. Výhodným terminátorom transkripcie je terminátor bovinného rastového hormónu. Výhodná je kombinácia CMVintA-BGH terminátor. Naviac je možné na uľahčenie prípravy prokaryotických buniek s polynukleotidom prípadne zaradiť do expresného vektora pod transkripčnú kontrolu vhodného prokaryotického promótora markér rezistencie k antibiotiku. Môžu byť použité gény na rezistenciu k ampicilínu, neomycínu alebo iným vhodným antibiotikám. Vo výhodnom uskutočnení tohto vynálezu kóduje gén pre rezistenciu k antibiotikám génový produkt na rezistenciu k neomycínu/kanamycínu. Na dosiahnutie vysokej produkcie polynukleotidu rastom v prokaryotických organizmoch je výhodné, pokiaľ vektor obsahuje prokaryotický začiatok replikácie a má vysoký počet kópií. Tieto prvky poskytuje akýkoľvej z veľkého množstva komerčne dostupných prokaryotických klonovacích vektorov. Vo výhodnom uskutočnení tohto vynálezu sú tieto funkcie poskytované komerčne dostupnými vektormi, známymi ako séria pUC. Môže však byť žiadúce odstrániť sekvencie, kódujúce v pUC lacZ a lacI. Je tiež vhodné, keď sa vektory nemôžu replikovať v eukaryotických bunkách. To minimalizuje riziko integrácie sekvencií polynukleotidovej vakcíny do genómu príjemcu.

V ďalšom uskutočnení sa používa expresný vektor pnRSV, pričom ako promótor je použitá časť long terminal repeat (LTR) vírusu Rousovho sarkómu (RSV). V ďalšom uskutočnení sa používa V1, mutovaný vektor pBR322, do ktorého bol klonovaný CMV promótor a BGH terminátor transkripcie. Vo výhodnom uskutočnení tohto vynálezu boli kombinované prvky V1

a pUC19 za vzniku expresného vektora označovaného V1J.

Do vektora V1J, V1JtPA alebo iného požadovaného expresného vektora je klonovaný niektorý iný gén *M. tb*, ktorý môže indukovať imunologické odpovede proti *M. tb* (CTL, pomocné T-lymfocyty a protilátky). V ďalšom uskutočnení je gén pre ampicilínovú rezistenciu z vektora V1J odstránený a nahradený génom pre neomycínovú rezistenciu za vytvorenia vektora V1J-neo, do ktorého môže byť klonovaný niektorý z rozdielnych génov *M. tb* na použitie podľa tohto vynálezu. V ešte ďalšom uskutočnení je vektorom vektor V1Jns, ktorý je rovnaký ako V1J-neo s výnimkou toho, že do jediného reštrikčného miesta Kpn1 v polohe 2114 vektora V1J-neo bolo vložené jedné reštrikčné miesto SfiI. Výskyt SfiI v DNA ľudského genómu je veľmi nízky (približne jedno miesto na stotisíc báz). Tento vektor teda dovoľuje monitorovanie integrácie expresného vektora do hostiteľskej DNA jednoduchým štiepením extrahovanej genomickej DNA enzýmom SfiI. V ďalšom uskutočnení je vektorom vektor V1R. Z tohto dôvodu je odstránené maximálne množstvo DNA a tým je vytvorený vysoko kompaktný vektor. Tento vektor dovoľuje použiť dlhšie inzerty s menšími ohľadmi na to, či sú kódované nežiadúce sekvencie a optimalizuje prijímanie konštrukcie, kódujúceho špecifické vírusové gény, zavedeného okolitého tkaniva, bunkami. Vyššie uvedené modifikácie vektorov a vývojové postupy môžu byť uskutočnené spôsobmi, ktoré sú odborníkom v danej oblasti techniky známe.

Odborník v danej oblasti techniky rozpozná, že jedným z použitia predkladaného vynálezu je poskytnutie systému na testovanie a analýzu *in vivo* rovnako ako *in vitro*, takže môže byť vytvorená korelácia sekvenčnej diverzity *m. tb* s proliferatívnymi odozvami CTL a T-buniek a inými parametrami. Izolácia a klonovanie týchto rôznych génov môže byť uskutočňované odborníkom v danej oblasti techniky známymi spôsobmi. Vynález ďalej poskytuje spôsob na systematickú identifikáciu kmeňov a sekvencií *M. tb* na výrobu vakcín. Zavedenie génov z primárnych izolátov z kmeňov *M. tb* poskytuje imunogén, ktorý indukuje imunologické odpovede proti klinic-

kým izolátom organizmu a spĺňa teda požiadavky, ktoré dosiaľ v danej oblasti techniky nebolo možné splniť. Ďalej, ak sa menia virulentné izoláty, imunogén môže byť podľa potreby zmenený, aby zahrnul nové sekvencie.

V jednom z uskutočnenia tohto vynálezu je gén, kódujúci proteín *M. tb*, priamo pripojený k transkripčnému promótoru. Môže byť žiadúce použiť tkanivové špecifické promótory alebo zosilňujúce sekvencie (enhancery), napríklad enhancery svalovej kreatínkinázy (MCK), aby sa umožnilo obmedziť expresiu polynukleotidu v určitých typoch tkanív. Napríklad myocyty sú terminálne diferencované bunky, ktoré sa nedelia. Integrácia cudzej DNA do chromozómov bude zrejme vyžadovať tak bunkové delenie ako aj syntézu proteínov. Môže byť teda výhodné obmedzenie expresie proteínov na bunky, ktoré sa nedelia, ako sú myocyty. Použitie promótora CMV je však vhodné na dosiahnutie expresie v mnohých tkanivách, do ktorých bol zavedený PNV.

M. tb a iné gény sú s výhodou ligované do expresného vektora, ktorý bol špeciálne optimalizovaný pre nukleotidovú vakcináciu. Elementy obsahujú promótor transkripcie, imunogénne epitópy, ďalšie cistróny, kódujúce gény na zvýšenie alebo moduláciu imunologickej odpovede s ich vlastnými promótormi, terminátorom transkripcie, bakteriálnym začiatkom replikácie a génom na rezistenciu k antibiotiku, ako je opísané vyššie. Vektor môže prípadne obsahovať vnútorné miesta prístupu k ribozómu (ribosome entry sites, IRES) na expresiu polycistrónnej mRNA. Odborníkom v danej oblasti techniky bude jasné, že RNA, ktorá bola transkribovaná *in vitro* na produkciu multicistrónnej mRNA, kódovanej DNA analógmi, je tiež predmetom tohto vynálezu. Na tento účel je žiadúce ako transkripčný promótor použiť také silné promótory RNA polymerázy, ako sú T7 alebo SP6 a uskutočnenie *in vitro* run-on transkripcie s templátom linearizovanej DNA. Tieto metódy sú v danej oblasti techniky dobre známe.

Ochranná účinnosť polynukleotidových imunogénov *M. tb* proti prípadnému napadnutiu baktériami je demonštrovaná imunizáciou DNA podľa tohto vynálezu. To je výhodné, pretože

nie je prítomný žiadny injekčný organizmus, nie je požadovaná replikácia/usporiadanie baktérie a je dovolená voľba determinantmi. Naviac pretože sekvencia mykobakteriálnych génových produktov môže byť konzervovaná medzi rôznymi kmeňmi *M. tb*, je získaná ochrana proti budúcemu napadnutiu iným kmeňom *M. tb*.

Injekcia expresného vektora DNA, kódujúceho antigén 85A, B alebo C môže mať za následok vytvorenie významnej ochrannej imunity proti budúcemu napadnutiu. Zvlášť môžu byť vytvárané odpovede špecifických CTL a pomocných T-lymfocytov.

Pretože každý z génových produktov *M. tb* vykazuje vysoký stupeň konzervácie medzi rôznymi kmeňmi *M. tb* a pretože imunologické odpovede môžu byť vytvárané ako odpoveď na intracelulárnu expresiu a spracovanie MHC, očakáva sa, že veľa konštrukcií *M. tb* PNV dá vzniknúť imunologickým odpovediam so skríženou reaktivitou.

Vynález poskytuje prostriedok na indukciu heterológnej ochrannej imunity bez potreby samoreplikujúceho prostriedku alebo pomocnej látky. Vytváranie vysokého titru protilátok proti exprimovaným proteínom po injekcii virálneho proteínu a DNA ľudského rastového hormónu [Tang a ďalší, Nature 356, 152, 1992] ukazuje, že ide o ľahký a vysoko účinný prostriedok na vytváranie vakcín, založených na protilátkach, buď oddelene alebo v kombinácii s vakcínami cytotoxických T-lymfocytov a pomocných T-lymfocytov, zameraných proti konzervovaným antigénom.

Ľahkosť produkcie a čistenia konštrukcií DNA je zrejmá v porovnaní s tradičným čistením proteínov a umožňuje vytváranie kombinovaných vakcín. Tak môžu byť pripravené viacnásobné konštrukcie, napríklad komplexné gény antigénu 85 a môžu byť pripravené akékoľvek iné gény *M. tb* vrátane génov, ktoré nepochádzajú z *M. tb*, môžu miešané a podávané spoločne. Naviac po injekcii DNA zachovaná expresia proteínov [H. Lin a ďalší, Circulation 82, 2217 (1990); R. N. Kitsis a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88, 4138 (1991); E. Hansen a ďalší FEBS Lett. 290, 73 (1991); S. Jiao

a ďalší, Num. Gene Therapy 3, 21 (1992); J. A. Wolff a ďalší, Human Mol. Genet. 1, 363 (1992)], môže byť zvýšené zachovanie pamäti B- a T-buniek [D. Gray a P. Matzinger, J. Exp. Med. 174, 969 (1991); S. Oehen a ďalší, tiež tam 176, 1273 (1992)], a tým pripraviť podmienky pre dlhotrvajúcu humorálnu a bunkovú imunitu.

Množstvo exprimovanej DNA alebo prepisovanej RNA na zavedenie vakcíny do príjemcu môže kolísať vo veľmi širokom rozmedzí a môže závisieť na sile promótorov transkripcie a translácie. Naviac veľkosť imunologickej odpovede môže závisieť na stupni expresie proteínu a na imunogenicite exprimovaného génového produktu. Všeobecne sa účinné množstvá pohybujú v rozsahu od približne 1 ng až 5 mg, 100 ng až 2,5 mg, 1 µg až 750 µg a s výhodou približne 10 µg až 300 µg DNA, ktoré sú podávané priamo do svalového tkaniva. Vhodné sú tiež podkožné injekcie, intradermálne zavedenie, vtláčanie cez kožu a iné spôsoby podávania, ako je intraperitoneálne, intravenózne alebo inhalačné. Taktiež sa predpokladá, že je možné uskutočňovať posilňovacie očkovanie. Po vakcinácii polynukleotidovým imunológom *M. tb* sa tiež predpokladá udržovanie proteínovými imunogénmi *M. tb*, ako je komplex antigénu 85. Môže byť tiež výhodné parenterálne podávanie, ako intravenózne, intramuskulárne, subkutánne alebo inými spôsobmi podávanie proteínu interleukín-12 (alebo iných cytokínov, napríklad GM-CSF), súčasne alebo po parenterálnom podaní PNV podľa tohto vynálezu.

Polynukleotid môže byť nahý, t.j. nespojený s inými proteínmi, pomocnými látkami alebo inými prostriedkami, ktoré ovplyvňujú imunitný systém príjemcu. V tomto prípade je žiadúce, aby bol polynukleotid vo fyziologicky prijateľnom roztoku, ako je sterilný fyziologický roztok alebo sterilný pufrovaný fyziologický roztok, pričom roztoky nemajú byť na tieto látky obmedzené. DNA môže byť alternatívne asociovaná s lipozómami, ako sú lecitínové lipozómy alebo iné v danej oblasti techniky známe lipozómy za vzniku zmesi DNA-lipozóm, alebo môže byť DNA asociovaná s pomocnými látkami, známymi v danej oblasti techniky, aby bolo dosiahnuté

zosilnenie imunologických odpovedí, ako je proteín alebo iný nosič. Môžu byť tiež použité prostriedky, ktoré uľahčujú vstup DNA do bunky, z ktorých neobmedzujúce príklady ióny vápnika. Tieto látky sa tu všeobecne označujú ako prostriedky uľahčujúce transfekciu a farmaceuticky prijateľné nosiče. V danej oblasti techniky sú známe tiež techniky poťahovania mikroprojektilov polynukleotidom, ktoré sú užitočné tiež v spojení s týmto vynálezom. Na humánne použitie je užitočné, aby konečný produkt DNA bol vo farmaceuticky prijateľnom nosiči alebo pufrovanom roztoku. Farmaceuticky prijateľné nosiče alebo roztoky pufrov sú v danej oblasti techniky známe a zahrnujú prípravky, opisované v rade textov, ako je Remington's Pharmaceutical Sciences.

V ďalšom uskutočnení je vynálezom polynukleotid, ktorý obsahuje susediace sekvencie nukleových kyselín, ktoré sú po zavedení uvedeného polynukleotidu do eukaryotického tkaniva *in vivo* schopné expresie za vytvorenia génového produktu. Kódovaný génový produkt pôsobí s výhodou buď ako imunostimulant alebo ako antigén, schopný vyvolať imunologickú odpoveď. Sekvencia nukleových kyselín v tomto uskutočnení teda kóduje imunogénny epitóp *M. tb* a prípadne cytokín alebo stimulačný prvok T-bunky, ako napríklad člen proteínovej rodiny B7.

Imunizácia génom má proti imunizácii génovým produktom niekoľko výhod. Prvá je relatívna jednoduchosť, s akou môže byť prirodzený alebo takmer prirodzený antigén predložený imunitnému systému. Cicavčie proteíny, exprimované rekombinantným spôsobom v baktériách, kvasinkách alebo dokonca v cicavčích bunkách často vyžadujú na zaistenie príslušnej antigenicity výrazné úpravy. Druhou výhodou imunizácie DNA je schopnosť imunogénu vstúpiť do procesu MHC triedy I a vzbudiť odpoveď cytotoxickej T-bunky. Imunizácia myší DNA, kódujúcou nukleoproteín (NP) chrípky A vyvolala odpoveď CD8+ na NP, ktorá myši chránila proti napadnutiu heterológnymi kmeňmi chrípky (Montgomery, D. L. a ďalší, vyššie; Ulmer, J. a ďalší, vyššie).

Existuje silný dôkaz na to, že bunkami sprostredkovaná

imunita je dôležitá pri kontrole infekcie *M. tb* [Orme a ďalší, 1993, J. Infect. Dis. 167, 1481; Cooper a ďalší 1993, J. Exp. Med. 178, 2243; Flynn a ďalší, 1993, J. Exp. Med. 178, 2249; Orme a ďalší, 1993, J. Immunol. 151, 518]. Pretože imunizácia DNA môže vyvolať tak humorálnu, ako aj bunkovú imunitnú odpoveď, jej najväčšou výhodou môže byť to, že poskytuje relatívne jednoduchý spôsob preskúmať veľké množstvo génov *M. tb* na ich schopnosť vakcinácie.

Imunizácia injekciou DNA tiež dovoľuje, ako je diskutované vyššie, pohotové vytvorenie viaczložkových subjednotkových vakcín. Nedávno bola ohlásená súbežná imunizácia väčším množstvom génov chrípky (Donnelly, J. a ďalší, 1994, Vaccines, str. 55 až 59). Vloženie génov, ktorých produkty aktivujú odlišné časti imunitného systému, do vakcíny proti *M. tb*, môže tiež poskytnúť dobrú ochranu proti budúcemu napadnutiu.

Vakcíny podľa predkladaného vynálezu sú použiteľné na podávanie domácim alebo hospodárskym zvieratám rovnako ako človeku. Vakcíny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na prevenciu a/alebo liečenie infekcie akýchkoľvek hospodárskych zvierat, vrátane, ale nie obmedzene na hovädzí dobytok chovaný na mlieko, ktorý je náchylný na mykobakteriálnu infekciu. Techniky podávania týchto vakcín zvieratám a ľuďom sú známe odborníkom vo veterinárnom, prípadne humánnom lekárstve.

Nasledujúce príklady majú ilustrovať predkladaný vynález, bez toho aby ho mali akokoľvek obmedzovať.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 - všeobecný princíp klonovania génov *M.tb* do expresných vektorov.

Obr. 2 - vektorová mapa V1Jns-tPA85A.C1.

Obr. 3 - vektorová mapa V1Jns.85A.C2.

Obr. 4 - vektorová mapa V1Jns.85A.C3.

Obr. 5 - vektorová mapa V1Jns.tPA85B.C1.

Obr. 6 - vektorová mapa V1Jns.tPA85C.C1.

Obr. 7 - overenie N-koncovej sekvencie konštrukcií.

Obr. 8 - expresia proteínov *M.tb* v tkanivovej kultúre.

Obr. 9 - produkcia protilátok špecifických proti antigénu 85A v DNA - vakcinovanej myši.

Obr. 10 - produkcia IL-2 v BALB/c myšiach Tb DNA vakcínou.

Obr. 11 - produkcia IL-2 v C57BL/6 myšiach Tb DNA vakcínou.

Obr. 12 - produkcia IFN-γ v BALB/c myšiach Tb DNA vakcínou.

Obr. 13 - produkcia IFN-γ v C57BL/6 myšiach Tb DNA vakcínou.

Obr. 14 - chybajúca produkcia IL-4 v BALB/c myšiach spôsobená Tb DNA vakcínou.

Obr. 15 - chybajúca produkcia IL-6 v BALB/c myšiach spôsobená Tb DNA vakcínou.

Obr. 16 - chybajúca produkcia IL-10 v BALB/c myšiach spôsobená Tb DNA vakcínou.

Obr. 17 - zníženie multiplikácie BCG v pľúcach C57BL/6 myší, vakcinovaných Tb DNA vakcínou.

Obr. 18 - zníženie multiplikácie BCG v pľúcach BALB/c myší, vakcinovaných Tb DNA vakcínou.

Obr. 19 - zníženie multiplikácie BCG v slezine BALB/c myší, vakcinovaných Tb DNA vakcínou.

Obr. 20 - zníženie multiplikácie BCG v slezine C57BL/6 myší, vakcinovaných Tb DNA vakcínou.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Vektory na produkciu vakcíny

A) Expresný vektor V1

Expresný vektor V1 bol konštruovaný z pCMVIE-AKI-DHFR [Y. Whang a ďalší, J. Virol. 61, 1796 (1987)]. Gény AKI

a DHFR boli odstránené štiepením vektora EcoRI a samovoľnou ligáciou. Tento vektor neobsahuje v CMV promótore intrón A, takže bol pridaný ako fragment PCR, ktorému chýbalo vnútorné štiepiace miesto SacI (v polohe 1855 podľa číslovania v: B. S. Chapman a ďalší. Nuc. Acids Res. 19, 3979 (1991)). Templát, použitý pre rekcie PCR, bol pCMVintA-Lux, vyrobený ligáciou fragmentov HindIII a NheI z pCMV6a120 [viď. B.S. Chapman a ďalší, vyššie], ktorý zahrnuje zosilňujúcu sekvenciu/promótor hCMV-IE1 a intrón A, do štiepiacich miest HindIII a XbaI plazmidu pBL3 za vytvorenia pCMVIntBL. Fragment luciferázového génu s dĺžkou 1881 párov báz (HindIII-SmaI Klenow filled-in) z RSV-Lux [J. R. de Vet a ďalší, Mol. Cell Biol. 7, 725, 1987] bol klonovaný do reštrikčného miesta SalI plazmidu pCMVIntBL, ktorý bol doplnený Klenowovým fragmentom a vystavený pôsobeniu fosfatázy.

Priméry, ktoré premostili intrón A, sú:
5' primér, SEQ.ID:1:
5'-CTATATAAGCAGAG CTCGTTTAG-3';
3' primér, SEQ.ID:2: 5'-GTAGCAAAGATCTAAGGACGGTGA CTGCAG-3'.

Priméry, použité na odstránenie štiepiaceho miesta SacI sú:
fragment v správnom zmysle primér, SEQ.ID:3:
5-GTATGTGTCTGAAAATGAGCGTGGAGATTGGGCTGGCAC-3'
a fragment v opačnom zmysle primér, SEQ.ID:4:
5'-GTGCGAGCCCAATCTCCACGCTCATTTTCAGACACA TAC-3'.

PCR fragment bol štiepený enzýmami SacI a BglII a vložený do vektora, ktorý bol štiepený rovnakými enzýmami.

B) Expresný vektor V1J

Účelom vytvorenia vektora V1J bolo odstrániť úseky promótora a terminátora transkripcie z vektora V1, aby ich bolo možné umiestniť do lepšie definovanej zostavy, vytvoriť kompaktnejší vektor a zlepšiť výťažky pri čistení plazmidu.

V1J je odvodený z vektorov V1 a pUC18, komerčne dostup-

ného plazmidu. V1 bol štiepený reštrikčnými enzýmami SspI a EcoRI za vytvorenia dvoch fragmentov DNA. Menší z týchto fragmentov, ktorý obsahuje promótor CMVintA a terminátor transkripcie bovinného rastového hormónu (BGH), ktorý riadi expresiu heterológnych génov, bol vyčistený z gélu na agarózovej elektroforéze. Konce tohto fragmentu DNA boli potom "zatupené" za použitia T4 DNA polymerázy, aby bola umožnená jeho ligácia do ďalšieho DNA fragmentu, s "tupými" koncami.

Ako základ tohto expresného vektora bol použitý plazmid pUC18. Je známy tým, že poskytuje vysoké výťažky plazmidu, má dobré definovanú sekvenciu a funkciu a malú veľkosť. Čiastočným štiepením reštrikčným enzýmom HaeII bol z tohto vektora odstránený celý lac operon. Zvyšný plazmid bol čistený na agarózovom géli, zatupený T4 DNA polymerázou, štiepený teľacou žalúdočnou alkalickou fosfatázou a ligovaný do elementu CMVintA/BGH, ktorý bol opísaný vyššie. Boli získané plazmidy, ktoré mali obe možné orientácie promotórových prvkov vzhľadom na kostru pUC. Jeden z týchto plazmidov poskytoval oveľa vyššie výťažky DNA v baktérii *E. coli* a bol označený VJ. Štruktúra tohto vektora bola overená sekvenčnou analýzou spojovacích oblastí a bolo ukázané, že poskytuje porovnateľnú alebo vyššiu expresiu heterológnych génov v porovnaní s V1.

C) Expresný vektor V1Jneo

Bolo nevyhnutné odstrániť gén amp^r, používaný na selekciu baktérie, nesúci V1J, pretože vo veľkoobjemových fermentoroch môže byť ampicilín nežiadúci. Gén amp^r bol z kostry pUC V1J odstránený štiepením reštrikčnými enzýmami SspI a Eam1105I. Zvyšný plazmid bol čistený agarózovou elektroforézou, zatupený T4 DNA polymerázou a štiepený teľacou žalúdočnou alkalickou fosfatázou. Pomocou reštrikčného enzýmu PstI bol z plazmidu pUC4J vyštiepený gén kan^r, odvodený od transpozónu 903, čistený agarózovou elektroforézou a zatupený T4 DNA polymerázou. Tento fragment bol ligovaný s kostrou V1J, čím boli odvodené plazmidy s génom kan^r v oboch orien-

táciách, ktoré boli označené ako V1Jneo #1 a #3. Sekvencia každého z týchto plazmidov bola potvrdená analýzou reštrikčným enzýmovým štiepením, DNA sekvenovaním spojovacích oblastí a bolo zistené, že produkuje podobné množstvo plazmidu ako V1J. Tieto vektory V1Jneo mali tiež porovnateľnú expresiu heterológnych génových produktov ako V1J. Ako expresná konštrukcia bol vybraný V1Jneo #3, ďalej označovaný ako V1Jneo, ktorý obsahoval gén kan^r v rovnakej orientácii ako gén amp^r vo V1J.

D) Expresný vektor V1Jns

Aby bolo umožnené štúdium integrácie, do vektora V1Jneo bolo pridané štiepiace miesto SfiI. Do miesta KnpI vo vnútri sekvencie BGH vektora bol pridaný komerčne dostupný SfiI linker s dĺžkou 13 párov báz (New England BioLabs). V1Jneo bol linearizovaný enzýmom KpnI, vyčistený na géli, zatupený T4 DNA polymerázou a ligovaný do SfiI linkera s tupými koncami. Izoláty klonov boli vybrané reštrikčným mapovaním a overené sekvenovaním cez linker. Nový vektor bol označený V1Jns. Expresia heterológnych génov V1Jns (s miestom SfiI) bola porovnateľná s expresiou rovnakých génov vo V1Jneo (s miestom KpnI).

E) V1Jns-tPA

Aby bolo možné pridať k sekvenovaným a/alebo membránovým proteínom heterológnu vedúcu peptidovú sekvenciu, bol V1Jns modifikovaný, aby zahrnoval vedúcu sekvenciu ľudského tkaniva špecifického plazminogénového aktivátora (tPA). Syntetické komplementárne oligoméry boli spojené a potom ligované do V1Jn, ktorý bol štiepený enzýmom BglII. Oligoméry v správnom a opačnom zmysle boli 5'-GATC ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GA-3', SEQ.ID:5: a 5'-GAT CTC GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC ACA CAG CAG CAG CAC ACA GCA GAG CCC TCT CTT CAT TGC ATC CAT GGT-3', SEQ.ID:6. V oligoméri so správ-

nym zmyslom je podčiarknutá Kozakova sekvencia. Tieto oligoméry majú prekrývajúce sa bázy, kompatibilné na ligáciu do sekvencií, štiepených BglII. Po ligácii je miesto proti smeru BglII zničené, zatiaľ čo druhé miesto v smere BglII je zachované pre následné ligácie. Sekvencie tak spojovacích miest, ako aj celej vedúcej sekvencie tPA, boli overované DNA sekvenovaním. Naviac, aby bolo možné potvrdiť zhodu s optimalizovaným vektorom V1Jns (= V1Jneo so štiepiacim miestom SfiI), bolo v mieste KpnI vo vnútri terminátorovej oblasti BGH vektora V1Jn-tPA vložené miesto SfiI pomocou zatupenia miesta KpnI T4 DNA polymerázou, nasledovaným ligáciou s linkerom SfiI (katalógové #1138, New England BioLabs). Táto modifikácia bola overená reštrikčným štiepením a agarózovou elektroforézou.

F) pGEM-3-X-IRES-B7

(kde X = akýkoľvek antigénny gén). Ako príklad dicistrónnej konštrukcie vakcíny, ktorá poskytuje koordinovanú expresiu génu, kódujúceho imunogén a génu, kódujúceho imunostimulačný proteín, bol pomocou PCR amplifikovaný z bunkovej línie B-lymfómu CH1 (získanej z ATCC) gén murín B7. B7 je členom rodiny proteínov, ktoré poskytujú nevyhnutnú kostimuláciu aktivácie T-buniek antigénom v súvislosti s hlavnými histokompatibilnými komplexmi I a II. CH1 bunky sú dobrým zdrojom B7 mRNA, pretože sú fenotypovo konštitutívne aktivované a B7 je primárne exprimovaný aktivovanými bunkami, produkujúcimi antigén, ako sú B bunky a makrogágy. Tieto bunky boli stimulované *in vitro* použitím cAMP alebo IL-4 a mRNA, pripravenej použitím štandardných postupov s guanidínium tiokyanátom. Syntéza cDNA bola vykonávaná za použitia tejto mRNA pomocou kitu GeneAmp RNA PCR (Perkin-Elmer Cetus) a primérového oligoméru (5'-GTA CCT CAT GAG CCA CAT AAT ACC ATG-3', SEQ.ID:7:), špecifického pre B7, umiestneného v smere od translačného otvoreného čítacieho rámca B7. B7 bol amplifikovaný pomocou PCR za použitia nasledujúcich PCR oligomérov v správnom a opačnom zmysle: 5'-GGT ACA AGA TCT ACC

ATG GCT TGC AAT TGT CAG TTG ATG C-3', SEQ.ID:8: a 5'-CCA CAT AGA TCT CCA TGG GAA CTA AAG GAA GAC GGT CTG TTC-3', SEQ.ID:9:. Tieto oligoméry poskytujú reštrikčné miesta BglII na koncoch inzertu a Kozakovu translačnú iniciačnú sekvenciu, obsahujúcu reštrikčné miesto NCoI a ďalšie miesto NcoI, umiestnené bezprostredne pred 3'-koncovým miestom BglII. Štiepenie enzýmom NCoI poskytlo fragment, vhodný na klonovanie do pGEM-3-IRES, ktorý bol štiepený enzýmom NcoI. Výsledný vektor pGEM-3-IRES-B7, obsahuje kazetu IRES-B7, ktorá môže byť ľahko premenená na V1Jns-X, kde X predstavuje gén, kódujúci antigén.

G) pGEM-3-X-IRES-GM-CSF

(kde X = akýkoľvek antigénny gén). Tento vektor obsahuje kazetu analogickú ako v položke C s výnimkou toho, že na miesto génu B7 je použitý gén pre imunostimulujúci cytokín, GM-CSF, GM-CSF je cytokín na diferenciáciu a stimuláciu makrofágov, o ktorom bolo zistené, že vyvoláva silné antitumorové aktivity T-buniek *in vivo* [G. Dranoff a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3539 (1993)].

H) pGEM-3-X-IRES-IL-12

(kde X = akýkoľvek antigénny gén). Tento vektor obsahuje kazetu analogickú ako v položke C s výnimkou toho, že na miesto génu B7 je použitý gén pre imunostimulujúci cytokín IL-12. Ukázalo sa, že IL-12 má dôležitú úlohu pri posune imunologických odpovedí smerom k bunkovým dráham, kde sú dominujúce T-bunky, čo je v protiklade k humorálnym imunologickým odozvám [L. Alfonzo a ďalší, Science, 263, 235, 1994].

Príklad 2

Príprava vektora V1R

Pri pokračujúcom úsilí o optimalizáciu vakcinačného vektora bol pripravený derivát V1Jns, označený ako V1R. Cieľom konštrukcie tohto vektora bolo získať vakcinačný vektor bez nepotrebných sekvencií DNA s minimálnou veľkosťou, ktorý si stále zachováva celkovo optimalizované expresné charakteristiky heterológneho génu a vysoké výťažky plazmidu, ako je tomu u V1J a V1Jns. Z literatúry aj experimentálne bolo zistené, že 1) bez ovplyvnenia výťažku plazmidu z baktérie je možné odstrániť oblasti v kostre pUC, obsahujúcej začiatok replikácie *E. coli.*; 2) môže byť odstránená 3'-oblasť génu kan^r, ktorá nasleduje po otvorenom čítacom rámci kanamycínu, pokiaľ na jej miesto je vložený bakteriálny terminátor; a 3) ≈300 bp od 3'-polovice terminátora BGH môže byť odstránených bez ovplyvnenia jeho regulačnej funkcie (nasledujúce po pôvodnom reštrikčnom štiepiacom mieste KpnI vo vnútri elementu BGH).

V1R bol konštruovaný za použitia PCR na syntézu troch segmentov DNA z V1Jns, predstavujúcich CMVintA promótor/BGH terminátor, začiatok replikácie a oblasti kanamycínovej rezistencie. Ku každému koncu segmentu boli pridané za použitia PCR oligomérov štiepiace miesta pre reštrikčné enzýmy, jedinečné pre každý segment: SspI a XhoI pre CMVintA/BGH; EcoRV a BamHI pre gén kan^r; a BclI a SalI pre ori^r.

Tieto enzýmové miesta boli zvolené preto, že dovoľujú priamu ligáciu každého z DNA segmentov, odvodeného pomocou PCR bez následnej straty týchto miest: EcoRV a SspI zanechávajú DNA s tupými koncami, ktoré sú kompatibilné pre ligáciu, zatiaľ čo BamHI a BclI zanechávajú komplementárne prekrývajúce sa konce, ako je tomu u SalI a XhoI. Po získaní týchto segmentov pomocou PCR bol každý segment štiepený vhodnými vyššie uvedenými reštrikčnými enzýmami a potom spoločne ligovaný v jedinej reakčnej zmesi, obsahujúcej všetky tri segmenty DNA. ť)-koniec začiatku ori^r bol navrhnutý tak, aby obsahoval T2 rho independentnú terminátorovú sekvenciu, ktorá sa normálne v tejto oblasti nachádza a môže teda poskytnúť terminačnú informáciu pre gén pre kanamycínovú rezistenciu. Identita ligovaného produktu bola potvrdená štiepe-

ním reštrikčnými enzýmami (>8 enzýmov) rovnako ako sekvenovaním DNA ligačných spojení. Výťažky DNA plazmidu a heterológnej expresie za požitia vírusových génov sa u V1R javia podobné ako u V1Jns. Celková redukcia veľkosti vektora, ktorá bola dosiahnutá, je 1346 pb (V1Jns = 4,86 kb; V1R = 3,52 kb).

Sekvencie PCR oligomérov, použité na syntézu V1R (reštrikčné štiepiace miesta sú podčiarknuté a identifikované v hranatých zátvorkách po uvedenej sekvencii):

(1) 5'-GGT ACA AAT ATT GG CTA TTG GCC ATT GCA TAC G-3' [SspI], SEQ.ID:10:,
(2) 5'-CCA CAT CTC GAG GAA CCG GGT CAA TTC TTC AGC ACC-3' [XhoI], SEQ.ID:11:,
(pre segment CMVintA/BGH

(3) 5'-GGT ACA GAT ATC GGA AAG CCA CGT TGT GTC TCA AAA TC-3' [EcoRV], SEQ.ID:12:,
(4) 5'-CCA CAT GGA TCC G TAA TGC TCT GCC AGT GTT ACA ACC-3' [BamHI], SEQ.ID:13:,
(pre génový segment rezistencie proti kanamycínu)

(5) 5'-GGT ACA TGA TCA CGT AGA AAA GAT CAA AGG ATC TTC TTG-3' [BclI], SEQ.ID:14:,
(6) 5'-CCA CAT GTC GAC CC GTA AAA AGG CCG CGT TGC TGG-3' [SalI], SEQ.ID:15:
(pre počiatok replikácie *E. coli*).

Príklad 3

Kultivácia buniek a transfekcia

Na prípravu stabilne transfektovaných bunkových línií, exprimujúcich antigény *M. tb* boli pestované bunky RD (ľudský rhabdomyosarkom ATCC CCL 136) pri 37 °C, 5% CO_2, v modifikovanom médiu Dulbecco's modilied Eagle's mediujm (DMEM), doplnenom 10% teplom inaktivovaného fetálneho bovinného séra,

20m M HEPES, 4 mM L-glutamínu a 100 µg/ml penicilínu a streptomycínu. Bunky boli vysiate v množstve 1,5 x 10^6 buniek/100 mm^2 misku a pestované 18 hodín. Bunky boli transfektované množstvom 10 µg/misku TB konštrukcie a 10 µg kotransfektovanej Cat konštrukcie za použitia kitu CallPhect kit (Pharmacia) a bol uskutočnený glycerolový šok (15 % glycerol in PBS, pH 7,2 po dobu 2,5 min) 5 hodín po prídavku DNA k bunkám. Kultúry boli zozbierané 72 hodín po transfekcii premytím platní 2 x 10 ml ľadového PBS, pH 7,2, prídavkom 5 ml ľadového TEN pufra (40 mM, TRIS-Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) a zoškrabaním. Na analýzu expresie proteínov boli centrifugáty lyzované v 50 µl pufra Single Detergent Lysis Buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,02 % NaN_3, 1 % Nonidet P-40, 100 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinín, 2 µg/ml leupeptín a 1 µg/ml Pepstatín A) a sonikované na ľade (2 až 15 s expozície). Lyzáty boli centrifugované pri 13 000 x g 4 °C, po dobu 10 minút. Koncentrácia proteínu bola určovaná metódou podľa Bradforda, 20 µg proteínu bunkového extraktu bolo nanesených na dráhu polyakrylamidového gélu (Novex) s 10 % TRIS-glycínom, potom prenesených na membránu Immobilon P5 (Millipore). Imunobloty boli ponechané cez noc reagovať s myšacou monoklonálnou protilátkou TD 17-4 v riedení 1:20, [Huygen a ďalší, 1994, Infect. Immunity 62, 363], potom nasledovala 1,5 hodinová reakcia s kozou antimyšacou lgGFc peroxidázou (Jackson) v riedení 1:1000. Bloty boli vyvinuté pomocou kitu ECL (Amersham).

Príklad 4

Klonovanie a príprava DNA

1. Konštrukcia V1Jns-tPA-85A (obsahujúca maturný Ag85A so signálnou sekvenciou tPA) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov.

fragment v správnom zmysle 85A. C1 primér [SEQ.ID.NO.:16]
GG AAG ATC TTT TCC CGG CCG GGC TTG CCG
BglII

fragment v opačnom zmysle 85A primér [SEQ.ID.NO.:17] GGAAGATCTTGTCTGTTCGGAGCTAGGC.

Ag85A z *M.tuberculosis* bol amplifikovaný z plazmidu p85A.tub., ktorý bol pripravený ligáciou fragmentu s dĺžkou 800 bp HindIII do fragmentu 1600 bp HindIII-SphI z obr. 2 podľa Borremans a ďalší, 1989 [Infect. Immunity 57, 3123]. Výsledný inzert 2400 bp bol subklonovaný do miest HindIII a SphI vektora BlueScribe M13+. Celá kodujúca sekvencia a okrajové oblasti v BlueScribe M13+ (VCS/Stratagene) boli amplifikované PCR s uvedenými primérmi v nasledujúcich podmienkach. Každá 100 µl reakcia obsahuje 2,5 U enzýmu Cloned Pfu DNA polymerase (Stratagene), 200 mM dNTP, 0,5 µg každého z primérov a 250 ng templátu DNA v reakčnom pufri, doplnenom enzýmom (Stratagen). Termálny reaktor Hybaid bol naprogramovaný nasledujúcim spôsobom: 5 min denaturácia pri 94 °C nasledovaná 25 cyklami (1 min pri 94 °C, 2 min pri 55 °C a 3 min pri 72 °C), zakončená desaťminútovým predĺžením pri 72 °C.

Amplifikovaná DNA bola štiepená 50 µg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim) po dobu 30 minút pri 37 °C, zahrievaná 10 min pri 95 °C, potom nasledovali 2 fenolové extrakcie (chloroform - izoamylalkohol) a vyzrážaná jedným objemom izopropylalkoholu, premytá dvakrát 70 % etanolom, usušená a rozpustená v 20 µl H_2O. 3 µg amplifikovanej DNA boli štiepené 40 U BglII (Boehringer Mannheim) a 907 bp fragment (v prípade 85A-C 1) bol izolovaný na 1 % agarózovom géli a extrahovaný na "Prep a Gene" (BioRad) podľa inštrukcií výrobcu.

50 ng tohto fragmentu bolo ligovaných do 20 ng BglII štiepeného a defosforylovaného vektora V1Jns-tPA v 10 µl reakcii, obsahujúci 2,5 U enzýmu T4 DNA ligázy (Amersham) v ligačnom pufri po dobu 16 hodín pri 14 °C, transformované do kompetentných buniek DH5 *E. coli* (BRL) a vysiatych na LB agarové médium s obsahom kanamycínu (50 µg/ml). Transformanty boli odpichnuté a ich plazmidová DNA bola štiepená enzýmom BglII (na potvrdenie prítomnosti inzertu) a enzýmom

PvuII na určenie jeho orientácie.

2. Konštrukcia V1Jns-85A [C2] (obsahujúca maturný Ag85A bez signálnej sekvencie) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov:

Fragment v správnom zmysle 85A C2 [SEQ.ID.NO.:18]
GGAAGATCTACC ATG GGC TTT TCC CGG CCG GGC TTG C

Fragment v opačnom zmysle 85A [SEQ.ID.NO.:17]
GGAAGATCTTGCTGTTCGGAGCTAGGC.

Bol použitý rovnaký postup ako v časti 1 okrem toho, že klonovanie bolo uskutočnené do vektora V1Jns.

3. Konštrukcia V1Jns-85A [C3] obsahuje Ag85A s jeho vlastnou signálovou sekvenciou) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov:

Fragment v správnom zmysle 85A C3 [SEQ.ID.NO.:19]
GGAAGATCTACC ATG GCA CAG CTT GTT GAC AGG GTT

Fragment v opačnom zmysle 85A [SEQ.ID.NO.:17]
GGAAGATCTTGCTGTTCGGAGCTAGGC.

Bol použitý rovnaký postup ako v časti 1 okrem toho, že klonovanie bolo uskutočnené do vektora V1Jns.

4. Konštrukcia V1Jns-tPA-85B [C1] (obsahuje Ag85B so signálovou sekvenciou tPA) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov:

Fragment v správnom zmysle 85B [C1] [SEQ.ID.NO.:20]
GGAAG ATC TCC TTC TCC CGG CCG GGG CTG CCG GTC GAG

Fragment v opačnom zmysle 85B [SEQ.ID.NO.:21]
GGAAGATCTAACCTTCGGTTGATCCCGTCAGCC.

Bol použitý rovnaký postup ako v časti 1 okrem toho, že templátom pre PCR bol p85B.tub.

5. Konštrukcia V1Jns-tPA-85C [C1] (obsahuje Ag85C so signálnou sekvenciou tPA) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov:

Fragment v správnom zmysle 85C [C1] [SEQ.ID.NO.:22]
GGAAG ATC TCC TTC TCT AGG CCC GGT CTT CCA

Fragment v opačnom zmysle 85C [SEQ.ID.NO.:23]
GGAAGATCTTGCCGATGCTGGCTTGCTGGCTCAGGC.

Bol použitý rovnaký postup ako v časti 1 okrem toho, že templátom pre PCR bol p85C.tub.

6. Konštrukcia V1Jns-85B [C2] (obsahuje Ag85B bez signálnej sekvencie) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov:

Fragment v správnom zmysle 85B [C2] [SEQ.ID.NO.:24]
GGA AGA TCT ACC ATG GGC TTC TCC CGG CCG GGG CTG C

Fragment v opačnom zmysle 85B [SEQ.ID.NO.:21]
GGAAGATCTTGCCGATGCTGGCTTGCTGGCTCAGGC.

Bol použitý rovnaký postup ako v časti 1 okrem toho, že templátom pre PCR bol p85Bb.tub a že klonovanie sa uskutočňuje do V1Jns.

7. Konštrukcia V1Jns-85C [C2] (obsahuje Ag85C bez signálnej sekvencie) bola uskutočnená za použitia nasledujúcich primérov:

Fragment v správnom zmysle 85C [C2] [SEQ.ID.NO.:25]
GGA AGA TCT ACC ATG GGC TTC TCT AGG CCC GGT CTT C

Fragment v opačnom zmysle 85C [SEQ.ID.NO.:23]
GGAAGATCTTGCCGATGCTGGCTTGCTGGCTCAGGC.

Bol použitý rovnaký postup ako v časti 1 okrem toho, že templátom pre PCR bol p85C.tub a že klonovanie sa uskutočňuje do V1Jns.

Po reštrikčnej analýze sú všetky konštrukcie čiastočne sekvenované pozdĺž spojenia vektorov. Príprava DNA vo veľkom meradle sa uskutočňuje podľa spôsobu, opísaného v (Montgomery, D. L. a ďalší, vyššie).

Plazmidové konštrukcie boli charakterizované reštrikčným mapovaním a sekvenčnou analýzou spojov vektor-inzert (viď. obr. 1 až 6). Výsledky boli v zhode so sekvenčnými dátami, publikovanými pre *M.tb* a ukázali, že iniciačný kodón bol vo všetkých konštrukciách intaktný (obr. 7). Sú tiež ukázané rôzne ďalšie aminokyselinové zvyšky nepríbuzné k *M.tb* Ag85, vložené ako výsledok klonovania.

Príklad 5

Expresia proteínov *M.tb* z plazmidov V1Jns.tPA

Bunky rhabdomyosarkómu (ATCC CCL136) boli vysiate 1 deň pred použitím s hustotou 1,2 x 10^6 buniek na 9,5 cm^2 jamku do šesťjamkových doštičiek pre tkanivové kultúry v médiu DMEM s vysokým obsahom glukózy, doplneným 10 % teplom inaktivovaného fetálneho teľacieho séra, 2 mM L-glutamínu, 25 mM HEPES, 50 U/ml penicilínu a 50 µg/ml streptomycínu. (Všetko od firmy BRL-Gibco). Plazmidová DNA, extrahovaná zmesou fenol:chloroform a čistená centrifugáciou v chloride céznom bola vyzrážaná fosfátom vápenatým za použitia reagencií Pharmacia CellPhect podľa návodu výrobcu okrem toho, že na každú 9,5 cm^2 jamku buniek RD je použitých 5 až 15 µg. Bunky boli šokované glycerolom 6 hodín po prídavku kalciumfosfátovej zrazeniny DNA; po výmene média boli kultúry 2 dni pred zberom inkubované.

Boli pripravené lyzáty transfektovaných kultúr v rozto-

ku 1 x RIPA (0,5 % SDS, 1,0 % TRITON X-100, 1 % deoxycholát sodný, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 25 mM TRIS-HCl pH 7,4) doplnenom 1 µM leupeptínu, 1 µM pepstatínu, 300 nM aprotinínu a 10 µM TLCK a na zníženie viskozity krátko sonikované. Lyzáty boli pre elektroforézu na 10 % géloch Tricine (Novex) a potom prenesené na nitrocelulózové membrány. Imunobloty boli spracované s monoklonálnymi protilátkami proti *M.tb* 17/4 a 32/15 [Huygen a ďalší, 1994, Infect. Immunity 62, 363] a vyvinuté detekčným kitom ECL firmy (Amersham).

Expresia génov komplexu antigénu 85 *M.tb* bola demonštrovaná tranzientnou transfekciou RD buniek. Lyzáty transfektovaných alebo zdanlivo transfektovaných buniek boli frakcionované pomocou SDS PAGE a analyzované imunoblotmi. Obr. 8 ukazuje, že RD bunky, transfektované V1Jns.tPA-85A (C1), V1Jns.tPA-85A (C2), V1Jns.tPA-85A (C3) a V1Jns.tPA-85B (C1) exprimujú imunoreaktívny proteín so zdanlivou molekulovou hmotnosťou približne 30 až 32 kDA.

Príklad 6

Imunizácia PNV a expresia proteínov antigénu 85 *in vivo*

Päť až šesť týždňov staré samice myší BALB/c a C57BL/6 boli anestetizované intraperitoneálnou (i.p.) injekciou zmesou 10 mg ketamínu. HCI (Aveco, Fort Dodge, IA) a 0,5 mg xylazínu (Mobley Corp., Shawnee, KS) vo fyziologickom roztoku. Zadné nohy boli omyté 70% etanolom. Zvieratám bolo trikrát injekciou podaných 100 µl DNA (2 mg/ml) suspendovanej vo fyziologickom roztoku: 50 µl do každej nohy. 17. až 18. deň po imunizácii, boli odobraté vzorky séra a testované na prítomnosť protilátok anti-Ag85. Obr. 9 ukazuje na imunoblote špecifickú reaktivitu séra u myší, ktorým bola podaná Ag85 DNA (C1) ale nie u myší, ktoré dostali kontrolnú DNA bez obsahu génového inzertu (V1J). Reaktivita bola detegovaná až k riedeniu séra aspoň 1:160 proti 300 ng čisteného antigénu 85A (obr. 9b). To ukazuje, že injekcia Ag85 *in vivo*, takže bola schopná vytvárať protilátky tak u myší BALB/c, ako aj

C57BL/6 (B6).

Odpovede antigén 85-špecifických T-buniek

Bunky sleziny vakcinovaných myší boli analyzované na sekréciu cytokínu na odpoveď na špecifickú restimuláciu antigénom, ako je opísané v Huygen a ďalší, 1992 [Infect. Immunity 60, 2880]. Bunky sleziny boli konkrétne inkubované s proteínmi filtrátu kultúry CF) z *M. bovis* BCG čisteného antigénu 85A alebo 20 merného peptidu (p25) zodpovedajúceho známemu epitópu T-buniek u myší C57BL/6 (aminokyseliny 241-260). Myši boli imunizované V1Jns.tPA85A (C1) (100 μg) trikrát v trojdýždňových intervaloch a analyzované 17 dní po poslednej injekcii. Cytokíny boli stanované za použitia biologických testov na IL-2, interferón- (IFN-) a IL-6 a testom ELISA na IL-4 a IL-10. Tak u myší BALB/c, ako aj C57BL/6, vakcinovaných V1Jns.PA85A (C1) bola pozorovaná podstatná produkcia IL-2 a IFN- (obr. 10 až 13). Naviac myši C57BL/6 reagovali aj na epitóp H-2^b-obmedzených T-buniek (obr. 13). U myší, vakcinovaných V1Jns.tPA85A neboli úrovne IL-4, IL-6 a IL-10 zvýšené (obr. 14 až 16). Tieto výsledky ukazujú, že DNA vakcínou bola generovaná odpoveď pomocných T-buniek typu T_h1.

Príklad 8

Ochrana pred napadnutím mykobaktériami

Na testovanie účinnosti DNA vakcíny proti *M.tb*, bola myšiam podaná intravenózna injekcia živých baktérií *M. bovis* BCG (0,5 mg) a zmnoženie BCG bolo analyzované v slezine a pľúcach. Ako kontrola bolo merané zmnoženie BCG pri infekcii myši, s ktorou ešte nebol uskutočnený pokus (primárna infekcia) a pri infekcii myši, ktorá bola vakcinovaná BCG v dobe injekcie DNA (sekundárna infekcia). Počet životaschopných baktérií (colony-forming units, CFU) v pľúcach myší, vakcinovaných V1Jns.tPA85A (C1), bol podstatne znížený

v porovnaní s myšou s primárnou infekciou alebo myšou, vakcinovanou kontrólnou DNA V1J. U myší C57BL/6, bol ôsmy deň po infekcii (obr. 17) znížený CFU o 83 % a u myší BALB/c bol znížený dvadsiaty deň (obr. 18) CFU o 65 %. V slezine bol znížený CFU dvadsiaty deň po infekcii u myší BALB/c a ôsmy deň po infekcii u myší C57BL/6 o približne 40 % (obr. 19). Preto imunologické odpovede, pozorované po injekcii DNA vakcíny *M.tb* poskytli ochranu v modeli s napadnutím živým *M.bovis*.

Výpis sekvencií

(1) Všeobecné informácie:

(i) Žiadateľ: Content Jean
Huygen Kris
Liu Margaret A.
Montgomery Donna
Ulmer Jeffrey

(ii) Názov vynálezu: Polynukleotidová vakcína proti tuberkulóze

(iii) Počet sekvencií: 25

(iv) Adresa pre korešpondenciu:
(A) Adresát: Jack L. Tribble
(B) Ulica: 126 E. Lincoln Ave., P.O.Box 2000
(C) Mesto: Rahway
(D) Štát: New Jersey
(E) Krajina: USA
(F) PSČ: 07065-0907

(v) Počítačová forma:
(A) Typ média: Floppy disk
(B) Počítač: IBM PC compatible
(C) Operačný systém: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: Patentln Release #1.0, Version #1.25

(vi) Údaje o žiadosti:
(A) Číslo žiadosti: US 08/338,992
(B) Dátum podania: 14-11-1994
(C) Klasifikácia:

(vii) Informácie o patentovom zástupcovi:
(A) Meno: Tribble Jack L.
(B) Číslo registrácie: 32,633
(C) REFERENCE/DOCKET NLJNIBER: 19342
(ix) Telekomunikačné informácie:
(A) Telefón: (908) 594-5321
(B) Telefax: (908) 594-4720

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:1:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 23 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:1:

CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAG 23

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:2:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 30 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:2:

GTAGCAAAGA TCTAAGGACG GTGACTGCAG 30

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:3:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 39 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:3:

GTATGTGTCT GAAAATGAGC GTGGAGATTG GGCTCGCAC 39

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:4:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 39 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:4:

GTGCGAGCCC AATCTCCACG CTCATTTTCA GACACATAC 39

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:5:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 78 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:5:

GATCACCATG GATGCAATGA AGAGAGGGCT CTGCTGTGTG 40

CTGCTGCTGT GTGGAGCAGT CTTCGTTTCG CCCAGCGA 78

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:6:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 78 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvecie: SEQ.ID.NO:6:

GATCTCGCTG GGCGAAACGA AGACTGCTCC ACACAGCAGC 40

AGCACACAGC AGAGCCCTCT CTTCATTGCA TCCATGGT 78

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:7:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 27 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:7:

GTACCTCATG AGCCACATAA TACCATG 27

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:8:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 40 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:8:

GGTACAAGAT CTACCATGGC TTGCAATTGT CAGTTGATGC 40

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:9:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 42 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:9:

CCACATAGAT CTCCATGGGA ACTAAAGGAA GACGGTCTGT TC 42

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:10:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 33 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:10:

GGTACAAATA TTGGCTATTG GCCATTGCAT ACG 33

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:11:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 36 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:11:

CCACATCTCG AGGAACCGGG TCAATTCTTC AGCACC 36

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:12:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 38 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:12:

GGTACAGATA TCGGAAAGCC ACGTTGTGTC TCAAAATC 38

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:13:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 37 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:13:

CCACATGGAT CCGTAATGCT CTGCCAGTGT TACAACC 37

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:14:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 39 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:14:

GGTACATGAT CACGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTG 39

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:15:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 34 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:15:

CCACATGTCG ACCCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGG 35

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:16:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 29 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:16:

GGAAGATCTT TTCCCGGCCG GGCTTGCCG 29

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:17:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 28 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:17:

GGAAGATCTT GTCTGTTCGG AGCTAGGC 28

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:18:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 37 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:18:

GGAAGATCTA CCATGGGCTT TTCCCGGCCG GGCTTGC 37

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:19:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 36 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:19:

GGAAGATCTA CCATGGCACA GCTTGTTGAC AGGGTT 36

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:20:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 38 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:20:

GGAAGATCTC CTTCTCCCGG CCGGGGCTGC CGGTCGAG 38

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:21:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 33 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:21:

GGAAGATCTA ACCTTCGGTT GATCCCGTCA GCC 33

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:22:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 32 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:22:

GGAAGATCTC CTTCTCTAGG CCCGGTCTTC CA 32

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:23:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 36 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:23:

GGAAGATCTT GCCGATGCTG GCTTGCTGGC TCAGGC 36

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:24:

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 37 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:24:

GGAAGATCTA CCATGGGCTT CTCCCGGCCG GGGCTGC 37

(2) Informácie pre SEQ.ID.NO:25:
(i) Charakteristika sekvencie:
(A) Dĺžka: 37 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Typ reťazca: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna
(ii) Typ molekuly: DNA (genomická)
(xi) Opis sekvencie: SEQ.ID.NO:25:

GGAAGATCTA CCATGGGCTT CTCTAGGCCC GGTCTTC 37

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polynukleotid, ktorý po zavedení do tkaniva stavovca indukuje jednu alebo viac antimykotických imunologických odpovedí, zvolených z odpovedí protilátok, CTL, pomocných T-lymfocytov a ochranných imunologických odpovedí, kde uvedený polynukleotid obsahuje jeden alebo viac génov, kódujúcich jeden alebo viac mykobakteriálnych proteínov alebo ich funkčných ekvivalentov, pričom uvedené gény sú operatívne pripojené k promótoru transkripcie.

2. Polynukleotid podľa nároku 1, kde uvedený gén kóduje proteín *Mycobacterium tuberculosis* a jeho funkčné ekvivalenty.

3. Polynukleotid podľa nároku 2, kde uvedený gén kóduje proteín, zvolený zo skupiny antigén 85A, B a/alebo C a jeho funkčné ekvivalenty.

4. Spôsob indukcie imunologickej odpovede u stavovca proti mykobakteriálnym epitópom, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje zavedenie polynukleotidu podľa nároku 1 v množstve medzi 1 ng a 5 mg do tkaniva stavovca.

5. Spôsob podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený gén kóduje proteín *Mycobacterium tuberculosis* a jeho funkčné ekvivalenty.

6. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený gén kóduje proteín zvolený zo skupiny antigén 85A, B a C a jeho funkčné ekvivalenty.

7. Vakcína na indukciu imunologických odpovedí proti mykobakteriálnym antigénom, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje polynukleotid podľa nároku 1 a farmaceuticky prijateľný nosič.

8. Vakcína podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedeným antigénom je antigén *Mycobacterium tuberculosis* a jeho funkčné ekvivalenty.

9. Vakcína podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že antigénom je proteín zo skupiny antigén 85A, B a C a jeho funkčné ekvivalenty.

10. Spôsob indukcie imunologických odpovedí proti mykobakteriálnym antigénom, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje zavedenie jedného alebo viacerých izolovaných a vyčistených mykobakteriálnych génov, vyvolávajúcich imunologickú odpoveď, ktorá zabraňuje mykobakteriálnej infekcii a/alebo odstraňuje mykobakteriálne ochorenie, do tkaniva stavovca.

11. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený gén kóduje proteín *Mycobacterium tuberculosis* a jeho funkčné ekvivalenty.

12. Spôsob podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený gén kóduje proteín zvolený zo skupiny antigén 85A, B a C a jeho funkčné ekvivalenty.

13. Polynukleotid, obsahujúci:

a) eukaryotický promótor transkripcie;
b) otvorený čítací rámec, kódujúci jeden alebo viac mykobakteriálnych epitópov, operatívne pripojený k uvedenému promótoru a signál ukončenia translácie; a
c) prípadne obsahuje jeden alebo viac operatívne spojených IRES, jeden alebo viac otvorených čítacích rámcov, kódujúcich jeden alebo viac ďalších génov a jeden alebo viac signálov ukončenia transkripcie.

14. Polynukleotid podľa nároku 13, kde uvedené prídavné gény podľa odstavca c) sú imunomodulačné alebo imunostimulačné gény, zvolené zo skupiny GM-CSF, IL-12, interferón

a člen rodiny B7 kostimulačných proteínov T-buniek.

15. Polynukleotid podľa nároku 13, kde uvedený mykobakteriálny gén podľa odstavca a) kóduje proteín *Mycobacterium tuberculosis* a jeho funkčné ekvivalenty.

16. Polynukleotid podľa nároku 15, kde mykobakteriálny gén podľa odstavca a) kóduje proteín *Mycobacterium tuberculosis*, zvolený zo skupiny antigén 85A, B a C a jeho funkčné ekvivalenty.

17. Polynukleotid podľa nároku 13, kde uvedené prídavné gény podľa odstavca c) sú gény *Mycobacterium tuberculosis*, zvolené zo skupiny antigén 85A, B a C a jeho funkčné ekvivalenty.

18. Spôsob liečby pacienta v prípade potreby polynukleotidom, ktorý po zavedení do tkaniva stavovca indukuje jednu alebo viac antimykobakteriálnych imunologických odpovedí, zvolených z odpovedí protilátok, CTL, pomocných T-lymfocytov a ochranných imunologických odpovedí, pričom uvedený polynukleotid obsahuje gén, kódujúci jeden alebo viac mykobakteriálnych proteínov alebo ich funkčných ekvivalentov, pričom uvedený gén je operatívne pripojený k promótoru transkripcie.

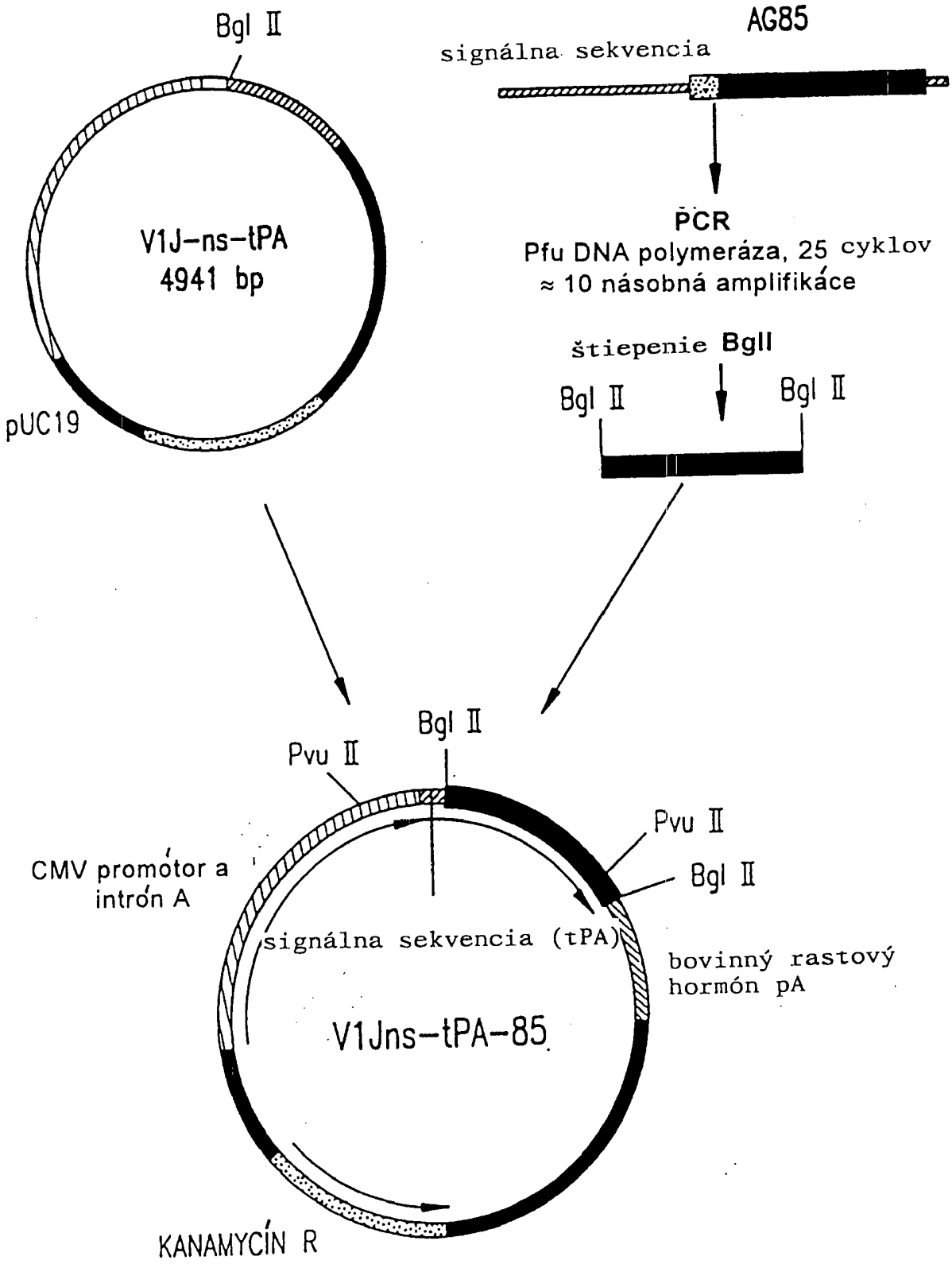
19. Spôsob podľa nároku 18, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený gén kóduje proteín *Mycobacterium tuberculosis* a jeho funkčné ekvivalenty.

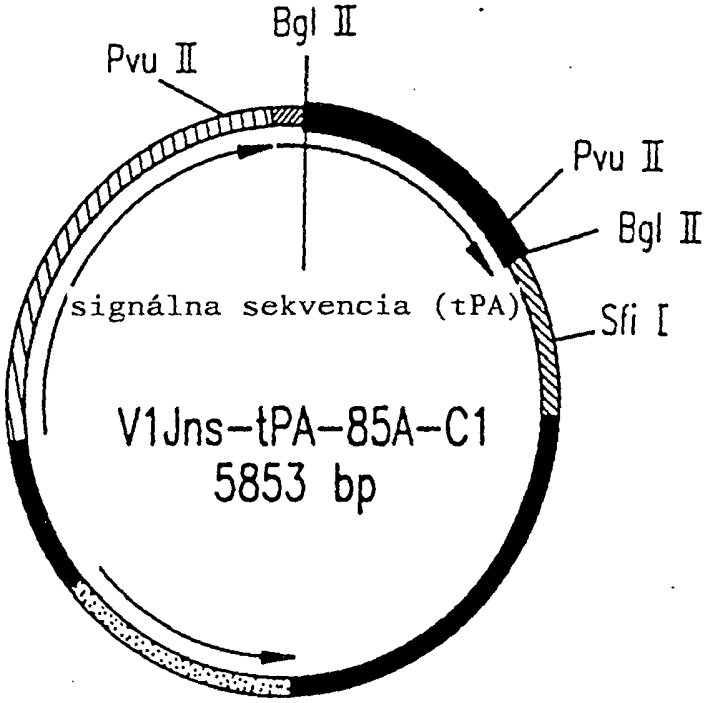
20. Spôsob podľa nároku 198, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený gén kóduje jeden alebo viac proteínov, zvolených zo skupiny antigén 85A, B a C a jeho funkčné ekvivalenty.

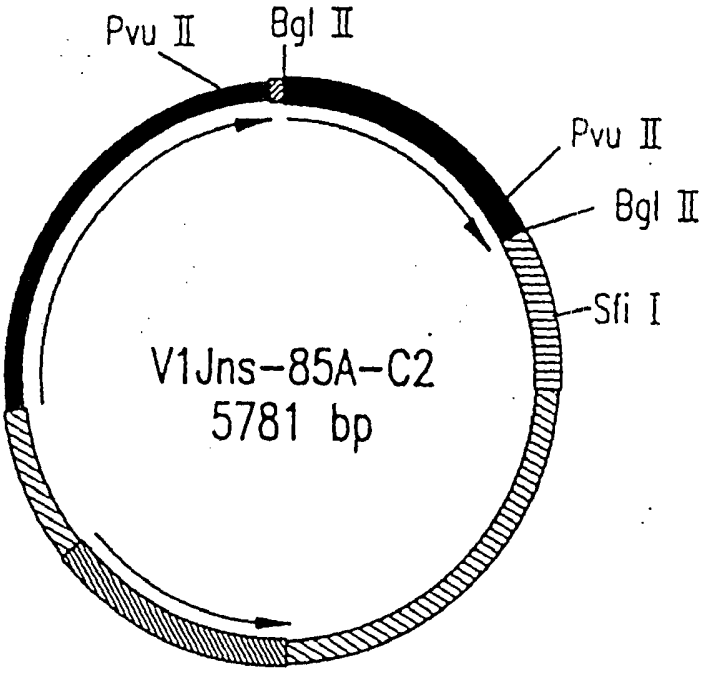
21. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedeným pacientom je domáce alebo hospodárske

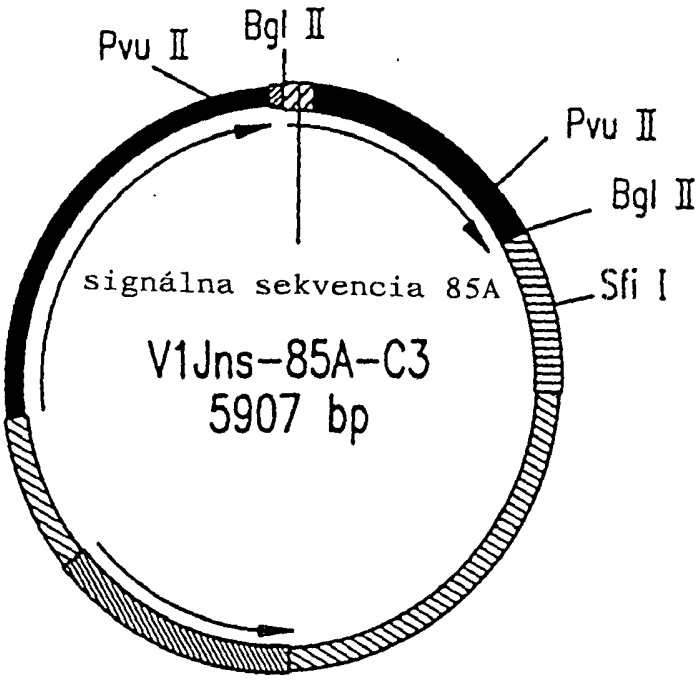
zviera.

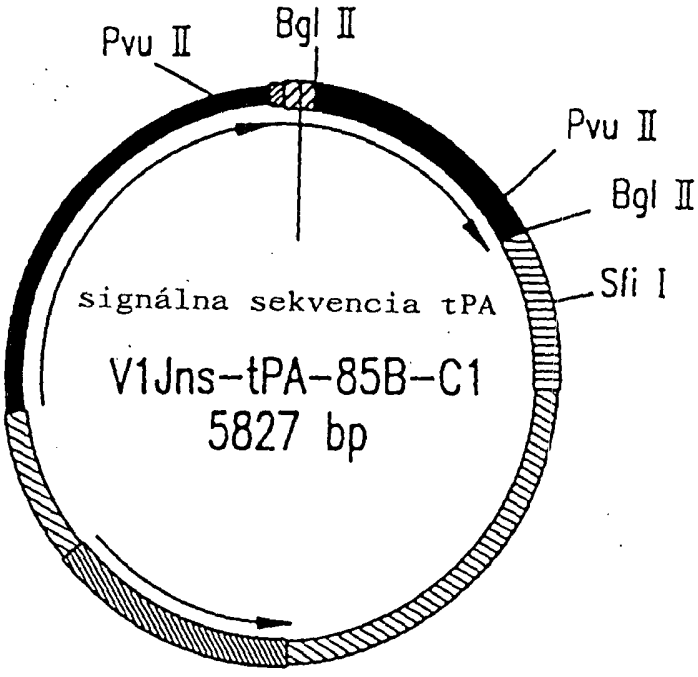
22. Vakcína na indukciu imunologických odpovedí proti mykobakteriálnej infekcii u domácich alebo hospodárskych zvierat, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje polynukleotid podľa nároku 1 a jeho farmaceuticky prijateľný nosič.

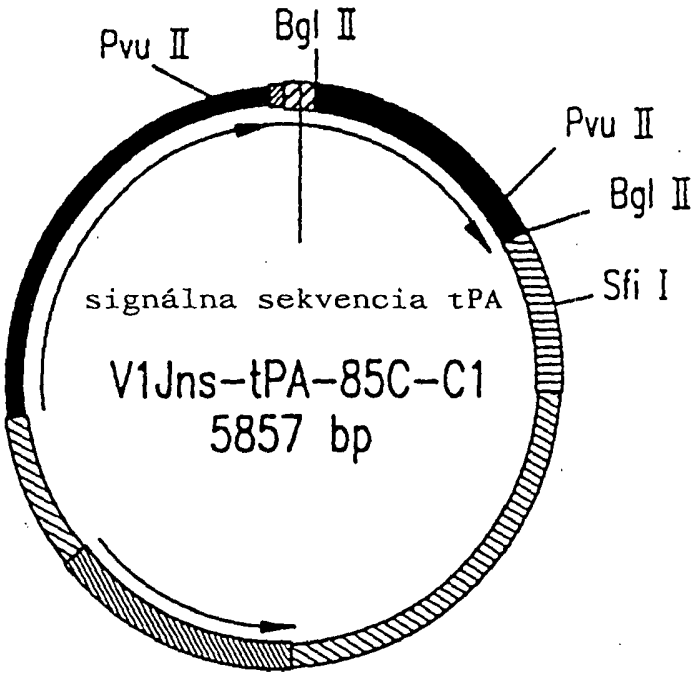

Bgl II
V1J-ns-tPA
4941 bp
pUC19
AG85
signálna sekvencia
PCR
Pfu DNA polymeráza, 25 cyklov
≈ 10 násobná amplifikáce
štiepenie BglII
Bgl II
Bgl II
Bgl II
Pvu II
Pvu II
Bgl II
CMV promótor a intrón A
signálna sekvencia (tPA)
bovinný rastový hormón pA
V1Jns-tPA-85
KANAMYCÍN R


Bgl II
Pvu II
Pvu II
Bgl II
signálna sekvencia (tPA)
Sfi I
V1Jns-tPA-85A-C1
5853 bp


Pvu II
Bgl II
Pvu II
Bgl II
Sfi I
V1Jns-85A-C2
5781 bp


Pvu II
Bgl II
Pvu II
Bgl II
Sfi I
signálna sekvencia 85A
V1Jns-85A-C3
5907 bp


Pvu II
Bgl II
Pvu II
Bgl II
Sfi I
signálna sekvencia tPA
V1Jns-tPA-85B-C1
5827 bp


Pvu II
Bgl II
Pvu II
Bgl II
Sfi I
signálna sekvencia tPA
V1Jns-tPA-85C-C1
5857 bp

85A C1

GTCACCGTCCTTGAGATCAC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys

GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GAG ATC TTT TCC CGG CCG GGC TTG CCG GTG GAG TAC
Gly Ala Val Phe Val | Ser Pro Ser Glu Ile Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr

sig.sekv.tPA NH_2 koniec tPA maturný proteín AG 85 (NH_2 koniec)

85A C2

GTCACCGTCCTTGAGATCTACC ATG GGC TTT TCC CGG CCG GGC TTG CCG GTG GAG TAC
Bgl II Met Gly Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pre Val Glu Tyr

85A C3

CTGCAGTCACCGTCCTTGAGATCTAC ATG GCA CAG CTT GTT GAC AGG GTT CGT
Met Ala Gln Leu Val Asp Arg Val Arg

GGC GCC GTC ACG GGT ATG TCG CGT CGA CTC GTG GTC GGG GCC GTC GGC GCG GCC CTA GTG
Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val

TCG GGT CTG GTC GGC GGC GTC GGT GGC ACG GCG ACC GCG CGG GCA TTT TCC CGG CCG CGC
Ser Gly Leu Val Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala | Phe Ser Arg Pre Gly

85B C1

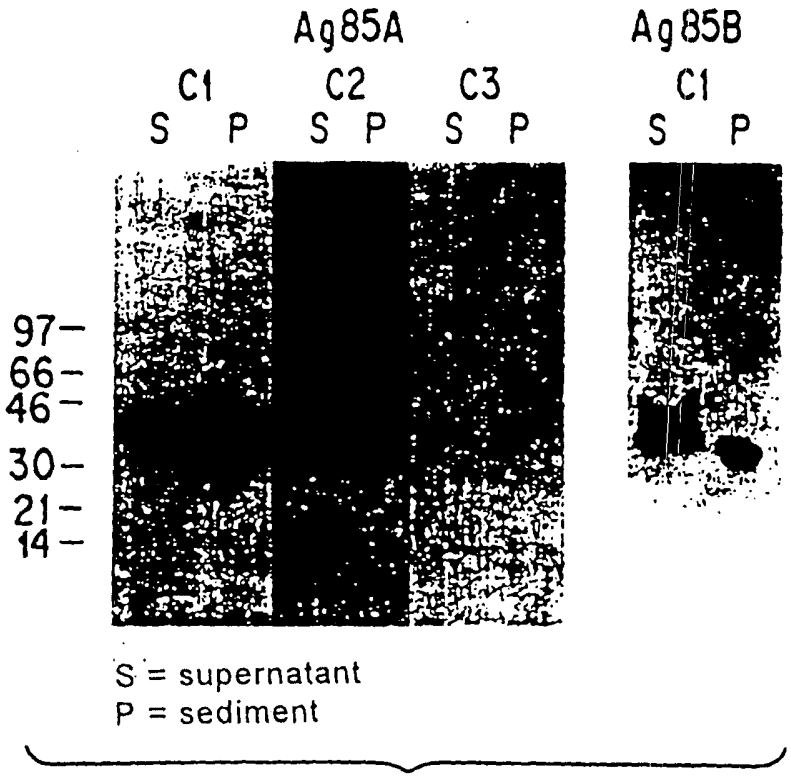
CTGCAGTCACCGTCCTTGAGATCACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu

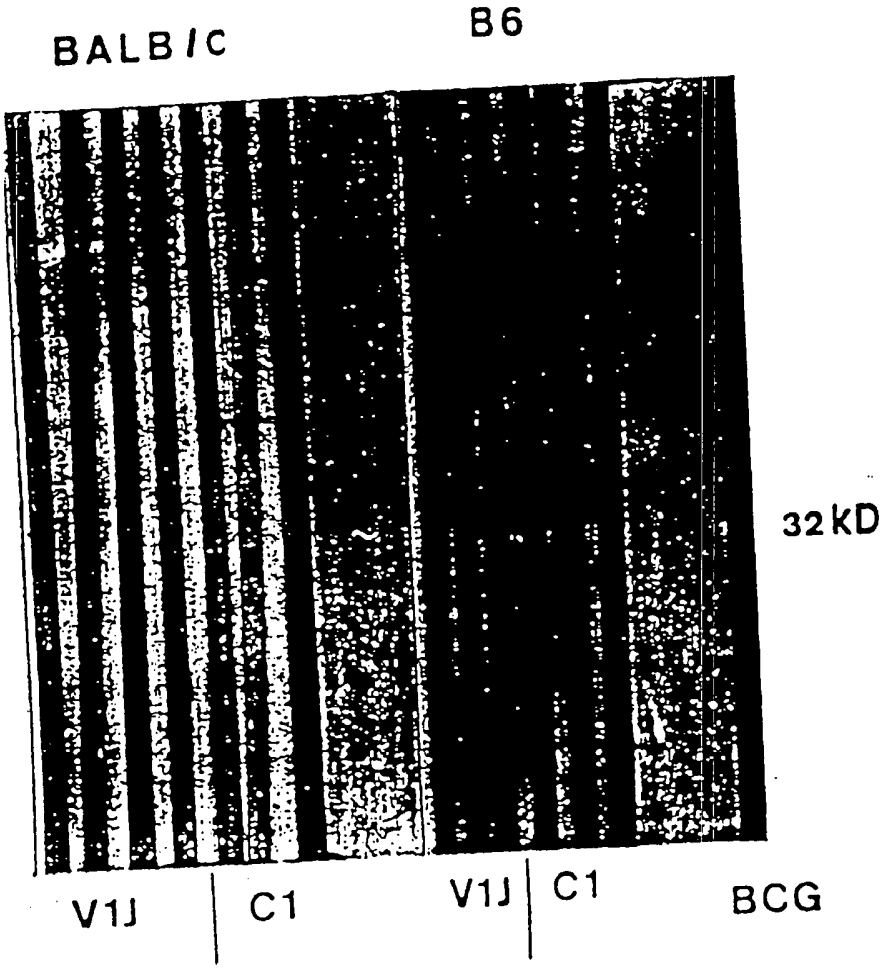
CTG TGT GGA CCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GAG ATC TCC TTC TCC CGG CCG
Leu Cys Gly Ala Val Phe Val | Ser Pro Ser Glu Ile Ser Phe Ser Arg Pro

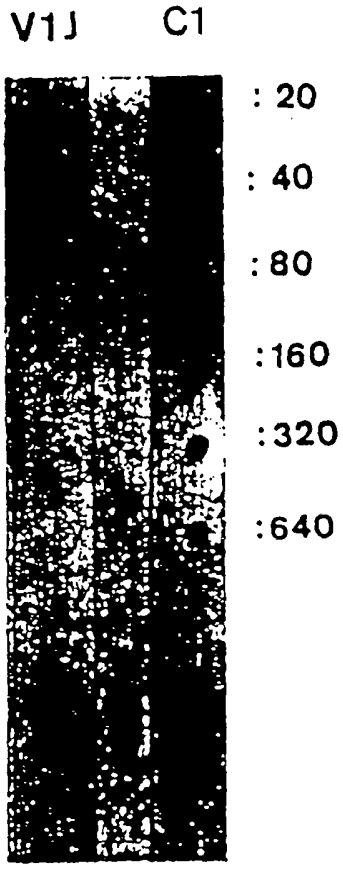
85C C1

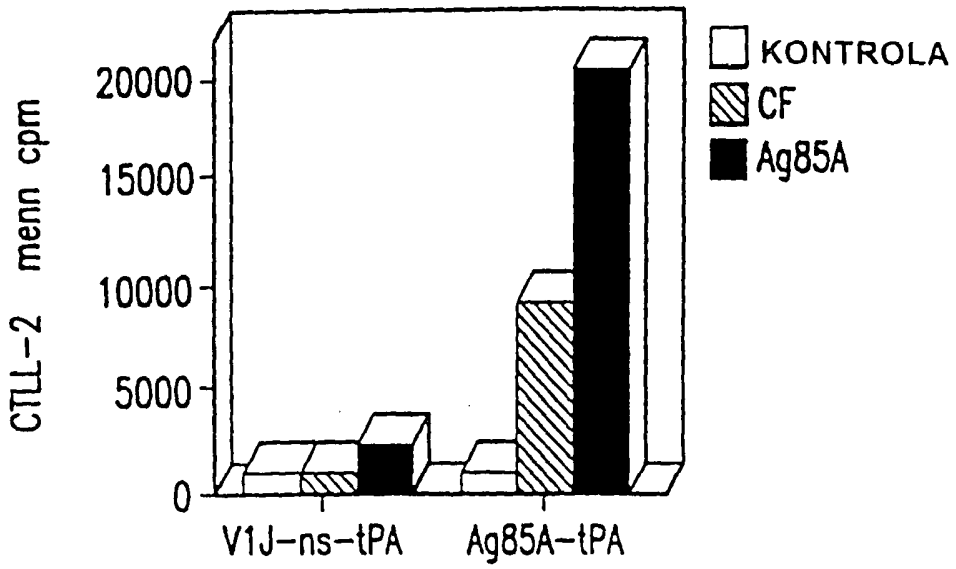
CTGCAGTCACCGTCCTTGAGATCACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Vel Leu Leu

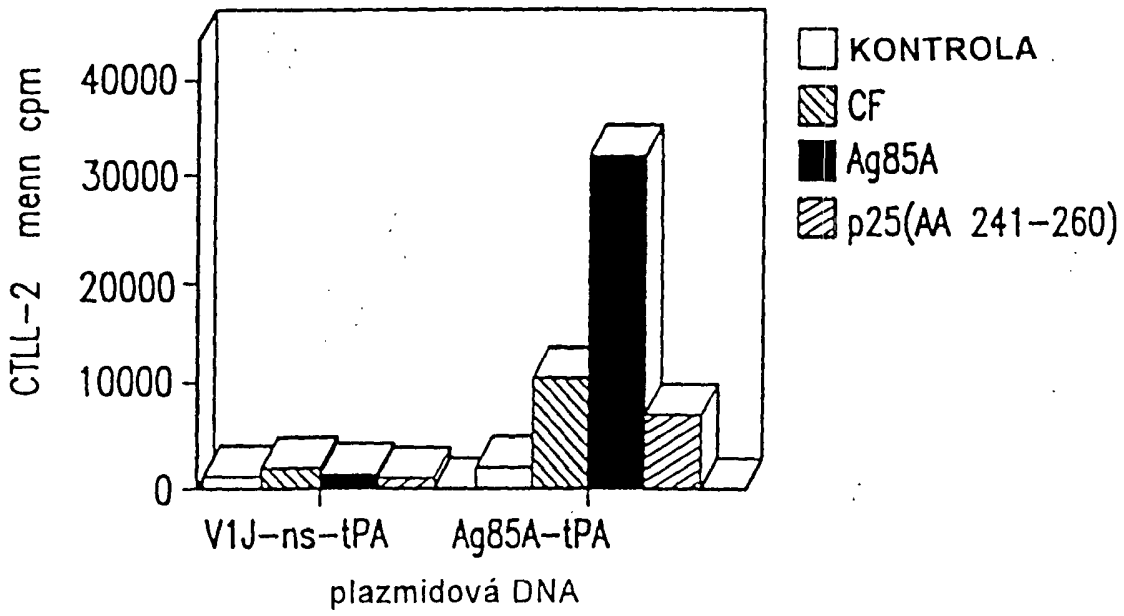
CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG CCC AGC GAG ATC TCC TTC TCT AGG CCC
Leu Cys Gly Ala Val Phe Val | Ser Pro Ser Glu Ile Ser Phe Ser Arg Pro

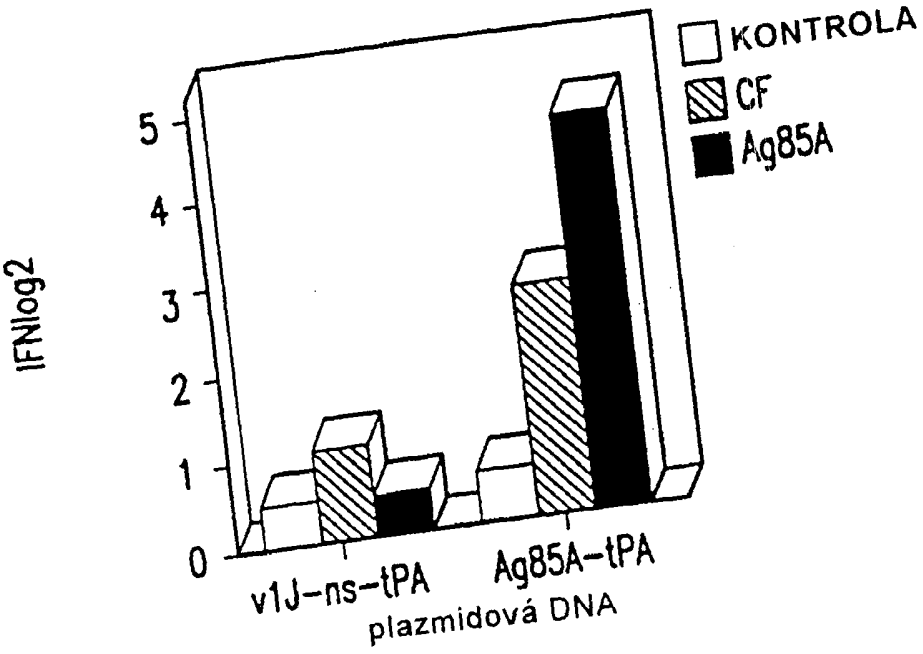

Ag85A
Ag85B
C1
C2
C3
C1
S P S P S P S P
97
66
46
30
21
14
S = supernatant
P = sediment

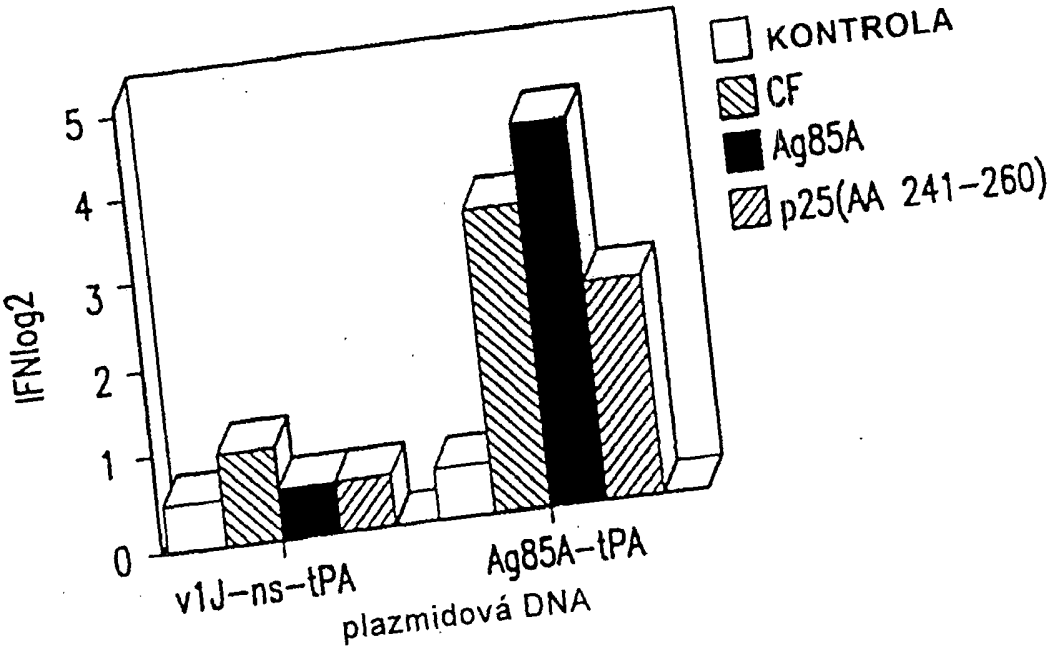

BALB/C
B6
32kD
V1J
C1
V1J
C1
BCG

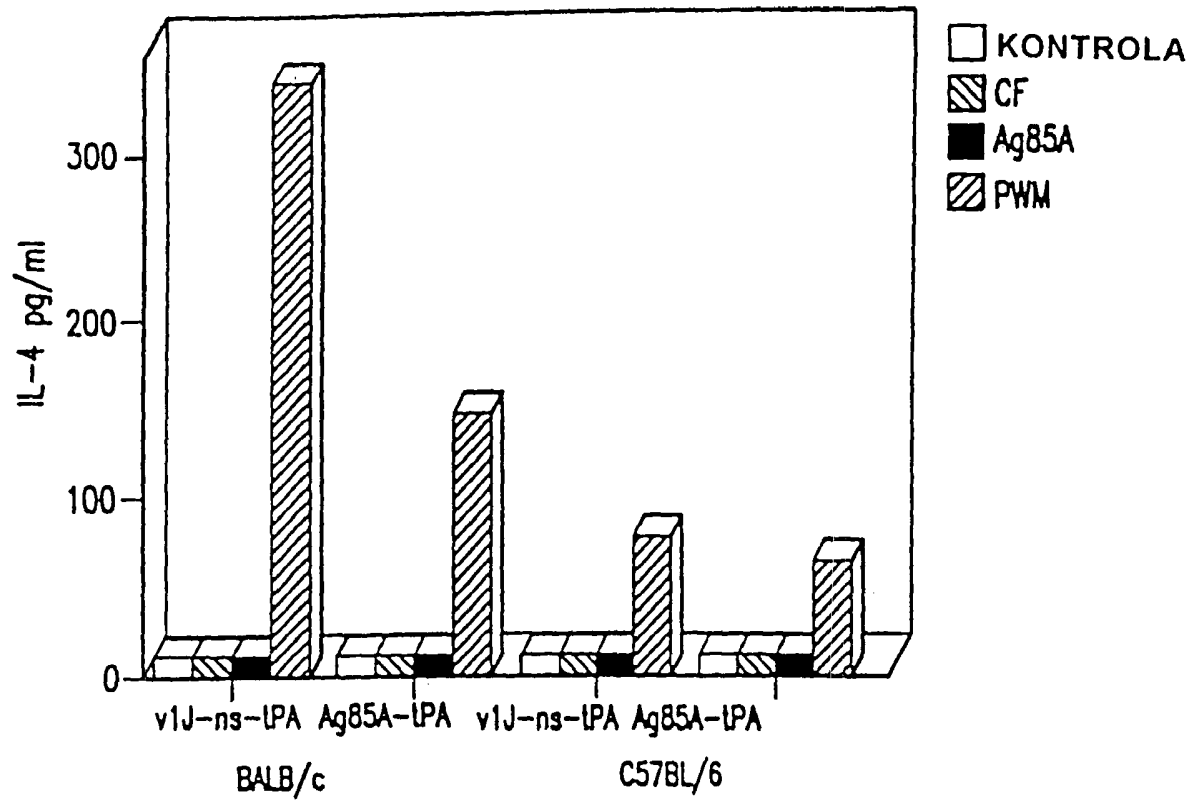

V1J
C1
: 20
: 40
: 80
:160
:320
:640

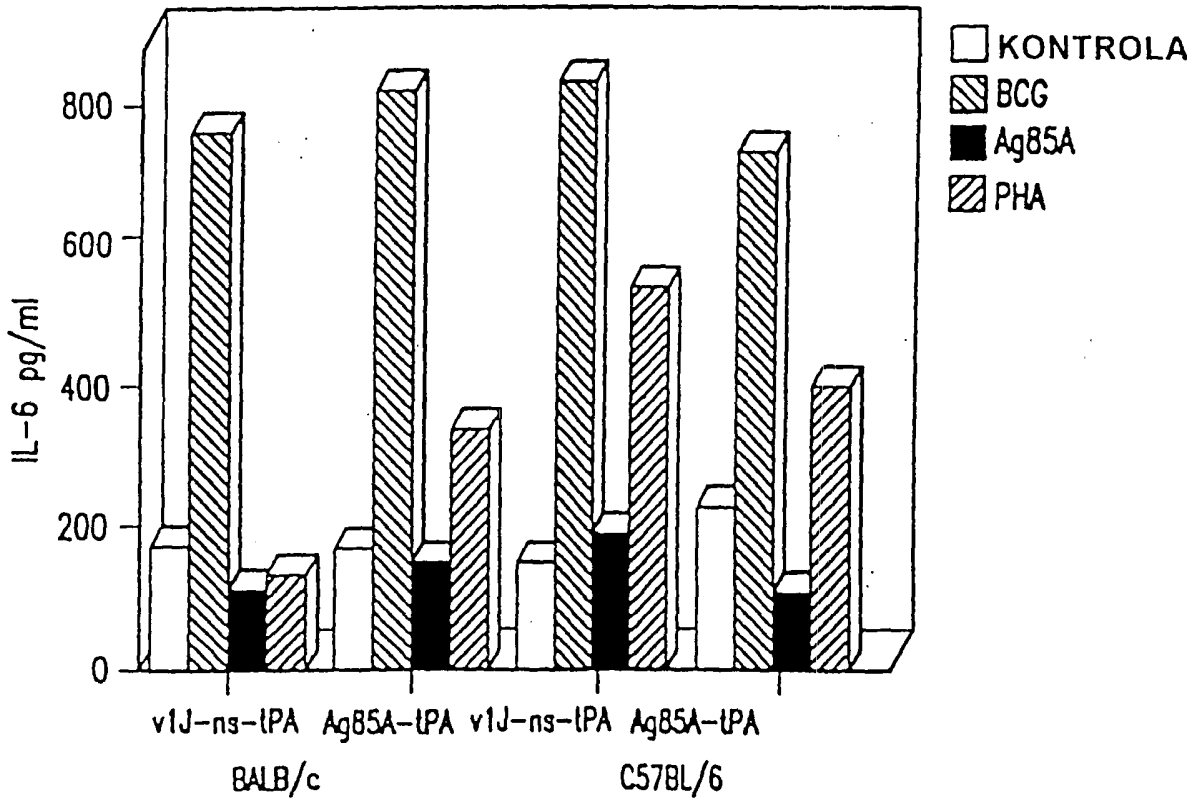

CTLL-2 menn cpm
20000
15000
10000
5000
0
V1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
KONTROLA
CF
Ag85A

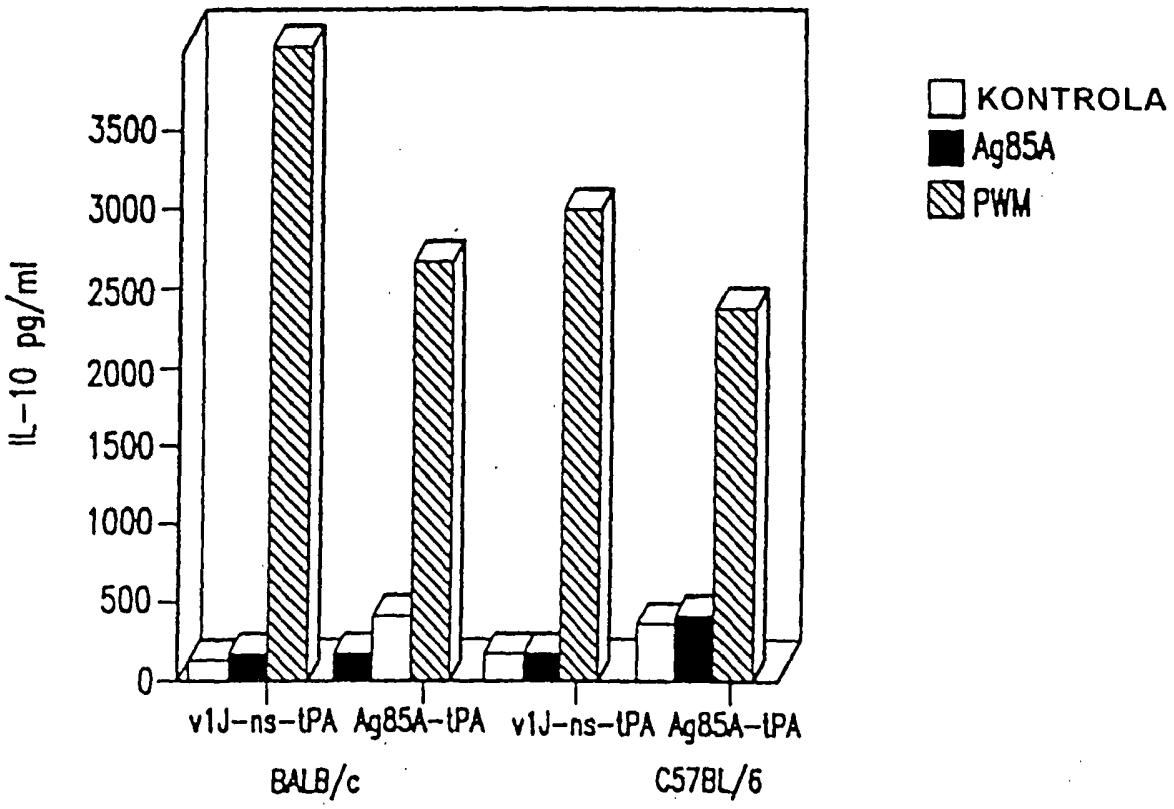

CTLL-2 menn cpm
40000
30000
20000
10000
0
V1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
plazmidová DNA
KONTROLA
CF
Ag85A
p25(AA 241-260)

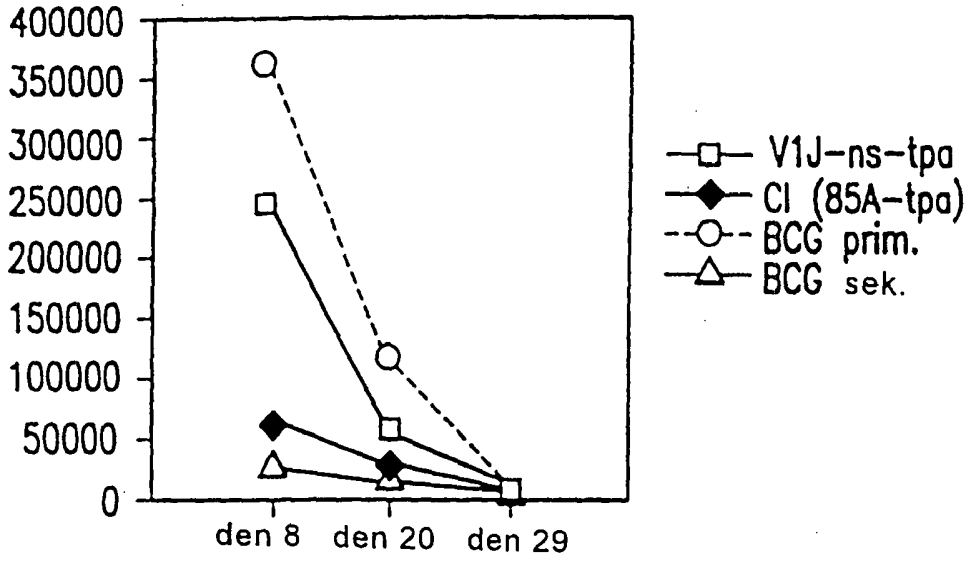

KONTROLA
CF
Ag85A
IFNlog2
5
4
3
2
1
0
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
plazmidová DNA


KONTROLA
CF
Ag85A
p25(AA 241-260)
IFNlog2
5
4
3
2
1
0
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
plazmidová DNA

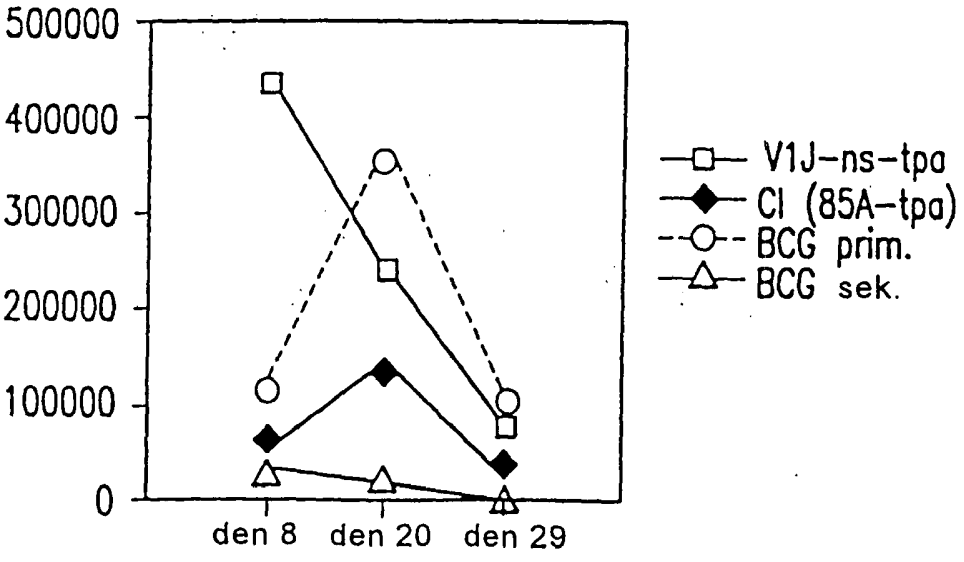

KONTROLA
CF
Ag85A
PWM
IL-4 pg/ml
300
200
100
0
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
BALB/c
C57BL/6


KONTROLA
BCG
Ag85A
PHA
IL-6 pg/ml
800
600
400
200
0
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
BALB/c
C57BL/6

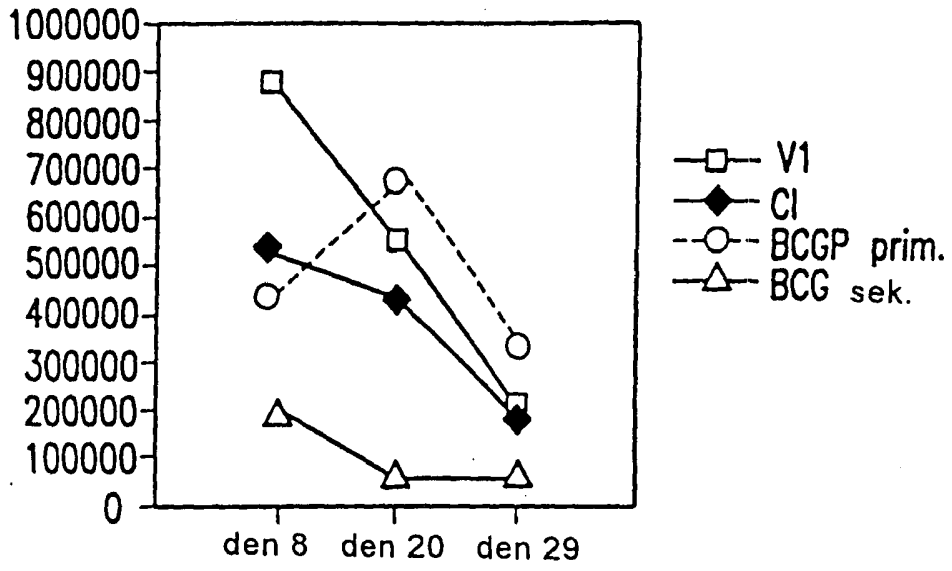

IL-10 pg/ml
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
v1J-ns-tPA
Ag85A-tPA
BALB/c
C57BL/6
KONTROLA
Ag85A
PWM



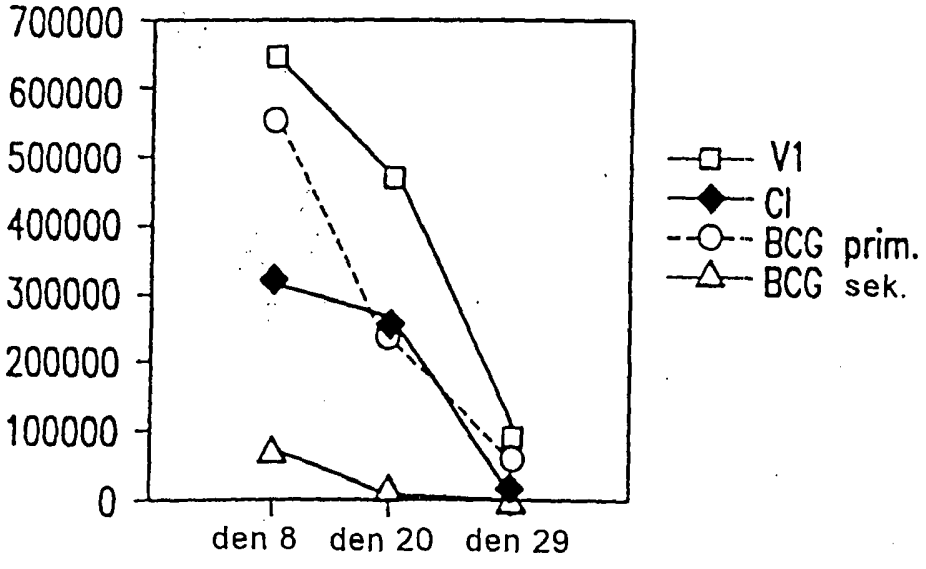
dni po inokulácii BCG



dni po inokulácii BCG



dni po inokulácii BCG



dni po inokulácii BCG