

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.09.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.09.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/933149**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/17991**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/14230**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 993

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 1/00
C 07 H 21/00
A 61 K 31/7084
A 61 P 35/00
A 61 P 37/04

(71) Přihlašovatel:

WASHINGTON UNIVERSITY, St. Louis, MO, US;

(72) Původce:

Watson Mark A., St. Louis, MO, US;

Fleming Timothy P., St. Louis, MO, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Mamaglobin, secernovaný protein specifický pro
karcinom prsu**

(57) Anotace:

Purifikovaná a izolovaná sekvence DNA a kódovaný
secernovaný pro prs specifický protein, mamaglobin. Způsoby
záchytu karcinomu prsu na základě zvýšené exprese sekrece
mamaglobinu nádorovými buňkami karcinomu prsu. Způsoby
detekují a/nebo kvantifikují přítomnost mamaglobinu nebo
mRNA kódující mamaglobin. Použití při léčbě karcinomu
prsu.

CZ 2000 - 993 A3

Mamaglobin, secernovaný protein specifický pro karcinom prsu

Oblast techniky

Tato žádost je částečně pokračováním patentu PCT/US96/08235 podaného dne 31. května 1996, který je pokračováním U.S patentu č. 08/455,896 podaného dne 31. května 1995.

Dosavadní stav techniky

(1) Obor vynálezu

Tento vynález se týká obecně oboru patogeneze karcinomu prsu a zvláště sekvence cDNA a kódování specifického prsního proteinu za účelem využití k zachytu a léčbě karcinomu prsu.

(2) Popis stavu problematiky

Karcinom prsu je jedním z nejčastějších a potenciálně smrtelných zhoubných nádorů.

Ačkoliv časná diagnostika a léčba snižuje morbiditu a mortalitu související s tímto onemocněním, pozitivní prediktivní hodnota mamografie je stanovena na pouhých 25 % (Hall a kol., N Engl J Med 327:319 až 328, 1992, jenž je součástí referencí). Bylo by proto žádoucí mít k dispozici způsoby k zachycení karcinomu dříve než může být zachycen při použití mamografie. Použití genetických nebo biochemických markerů by pomohlo poskytnout takovýto způsob k dosažení a ke zvýšení prediktivní hodnoty mamografie. (Hayes, Hematol Oncol Clin N Am 8:485, 1994, jenž je součástí referencí).

Rozvoj karcinomu prsu je doprovázen počtem genetických změn (Pro přehled viz Porter-Jordan, Hematol Oncol Clin N Am 8:73, 1994, jenž je součástí referencí) Mezi takovéto změny patří velké chromozomální přestavby a ztráty genetických markerů (Devilee a kol., Biochim Biophys Acta 1198:113, 1994; Callahan a kol., J Cell Biochem Suppl 17:167, 1993 jenž je součástí referencí). Je dokázáno, že progres neoplázie prsu vede ke kvalitativním a kvantitativním změnám v expresi dříve stanovených genů, které kódují růstové faktory a jejich receptory (Zajchowski a kol., Cancer Res 48:7041, 1998, jenž je součástí referencí), strukturální proteiny (Trask a kol., Proc Natl Acad Sci

87:2319, 1990, jenž je součástí referencí), proteiny sekundárních posílů (Ohuchi a kol., Cancer Res 26:2511, 1986 jenž je součástí referencí), a transkripční faktory (Harris, Adv Cancer Res 59:69:1992, jenž je součástí referencí). Tyto změny exprese genů se mohou stát potenciálně hlavním podkladem pro rozvoj markeru karcinomu prsu, i když není dobře známa přesná role těchto genových změn v patogenezi karcinomu prsu ze vzorků biopsií pacientů.

Navíc k určení genetického nebo biochemického markeru karcinomu prsu za účelem časného zachytu onemocnění by bylo žádoucí mít k dispozici nádorový marker, který by poskytl odhad prognózy, způsoby výběru a zhodnocení léčby a způsoby cílové léčby. Ačkoliv již bylo určeno mnoho tkáňových markerů, žádný z nich není dostatečně citlivý nebo nádorově specifický, aby byl ideálně vhodný pro diagnostiku nebo screening u všeobecné populace. (Viz výše uvedeno). Proto přetrvává potřeba markeru karcinomu prsu jakožto genu spolu s jeho exprimovaným proteinem, které by se použily ke specifickému a selektivnímu určení vzniku a patogenetického rozvoje karcinomu prsu u pacienta a kterých by se použilo v nádorově specifické imunoterapii.

Používá se modifikovaná rozdíly znázorňující technika polymerázové řetězové reakce pro izolaci diferenciálně exprimovaných sekvenčních konců z karcinomu prsu. Některé sekvenční fragmenty, které byly izolovány, byly ojediněle exprimovány v neoplastické epitelové tkáni prsu na rozdíl od normálních tkáňových kontrol. (Watson a Fleming, Cancer Res 54:4598 až 4602, 1994 jenž je součástí referencí). Objevení jednoho z těchto sekvenčních volných konců stanovených jako DEST002 vedlo k objevení a k izolaci nové celé délky cDNA a kódovaných proteinů, které se nyní označují jako mamaglobin.

Podstata vynálezu

Stručně tento současný vynález vede k k identifikaci nových genů, jejichž exprese je zvýšena u karcinomu prsu a k izolaci cDNA od mRNA těchto genů. Žadatelé dosáhli objevení nové cDNA a kódovaného sekrečního proteinu specifického pro prs, mamaglobinu. cDNA je v purifikované a izolované formě a její sekvence nukleotidů je označovaná jako sekvence č. 1. Kódovaný protein, mamaglobin je v purifikované a izolované formě a má sekvenci aminokyselin označovanou jako sekvence č. 2.

Mamaglobin je více exprimován u 27 % primárních nádorů karcinomu prsu I. stádia. To svědčí o tom, že porucha regulace genu pro mamaglobin se u karcinomu prsu objevuje časně a často. Objevení mamaglobinu a jeho cDNA proto poskytuje základ pro vývoj nových způsobů pro záchyt a léčbu u člověka a jiných savců.

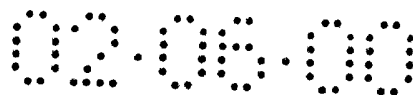
Současný vynález se týká přímo nových způsobů zachycení přítomnosti neoplázie buněk prsu ve vzorku. Zjednodušeně řečeno se cDNA kódující mamaglobin nebo derivát zmíněné cDNA používá k určení přítomnosti mRNA mamaglobinu ve vzorku. Způsob obsahuje následující kroky: (a) získání polynukleotidu, který obsahuje sekvenci nukleotidů sekvence č. 1 a nebo její deriváty, (b) inkubaci sekvence nukleotidů se vzorkem za podmínek, při kterých sekvence hybridizuje s mRNA z neoplastických buněk prsu a (c) stanovení přítomnosti hybridizačního komplexu DNA-RNA.

Další stránka současného vynálezu poskytuje soupravu k určení přítomnosti neoplastických buněk prsu ve vzorku pomocí hybridizace. Tato souprava obsahuje polynukleotid, který obsahuje sekvenci nukleotidů označovanou jako sekvence č. 1 nebo jejich deriváty balené v nádobce.

V další části současného vynálezu se stanovuje exprese mamaglobinu ve vzorku tak, že se určí přítomnost cDNA která je ve vzorku reverzně přepsána z mRNA mamaglobinu. Způsob obsahuje následující kroky: (a) přípravu cDNA kódující mamaglobin z mRNA při použití metody reverzního přepisu ve vzorku získaného od pacienta, (b) příprava dvou primerů pro polymerázovou řetězovou reakci, která obsahuje oligomery, které lemují nebo leží uvnitř cDNA, která kóduje mamaglobin a (c) amplifikace mamaglobin kódující cDNA pomocí polymerázové řetězové reakce. Tyto dva primery mají sekvenci nukleotidů označovanou jako sekvence č. 3 a sekvence č. 4.

Další část současného vynálezu poskytuje soupravu ke stanovení přítomnosti neoplastických buněk prsu ve vzorku pomocí polymerázové řetězové reakce. Souprava obsahuje dva primery pro metodu polymerázové řetězové reakce, která obsahuje oligomery, které lemují nebo leží uvnitř v mamaglobin kódující cDNA, balené v nádobce. Dva primery mají sekvenci nukleotidů označovanou jako sekvence č. 3 a sekvence č. 4.

V další části současného vynálezu se stanovuje přítomnost mamaglobinového proteinu exprimovaného na nádorových buňkách ve vzorku při použití specifických protilátek proti mamaglobinovému proteinu. Specifické protilátky jsou buď polyklonální nebo monoklonální protilátky.



Vynález se také zabývá novými sloučeninami a způsoby léčby neoplastických onemocnění prsu při použití antigenů mamaglobinu, které mají schopnost vyvolat buněčnou nebo protilátkovou imunitní odpověď, tj. přes aktivované T buňky u nádorů s exprimovaným mamaglobinem.

Jedna složka sloučeniny podle tohoto vynálezu obsahuje mamaglobinový antigen B buněk, který má schopnost aktivovat specifické B buňky mamaglobinu. Antigen B buněk obsahuje epitop B buňky specifický pro mamaglobin a epitop T_H nebo determinantu, která je rozpoznána T pomocnými buňkami.

Další složku tvoří mamaglobinový antigen, který je mamaglobinovým antigenem buněk T_c a je rozpoznán specifickými mamaglobinovými cytotoxickými T lymfocyty. Obsahuje epitop T_c buněk a vazebné místo, nebo agretop pro molekulu MHC třídy I.

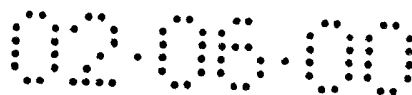
Další složka sloučeniny podle vynálezu obsahuje antigeny buněk B a T_c .

Způsoby léčby pacientů s nádory s exprimovaným mamaglobinem zahrnují adoptivní imunoterapii, která obsahuje mimotělní stimulaci pomocí mamaglobinového antigenu specifických mamaglobinových lymfocytů, který je izolován od pacientů. Následně se pacientovi podají aktivované lymfocyty. V lidském těle dojde ke stimulaci protimamaglobinové imunitní odpovědi. Ta zahrnuje podání vakcíny pacientovi, která obsahuje mamaglobinový antigen.

Byly zjištěny některé výhody, kterých se dosáhlo v tomto vynálezu. Patří mezi ně získání sekvence nukleotidů a kódování sekvence aminokyselin, které mohou sloužit jako markery buněk karcinomu prsu; získání metod pro časný záchyt přítomnosti neoplastických buněk prsu; získání různých způsobů záchytu karcinomu prsu, které mohou doplnit mamografii a zvýšit tak prediktivní hodnotu; získání metod, které poskytují odhad prognózy; získání markerů, které umožní zaměření léčby; a získání sloučenin pro stimulaci buněčné a humorální imunitní odpovědi proti nádorům.

Stručný popis obrázků

Na obrázku 1 je znázorněn postup, který se používá k izolaci celé délky mamaglobinové cDNA, včetně rychlé amplifikace konců cDNA (RACE = Rapid Amplification cDNA Ends). Technologie polymerázové řetězové reakce (PCR) a následné subklonace do dvou vektorů pGEM72 a pCEV27.



Obrázek 2 znázorňuje sekvenci lidské cDNA sekvenční č. 1 (číslování nukleotidů viz výše) a sekvenci aminokyselin kódovaného specifického proteinu prsu, mamaglobinu (sekvenční č. 2) (číslování aminokyselin viz níže), plná čára označuje fragment bp 403 (sekvenční č. 5) izolovaný metodou RACE PCR a nevyplněná čára označuje sekvenci 206 bp DEST002 (sekvenční č. 6).

Obrázek 3 znázorňuje sekvenci aminokyselin specifického proteinu prsu, mamaglobinu (hMAM), (sekvenční č. 2) v porovnání s krysí vazebnou proteinovou subjednotkou C3 na prostatický steroid (rPSC3) (sekvenční č. 7) a protein lidských jasných buněk o 10 kD (hCC10) (sekvenční č. 8), jehož identické části jsou označeny tučnými písmeny a dvojitými čarami a strukturálně podobné aminokyseliny jsou označeny jednoduchými čarami.

Obrázek 4 znázorňuje (A) analýzu Northern blot hybridizace lidské cDNA kódující specifický protein prsu, mamaglobin (hMAM) s mRNA, která je exprimována v tkáních prsní neoplázie, normálního prsu a jiných tkáních dospělého jedince a (B) analýzu RT/PCR amplifikovaných vzorků z tkání prsní neoplázie, normálního prsu a jiných tkáních dospělého jedince.

Obrázek 5 znázorňuje překlad sekvenční cDNA specifické pro prs v testovacím systému in vitro lyzátu králíčních retikulocytů.

Obrázek 6 znázorňuje hybridizaci Northern blot s cDNA kódující mamaglobin, kde je demonstrován záchyt mRNA v nádoru 2410, v nádorech u tří z osmi dalších pacientů (znázorněno tučně) a v ještě menším rozsahu v normální tkáni prsu (znázorněno kurzívou) v porovnání s dvěma případy (čtyři linie napravo) exprese mamaglobinové mRNA u nádorové tkáně a u normální tkáně stejného pacienta.

Obrázek 7 znázorňuje analýzu Western blot s použitím polyklonální protilátky proti C konci mamaglobinu (sekvenční č. 14) v upraveném médiu (S) a buněčném lyzátu (C) z nádorových buněk karcinomu prsu MDA-MB-415 při chybění (-) a přítomnosti (+) imunizačního proteinu. Je znázorněn záchyt prekursoru a secernovaných forem mamaglobinového proteinu v buněčném médiu a buněčném lyzátu.

Obrázek 8 znázorňuje analýzu Western blot s použitím proti-mamaglobinové polyklonální protilátky v upraveném médiu (S) a buněčném lyzátu (C) z nádorových buněk karcinomu prsu MDA-MB-415, které vyrostly při chybění (-) a přítomnosti (+) tunikamycinu, který blokuje glykosylaci. Je znázorněn nedostatek detekovatelného

mamaglobinového proteinu v buněčném lyzátu nebo buněčném médiu, kde je inhibována N-glykosylace.

Obrázek 9 znázorňuje analýzu Western blot v buněčném lyzátu z nádorových buněk karcinomu prsu. Je zde ukázán záchyt prekursoru mamaglobinového proteinu při použití proti-mamaglobinové polyklonální protilátky a kozí proti-králičí protilátky, viditelný pomocí enzymové chemiluminiscence.

Obrázek 10 znázorňuje analýzu Western blot při použití proti-mamaglobinové polyklonální protilátky tekutých sekretů z lidského prsu z období těhotenství a po porodu. Je zde demonstrován záchyt secernovaného mamaglobinového proteinu v proliferující prsní žláze.

Obrázek 11A znázorňuje barevně řez buněk karcinomu prsu fixovaný v parafínu z patientského vzorku, který je imunohistochemicky obarven při použití proti-mamaglobinové polyklonální protilátky a kozí proti-králičí protilátky s navázanou křenovou peroxidázou a DAB jakožto substrátu. Je znázorněno hnědavé zabarvení buněk, u kterých je exprimován mamaglobinový protein.

Obrázek 11B znázorňuje černobíle řez buněk karcinomu prsu fixovaný v parafínu z patientského vzorku, který je imunohistochemicky obarven při použití proti-mamaglobinové polyklonální protilátky a kozí proti-králičí protilátky s navázanou křenovou peroxidázou a DAB jakožto substrátu, kde je označeno hnědavé zabarvení buněk, u kterých je exprimován mamaglobinový protein.

Popis upřednostňovaných částí:

Jedno hledisko současného vynálezu je založeno na identifikaci a stanovení sekvence cDNA označené jako sekvence č. 1, která kóduje sekreční protein specifický pro prs, mamaglobin, označený jako sekvence č. 2 (obrázek 2). Jak je níže uvedeno, plná délka cDNA mamaglobinu byla izolovaná tak, že se začalo od mRNA nádorových buněk, která byla reverzně přepsána, amplifikována použitím techniky PCR a subklonována na exprimované vektory. Navíc byl identifikován a popsán protein mamaglobin, kódovaný pomocí cDNA.

Použitím anonymní sekvence volného konce dříve označovaného jako DEST002 bylo prokázáno, že odpovídající výsledný genový produkt, který byl až doposud

neznámý, byl zde označený jako mamaglobin. Ten je zvláště hojný u buněčné linie karcinomu prsu MDA-MB-415. K izolaci celé délky cDNA mamaglobinu byla mRNA reverzně přepsána z této buněčné linie a klonována při použití techniky RACE PCR (Edwards a kol. *Nucleic Acid Research* 19:5227 až 32, 1991, jenž je součástí referencí). tato technika je založena na strategii vazby jednoduchého vlákna oligodeoxyribonukleotidu na 3' konec jednoduchého vlákna cDNA. Tento způsob, kterým byla cDNA izolována, je znázorněn schematicky na obrázku 1.

Sekvence celé délky 503 bp cDNA (sekvence č. 1) byla odvozena od známé sekvence získané z fragmentu 403 bp (sekvence č. 5) (obrázek 2), který byl izolován touto technikou spolu se známou sekvencí dříve získanou z odpovídající sekvence DEST (DEST002, sekvence č. 6) (obrázek 2) v naší předchozí studii. (Watson a Fleming, *supra*). Uvnitř 503 bp cDNA je 279 bp otevřený čtecí rámec, který kóduje polypeptid o 93 aminokyselinách o předpovídané molekulové hmotnosti 10,5 kD (sekvence č. 2) (obrázek 2). Počáteční methionin tohoto otevřeného čtecího rámce je uvnitř téměř perfektně shodné Kozakovy sekvence (Kozak, *Cell* 22:7 až 8, 1980, který je součástí referencí). 60 bp proti směru od této sekvence neobsahuje žádné další vnitřní methioniny nebo překládací stopy. Nepřeložená sekvence 3' cDNA utváří 163 bp a obsahuje polyadenylační signál, AATAAA, 12 bp proti směru od základního místa originální sekvence DEST002. Tyto údaje dokazují, že byla izolována celá délka cDNA mamaglobinu. Prvních 19 zbytků kódovaného peptidu předpovídají signální sekvenci hydrofobního peptidu a zbytky 53 až 55 a 68 až 70 se shodnými N-vázanými glykosylačními místy určují, že mamaglobin je secernovaný glykoprotein.

Průzkum sekvence DNA podobný sekvenci cDNA mamaglobinu v Genbanku při použití algoritmu BLAST (Benson a kol., *Nucl Acid Res* 21:2963 až 2965, 1993; Altschul a kol., *J Mol Biol* 215:403 až 410, 1990, jenž je součástí referencí) neprokázal žádné zřejmé homologie sekvence DNA. Proto se věří v to, že cDNA mamaglobinu je nová, doposud neznámá sekvence DNA.

Ve výzkumu dalších sekvencí polypeptidů souvisejících s mamaglobinem bylo zjištěna homologie sekvence aminokyselin mezi mamaglobinem a dalšími polypeptidy. Mamaglobin vykazoval identitu 42 % aminokyselin (58 % včetně tradičních substitucí) s C3 podjednotkou krysího proteinu vázajícího prostatický steroid (prostatein) (rPSC3) (obrázek 3) (sekvence č. 7). Krysí protein vázající prostatický steroid je hlavní

secernovaný protein přední prostaty u krysa a obsahuje tetramerní protein složený ze dvou dimerních podjednotek; CD3/C1a C3/C2 (Parker a kol., Ann N Y Acad Sci 438:115 až 124; Parker a kol., J Steroid Biochem 2:67 až 71, 1984, jež jsou součástí referencí). Všechny geny C1, C2 a C3 kódují přibližně 6 kD secernovaných proteinů a uvažuje se, že vznikají z genové duplikace. Zatímco geny C1 a C2 vykazují navzájem silnou homologii, jsou daleko méně podobné genu C3. Obdobně mamaglobin nevykazuje žádnou homologii v sekvenci s proteiny C1 ani C2.

Jak je výše uvedeno, protein vázající prostatický steroid (prostatein) je hlavním secernovaným proteinem přední části prostaty u krysa a jeho exprese je regulována androgeními steroidy (Parker a kol., Ann N Y Acad Sci 438:115 až 24; Parker a kol., Steroid Biochem 20:67 až 71, 1984, jež jsou součástí referencí). O dalším proteinu, lidském proteinu vázající estramustin (hEMBP), se udává, že je exprimován na lidské prostatě, u lidského karcinomu prsu a lidského maligního melanomu. (Bjork a kol., Cancer res 42:1935 až 1942, 1982; Bjork a kol., Anticancer Res 11:1173 až 82, 1991, jež jsou součástí referencí). Lidský protein vázající estramustin je imunochemicky podobný krysímu proteinu vázající estramustin a předpokládá se, že je identický s krysím proteinem vázající steroidy, prostateinem. Jak je výše uvedeno, sekvence aminokyselin mamaglobinu vykazovala s C3 podjednotkou prostateinu identitu ve 42 % aminokyselin a homologii v 58 % včetně tradičních substitucí. Proto je možné, že mamaglobin by mohl nějak souviset s hEMBP. Avšak zatímco jak prostatein tak i hEMBP jsou zachyceny v prostatické žláze, mRNA mamaglobinu v této tkáni zcela chybí. Tudíž buď není mamaglobin stejný protein ani podjednotka hEMBP a tedy sekvence hEMBP nebyla dosud určena tak, aby byla zjištěna jakákoliv podobnost mamaglobinu s některým fragmentem nebo podjednotkou hEMBP.

Ačkoliv bylo v poslední době dokázáno, že spojením promotoru rPSC3 s antigenem SV40 vznikají jak karcinomy prostaty tak i karcinomy prsu u transgenních myší. (Maroulakou a kol., Proc Nat Acad Sci U.S 91:11236 až 11240, 1994; Sandmoller a kol., Oncogene 9:2805 až 2815, 1994, jež jsou součástí referencí), pravá biologická funkce tohoto proteinu však doposud není objasněna. I přes hypotetický vztah mezi krysím prostatickým steroid vázajícím proteinem a lidským EMBP nebyl zatím identifikován ani lidský polypeptid ani lidský gen odpovídající rPSC3. Proto mamaglobin a cDNA kódující mamaglobin představují doposud nově známé sekvence.

Při manuálním porovnání s dalšími sekvencemi, u kterých bylo méně signifikantní BLAST skóre, jak u sekvence mamaglobinu tak i u sekvence proteinu rPSC3, jsme identifikovali další homologie s proteiny o 10 kD lidských jasných buněk (hCC10) (sekvence č. 8) (Peri a kol., J Clin Invest 92:2099 až 2109, 1993, jenž je součástí referencí) (obrázek 3). Navíc i s králíčími a myšími uteroglobinovými proteiny (Miele a kol., Endocrine Rev 8:474 až 90, 1987; Cato a Beato, Antocancer Res 5:65 až 72, 1985; Miele a kol., J Endocrinol Invest 17:679 až 692, 1994, jenž je součástí referencí). U těchto homologií, v závislosti na druhu, byla 26% identita nebo 40% identita včetně tradičních substitucí. Zvláště mnoho aminokyselin ve všech proteinech bylo perfektně zachováno, včetně Cys-3 a Cys-69, o kterých je známo, že hrají určitou úlohu při tvorbě disulfidických vazeb mezi uteroglobinovými podjednotkami (viz níže). Tyto homologie naznačují, že mamaglobin je novým členem malé skupiny proteinů, které jsou secernovány epiteliálními buňkami (Miele a kol., 1994 viz výše).

Gen hCC10 je lidským homologem králíčích a myších uteroglobinových genů (Peri a kol., J Clin Invest 92:2099 až 2109, 1993, jenž je součástí referencí).

Původně byl uteroglobin popisován jako protein secernovaný v děloze králíka. Dále však již bylo zjištěno, že je secernován i v dalších epiteliálních orgánech včetně plic, prsu a prostaty. Na rozdíl od krysího prostateinu je uteroglobin homodimerický protein spojený dvěma disulfidickými vazbami na zachovaných koncích Cys-2 a Cys-69 (Miele a kol., 1994, viz výše). Ačkoliv přepis genu uteroglobinu je regulován steroidními hormony, schopnost samotného proteinu vázat na sebe progesteron nebo jiné steroidní hormony je kontroverzní a opět pravá biologická funkce tohoto proteinu není doposud známa. (Miele a kol., 1994, viz výše).

Exprese mamaglobinu je omezena na prsní žlázu. Toto je v rozporu s pozorováním, že rPSC3 je exprimován u krys v přední části prostaty (Parker a kol., Ann N Y Acad Sci 438:115 až 1124, 19984), a hCC10/uteroglobin je exprimován v mnoha tkáních včetně plic, dělohy, prostaty a prsu (Miele a kol., 1987, viz výše; Cato a Beato, viz výše; Miele a kol., 1994, viz výše). Vzhledem k tomu, že existuje homologie mezi mamaglobinem a těmito proteiny, vytvořili jsme model tkáňově specifické exprese.

mRNA mamaglobinu o 500 bp se stanovila snadno v nádorovém vzorku 2410 (tkáň, ze které byla izolována původní sekvence volného konce) a v menší míře v normální tkáni prsu (obrázek 4A). Nepodařilo se stanovit mRNA mamaglobinu

v nesmrtelné linii B-589 prsních epiteliálních buněk. Expres mamaglobinu byla také nedetekovatelná v lidské děloze a plicích, dvou místech exprese uteroglobinu.

Použitím amplifikace pomocí RT/PCR byla stanovena mRNA mamaglobinu jak v nádoru 2410 tak i v normální tkáni prsu, ale nebyla detekována v dalších 15 vyšetřených tkáních, včetně tkání, u kterých je normálně exprimován rPSC3 a uteroglobin (plíce, děloha, prostata), tkání citlivých na hormony a steroidogenních tkání (vaječníky, varlata, placenta), a další sekretorické epiteliální orgány (tlusté střevo) (obrázek 4B). Expres mRNA mamaglobinu je tedy relativně specifická pro tkáň prsu.

Na základě studií v této zprávě, je mamaglobin relativně specifický pro prsní tkáň. Dalšími geny, které jsou více exprimovány u karcinomu prsu jsou erb-B a cyklin D (Jardines a kol., *Pethobiology* 61:268 až 282, 1994; Keyomars a Pardee, *Proc Nat Acad Sci U.S.* 90:1112 až 1116, 1993, jenž je součástí referencí). Na rozdíl od zvýšené exprese erb-B a cyklinu D odpovídá zvýšená expres mamaglobinu spíše více specifické alteraci epiteliálních buněk prsu nežli všeobecně zvýšenému růstovému potenciálu nebo mitotické aktivitě. Tak např. objevení se dysregulace genu mamaglobinu může mít mnohem specifičtější význam pro terapeutickou zranitelnost nebo pro klinický průběh nádoru.

Při mezi citlivosti, která je dána jednokrokovou metodou RT/PCR se nedá expres mamaglobinu stanovit v normálních lymfatických uzlinách nebo periferních lymfocytech. Toto svědčí, že stanovení přepisu mamaglobinu v periferních lymfatických uzlinách může být užitečné k detekci skrytých metastáz karcinomu prsu, tak jak to bylo již navrženo pro jiné specifické epiteliální geny (Schoenfield a kol., *Cancer Res* 54:2986 až 90, jenž je součástí referencí).

K demonstraci toho, že cDNA mamaglobinu kóduje translační protein, bylo klonu cDNA použito v in vitro translačním testu. Obrázek 5 ukazuje výsledný proteinový produkt z lyzátu králíčních retikulocytů s cDNA mamaglobinu. Použitím mamaglobinové cDNA vznikl protein o velikosti přibližně 6kD. Tato molekulová hmotnost je nižší než byla očekávána z koncepční translace otevřeného čtecího rámce. Avšak toto bylo pozorováno i u překladu králíčího a lidského uteroglobinu.

Ačkoliv jsme zachytili u jednoho nádoru zvýšenou expresi RNA mamaglobinu (tj. 2410), není jasné, s jakou četností je tato zvýšená expres pozorována u dalších karcinomů prsu. Proto jsme metodou hybridizace Northern blot vyšetřili použitím sondy

cDNA mamaglobinu soubor patnácti primárních karcinomů prsu stádia I s různými histologickými typy. S ohledem na potenciální variabilitu v expresi v důsledku ovlivnění životním prostředím (např. hormonálním stavem pacienta) se také porovnávaly nádorové vzorky přímo s normální prsní tkání téhož pacienta, i když to v mnoha případech nebylo možné. Jak je patrné z obrázku 6, mRNA mamaglobinu byla opět stanovena v normální tkáni prsu a nádoru 2410. Mamaglobin byl rovněž stanoven u tří dalších nádorů. U dvou z nich byla pouze malá nebo žádná exprese u normální tkáně téhož pacienta (BO15 a BO22). U všech, 4 z 15 (27 %) nádorů byla zjištěna vyšší exprese mRNA mamaglobinu. Tyto údaje svědčí pro to, že zvýšená exprese mamaglobinu není specifická pro jeden vzorek, ale je ve skutečnosti se u primárních karcinomů prsu vyskytuje relativně často. Dále skutečnost, že všechny vyšetřované nádory byly v klinickém stádiu I, svědčí pro to, že tato porucha regulace se objevuje u progresu neoplázie prsu relativně časně. Protože žadatel věří, že mamaglobin je secernovaný protein, dá očekávat, že jeho přítomnost bude detekovatelná v séru těchto pacientů, u jejichž nádorů dochází ke zvýšené expresi tohoto genového produktu. Tak se např. zdá velmi pravděpodobné, že mamaglobin bude při zajišťování pacientů s karcinomem prsu klinicky stejně užitečný jako např. prostatický specifický antigen (PSA) a jiné solidní nádorové markery. (Tumor markers in diagnostic pathology, Clin Lab Med 10:1 až 250, 1990, jenž je součástí referencí).

Stanovili jsme prevalenci mamaglobinu jakožto nádorového markeru v obecné populaci karcinomů prsu tak, že jsme vyšetřili expresi mamaglobinu u několika primárních karcinomů prsu. I když počet vyšetřených vzorků v této studii byl malý, u 27 % byla zjištěna zvýšená exprese mRNA mamaglobinu. Toto procento je srovnatelné s prevalencí dalších genetických alterací jako je např. amplifikace erb-B a mutace p53 (Slamon a kol., Sci 244:707 až 7012, 1989; Thor a kol., J Nat'l Cancer Inst 84:845 až 855, jenž je součástí referencí). Protože jsme omezili naši analýzu na nádory klinického stádia I, zvýšená exprese mamaglobinu by skutečně převládala nad dalšími genetickými alteracemi, které byly zjištěny u této podskupiny nádorů (Allerd a kol., J Nat'l Cancer Inst 85:200 až 206, 1993, jenž je součástí referencí).

Stanovení mamaglobinu jakožto nádorového markeru karcinomu prsu poskytuje základ pro další hledisko tohoto současného vynálezu, které zahrnuje způsoby stanovení přítomnosti karcinomu prsu u pacienta.

Pojem „stanovení“ se zde používá v souvislosti se stanovením neoplastického onemocnění prsu a znamená stanovení přítomnosti karcinomu prsu u pacienta, odlišení karcinomu prsu od jiných onemocnění, odhad prognózy z hlediska důsledku onemocnění a vyhlídky na uzdravení, monitorování stavu onemocnění nebo opětovného výskytu onemocnění, stanovení upřednostňovaného léčebného režimu a zacílení protinádorové terapie.

Metoda stanovení karcinomu prsu zahrnuje hybridizaci polynukleotidu s mRNA neoplastických buněk prsu. Polynukleotid obsahuje sekvenci č. 1 nebo derivát sekvence č. 1. Derivát sekvence nukleotidu znamená, že odvozená sekvence nukleotidů je v podstatě stejná jako je sekvence, od které je odvozená sekvence nukleotidů, která má dostatečnou komplementaritu sekvence k sekvenci, od které je odvozená pro hybridizaci mRNA neoplastických buněk prsu při stejných stísněných podmínkách za kterých sekvence, ze které je odvozena hybridizuje mRNA neoplastických buněk prsu. Odvozená sekvence nukleotidů není nutně fyzikálně odvozená od sekvence nukleotidů, ale může být vytvořena jakýmkoliv způsobem, např. chemickou syntézou nebo replikací DNA nebo reverzním přepisem nebo přepisem.

K detekci přítomnosti mRNA kódující mamaglobin v detekčním systému pro karcinom prsu se získá vzorek od pacienta. Vzorek může být tkáňová biopsie nebo vzorek krve, plasmy, séra apod. Vzorek se může upravit tak, aby došlo k extrakci nukleových kyselin, které jsou ve vzorku. Výsledná nukleová kyselina ze vzorku se podrobí gelové elektroforéze nebo jiné separační technice dělící podle velikosti.

Detekce zahrnuje nukleové kyseliny a zvláště mRNA vzorku se sekvencí DNA, která slouží jako próba pro tvorbu hybridových duplexů. Pojem „próba“ znamená strukturu, která obsahuje polynukleotid, který tvoří hybridovou strukturu s cílovou sekvencí na cílovém místě.

Detekce výsledného duplexu obvykle provádí použitím značených prób. Alternativně může být próba neoznačená, ale je detekovatelná specifickou vazbou s ligandem, který je označený, buď přímo nebo nepřímo. Vhodné značky a způsoby pro označování prób a ligandů jsou v oboru známy a patří mezi ně např.: radioaktivní značky, které mohou být včleněny známými způsoby (např. nick translací nebo kinasováním), biotin, fluorescenční skupiny, chemiluminiscenční skupiny (např. dioxetany, zvláště spouštěcí dioxetany), enzymy, protilátky, apod.

Když se použije cDNA kódující mamaglobin a jeho derivát jakožto próba, musí se zachovat přísné podmínky, aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům. Pokud se použijí sekvence odvozené od mamaglobinu, mohou být podmínky méně přísné. Omezení hybridizace se určuje počtem faktorů během hybridizace a během promývací procedury a zahrnuje teplotu, iontovou sílu, časové omezení a koncentraci formamidu. Tyto faktory jsou vysvětleny např. v knize Sambrook a kol. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 1989).

Aby se dosáhlo zvýšení citlivosti detekce mRNA mamaglobinu ve vzorku, používá se technika reverzní transkripce/polymerázové řetězové reakce (RT/PCR) k amplifikaci cDNA přepsané z mRNA kódující mamaglobin. Způsob RT/PCR je v oboru dobře znám (například, viz Watson a Fleming, viz výše).

Metoda RT/PCR se může provádět tak, jak je uvedeno níže. Celková buněčná RNA se izoluje pomocí například metody standardního guanidin isothiokyanátu a celková RNA se reverzně přepíše. Metoda reverzního přepisu zahrnuje syntézu DNA na šabloně RNA při použití enzymu reverzní transkriptázy a primeru s koncem 3'. Typický primer obsahuje oligo (dT) sekvenci. Takto produkovaná cDNA se potom amplifikuje při použití metody PCR specifickými primery pro mamaglobin. (Beylavsky a kol., Nucl Acid res 17:2919 až 2932, 1989; Krug a Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, N. Y., Sv. 152, str. 316 až 325, 1987, jenž je součástí referencí).

Metoda polymerázové řetězové reakce se provádí při použití dvou oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární dvěma okrajovým oblastem DNA segmentu určeného k amplifikaci. Protisměrové a posměrové primery mají typickou délku od 20 do 30 párů bází a hybridizují k okrajovým oblastem pro replikaci sekvence nukleotidů. Primery se vybírají tak, aby byly skutečně komplementární k vlákně cDNA, která se amplifikuje. Proto nemusí primery přímo odpovídat sekvenci nukleotidu šablony, ale musí být dostatečně komplementární, tak aby selektivně hybridizovaly s amplifikovaným vláknem.

Polymerizace z primerů je katalyzována pomocí DNA-polymerázy za přítomnosti deoxynukleotidových trifosfátů nebo nukleotidových analogů pro tvorbu molekul dvojité šroubovice DNA. Dvojitá vlákna se potom oddělují jakoukoliv denaturační technikou, která zahrnuje fyzikální, chemickou nebo enzymatickou techniku. Běžně používaná metody fyzikální denaturace zahrnuje zahřátí nukleové kyseliny, obvykle z 80 °C na

105 °C po dobu v rozmezí od 1 do 10 minut. Tento proces se opakuje podle požadovaného počtu cyklů.

Následovně po amplifikaci se produkt PCR detekuje barvením ethidium bromidem (Sambrook a kol., 1989, viz výše).

V další části současného vynálezu se používá sekvence cDNA mamaglobinu nebo jejího derivátu k vyznačení kterékoliv alterace genu mamaglobinu (tj. přemístění genu, amplifikace genu, chybění genu) ve vzorku pacienta s karcinomem prsu. Toto poskytuje metodu, u které vzorky pacientů, které neobsahují neporušenou mRNA, mohou být přesto vyšetřeny na změny ve struktuře genu.

V jednom použití této techniky se sekvence cDNA mamaglobinu nebo jejich derivátů hybridizuje s genomickou DNA pacienta, která byla izolována z nádoru pacienta, normální tkáně nebo lymfocytů a modifikována pomocí jedné nebo více restrikčních endonukleáz. Bylo použito metodiky Southern blot, která je v oboru dobře známá. Tento test určuje, zda-li pacient nebo nádor prsu pacienta obsahuje gen mamaglobinu, který by chyběl, byl přemístěn nebo amplifikován. Chybění těchto změn může poskytnout důležitou informaci užitečnou pro odhad prognózy a zajištění pacienta.

V druhém použití této techniky se může použít jednoho nebo více párů oligonukleotidových primerů založených na sekvenci cDNA mamaglobinu nebo jejich derivátů při polymerázové řetězové reakci k amplifikaci segmentů genu mamaglobinu ze vzorku pacienta. Analýza výsledných PCR produktů určuje, zda-li určitý segment genu mamaglobinu chybí nebo je přemístěn. Takováto informace je užitečná pro prognózu a zajištění pacienta.

Dalším způsob zachycení karcinomu prsu zahrnuje detekci přítomnosti prekursoru a/nebo secernovaných forem mamaglobinového polypeptidu ve vzorku získaného od pacienta. Může se použít jakákoliv metoda k detekci proteinů, která je známá v oboru. mezi takovéto metody patří, ale nejsou omezeny, imunodifúze, imuno elektroforéza, imunochemické metody, testy s navázanými ligandy, imunohistochemické techniky, aglutinace a komplementové testy. (např. viz Basic a Clinical Immunology, Sites and - Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. str. 217 až 262, 1991, jenž je součástí referencí). Mezi upřednostňované metody patří imunotesty s navázanými ligandy, které

zahrnují reakci protilátek s epitopem nebo s epitopy mamaglobinu a kompetitivní nahrazení značeného mamaglobinového polypeptidu nebo jejich derivátů.

Zde používaný pojem „mamaglobinový polypeptid“ zahrnuje přirozeně se vyskytující mamaglobin, včetně neglykosylovaných a glykosylovaných prekursorů a glykosylované secernované formy, deriváty a jejich fragmenty. Přirozeně se vyskytující znamená polypeptid, který může být izolován z přírodního zdroje, např. z normálního a/nebo nemocného organismu, a který není uměle modifikován.

Pod pojmem deriváty mamaglobinu se myslí polypeptidy, které se skládají ze segmentu alespoň 10 aminokyselin, které mají podstatnou shodu s částí přirozeně se vyskytujícího mamaglobinu. Segment, který má podstatnou shodu obsahuje s výhodou alespoň 20 aminokyselin, ale ještě výhodněji alespoň 50 aminokyselin a nejvýhodněji alespoň 75 aminokyselin. Dva polypeptidy, které mají podstatnou shodu, při optimálním uspořádání pomocí programů pro uspořádání sekvencí, jako je např. BLAST, mají alespoň 80% podíl ve shodě sekvence, výhodněji alespoň 95% podíl ve shodě sekvence, nejvýhodněji alespoň 90% podíl ve shodě sekvence. Zbylé pozice, které nejsou ve shodě se s výhodou liší tradičními substitucemi aminokyselin.

Tradiční substituce aminokyselin se týkají zaměnitelnosti zbytků, které mají podobné vedlejší řetězce. Například skupinu aminokyselin obsahující alifatické vedlejší řetězce tvoří glycin, alanin, valin, leucin a isoleucin; skupinu aminokyselin obsahující alifaticko-hydroxylové vedlejší řetězce tvoří serin a treonin; skupinu aminokyselin obsahující vedlejší řetězce s amidem tvoří asparagin a glutamin; skupinu aminokyselin obsahující aromatické vedlejší řetězce tvoří fenylalanin, tyrozin a tryptofan; skupinu aminokyselin obsahující zásadité vedlejší řetězce tvoří lysin, arginin a histidin; a skupinu aminokyselin obsahující vedlejší řetězce se sírou tvoří cystein a methionin. Upřednostňovanými substitučními skupinami aminokyselin jsou: valin-leucin-isoleucin, fenylalanin-tyrozin, lysin-arginin, alanin-valin a asparagin-glutamin.

Derivovaný mamaglobinový polypeptid bude pravděpodobně zkříženě reagovat s protilátkou proti mamaglobinu, monoklonální nebo polyklonální, která je specifická pro přirozeně se vyskytující mamaglobin nebo jeho fragmenty.

Zde použité pojmy „fragment“ a „peptid“ znamenají mamaglobinový polypeptid, který má sekvenci aminokyselin shodnou se sekvencí aminokyselin odvozené z celé délky cDNA mamaglobinu (např.: sekvence č. 1) nebo jejich deriváty, ale chybí mu

amino-konec a/nebo karboxy-konec. Obvykle mamaglobinové fragmenty nebo peptidy obsahují alespoň 3 aminokyseliny. S výhodou mamaglobinové fragmenty nebo peptidy obsahují alespoň 6 aminokyselinových zbytků, ještě výhodněji obsahují 12 aminokyselinových zbytků, dokonce ještě výhodněji obsahují 25 aminokyselinových zbytků a nejvýhodněji obsahují 50 a více aminokyselinových zbytků.

Je známo v oboru mnoho kompetitivních a nekompetitivních protein vázících imunoanalytických testů. Protilátky použité v těchto testech mohou být neznačené, např. jako je tomu u aglutinačních testů, nebo se používají značené protilátky pro nejrozšířenější spektrum testů. Značení může být provedeno pomocí radionuklidů, enzymů, fluorescenčních látek, chemiluminiscenčních látek, enzymových substrátů nebo kofaktorů, enzymových inhibitorů, částec, barviv apod. pro radioimunoanalýzu (RIA), enzymoimunoanalýzu, např. imunoanalýzu s navázaným enzymem, (ELISA), fluorescenční imunoanalýzu, apod.

Polyklonální nebo monoklonální protilátky proti mamaglobinovému polypeptidu, které obsahují epitop B buněk mohou být vytvořeny pro použití v imunoanalýzách jakýmkoliv způsobem, který je v oboru znám. Jak je zde použito, pojem „epitop B buněk“ znamená antigenní determinantu mamaglobinového polypeptidu. Epitop B buněk může obsahovat 3 aminokyseliny v prostorovém uspořádání, které je unikátní pro epitop. Obecně epitop B buněk obsahuje alespoň 5 aminokyselin. Způsoby určení prostorového uspořádání aminokyselin jsou v oboru známy a patří mezi ně například rentgenová krystalografie a 2 dimensionální nukleární magnetická rezonance.

Jedním způsobem přípravy protilátek proti proteinu je selekce a příprava sekvence aminokyselin celého nebo části proteinu, chemická syntéza sekvence a naočkování vhodného zvířete, obvykle králíka nebo myši.

Způsoby přípravy mamaglobinového polypeptidu zahrnují bez omezení chemickou syntézu, technologii rekombinantní DNA nebo izolaci z biologických vzorků. Chemická syntéza peptidu obsahujícího epitop může být provedena například klasickým způsobem podle Merrifelda metodou syntézy peptidů v pevné fázi (Merrifeld, J Am Chem Soc 85:2149, 1963, jenž je součástí referencí) nebo metodou FMOC při použití automatického mnohonásobného peptid syntetizujícího systému (Firma DuPont, Wilmington, DE) (Caprino a Han, J Org Chem 37:3404, 1972, jenž je součástí referencí).

Polyklonální protilátky se mohou připravovat imunizací králíků, tak že se jim injekčně vpraví antigen do popliteálních lymfatických uzlin a po dvou týdenních intervalech se doplní o intraperitoneální injekcí antigenu. Zvířata se nechají vykrváct a séra se testují s purifikovaným mamaglobinovým proteinem, obvykle pomocí ELISA.

Monoklonální protilátky se mohou připravovat metodou podle Milsteina a Kohlera splynutí splenocytů z imunizované myši s kontinuálně replikujícími se nádorovými buňkami jako jsou myelomové nebo lymfomové buňky. (Milstein a Kohler Nature 256:495 až 497, 1975; Gutfre a Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1 až 46, Langome a Banatis, Academic Press, 1981, jenž je součástí referencí). Hybridované buňky takto vytvořené se potom klonují dilučními metodami a supernatanty se testují na produkci protilátek pomocí ELISA nebo RIA.

Takto připravené polyklonální nebo monoklonální protilátky proti mamaglobinu se mohou použít k izolaci a purifikaci prekursoru a secernovaných forem mamaglobinu z buněk, které exprimují mamaglobin. Například jak je níže uvedeno, polyklonální protilátka vytvořená proti aminokyselinovému konci 16 C předpokládaná z cDNA mamaglobinu (Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe, sekvence č. 14) se váže na prekursor a secernované formy mamaglobinu stejně tak jako i na mamaglobin, který byl syntetizován in vitro translačním systémem. Izolace mamaglobinu použitím protilátky proti mamaglobinu se provádí postupy dobře známými v oboru, jako je např. afinitní chromatografie.

Jedinečná schopnost protilátek rozpoznat a specificky se navázat na cílové antigeny, které jsou exprimovány nádorovými buňkami zajišťuje přístup k léčbě karcinomu. (Viz přehled LoBuglio a Saleh, Am J Med Sci 304:241-224, 1992; Bagshawe, Adv Pharmacol 24:99 až 121, 1993, jenž je součástí referencí). Proto z jiného pohledu tento současný vynález poskytuje metodu prevence vzniku a léčby karcinomu prsu u zvířat založenou na používání protilátek proti mamaglobinu, u kterého bylo objeveno, že je zvýšeně exprimován u nádorových buněk karcinomu prsu.

Specifické protilátky proti mamaglobinu, buď polyklonální nebo monoklonální protilátky se produkují jakýmkoliv způsobem známým v oboru. Například myší nebo lidské monoklonální protilátky mohou být produkovány hybridizační technologií. Alternativně se podá zvířeti mamaglobin nebo jeho imunologicky aktivní derivát nebo

jeho fragment, nebo anti-idiotická protilátka nebo její fragment. Tím se zajistí produkce B buněk se schopností rozpoznat buňky exprimující mamaglobin.

Takto vyprodukované protilátky nebo jejich fragmenty se označí jednou nebo více onkolytickými látkami, jako jsou např. radionuklidy, toxiny, cytotoxické látky a podají se pacientovi, u kterého je podezření, že trpí karcinomem prsu. Označená protilátka se naváže na mamaglobin, který je zvýšeně exprimován nádorovými buňkami karcinomu prsu a způsobí odumření nádorové buňky.

K produkci takto značených protilátek se může použít jakýchkoliv nejrozličnějších v oboru známých onkolytických látek. Například imunotoxiny se mohou vytvářet spojením rostlinných a bakteriálních toxinů s protilátkami. Mezi takovéto toxiny například patří ricin, difterický toxin a pseudomonádový exotoxin A. Konjugát lék-protilátka se může vytvořit tak, že se chemoterapeutické látky navážou na protilátku. Mezi chemoterapeutické látky vhodné k tomuto použití patří například tamoxifen, doxorubicin, metotrexát, chlorambucil, alkaloidy *Vinca* a mitomycin. Dále mohou být vytvořeny radioimunokonjugáty, u kterých je radionuklid trvale navázán na protilátku. Mezi radionuklidy vhodné pro tvorbu radioimunokonjugátů patří například β -emitory jako je například ^{131}I , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{67}Cu , ^{99}Y a ^{47}Sc ; α -emitory jako je například ^{211}At , ^{212}Bi a ^{212}Pb ; auger elektronové emitory jako je například ^{125}I a ^{77}Br ; a štěpitelné nuklidy jako je například ^{10}B .

Zjištění, že u významného procenta nádorů prsu je exprimován mamaglobinový protein, je základem pro další hledisko tohoto vynálezu, které zahrnuje aktivaci pro mamaglobin specifických B a/nebo T lymfocytů (T_c) pomocí mamaglobinových antigenů. Proto tento vynález poskytuje mamaglobinové antigeny B buněk a antigeny T_c buněk; vakcíny obsahující alespoň jeden mamaglobinový antigen B buněk a/nebo alespoň jeden mamaglobinový antigen T_c buněk pro indukci protilátkové a/nebo buněčně zprostředkované imunitní odpovědi proti nádorům exprimujícím mamaglobin, a způsoby léčby pacientů s karcinomem prsu s nádorem, u kterého je exprimován mamaglobin. Jeden způsob podle tohoto vynálezu zahrnuje to, že se pacientovi podává vakcína specifická pro mamaglobin.

Zde použitý pojem „mamaglobinový antigen“ znamená přirozeně se vyskytující mamaglobinové polypeptidy, deriváty a jejich fragmenty, které obsahují epitop B buněk

nebo T_c buněk, který je rozpoznán B-buňkami nebo T_c buňkami specifickými pro mamaglobin.

Mamaglobinový antigen B buněk obsahuje epitop B buněk nebo T_c buněk specifický pro mamaglobin. Pojem „epitop B-buněk“ znamená jakýkoliv antigen, haptén, epitop nebo antigenní determinantu, která, když je podána zvířeti, je rozpoznána anti-mamaglobinovými imunoglobulinovými receptory na B-buňkách a má schopnost vyvolat produkci protilátek s příslušnou pomocí T_H buněk. Epitop B-buněk obsahuje sekvenci aminokyselin o počtu alespoň 4 aminokyselin. S výhodou obsahuje epitop B buněk mezi 6 až 25 aminokyselinami a ještě výhodněji obsahuje 15 až 22 aminokyselin. Utvořená sekvence aminokyselin epitopu B buněk může být identická nebo podstatně identická s kontinuální sekvencí aminokyselin fragmentu nebo přirozeně se vyskytujícího mamaglobinu. Alternativně utvořená sekvence aminokyselin epitopu B buněk může být identická nebo podstatně identická s diskontinuální sekvencí aminokyselin představující seskládanou topografickou determinantu mamaglobinu.

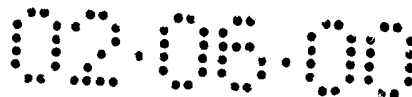
Pojem „epitop T_H-buněk“ znamená jakoukoliv antigenní determinantu, která je rozpoznána buňkami T-helper ve spojení s molekulami MHC II. třídy. Aktivace buněk T-helper indukuje diferenciaci odpočívajících B-buněk specifických pro mamaglobin v buňky s vyšší afinitou, které secernují IgG protilátky, tj. indukuje sekundární protilátkovou odpověď. V oboru je známa příprava a použití imunogenních peptidů obsahujících determinanty B a T_H buněk pro tvorbu vyšších titrů specifických B-buněk produkujících protilátky přes T-helper buňky, viz. např. Cheronis a kol., U.S. Patent č. 5.573,916, Denton a kol., Cancer Letters 70:143 až 150 (1993), Boras-Cuesta a kol., Eur. J. Immunol. 17, 1213 až 1215 (1987), a Good a kol., Science 235:1059 až 1062 (1987), jenž je součástí referencí. Epitop T_H buněk může obsahovat sekvenci aminokyselin mamaglobinu nebo heterologního proteinu. Například Denton a kol. popisují indukci protilátkové odpovědi pomocí mucinů, což je komplex glykoproteinů exprimovaných sekrečními epitelii a souvisí s karcinomem prsu a jinými karcinomy u myši imunizovaných syntetickým peptidem, který obsahoval determinantní oblast B-buněk z dřeně MUC-1 mucinu spojené se sekvencí 111 až 120 chřipkového hemaglutininu A/X-31, známou determinantou T-helper buněk. Epitop buněk T_H obsahuje sekvenci aminokyselin od 6 do 20 aminokyselinových zbytků, s výhodou mezi 8 a 18 zbytky, nejvýhodněji mezi 9 a 15 zbytky.

Mamaglobinový antigen T_C buněk obsahuje epitop T_C buněk a agretop MHC I. třídy. Pojem „epitop T_C-buněk“ znamená jakýkoliv antigen, epitop nebo antigenní determinantu, která je rozpoznána specifickými T_C buňkami, když mají na povrchu buněk nesoucích antigen molekulu MHC třídy I. Pojem „agretop MHC I. třídy“ znamená jakoukoliv sekvenci aminokyselin rozpoznanou molekulou MHC třídy I, která umožní, že mamaglobinový antigen je vystaven TC buňkám specifickým pro mamaglobin pomocí molekuly MHC třídy I. na povrchu buněk nesoucích antigen (APC). Epitop T_C buněk a agretop MHC I. třídy jsou obsaženy v sekvenci aminokyselin od 6 do 11 aminokyselin, která je identická nebo podstatně identická se sekvencí aminokyselin fragmentu nebo přirozeně se vyskytujícího mamaglobinu. S výhodou tato sekvence obsahuje 8 nebo 9 aminokyselin.

Metody identifikace epitopů B a T_C buněk na proteinový antigen jsou v oboru známy. Například kapacita izolovaných B-buněk specifických pro mamaglobin nebo T_C specifických pro mamaglobin odpovědět na secernovaný mamaglobin se stanoví při použití standardních imunobiologických technik. Tyto peptidy označované jako antigenní peptidy mohou být modifikovány jednou nebo několika aminokyselinami najednou tak, aby byla optimalizována jejich schopnost stimulovat B nebo T buňky specifické pro mamaglobin.

Epitop B buněk může být zmapován za použití komerčně dostupných souprav pro mapování epitopů, které zahrnují třídění náhodných peptidů navázaných přes C-konec k polyethylenovému nosiči. Cambridge Research Biochemicals.

Alternativně může být předpovídaná sekvence aminokyselin mamaglobinu zkoumána pro sekvence, které se přizpůsobí známým vazebným vzorům molekul MHC třídy I. a MHC třídy II. Viz například Hill a kol., *Natur* 360:434 (1992), Pamer a kol., *Nature* 360:852 (1992) a Hammer a kol., *J Exp. Med.* 176:1007 (1992), a Falk a kol., *Nature* 351:290 až 296 (1991), jenž je součástí referencí. Například antigenní peptidy rozpoznatelné cytotoxickými T lymfocyty specifickými pro nádory prsu mohou být stanoveny tak, že se prozkoumá sekvence aminokyselin mamaglobinu na peptidy vážící se na HLA-A2 jak to popisuje Peoples a kol., *Proc. Natl.Acad. Sci.* 92:432 až 436 (1995), jenž je součástí referencí. Výběr HLA-A2 jakožto molekuly představující antigen je vhodný tam, kde je u pacienta exprimován HLA-A2 (přibližně u 50 % obyvatel kavkazské oblasti je exprimován HLA-A2). Předpovídané peptidy vážící se na HLA-A2

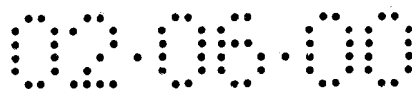


se syntetizují a testují na antigenicitu tak, že se syntetické peptidy naváží na buněčnou linii T2 buněk. Lidský produkt fúze T a B buněk obsahuje defekt v přítomnosti antigenu takový, že molekuly HLA-A2 na povrchu buněk T2 mohou být účinně naplněny exogenními peptidy vážícími se na HLA-A2. (Henderson a kol., Science 255:1264 až 1266 (1992) jenž je součástí referencí). Proto se provádí standardní test na cytotoxicitu, který zahrnuje T2 buňky navázané peptidem s cytotoxickými T lymfocyty specifickými pro prs získané z lymfocytů infiltrujících nádor (TIL) izolovaných z prsního nádoru s expresí mamaglobinu, viz například Peoples a kol., strany 432 až 433 a Tosso a kol., Cancer Research 52: 16 až 20 (1996), jenž je součástí referencí.

Antigenní mamaglobinové peptidy, které obsahují epitopy buněk T_C, mohou být také stanoveny endogenních peptidů vymývaných kyselinou, které mají molekuly HLA třídy I. na povrchu nádorových buněk (Viz například Peoples a kol., viz výše, str. 433). Vymyté peptidy se separují jakýmkoliv způsobem známým v oboru, včetně HPLC frakcionace. Rozdílné frakce peptidů se naváží na T2 buňky a potom se nasycené T2 buňky nechají inkubovat s cytotoxickými T lymfocyty specifickými pro nádory prsu, aby se určilo, které peptidy při použití imunobiologické techniky jsou cytotoxickými T lymfocyty rozpoznány.

Použití mamaglobinového antigenu podle tohoto vynálezu je při adoptivní imunoterapii. Tato terapie zahrnuje in vitro aktivaci a pomnožení B buněk produkujících anti-mamaglobinové protilátky a/nebo cytotoxických T lymfocytů (CTL) specifických pro mamaglobin pomocí mamaglobinového antigenu, které jsou izolovány od pacienta s nádorem exprimujícím mamaglobin. Tato metoda může být také prováděna se směsí, která obsahuje jak mamaglobinové antigeny B buněk tak i T_C buněk. Aktivované lymfocyty se potom podají zpět pacientovi při adoptivní imunoterapii.

Mamaglobinový antigen podle tohoto vynálezu je užitečný jako složka vakcíny specifické pro mamaglobin. Vakcína obsahuje imunogenně stimulační množství mamaglobinového antigenu. Tak jak je zde použito, imunostimulační množství znamená množství antigenu, které má schopnost stimulovat požadovanou imunitní odpověď u příjemce pro zlepšení nebo léčbu karcinomu prsu. Toto množství se stanovuje bez nevhodných experimentů empiricky standardními postupy, které jsou znalců v oboru dobře známy.



Antigen je poskytován jakoukoliv z mnoha druhů vakcín, které jsou navrženy pro vyvolání imunitní odpovědi, například protilátkově a/nebo buněčně zprostředkované. Tyto druhy jsou v oboru dobře známy. Viz například A. Lanzavecchia, Science 260:937-944 (1993) a U.S. Patent č. 5,585,103 pro Raychandhuri, jenž je součástí referencí. Příklady jednotlivých druhů vakcín, které se používají ke stimulaci imunitní odpovědi, zahrnují farmaceuticky přijatelné pomocné látky jako jsou například soli hliníku; emulze skvalenu nebo skvalanu a muramyl dipeptid; lipozómy; a sloučeniny, které obsahují stabilizační detergent, látky tvořící micely a biodegradabilní a biokompatibilní olej (Raychandhuri, viz výše).

Vakcína specifická pro mamaglobin může také obsahovat nosné buňky naplněné mamaglobinovým antigenem. S výhodou se nosné buňky připravují z vhodných buněk, které mají autologní antigen (APC), jako jsou například makrofágy, dendritické buňky nebo aktivované B nebo T lymfocyty. Viz například Lanzavecchia, viz výše, str. 937. Profesionální buňky, které mají autologní antigen (APC), mají exprimovaný ligand B7, který se váže na CD28 nebo na CTLA4 na T buňkách, aby byl dopraven antigenně nespecifický kostimulační signál, známý jako Signál 2, aby se předešlo inaktivitě nebo nereaktivitě T buněk. Proto může vakcína obsahovat interleukin-2 nebo jiný kostimulační signál, aby se zrušila indukce nereaktivity. (Lanzavecchia, viz výše, str. 938)

Další druh vakcíny specifické pro mamaglobin obsahuje rekombinantní vektor, který obsahuje sekvenci nukleotidů kódující expresi mamaglobinového antigenu. Použití infekčních látek ke stimulaci cytotoxických T lymfocytů je v oboru známo. (Raychandhuri, viz výše). Chimérické vektory byly popsány za použití kravských neštovic, polio, adeno a retrovirů, stejně tak jako bakterií např. Listérií nebo BCG. Například je dokázáno, že vektor viru neštovic, ALVAC, vyvolává silnou buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď proti zakódovaným heterologním genovým produktům (Taylor a kol., Virology 187:321-328 (1991), jenž je součástí referencí). Dále rekombinantní ALVAC s expresí rejekčního antigenu MZ2-E lidského melanomu kódovaného genem MAGE-1 má schopnost stimulovat in vitro aktivitu MAGE-1 cytotoxických T lymfocytů v populaci TIL získané z nádoru prsu s expresí MAGE-1 mRNA (Toso a kol., viz výše). V jiném přístupu popsaném v U.S. patentu č. 55937972 pro Weinera a kol. (jenž je součástí referencí), se vektor s rekombinantní expresí kódující antigen imunogenního proteinu

podává jedincům přímo buď in vivo, například do svalových buněk nebo ex vivo do buněk jedince s látkou, která usnadňuje buňkám vychytávání DNA.

Znalci z oboru mohou snadno určit, jak vytvořit vakcínu vhodnou k dosažení požadované imunitní odpovědi. Například k in vivo indukci tvorby anti-mamaglobinových protilátek, obsahuje vakcína specifická pro mamaglobin alespoň jeden mamaglobinový antigen B buněk, který obsahuje epitop B buněk a epitop T_H buněk. Epitop T_H buněk je s výhodou u příjemce zamýšlené vakcíny společně s příslušným haplotypem MHC třídy II. Alternativně může být epitop T_H buněk použit tak, že je rozpoznán u člověka obecně bez ohledu na typ HLA, jako je například „univerzální“ epitop T buněk z tetanového toxoidu (Panima-Bordignon a kol., Eur. J. Immunol. 19:2237(1989), jenž je součástí referenci). S výhodou vakcína obsahuje množství mamaglobinových antigenů B buněk s T_H epitopy, které jsou rozpoznány molekulami MHC II. třídy různých HLA typů.

Další složka vakcíny specifické pro mamaglobin indukuje buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď a obsahuje alespoň jeden mamaglobinový T_C antigen, který má schopnost aktivovat T_C buňky specifické pro mamaglobin. S výhodou vakcína obsahuje několik T_C antigenů.

Vakcína specifická pro mamaglobin může být také vytvořena tak, že indukuje jak protilátkovou tak i buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď. Tato složka obsahuje jak mamaglobinové antigeny B buněk tak i mamaglobinové antigeny T_C buněk.

Pacient s nádorem, u kterého je exprimován mamaglobin, může být podle tohoto vynálezu léčen podáváním imunostimulačního množství vakcíny specifické pro mamaglobin. Podávání vakcíny se může provádět jakoukoliv standardní technikou. Toto zahrnuje bez omezení nitrožilní, intraperitoneální, nitrosvalovou, podkožní injekci nebo injekci přímo do prsní tkáně.

Upřednostňované složky tohoto vynálezu jsou popsány v následujících příkladech. Další složky, které jsou součástí patentových nároků, budou odborníkům zřejmé s ohledem na zde uvedenou specifikaci nebo metodiku objevu. Bere se v úvahu, že specifikace spolu s příklady, jsou pouze ukázkové, přičemž plný rozsah a pojetí tohoto vynálezu jsou vyjádřeny v patentových nárocích, které následují po příkladech.

V níže uvedených příkladech byly použité buněčné linie získány z American Type Culture Collection a nechaly se růst v čistém Dulbeccově minimálním médiu doplněném

o 10% fetálního telecího séra. Vzorky tkáňové biopsie byly získány z Human Cooperative Tissue Network (LiVolsi a kol., Cancer 71:1391-1394, 1993, jenž je součástí referencí).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Tento příklad demonstruje izolaci cDNA mamaglobinu.

Celková buněčná RNA z buněčné linie MDA-MB415 byla izolována za použití standardní metody s guanidinem isothiokyanátem. (Belyavski a kol., viz výše). Tato RNA se použije při postupu RACE PCR s použitím soupravy Amplifinder (Clonetech) a podle návodu výrobce.

Syntéza prvního vlákna cDNA byla provedena standardní reakcí, která zahrnuje 1 µg RNA, 10 µmol specifického mamaglobinového primeru D2R (5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3') (sekvence č. 4), 4 µl pufru 5X RT (250 mmol TrisCl pH 8,3, 375 mmol KCl, 15 mmol MgCl₂), 2 µl 100 mmol DTT, 1 µl 10 mmol dNTP a 200 jednotek reverzní transkriptázy Superscript™ II (Gibco/BRL) v reakčním objemu 20 µl. Reakce probíhala po dobu jedné hodiny při teplotě 45 °C a byla ukončena inkubací při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. RNA byla hydrolyzována pomocí 400 µmol NaOH při teplotě 65 °C po dobu 30 minut a neutralizována pomocí 400 µmol kyseliny octové.

Reakční směs se potom přidala ke 3 dílům 6M NaI a 10 µl upravených skleněných kuliček. Kuličky se promyly třikrát pomocí 80% EtOH a nukleová kyselina se vymyla z kuliček pomocí 45 µl vody. Nukleová kyselina se potom nechala vysrážet a znovu resuspendovat v 10 µl vody. Purifikované první vlákno cDNA se potom naváže na výrobcem poskytovaný kotevní oligonukleotid (sekvence č. 9, 5'-CAC GAA TTC ACT ATC GAT TCT GGA ACC TTC AGA GG-3'), používá se ligáza T4 RNA při teplotě 27 °C po dobu 20 hodin. Jedna desetina ligační reakce byla použita pro amplifikaci PCR při 50 µl reakce obsahující 1 µmol na výrobcem poskytovaný kotevní primer (sekvence č. 10, 5'-CTG GTT GGG CCC ACC TCT GAA GGT TCC AGA ATC GAT AG-3'), 1 µmol mamaglobinového specifického primeru D2Rb (sekvence č. 11, 5'-AAT

CCG TAG TTG GTT TCT CAC C-3'), 200 μ mol dNTP, 5 jednotek DNA polymerázy VentTM a 1X polymerázového pufru (10 mmol KCl, 20 mmol TrisCl, 10 mmol (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100). Reakce se nechá inkubovat při teplotě 94 °C po dobu 2 minut a potom při teplotě 94 °C po dobu 45 sekund, při teplotě 50 °C po dobu 1 minuty a při teplotě 72 °C po dobu 90 sekund, celkem 40-krát.

Dva vložené posměrové oligonukleotidy specifické pro mamaglobin byly D2R (sekvence č. 4) a D2Rb (sekvence č. 11). Kontrolní protisměrový oligonukleotid specifický pro mamaglobin byl použit podle návodu výrobce, D2F (5'-CTT TCT GCA AGA CCT TTG GC-3') (sekvence č. 12). Všechny amplifikace PCR byly provedeny s Vent DNA polymerázou (New England Biolabs). Amplifikovaný produkt RACE byl digеровán pomocí EcoRI a ligován k EcoRI a SmaI místům plazmidového vektoru pGEM7Z (Promega, Madison, WI).

Všechno sekvenční řazení bylo prováděno při použití Taq DNA polymerázové termocyklační sekvenční soupravy podle návodu výrobce (Promega). Stručně je níže popsán použitý pracovní postup.

Deset pmol oligonukleotidu se specifickou sekvencí bylo označeno pomocí 10 pmol ³²P- γ ATP (3 000 Ci/mmol a 10 mCi/ml) při použití T4 polynukleotidové kinázy v 10 μ l reakční směsi po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Polymerizační reakce obsahující 100 ng plasmidové šablony, 1,5 pmol značeného sekvenčního primeru a 5 jednotek sekvenční Tag polymerázy byla vytvořena v 17 μ l sekvenčního pufru poskytovaného výrobcem. Tato reakce byla alikvotně rozdělena do sady čtyř reakčních zkumavek obsahujících výrobcem poskytovanou směs deoxynukleotidů, a to buď dideoxy-A, C, G nebo T. Sada čtyř zkumavek se nechala inkubovat při teplotě 95 °C po dobu 2 minut a potom při teplotě 94 °C po dobu 45 sekund, při teplotě 45 °C po dobu 30 sekund a při teplotě 72 °C po dobu 1 minuty, celkem 30-krát. Po dokončení reakcí se do každé zkumavky přidaly 3 μ l barviva 80% formamid/bromfenolové modři. Vzorky se nechaly ohřát na 70 °C po dobu 2 minut a byly nanесeny na 6% akrylamid/7,5 M močoviny sekvenční gel a nechaly se probíhat po dobu 2 až 4 hodin konstantním 60 W příkonem. Gel byl osušen a exponován na Kodak XAR5 rentgenový film po dobu 2 až 24 hodin.

Takto získaná sekvence byla fragment o 403 bp (sekvence č. 5) jak je znázorněno na obrázku 2, plná čára. V dřívějších pracích byla izolována sekvence DEST002 Tag

(Watson a Fleming, viz výše). Tato sekvence byla fragmentem o 206 bp (sekvence č. 6) jak je uvedeno na obrázku č. 2, nevyplněná čára. Kombinace informací těchto sekvencí umožnila odečíst plnou délku cDNA o 503 bp mamaglobinu. (obrázek č. 2).

Příklad 2

Tento příklad dokazuje, že exprese mamaglobinu je omezena na nádorové buňky prsní žlázy a v menší míře na normální buňky prsní žlázy.

Vzorky celkové buněčné RNA byly izolovány pomocí standardní guanidin isothiokyanátonou metodou a upraveny pomocí bez-RNasové DNasy (Promega). Pro testování RT/PCR byl 1 µg určené celkové RNA reverzně přepsán s oligo dT₂₁ (sekvence č. 13) a reverzní transkriptázou Superscript II (Gibco/BRL) podle návodu výrobce.

Dvě stě ng oligo dT₂₁ (sekvence č. 13) a 1 µg celkové RNA se nechaly inkubovat při teplotě 65 °C po dobu 5 minut v objemu 10 µl. Vzorky se nechaly ochladit na ledu a přidalo se k nim 4 µl 5X RT pufru (250 mmol TrisCl pH 8,3, 375 mmol KCl, 15 mmol MgCl₂), 2 µl 100 mmol DTT, 1 µl 10 mmol dNTP a 200 jednotek reverzní transkriptázy SuperscriptTM II (Gibco/BRL). Reakce pokračovala po dobu 1 hodiny při teplotě 45 °C a byla ukončena inkubací při teplotě 95 °C po dobu 5 minut.

Jedna desetina každé RT reakce byla podrobena PCR analýze za použití primerů D2R specifických pro mamaglobin (D2R (5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3') (sekvence č. 4) a d2102 (5'-CAG CGG CTT CCT TGA TCC TTG-3') (sekvence č. 3) a za standardních reakčních podmínek při 40 cyklech při 94 °C x 30 sekund / 55 °C x 1 min. / 72 °C x 1 min.

Pro Northern analýzu bylo testováno 20 µg celkové RNA tak, jak již bylo popsáno (Watson a Fleming, viz výše), byla použita próba mamaglobinové cDNA o plné délce. Integrita a rovnoměrné plnění všech vzorků RNA bylo hodnoceno barvením ethidium bromidem.

Jak je uvedeno na obrázku 4A, mamaglobinová informace o 500 bp se stanovuje snadno ve vzorku tkáně 2410 (tkáň, ze které byla původní DEST izolována) a v menší míře i v normální tkáni lidského prsu, ale ne u nesmrtelné buněčné linie prsního epitelu B5-589, nebo v lidských plicích, placentě, děloze a vaječnících (obrázek 4A). Následně

po amplifikaci byla provedena analýza RT/PCR, kde exprese mamaglobinu nebyla stále určena u 15 vyšetřených vzorků (obrázek 4B). Detekcí odezvy glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) a EGF receptorové odezvy v těchto reakcích (údaje nejsou uvedeny) bylo prokázáno, že chybění exprese nebylo důsledkem znehodnocení RNA nebo další triviální příčiny. Exprese mamaglobinové RNA je tedy relativně specifická pro prsní tkáň.

Příklad 3

Tento příklad ukazuje, že cDNA mamaglobinu kóduje překladatelné nukleotidové sekvence, jejichž výsledkem je proteinový produkt o přibližně odhadnuté molekulové hmotnosti. Překládání in vitro bylo prováděno podle návodu výrobce pomocí TNTTM králíčí retikulocytové translační soupravy s T7 RNA polymerázou (Promega) a ³⁵S-methioninu (>1000 Ci/mmol; 10mCi/ml, Amersham).

Ke 25 μ l lyzátu TNTTM králíčích retikulocytů se přidaly 2 μ l výrobcem připraveného reakčního pufru, T7 RNA polymerázy, 20 μ mol směsi aminokyselin bez methioninu, 40 μ Ci ³⁵S-methioninu (1 000 Ci/mmol a 10 mCi/ml), 40 jednotek ribonukleázového inhibitoru, 1 μ g plasmidu mamaglobin/pGEM7 a dostatek upravené DEPC vody, aby konečný objem reakce byl 50 μ l. Tato reakce se nechala inkubovat při teplotě 30 °C po dobu 60 minut. 5 μ l této reakce se přendalo do 20 μ l gelového pufru SDS, nechalo se vařit po dobu 2 minut a nanoslo na 17,5 % SDS-polyakrylamidový gel.

Lyzát králíčích retikulocytů programovaný mamaglobinovou cDNA vytvořil protein o 6 kD, zatímco bez programované cDNA nedošlo ke tvorbě žádného proteinového produktu.

Příklad 4

tento příklad ukazuje prevalenci zvýšené exprese mamaglobinu u primárního karcinomu prsu.

Ke stanovení četnosti zvýšené exprese mamaglobinu u karcinomu prsu jsme vyšetřili soubor patnácti primárních karcinomů prsu klinického stádia I s různými histologickými typy pomocí hybridizace Northern blot s próbou mamaglobinové cDNA.

U dvou nemocných byly také porovnány vzorky normální prsní tkáně téhož pacienta (obrázek 6). Mamaglobinová mRNA o 500 bp byla detekována u normální prsní tkáně a nádoru 2410 a u tří dalších nádorů. U dvou z nich normální prsní tkáň téhož pacienta vykazovala malou nebo žádnou expresi (BO15 proti BO16; BO22 proti BO23) (obrázek 6). U všech 4 z 15 (27 %) vyšetřených nádorů byla zjištěna zvýšená exprese mRNA mamaglobinu.

Tyto údaje dokazují, že zvýšená exprese mRNA mamaglobinu není ojedinělá pro jednotlivé nádorové vzorky a je ve skutečnosti relativně častá u primárních prsních nádorů. Dále skutečnost, že všechny vyšetřené nádory byly klinického stádia I, svědčí pro to, že dysregulace se objevuje relativně časně u progresu prsní neoplázie.

Příklad 5

Následující příklad znázorňuje detekci mamaglobinového proteinu pomocí anti-mamaglobinové polyklonální protilátky.

Anti-mamaglobinové polyklonální protilátky byla připravena spojením peptidu odpovídajícího 16 C konci aminokyselin určeného z mamaglobinové cDNA (Glu-Val-Phe-Met-Gln-Leu-Ile-Tyr-Asp-Ser-Ser-Leu-Cys-Asp-Leu-Phe, sekvence č. 14) s Keyhole Lymphet Hemocyaninem a injekcí králíkům s Freundovou pomocnou látkou. Takto naočkovaní králíci se posilovali v třítydenních intervalech a 12. týden se nechali vykrváct. Tato séra se vyšetřila, aby se stanovila jejich schopnost detekovat mamaglobin v upraveném médiu kultur buněčných linií nádorů prsu MDA-MB-415 a MCF-7 bez séra. MDA-MB-415 byla později označena jako buněčná linie, u které je zvýšená exprese mamaglobin a MCF-7 byla označena jako buněčná linie, která produkuje nedetekovatelnou mamaglobinovou mRNA.

Upravená média byla získána ze 24 hodinové kultury a znovu rozpuštěna na 12% SDS akrylamidovém gelu při redukčních podmínkách (tj. vzorek se nechal vařit v pufru, který obsahovat dithiotreitol (DTT) a 2-merkapt ethanol (BME), aby se omezily disulfidické vazby). Potom se nalila na Nytran filtr a analyzovala se pomocí standardního protokolu Western blot pomocí výše popsané protilátky proti C-terminálnímu peptidu, jakožto primární protilátky tohoto testu. Po primárním navázání protilátky se blot promyl a přidaly se sekundární protilátky (kozy proti-králíci). Komplexy

mamaglobin – protilátka byly zviditelněny pomocí enzymově vázané chemiluminiscence (ECL Western Blotting Detecting reagent, Amersham, Arlington Heights, IL).

Anti-mamaglobinové polyklonální protilátky detekovaly v upraveném médiu buněčné kultury MDA-MB-415 pruh s patrnou molekulovou hmotností přibližně 21 kD (údaje nejsou uvedeny). Žádné pruhy nebyly detekovány u upraveného média buněčné kultury MCF-7 (údaje nejsou uvedeny). Toto ve shodě s údaji o mRNA svědčí, že buňky MDA-MB-415 secernují mamaglobinový protein ale nikoliv buňky MCF-7.

Zjištěná molekulová hmotnost mamaglobinu secernovaného do kultivačního média MDA-MB-415 je větší než 10,5 kD, což je hodnota vypočítaná z předpovídané sekvence aminokyselin sekvence č. 2. Vzhledem k tomu, že téměř všechny secernované proteiny byly glykosylovány, cytozol buněk MDA-MB-415 byl testován pomocí anti-mamaglobinové polyklonální protilátky, aby se zjistilo, zda-li by se mohly detekovat některé formy prekursoru secernovaného mamaglobinu.

Buňky MDA-MB-415 se nechaly růst po dobu 24 hodin v médiu bez séra, kultivační média se odebrala, centrifugovala a sebral se výsledný supernatant. Připevněné buňky se promyly pomocí fyziologického roztoku pufovaného fosfátem (PBS) a nechaly se lyzovat pomocí 1X Laemmli pufru (2% SDS, 10% glycerol, 100 mmol DTT, 60 mmol Tris, pH 6,8, 0,001 % bromfenolové modři). Lyzovaná směs se nechala vařit po dobu 5 minut a potom se centrifugovala při 10 000 G po dobu 5 minut, aby se buněčná drť shlukla. Buněčný lyzát se potom přendal do nové zkumavky a byla použita analýza Western blot tak, jak je popsáno níže.

Kultivační supernatant a buněčný lyzát se spojily s 12% SDS akrylamidovým gelem za redukčních podmínek (tj.: vzorek se nechal vařit v pufru, který obsahovat DTT a BME) a nalil se na PVDF membránu při použití standardní techniky. Blot byl zkoumán pomocí polyklonální protilátky proti C-terminálnímu peptidu za přítomnosti a při chybění soupeřícího peptidu, který byl použit k přípravě protilátek.

Vizualizace komplexu mamaglobin-protilátka bylo popsáno výše. Jak je vidět na obrázku 7, při chybění soutěžícího peptidu (-) upravená média (S) obsahují pruh o 21 kD představující secernovaný mamaglobinový protein. Buněčný lyzát (C) se vyznačoval markantním pruhem o hmotnosti přibližně 14 kD a několika pruhy s vyšší molekulovou hmotností včetně jednoho o hmotnosti 21 kD. Pokud se Western blot provádí za přítomnosti soutěžícího peptidu (+), secernované formy a nitrobuněčné

formy mamaglobinu nejsou viditelné a znamená to, že tyto proteiny obsahují peptid, ke kterému byla syntetizována protilátka.

Pruh o 14 kD byl detekován pouze v buněčném lyzátu, který pravděpodobně představuje prekurzor, nebo nezpracované formy mamaglobinu. Jelikož předpovídaná sekvence aminokyselin pro mamaglobin je ve shodě s N-glykosylačním místem, Asn-X-Thr umístěný ve zbytcích 53 až 55 a ve zbytcích 68 až 70 sekvence č. 2, sledovaná secernovaná forma o 21 kD pravděpodobně představuje nějakou glykosylovanou formu proteinu.

Tato hypotéza byla testována pomocí kultivace buněk MDA-MB-415 v přítomnosti a při chybění tunikamycinu, tedy léku, který blokuje N-spojenou glykosylaci eukaryotických proteinů. Tunikamycin se přidával do jedné ze dvou identických kultur v koncentraci 1 µg/ml a obě kultury se nechaly inkubovat přes noc po dobu více hodin. Kultivační média a buněčný lyzát z léčených a kontrolních kultur byly připravovány a analyzovány metodou Western blot tak, jak je popsáno výše.

Jak je uvedeno na obrázku 8, u médií z kultur (S) léčených pomocí tunikamycinu (+) chyběly detekovatelné hladiny secernovaného mamaglobinu, což svědčí o tom, že je secernovaný mamaglobin glykosylovaný. Překvapivě buněčná cytozolová forma mamaglobinu (14 kD) nebyla také detekovatelná v lyzátu buněk MDA-MB-415 léčených pomocí tunikamycinu (vzdálený pravý pruh). Domníváme se, že blokováním časné glykosylace pomocí tunikamycinu vede k nestabilitě a degradaci prekurzorových forem mamaglobinu, což vysvětluje chybění detekovatelnosti proteinu o 14 kD v cytozolu buněk léčených pomocí tunikamycinu.

Polyklonální protilátka proti C-terminálnímu peptidu mamaglobinu také detekovala prekurzorové formy mamaglobinu o 14 kD v buněčném lyzátu ze vzorků primárního lidského karcinomu prsu. jak je vidět na obrázku 9, prekurzorová forma mamaglobinu je přítomná u vzorku nádoru B023, ale není detekovatelná ve vzorku normální prsní tkáně téhož pacienta (B022). Je zajímavé, že některé nádorové vzorky, u kterých je exprimován transkript mamaglobinu (tj. 087R, 014, 75A a 2410), neobsahují detekovatelné hladiny mamaglobinového proteinu podle testu Western blot analýzy. Podle jedné hypotézy podle těchto údajů je exprese mamaglobinu regulována na úrovni přepisu a překladu a tato diferenciační regulace je určena vývojovým stádiem nádoru.

Polyklonální protilátka proti mamaglobinu se také používá pro vyhledávání secernovaného mamaglobinu ze sekrecí prsu proliferující prsní žlázy. Kolostrum a zralé mateřské mléko (vzorky o 500 μ l) se sbíraly manuálním vymačkáváním u těhotných žen během prvního a třetího trimestru, při porodu a 3., 14., a 21. den po porodu. Vzorky se naředily stejným objemem 2X laemmli pufru (4% SDS, 20 % glycerolu, 200 mmol DTT, 120 mmol Tris, pH 6,8, 0,002 % bromfenolové modři). Naředěné vzorky se nechaly vařit po dobu 5 minut a potom se centrifugovaly při 10 000 G po dobu 5 minut při teplotě 4 °C, aby se získal shluk buněčné drti. denaturované vzorky se přendaly do nové zkumavky a uskladnily se při teplotě –20 °C před provedením analýzy Western blot tak, jak je popsáno výše.

Jak je vidět na obrázku 10, protilátky detekovaly secernovaný mamaglobin o 21 kD v sekretech prsu ze vzorku z období těhotenství, tedy období vysoké proliferace epitelových buněk prsu. Nicméně při nástupu laktace, tedy stádia diferenciacie epitelu prsu, se hladiny mamaglobinu významně snížily od 3. dne po porodu a již nebyly vůbec pozorovány 14. den po porodu. Tyto výsledky ukazují, že secernovaný mamaglobin souvisí s proliferací epitelových buněk prsu. Toto pozorování je ve shodě s detekcí secernovaného mamaglobinu u lidského karcinomu prsu.

Reaktivita mezi protilátkou a mamaglobinovým peptidem byla také prokázána u nádorových buněk prsu pomocí imunohistochemického barvení preparátů z patientských vzorků karcinomu prsu fixovaných v parafínu. (Obrázek 11). Imunohistochemické barvení se provádělo při použití protilátek proti mamaglobinovému peptidu jakožto primární protilátky a potom se detekoval komplex mamaglobin-protilátka pomocí kozích proti-králíčích protilátek s navázanou křenovou peroxidázou a 3,3'-diaminobenzen tetrahydrochloridem (DAB) jakožto substrátem. Buňky s expresí mamaglobinového proteinu se barvily do hněda.

Na základě těchto výsledků se domníváme, že mamaglobinový protein je syntetizován jako prekurzorový protein a post-translační modifikace jako např. N-vázaná glykosylace zjevně zvyšují jeho molekulovou hmotnost před sekrecí; že stabilita prekurzorových forem mamaglobinu závisí na N-vázané glykosylaci: a že mamaglobinový protein je secernován proliferujícími nádorovými buňkami karcinomu prsu. Detekce mamaglobinového proteinu je použitelná u diagnostiky karcinomu tak, že se mamaglobinový protein používá jakožto nádorový marker karcinomu prsu, dále pak ke

stanovení relapsu karcinomu prsu, při monitoraci autologních transplantovaných kmenových buněk kostní dřeně ke stanovení kontaminace nádorovými buňkami a zacílení nádorových buněk karcinomu prsu při léčebném zásahu cestou přes protilátky zprostředkované komplexy. Purifikovaný a izolovaný mamaglobinový polypeptid je užitečný pro tvorbu protilátek proti nádorům prsu a pro vývoj dalších imunoterapeutických vzorků specifických pro jednotlivé nádory.

S ohledem na výše uvedené údaje je zřejmé, že tímto vynálezem bylo dosaženo několika výhod a bude dosaženo i dalších výhodných výsledků.

Vzhledem k tomu, že může být provedeno mnoho různých obměn ve výše uvedených metodách a sloučeninách odvozených od tohoto vynálezu, vše co je obsažené ve výše uvedeném popisu a znázorněno na doplňujících obrázcích by mělo být chápáno jako v ilustrativním, ale nikoliv v limitujícím slova smyslu.

Seznam sekvencí

Sekvence č. 1:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 503 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA na mRNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 1:

GACAGCGGCT TCCTTGATCC TTGCCACCCG CGACTGAACA CCGACAGCAG CAGCCTCACC
60

ATGAAGTTGC TGATGGTCCT CATGCTGGCG GCCCTCTCCC AGCACTGCTA CGCAGGCTCT
120

GGCTGCCCCT TATTGGAGAA TGTGATTTC AAGACAATCA ATCCACAAGT GTCTAAGACT
180

GAATACAAAG AACTTCTTCA AGAGTTCATA GACGACAATG CCACTACAAA TGCCATAGAT
240

GAATTGAAGG AATGTTTTCT TAACCAAACG GATGAACTC TGAGCAATGT TGAGGTGTTT
300

ATGCAATTAA TATATGACAG CAGTCTTTGT GATTTATTTT AACTTTCTGC AAGACCTTTG
360

GCTCACAGAA CTGCAGGGTA TGGTGAGAAA CCAACTACGG ATTGCTGCAA ACCACACCTT
420

CTCTTTCTTA TGTCTTTTAA CTACAACTA CAAGACAATT GTTGAAACCT GCTATACATG
480

TTTATTTTAA TAAATTGATG GCA
503

Sekvence č. 2:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 93 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: protein
- (iii) Hypotetický: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 2

```

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

```

Sekvence č. 3:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 21 párů bazí
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 3:

```

CAGCGGCTTC CTTGATCCTT G
21

```

Sekvence č. 4:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 20 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 4:

: ATAAGAAAGA GAAGGTGTGG
 20

Sekvence č. 5:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 403 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA na mRNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 5:

GACAGCGGCT TCCTTGATCC TTGCCACCCG CGACTGAACA CCGACAGCAG CAGCCTCACC
60

ATGAAGTTGC TGATGGTCCT CATGCTGGCG GCCCTCTCCC AGCACTGCTA CGCAGGCTCT
120

GGCTGCCCCCT TATTGGAGAA TGTGATTTC AAGACAATCA ATCCACAAGT GTCTAAGACT
180

GAATACAAAG AACTTCTTCA AGAGTTCATA GACGACAATG CCACTACAAA TGCCATAGAT
240

GAATTGAAGG AATGTTTTCT TAACCAAACG GATGAACTC TGAGCAATGT TGAGGTGTTT
300

ATGCAATTAA TATATGACAG CAGTCTTTGT GATTATTTT AACTTTCTGC AAGACCTTTG
360

GCTCACAGAA CTGCAGGGTA TGGTGAGAAA CCAACTACGG ATT
403

Sekvence č. 6:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 206 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA na mRNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 6:

TTTATGCAAT TAATATATGA CAGCAGTCTT TGTGATTAT TTTAACTTTC TGCAAGACCT
60

TTGGCTCACA GAACTGCAGG GTATGGTGAG AAACCAACTA CGGATTGCTG CAAACCACAC
120

CTTCTCTTTC TTATGTCTTT TTACTACAAA CTACAAGACA ATTGTTGAAA CCTGCTATAC
180

ATGTTTATTT TAATAAATTG ATGGCA
206

Sekvence č. 7:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 95 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: protein
- (iii) Hypotetický: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 7:

Met Lys Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Val Thr Ile Pro Ile Cys Cys
1 5 10 15

Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Cys Ser Ile Leu Asp Glu Val Ile Arg Gly
20 25 30

Thr Ile Asn Ser Thr Val Thr Leu His Asp Tyr Met Lys Leu Val Lys
35 40 45

Pro Tyr Val Gln Asp His Phe Thr Glu Lys Ala Val Lys Gln Phe Lys
50 55 60

Gln Cys Phe Leu Asp Gln Thr Asp Lys Thr Leu Glu Asn Val Gly Val
65 70 75 80

Met Met Glu Ala Ile Phe Asn Ser Glu Ser Cys Gln Gln Pro Ser
85 90 95

Sekvence č. 8:

- (i) charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 91 aminokyselin
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: protein
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 8:

```

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

```

Sekvence č. 9:

- (i) charakteristika sekvence:
 (A) Délka: 35 párů bází
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Řetězec: jednoduchý
 (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 9:

```

CACGAATTCA CTATCGATTG TGGAACCTTC AGAGG
35

```

Sekvence č. 10:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 38 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 10:

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG
38

Sekvence č. 11:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 22 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 11:

AATCCGTAGT TGGTTTCTCA CC
22

Sekvence č. 12:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 20 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 12:

CTTTCTGCAA GACCTTTGGC
20

Sekvence č. 13:

- (i) charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 21 párů bází
 - (B) Typ: nukleová kyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: cDNA na mRNA
- (iii) Hypotetický: ne
- (iv) Anti-sense: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 13:

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT T
21

- (i) Charakteristika sekvence:
 - (A) Délka: 16 aminokyselin
 - (B) Typ: aminokyselina
 - (C) Řetězec: jednoduchý
 - (D) Topologie: lineární
- (ii) Molekulový typ: peptid
- (iii) Hypotetický: ne
- (xi) Popis sekvence: Sekvence č. 14:

Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser Leu Cys Asp Leu Phe
1 5 10 15

PATENTSERVIS
Praha a.s.

PATENTOVÉ NÁROKY

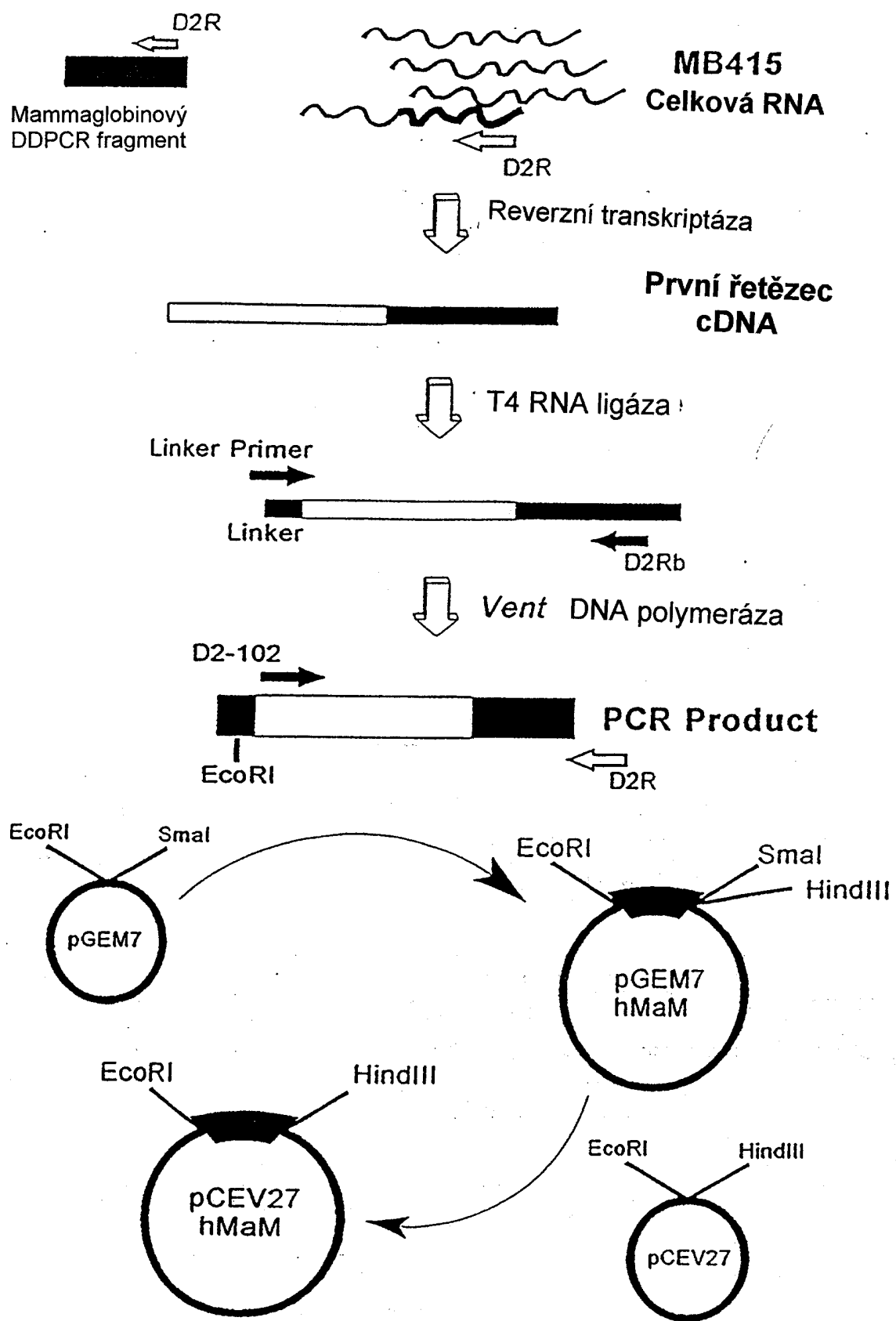
1. Vakcína specifická pro mamaglobin, která obsahuje imunogenně účinné množství alespoň jednoho antigenu mamaglobinu, který obsahuje alespoň šest aminokyselin souvisejících se sekvencí č. 2.
2. Vakcína podle nároku 1, kde zmíněný mamaglobinový antigen je navázán na přenašečskou buňku.
3. Vakcína podle nároku 1, která dále obsahuje farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.
4. Vakcína podle nároku 1, která obsahuje směs mamaglobinových antigenů B buněk a mamaglobinových antigenů T_C buněk.
5. Vakcína specifická pro mamaglobin, která obsahuje rekombinantní vektor, který obsahuje sekvenci nukleotidů kódující expresi mamaglobinových antigenů B buněk a/nebo mamaglobinových antigenů T_C buněk.)
6. Způsob léčby pacienta s nádorem exprimujícím mamaglobin vyznačující se tím, že zahrnuje podání vakcíny specifické, pro mamaglobin, která obsahuje imunogenně účinné množství alespoň jednoho antigenu mamaglobinu.
7. Způsob podle nároku 6 vyznačující se tím, že zmíněný mamaglobinový antigen je navázán na přenašečskou buňku.
8. Způsob podle nároku 5 vyznačující se tím, že zmíněná vakcína dále obsahuje farmaceuticky přijatelnou pomocnou látku.
9. Způsob podle nároku 5 vyznačující se tím, že zmíněný mamaglobinový antigen obsahuje sekvenci aminokyselin, která je pro expresi kódována sekvencí nukleotidů v rekombinantním vektoru.
10. Způsob léčby pacienta s nádorem exprimujícím mamaglobin vyznačující se tím, že zahrnuje izolaci lymfocytů specifických pro mamaglobin z nádoru, aktivaci lymfocytů pomocí alespoň jednoho mamaglobinového antigenu a podání aktivovaných lymfocytů pacientovi.

11. Izolovaný a purifikovaný polypeptid, který obsahuje alespoň jeden mamaglobinový antigen, který obsahuje alespoň 6 aminokyselin souvisejících se sekvencí č. 2, kde zmíněný mamaglobinový antigen je rozpoznán B buňkami a/nebo T_C buňkami specifickými pro přirozeně se vyskytující, secernovaný mamaglobinový polypeptid, který je glykosylovaný a obsahuje sekvenci 20 až 93 aminokyselin sekvence č. 2.
12. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 11, kde mamaglobinový antigen obsahuje alespoň 12 aminokyselin souvisejících se sekvencí č. 2.
13. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 12, kde mamaglobinový antigen obsahuje alespoň 25 aminokyselin souvisejících se sekvencí č. 2.
14. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 13, kde mamaglobinový antigen obsahuje alespoň 20 až 93 aminokyselin souvisejících se sekvencí č. 2.
15. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 13, kde mamaglobinový antigen je glykosylovaný a obsahuje sekvenci č. 2.
16. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 11, kde mamaglobinový antigen je mamaglobinový antigen B buněk, který indukuje in vitro aktivaci a expanzi B buněk od pacienta s karcinomem prsu.
17. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 16, kde mamaglobinový antigen B buněk obsahuje epitop T_H buněk z heterologního proteinu.
18. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 11, kde mamaglobinový antigen je mamaglobinový antigen T_C buněk, který indukuje in vitro aktivaci a expanzi T_C buněk od pacienta s karcinomem prsu.
19. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 18, kde mamaglobinový antigen T_C buněk obsahuje 8 nebo 9 aminokyselin souvisejících se sekvencí č. 2.
20. Izolovaný a purifikovaný polypeptid podle nároku 11, který obsahuje mamaglobinový antigen B buněk a mamaglobinový antigen T_C buněk.

1/12

02.08.00

PV 2000-993



Obrázek 1

00:08:00

2/12

9	18	27	36	45	54
5' GAC AGC GGC TTC CTT GAT CCT TGC CAC CCG CGA CTG AAC ACC GAC AGC AGC AGC					
63	72	81	90	99	108
CTC ACC ATG AAG TTG CTG ATG GTC CTC ATG CTG GCG GCC CTC TCC CAG CAC TGC					
Met Lys Leu Leu Met Val Leu Met Leu Ala Ala Leu Ser Gln His Cys					
1			10		
117	126	135	144	153	162
TAC GCA GGC TCT GGC TGC CCC TTA TTG GAG AAT GTG ATT TCC AAG ACA ATC AAT					
Tyr Ala Gly Ser Gly Cys Pro Leu Leu Glu Asn Val Ile Ser Lys Thr Ile Asn					
20			30		
171	180	189	198	207	216
CCA CAA GTG TCT AAG ACT GAA TAC AAA GAA CTT CTT CAA GAG TTC ATA GAC GAC					
Pro Gln Val Ser Lys Thr Glu Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Glu Phe Ile Asp Asp					
40				50	
225	234	243	252	261	270
AAT GCC ACT ACA AAT GCC ATA GAT GAA TTG AAG GAA TGT TTT CTT AAC CAA ACG					
Asn Ala Thr Thr Asn Ala Ile Asp Glu Leu Lys Glu Cys Phe Leu Asn Gln Thr					
60					70
279	288	297	306	315	324
GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GAG GTG TTT ATG CAA TTA ATA TAT GAC AGC AGT					
Asp Glu Thr Leu Ser Asn Val Glu Val Phe Met Gln Leu Ile Tyr Asp Ser Ser					
80					
333	342	351	360	369	378
CTT TGT GAT TTA TTT TAA CTT TCT GCA AGA CCT TTG GCT CAC AGA ACT GCA GGG					
Leu Cys Asp Leu Phe ***					
90					
387	396	405	414	423	432
TAT GGT GAG AAA CCA ACT ACG GAT TGC TGC AAA CCA CAC CTT CTC TTT CTT ATG					
441	450	459	468	477	486
TCT TTT TAC TAC AAA CTA CAA GAC AAT TGT TGA AAC CTG CTA TAC ATG TTT ATT					
495					
TTA ATA AAT TGA TGG CA 3'					

Obrázek 2

hcc10 -21 MKAVTLTLVTTALCCSSASAEICPSFQRMETLLMDTPSS-
hMaM 01 MKLLMVLMLAALSQHGYA-GSGCPLENVTSKTNPQVSKT
rPSC3 01 MKLVFLFLVTTIPICGYASGSGCSILDEVTGNTNSTVTLH

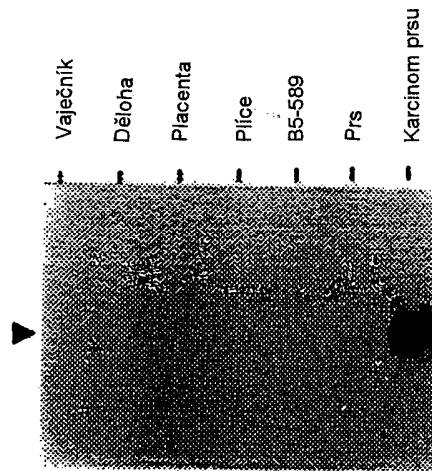
hcc10 20 -YEAAMELFSPDQDMREAGAQLKKLVDTTPOK--PRESIIKL
hMaM 41 EYKELLQEFIDBNATTNAIDELKECF--ENOTDETLSNVEVF
rPSC3 42 DYMKLVKPYVQDHFTEKAVKQFKQCF--EDQTDKTLENVGVGM

hcc10 61 MEKIAQSSIGN
hMaM 82 MQITFYDSSIGDLF
rPSC3 83 MEATTFNSESQQQPS

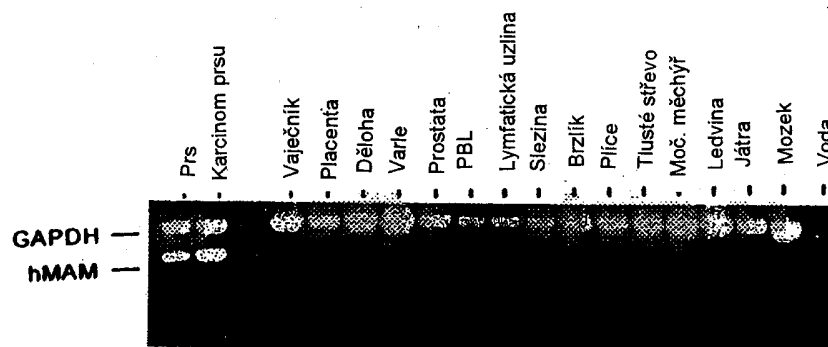
Obrázek 3

4/12

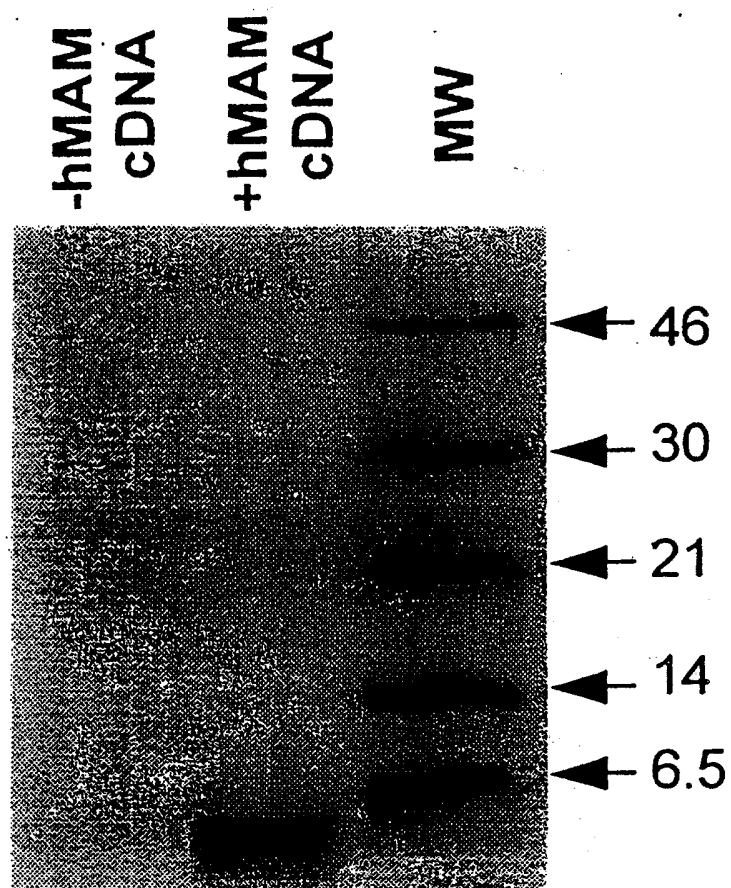
Obrázek 4A



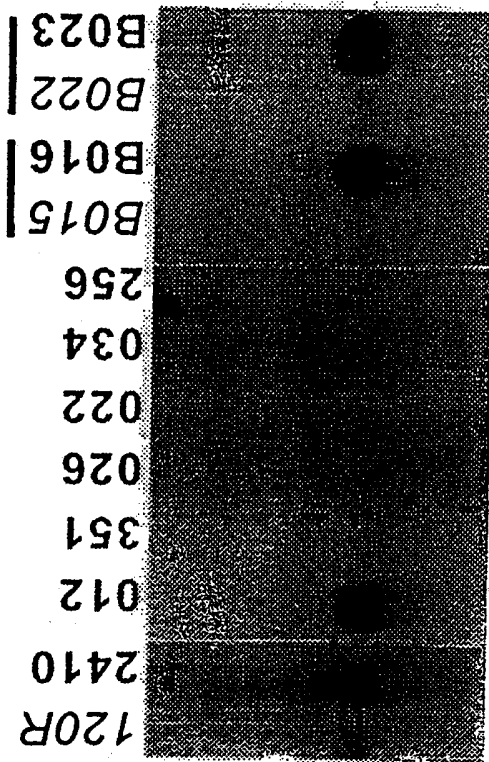
Obrázek 4B



5/12

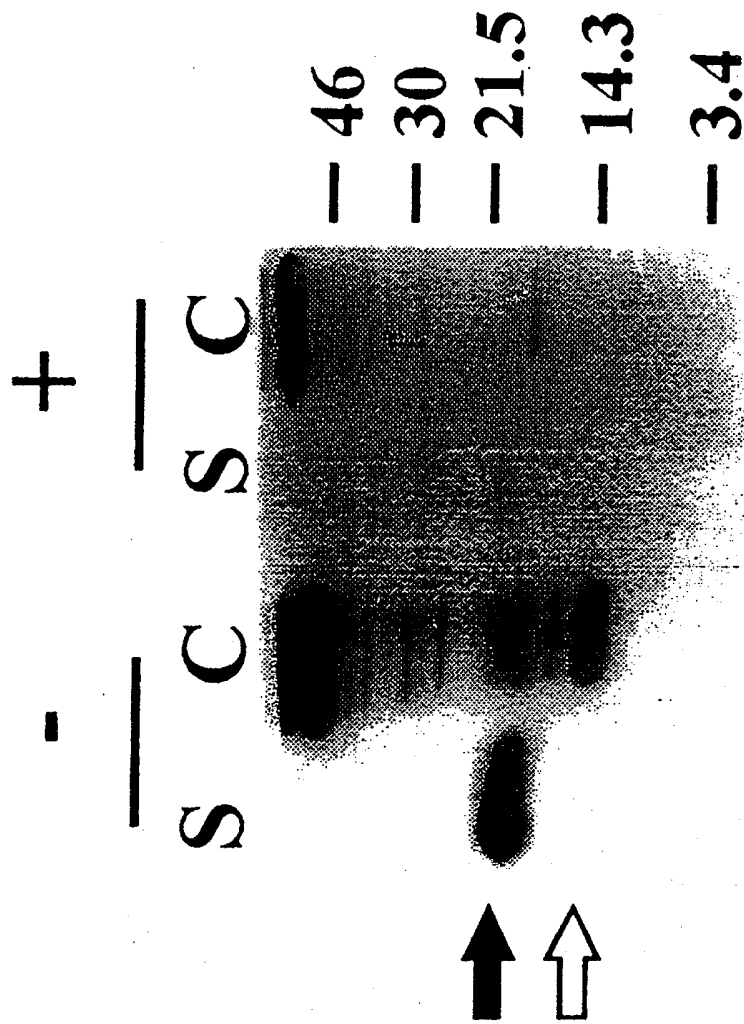


Obrázek 5



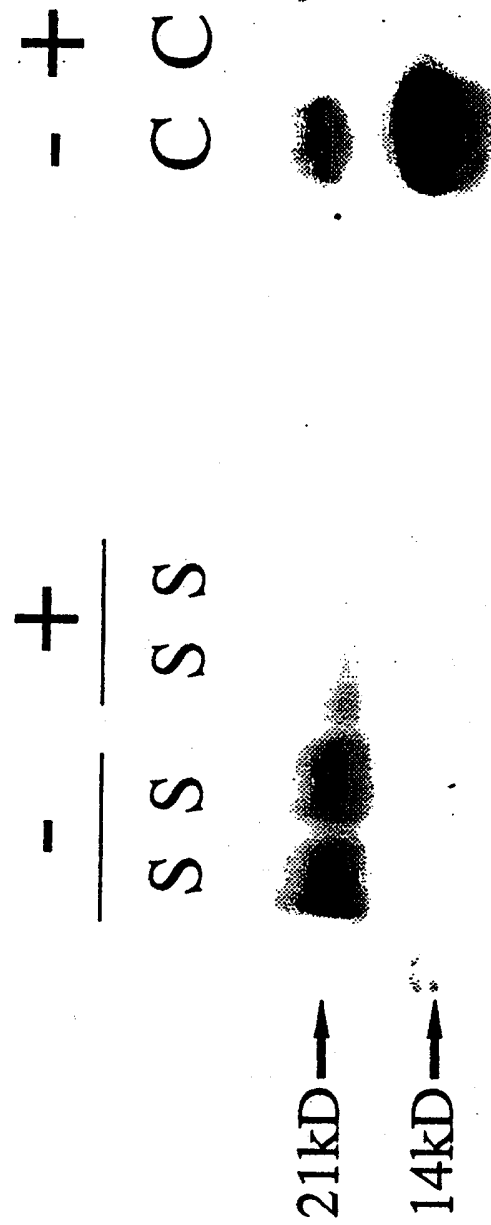
Obrázek 6

7/12



Obrázek 7

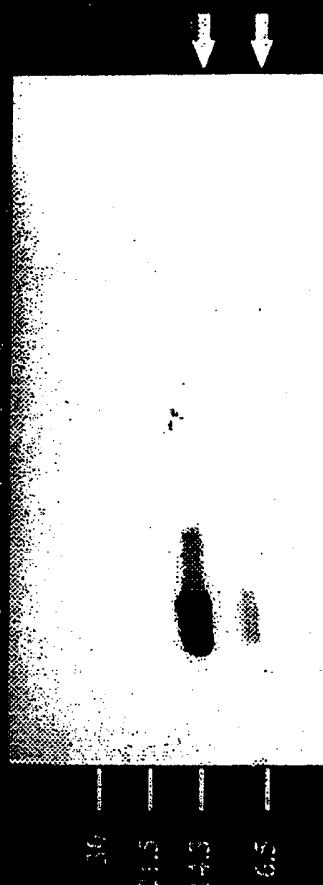
8/12



Obrázek 8

9/12

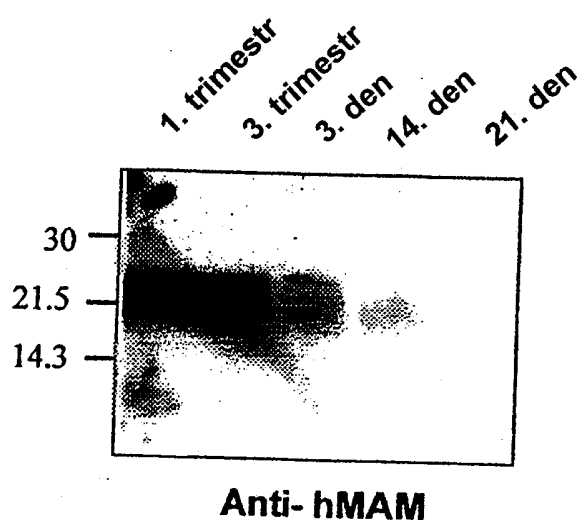
Mamaglobinový protein je
zvýšeně exprimován u podskupiny
lidských nádorů prsu



Obrázek 9

10/12

**Mamaglobinový protein je secernován
proliferující prsní žlázou**



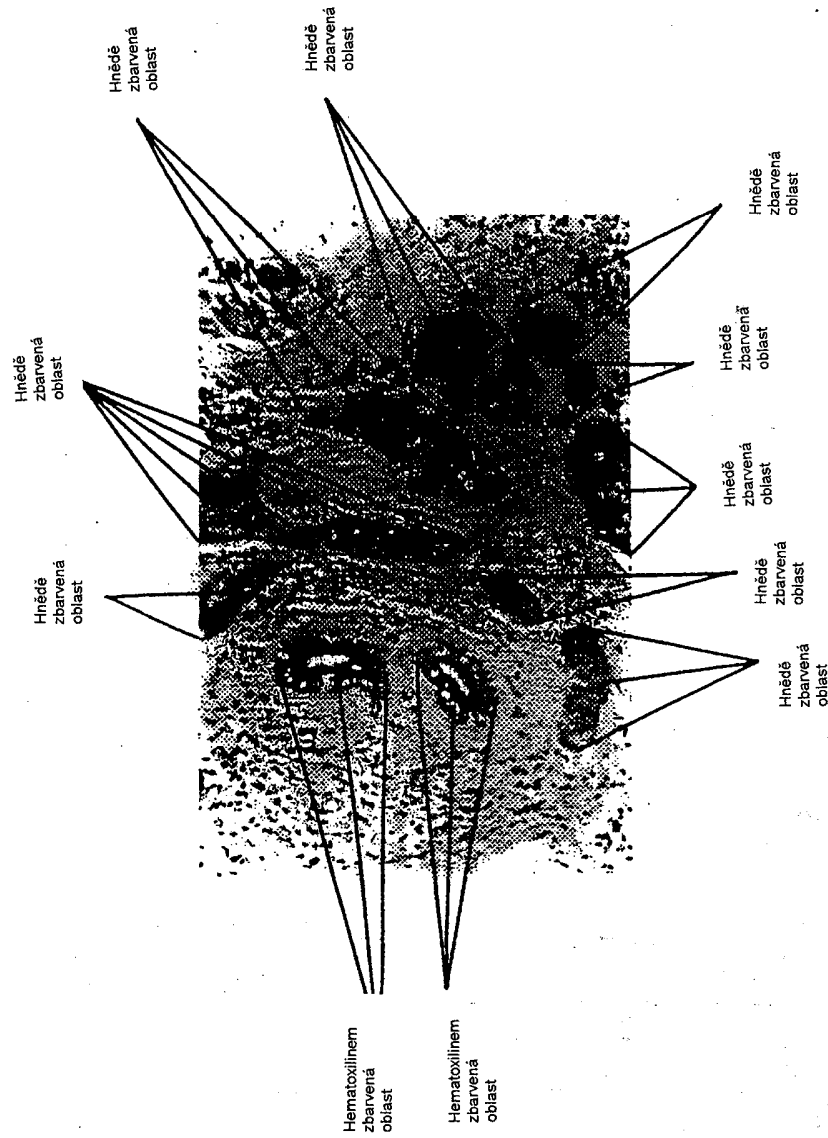
Obrázek 10

11/12



Obrázek 11A

12/12



Obrázek 11B