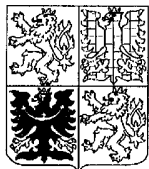


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 20.03.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 05.08.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/054835

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 11.10.2000
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: PCT/CA98/00246

(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/07860

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 422

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/70
A 61 K 39/385
A 61 K 39/12
C 07 K 19/00
A 61 K 48/00

(71) Přihlašovatel:

STRESSGEN BIOTECHNOLOGIES
CORPORATION, Victoria, CA;

(72) Původce:

Mizzen Lee, Victoria, CA;
Chu Randall, Victoria, CA;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Háfkova 2, Praha 2, 12000;

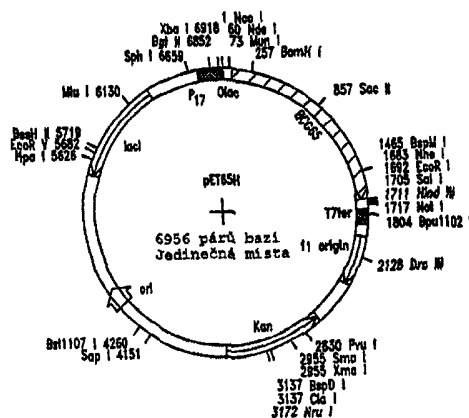
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Imunitní odpověď proti HPV antigenům
vyvolaná prostředky obsahujícími HPV antigen a
stresový protein nebo expresní vektor schopný
expresce těchto proteinů**

(57) Anotace:

Řešení se týká prostředků pro indukci imunitní odpovědi, výhodně buněčné, přesněji buněčné cytolytické imunitní odpovědi, proti proteinovým antigenům lidského papilomaviru (HPV) přítomným na HPV nebo na infikovaných buňkách, včetně buněk karcinomu čípku děložního a jiných nádorů. V jednom provedení prostředek obsahuje proteinový antigen HPV navázaný na stresový protein (nebo protein teplotního šoku (Hsp)). Proteinový antigen HPV může být navázán na stresový protein chemickou konjugací nebo nekovalentní vazbou prostřednictvím spojovacích skupin, nebo mohou být proteinový antigen HPV a stresový protein vázány ve fúsním proteinu obsahujícím jak proteinový antigen HPV, tak stresový protein. V jiném provedení prostředek obsahuje expresní vektor obsahující, v exprimovatelné formě, sekvence kódující proteinový antigen HPV a sekvence kódující stresový protein. Expresní vektor může být vložen do buněk jedince, nebo může být použit pro transformaci buněk jedince in vivo, kdy tento postup vede k expresi fúsního proteinu složeného z proteinového antigenu HPV a stresového proteinu, který stimuluje imunitní odpověď jedince proti proteinovému antigenu HPV. Řešení se také týká prostředků obsahujících

stresový protein vázaný na HPV antigen a jinou farmakologicky přijatelnou složku, fúsních proteinů složených z proteinového antigenu HPV a stresového proteinu a konjugátů a expresních vektorů kódujících a řídících expresi fúsních proteinů složených z proteinového antigenu HPV a stresového proteinu v buňkách jedince.



Imunitní odpověď proti HPV antigenům vyvolaná prostředky obsahujícími HPV antigen a stresový protein nebo expresní vektor schopný exprese těchto proteinů

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká obecně způsobů a prostředků obsahujících stresové proteiny ve vazbě na antigeny lidského papilomaviru, které jsou vhodné pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovým antigenům lidského papilomaviru.

Dosavadní stav techniky

Infekce lidskými papilomaviry (HPV) je častá a viry mohou být přenášeny sexuálně. Soudí se, že 20-80% sexuálně aktivních dospělých je infikováno. Ačkoliv je většina infekcí asymptomatických, může infekce vést ke vzniku bradavic v oblasti genitálu a nádorům řiti a genitálu. Bradavice v oblasti genitálu mají mezi dospělými prevalenci 1-5%. Přibližně 1% žen ve světě je postiženo karcinomem čípku děložního, který je nejčastější příčinou smrti žen mladších než 50 let. Karcinom čípku děložního je silně asociován s HPV (Frazer, Genitourin. Med. 72: 398-403 (1996)).

V současné době nejsou dostupné žádné terapeutické prostředky nebo profylaktické prostředky, t.j. vakciny, proti HPV a proto existuje potřeba vývoje nových účinných prostředků. Budoucnost běžných usmrcených nebo živých oslabených vakcin se zdá být špatnou. Podle Frazera nebyl HPV dosud propagován v buněčné kultuře a vliv infekce HPV na tvorbu nádorů, stejně jako kompletní druhová specifická HPV představuje další překážku, která nemůže být snadno překonána (Frazer, Genitourin. Med. 72: 398-403 (1996)). Bylo navrženo, že hlavní kapsidový protein,

který tvoří při expresi v eukaryotických buňkách viru-podobné částice, které jsou imunogenní bez adjuvans, může být základem pro vývoj vakciny (Christensen et al., J. Gen. Virol. 75: 2271-2276 (1994); viz též PCT/EP95/03974 a PCT/US95/12914.

HPV náleží ke třídě A rodiny papovaviridae, kam také patří SV40 a polyomavirus. Bylo charakterizováno více než 68 různých typů HPV, které jsou strukturálně vysoce příbuzné, ale které mají menší než 50% identitu sekvence na úrovni DNA. Všechny známé typy jsou epiteliotropní viry, které infikují specifické typy epitelu a často způsobují proliferaci epitelu. Několik typů bylo identifikováno v běžných bradavicích. Je známo 23 typů, které infikují mužskou a ženskou anogenitální oblast. Onemocnění anogenitální oblasti způsobená těmito typy HPV jsou v rozsahu od condylomata accuminata do invazivního spinocelulárního karcinomu. HPV DNA může být identifikována ve více než 80% žen s biopticky potvrzenými spinocelulárními intraepitelovými lézemi nebo intraepitelovou neoplasií čípku děložního. Několik typů, včetně HPV 16, 18 a 31, je silně asociováno s vysoce agresivními spinocelulárními intraepitelovými lézemi a invazivním karcinomem čípku děložního, vulvy, penisu a anu (Lorincz et al., Obstet. Gynecol. 79: 328-327 (1992)). Podle Frazera je karcinom čípku děložního v 90-95% asociován s HPV (Frazer, Genitourin. Med. 72: 398-403 (1996)). HPV není asociován pouze s karcinomy anogenitální oblasti, ale také s karcinomy hltnu, hrtanu a močového měchýře (Brachman et al., Cancer Res. 52: 4832-4836 (1992); Rotola et al., Int. J. Cancer. 52: 359-65 (1992)). Novější studie popsala, že HPV DNA je také přítomna u 30% testovaných karcinomů plic. Identifikované typy zahrnují HPV 6, 11, 16, 18, 31 a 33 (Soini et al., Thorax 51: 887-893 (1996)). Nejčastějšími typy HPV asociovanými s karcinomy jsou tedy 6, 11, 16, 18, 31 a 33, kdy HPV 16 a 18 jsou detekovány u více než 90% karcinomů čípku děložního (van Driel et al., Ann. Med. 28:

471-477 (1996)) a byly nejintenzivněji studovány.

Papilomaviry jsou DNA viry mající dvouřetězcový, cirkulární DNA genom o 7800-7900 párech bazí, neobalený virion a ikosahedrální kapsidu tvořenou 72 kapsomerami. Genom obsahuje tři hlavní regiony, jeden kodující pozdní geny, jeden kodující časné geny a nekodující region (Park et al., Cancer 76: 1902-1913 (1995)). Nekodující region je také označován jako regulační element vázající se proti směru transkripce. Tento region má délku přibližně 400 párů bazí a obsahuje sestavu vazebných míst pro různé transkripční faktory kontrolující expresi časných a pozdních genů. Region pozdních genů má dva samostatné otevřené čtecí rámce kodující virové kapsidové proteiny L1 a L2. Protein L1 je hlavní kapsidový protein, který je vysoce konzervován mezi různými druhy HPV. Region časných genů obsahuje šest otevřených čtecích rámců, označených E1, E2, E4, E5, E6 a E7. Proteiny E6 a E7 jsou onkoproteiny zásadní pro replikaci viru, stejně jako pro imortalizaci a transformaci hostitelských buněk. Proteiny E1, E2 a E4 mají také významnou úlohu při replikaci viru. Kromě toho, E4 působí také při zrání viru. Role E5 je méně dobře známá.

Buňky maligních nádorů mají dvě významné růstové charakteristiky. Jsou imortalizované, t.j. nestárnou, a jsou schopné růstu bez ukotvení. Vložení HPV16 nebo HPV18 DNA do imortalizovaných buněk hlodavců vede ke transformaci těchto buněk, t.j. získání schopnosti růst za absence vazby na substrát a schopnosti tvořit nádory při injekci myším (Crook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8820-24 (1988)). Jiný výsledek je získán při vložení HPV DNA do neimortalizovaných buněk s nízkým počtem pasáží: buňky se stanou imortalizovanými, ale ne transformovanými (Woodworth et al., Cancer Res. 48: 4620-28 (1988)). Proto jedna dráha vzniku nádorů obsahuje změnu, která vede k imortalizaci buněk, po které následuje exprese HPV genů, která vede k

transformaci těchto buněk. HPV geny obsažené v transformaci buněk in vitro jsou geny kodující E6 a/nebo E7 (Bedell et al., J. Virol. 61: 3635-40 (1987)). Byl navržen mechanismus, kterým mohou E6 a E7 proteiny způsobovat transformaci buněk (Park et al., Cancer 76: 1902-1913 (1995), a odkazy zde citované).

E6 je malý (molekulová hmotnost přibližně 15000) polypeptid obsahující Zn-vazebné domény. Klíčem k jeho transformační funkci je pozorování, že se váže na protein p53. p53 protein je dobře známý tumor-supresorový protein, který negativně reguluje progresi buněčného cyklu a v důsledku toho dělení buněk a jejich růst. Vazba E6 na p53 vede k ubikvinaci a případné degradaci p53, kde uvedený proces obsahuje zapojení jiného buněčného proteinu, který je označen jako "E6-asociovaný protein". V důsledku toho mají buňky exprimující E6 snížené bazální hladiny p53. Koncentrace p53 jsou zvýšeny v reakci na poškození DNA. Takové zvýšené hladiny vedou k vyšší expresi p21, inhibitoru cyklin-dependentních kinas, které způsobují zástavu buněčného cyklu. Tento mechanismus poskytuje buňkám čas pro opravu poškozené DNA před replikací, během kterého mohou být opravena poškození/mutace. E6-zprostředkované vyřazení p53 může bránit funkci tohoto mechanismu. Nově bylo také zjištěno, že E6 neovlivňuje regulaci buněčného cyklu pouze zrychlením degradace p53, ale také přímo blokováním interakce p53 s DNA (Thomas et al., Oncogene 10: 261-8 (1995)).

E7 protein je malý (molekulová hmotnost přibližně 10000) fosfoprotein obsahující Zn-vazebné domény, který je schopen vazby na produkt retinoblastomového genu Rb. Rb je tumor-supresorový protein, který se váže na a inaktivuje transkripční faktor E2F. Tento faktor kontroluje transkripci mnoha růstových genů včetně genů kodujících thymidin-kinasu, c-myc, dihydrofolat reduktasu a DNA-polymerasu α . Tvorba komplexu Rb-E2F brání expresi těchto

genů v G0 a G1 fázi, omezuje jejich expresi v S-fázi, během které komplexy Rb-E2F disociují a uvolňují aktivní transkripční faktor E2F. Tvorba Rb-E7 komplexů brání tvorbě Rb-E2F komplexů, což vede ke zkrácení pre-S-fáze, t.j. k akceleraci progresu buněčného cyklu. Důkazem potvrzujícím význam těchto mechanismů je pozorování, že E6 proteiny z vysoce onkogenních typů HPV (například HPV16 a 18) mají vyšší afinity pro p53 než stejné proteiny z neonkogenních typů, a že E7 proteiny z vysoce onkogenních typů HPV mají vyšší afinity pro Rb než stejné proteiny z neonkogenních typů.

U většiny karcinomů čípku děložního a prekursorových lézí je HPV DNA integrována do genomu hostitelské buňky (Cullen et al., J. Virol. 65: 606-612 (1991)). Zdá se, že ve většině případů vyžaduje integrace zlom HPV genomové DNA v E1/E2 regionu. Důsledkem zlomu v E1/E2 regionu je přerušení otevřeného čtecího rámce kodujícího dva různé E2 proteiny, z nichž menší působí jak represor transkripce v expresi časných genů. Toto vede ke zvýšení exprese E6 a E7.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká prostředků pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince, kterému jsou podány. Imunitní odpověď může být protilátkové nebo buněčná odpověď, konkrétně buňkami zprostředkovaná cytolytická odpověď na proteinový antigen HPV. Prostředky mohou být použity profylakticky nebo terapeuticky. V profylaktickém použití označuje termín indukce imunitní odpovědi vyvolání imunitní reakce větší, než je velmi nízká základní imunita. V terapeutickém použití označuje termín indukce imunitní odpovědi u jedince vyvolání odpovědi, která převyšuje - buď kvalitativně, nebo kvantitativně - odpovědi vyvolané kontaktem s proteinovými

antigeny HPV přítomnými buď na viru, nebo na infikovaných nebo transformovaných buňkách jedince. V konkrétních provedeních jsou prostředky použity pro vyvolání imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám exprimujícím a nesoucím proteinový antigen HPV. V těchto provedeních jsou proteinové antigeny HPV, které jsou zaměřeny prostředky, E6 a E7 časně virové proteiny, o který je známo, že jsou pravidelně exprimovány nádory spojenými s HPV. V jednom provedení obsahuje prostředek proteinový antigen HPV navázaný na stresový protein (nebo protein teplotního šoku (Hsp)). Proteinový antigen HPV může být navázán na stresový protein chemickou konjugací, nebo mohou být antigen a stresový protein navázány na nukleotidové úrovni umožňující expresi a izolaci fúsního proteinu obsahujícího sekvence jak antigenu, tak stresového proteinu. Prostředek může být podán jedinci, nebo může být použit ex vivo pro stimulaci a/nebo expansi buněk imunitního systému jedince namířených proti nebo zprostředkujících namíření proti HPV nebo buňkám, včetně nádorových buněk, nesoucím proteinový antigen HPV. Prostředky jsou účinné ve stimulaci imunitní reakce, když jsou podány jako proteinové roztoky neobsahující částice (t.j. neobsahující virus nebo viru-podobné částice) za absence adjuvans.

V jiném provedení prostředky obsahují expresní vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny kodující proteinový antigen HPV a stresový protein. Expresní vektor dále obsahuje elementy řídící transkripci a translaci kodujících sekvencí a může také obsahovat elementy usnadňující podání a persistenci nebo amplifikaci nukleových kyselin v buňkách jedince. Expresní vektor může být vložen do buněk jedince, nebo může být použit pro transformaci buněk jedince ex vivo, a v důsledku jeho přítomnosti dochází k expresi fúsního proteinu složeného z proteinové antigenu HPV - stresového proteinu, který indukuje imunitní reakci proti proteinovému antigenu HPV.

Předkládaný vynález se také týká prostředků obsahujících proteinový antigen HPV navázaný na stresový protein v kombinaci s jinou farmakologicky přijatelnou složkou. V jednom provedení obsahuje prostředek konjugat tvořený stresovým proteinem navázaným na proteinový antigen HPV. V jiném provedení obsahuje prostředek fúsní protein (například protein exprimovaný z pET65HE6 a pET65HE7), ve kterém je stresový protein fúsovaný na proteinový antigen HPV. Konjugaty a fúsní proteiny těchto prostředků jsou také předmětem předkládaného vynálezu, stejně jako expresní vektory kodující a řídící expresi fúsního proteinu obsahujícího sekvenční sekvence pro stresový protein a proteinový antigen HPV v buňkách jedince.

Předkládaný vynález se také týká použití prostředků pro posílení imunitní odpovědi proti proteinovým antigenům HPV a, v konkrétních provedeních, proti nádorům nesoucím proteinový antigen HPV. Citované články z odborné literatury, zejména ty, které se týkají přípravy a použití prostředků podle předkládaného vynálezu, jsou zde uvedeny jako odkazy.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 je schematické znázornění konstruktů pET65H.

Obr. 2 je schematické znázornění konstruktů pET65HE6.

Obr. 3 je schematické znázornění konstruktů pET65HE7.

Obr. 4 je graf znázorňující procento incidence nádorů v závislosti na čase po inokulaci TC-1 nádorem, který demonstruje úspěšnou imunizaci myši proti nádoru pomocí Hsp65-E6 a -E7 fúsními proteiny.

Obr. 5 je graf znázorňující procento specifické buněčné lýzy TC-1 nádorových buněk v závislosti na poměru efektorových ku cílovým buňkám, který ukazuje buňkami zprostředkovanou cytolytickou odpověď proti HPV antigen (E7) - exprimujícím cílovým nádorovým buňkám u imunizovaných myší.

Obr. 6 je graf znázorňující procento buněčné lýzy různých cílových buněk v závislosti na poměru efektorových ku cílovým buňkám, který ukazuje buňkami zprostředkovanou cytolytickou odpověď proti HPV E7 - exprimujícím cílovým nádorovým buňkám u imunizovaných myší.

Obr. 7 je graf znázorňující procento incidence nádorů u myší, kterým bylo podáno $1,3 \times 10^5$ TC-1 nádorových buněk a kterým byl potom podán salinický roztok, Hsp65-E7 fúsní protein v salinickém roztoku nebo E7 peptid v salinickém roztoku/IFA v závislosti na dnech po podání nádorových buněk.

Obr. 8 je graf znázorňující procento incidence nádorů u myší, kterým bylo podáno 2×10^5 TC-1 nádorových buněk a kterým byl potom podán salinický roztok, Hsp65-E7 fúsní protein v salinickém roztoku nebo E7 peptid v salinickém roztoku/IFA v závislosti na dnech po podání nádorových buněk.

Obr. 9 je schematické znázornění konstruktu pET/E7(H).

Obr. 10 je soubor grafů ukazujících inkorporaci thymidinu kultivovanými buňkami lymfatických uzlin získanými od myší imunizovaných Hsp65-E7 fúsním proteinem nebo E7 proteinem.

Obr. 11 je graf znázorňující efekt léčby Hsp-E7 fúsním proteinem nebo E7 na velikost nádoru u myší nesoucích TC-1 nádorové buňky.

Obr. 12 je schematické znázornění konstruktů pET65C.

Obr. 13 je schematické znázornění konstruktů pET65C/E7-1N.

Předkládaný vynález se týká prostředků, které indukují imunitní reakci u jedince namířenou proti lidskému papilomaviru nebo buňkám jedince, které exprimují proteinový antigen HPV. V jednom provedení prostředky obsahují proteinový antigen HPV a stresový protein. V jiném provedení prostředky obsahují expresní vektor schopný řídit expresi fúzního proteinu obsahujícího proteinový antigen HPV a stresový protein.

Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být použity profylakticky pro zvýšení imunity proti proteinovému antigenu HPV, pro prevenci vzniku a proliferace HPV nebo buněk jedince exprimujících a nesoucích proteinový antigen HPV nebo prezentujících jeho části. Prostředky mohou být také použity terapeuticky u jedince dříve infikovaného HPV pro zabránění další proliferace viru nebo pro eliminaci buněk jedince, které proliferují v důsledku HPV infekce, včetně nádorů exprimujících a nesoucích proteinový antigen HPV nebo prezentujících jeho části. Pokud je v textu uveden proteinový antigen HPV jako cíl pro imunitní odpověď indukovanou prostředky podle předkládaného vynálezu, tak termín proteinový antigen HPV zahrnuje celý HPV protein nebo polypeptid (molekulová hmotnost vyšší než 10 kDa), část HPV proteinu přítomnou na povrchu HPV nebo infikovaných buněk jedince, stejně jako peptid přítomný na povrchu infikovaných buněk v důsledku zpracování a prezentace HPV proteinu, například v typické dráze zahrnující MHC antigeny I. nebo II. třídy.

Genomové sekvence mnoha různých typů HPV byly klonovány a byly charakterizovány analýzou DNA sekvence. Bakteriální vektory obsahující kompletní nebo částečné HPV genomy jsou dostupné z mnoha zdrojů, například z American Tissue Culture Collection (ATCC). Další typy HPV užitečné pro provádění předkládaného vynálezu mohou být izolovány a typizovány známými metodami.

HPV exprimuje šest nebo sedm nestrukturálních a dva strukturální proteiny a každý z těchto proteinů může principiálně sloužit jako cíl pro imunoprofylaktické nebo imunoterapeutické přístupy, které mají za cíl eliminaci HPV a/nebo infikovaných buněk. Virové kapsidové proteiny L1 a L2 jsou strukturální proteiny HPV, které jsou kodované pozdními geny. L1 je hlavní kapsidový protein a je vysoce konzervovaný mezi různými druhy HPV. Sedm nestrukturálních proteinů jsou produkty časných virových genů. Proteiny E1, E2 a E4 mají významnou úlohu při replikaci viru. Protein E4 má dále význam pro zrání viru. Úloha E5 je dosud neznámá. Proteiny E6 a E7 jsou onkoproteiny zásadní pro replikaci viru, stejně jako pro imortalizaci a transformaci hostitelských buněk. Tyto proteiny, které mohou být obsaženy v prostředcích podle předkládaného vynálezu, jsou označovány jako proteinové antigeny HPV.

Značný význam při použití způsobů podle předkládaného vynálezu pro profylaktickou a terapeutickou léčbu nádorů asociovaných s HPV má pozorování, že HPV E6 a E7 proteiny jsou stabilně exprimovány v karcinomech čípku děložního (Zur Hausen, Appl. Pathol. 5: 19-24 (1987); Pater and Pater, Virology 145: 313-8 (1985)). Kinoshita et al., Br. J. Cancer 71: 344-9 (1995)) prokázali, že E6 a E7 geny jsou také exprimovány v karcinomech plic. Kromě toho, určitá přirozená imunitní (humorální) odpověď na E7 byla zaznamenána u pacientů s karcinomem čípku děložního (Jochmus-Kudielka et al., J. Natl. Cancer Inst. 81: 16898-704

(1989)). Nakonec, modelové studie prokázaly, že imunizace modifikovanými E7 proteiny chrání myši před inokulací buňkami plic transformovanými aktivovaným c-Ha-ras genem a HPV E6/E7 geny (Lin et al., Cancer Res. 56: 21-26 (1996)). Vzhledem k tomu, že tyto proteiny jsou obvykle exprimovány u karcinomů vznikajících v důsledku infekce HPV, že stejné proteiny jsou také onkogeny, které mají pravděpodobně hlavní úlohu při vzniku a růstu nádorů a vzhledem k tomu, že proti těmto proteinům může být namířena imunitní odpověď jsou E6 a E7 výhodnými cíly pro imunointervenci nebo profylaxi a proto jsou výhodnými proteinovými antigeny HPV v prostředcích podle předkládaného vynálezu, které jsou použity pro prevenci nebo léčbu nádorů asociovaných s HPV.

Na několika zvířecích modelech bylo prokázáno, že cytotoxické T buňky (CTL) mohou indukovat protektivní imunitu proti některým virům (Kast and Melief, Immunol. Lett. 30: 229 (1991)). Bylo pozorováno, že u jedinců s imunosupresí se častěji vyvine karcinom čípku děložního než u imunokompetentních jedinců (Schneider et al., Acta Cytologica 27: 220-4 (1983)). Tyto skutečnosti jasně ukazují na to, že buněčná část imunitního systému, zejména systém T buněk, má hlavní roli v imunologické odpovědi proti malignitám asociovaným s HPV. Další důkazy svědčící pro význam CTL odpovědi v protektivní imunitě proti E6- a E7-transformovaným buňkám pochází z pokusu, ve kterém byly myši vakcinované relevantním CTL epitopem HPV 16 E7 chráněny před transplantovatelnými HPV 16-indukovanými nádory (Feltkamp et al., Eur. J. Immunol. 23: 2242 (1993)). Předkládaný vynález je založen na našem pozorování, že vazba stresového proteinu na proteinový antigen HPV vede ke vzniku prostředku, který silně stimuluje buněčnou, zejména buňkami zprostředkovanou cytolytickou, odpověď proti navázanému proteinovému antigenu HPV, kde tato odpověď zabíjí buňky nesoucí HPV antigen.

Proteinovým antigenem HPV podle předkládaného vynálezu může být jakýkoliv polypeptid kodovaný HPV. Dále to může být část HPV proteinu, s podmínkou, že tato část si při navázání na stresový protein uchovává schopnost indukovat imunitní odpověď proti proteinovému antigenu HPV na infikovaných buňkách nebo na HPV. Prostředky podle předkládaného vynálezu obsahující místo proteinového antigenu HPV různé části HPV antigenu mohou být připraveny běžnými technikami, jako jsou techniky popsané v učebnicích molekulární biologie a biochemie (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, svazek 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990)). Každý prostředek obsahující určitou část proteinového antigen HPV může být testován na stupeň a kvalitu imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV v pokusech, jako jsou například pokusy popsané v příkladech provedení vynálezu. Minimálně bude proteinový antigen HPV v prostředcích podle předkládaného vynálezu obsahovat alespoň jeden epitop B nebo T buněk (například epitop CTL nebo T-helperových buněk) HPV proteinu. V souvislosti s prostředky podle předkládaného vynálezu zahrnuje termín "proteinový antigen HPV" části proteinového antigenu HPV, s podmínkou, že tyto části si uchovávají schopnost indukovat imunitní odpověď proti proteinovému antigenu HPV na infikovaných buňkách nebo na HPV.

E6 a zejména E7 jsou transformující proteiny. V prostředcích obsahujících jako proteinový antigen HPV kompletní HPV E6 nebo E7 protein nebo jeho část, která je dostatečná pro transformující schopnost, může a nemusí být transformační charakter antigenu významným rizikem, v závislosti na způsobu, kterým je HPV antigen zpracován. Například, v případě, že je proteinový antigen HPV nebo prostředek obsahující takový antigen připraven rekombinantní technikou, při které existuje riziko kontaminace DNA, tak je

vhodné provést kroky pro eliminaci transformační schopnosti antigenu. Při použití prostředků obsahujících expresní vektor řídící v jedinci expresi fúsního proteinu obsahujícího kompletní HPV E6 nebo E7 proteinovou sekvenci nebo její část, která je dostatečná pro transformující schopnost, tak je nutné eliminovat sekvence, které způsobují transformační schopnost proteinu. Netransformující varianty E6 a E7 byly získány fúsováním E6 a E7 sekvencí (PCT/AU95/00868). Je proto možné, aby byly některé fúsní proteiny obsahující E6 nebo E7 sekvence a sekvence stresového proteinu již netransformující. Alternativně mohou být sekvence selektivně deletovány z E6 nebo E7 za použití technik, které jsou dobře známé v oboru a které byly také popsány v PCT/AU95/00868. Delece mohou být provedeny v expresním vektoru exprimujícím E6 nebo E7 sekvence samostatně, nebo ve vektorech exprimujících fúsní proteiny složené z E6 nebo E7 a stresového proteinu. Výsledky takových úprav mohou být hodnoceny testováním transformační schopnosti delečních proteinů v transfekčních pokusech. Například, NIH3T3 buňky mohou být transfektovány expresním vektorem obsahujícím gen pro deletovaný protein a transformační schopnost může být hodnocena testem tvorby kolonií na měkkém agaru. Tento test je také popsán v PCT/AU95/00868.

V jednom provedení předkládaného vynálezu jsou prostředky složeny ze dvou skupin: stresového proteinu a proteinového antigenu HPV, proti kterému má být vyvolána imunitní odpověď. Tyto dvě skupiny jsou navázány tak, že tvoří jednu jednotku. Tyto dvě skupiny mohou být spojeny konjugací, t.j. prostřednictvím kovalentní vazby mezi stresovým proteinem a proteinovým antigenem HPV (Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1996); Lussow, A.R. et al., Eur. J. Immunol. 21: 2297-2302 (1991); Barrios, C. et al., Eur. J. Immunol. 22: 1365-1372 (1992)). Alternativně mohou být pro spojení a expresi dvou skupin použity rekombinantní techniky, které vedou ke vzniku

fúsního proteinu, který obsahuje stresový protein a proteinový antigen HPV v jedné molekule. Toto umožňuje produkci a přečištění jedné rekombinantní molekuly při výrobě. Tyto dvě skupiny mohou být také vázány nekovalentní vazbou. Jakákoliv z několika známých vysoce afinitních interakcí může být upravena pro nekovalentní vazbu dvou skupin. Například, biotinová skupina může být přidána k proteinovému antigenu HPV a stresový protein, který má být navázán, může být exprimován jako fúsní protein tvořený avidinem a stresovým proteinem. Fúsní protein tvořený avidinem a stresovým proteinem se bude silně vázat na biotinylovaný proteinový antigen HPV. Analogicky mohou být části proteinového antigenu HPV navázány na kompletní stresový protein nebo na části stresového proteinu a části stresového proteinu mohou být navázány na kompletní proteinový antigen HPV nebo na části proteinového antigenu HPV, s podmínkou, že příslušné části jsou dostatečné pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince, kterému jsou podány. V jiném provedení prostředky obsahují expresní vektor schopný řízení exprese fúsního proteinu tvořeného proteinovým antigenem HPV a stresovým proteinem.

V prostředcích podle předkládaného vynálezu může být použit jakýkoliv vhodný stresový protein (protein teplotního šoku (hsp)). Například, jak je popsáno v příkladech, může být použit Hsp60 a/nebo Hsp70. Obecně, buňky reagují na stres (obvykle tepelný stres) tak, že zvýší expresi skupiny genů, které jsou společně označovány jako stresové geny neboli geny tepelného šoku. Tepelný šok je expozice buněk nebo organismu teplotám, které jsou o jeden až několik stupňů Celsia vyšší než teploty, na které jsou buňky adaptovány. V důsledku indukce takových genů se zvyšují hladiny příslušných stresových proteinů v buňkách, které jsou vystaveny stresu. Jak je zde použit, znamená termín "stresový protein", nebo také "protein teplotního šoku" nebo "Hsp" protein, který je kodovaný stresovým genem a který je proto

typicky produkován ve vyšším množství při kontaktu nebo vystavení organismu stresovému faktoru. Termín "stresový gen", nebo také "gen teplotního šoku" označuje gen, který je aktivován nebo jinak detekovatelně pozitivně regulován při kontaktu nebo vystavení organismu (obsahujícího gen) stresovému faktoru, jako je teplotní šok, hypoxie, glukosová deprivace, soli těžkých kovů, inhibitory energetického metabolismu a transportu elektronů a činidla denaturující proteiny, nebo některé benzochinonové ansamyciny. Nover, L., Heat Shock Response, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, (1991). Termín "stresový gen" také zahrnuje geny homologické se známými geny stresové rodiny, jako jsou některé geny v Hsp70 a Hsp90 rodině stresových genů, i když nejsou takové homologické geny sami indukovány stresovým faktorem. Termíny stresový gen a stresový protein, jak jsou použity v předkládaném vynálezu, mohou být zaměnitelné, pokud z kontextu nevyplývá něco jiného.

V jednotlivých provedeních, například v případech zahrnujících chemické konjugaty mezi stresovým proteinem a proteinovým antigenem HPV, jsou stresovými proteiny použitými v předkládaném vynálezu izolované stresové proteiny, což znamená stresové proteiny, které byly selektovány a izolovány z hostitelských buněk, ve kterých byly produkovány. Taková izolace může být provedena běžnými technikami, které jsou zde popsány a které jsou v oboru známy (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, svazek 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990)).

V bakteriích jsou převládajícími stresovými proteiny proteiny s molekulovou hmotností přibližně 70 a 60 kDa, které jsou označeny jako Hsp70 a Hsp 60, v příslušném pořadí. Tyto a jiné

stresové proteiny a geny kodující tyto proteiny jsou uvedeny dále. V bakteriích obvykle představují Hsp70 a Hsp60 přibližně 1-3% buněčných proteinů, podle charakteru barvení při použití elektroforesy na dodecylsírán sodný-polyakrylamidovém gelu a barvení Coomasie modří, ale za stresu se akumulují až na 25%. Zdá se, že stresové proteiny se účastní významných buněčných dějů, jako je syntéza proteinů, intracelulární přenos a sestavování a rozkládání proteinových komplexů. Zdá se, že zvýšená syntéza stresových proteinů během stresu slouží primárně k minimalizaci následků indukovaného rozkládání proteinů. Kromě toho, předchozí expozice buněk středně silným stresovým podnětům, která indukuje syntézu stresových proteinů, poskytuje ochranu buněk před škodlivými účinky následného výraznějšího stresu.

Zdá se, že hlavní stresové proteiny jsou exprimované ve všech dosud vyšetřovaných organismech a typech tkání. Také se zdá, že stresové proteiny představují nejvíce konzervovanou skupinu dosud identifikovaných proteinů. Například, při srovnání stresových proteinů od značně odlišných organismů mají Hsp90 a Hsp70 50% nebo vyšší identitu na aminokyselinové úrovni a sdílejí mnoho podobností v neidentických pozicích. Je zjištěno, že podobné nebo vyšší úrovně homologie existují mezi různými členy určité rodiny stresových proteinů v jednom druhu.

Geny kodující stresové proteiny mohou být přítomné v jedné kopii nebo v mnoha neidentických kopiích v genomu buňky nebo organismu. Například, bylo prokázáno, že lidský genom obsahuje alespoň jednu kopii hsp100 genu, alespoň dva různé hsp90 geny, až 10 hsp70 genů, z nichž alespoň některé jsou neidentické kopie, několik genů T komplexu (Tcp genů) a alespoň jeden gen kodující příbuzný mitochondriální protein Hsp60, stejně jako alespoň tři kopie malých hsp genů kodujících Hsp o molekulové hmotnosti 20-30 kDa. Ve většině rodin stresových genů existuje alespoň jeden gen,

jehož úroveň exprese je relativně vysoká a který je buď zcela konstitutivní, nebo pouze mírně indukovatelný tepelným šokem. Dále, několik rodin stresových genů obsahuje členy, které nejsou pozitivně regulovány teplem, ale jsou regulovány jinými podněty, například zvýšenou koncentrací vápníku atd.

Stresové proteiny, zejména Hsp70, Hsp60, Hsp20-30 a Hsp10, patří mezi hlavní determinanty rozpoznávané imunitním systémem hostitele v imunitní odpovědi na infekci *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae*. Young, R.A. and Elliot, T.J., Stress Proteins, Infection And Immune Surveillance, Cell 50: 5-8 (1989). Dále, některé krysí arthritogenní T buňky rozpoznávají Hsp60 epitopy. Van Eden, W. et al., Nature 331: 171-173 (1988). Nicméně, jedinci, včetně zdravých jedinců, bez anamnesy mykobakteriální infekce nebo autoimunitního onemocnění mají také T buňky, které rozpoznávají jak bakteriální, tak lidské Hsp60 epitopy; významná frakce T buněk u zdravých jedinců, charakterizovaná expresí gamma-delta T buněčného receptoru, rozpoznává vlastní a cizí stresové proteiny. O'Brien, R. et al., Cell 57: 664-674 (1989). Proto mají jedinci - i zdraví jedinci - populaci T buněk, které rozpoznávají epitopy jak vlastních, tak cizích stresových proteinů.

Tento systém rozpoznávající epitopy stresových proteinů pravděpodobně představuje "časný obranný systém" proti infikujícím organismům. Murray, P.J. and Young, R.A. J. Bacteriol. 174: 4193-6 (1992). Tento systém může být udržován častou stimulací bakteriemi a virem. Jak bylo uvedeno výše, zdravý jedinci mají populace T buněk rozpoznávajících vlastní stresové proteiny. Proto je přítomnost autoreaktivních T buněk slučitelná se zdravím a nezpůsobuje autoimunitní onemocnění; toto demonstruje bezpečnost stresových proteinů v jedinci. Bezpečnost stresových proteinů je dále demonstrována úspěšností a relativní

bezpečností vakcinace BCG (*Bacille Calmette Guerin*, kmen *Mycobacterium tuberculosis*), která indukuje imunitní odpověď proti stresovým proteinům, která je také protektivní proti *Mycobacterium tuberculosis*.

Rodiny stresových genů a proteinů pro použití v předkládaném vynálezu jsou dobře známé v oboru a zahrnují, například, Hsp100-200, Hsp100, Hsp90, Lon, Hsp70, Hsp60, TF55, Hsp40, FKBP, cyklofiliny, Hsp20-30, ClpP, GrpE, Hsp10, ubikvitin, kalnexin a protein-disulfid izomerázy. Macario, A.J.L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25: 59-70, 1995; Parsell, D.A. and Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27: 437-496 (1993); U.S. patent č. 5232833 (Sanders et al.). Významnou skupinou stresových proteinů jsou Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp20-30, ještě výhodnější jsou Hsp70 a Hsp60.

Hsp100-200 zahrnuje Grp170 (glukosou regulovaný protein). Grp170 je lokalizován v lumen ER, v pre-Golgiho kompartmentu, a může mít význam pro skládání a sestavení imunoglobulinů.

Hsp100 zahrnuje savčí Hsp110, kvasinkový Hsp104, ClpA, ClpB, ClpC, ClpX a ClpY. Kvasinkový Hsp104 a *E. coli* ClpA tvoří hexamerní a *E. coli* ClpB tvoří tetramerní částice, jejichž sestavení pravděpodobně vyžaduje vazbu na nukleotid adenin. Clp proteasa tvoří 750 kDa heterooligomer složený z ClpP (proteolytické podjednotky) a ClpA. ClpB-Y jsou strukturálně příbuzné ClpA, ačkoli oproti ClpA pravděpodobně netvoří komplex s ClpP.

Hsp90 zahrnuje HspG v *E. coli*, Hsp83 a Hsc83 ve kvasinkách a Hsp90 α , Hsp90 β a Grp94 u člověka. Hsp90 váže skupinu proteinů, které jsou typicky buněčnými regulačními molekulami, jako jsou receptory pro steroidní hormony (například receptory pro

glukokortikoidy, estrogen, progesteron, a testosteron), transkripční faktory a protein kinasy, které mají roli v signálním přenosu. Hsp90 proteiny se také účastní tvorby velkých, hojných proteinových komplexů, které indukují jiné stresové proteiny.

Lon je tetramerní protein působící jako ATP-dependentní proteasa degradující nepřírozené proteiny v *E. coli*.

Hsp70 zahrnuje Hsp72 a Hsc73 ze savčích buněk, DnaK v bakteriích, zejména mykobakteriích jako je *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis* (jako je Bacille-Calmette Guerin; zde označeno jako Hsp71), DnaK z *E. coli*, kvasinek a jiných prokaryotních organismů, a BiP a Grp78. Hsp70 je schopen specifické vazby na ATP, stejně jako na nesložené polypeptidy a peptidy, čímž se účastní skládání a rozkládání proteinů, stejně jako sestavování a rozkládání proteinových komplexů.

Hsp60 zahrnuje Hsp65 od mykobakterií. Bakteriální Hsp60 je také obecně známý jako GroEL, jako je GroEL od *E. coli*. Hsp60 tvoří velké homooligomerní komplexy a zdá se, že má klíčovou úlohu při skládání proteinů. Homology Hsp60 jsou přítomné v eukaryotických mitochondriích a chloroplastech.

TF55 zahrnuje Tcpl, TRiC a thermosom. Proteiny se typicky vyskytují v cytoplasmě eukaryotických organismů a tvoří mnohočlenné kruhy navozující skládání proteinů. Mají také slabou homologii s Hsp60.

Hsp40 zahrnuje DnaJ od prokaryot jako jsou *E. coli* a mykobakterie a HsJ1, HDJ1 a Hsp40. Hsp40 působí jako molekulární chaperon při skládání proteinů, termotoleranci a replikaci DNA,

kromě dalších buněčných aktivit.

FKBP zahrnuje FKBP12, FKBP13, FKBP25 a FKBP59, Fpr1 a Nepl. Proteiny mají typicky peptidyl-prolyl-izomerazovou aktivitu a interagují s imunosupresivy jako je FK506 a rapamycin. Proteiny se obvykle vyskytují v cytoplasmě a endoplasmatickém retikulu.

Cyklofilin zahrnuje cyklofiliny A, B a C. Proteiny mají typicky peptidyl-prolyl-izomerazovou aktivitu a interagují s imunosupresivem cyklosporinem A. Protein cyklosporin A se váže na kalcineurin (protein-fosfatasu).

Hsp20-30 je také označován jako malý Hsp. Hsp20-30 se typicky nachází ve formě velkých homooligomerních komplexů, nebo také ve formě heterooligomerních komplexů, pokud organismus nebo buňky exprimují několik různých typů malých Hsp. Hsp20-30 interaguje se strukturami cytoskeletu a může mít úlohu v polymerizaci/depolymerizaci aktinu. Hsp20-30 je rychle fosforylován při stresu nebo při vystavení klidových buněk působení růstových faktorů. Mezi homology Hsp20-30 patří α -krytalín.

ClpP je proteasa *E. coli*, která se účastní degradace abnormálních proteinů. Homology ClpP se nacházejí v chloroplastech. ClpP tvoří heterooligomerní komplex s ClpA.

GrpE je protein *E. coli* o hmotnosti přibližně 20 kDa, který se účastní jak obnovy stresem poškozených proteinů, tak degradace poškozených proteinů. GrpE má úlohu v regulaci exprese stresového genu v *E. coli*.

Hsp10 zahrnuje GroES a Cpn10. Hsp10 se typicky nachází v *E. coli* a v mitochondriích a chloroplastech eukaryotických buněk. Hsp10 tvoří sedmi-členný kruh, který se asociuje s Hsp60

oligomery. Hsp10 se také účastní skládání proteinů.

Bylo zjištěno, že ubikvitin váže proteiny ve koordinaci s proteolytickým odštěpením proteinů ATP-dependentními cytosolovými proteasami.

V konkrétních provedeních jsou stresové proteiny podle předkládaného vynálezu získány z enterobakterií, mykobakterií (konkrétně *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. vaccae*, *M. smegmatis* a *M. bovis*), *E. coli*, kvasinek, *Drosophilla*, obratlovců, ptáků, kuřat, savců, krys, myší, primátů nebo lidí.

Stresové proteiny mohou být ve formě acidických nebo bazických solí, nebo mohou být v neutrální formě. Kromě toho, jednotlivé aminokyselinové zbytky mohou být modifikovány oxidací nebo redukcí. Dále, v aminokyselinové nebo nukleotidové sekvenci mohou být provedeny různé substituce, delece nebo adice, jejichž cílem je zachovat nebo dále zvýšit biologickou aktivitu stresového proteinu. Vzhledem k degeneraci kodu mohou existovat významné variace v nukleotidové sekvenci kodující stejnou aminokyselinovou sekvenci. Předkládaný vynález je také vhodný pro použití s částmi stresových proteinů nebo peptidů získanými ze stresových proteinů, s podmínkou, že takové části nebo peptidy obsahují epitopy účastnící se ve zvýšení imunitní odpovědi na vybraný proteinový antigen HPV. Části stresových proteinů mohou být získány fragmentací za použití proteas, nebo rekombinantními metodami, jako je exprese části nukleotidové sekvence kodující stresový protein (buď samostatně, nebo fúované na jinou sekvenci nukleové kyseliny kodující protein). Peptidy mohou být také vyrobeny takovými metodami, nebo chemickou syntézou. Stresové proteiny mohou obsahovat mutace vložené do určitého lokusu pomocí různých známých technik. Viz například Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor

Laboratory Press (1989); Drinkwater and Klinedinst, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3402-3406 (1986); Liao and Wise, Gene 88: 107-111 (1990); Horwitz et al., Genome 3: 112-117 (1989). Termín stresový protein, jak je zde použit, zahrnuje takové části a peptidy stresového proteinu.

Způsoby pro identifikaci genu nebo proteinu považovaného za stresový gen nebo protein jsou v oboru dobře známé. Například, konzervace genů a proteinů určité rodiny stresových proteinů umožňuje srovnání nukleotidové nebo aminokyselinové sekvence genu/proteinu s dobře známými stresovými geny, jako je DnaK, GroEL nebo DnaJ, například hybridizací nukleových kyselin nebo sekvenováním nukleových kyselin nebo aminokyselin, po kterém následuje počítačová srovnávací analýza. Voelmy, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4949-4953 (1985). Alternativně může být test použit pro identifikaci a/nebo odlišení mezi základními strukturálními charakteristikami a/nebo funkčními vlastnostmi vybraného stresového proteinu. Například, expresní knihovna může být vyšetřována za použití anti-Hsp protilátek. O Hsp90 je dobře známo, že se váže s vysokou afinitou na benzochinon ansamycingeldanamycin. Expresní knihovna může být proto vyšetřována geldanamycinem pro identifikaci domnělých analogů Hsp90 jako proteinů, které se váží na benzochinon ansamycin. Charakter proteinukodovaného izolovanou nukleovou kyselinou může být dále testován jinými testy, včetně testů založených na protilátkách. Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (vyd.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988). Dále může být testována biologická aktivita dané skupiny stresových proteinů. Guidon, P.T. and Hightower, L.E., Biochem. 25: 3231-3239 (1986). Například, Hsp70 je schopen specifické vazby na ATP, stejně jako vazby na nesložené polypeptidy a peptidy v proteinových komplexech. Proto, smísení proteinu se vzorkem obsahujícím vhodné polypeptidy, peptidy nebo ATP, po kterém následuje stanovení

přítomnosti nebo nepřítomnosti komplexů protein-protein nebo protein-nukleotid naznačuje přítomnost nebo nepřítomnost Hsp70 proteinu nebo genu, kde tato přítomnost nebo nepřítomnost může být potvrzena jinými testy, jako jsou testy založené na protilátkách.

Stresový protein, část stresového proteinu, homolog stresového proteinu a proteinový antigen HPV, na který je stresový protein konjugován nebo nekovalentně navázán, které jsou přítomné v prostředcích podle předkládaného vynálezu, mohou být produkovány nebo získány za použití známých technik. Například, stresový protein a/nebo antigen mohou být získány (izolovány) ze zdroje, ve kterém se vyskytují, mohou být produkovány a získány z buněčných kultur nebo mohou být, v případě antigenu, získány z infikovaných buněk, mohou být produkovány klonováním, pokud je nutné, a expresí genu kodujícího požadovaný stresový protein nebo antigen, nebo mohou být syntetizovány chemicky. Dále, sekvence nukleové kyseliny kodující vybraný stresový protein nebo antigen může být syntetizována chemicky. Fúsní protein obsahující stresový protein a proteinový antigen HPV může být produkován rekombinantně. Například, nukleová kyselina kodující stresový protein může být navázána na jeden z konců sekvence nukleové kyseliny kodující proteinový antigen HPV tak, že tyto dvě protein-kodující sekvence mají společný translační čtecí rámec a mohou být exprimovány jako fúsní protein obsahující proteinový antigen HPV a stresový protein. Kombinovaná sekvence je insertována do vhodného vektoru vybraného na základě požadovaných expresních vlastností a charakteru hostitelské buňky. V příkladech uvedených dále jsou sekvence nukleových kyselin obsaženy ve vektoru vhodném pro expresi proteinů v bakterii *E.coli*. Po expresi ve vybrané hostitelské buňce mohou být fúsní proteiny přečištěny běžnými biochemickými separačními technikami nebo imunoafinitními technikami za použití protilátky k jedné

části fúsního proteinu. Alternativně může vybraný vektor přidávat sekvenci k sekvenci fúsního proteinu, například oligohistidinovou smyčku, jak je popsána v příkladech dále, která umožňuje expresi fúsního proteinu obsahujícího smyčku, který může být potom přečištěn afinitními technikami využívajícími protilátky nebo jiného materiálu s vysokou afinitou pro smyčku (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deutscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, svazek 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990). Pokud je použit vektor vhodný pro expresi v savčích buňkách, například jeden z vektorů uvedených dále, tak může být fúsní protein přečištěn ze savčích buněk. Alternativně může být savčí expresní vektor (obsahující kodující sekvenci pro fúsní protein) podán jedinci pro řízení exprese fúsního proteinu v buňkách jedince. Nukleová kyselina kodující fúsní protein obsahující stresový protein a proteinový antigen HPV může být také vyrobena chemicky a potom může být insertována do vhodného vektoru pro produkci fúsního proteinu a jeho přečištění nebo podání jedinci. Konečně, fúsní protein může být také připraven chemicky.

Prostředky obsahující stresový protein a antigen HPV popsané výše mohou být použity pro zesílení imunitní odpovědi, konkrétně buňkami zprostředkované cytolytické odpovědi, na HPV nebo HPV-infikované nebo transformované buňky exprimující HPV antigen. Výhodně obsahují prostředky sekvence proteinového antigenu od určitého typu HPV, proti jehož proteinům má být vyvolána imunitní odpověď.

Prostředky obsahující stresový protein a antigen HPV popsané výše mohou být podány jedinci různými způsoby. Způsoby podání zahrnují intradermální, transdermální (například v polymerech se zpomaleným uvolňováním), intramuskulární, intraperitoneální,

intravenosní, subkutání, orální epidurální a intranasální způsoby podání. Může být použit jakýkoliv vhodný způsob podání, například infuze nebo bolusová injekce, nebo absorpce přes epitelovou nebo mukokutánní bariéru. Kromě toho, prostředky podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat a mohou být podány spolu s farmaceuticky přijatelnými složkami, jako jsou biologicky aktivní činidla (například adjuvans jako je hliník), surfaktanty (například glyceridy), přísady (například laktosa), nosiče, ředidla a vehikula. Dále, prostředky mohou být použity ex vivo jako prostředky pro stimulaci bílých krvinek získaných od jedince pro vyvolání, posílení a propagaci imunitních buněk specifických pro proteinový antigen HPV in vitro, kde tyto buňky jsou potom podány zpět jedinci.

Dále, fúsní protein obsahující stresový protein a proteinový antigen HPV může být podán in vivo expresí nukleové kysleiny kodující takové proteinové sekvence lidskému jedinci. Expres takových nukleových kyselin může být také dosažena ex vivo pomocí stimulace bílých krvinek získaných od jedince pro vyvolání, posílení a propagaci imunitních buněk specifických pro proteinový antigen HPV in vitro, kde tyto buňky jsou potom podány zpět jedinci. Expresní vektory vhodné pro řízení exprese fúsního proteinu obsahujícího stresový protein a proteinový antigen HPV mohou být vybrány z mnoha vektorů v současnosti používaných v oboru. Výhodné jsou vektory, které umožňují vysoký stupeň exprese a zároveň jsou účinné v přenosu požadovaného genu. Například může být použit rekombinantní adenovirový vektor pJM17 (All et al., Gene Therapy 1: 367-84 (1994); Berkner K.L., Biotechniques 6: 616-624 (1988), druhá generace adenovirových vektorů DE1/DE4 (Wang and Finer, Nature Medicine 2: 714-6 (1996)), nebo adeno-asociovaný virový vektor AAV/Neo (Muro-Cacho et al., J. Immunotherapy 11: 231-7 (1992)). Dále mohou být použity rekombinantní retrovirové vektory MFG (Jaffee et al.,

Cancer Res. 53: 2221-6 (1993)) nebo LN, LNSX, LNCX, LXSX (Miller and Rosman, Biotechniques 7: 980-9 (1989)). Alternativně mohou být použity vektory odvozené od viru herpes simplex, jako je pHSV1 (Geller et al., Proc. Natl. Acad. Sci 87: 8950-4 (1990)) nebo vakciniové vektory, jako je MVA (Sutter and Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 10847-51 (1992)).

Často používanými specifickými expresními jednotkami obsahujícími promotor a 3' sekvence jsou jednotky v plasmidu CDNA3 (Invitrogen), plasmidu AH5, pRC/CMV (Invitrogen), pCMU II (Paabo et al., EMBO J. 5: 1921-1927 (1986)), pZip-Neo SV (Cepko et al., Cell 37: 1053-1062 (1984)) a pSRa (DNAX, Palo Alto, CA). Vložení genů do expresních jednotek a/nebo vektorů může být provedeno za použití technik genetického inženýrství, jak jsou popsány v manuálech jako je Molecular Cloning a Current Protocols in Molecular Biology (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press (1989); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Willey Interscience (1989)). Výsledná exprimovatelná nukleová kyselina může být vložena do buněk lidského jedince za použití jakékoliv metody, která je schopna umístit nukleovou kyselinu do buněk v exprimovatelné formě, například jako část virového vektoru, jak jsou uvedeny výše, nebo ve formě holého plasmidu nebo jiné DNA, nebo ve formě obalené ve specifických liposomech nebo ve falešných erytrocytech (Friedman, T. Science 244: 1275-1281 (1989); Rabinovich, N.R. et al., Science, 265: 1401-1404 (1994)). Způsoby přenosu zahrnují přímou injekci do tkání a nádorů, liposomální transfekci (Fraley et al., Nature 370: 111-117 (1980)), receptory zprostředkovanou endocytosu (Zatloukal et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 136-153 (1992)), a genový přenos provedený bombardováním částicemi (Eisenbraun et al., DNA and Cell Biol. 12: 791-797 (1993)).

Množství stresového proteinu a proteinového antigenu HPV (fúsovaných, konjugovaných nebo nekovalentně vázaných, jak bylo popsáno výše) v prostředcích podle předkládaného vynálezu je takové množství, které produkuje účinnou imunostimulační reakci u jedince. Účinné množství je takové množství, které po podání vede k indukci imunitní odpovědi. Kromě toho, množství stresového proteinu a proteinového antigenu HPV podané subjektu závisí na mnoha faktorech, jako je typ použitého proteinového antigenu HPV a stresového proteinu, velikost, věk, tělesná hmotnost, celkový zdravotní stav, pohlaví, dietní zvyklosti jedince, stejně jako na obecné imunologické reaktivitě jedince. Úprava uvedených dávek je provedena odborníkem v oboru. Například, množství stresového proteinu a proteinového antigenu HPV může být od 1 μg do 1 g, lépe od 100 μg do 1 g a nejlépe od 1 mg do 1 g. Účinné množství prostředku obsahujícího expresní vektor je takové množství, které po podání indukuje imunitní odpověď proti proteinovému antigenu HPV, který koduje. Dále, množství expresního vektoru podané jedinci závisí na mnoha faktorech, jako je typ použitého proteinového antigenu HPV a stresového proteinu, velikost, věk, tělesná hmotnost, celkový zdravotní stav, pohlaví, dietní zvyklosti jedince, stejně jako na obecné imunologické reaktivitě jedince. Další faktory, které je třeba brát v úvahu, jsou způsob podání a typ použitého vektoru. Například, když je profylaktická nebo terapeutická léčba provedena virovým vektorem obsahujícím nukleovou kyselinu kodující fúsní protein složený z proteinového antigenu HPV a stresového proteinu, tak je účinné množství v rozmezí 10^4 až 10^{12} bez-helperového, replikace-defektního viru na kg tělesné hmotnosti, lépe 10^5 až 10^{11} viru na kg tělesné hmotnosti a nejlépe 10^6 až 10^{10} viru na kg tělesné hmotnosti.

Předkládaný vynález je dále dokreslen následujícími příklady, které nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Izolace rekombinantních stresových proteinů

Rekombinantní mykobakteriální Hsp71

Plasmid Y3111 obsahuje gen hsp 71 *M. tuberculosis* funkčně insertovaný mezi expresními kontrolními sekvencemi (Mehlert, A. and Young, D.B., *Mol. Microbiol.* 3: 125-130 (1989)). *E. coli* kmen CG2027 (získaný od C. Georgopoulos, University of Geneva, Switzerland) obsahující zkrácený dnaK gen, byl transformován plasmidem Y3111 pomocí standardních technik (Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)).

Bakterie obsahující plasmid Y3111 byly kultivovány přes noc v 2xYT mediu (20 g Trypton, 10 g kvasinkový extrakt, 10 g NaCl na litr) obsahujícím 100 µg/ml ampicilinu při 37 °C, za míchání (250 rpm). 10% glycerolový zásobní roztok byl připraven z této kultury a byl uskladněn při -70 °C. Několik seškrabů ze zmrazené glycerolové zásoby bylo použito pro inokulaci větší kultury, která byla inkubována způsobem uvedeným výše po dobu přibližně 48 hodin. Po dosažení optické hustoty 2,5 až 3,5 při 590 nm byly buňky odebrány centrifugací.

Následující kroky byly provedeny při 4 °C. Buněčná peleta byla resuspendována ve 3 ml lyzačního pufru na gram peletovaných buněk. Složení lyzačního pufru bylo 10 mM Tris-HCl, 2 mM ethylendiamintetraacetatu (EDTA), 5 mM β-merkapt ethanolu, 10 µg/ml aprotininu, 10 µg/ml leupeptinu a µg/ml pepstatinu. K buněčné suspenzi byl přidán lysozym v konečné koncentraci 0,14 mg/ml. Supenze byla potom zmrazena při -70 °C.

Buněčná suspenze byla potom rozmrazena a buňky byly rozrušeny sonikací. Sonikovaná suspenze byla centrifugována při 17000 rpm po dobu 30 minut (JA-17 centrifuga, Beckmann). Do supernatantu se přidával pevný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do té doby, než byl roztok z 65% nasycený $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Po 30 minutové inkubaci se směs centrifugovala způsobem uvedeným výše. Peleta byla rozpuštěna v Q SEPHAROSE pufru A. Do tohoto roztoku se přidalo 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotininu, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptinu a 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatinu a roztok se dialyzoval přes noc proti 65 objemům Q SEPHAROSE pufru A obsahujícím 30 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 5 mM β -merkaptoethanolu. Dialyzovaný roztok se pročistil centrifugací, jak byla uvedena výše.

Dialyzovaný roztok se aplikuje na Q SEPHAROSE kolonu (Pharmacia) uvedenou do rovnováhy Q SEPHAROSE puftrem A. Kolona se promyje 2 objemy kolony stejného pufru. Eluce se provede gradientem 0 až 600 mM NaCl. Frakce se testují SDS-PAGE a barví se Coomassie Blue na přítomnost hlavního 71 kDa polypeptidu (t.j. rekombinantního Hsp 71 proteinu M. tuberculosis). Frakce obsahující polypeptid se shromáždí a nasytí se na 65% přidáním pevného $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Směs se centrifuguje způsobem popsáným výše, peleta se rozpustí v ATP Start pufru (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 15 mM β -merkaptoethanolu, 0,1 mM EDTA) a výsledný proteinový roztok se dialyzuje přes noc proti 65 objemům stejného pufru a pročistí se centrifugací.

Dialyzovaný proteinový roztok se potom aplikuje na ATP-agarosovou kolonu (Fluka) uvedenou do rovnováhy ATP Start puftrem. Kolona se promyje 1 objemem kolony ATP Start pufru s 1 M NaCl. Eluce se provede ATP Start puftrem doplněným 10 mM ATP. Eluat se nasytí na 65% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a vysrážený protein se odebere způsobem uvedeným výše. Centrifugovaná peleta se rozpustí a dialyzuje se proti 200 objemům Blue SEPHAROSE pufru (30 mM

Tris-HCl, (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 5 mM β-merkapt ethanol).

Dialyzovaný proteinový roztok se aplikuje na Blue SEPHAROSE kolonu (Pharmacia) uvedenou do rovnováhy Blue SEPHAROSE puftrem. Kolona se promyje 1,5 objemy kolony stejného pufru. Průtokové a výplachové frakce (obsahující Hsp 71) se odeberou jako jeden soubor. Čistota konečného přípravku se hodnotí SAD-PAGE a barvením Coomassie modří, westernovou analýzou (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982); viz Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) za použití monoklonálních protilátek specifických pro mykobakteriální Hsp71 a E. coli DnaK, v příslušném pořadí, a pomocí testů na ATPasovou aktivitu. Přípravky mají obvykle vyšší než 90% čistotu podle charakteru barvení přípravků v gelech barvených Coomasie modří, a výhodněji mají vyšší než 95% čistotu a obsahují méně než 1% E. coli GroEL a žádný detekovatelný E. coli DnaK.

Rekombinantní mykobakteriální Hsp65

Plasmid RIB 1300 obsahuje gen hsp65 M. bovis funkčně insertovaný mezi expresními kontrolními sekvencemi (Thole, J.E.R. et al., J. Exp. Med. 178: 343-8 (1993)). E. coli kmen M1546 byl transformován plasmidem RIB 1300 (Thole, J.E.R., výše) pomocí standardních technik (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)).

Inokulum bakterií obsahujících plasmid RIB 1300 bylo kultivováno do saturace na NCZYM mediu (10 g N-Z aminu A, 5 g Bacto kvasinkového extraktu, 1 g kasaminokyselin, 5 g NaCl, 2 g (NH₄)₂SO₄·7H₂O na litr) obsahujícím 200 µg/ml ampicilinu při 28 °C, za míchání (250 rpm). Tato kultura byla použita pro

inokulaci větší kultury, která byla inkubována způsobem uvedeným výše do dosažení optické hustoty 0,3 až 0,6 při 590 nm. Produkce rekombinantního proteinu byla iniciována rychlým zvýšením teploty kultivace na 42 °C inkubací ve vodní lázni. Kultura byla udržována při této teplotě po dobu 3 hodin za mísení. Bakterie byly odebrány centrifugací a byly resuspendovány v 6 objemech lyzačního pufru na bakteriální peletu. Složení lyzačního pufru bylo 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM ethylendiamintetraacetátu (EDTA), 0,1 mM PMSF a 0,1% RIVM BA (0,104 g 4-amino-benzamidin-2HCl, 0,066 g kyseliny epsilon-aminokaproové na 50 ml). Lysozym byl přidán v konečné koncentraci 0,1 mg/ml a supenze byla potom zmrazena při -70 °C.

Bakteriální suspenze byla rozmrazena a byla umístěna při 4 °C. Následující kroky byly provedeny při této teplotě. Kompletní lýza bakterií byla provedena sonikací. Sonikovaný roztok byl centrifugován při 17000 rpm po dobu 30 minut na JA-17 centrifuze (Becman). Do supernatantu se přidával nasycený roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do té doby, než byl roztok z 20% nasycený $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sraženina se odstranila centrifugací (viz výše) a odebrala se. Supernatant se z 55% nasytil $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Peleta vzniklá po další centrifugaci byla rozpuštěna v TE pufru (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 15 mM β -merkapt ethanol, 1 mM EDTA). Proteinový roztok v TE se potom dialyzoval proti 50 objemům kolony TE pufru.

Po centrifugování (způsobem uvedeným výše) pro odstranění vysráženého materiálu se dialyzovaný proteinový roztok aplikoval na DEAE SEPHAROSE (pharmacia) kolonu. Po promytí TE pufrem se proteiny eluovaly gradientem 0-300 mM NaCl v TE pufru. Frakce obsahující Hsp65 M. bovis BCG byly identifikovány SDS-PAGE a barvením Coomassie modří a byly shromážděny. K tomuto materiálu bylo přidáno 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotininu, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptinu a 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatinu a tento materiál byl koncentrován v Amicon kyvetě za

použití YM30 membrány.

Koncentrovaný materiál byl aplikován na S-200 SEPHACRYL (Pharmacia) kolonu uvedenou do rovnováhy S200 pufrem (10 mM Na_2HPO_4 (pH 6,8), 150 mM NaCl a 15 mM β -merkaptoethanol). Eluce byla provedena stejným pufrem. Frakce byly testovány na přítomnost mykobakteriálního Hsp65 způsobem uvedeným výše a pozitivní frakce obsahující vysoce čistý protein byly shromážděny a byly dialyzovány přes noc proti HAP pufru (10 mM Na_2HPO_4 (pH 6,8), 15 mM β -merkaptoethanol).

Dialyzovaný materiál byl aplikován na hydroxyapatitovou (Bio-Rad; Bio-Gel HTP gel) kolonu uvedenou do rovnováhy v HAP pufru. Kolona byly promyta 3 objemy kolony 1 mM MgCl_2 a 15 mM β -merkaptoethanolu a potom 1 mM Na_2HPO_4 (pH 6,8), 15 mM β -merkaptoethanolu. Protein byl eluován 10-60 mM fosfatovým gradientem. Frakce byly testovány způsobem uvedeným výše a pozitivní frakce byly shromážděny, koncentrovány a přeneseny do 0,85% NaCl pomocí gelové filtrace přes PD10 (Pharmacia). Čistota konečného přípravku se hodnotí SAD-PAGE a barvením Coomassie modří, westernovou analýzou za použití protilátek specifických pro E. coli DnaK a GroEL. Přípravky mají obvykle vyšší než 90% čistotu a neobsahují více než 0,5% E. coli GroEL a 0,1-0,1% E. coli DnaK.

Přípravky Hsp mohou být depyrogenovány buď afinitní chromatografií na DetoxiGel pryskyřici (Pierce), adicí polymyxinu B nebo extrakcí s detergenty jako je Triton X-114 nebo X-100. Redukce obsahu lipopolysacharidů může být sledována "limulus amoebocytovým testem" (LAL; Biowhittaker, QCL 1000). Hsp přípravky mohou být uskladněny v pufru při -70°C , nebo mohou být skladovány jako suché pelety po lyofilizaci, výhodně při -70°C .

Příklad 2: Příprava konjugátů tvořených proteinovým antigenem a stresovým proteinem

Tento příklad je ilustrací technik, které mohou být použity pro přípravu konjugátů mezi stresovým proteinem a proteinovým antigenem, v tomto příkladu peptidem odvozeným od nukleoproteinu viru chřipky (NP).

Syntéza stresového proteinu (Hsp71) a antigenu (NP.B)

Hsp71 *M. tuberculosis* byl připraven způsobem popsáním v příkladu 1. NP peptid (zde označovaný jako NP.B; Motal, U.M.A. et al., Eur. J. Immunol. 25: 11214 (1995) a odkazy zde citované) s aminokyselinovou sekvencí (C)VQLASNNMETM (SEQ ID NO: 1; peptid obsahuje extra-amino terminální cysteinový zbytek) odpovídající zbytkům 363-374 v kompletním NP a obsahující známý CTL epitop (H-2b-restrihovaný) byl připraven synteticky (0,25 mM) na Applied Biosystems model 431A syntezátoru peptidů za použití Fmoc (9-fluorenylmethyloxy-karbonyl) jako α -amino chránící skupiny a HMP (Wang) pryskyřice jako pevného nosiče. Všechny aminokyseliny a chemická činidla byla zakoupena od Applied Biosystems. NP.B byl odštěpen od pryskyřice a chránící skupiny pro vedlejší řetězec byly odstraněny inkubací NP.B-pryskyřice za stálého mísení po dobu 3 hodin ve 2 ml směsi připravené smísením 10 ml kyseliny trifluoroctové, 0,5 ml vody, 0,75 g krystalického fenolu, 0,25 ml ethandithiolu a 0,5 ml thioanisolu. Štěpící směs byla filtrována do 40 ml ledově chladného diethyletheru. Nerozpustný materiál byl odebrán centrifugací při 5000 x g po dobu 8 minut. Ether byl dekantován a peleta byla třikrát promyta resuspendováním v chladném diethyletheru, po kterém následovala centrifugace. Po posledním promytí byla peleta sušena na vzduchu, přenesena do destilované vody a lyofilizována.

Chemická konjugace NP.B peptidu na Hsp71 a difterický toxoid

Konjugace byla provedena s Hsp 71 a - pro získání standardu pro srovnání účinnosti specifické stimulace CTL aktivity - také na běžně používaný nosič proteinů, kterým je difterický toxoid (zkratka DT; DT byl získán od Wako Chemicals).

Roztoky obsahující aktivovaný nosič a protein: 9 mg Hsp71 bylo rozpuštěno v 4,5 ml 0,1 M pufru tvořeného boritanem sodným, pH 8,0. K proteinu byl přidán Sulfo-MBS (m-maleiimidobenzoyl-N-hydroxy-sulfosukcinimid ester) (2,3 mg ve 100 μ l dimethylsulfoxaminu) a reakční směs byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě okolí. Potom bylo pH směsi upraveno na pH 6,0 a reakční směs byla dialyzována přes noc při 4 °C proti 1 litru 20 mM fosforečnanu sodného a 150 mM NaCl, pH 5,6. DT byl připraven podobně.

Redukované peptidové roztoky: Pro každou konjugační reakci byly 3 mg peptidu rozpuštěny ve 100 μ l 0,1 M β -merkapt ethanolu. Po 1 hodině inkubace, která umožnila redukci peptidu, se redukční činidlo odstranilo sušením reakční směsi ve SpeedVac centrifuze. Peptid se znovu rozpustil ve 0,5 ml destilované vody, do které se přidávaly 5 μ l alikvoty 1 N NaOH, dokud nebyl peptid zcela rozpuštěn. Pro konjugační reakce s DT bylo 6 mg peptidu redukováno a potom rozpuštěno v 1 ml vody.

pH aktivovaných roztoků nosič-protein bylo upraveno pomocí 0,1 N NaOH na 6,8. Roztok obsahující 3 mg aktivovaného nosiče-proteinu reagoval s 0,5 ml roztoku redukováného peptidu (nebo 1 ml roztoku redukováného peptidu pro konjugaci s DT) po dobu 3 hodin při teplotě okolí za stálého mísení. Pro odstranění nezreagovaného peptidu byl výsledný roztok obsahující konjugát dialyzován přes noc při 4 °C proti 1 litru 20 mM fosforečnanu

sodného a 150 mM NaCl, pH 7. Koncentrace proteinu byla stanovena BCA testem. Účinnost konjugace při použití tohoto postupu byla stanovena v předchozích pilotních pokusech za použití radioaktivně značeného NP.B peptidu. Bylo zjištěno, že poměr peptid:protein je 17:5 pro konjugat NP.B-Hsp71 (71.NP) a 10:1 pro NP.B-DT (DT-NP).

Příklad 3: Příprava HSP-E6 a HSP-E7 fúsních genů

Příprava bakteriálního expresního vektoru pET65H

Plasmid RIB 1300 obsahuje gen hsp65 *M. bovis* (Thole, J.E.R. et al., J. Exp. Med. 178: 343-8 (1993)). Pár primerů pro amplifikaci hsp65 genu byl syntetizován na automatizovaném oligonukleotidovém syntezátoru a byl přečištěn za použití běžných technik. Primer vbe směru kodující sekvence obsahoval NdeI restrikční místo a měl nukleotidovou sekvenci 5'- AAT CAC TTC CAT ATG GCC AAG ACA ATT. Reversní primer obsahoval EcoRI a NheI místa sousedící se stop kodonem a měl nukleotidovou sekvenci 5' CGC TCG GAC GAA TTC TCA GCT AGC GAA ATC CAT GCC.

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla provedena za použití výše uvedeného páru primerů a pRIB 1300 jako DNA templátu. PCR fragmenty byly dvojité tráveny restrikčními endonukleasami NdeI a EcoRI a byly ligovány do NdeI/EcoRI-dvojité tráveného pET28a (Invitrogen) za použití běžných subklonovacích postupů (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)). Transformace-kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α byly transformovány ligační směsí a byly umístěny na agar obsahující 100 μ g/ml ampicilinu. Kolonie transformovaných buněk byly izolovány a byla připravena plasmidová DNA a byla analyzována na přítomnost hsp65 genu a vektorových sekvencí pomocí restrikčního mapování a sekvenování

nukleotidů. Byly identifikovány správné konstrukty (označené pET65H) obsahující mykobakteriální hsp65 gen a byly transformovány do *E. coli* kmene BL21 (DE3; Novagen) pro analýzu exprese hsp65 genu. Schematická mapa konstruktu pET65H je uvedena na obr. 1. Pro testování exprese Hsp65 byly transformované bakterie kmene BL21 kultivovány, indukovány a sklíženy podle návodu výrobce (Novagen). Bakterie byly lyzovány a rozpustný materiál, stejně jako materiál solubilizovaný z inkusních tělísek guanidiniumhydrochloridem (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) byl zpracován elektroforesou na SDS-PAGE a anti-Hsp65 imunoblotem za použití monoklonální protilátky specifické pro mykobakteriální stresový protein.

Příprava konstruktů pro expresi Hsp65-HPV16E6 fúsního proteinu v bakteriích

Kompletní HPV16-E6 kodující region byl insertován na karboxy-konci hsp65 genu v pET65H.

Plasmid pHPV16 obsahuje kompletní genom HPV16 v Bluescript vektoru SK (ATCC 45113). Pro nukleotidovou sekvenci genomu HPV16 viz Seedorf et al., Virology 145: 181-5 (1985). Pár primerů pro amplifikaci E6 genu byl syntetizován na automatizovaném oligonukleotidovém syntezátoru a byl přečištěn za použití běžných technik. Primer vbe směru kodující sekvence obsahoval *NheI* restriční místo a měl nukleotidovou sekvenci 5'- AAA AGC AGA GCT AGC ATG CAC CAA AAG. Reversní primer obsahoval *EcoRI* a stop kodon a měl nukleotidovou sekvenci 5' CTC CAT GAA TTC TTA CAG CGT GGT.

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla provedena za použití výše uvedeného páru primerů a pHPV16 jako DNA templátu. PCR fragmenty byly dvojité tráveny restričními endonukleasami *NheI*

a EcoRI a byly ligovány do NheI/EcoRI-dvojitě tráveného pET65H za použití běžných subklonovacích postupů (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)). Transformace-kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α byly transformovány ligační směsí a byly umístěny na agar obsahující 100 μ g/ml ampicilinu. Kolonie transformovaných buněk byly izolovány a byla připravena plasmidová DNA a byla analyzována na přítomnost hsp65-E6 fúsního genu a vektorových sekvencí pomocí restrikčního mapování a sekvenování nukleotidů. Byly identifikovány správné konstrukty (označené pET65HE6) obsahující hsp65-E6 fúsní gen a byly transformovány do *E. coli* kmene BL21 (DE3; Novagen) pro analýzu exprese fúsního genu. Schematická mapa konstruktu pET65HE6 je uvedena na obr. 2. Pro testování exprese Hsp65-E6 byly transformované bakterie kmene BL21 kultivovány, indukovány a sklizeny podle návodu výrobce (Novagen). Bakterie byly lyzovány a rozpustný materiál, stejně jako materiál solubilizovaný z inkusních tělísek guanidiniumhydrochloridem (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) byl zpracován elektroforesou na SDS-PAGE. Jako standard byl v paralelní dráze použit Hsp65. Exprese Hsp65-E6 se projevila jako proužek silně se barvící Coomassie modří migrující o něco pomaleji (zřetelná molekulová hmotnost (MOO) přibližně 73 kDa), než skutečný Hsp65 (zřetelná molekulová hmotnost přibližně 56 kDa) ve vzorcích z pET65HE6-transformovaných bakterií, který nebyl přítomen v příslušných netransformovaných bakteriích.

Příprava konstruktu pro expresi Hsp65-HPV16E7 fúsního proteinu v bakteriích

Kompletní HPV16-E7 kodující region byl insertován na karboxy-konci hsp65 genu v pET65H.

Pár primerů pro amplifikaci E7 genu byl syntetizován na automatizovaném oligonukleotidovém syntezátoru a byl přečištěn za použití běžných technik. Primer ve směru kodující sekvence obsahoval NheI restriční místo a měl nukleotidovou sekvenci 5'-AAC CCA CCT GCT AGC ATG CAT GGA GAT. Reversní primer obsahoval EcoRI a stop kodon a měl nukleotidovou sekvenci 5' AGC CAT GAA TTC TTA TGG TTT CTG.

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla provedena za použití výše uvedeného páru primerů a pHPV 16 jako DNA templátu. PCR fragmenty byly dvojité tráveny restričními endonukleasami NheI a EcoRI a byly ligovány do NheI/EcoRI-dvojité tráveného pETH65 (Invitrogen) za použití běžných subklonovacích postupů. Transformace-kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5α byly transformovány ligační směsí a byly umístěny na agar obsahující 100 µg/ml ampicilinu. Kolonie transformovaných buněk byly izolovány a byla připravena plasmidová DNA a byla analyzována na přítomnost hsp65-E7 fúsního genu a vektorových sekvencí pomocí restričního mapování a sekvenování nukleotidů. Byly identifikovány správné konstrukty (označené pET65HE7) obsahující hsp65-E7 fúsní gen a byly transformovány do *E. coli* kmene BL21 (DE3; Novagen) pro analýzu exprese fúsního genu. Schematická mapa konstruktu pET65HE7 je uvedena na obr. 3. Pro testování exprese Hsp65-E7 byly bakterie kmene BL21 transformované pET65HE7 kultivovány, indukovány a sklízены podle návodu výrobce (Novagen). Bakterie byly lyzovány a rozpustný materiál, stejně jako materiál solubilizovaný z inkusních tělísek guanidiniumhydrochloridem byl zpracován elektroforesou na SDS-PAGE a anti-E7 imunoblotem za použití monoklonální protilátky specifické pro HPV16 E7 (Zymed Laboratory Inc., katalogové č. 28-0006).

Příklad 4: Exprese a přečištění fúsních proteinů

Exprese a přečištění Hsp65-E6 fúsního proteinu: postup 1

Konstrukt pET65HE6 byl transformován do E.coli kmene BL21 (DE3; Novagen) a transformované buňky byly kultivovány v 6 litrových kulturách na 2 x YT mediu (20 g Trypton, 10 g kvasinkový extrakt, 10 g NaCl na liter) obsahujícím 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu při 30 °C. Pro každou kulturu byla při dosažení density 0,5 (OD_{590}) indukována exprese fúsního proteinu pomocí 0,5 mM isopropyl-thio-galaktopyranosidu, a kultura byla potom inkubována po dobu dalších 3 hodin při 37 °C. Buňky byly získány centrifugací, byly suspendovány v 90 ml lyzačního pufru (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM β -merkapt ethanol, pH 7,5) obsahujícím 200 $\mu\text{g/ml}$ lysozymu a byly zmrazeny při -70 °C. O jeden den později byla zmrazená buněčná suspenze rozmrazena ve vodní lázni při 37 °C a byla doplněna 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotininu, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptinu, 2 $\mu\text{g/ml}$ pepstatinu a 2 mM PMSF. Všechny další kroky byly provedeny při 0-4 °C. Lýza buněk byla provedena sonikací a nerozpustný materiál byl odstraněn centrifugací při 17000 rpm po dobu 15 minut (JA-centrifuga, Beckmann). Peletovaný materiál byl promyt dvakrát lyzačním pufrem a potom byl za použití sonikace solubilizován v 90 ml pufru A (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 M guanidiniumhydrochlorid). Nerozpustný materiál byl odstraněn centrifugací, jak byla popsána výše. Solubilizovaný materiál byl potom aplikován na kolonu obsahující 50 ml niklové pryskyřice s chelační schopností pro kovy (Chelating Sepharose Fast Flow; Pharmacia), které byla uvedena do rovnováhy pufrem A. Navázaný fúsní protein byl pomalu skládán na pryskyřici za použití 0-1 M gradientu NaCl. Potom byla pryskyřice promyta 5 objemy pufru B (1 M NaCl) pro odstranění zbytkového guanidiniumhydrochloridu, a 5 objemy pufru C (50 mM imidazol, pH 7,5, 0,5 mM β -merkapt ethanol, 150 mM NaCl) pro odstranění kontaminujících

proteinů. Fúsní protein byl eluován 6 objemy 50-500 mM lineárního imidazolového gradientu v pufru C. Shromážděný, eluovaný protein byl dialyzován přes noc proti přibližně 40 objemům Dulbecco fosfatem pufrovaného salinického roztoku (2,7 mM KH_2PO_4 , 4,3 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,137 mM NaCl), byl koncentrován ultrafiltrací (Amicon, limit molekulové hmotnosti 30 kDa) a byl zpracován na Detoxin pryskyřici uvedené do rovnováhy v Dulbecco fosfatem pufrovaném salinickém roztoku pro odstranění endotoxinů.

Expresa a přečištění Hsp65-E6 fúsního proteinu: postup 2

Konstrukt pET65HE6 byl transformován do E.coli kmene BL21 (DE3; Novagen) a transformované buňky byly kultivovány ve 12 litrových kulturách na 2 x YT mediu (20 g Trypton, 10 g kvasinkový extrakt, 10 g NaCl na litr) obsahujícím 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu při 30 °C. Pro každou kulturu byla při dosažení density 0,5 (OD_{590}) indukována exprese fúsního proteinu pomocí 0,5 mM isopropyl-thio-galaktopyranosidu, a kultura byla potom inkubována po dobu dalších 3 hodin při 37 °C. Buňky byly získány centrifugací, byly suspendovány ve 180 ml lyzačního pufru (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM β -merkaptoethanol, pH 7,5) obsahujícím 200 $\mu\text{g/ml}$ lysozymu a byly zmrazeny při -70 °C. O jeden den později byla zmrazená buněčná suspenze rozmrazena ve vodní lázni při 37 °C a byla doplněna 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotininu, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptinu, 2 $\mu\text{g/ml}$ pepstatinu a 2 mM PMSF. Všechny další kroky byly provedeny při 0-4 °C. Lýza buněk byla provedena sonikací a nerozpustný materiál byl odstraněn centrifugací při 17000 rpm po dobu 15 minut (JA-centrifuga, Beckmann). Peletovaný materiál byl promyt dvakrát lyzačním puforem a potom byl za použití sonikace solubilizován ve 180 ml pufru A (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 M guanidinium-hydrochlorid). Nerozpustný materiál byl odstraněn centrifugací, jak byla popsána výše. Solubilizovaný materiál byl potom aplikován na kolonu obsahující 50 ml niklové pryskyřice

s chelační schopností pro kovy (Chelating Sepharose Fast Flow; Pharmacia), které byla uvedena do rovnováhy pufrém A. Navázaný fúsní protein byl promyt pufrém D (pufr A s 5% Triton X-100) a potom byl pomalu skládán na pryskyřici za použití 0-1 M gradientu NaCl. Potom byla pryskyřice promyta 5 objemy pufru E (1 M NaCl, 1% Triton X-100) a 5 objemy pufru B (1 M NaCl) pro odstranění zbytkového guanidiniumhydrochloridu, a potom 5 objemy pufru F (50 mM imidazol, pH 7,5, 0,5 mM β -merkaptoethanol, 0,5 M mM NaCl, 15% glycerol) pro odstranění kontaminujících proteinů. Fúsní protein byl eluován 6 objemy 50-500 mM lineárního imidazolového gradientu v pufru F. Shromážděný, eluovaný protein byl dialyzován přes noc proti přibližně 40 pufru G (30 mM Tris-HCl, pH 6,2, 2 mM EDTA, 5 mM β -merkaptoethanol, 15% glycerol) a byl aplikován na 50 ml SP-Sepharosovou kolonu uvedenou do rovnováhy ve stejném pufru. Fúsní protein (přibližně 42 mg, představující přibližně 50% celkového fúsního proteinu přítomného v nefrakcionovaném extraktu) byl získán z výtokové frakce, byl dialyzován přes noc proti přibližně 40 objemům Dulbecco fosfatem pufrovaného salinického roztoku (2,7 mM KH_2PO_4 , 4,3 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,137 mM NaCl), byl koncentrován ultrafiltrací (Amicon, limit molekulové hmotnosti 30 kDa).

Hsp65-E7 fúsní protein byl exprimován a přečištěn stejným způsobem. Čistota fúsních proteinů byla hodnocena SDS-PAGE a barvením gelů Coomassie modří. Proteiny měly obvykle 70-90% čistotu po postupu 1 a přibližně 95% čistotu po výhodnějším postupu 2. Koncentrace endotoxinů po přečištění postupem 2 byly nižší než 20 EU/mg proteinu.

Příklad 5: Imunizace pomocí Hsp65-E6 a Hsp65-E7

Samice C57/BL/6 myši stáří do osmi týdnů byly získány od

Charles River Laboratory (St. Constant, Quebec, Canada). Skupiny šesti až osmi myši byly imunizovány podkožně v oblasti šíje stejnými množstvími Hsp65-E6 a Hsp65-E7 fúsních proteinů v Dulbecco fosfotem pufrovaném salinickém roztoku, kde tyto proteiny byly přečištěny způsobem popsáním v příkladu 4. Celkové podané dávky fúsních proteinů byly 20 μ g nebo 200 μ g, v příslušném pořadí. Negativní kontrolní imunizace byla provedena Freundovým nekompletním adjuvans v salinickém roztoku (IFA) a pozitivní kontrolní imunizace byla provedena 100 μ g syntetického HPV 16 peptidu tvořeného zbytky 44 - 62 v IFA a salinickém roztoku. Vzhledem k podaným dávkám fúsních proteinů představuje toto množství E7 peptidu 20 nebo 200-násobek, v příslušném pořadí. Imunizace byla opakována o 14 dní později. 20 dní po druhé imunizaci byly myši infikovány podkožní injekcí v oholené oblasti krku $1,3 \times 10^5$ E7-exprimujícími nádorovými buňkami TC-1. Incidence nádoru byla skorována jako přítomnost či nepřítomnost nádoru při vizuálním pozorování a palpaci každé dva dny po dobu 50 dnů. TC-1 nádorová buněčná linie exprimující HPV16 E7 protein byla získána z primárních plicních buněk C57/B1/6 myši imortalizací a transformací HPV16 E6 a E7 geny a byla aktivována lidským c-Ha-ras genem, jak popsali Lin et al., (Cancer Res. 56: 21-26 (1996)). Pro inokulaci nádoru byly TC-1 buňky, získané od Dr. T.C. Wu (The Johns Hopkins Medical Institution, Baltimore, MD) kultivovány do 60-70% konfluence v RPMI 1640 mediu doplněném 10% fetálním telecím sérem (Hyclon, Logan, UT), neesenciálními aminokyselinami, glutaminem, pyruvatem, gentamycinem, β -merkaptοethanolem, 0,4 mg/ml Geneticinu^R (Life Technologies, Grand Island, NY) a 0,2 mg/ml hygromycinu B při 37 °C. Buňky byly sklizeny trypsinizací a resuspendováním v Hankovu pufrovacím roztoku v koncentraci $6,5 \times 10^5$ buněk/ml.

Výsledky jednoho takového pokusu jsou uvedeny na obr. 4. Krátce po inokulaci narůstala incidence nádorů ve všech skupinách

(mezi 5 a 15 dnů po inokulaci). Zatímco pro IFA skupinu zůstávala incidence vysoká, dramaticky klesla na 0% pro skupinu léčenou 200 μ g fúsního proteinu nebo E7 peptidem v IFA. Střední výsledky byly získány pro skupinu léčenou 20 μ g fúsních proteinů. Proto lze říci, že imunizace za použití Hsp65-E6 a Hsp65-E7 fúsních proteinů za nepřítomnosti jakéhokoliv adjuvans účinně chrání myši před letální expozicí nádorovým buňkám exprimujícím E7. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Reakce na druhou expozici TC-1 nádorovým buňkám

Skupina	Procentuální incidence nádorů*	
	po 1. expozici (den 54)	po 2. expozici (den 79)
IFA nebo nic**	83 (5/6)	100 (4/4)
μ g fúsních proteinů	25 (2/8)	25 (1/4)
μ g fúsních proteinů	0 (0/8)	0 (0/4)
E7 peptid v IFA	0 (0/8)	0 (0/4)

* V závorkách je uveden počet zvířat s nádorem/celkový počet zvířat na skupinu. V pravém sloupci byla zvířata sledována na přítomnost nebo absenci nádoru po dobu dalších 25 dnů (po 2. expozici).

** Jako kontrola pro 2. expozici nádoru byla pro srovnání použita skupina neimunizovaných zvířat.

Příklad 6: Expozice imunizovaných zvířat 2. dávce nádorových buněk

Pro hodnocení trvání imunitní odpovědi na HPV antigeny byly skupiny o čtyřech přežívajících zvířatech z předešlého pokusu (v den 54), jak ze skupiny, které byl podán fúsní protein, tak ze

skupiny, které byl podán E7 peptid/IFA, vystaveny druhé dávce $1,3 \times 10^5$ živých TC-1 nádorových buněk na zvíře. Jako kontrola byla použita skupina naivních myší, kterým byla podána stejná dávka nádorových buněk. Incidence nádorů byla hodnocena o 25 dnů později.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1. Zvířata imunizovaná fúsními proteiny nebo E7 peptidem/IFA byla zcela nebo téměř zcela chráněna před druhou dávkou, zatímco neimunizovaná zvířata měla 100% incidenci nádorů.

Příklad 7: Cytolytická aktivita splenocytů od imunizovaných neimunizovaných zvířat

Myši ve skupinách, kterým byl podán fúsní protein, peptid nebo které nebyly imunizovány, byly utráceny zlomením vazů a byly odebrány jejich sleziny. Byla připravena jedna buněčná suspenze ze slezin a byla promyta jednou v Hankově pufovaném roztoku doplněném 5% fetálním telecím sérem. Lymfoidní buňky byly restimulovány kultivací 20×10^6 živých buněk s 2×10^6 mitomycinem C zpracovaných TC-1 buněk po dobu 5 dnů v RPMI 1640 mediu doplněném 10% fetálním hovězím sérem, 2 mM L-glutaminu, 1 mM pyruvátu sodného, 50 μ M 2-merkaptoethanolu a 50 μ g/ml gentamycinsulfátu při 37 °C a 5% CO₂. Potom byly získány splenocyty (efektorové buňky) a byly použity v testech CTL aktivity, jak jsou popsány dále.

TC-1 a HLA typově odpovídající buněčné linie EL4 a MC57G neexprimující E7 epitop byly použity jako cílové buňky. Buňky byly inkubovány po dobu 90 minut se 150 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ a - v případě EL4 buněk - také s 10 μ g nukleoproteinpeptidu₃₆₆₋₃₇₄ chřipkového viru na 10^6 buněk. Po důkladném promytí pro odstranění nadbytku radioaktivního činidla bylo 5×10^3 značených

cílových buněk současně kultivováno s restimulovanými efektorovými buňkami v různých poměrech efektorových ku cílovým buňkám. Po 4-5 hodinové inkubaci byly kultivační plotny centrifugovány po dobu 5 minut při 200 x g a 100 μ l alikvoty supernatantu obsahujícího radioaktivní činidlo uvolněné z buněk byly odebírány do Beckman Ready Caps. Radioaktivita byla měřena scintilačně. Pro stanovení spontánně uvolněné a celkově uvolnitelné radioaktivity byly supernatanty z kultur obsahujících pouze cílové buňky nebo cílové buňky lyzované adicí Triton X100 odebrány a jejich radioaktivita byla stanovena způsobem uvedeným výše. Výsledky jsou vyjádřeny jako % korigované lýzy, které je vypočítáno podle vzorce:

$$\% \text{ korigované lýzy} = 100 \times (\text{cpm}_{\text{test}} - \text{cpm}_{\text{spont}}) / (\text{cpm}_{\text{celk.}} - \text{cpm}_{\text{spont}})$$

kde cpm_{test} je radioaktivita uvolněná z konkrétní současné kultivace, $\text{cpm}_{\text{spont}}$ je spontánně uvolněná radioaktivita v kultuře cílových buněk a $\text{cpm}_{\text{total}}$ je radioaktivita uvolněná po lýze cílových buněk Triton X100. CTL testy byly provedeny třikrát a jsou uvedeny průměrné hodnoty.

Výsledky pokusu za použití TC-1 buněk jako cílových buněk jsou uvedeny na obr. 5. 40% a 25% lýza TC-1 buněk byla způsobena efektorovými buňkami (použitými v množství 100-krát vyšším než cílové buňky) získanými od zvířat imunizovaných 200 μ g a 20 μ g fúsních proteinů, v příslušném pořadí.

Ve druhém pokusu byla specificita CTL aktivity testována za použití splenocytů od zvířat imunizovaných 20 μ g fúsního proteinu. Výsledky uvedené na obr. 6 demonstrují účinnou lýzu HPV16 E6/E7-transformovaných TC-1 buněk. Lýza dvou dalších typů buněk (EL4 a MC57G) neexprimujících HPV antigen se vyskytovala s mnohem nižší účinností, což ukazuje na specificitu CTL odpovědi

vyvolané imunizací s Hsp-E6 a -E7 fúsními proteiny.

Příklad 8: Regrese TC-1 nádoru u myši po léčbě Hsp65-E7 fúsním proteinem

V tomto pokusu byly použity tři skupiny osmi C57/BIJ6 myši. Každému zvířeti bylo podáno podkožně $1,3 \times 10^5$ TC-1 buněk do vyholené oblasti krku. O dva dny později byl první skupině podán salinický roztok (negativní kontrola), druhé skupině bylo podáno 100 μg /zvíře Hsp65-E7 fúsního proteinu v salinickém roztoku a třetí skupině bylo podáno 100 μg /zvíře E7 peptidu a IFA (pozitivní kontrola). Všechny injekce (0,2 ml) byly podány podkožně v oblasti šíje. O 14 dní později (16 dní po inokulaci tumoru) byly injekce opakovány. Ode dne 1 po inokulaci tumoru byly každý druhý den myši vizuálně a palpačně vyšetřovány na přítomnost nebo nepřítomnost nádoru.

Obr. 7 ukazuje, že 9 dnů po inokulaci nádoru měly všechny skupiny maximální incidenci nádoru (vyjádřenou v procentech zvířat s nádory), v rozmezí od 85 - 100%. Nicméně, v den 17 bylo u skupiny léčené Hsp65-E7 fúsním proteinem, stejně jako u skupiny léčené E7 peptidem v IFA, pozorováno významné snížení incidence nádorů, na hodnotu přibližně 15%. Naopak, skupina léčená salinickým roztokem měla po zbytek pozorování téměř 100% incidenci nádorů. Tyto výsledky ukazují, že Hsp65-E7 fúsní protein, podaný za absence adjuvans, indukuje drastickou regresi HPV-indukovaných nádorů.

Výsledky z podobného pokusu jsou uvedeny na obr. 8. V tomto pokusu byla zvířata inokulována vyšší dávkou nádorových buněk (2×10^5 /zvíře) než v předešlém pokusu. Získané výsledky byly velmi podobné, jako v předešlém pokusu.

Příklad 9: Srovnání schopnosti E7 proteinu a Hsp65-E7 fúsního proteinu indukovat buněčné imunitní odpovědi

Hsp65-E7 fúsní protein byl připraven a přečištěn způsobem podle příkladu 4. Kompletní HPV E7 protein byl získán následujícím postupem.

E7 gen byl amplifikován z HPV 16 genomové DNA (pSK/HPV16 získaný z American Type Culture Collection) za použití AmpliTaq DNA polymerasy (Perkin Elmer). Primer ve směru kodující sekvence (5' - AAC CCA GCT GCT AGC ATG CAT GGA GAT - 3') obsahoval NheI místo bezprostředně před ATG start kodonem, zatímco reversní primer (5' - AGC CAT GAA TTC TTA TGG TTT CTG - 3') obsahoval EcoRI místo ihned za TAA stop kodonem sekvence kodující E7. Produkt PCR byl tráven NheI a EcoRI, byl přečištěn z agarosového gelu a byl ligován do pET28a, který byl tráven stejnými restriktčními enzymy. Transformace bakterií, izolace kolonií obsahujících rekombinanty a příprava plasmidové DNA z expandovaných kolonií byly provedeny standardními způsoby. Viz, například, Ausubel et al., (vyd.), Short protocols in Molecular Biology, 3. vydání, (John Wiley and Sons, Inc., 1995). Identita výsledného plasmidového konstruktu, pET/E7 (H) byla potvrzena diagnostickým restriktčním trávením a analýzou DNA sekvence. Schematická mapa pET/E7 (H) je uvedena na obr. 9.

12 litrů 2xYT media obsahujícího 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu bylo inokulováno kulturou E: coli BL21 (DE3) obsahující pET/E7 (H) a byla provedena inkubace přes noc za provzdušňování. Po dosažení optické density 0,5 byla kultura indukována 0,5 mM IPTG po dobu 3 hodin. Buňky byly potom sklizeny centrifugací, byly resuspendovány ve 180 ml lyzačního pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mM 2-merkaptoethanol) doplněného 200 $\mu\text{g/ml}$ lysozymu a byly uskladněny při -70 °C přes noc. Buněčná suspenze se rozpustila ve

37 °C vodní lázni za přítomnosti 2 µg/ml aprotininu, 2 µg/ml leupeptinu a 2 µg/ml pepstatinu. Po přidání 2 mM PMSF se provedla důkladná sonikace buněčné suspenze a nerozpustné proteiny se získaly centrifugací. Proteinové pelety se dvakrát resuspendovaly v lyzačním pufru, znovu se sonikovaly a získaly centrifugací. Potom se proteinové pelety solubilizovaly sonikací v pufru A (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 M guanidiniumhydrochlorid, 1 mM 2-merkaptoethanol) a nerozpustný materiál se odstranil centrifugací. Solubilizované proteiny se aplikovaly do 50 ml Ni-chelační kolony (2,6 cm x 12 cm; Pharmacia), která byla uvedena do rovnováhy pufrům A. Navázaný protein se promyl 5 objemy lože pufru E (pufr A s 2% Triton X-100) a skládal se působením gradientu guanidiniumhydrochlorid-chlorid sodný (0,1M NaCl/6,0 guanidiniumhydrochlorid; 5 objemů lože) za přítomnosti 1% Triton X-100. Složený protein se promyl 5 objemy lože pufru F (30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 15% glycerol, 2% Triton X-100, 1 mM 2-merkaptoethanol) a potom 5 objemy lože pufru G (pufr F bez Triton X-100) pro odstranění Tritonu X-100. Kolona byla potom promyta 5 objemy lože pufru H (50 mM imidazol, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 15% glycerol, 1 mM 2-merkaptoethanol) pro odstranění slabě navázaných proteinů. E7 protein byl eluován lineárním imidazolovým gradientem 50 mM až 1 M imidazolu v pufru H). E7 protein byl koncentrován a dialyzován proti Dulbecco fosfatem pufrovanému salinickému roztoku doplněnému 25% glycerolem. Solubilní protein byl uskladněn při -70 °C. SDS-PAGE a barvením proteinu bylo zjištěno, že E7 přípravek je v podstatě homogenní.

Koncentrace endotoxinů v proteinových přípravcích byly hodnoceny "limulus amoebocytovým" testem a bylo zjištěno, že nejsou vyšší než 50 jednotek endotoxinu na mg proteinu.

Skupiny 5 C57BL/6 myši byly imunizovány injekcí při bazi ocasu, která obsahovala buď salinický roztok, nebo 0,055, 0,55 nebo 1,8

nmol E7 protein nebo Hsp65-E7 fúsního proteinu v salinickém roztoku. Objemy injekcí byly 0,2 ml. O den později byly od každého zvířete asepticky odebrány inguinální lymfatické uzliny (LN) a LN od pěti zvířat ve skupině byly shromážděny. Buněčné suspenze byly připraveny za použití standardních technik. Pro každý soubor buněk LN (2×10^6 buněk/ml) byly 96-jamkové ploty s oblým dnem osídleny 4×10^5 buňkami na jamku. Buňky byly testovány trojmo na proliferativní odpověď na přidání buď media, 10 nebo 50 $\mu\text{g/ml}$ E7 proteinu, 10 nebo 100 $\mu\text{g/ml}$ Hsp65-E7 fúsního proteinu nebo 1 nebo 10 $\mu\text{g/ml}$ E7 peptidu ("pep": zbytky 44-57). Po přidání byly buňky inkubovány po dobu 4 dnů při 37 °C a 5% CO_2 . Do každé kultury byl přidán tritiovaný thymidin (1 μCi). Po 15 hodinové inkubaci byly buňky sklizeny a připraveny pro scintilační vyšetření. Data na obr. 10 jsou uvedena jako průměrné cpm inkorporované radioaktivity $\pm$ standardní odchylka.

Jiné panely ukazují testy s LN buňkami od zvířat imunizovaných různým množstvím Hsp65-E7 fúsního proteinu nebo E7 proteinu, jak bylo uvedeno výše. Výsledky ukazují, že imunizace Hsp65-E7 fúsním proteinem indukuje buněčnou imunitu k fúsnímu proteinu samotnému (horní a střední levý), stejně jako k E7 proteinu (střední levý). Rozpoznávání E7 proteinu je dále demonstrováno pozorovanou indukcí proliferace E7 peptidem, o kterém je známo, že představuje epitop T-helper buněk (střední levý). Naopak, žádné proliferativní odpovědi nebyly pozorovány u LN buněk od zvířat imunizovaných různými množstvími E7 proteinu (střední pravý a dolní) nebo od zvířat falešně imunizovaných salinickým roztokem. Buňky připravené ze zvířat imunizovaných E7 proteinem byly životaschopné, jak je dokázáno jejich schopností proliferovat v odpovědi na mitogen T buněk - ConA. Závěrem, při srovnání s imunizací E7 vyvolává imunizace Hsp65-E7 fúsním proteinem lepší buněčnou imunitní odpověď na E7, jak je testováno proliferací LN buněk od imunizovaných zvířat.

Příklad 10: Léčba Hsp65-E7 fúsním proteinem způsobuje regresí
měřitelných, pokročilých nádorů

Pro testování účinnosti Hsp65-E7 fúsního proteinu v protinádorové terapii byly C57/Bl/6 myši inokulovány $1,3 \times 10^5$ TC-1 nádorových buněk podkožní injekcí do vyholené oblasti krku. Po sedmi dnech, když se u zvířat vyvinuly palpovatelné, měřitelné nádory, se zvířata náhodně rozdělila do třech skupin. Každá skupina byla tvořena 12-14 zvířaty. Všechny terapie byly podávány podkožní injekcí objemu 0,2 ml v oblasti šíje. První skupině bylo podáno 100 μg Hsp65-E7 fúsního proteinu, druhé skupině bylo podáno 20 μg E7 proteinu (což odpovídá 100 μg fúsního proteinu) a třetí skupině byl podán salinický roztok. Od prvního dne po inokulaci byly myši sledovány vizuálně a palpací na přítomnost nádoru. Objemy nádorů byly určovány za použití kaliperů ve dvou ortogonálních rovinách. Z těchto měření byly vypočítány objemy nádorů pomocí konverzní rovnice, kterou popsali Naito et al., Cancer Res. 46: 4109 (1986). Výsledky jsou uvedeny na obr. 11 jako průměrný objem nádorů v každé skupině $\pm$ standardní odchylka.

Výsledky demonstrují, že léčba Hsp65-E7 fúsním proteinem vede ke kompletní regresí měřitelných, pokročilých nádorů. Účinek se projevil u každého testovaného zvířete. Naopak, ani falešná léčba, ani léčba E7 nezpůsobily více než přechodnou regresí nádorů. Statistické hodnocení měření nádorů, provedené ve třech dalších dobách pokusu, je uvedeno v tabulce 2. Jak je zřejmé z vypočítaných hodnot p , jsou účinky léčby Hsp65-E7 fúsním proteinem na velikost nádorů statisticky odlišné od účinků jiných způsobů léčby.

Tabulka 2: Statistické srovnání léčebných skupin

Srovnání	Den měření	hodnota p
Salinický roztok vs.	30	0,048
Hsp65-E7	33	0,079
	35	0,046
Salinický roztok vs.	30	0,853
E7	33	1,0
	35	0,86

Je třeba si uvědomit, že v předchozích příkladech byl Hsp65-E7 protein produkován jako protein opatřený histidinovou koncovkou. Pro jednoznačné prokázání toho, že pozorované terapeutické účinky nesouvisí žádným způsobem s přítomností oligohistidinové sekvence ve fúsním proteinu byl připraven Hsp65-E7 fúsní protein bez histidinové koncovky a byl použit v tomto příkladu. Fúsní protein byl získán následujícím způsobem.

Pro konstrukci plasmidu ET65C (obr. 12) byl hsp65 gen *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) amplifikován z plasmidu RIB 1300 (Van Eden et al., Nature 331: 171, 1988) za použití AmpliTaq DNA polymerasy (Perkin Elmer). Primer ve směru kodující sekvence (5'- TTC GCC ATG GCC AAG ACA ATT GCG - 3') obsahoval *NheI* místo, které obsahovalo ATG start kodon hsp65 genu a reversní primer (5' - CGC TCG GAC GCT AGC TCA CAT ATG GAA ATC CAT GCC - 3') obsahoval *NdeI* místo ihned za TGA stop kodonem sekvence kodující Hsp65 a *NheI* místo ihned potom. Produkt PCR byl tráven *NcoI* a *NheI*, byl přečištěn z agarosového gelu a byl ligován do pET28a, který byl tráven stejnými restrikcčními enzymy. Ligační směs byla transformována do *E.coli* DH5 α a kolonie resistantní na

antibiotika byly izolovány a amplifikovány pro přípravu plasmidové DNA. Plasmid ET65C byl identifikován diagnostickým restrikčním trávením a analýzou DNA sekvence.

Pro přípravu plasmidu ET65C/E7-1N obsahujícího gen pro fúsní protein Hsp65-E7 bez koncové smyčky byl E7 gen amplifikován z z HPV 16 genomové DNA (pSK/HPV16 získaný z American Type Culture Collection) za použití AmpliTaq DNA polymerasy (Perkin Elmer). Primer ve směru kodující sekvence (5'- CCA GCT GTA CAT ATG CAT GGA GAT - 3') obsahoval NdeI místo, které zahrnovalo ATG start kodon, zatímco reversní primer (5' - AGC CAT GAA TTC TTA TGG TTT CTG - 3') obsahoval EcoRI místo ihned za TAA stop kodonem sekvence kodující E7. Produkt PCR byl tráven NdeI a EcoRI, byl přečištěn z agarosového gelu a byl ligován do pET65c, který byl tráven stejnými restrikčními enzymy. Transformace bakterií, izolace kolonií obsahujících rekombinanty a příprava plasmidové DNA z expandovaných kolonií byly provedeny standardními způsoby. Viz, například, Ausubel et al., (vyd.), Short protocols in Molecular Biology, 3. vydání, (John Wiley and Sons, Inc., 1995). Identita výsledného plasmidového konstruktu, pET65C/E7-1N byla potvrzena diagnostickým restrikčním trávením a analýzou DNA sekvence. Schematická mapa pET65C/E7-1N je uvedena na obr. 13.

12 litrů 2xYT media obsahujícího 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinu bylo inokulováno kulturou E: coli BL21 (DE3) obsahující pET65C/E7-1N a byla provedena inkubace přes noc za provzdušňování. Po dosažení optické density 0,5 byla kultura indukována 0,5 mM IPTG po dobu 3 hodin. Buňky byly potom sklizeny centrifugací, byly resuspendovány ve 180 ml lyzačního pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 mM 2-merkaptoethanol) doplněného 200 $\mu\text{g/ml}$ lysozymu a byly uskladněny při -70 °C přes noc. Buněčná suspenze se rozpustila ve 37 °C vodní lázni za přítomnosti 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotininu, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptinu a 2 $\mu\text{g/ml}$ pepstatinu. Po přidání

2 mM PMSF se provedla důkladná sonikace buněčné suspenze a nerozpustné proteiny se získaly centrifugací. Většina Hsp65-E7 proteinu bez smyčky byla nalezena v solubilní proteinové frakci. Pro odstranění endotoxinu se k frakci solubilního proteinu přidal 1% Triton X-114 a směs se ochladila na ledu (během 5 nebo více minut) a důkladně se promísila. Směs se potom zahřívala po dobu 10 minut ve vodní lázni o teplotě 30 °C a potom se provedla centrifugace při 24 °C. Čirý supernatant (horní vrstva) se přenesl do nové zkumavky. Centrifugace se opakovala 3-6-krát pro odstranění residuálního Tritonu X-114. Supernatant se potom frakcionoval síranem amonným. Fúsní protein se získal ve frakci 0-15% síranu amonného (hmot./obj.). Vysrážený protein se potom rozpustil v pufru B (30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 3 M močovina, 1 mM EDTA, 1 mM 2-merkapttoethanol) a aplikoval se do 170 ml Source Q kolony (3,5 x 20 cm; Pharmacia) předem uvedené do rovnováhy pufrům B. Kolona byla promyta 3 objemy lože pufru C (pufr B minus močovina) a potom 3 objemy lože pufru D (pufr C doplněný 250 mM NaCl). Fúsní protein se eluoval lineárním solným gradientem (250 mM - 1 M NaCl v pufru C) (půl A) a potom 6 M guanidiniumhydrochloridem (pufr A (půl B)). Půl B se aplikoval do Ni-chelační kolony (2,6 cm x 12 cm; Pharmacia), která byla uvedena do rovnováhy pufrům A. Navázaný protein se promyl 5 objemy lože pufru E (pufr A s 2% Triton X-100) a skládal se působením gradientu guanidiniumhydrochlorid-chlorid sodný (0,1M NaCl/6,0 guanidiniumhydrochlorid; 5 objemů lože) za přítomnosti 1% Triton X-100. Složený protein se promyl 5 objemy lože pufru F (30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 15% glycerol, 2% Triton X-100, 1 mM 2-merkapttoethanol) a potom 5 objemy lože pufru G (pufr F bez Triton X-100) pro odstranění Tritonu X-100. Kolona byla potom promyta 5 objemy lože pufru H (50 mM imidazol, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 15% glycerol, 1 mM 2-merkapttoethanol) pro odstranění slabě navázaných proteinů. Fúsní protein byl eluován lineárním imidazolovým gradientem 50 mM až 1 M imidazolu v pufru

Jako další důkaz nevýznamnosti histidinové koncové smyčky byly přímo srovnávány účinnosti Hsp65-E7 obsahujícího smyčku a neobsahujícího smyčku v pokusu v podstatě stejném, jako je výše popsáný pokus. Bylo zjištěno, že tyto dva proteiny mají stejnou účinnost na regresí nádorů.

PETER KALINSKY
ATTORNEY AT LAW



P a t e n t o v é n á r o k y

1. Prostředek pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje proteinový antigen HPV navázaný na stresový protein.
2. Prostředek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní odpověď je buněčná imunitní odpověď.
3. Prostředek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein je mykobakteriální stresový protein.
4. Prostředek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinový antigen HPV je E6 nebo E7 protein.
5. Prostředek podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein pochází z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.
6. Prostředek pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje proteinový antigen HPV konjugovaný na stresový protein.
7. Prostředek podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní odpověď je buněčná imunitní odpověď.
8. Prostředek podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein je mykobakteriální stresový protein.
9. Prostředek podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinový antigen HPV je E6 nebo E7 protein.
10. Prostředek podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein pochází z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.

11. Prostředek pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje fúsní protein složený z proteinového antigenu HPV fúsovaného na stresový protein.
12. Prostředek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní odpověď je buněčná imunitní odpověď.
13. Prostředek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein je mykobakteriální stresový protein.
14. Prostředek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinový antigen HPV je E6 nebo E7 protein.
15. Prostředek podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein pochází z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.
16. Prostředek obsahující proteinový antigen HPV navázaný na stresový protein v kombinaci s jinou farmakologicky přijatelnou složkou.
17. Prostředek podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein je mykobakteriální stresový protein.
18. Prostředek podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinový antigen HPV je E6 nebo E7 protein.
19. Prostředek podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein pochází z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.
20. Konjugat v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje proteinový antigen HPV konjugovaný na stresový protein.

21. Konjugat podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein je mykobakteriální stresový protein.
22. Konjugat podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že proteinový antigen HPV je E6 nebo E7 protein.
23. Konjugat podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že stresový protein pochází z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.
24. Fúsní protein složený z proteinového antigenu HPV fúsovaného na stresový protein.
25. Fúsní protein podle nároku 24, ve kterém je stresovým proteinem mykobakteriální stresový protein.
26. Fúsní protein podle nároku 24, ve kterém je proteinovým antigenem HPV E6 nebo E7 protein.
27. Fúsní protein podle nároku 24, ve kterém pochází stresový protein z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.
28. Fúsní protein podle nároku 24, ve kterém je proteinovým antigenem HPV E6 nebo E7 protein a stresový protein pochází z Hsp60 nebo Hsp70 rodiny.
29. Prostředek pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresní vektor kodující a řídí expresi fúsního proteinu podle nároku 24 v buňkách jedince.
30. Prostředek podle nároku 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní odpověď je buněčná imunitní odpověď.

31. Prostředek pro indukci imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresní vektor kodující a řídící expresi fúsního proteinu podle nároku 28 v buňkách jedince.

32. Prostředek podle nároku 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunitní odpověď je buněčná imunitní odpověď.

33. Expresní vektor kodující a řídící expresi fúsního proteinu podle nároku 24 v buňkách jedince.

34. Expresní vektor kodující a řídící expresi fúsního proteinu podle nároku 28 v buňkách jedince.

35. Způsob indukce imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství expresního vektoru podle nároku 33 jedinci.

36. Způsob indukce imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství expresního vektoru podle nároku 34 jedinci.

37. Způsob indukce imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství prostředku podle nároku 16 jedinci.

38. Způsob indukce imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství konjugatu podle nároku 20 jedinci.

39. Způsob indukce imunitní odpovědi proti proteinovému antigenu HPV v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství fúsního proteinu podle nároku 24 jedinci.

40. Způsob léčby nádorů exprimujících proteinový antigen HPV
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání
účinného množství expresního vektoru podle nároku 33 jedinci.
41. Způsob léčby nádorů exprimujících proteinový antigen HPV
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání
účinného množství expresního vektoru podle nároku 34 jedinci.
42. Způsob léčby nádorů exprimujících proteinový antigen HPV
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání
účinného množství prostředku podle nároku 16 jedinci.
43. Způsob léčby nádorů exprimujících proteinový antigen HPV
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání
účinného množství konjugatu podle nároku 20 jedinci.
44. Způsob léčby nádorů exprimujících proteinový antigen HPV
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání
účinného množství fúsního proteinu podle nároku 24 jedinci.

PETE KALINSKY
ATTORNEY AT LAW



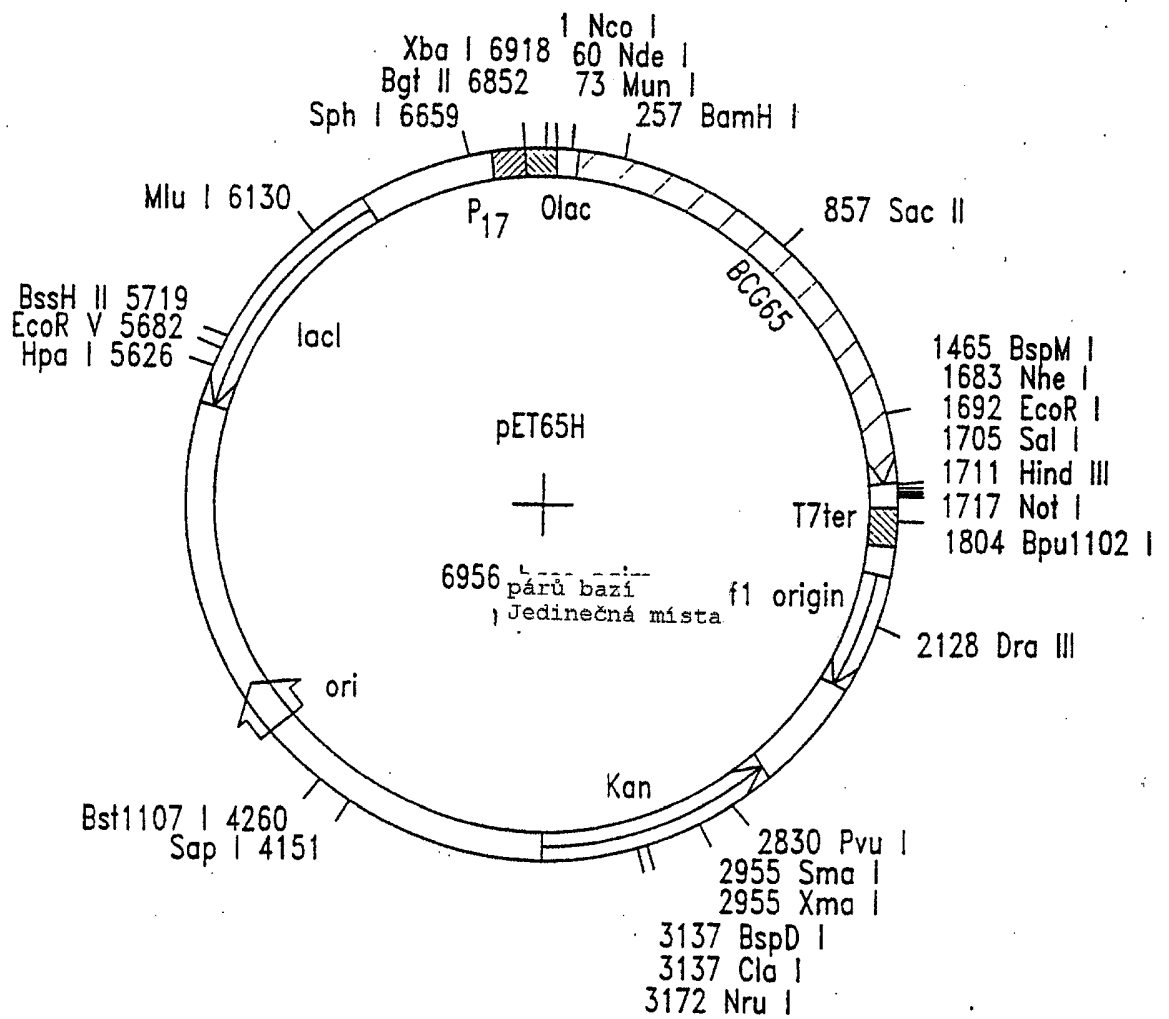
PROF. DR. JAROMÍR DVOŘÁK
VÝVOJ A VÝROBA VAKCÍN
P. O. BOX 100
120 00 Praha 2, PRAHA 2
Czech Republic

10.07.00

1/13

PV 6000 - 412

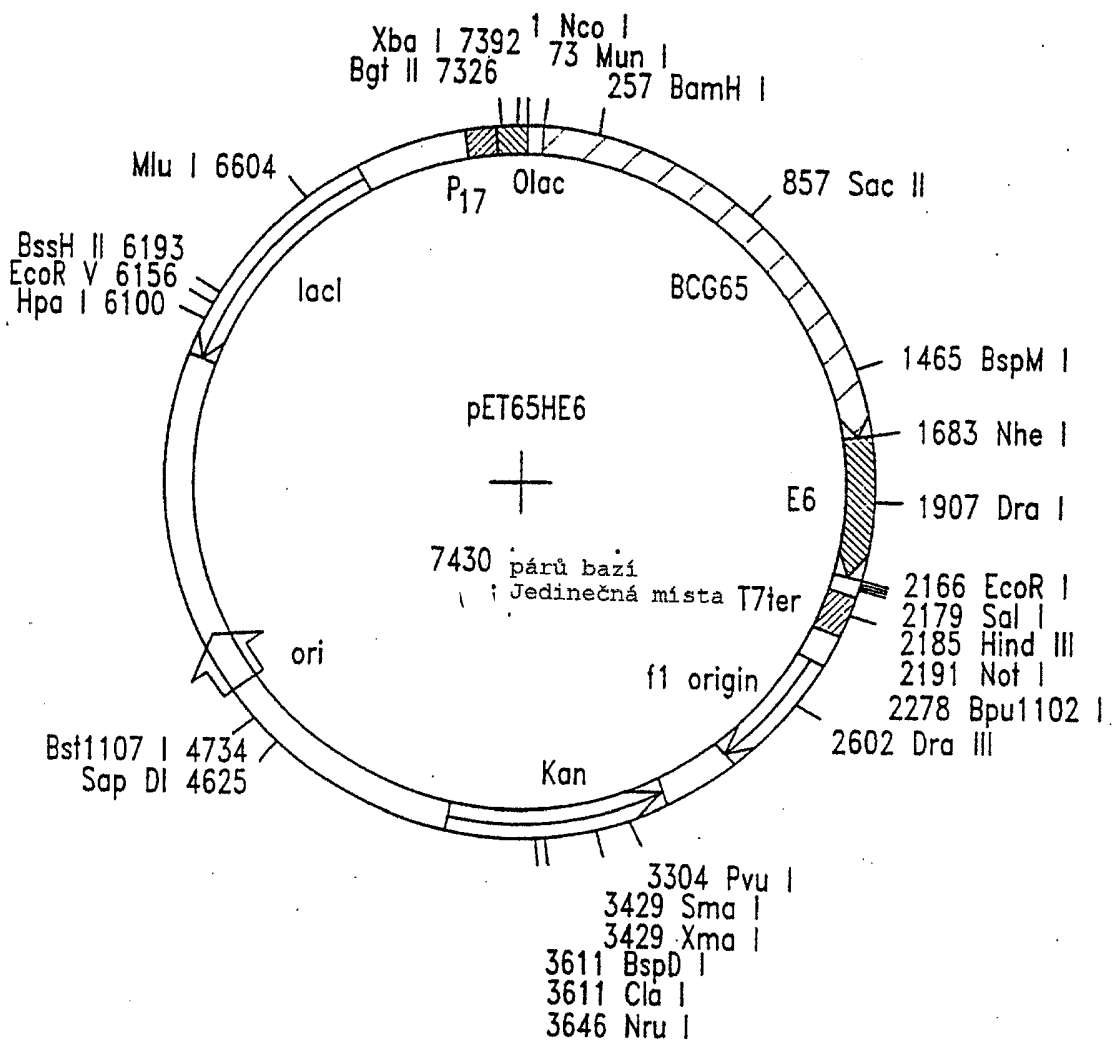
~~49470~~



Obr. 1

ATTORNEY AT LAW

[Handwritten signature]

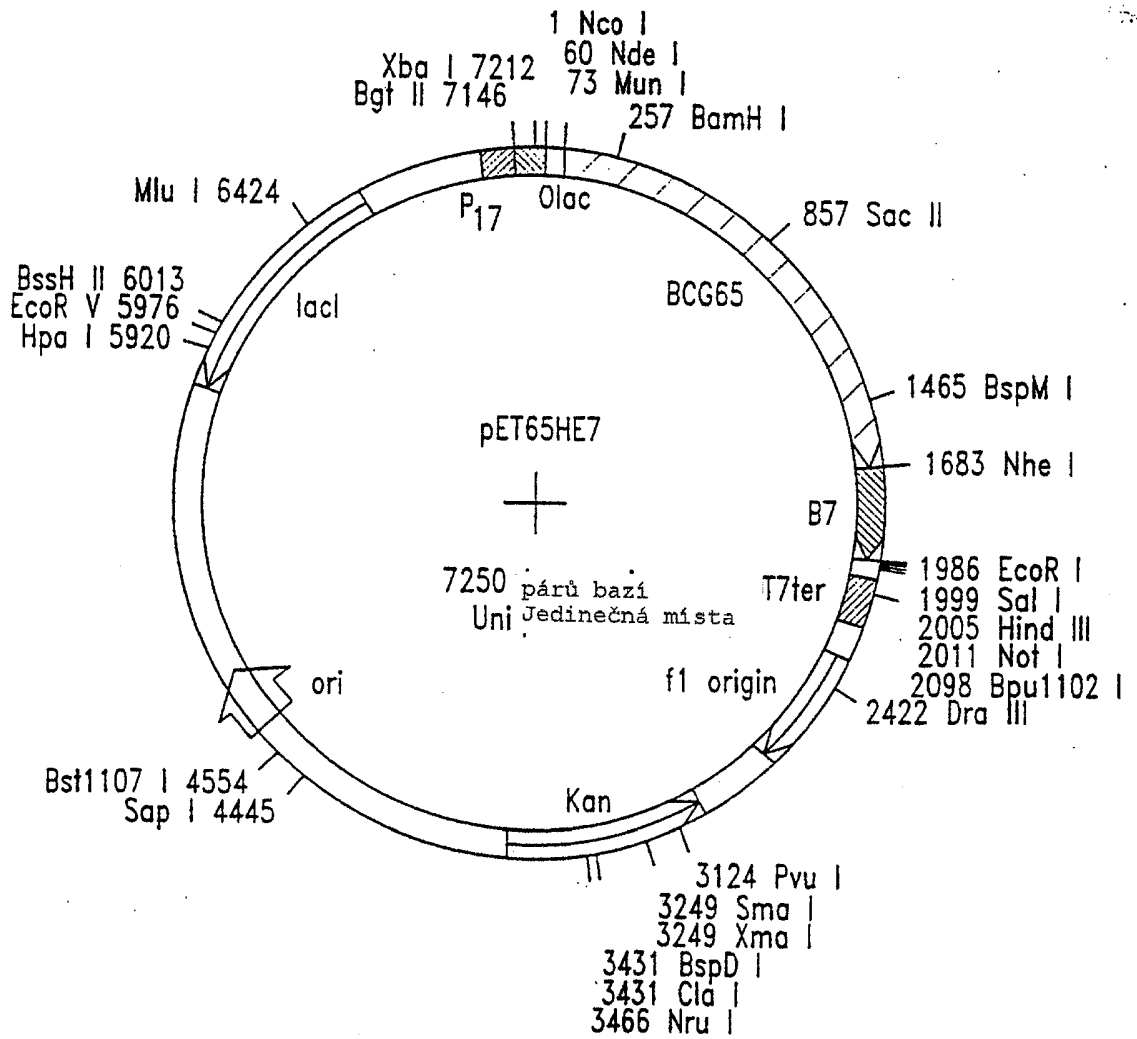


Obr. 2

ATTOHNEAL 12/00

10.07.00

3/13



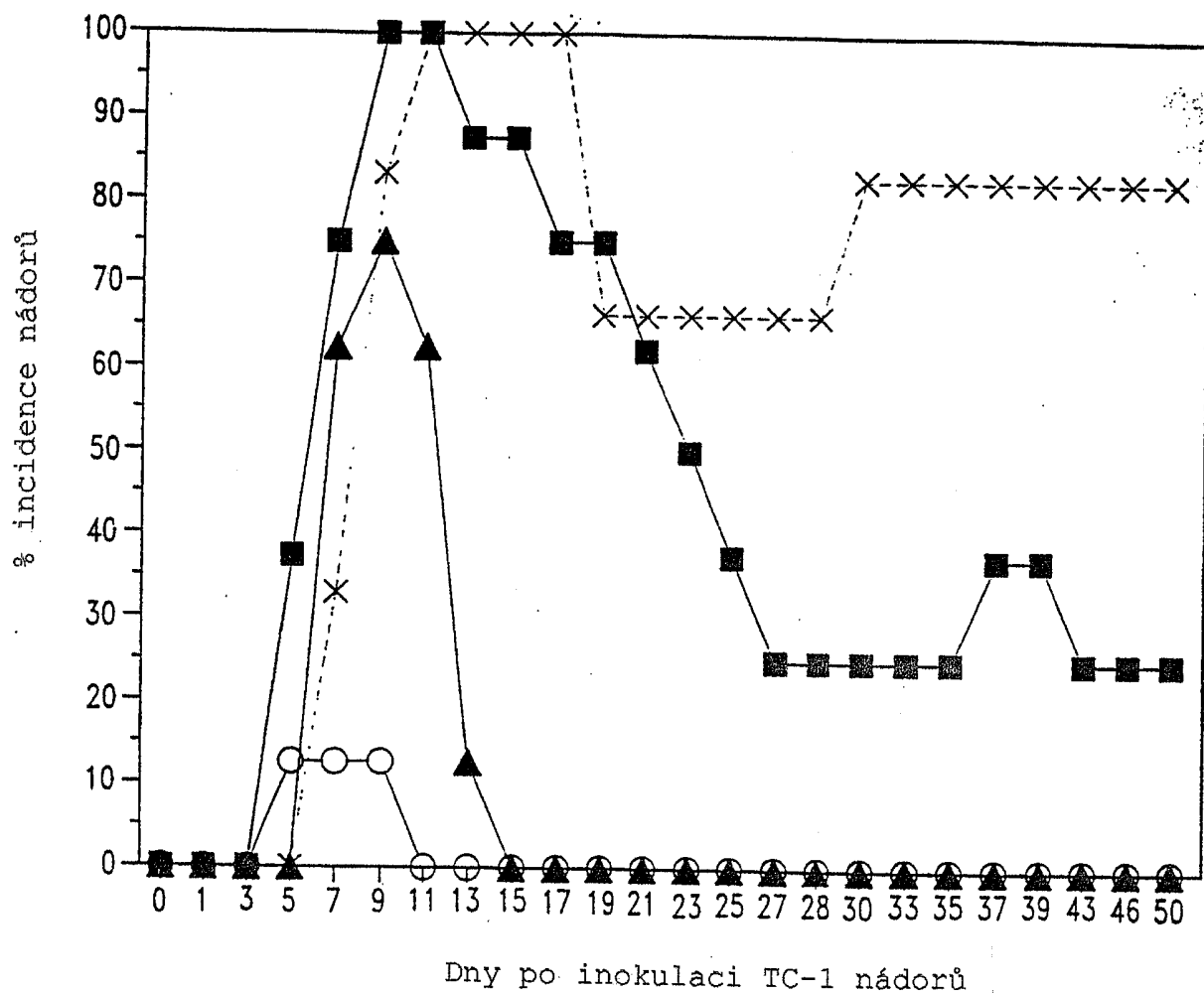
Obr. 3

PROF. KALINICKÝ
ATTORNEY AT LAW

[Handwritten signature]

10.07.00

4/13



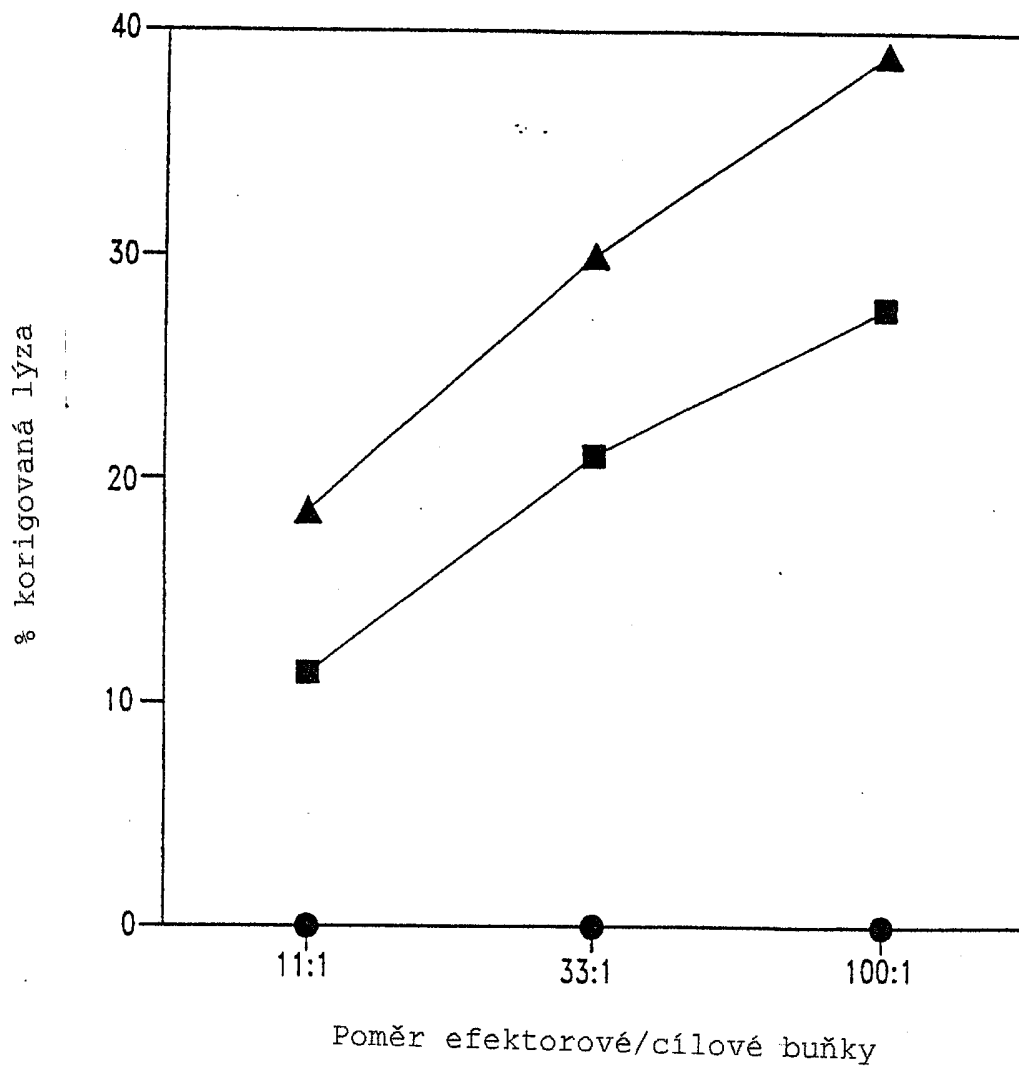
- ▲— 10 ug Hsp65-E6 + 10 ug Hsp65-E7
- 100 ug Hsp65-E6 + 100 ug Hsp 65-E7
- 100 ug peptid/IFA
- X-- Salinický roztok/IFA

EDITH KALENICKY
ATTORNEY-AT-LAW

Obr. 4

10.07.00

5/13



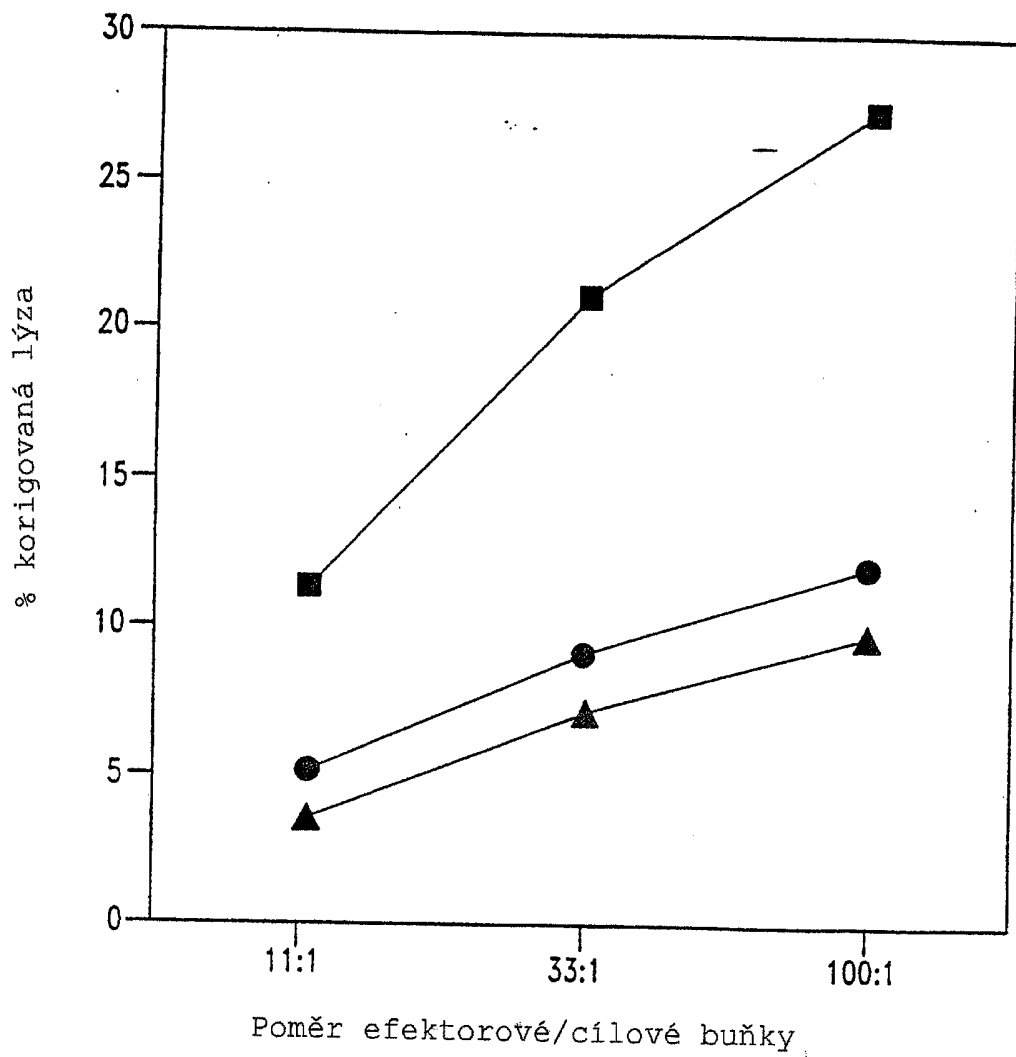
- 10 ug Hsp65-E6 + 10 ug Hsp65-E7
- ▲ 100 ug Hsp65-E6 + 100 ug Hsp 65-E7
- neimunizované

Obr. 5

PETER KALENSKY
ATTORNEY AT LAW

10.07.00

6/13



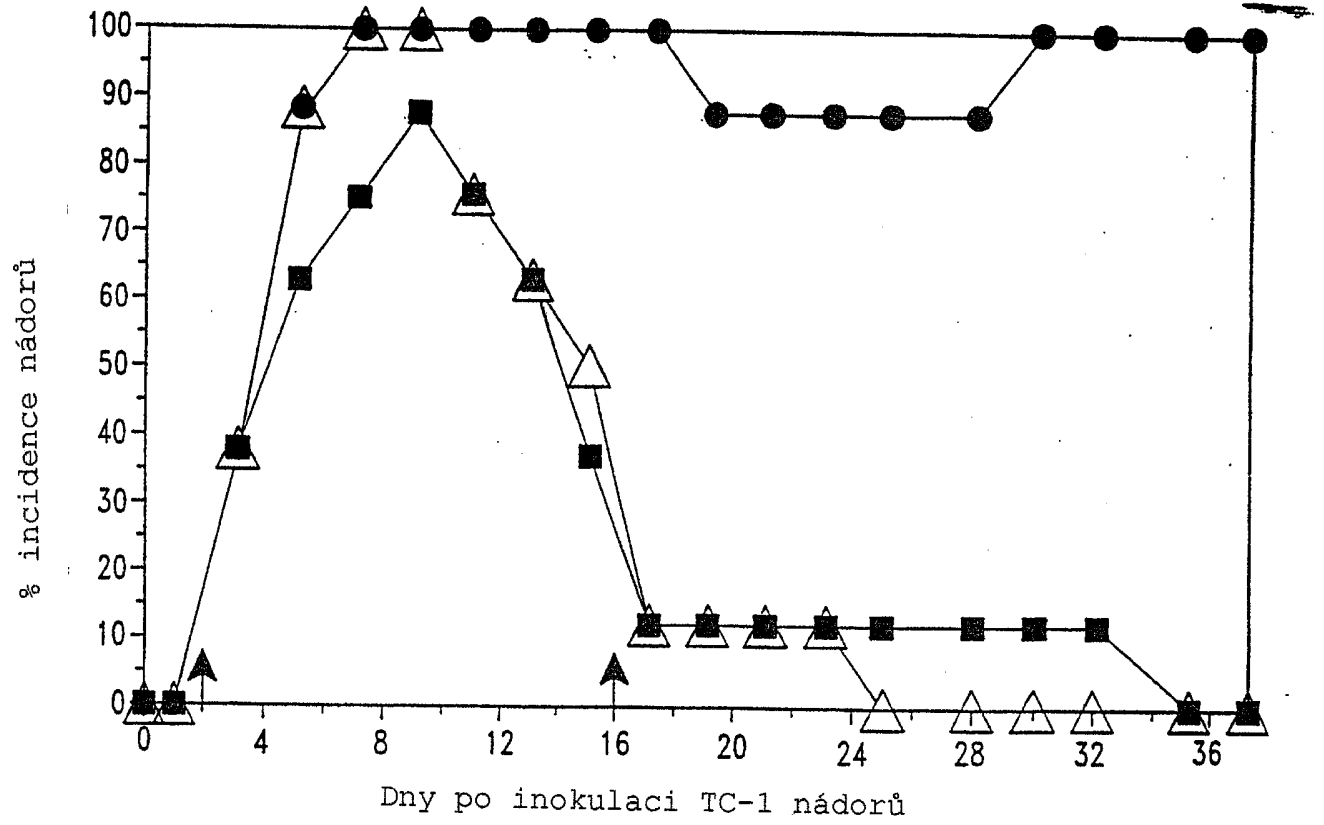
■ TC-1
▲ NP-EL4
● MC57

Obr. 6

DEEVA KALENKOVA
ATTORNEY AT LAW

10.07.00

7/13



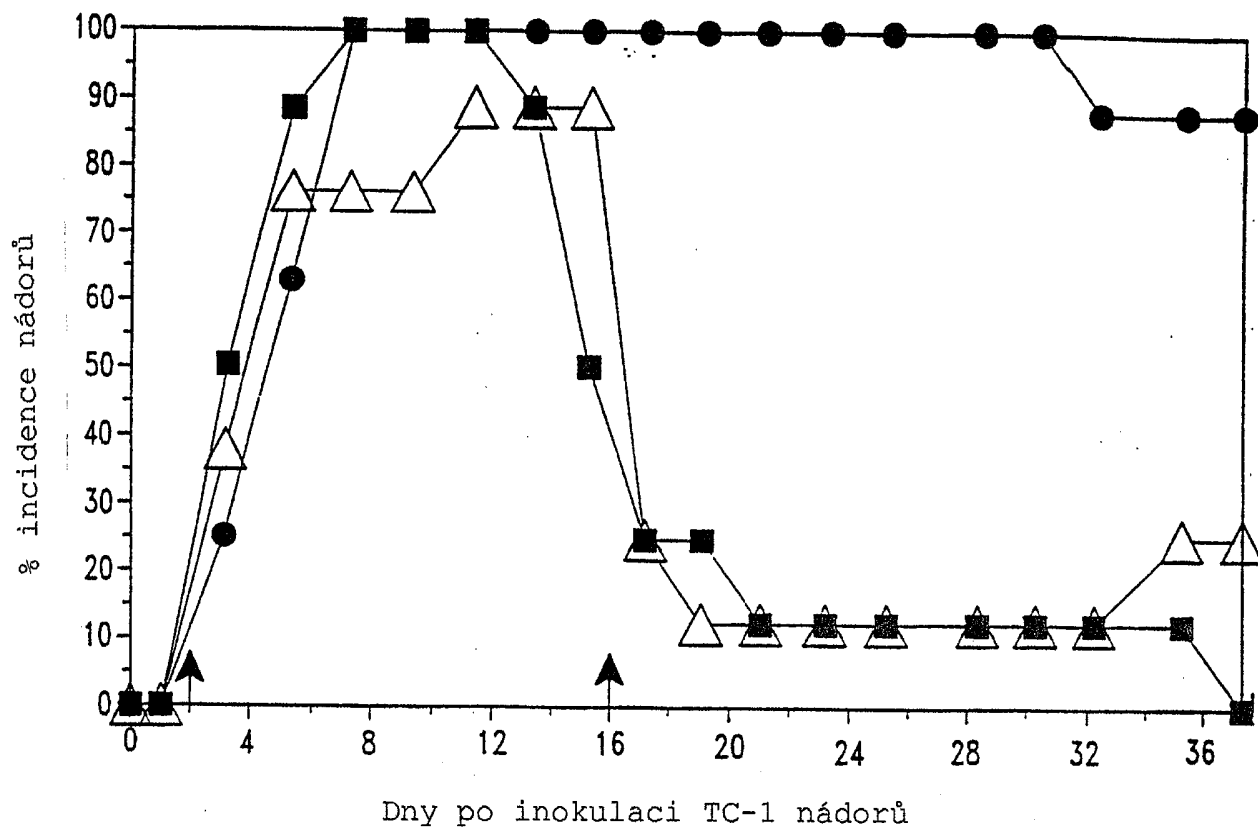
- △ 100 µg peptid/IFA
- 100 µg Hsp65-E7
- Salinický roztok

Obr. 7

JOSEF KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW

10.07.00

8/13



- △ 100 µg peptid/IFA
- 100 µg Hsp65-E7
- Salinický roztok

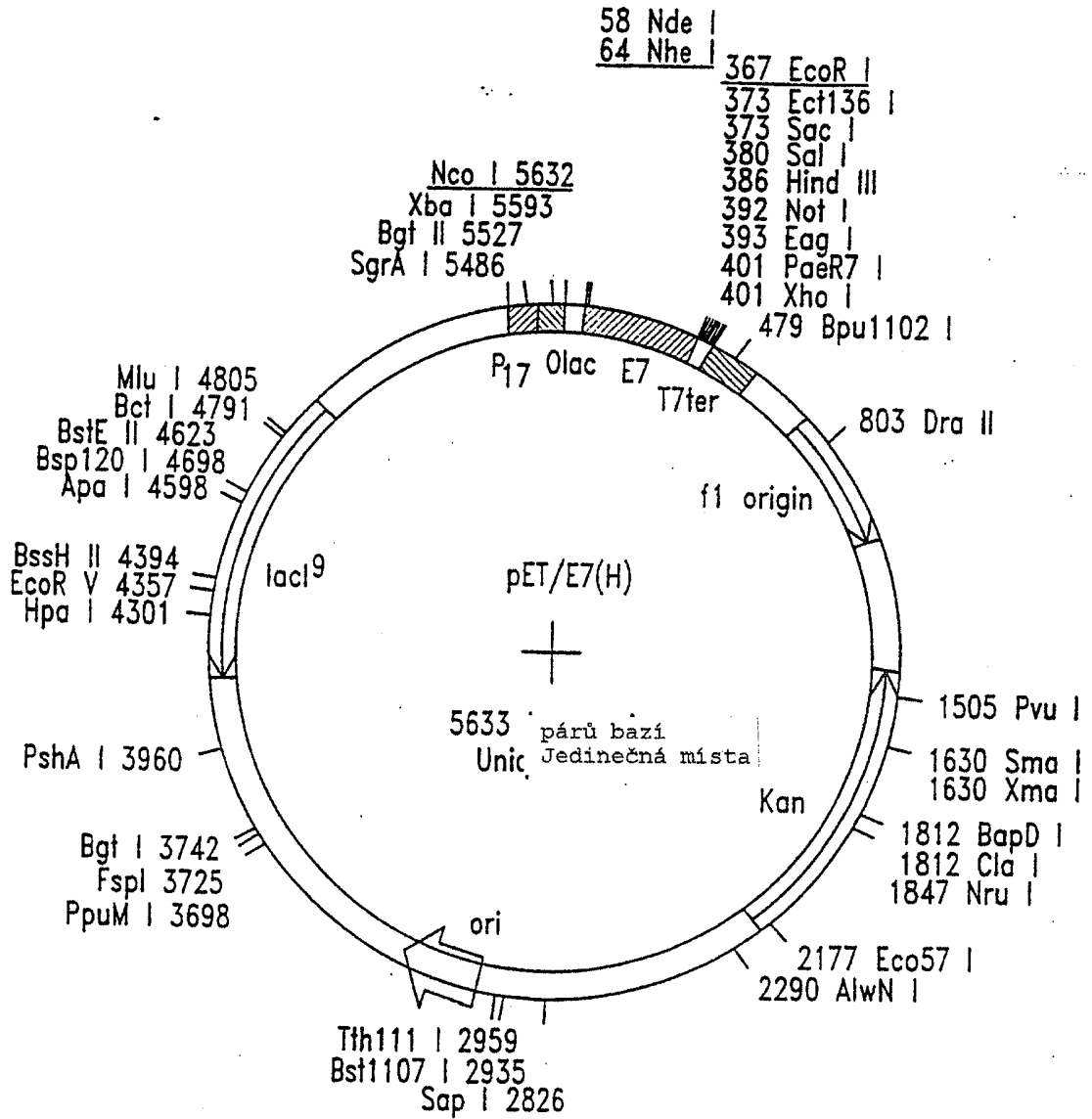
Obr. 8

DR. J. KALICKÝ
ATTORNEY AT LAW

[Handwritten signature]

10.07.00

9/13



PETER KALENCKÝ
ATTORNEY AT LAW

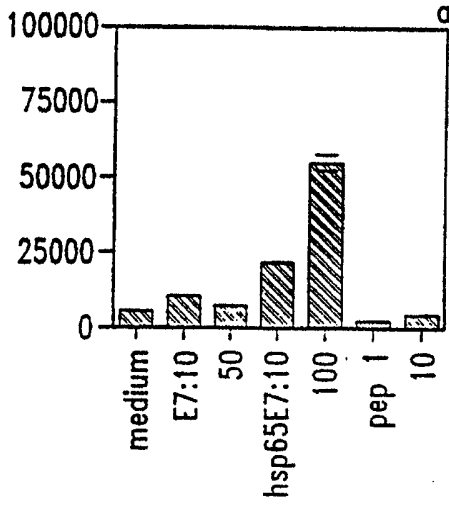
[Handwritten signature]

10.07.00

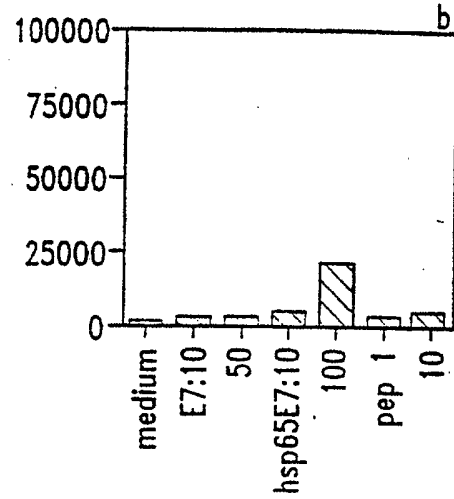
10/13

Inkorporace 3-H thymidinu (cpm)

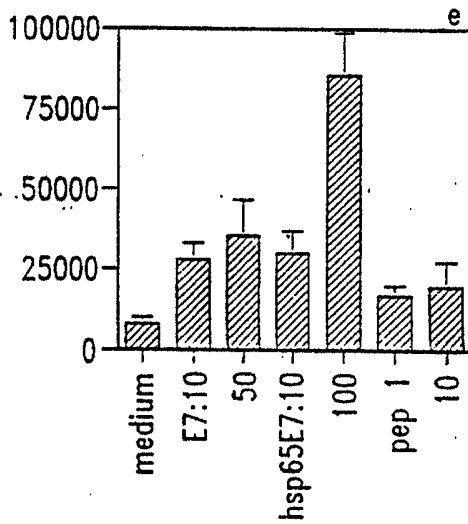
hsp65E7:3ug (0.055 nmoi E7)



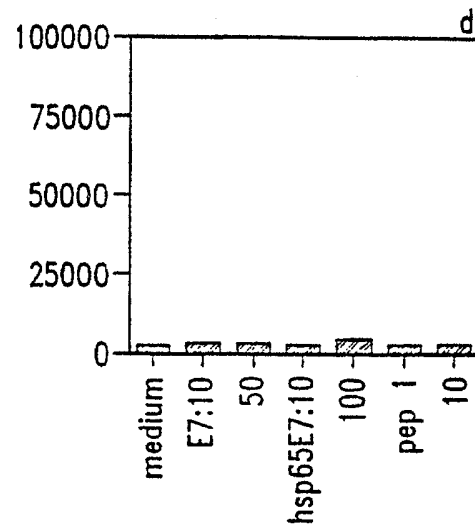
hsp65E7:30ug (0.55 nmoi E7)



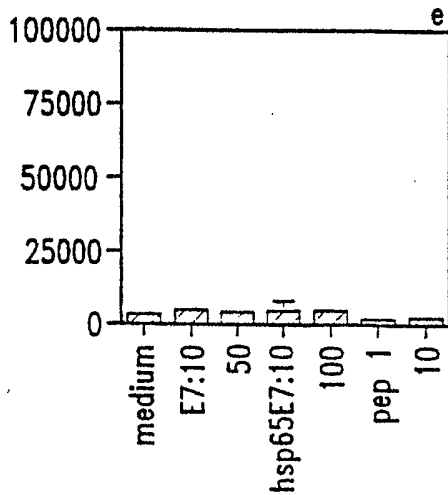
hsp65E7:100ug (1.8 nmoi E7)



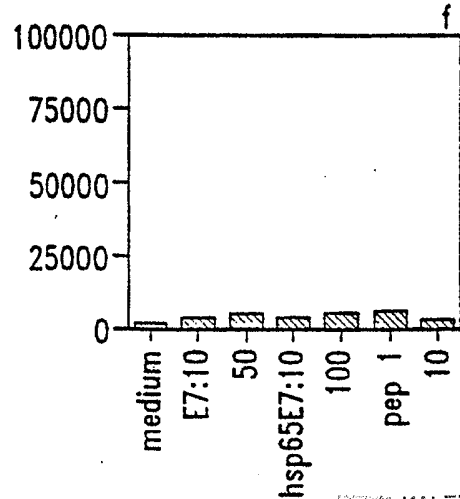
E7:0.055 nmoi



E7:0.55 nmoi

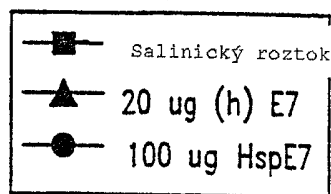
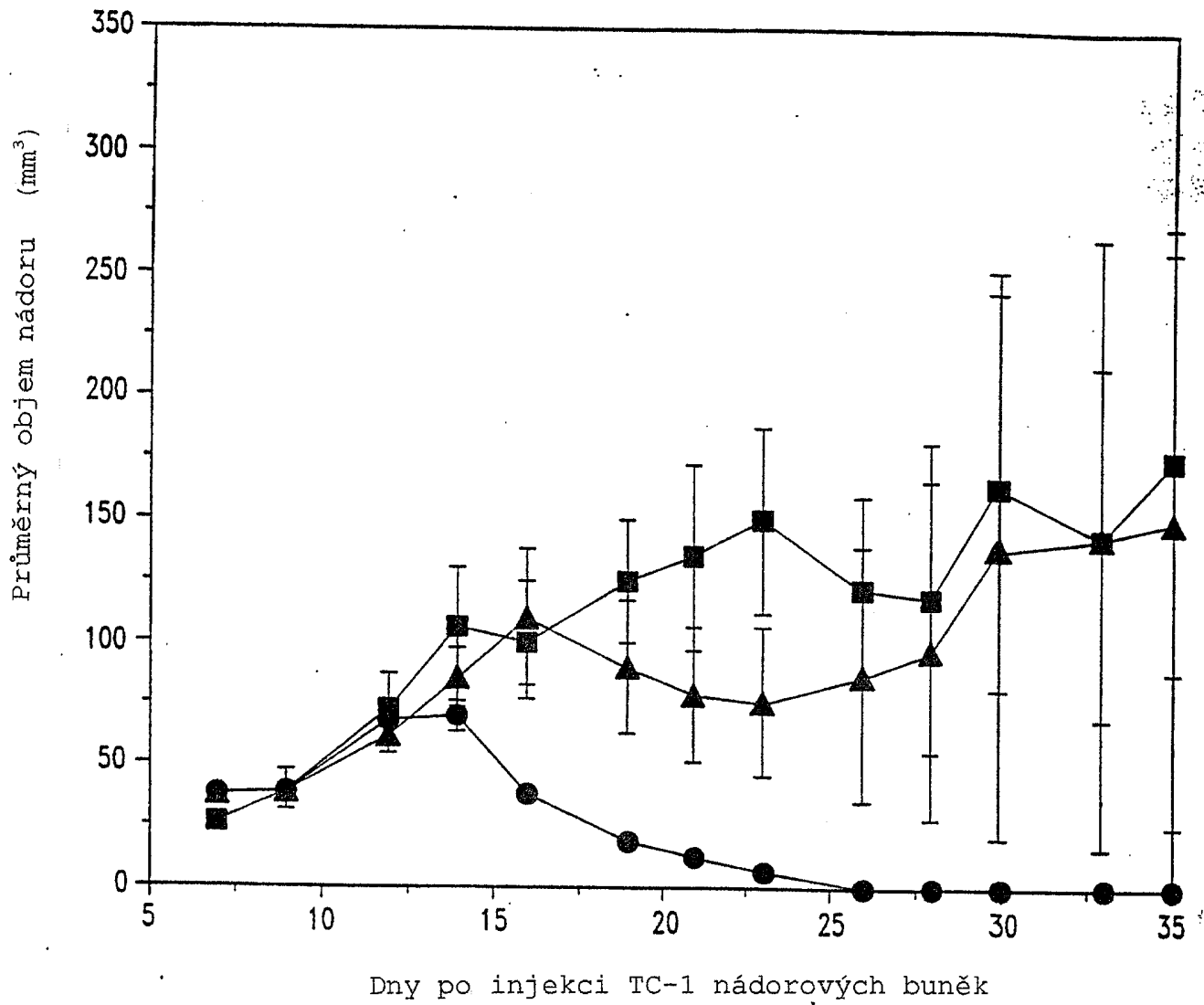


E7:1.8 nmoi



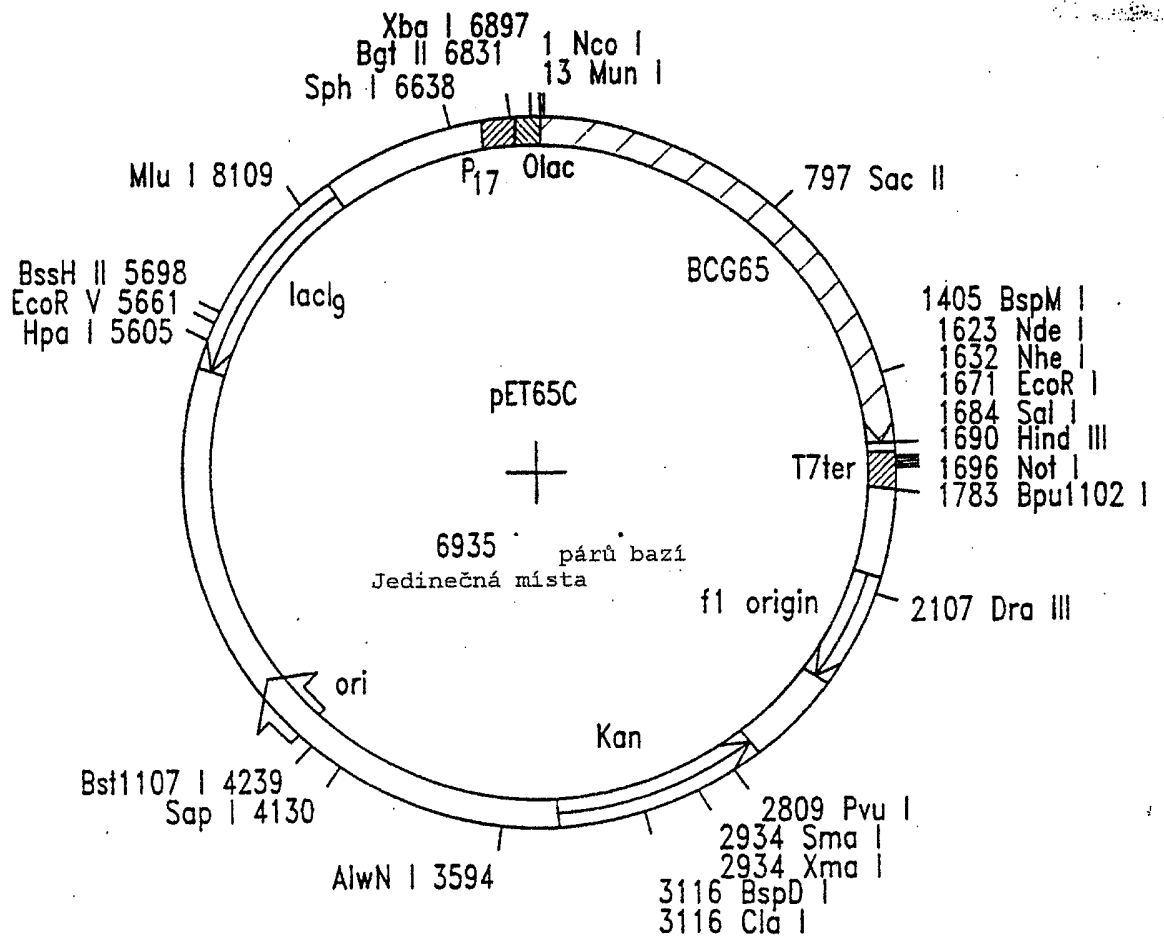
10.07.00

11/13



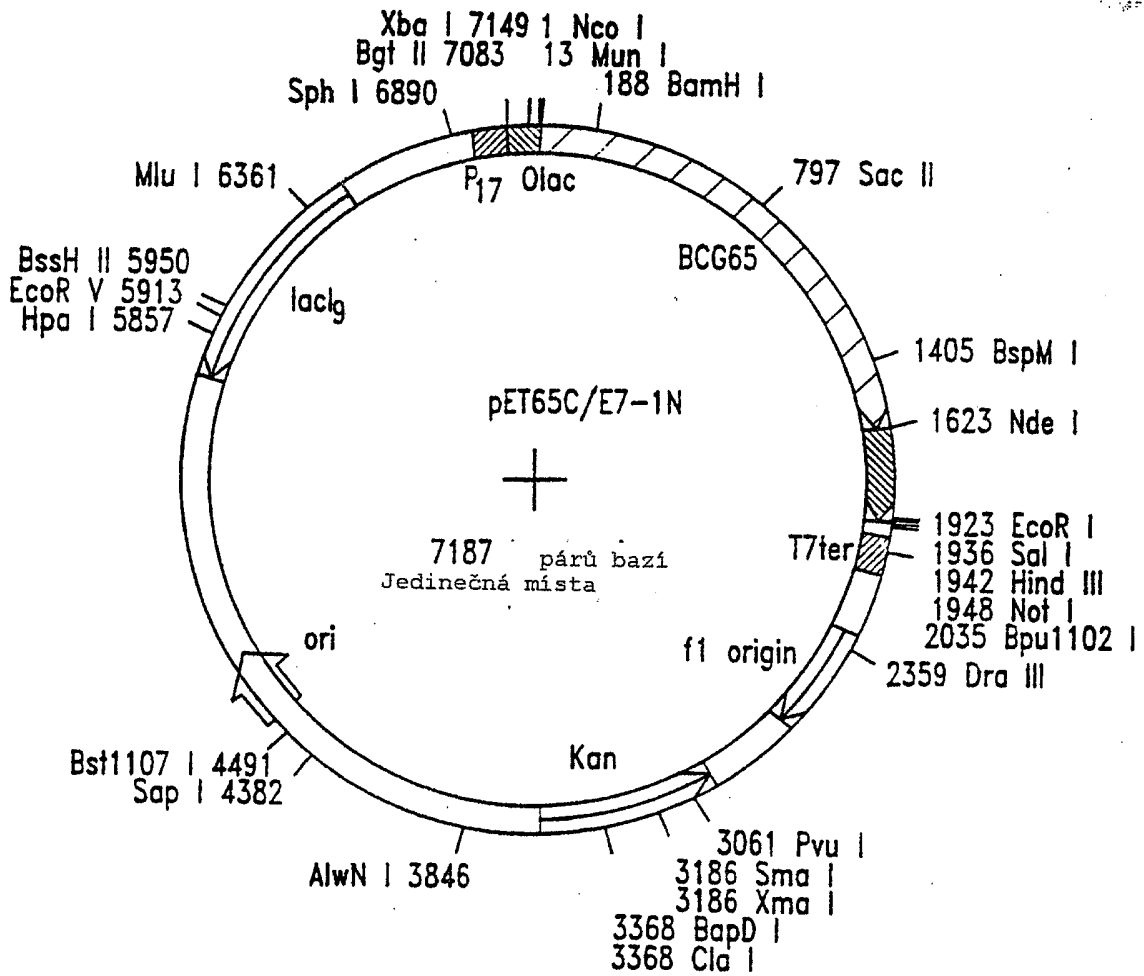
10.07.00

12/13



PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW

Obr. 12



PETR KALENSKY
ATTORNEY AT LAW