

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

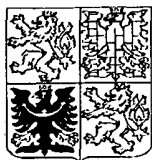
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3096-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



(22) Přihlášeno: **28. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **31.03.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/414417**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 01. 98**
(Věstník č. 1/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/01689**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/30514**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/12
C 12 N 15/86
C 07 K 14/71

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(71) Přihlašovatel:

UNIVERSITY OF WASHINGTON, Seattle,
WA, US;

(72) Původce:

Cheever Martin A., Mercer Island, WA, US;
Disis Mary L., Renton, WA, US;

(74) Zástupce:

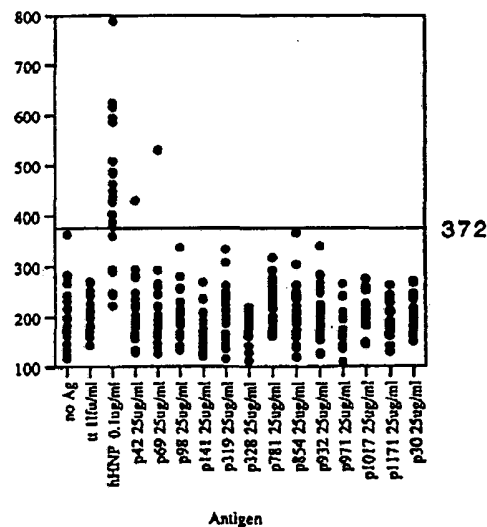
Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Intracelulární doména HER-2/neu prote-
inu pro ochranu před malignitami a pro
léčbu malignit.**

(57) Anotace:

Jsou popsány sloučeniny a kompozice pro vy-
volání nebo posílení imunitní reaktivity na
Her-2/neu protein. Sloučeniny zahrnují poly-
peptidy a molekuly nukleové kyseliny kodující
takové peptidy. Sloučeniny mohou být použi-
ty pro prevenci nebo léčbu malignit, se který-
mi je HER-2/neu onkogen asociován.



CZ 3096-97 A3

21.10.97

Intracelulární doména HER-2/neu proteinu pro ochranu před malignitami a pro léčbu malignit

Oblast techniky

Předkládaný vynález je obecně zaměřen na polypeptidy a nukleové kyseliny, kodující takové polypeptidy, pro zvýšení nebo posílení imunitní odpovědi na HER-2/neu protein, včetně jejich použití pro léčbu malignit, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

Dosavadní stav techniky

Vzhledem k enormním investicím finančním a lidským zůstávají nádory vedoucí příčinou úmrtí. Například, nádory jsou vedoucí příčinou úmrtí žen ve věku od 35 do 74 let. Rakovina prsu je nejčastější malignitou u žen a incidence vzniku karcinomu prsu vzrůstá. U jedné z deseti žen bude diagnostikováno onemocnění. Standardní přístupy pro léčbu rakoviny prsu jsou zaměřeny na kombinaci chirurgie, radioterapie a chemoterapie. Tyto přístupy vedly k určitým dramatickým úspěchům u jistých malignit. Nicméně, tyto přístupy nebyly úspěšné pro všechny malignity a rakovina prsu je nejčastěji nevyléčitelná, pokud je léčeno jisté stadium onemocnění. Alternativní přístupy pro prevenci a terapii jsou nezbytné.

Společnou charakteristikou malignit je nekontrolovatelný buněčný růst. Zdá se, že nádorové buňky podléhají procesu transformace z normálního fenotypu na maligní fenotyp schopný autonomního růstu. Amplifikace a nadměrná exprese somatických

21.10.97

buněčných genů je považována za společnou primární událost, která vede k transformaci normálních buněk na maligní buňky. Maligní fenotypové charakteristiky kodované onkogenními geny jsou přeneseny během buněčného dělení na potomstvo transformovaných buněk.

Probíhající výzkum onkogenů identifikoval nejméně čtyřicet onkogenů operativních v maligních buňkách a odpovědných za, nebo asociovaných s, transformaci. Onkogeny byly klasifikovány do různých skupin na základě jejich putativní funkce nebo umístění jejich genových produktů (jako je protein exprivovaný onkogenem).

O onkogenech se soudí, že jsou zásadní pro jisté aspekty normální buněčné fyziologie. V tomto ohledu je HER-2/neu onkogen členem tyrosin proteinkinasové rodiny a vykazuje vysoký stupeň homologie s receptorem pro epidermální růstový faktor. HER-2/neu pravděpodobně hraje roli v buněčném růstu a/nebo diferenciaci. HER-2/neu pravděpodobně indukuje malignity kvantitativním mechanismem, který je následkem zvýšené nebo deregulované exprese v podstatě normálního genového produktu.

HER-2/neu (p185) je proteinový produkt HER-2/neu onkogenu. HER-2/neu gen je amplifikován a HER-2/neu protein je nadměrně exprivován u mnoha nádorů včetně nádorů prsu, vaječníku, tlustého střeva, plic a prostaty. HER-2/neu je ve vztahu k maligní transformaci. Je nacházen v 50 - 60% duktálních karcinomech in situ a 20 - 40% všech nádorů prsu, stejně jako v podstatné frakci adenokarcinomů vycházejících z vaječníků, prostaty, tlustého střeva a plic. HER-2/neu je těsně asociován

nejen s maligním fenotypem, ale také s agresivitou malignity, kdy je nacházen v jedné čtvrtině všech invazivních karcinomů prsu. HER-2/neu nadměrná exprese koreluje se špatnou prognosou jak karcinomu prsu, tak karcinomu vaječníků. HER-2/neu je transmembránový protein s relativní molekulovou hmotností 185 kd, kde je asi 1255 aminokyselin (aa). Má extracelulární vazebnou doménu (ECD) o asi 645 aa, se 40% homologií s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGRF), vysoce hydrofobní transmembránovou kotvicí doménu (TMD) a karboxyterminální cytoplasmatickou doménu (CD) o asi 580 aa s 80% homologií k EGRF.

Vzhledem k obtížím v nynějších přístupech k terapii nádorů, se kterými je asociován HER-2/neu onkogen zde v oboru existuje potřeba zlepšených sloučenin a kompozic. Předkládaný vynález naplňuje tuto potřebu a dále poskytuje jiné příbuzné výhody.

Podstata vynálezu

Stručně řečeno, předkládaný vynález poskytuje polypeptidy, molekuly nukleových kyselin (řídící expresi takových polypeptidů) a virové vektory (řídící expresi takových polypeptidů) pro použití pro imunizaci, nebo pro výrobu léčiv pro imunizaci, teplokrevných zvířat vůči malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován. Polypeptid nebo molekula nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu může být přítomna v kompozici, která obsahuje farmaceuticky akceptovatelný nosič nebo ředidlo. Takový polypeptid, molekula nukleové kyseliny, virový vektor nebo farmaceutická kompozice mohou být použity pro imunizaci jednorázovou (např. pokud je

21.10.97

předpokládána malignita) nebo opakovanou (např. u jednotlivců se zvýšeným rizikem vzniku nebo nového vzniku malignity). Léčiva pro imunizaci mohou být užitečná v léčbě existujících tumorů nebo pro ochranu před výskytem tumorů nebo jejich opětovným výskytem.

V jednom provedení předkládaný vynález poskytuje polypeptid kodovaný DNA sekvencí vybranou z: a) nukleotidů 2026 až 3765 SEQ ID NO: 1, a b) DNA sekvencí, které hybridizují s nukleotidovou sekvencí komplementární k nukleotidům 2026 až 3765 SEQ ID NO: 1 za středně přísných podmínek, kde DNA sekvence koduje polypeptid, který produkuje imunitní reakci na HER-2/neu protein. V preferovaném provedení má polypeptid aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od lysinu, aminokyseliny 676, do valinu, aminokyseliny 1255, nebo jeho varianta, která produkuje alespoň stejnou imunitní odpověď. Je poskytnuta kompozice, která obsahuje polypeptid podle předkládaného vynálezu v kombinaci s farmaceuticky akceptovatelným nosičem nebo ředidlem.

V jiném provedení je polypeptid nebo kompozice podle předkládaného vynálezu poskytnuta pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován. V jiném provedení je takový polypeptid nebo kompozice použit pro výrobu léčiva pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

V jiném provedení je poskytnuta molekula nukleové kyseliny řídící expresi polypeptidu podle předkládaného vynálezu pro

imunizaci transfekcí buněk teplokrevných zvířat molekulou nukleové kyseliny. V jiném provedení je taková molekula nukleové kyseliny použita pro výrobu léčiva pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

V jiném provedení je poskytnut virový vektor řídící expresi polypeptidu podle předkládaného vynálezu pro imunizaci infekcí buněk teplokrevných zvířat vektorem. V jiném provedení je takový virový vektor použit pro výrobu léčiva pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

Tyto a jiné aspekty předkládaného vynálezu se stanou zřejmými s ohledem na následující podrobný popis a připojené obrázky.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 ukazuje výsledky zaměření naivních T lymfocytů na HER-2/neu polypeptid prostřednictvím dendritických buněk. Z kostní dřeně odvozené DC byly generovány GM-CSF a IL6 z CD34+ kmenových buněk. DC pulsované HER-2/neu polypeptidem indukovaly protein specifickou proliferaci autologních CD4+/CD45RA+ T lymfocytů po 7 dnech kultivace T buněk s DC. Z kostní dřeně odvozené CD34+ kmenové buňky kultivované po dobu jednoho týdne v séru prostém mediu obsahujícím GM-CSF a IL-6 byly použity jako APC. APC byly umístěny na 96 jamkovou plotnu s plochým dnem (Corning, Corning, NY, USA) v různých koncentracích a byly inkubovány po 16 - 18 hodin s 20 - 25 µg/ml rekombinantního

21.10.97

HER-2/neu polypeptidu. CD4⁺ T lymfocyty byly izolovány z mononukleárních buněk autologní periferní krve pozitivní selekcí za použití imunoafinitních kolon (CellPro Inc., Bothell, WA, USA). Antigenem pulsované APC buňky byly ozářeny (10 Gy) a byly přidány CD4⁺ T lymfocyty v množství 10^5 na jamku. Proliferativní odpověď T buněk byla měřena vychytáváním (³H) thymidinu (1 μ Ci/jamku) přidaného v den 7 na 16 - 18 hodin. Proliferační testy byly provedeny v medium prostém séra a cytokinů opakovaně v 5 jamkách. Symboly reprezentují:

--●-- DC + HER-2/neu polypeptid + CD4⁺/CD45RA⁺ T buňky;
 --○-- DC + CD4⁺/CD45RA⁺ T buňky; a --□-- DC + HER-2/neu polypeptid.

Obrázek 2 reprezentuje odpověď CD4⁺ buněk na HER-2/neu polypeptid. Za použití priming testu popsaného pro obrázek 1 byly CD4⁺ T buňky od normálních dárců testovány na odpověď na rekombinantní lidský HER-2/neu polypeptid. Symboly reprezentují:

--■-- SC + CD4; a ...◆... SC + CD4 + HER-2/neu polypeptid. "SC" je kmenová buňka.

Obrázek 3 ukazuje, že u krys imunizovaných krysím HER-2/neu polypeptidem se vyvíjí krysí neu specifické protilátky. Krysy byly imunizované rekombinantním krysím HER-2/neu polypeptidem 25 μ g v MPL nebo vakcinačním adjuvans. Byly podány tři imunizace, každá 20 dní od sebe. Dvacet dní po poslední imunizaci byly krysy hodnoceny na protilátkovou odpověď proti krysímu neu. Zvířata imunizovaná HER-2/neu polypeptidem a vakcinačním adjuvans vykazovala vysoký titr krysí neu specifických odpovědí. Kontrola byla zvířata imunizovaná lidským HER-2/neu polypeptidem (cizorodým proteinem). V oddělených pokusech se u krys

21.10.97

imunizovaných 100 µg a 300 µg purifikovaného kompletního krysího neu nevyvinuly detegovatelné neu specifické protilátky (data nejsou ukázána). Data reprezentují průměr a standardní odchylku od tří zvířat. Symboly reprezentují: --■-- krysí HER-2/neu polypeptid/MPL; ..●... krysí HER-2/neu polypeptid/vakcinační; ---□--- MPL sám; ---○---vakcinční sám; a ---■--- kontrola. "MPL" a "vakcinační" jsou adjuvans (Ribi, Bozeman, MT, USA). "neu" je zde HER-2/neu protein.

Obrázek 4 ukazuje, že pacienti s rakovinou prsu mají preexistující imunitu k HER-2/neu polypeptidu. PBMC od pacienta byly hodnoceny inkorporací triciovaného thymidinu ve 24 jamkových plotnách. Jako odpovídající jamky jsou počítány ty, které mají o více než tři standardní odchylky vyšší hodnoty než kontrolní jamky. HER-2/neu pozitivní pacienti s rakovinou prsu stadia II měly signifikantní odpověď na rekombinantní lidský HER-2/neu polypeptid. Symboly "p" reprezentují peptidy pro HER-2/neu protein, "tt" reprezentují tetanický toxoid a "hHNP" reprezentuje rekombinantní lidský HER-2/neu polypeptid.

Před popisem vynálezu může být užitečné pro jeho pochopení vymezení jistých termínů, které jsou zde použity.

HER-2/neu polypeptid - jak je zde použito označuje část HER-2/neu proteinu (protein je také známý jako p185 nebo c-erbB2) mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od lysinu, aminokyseliny 676, do valinu, aminokyseliny 1255; a může být přirozený, synteticky produkováný, produkováný genetickým

21.10.97

např. jedna nebo více aminokyselin nahrazeno jinými aminokyselinami nebo neaminokyselinami, které v podstatě neovlivňují vyvolání nebo posílení imunitní odpovědi na HER-2/neu protein (např., varianta stimuluje odpověď pomocných T buněk nebo cytotoxických T buněk).

Proliferace T buněk - jak je zde použito zahrnuje množení T buněk stejně jako stimulaci T buněk, která vede ke zmnožení, t.j. iniciaci událostí vedoucích k mitose a mitosu samotnou. Metody pro detekci proliferace T buněk jsou uvedeny dále.

Jak je uvedeno výše, předkládaný vynález je zaměřen na sloučeniny a kompozice pro vyvolání nebo posílení imunity k proteinovému produktu exprimovanému HER-2/neu onkogenu, včetně malignit u teplokrevných zvířat, u kterých je amplifikovaný HER-2/neu gen asociován s malignitami. Asociace amplifikovaného HER-2/neu genu s malignitami nevyžaduje, aby proteinový produkt exprese genu byl přítomen v tumoru. Například, nadměrná exprese proteinového expresního produktu může být zahrnuta v iniciaci tumoru, ale proteinová exprese může být následně ztracena. Použitím předkládaného vynálezu je vyvolání nebo posílení účinné autochtonní imunitní odpovědi pro konvertování HER-2/neu pozitivního tumoru na HER-2/neu negativní.

Přesněji, objev předkládaného vynálezu, v jednom aspektu, ukazuje, že polypeptid založený na určité části (HER-2/neu polypeptid) proteinového expresního produktu HER-2/neu genu může být rozpoznán na thymu závislými lymfocyty (zde "T buňky") a proto může být autochtonní imunitní T buněčná odpověď využita profylakticky nebo pro léčbu malignit, u kterých je takový protein nadměrně exprimován. Objev předkládaného vynálezu také

21.10.97

ukazuje, v jiném aspektu, že molekuly nukleové kyseliny řídící expresi takového peptidu mohou být použity samostatně nebo ve virovém vektoru pro imunizaci.

Obečně, o CD4+ T buňkách se soudí, že účinkují jako helper/inducery prostřednictvím uvolnění lymfokinů, pokud jsou stimulovány specifickým antigenem; nicméně, subpopulace CD4+ buněk může účinkovat jako cytotoxické T lymfocyty (CTL). Obdobně, o CD8+ T buňkách se soudí, že účinkují přímo lýsou antigenních cílů; nicméně, za různých okolností mohou secernovat lymfokiny za poskytnutí helper nebo DTH funkce. Navzdory potenciálně se překrývající funkci jsou fenotypové CD4 a CD8 markery vázány na rozpoznání peptidů vázaných na třídu II nebo na třídu I MHC antigenů. Rozpoznání antigenu v kontextu třídy II nebo třídy I MHC umožňuje CD4+ a CD8+ buňkám odpovídat na různé antigeny nebo na stejný antigen presentovaný za různých okolností. Vazba imunogenních peptidů na třídu II MHC antigenů se nejčastěji vyskytuje u antigenů trávených antigen prezentujícími buňkami. Proto CD4+ T buňky obvykle rozpoznávají antigeny, které byly externě od nádorové buňky. Oproti tomu, za normálních okolností, se vazba peptidů na třídu I MHC vyskytuje pouze u proteinů přítomných v cytosolu a syntetizovaných samotným cílem, proteiny v zevním prostředí jsou vyloučeny. Vyjímkou z tohoto je vazba exogeních peptidů s přesným třída I vazebným motivem, které jsou přítomny mimo buňku ve vysoké koncentraci. Tak CD4+ a CD8+ T buňky mají významně odlišné funkce a mají tendenci rozpoznávat různé antigeny s ohledem na to, kde jsou antigeny normálně umístěny.

Jak je popsáno v předkládaném vynálezu, polypeptidová část

21.10.97

proteinového produktu exprivovaného HER-2/neu onkogenem je rozpoznávána T buňkami. Cirkulující HER-2/neu polypeptid je degradován na peptidové fragmenty. Peptidové fragmenty z polypeptidu se vážou na antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Předložením peptidu navázaného na MHC antigen na povrchu buňky a rozpoznáním kombinace peptidu plus vlastního MHC antigenu T buňkami hostitele se stane HER-2/neu polypeptid (včetně toho, který je exprivován maligními buňkami) imunogením pro T buňky. Vynikající specifita receptoru T buněk umožňuje jednotlivým T buňkám rozlišit peptidy, které se liší jedním aminokyselinovým zbytkem.

V průběhu imunitní odpovědi na peptidový fragment z polypeptidu se budou T buňky exprivující T buněčný receptor s vysokou vazebnou afinitou ke komplexu MHC- peptid vázat na komplex MHC - peptid a tak se stanou aktivovanými a indukuje se u nich proliferace. Při prvním setkání s peptidem bude malý počet imunitních T buněk secernovat lymfokiny, proliferovat a diferencovat na efektorové a paměťové T buňky. Primární imunitní odpověď proběhne in vivo, ale bude obtížné ji detegovat in vitro. Další setkání paměťových buněk se stejným antigenem povede k rychlejší a silnější imunitní odpovědi. Sekundární odpověď se vyskytne jak in vivo, tak in vitro. In vitro odpověď je snadno změřena měřením stupně proliferace, stupně produkce cytokinů nebo generování cytolytické aktivity populace T buněk re-exponovaných antigenu. Významná proliferace populace T buněk v odpovědi na určitý antigen je považována za ukazatel předešlé expozice nebo vystavení antigenu.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu obecně obsahují

21.10.97

HER-2/neu polypeptidy nebo DNA molekuly, které řídí expresi takových peptidů, kde DNA molekuly mohou být přítomny ve virovém vektoru. Jak bylo uvedeno výše, polypeptidy podle předkládaného vynálezu zahrnují varianty polypeptidu SEQ ID NO: 2 od aminokyseliny 676 do aminokyseliny 1255, které si uchovávají schopnost stimulovat imunitní odpověď. Takové varianty obsahují různé strukturální formy nativního polypeptidu. Díky přítomnosti ionizovatelných amino a karboxylových skupin, například, může být HER-2/neu polypeptid ve formě soli kyseliny nebo zásady, nebo může být v neutrální formě. Jednotlivá aminokyselinová residua mohou také být modifikována oxidací nebo redukcí.

Varianty v rozsahu předkládaného vynálezu také zahrnují polypeptidy, ve kterých je primární aminokyselinová struktura nativního HER-2/neu polypeptidu modifikována vytvořením kovalentních nebo agregativních konjugátů s jinými peptidy nebo polypeptidy, nebo chemickými skupinami jako je glykosylová skupina, lipidy, fosfáty, acetyl skupiny a podobně. Kovalentní deriváty mohou být připraveny, například, navázáním určitých funkčních skupin na postranní aminokyselinové řetězce nebo na N- nebo C- konec.

Předkládaný vynález také obsahuje HER-2/neu polypeptidy s nebo bez glykosylace. Polypeptidy exprimované v kvasinkových nebo savčích expresních systémech mohou být podobné nebo mírně odlišné v molekulové hmotnosti a v glykosylaci od nativních molekul, v závislosti na expresním systému. Například, exprese DNA kodující polypeptidy v bakterii jako je E. coli typicky poskytuje neglykosylované molekuly. N-glykosylační místa eukaryotních proteinů jsou charakterizována tripletem aminokyselin Asn-A₁-Z, kde A₁ je jakákoliv aminokyselina s výjimkou Pro, a Z je Ser nebo

21.10.97

Thr. Varianty HER-2/neu polypeptidů, které mají inaktivovaná N-glykosylační místa, mohou být produkovány technikami, které jsou odborníkům známé, jako je syntesa oligonukleotidů a ligace nebo technika místně specifické mutagenese, a jsou v rozsahu předkládaného vynálezu. Alternativně, N-vázaná glykosylační místa mohou být přidána k HER-2/neu polypeptidu.

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu také zahrnují varianty polypeptidu SEQ ID NO: 2 (t.j. varianty polypeptidu majícího aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od aminokyseliny 676 do aminokyseliny 1255), které mají aminokyselinovou sekvenci, která se liší od této sekvence v jedné nebo více delecích, insercích substitucích nebo jiných modifikacích. V jednom provedení jsou takové varianty v podstatě homologní k nativnímu HER-2/neu polypeptidu a uchovávají si schopnost stimulovat imunitní odpověď. "V podstatě homologní" jak je zde použito, označuje sekvenci aminokyselin, která může být kodována DNA sekvencemi, které jsou schopné hybridizace za středně přísných podmínek se sekvencí nukleotidů, která je komplementární k přirozeně se vyskytující DNA sekvenci, kodující specifickou část polypeptidu SEQ ID NO: 2 (t.j. nukleotidy 2026 až 3765 SEQ ID NO: 1). Vhodné středně přísné podmínky zahrnují předpromytí v roztoku 5 x SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0); hybridizaci při 50 °C - 65 °C, 5 x SSC, přes noc; a potom následuje dvojnásobné promytí při 65 °C po 20 minut každým z 2 x, 0,5 x a 0,2 x SSC (obsahujícím 0,1% SDS). Takové hybridizující DNA sekvence jsou také v rozsahu tohoto vynálezu. Účinek jakýchkoliv takových modifikací na schopnost HER-2/neu polypeptidu produkovat imunitní odpověď musí být možné snadno určit (např. analyzováním schopnosti mutovaného HER-2/neu polypeptidu indukovat odpověď T

buněk za použití metod zde popsanych, například).

Obecně, aminokyselinové substituce mohou být provedeny množstvím způsobů pro poskytnutí jiných provedení předkládaného vynálezu. Za prvé, například, aminokyselinové substituce mohou být provedeny konzervativně, t.j. substituovaná aminokyselina je nahrazena aminokyselinou, která má podobné vlastnosti, takže odborník v oboru peptidové chemie bude očekávat, že sekundární struktura a hydropatické vlastnosti polypeptidu zůstanou bez podstatných změn. Obecně, následující skupiny polypeptidů reprezentují konzervativní změny: 1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; 2) cys, ser, tyr, thr; 3) val, ile, leu, met, ala, phe; 4) lys, arg, his; 4) lys, arg, his; a 5) phe, tyr, trp, his. Příkladem nekonzervativní změny je nahrazení aminokyseliny z jedné skupiny aminokyselinou z jiné skupiny.

Jiným způsobem pro vytvoření aminokyselinových substitucí pro produkování variant podle předkládaného vynálezu je identifikace a nahrazení aminokyselin v motivech T buněk s potenciálem vazby třídy II MHC molekul (pro CD4+ T buněčnou odpověď) nebo třídy I MHC molekul (pro CD8+ T buněčnou odpověď). Peptidové segmenty (HER-2/neu polypeptidu) s motivem s teoretickým potenciálem pro vazbu třídy II MHC molekul mohou být identifikovány počítačovou analýzou. Například, program pro analýzu proteinové sekvence, T Sites, který obsahuje několik počítačových algoritmů pro odlišení potenciálních míst pro rozpoznání T buněk, může být použit (Feller and de la Cruz, Nature, 349: 720 - 721, 1991). Jsou použity dva vyhledávací algoritmy: 1) AMPHI algoritmus popsany Margalitem (Feller and de la Cruz, Nature, 349: 720 - 721, 1991; Margalit et al., J. Immunol., 138: 2213 - 2229, 1987) identifikuje epitopové motivy podle alfa helikální periodicity a

21.10.97

amfipaticity; 2) Rothbardův a Taylorův algoritmus, který identifikuje epitopové motivy podle náboje a polaritý (Rothbard and Taylor, EMBO, 7: 93 - 100, 1988). Segmenty s oběma motivy jsou nejvhodnější pro vazbu na třídu II MHC molekul. Falk et al., určil, že vazba peptidů na jednotlivé MHC molekuly vykazuje rozpoznatelné sekvenční motivy (Falk et al., Nature, 351: 290 - 296, 1991). Peptidový motiv pro vazbu v zářezu HLA-A2.1 byl definován Edmanem degradací peptidů získaných z HLA-A2.1 molekul kultivované buněčné linie (Tabulka 2, od Falk et al., výše). Metoda identifikovala typické nebo průměrné na HLA-A2.1 se vázající peptidy v délce 9 aminokyselin s dominantními kotvícími zbytky v pozicích 2 (L) a 9 (V). Běžně se vyskytující silně se vázající zbytky byly identifikovány v pozicích 2 (M), 4 (E,K), 6 (V), a 8 (K). Identifikovaný motiv reprezentuje průměr mnoha vazebných peptidů.

21.10.97

HLA-A2.1 restrikční motiv

	Aminokyselinová pozice									bodové označení
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
dominantní vazebný kotvící zbytek		L						V		+3
silně se vázající zbytek		M		E		V		K		+2
slabě se vázající zbytek	I		A	G	I	I	A	E	L	+1
	L		Y	P	K	L	Y	S		
	F		F	D	Y	T	H			
	K		P	T	N					
	M		M		G					
	Y		S		V					
					H					

Odvozený peptidový motiv jak je nyní definován není přísný. Některé HLA-A2.1 neobsahují oba dominantní kotevní zbytky a aminokyseliny sousedící s dominantními kotevními zbytky hrají hlavní roli v umožnění nebo neumožnění vazby. Ne všechny peptidy s nyní popsaným motivem se budou vázat a některé peptidy bez motivu se budou vázat. Nicméně, tento motiv je dostatečně hodnotný pro umožnění identifikace některých peptidů schopných vazby. Tanto HLA-A2.1 motiv umísťuje 6 aminokyselin mezi dominantní kotevní aminokyseliny na zbytku 2 a 9.

21.10.97

Po identifikaci peptidových motivů v HER-2/neu polypeptidu může být aminokyselinová substituce provedena konzervativně nebo nekonzervativně. Druhý typ substituce je zamýšlen pro produkci polypeptidu, který je silnější a/nebo více zkříženě reaktivní (MHC polymorfismus). Příkladem silnějšího polypeptidu je ten, který se váže na stejnou MHC molekulu s vyšší afinitou, než nativní polypeptid, bez ovlivnění rozpoznání T buňkami specifickými pro přirozený polypeptid. Příkladem polypeptidu s širší zkříženou reaktivitou je ten, který indukuje šířeji zkříženě reaktivní imunitní odpovědi (t.j., váže se na větší rozsah MHC molekul), než přirozený polypeptid. Podobně, jedna nebo více aminokyselin umístěných mezi peptidové motivy a majících prostorovou funkci (např., neinteragujících s MHC molekulou nebo receptorem T buněk) může být substituována konzervativně nebo nekonzervativně. Odborníkům bude jasné, že polypeptidy obsahující jednu nebo více aminokyselinových substitucí mohou být testovány na výhodné nebo nevýhodné imunologické interakce množstvím testů, včetně těch, které jsou zde popsány pro schopnost stimulovat rozpoznávání T buňkami.

Varianty v rozsahu předkládaného vynálezu mohou také, nebo alternativně, obsahovat jiné modifikace, včetně delecí nebo adicí aminokyselin, které mají minimální vliv na požadované imunologické vlastosti polypeptidu. Odborníci ocení, že zkrácené formy nebo nepřirozeně rozsáhlé formy HER-2/neu polypeptidu mohou být použity, s tím, že poskytnuté imunologické vlastnosti jsou zhruba ekvivalentní jako u kompletního, nativního HER-2/neu polypeptidu. Cysteinové zbytky mohou být deletovány nebo nahrazeny jinými aminokyselinami pro zabránění tvorby nesprávných intramolekulárních disulfidových můstků při renaturaci. Jiné

21.10.97

přístupy mutagenese vyžadují modifikaci sousedních dibasických aminokyselinových zbytků pro zvýšení exprese v kvasinkových systemech, ve kterých je přítomna aktivita KEX2 proteasy.

HER-2/neu polypeptid může být obecně získán za použití genomového nebo cDNA klonu kodujícího protein. Genomová sekvence, která koduje kompletní HER-2/neu je ukázána v SEQ ID NO: 1 a odvozená aminokyselinová sekvence je presentována v SEQ ID NO: 2. Takové klony mohou být izolovány vyšetřením vhodné expresní knihovny na klony, které exprivují HER-2/neu protein. Příprava knihovny a vyšetření může být obecně provedeno za použití metod odborníkům v oboru známých, jako jsou metody popsané v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989, což je zde uvedeno jako odkaz. Stručně, bakteriofágová expresní knihovna může být umístěna a přenesena na filtry. Filtry mohou být potom inkubovány s detekčním reagens. V kontextu tohoto vynálezu je "detekčním reagens" jakákoliv sloučenina schopná vazby na HER-2/neu protein, která může být potom detegována množstvím prostředků, které jsou odborníkům známy. Typická detekční reagens obsahují "vazebné agens", jako je Protein A, Protein G, IgG nebo lektin, navázané na reporterovou skupinu. Preferované reporterové skupiny obsahují enzymy, substráty, kofaktory, inhibitory, barviva, radionuklidy, luminiscentní skupiny, fluorescentní skupiny a biotin. Výhodněji, reporterovou skupinou je křenová peroxidasa, která může být detegována inkubací se substrátem jako je tetramethylbenzidin nebo 2,2'-azino-di-3-ethylbenz-thiazolin sulfonová kyselina. Plaky, které obsahují genomové nebo cDNA sekvence, které exprivují HER-2/neu protein, jsou izolovány a purifikovány technikami, které jsou odborníkům známy. Vhodné

21.10.97

metody mohou být nalezeny, například, v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

Varianty polypeptidu, které si uchovávají schopnost stimulovat imunitní odpověď, mohou obecně být identifikovány modifikováním sekvence v jednom nebo ve více aspektech popsaných výše a testováním vzniklého polypeptidu na schopnost stimulovat imunitní odpověď, např. odpověď T buněk. Například, takové testy mohou být obecně provedeny kontaktováním T buněk s modifikovaným polypeptidem a testováním odpovědi. Přirozeně se vyskytující varianty polypeptidu mohou také být izolovány, například, vyšetřením vhodné cDNA nebo genomové knihovny s DNA sekvencí kodující polypeptid nebo jeho variantu.

Výše popsané modifikace sekvence mohou být zavedeny za použití standardních rekombinačních technik nebo automatizovanou syntézou modifikovaného polypeptidu. Například, mutace mohou být zavedeny do určitého místa syntetizováním oligonukleotidů obsahujících mutantní sekvenci, obklopenou restrikcí místy umožňujícími ligaci na fragmenty nativní sekvence. Po ligaci koduje vzniklá rekonstruovaná sekvence analog mající požadovanou aminokyselinovou inserci, substituci nebo delecii.

Alternativně, postupy na oligonukleotidy zaměřené místně specifické mutagenese mohou být použity pro poskytnutí genu, ve které jsou určité kodony alterovány požadovanou substitucí, delecí nebo insercí. Příklady metod pro výrobu alterací uvedených výše jsou popsány ve Walder et al., Gene 42: 133, 1986; Bauer et al., Gene 37: 73, 1985; Craik, BioTechniques, Leden 1985, 12 - 19; Smith et al., Genetics Engineering: Principles and Methods,

Plenum Press, 1981; a U. S. patenty č. 4518584 a 4737462.

Mutace v nukleotidové sekvenci konstruované pro expresi takových HER-2/neu polypeptidů musí, samozřejmě, zachovávat čtecí rámeček kodujících sekvencí a preferovaně nevytvářet komplementární regiony, které by mohly hybridizovat za produkce sekundárních mRNA struktur, jako jsou smyčky a vlásenky, které mohou nežádoucím způsobem ovlivňovat translaci mRNA. Ačkoliv místo mutace může být předem určeno, není nezbytné, aby charakter mutace per se byl předem určen. Například, pro vybrání optimálních charakteristik mutantů v daném místě může být provedena náhodná mutagenese v cílovém kodonu a exprivovaný HER-2/neu polypeptid může být vyšetřován na požadovanou aktivitu.

Ne všechny mutace v nukleotidové sekvenci, která koduje HER-2/neu polypeptid, budou exprivovány v konečném produktu. Například, substituce nukleotidů mohou být provedeny pro posílení exprese, především pro vyloučení smyček sekundární struktury v transkribované mRNA (viz, např. Evropskou patentovou přihlášku 75444A), nebo pro poskytnutí kodonů, které jsou snadněji translatovány selektovaným hostitelem, jako jsou dobře známé E. coli preferenční kodony pro expresi v E. coli.

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu, jak přirozeně se vyskytující, tak modifikované, jsou preferovaně produkovány rekombinantními DNA metodami. Takové metody zahrnují inserci DNA sekvence kodující HER-2/neu polypeptid do rekombinantního expresního vektoru a expresi DNA sekvence v rekombinantním mikrobiálním, savčím nebo hmyzím buněčném expresním systému za podmínek navozujících expresi. DNA sekvence kodující polypeptidy

21.10.97

poskytnuté tímto vynálezem mohou být sestaveny z cDNA fragmentů a krátkých oligonukleotidových linkerů, nebo ze serie oligonukleotidů, za poskytnutí syntetického genu, který je schopen inserce v rekombinantním expresním vektoru a exprese v rekombinantní transkripční jednotce.

Rekombinantní expresní vektory obsahují DNA sekvenci kodující HER-2/neu polypeptid operativně vázanou na vhodné transkripční nebo translační regulační elementy odvozené od savčích, mikrobiálních, virových nebo hmyzích genů. Takové regulační elementy zahrnují transkripční promotor, volitelnou operatorovou sekvenci pro kontrolu transkripce, sekvenci kodující vhodná mRNA ribosomální vazebná místa a sekvence, které kontrolují ukončení transkripce a translace. Zdroj replikace a selektovatelný marker pro usnadnění rozpoznání transformantů mohou být dále inkorporovány.

DNA regiony jsou operativně vázány, pokud jsou jeden ke druhému ve funkčním vztahu. Například, DNA pro signální peptid (sekreční leader) je operativně navázán na DNA pro polypeptid pokud je exprimován jako prekursor, který participuje na sekreci polypeptidu; promotor je operativně navázán na kodující sekvenci, pokud kontroluje transkripci sekvence; nebo ribosomové vazebné místo je operativně navázáno na kodující sekvenci pokud je umístěno tak, že umožňuje translaci. Obecně, operativně vázaný znamená sousedící a, v případě sekrečních leaderů, ve čtecím rámečku. DNA sekvence kodující HER-2/neu polypeptid, které mají být exprimovány v mikroorganismu, nebudou preferovaně obsahovat žádné introny, které by mohly předčasně ukončit transkripci DNA na mRNA.

Expresní vektory pro bakteriální použití mohou obsahovat selektovatelný marker a bakteriální zdroj replikace odvozené od komerčně dostupných plasmidů obsahujících genetické elementy dobře známého klonovacího vektoru pBR322 (ATCC 37017). Takové komerční vektory zahrnují, například, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) a pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Tyto pBR322 "základní" sekce jsou kombinovány s vhodným promotorem a sekvencemi, které mají být exprirovány. *E. coli* je typicky transformována za použití derivátů pBR322, plasmidu odvozeného od druhu *E. coli* (Bolivar et al., Gene, 2: 95, 1977). pBR322 obsahuje geny pro resistenci na ampicilin a tetracyklin a tak poskytuje jednoduchý prostředek pro identifikaci transformovaných buněk.

Promotory běžně používané v rekombinantních mikrobiálních expresních vektorech zahrnují β -laktamasový (penicilinasový) a laktosový promotorový system (Chang et al., Nature 275: 615, 1978; a Goeddel et al., Nature 281: 544, 1979), tryptofanový (*trp*) promotorový system (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980; a Evropská patentová přihláška 36776) a *tac* promotor (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, str. 412, 1982). Zejména užitečný bakteriální expresní system využívá fág lambda *P_L* promotor a *cI857ts* termolabilní represor. Plasmidové vektory dostupné od American Type Culture Collection, které inkorporují deriváty lambda *P_L* promotoru zahrnují plasmid pHUB2, umístěný v *E. coli* kmenu JMB9 (ATCC 37092) a pPLc28, umístěný v *E. coli* RR1 (ATCC 53082).

Vhodné promotorové-sekvence ve kvasinkových vektorech obsahují promotory pro metallothionein, 3-fosfoglycerát kinasu (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255: 2073, 1980) nebo jiné glykolytické

21.10.97

enzymy (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968; a Holland et al., Biochem., 17: 4900, 1978), jako je enolasa, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, hexokinasa, pyruvát dekarboxylasa, fosfofruktokinasa, glukosa-6-fosfát isomerasa, 3-fosfoglycerát mutasa, pyruvát kinasa, triosafosfát isomerasa, fosfoglukosa isomerasa a glukokinasa. Vhodné vektory a promotory pro použití v kvasinkové expresi jsou dále popsány v R. Hitzeman et al., Evropská patentová přihláška 73657.

Preferované kvasinkové vektory mohou být sestaveny za použití DNA sekvencí z pBR322 pro selekci a replikaci v E. coli (Amp^r gen a zdroj replikace) a kvasinkových DNA sekvencí obsahujících glukosou represibilní ADH2 promotor a α -faktor sekreční leader. ADH12 promotor popsal Russell et al., (J. Biol. Chem. 258: 2674, 1982) a Beier et al., (Nature 300: 724, 1982). Kvasinkový α -faktor leader, který řídí sekreci heterologních proteinů, může být insertován mezi promotor a strukturální gen, který má být expričován (viz např. Kurjan et al., Cell 30: 933, 1982; a Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5330, 1984). Leader sekvence může být modifikována tak, aby obsahovala, v blízkosti svého 3' konce, jedno nebo více použitelných restričních míst pro usnadnění fúze leader sekvence na cizorodé geny. Transkripční a translační kontrolní sekvence v expresních vektorech pro použití v transformaci buněk obratlovců mohou být poskytnuty z virových zdrojů. Například, běžně používané promotory a enhancery jsou odvozeny od polyoma, adenoviru 2, opičího viru 40 (SV40) a lidského cytomegaloviru. DNA sekvence odvozené z SV40 virového genomu, například, SV40 zdroj, časný a pozdní promotor, enhancer, splice, a polyadenylační místa mohou být použity pro poskytnutí jiných genetických elementů vyžadovaných pro expresi heterologní

DNA sekvence. Časné a pozdní promotory jsou zejména užitečné, protože jsou oba snadno získány z viru jako fragment, který také obsahuje SV40 virový zdroj replikace (Fiers et al., Nature, 273: 113, 1978). Menší nebo větší SV40 fragmenty mohou také být použity, takže přibližně 250 bp sekvence v rozsahu od Hind II místa k Bgl II místu umístěná ve virovém zdroji replikace je také obsažena. Dále, virový genomový promotor, kontrolní a/nebo signální sekvence mohou být využity, kde takové kontrolní sekvence jsou kompatibilní s vybranou hostitelskou buňkou. Příkladné vektory mohou být konstruovány jak popisuje Okayama a Berg, Mol. Cell Biol. 3: 280, 1983.

Užitečný systém pro stabilní vysokou hladinu exprese cDNA savčího receptoru v C127 myších savčích epiteliálních buňkách může být konstruován v podstatě tak, jak to popisuje Cosman et al., (Mol. Immunol. 23: 935, 1986). Preferovaným eukaryotním vektorem pro expresi DNA LbIF4A proteinu je pDC406 (McMahan et al., EMBO J., 10: 2821, 1991) a obsahuje regulační sekvence odvozené od SV40, viru lidské imunodeficiency (HIV) a viru Epstein-Barrové (EBV). Jiné preferované vektory zahrnují pDC409 a pDC410, které jsou odvozeny od pDC406. pDC409 byl odvozen od pDC406 substitucí EBV zdroje replikace za sekvenci kodující SV40 velký T antigen. pDC409 se liší od pDC406 v tom, že Bgl II restriční místo mimo mnohotné klonovací místo bylo deletováno, což činí Bgl II místo v mnohotném klonovacím místě jedinečným.

Použitelná buněčná linie, která umožňuje episomální replikaci expresních vektorů, jako je pDC406 a pDC409, které obsahují EBV zdroj replikace, je CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478). CV-L/EBNA buněčná linie byla odvozena transfekcí CV-1 buněčné linie genem kodujícím

nukleární antigen I viru Epstein - Barrové (EBNA-1) a konstitutivně exprivuje EBNA-1 řízený lidským CMV okamžitým-časným enhancerem/promotorem.

Transformované hostitelské buňky jsou buňky, které byly transformovány nebo transfektovány expresními vektory konstruovanými za použití rekombinantních DNA technik a které obsahují sekvence kodující HER-2/neu polypeptid podle předkládaného vynálezu. Transformované hostitelské buňky mohou exprivovat požadovaný HER-2/neu polypeptid, ale hostitelské buňky transformované za účelem klonování nebo amplifikace HER-2/neu DNA nemusí exprivovat HER-2/neu polypeptid. Exprivované polypeptidy budou preferované secernovány do kultivačního supernatantu, v závislosti na vybrané DNA, ale mohou také být deponovány v buněčné membráně.

Vhodné hostitelské buňky pro expresi rekombinantních proteinů zahrnují prokaryotní buňky, kvasinky nebo vyšší eukaryotní buňky pod kontrolou vhodných promotorů. Prokaryoty zahrnují gram negativní nebo gram pozitivní organismy, například *E. coli* nebo *Bacilli*. Vyšší eukaryotní buňky obsahují ustanovené buněčné linie savčího nebo hmyzího původu jak jsou popsány dále. Buněk prosté translační systémy mohou být také využity pro produkci HER-2/neu polypeptidů za použití RNA derivovaných z DNA konstruktů. Vhodné klonovací a expresní vektory pro použití v bakteriálních, houbových, kvasinkových a savčích buněčných hostitelých jsou popsány například v Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985.

Prokaryotní expresní hostitelé mohou být použity pro expresi HER-2/neu polypeptidů, které nevyžadují extensivní proteolytické

21.10.97

a disulfidové zpracování. Prokaryotní expresní vektory obecně obsahují jeden nebo více fenotypových selektovatelných markerů, například, gen kodující proteiny udílející resistenci na antibiotika nebo doplňující autotrofní požadavky a zdroj replikace rozpoznávaný hostitelem pro zajištění amplifikace v hostiteli. Vhodné prokaryotní hostitelé pro transformaci zahrnují *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* a různé druhy rodu *Pseudomonas*, *Streptomyces*, a *Staphylococcus*, ačkoliv jiní hostitelé mohou být také použiti.

Rekombinantní HER-2/neu polypeptidy mohou také být exprivovány ve kvasinkovém hostiteli, preferovaně druhu *Saccharomyces*, jako je *S. cerevisiae*. Kvasinky jiných rodů, jako je *Pichia* nebo *Kluyveromyces*, mohou také být použity. Kvasinkové vektory budou obecně obsahovat zdroj replikace z 2 μ kvasinkového plasmidu nebo autonomně se replikující sekvenci (ARS), promotor, DNA kodující HER-2/neu polypeptid, sekvence pro polyadenylaci a terminaci transkripce a selekční gen. Preferovaně budou kvasinkové vektory obsahovat zdroj replikace a selektovatelný marker umožňující transformaci jak kvasinky, tak *E. coli*, např. gen resistance na ampicilin *E. coli* a *S. cerevisiae* *trp1* gen, který poskytuje selekční marker pro mutantní kmen kvasinky postrádající schopnost růstu v tryptofanu, a promotor odvozený od vysoce exprivovaného kvasinkového genu pro indukci transkripce strukturálního genu downstream. Přítomnost *trp1* léze v buněčném genomu hostitelské kvasinky potom poskytuje účinné prostředí pro detekci transformace růstem za absence tryptofanu.

Vhodné transformační protokoly pro kvasinky jsou odborníkům známy. Příkladná technika popsaná Hindem et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978) vyžaduje selekci Trp+

21.10.97

transformantů v selektivním mediu skládajícím se z 0,67% kvasinkové dusíkaté base, 0,5% casaminokyselin, 2% glukosy, 10 mg/ml adeninu a 20 mg/ml uracilu. Hostitelské kmeny transformované vektorem obsahujícím ADH2 promotor mohou být kultivovány pro expresi v bohatém mediu skládajícím se z 1% kvasinkového extraktu, 2% peptonu, a 1% glukosy doplněném 80 mg/ml adeninu a 80 mg/ml uracilu. Dereprese ADH2 promotoru se vyskytne po vyčerpání glukosy v mediu. Surové kvasinkové supernatanty jsou získány filtrací a uchovávány při 4 °C před další purifikací.

Různé savčí nebo hmyzí (např. Spodoptera nebo Trichoplusia) buněčné kultivační systémy mohou také být použity pro expresi rekombinantního polypeptidu. Baculovirový systém pro produkci heterologních polypeptidů ve hmyzích buňkách jsou popsány, například, Luckowem a Summers, Bio/Technology 6: 47, 1988. Příklady vhodných savčích hostitelských buněčných linií zahrnují COS-7 linie buněk opičích ledvin, popsané Gluzmanem (Cell 23: 175, 1981) a jiné buněčné linie schopné exprese vhodných vektorů, včetně, například, CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478), L buněk, C127, 3T3, ovaria čínských křeček (CHO), COS, NS-1, HeLa a BHK buněčné linie. Savčí expresní vektory mohou obsahovat netranskribované elementy jako je zdroj replikace, vhodný promotor a enhancer navázaný na gen, který má být exprimován a jiné 5' a 3' sousedící netranskribované sekvence a 5' a 3' netranslatované sekvence, jako jsou nezbytná vazebná místa pro ribosomy, polyadenylační místo, stříhový donor a akceptor místa a transkripční terminační sekvence.

Purifikované HER-2/neu polypeptidy mohou být připraveny kultivací vhodných systému hostitel/vektor pro expresi

21.10.97

rekombinantních translačních produktů DNA podle předkládaného vynálezu, které jsou potom purifikovány z kultivačního media nebo z buněčných extraktů. Například, supernatanty ze systémů, které secernují rekombinantní polypeptidy do kultivačního media mohou být nejprve koncentrovány za použití komerčně dostupného proteinového koncentračního filtru, jako je Amicon nebo Millipore Pellicon ultrafiltrační jednotka. Po kroku koncentrování může být koncentrát aplikován na vhodnou purifikační matrix. Například, vhodná afinitní matrice může obsahovat počítatelný strukturální protein (t. j. protein, na který se HER-2/neu polypeptid váže ve specifické interakci založené na struktuře) nebo lektin nebo molekulu protilátky navázanou na vhodný nosič. Alternativně může být využit aniontový výměnný resin, například matrix nebo substrát, který má zavěšené diethylaminoethyl (DEAE) skupiny. Matrice mohou být akrylamidové, agarosové, dextranové, celulosové nebo jiných typů běžně používaných v proteinové purifikaci. Alternativně může být využit krok výměny kationtů. Vhodné kationtové měniče zahrnují různé nerozpustné matrice obsahující sulfopropylovou nebo karboxymethylovou skupinu. Sulfopropylové skupiny jsou preferovány. Gelová filtrační chromatografie také poskytuje prostředek pro purifikaci HER-2/neu.

Afinitní chromatografie je preferovanou metodou pro purifikaci HER-2/neu polypeptidů. Například, monoklonální protilátky proti HER-2/neu polypeptidu mohou být také užitečné při purifikaci afinitní chromatografií, za použití metod, které jsou v oboru dobře známé.

Konečně, jeden nebo více kroků reversní fázové vysoce účinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) využívající

21.10.97

hydrofobního RP-HPLC media (např. silikagel mající zavěšenou methylovou nebo jinou alifatickou skupinu) mohou být využity pro další čištění HER-2/neu polypeptidové kompozice. Některé nebo všechny proběhlé kroky purifikace, v různých kombinacích, mohou být také využity pro poskytnutí homogenního rekombinantního polypeptidu.

Rekombinantní HER-2/neu polypeptid produkovaný v bakteriální kultuře je preferovaně izolován iniciální extrakcí z buněčných pelet, po čemž následuje jedna nebo více koncentrací, vysolení, vodná iontová výměna nebo vyloučení podle velikosti kroky chromatografie. Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) může být použita pro konečné kroky purifikace. Mikrobiální buňky použité v expresi rekombinantního LbeIF4A proteinu mohou být rozrušeny jakoukoliv vhodnou metodou, včetně cyklování mrazení tavení, sonikace, mechanického rozrušení nebo za použití agens způsobujících lýsu buňky.

Fermentace kvasinek, které exprimují HER-2/neu polypeptid jako secernovaný protein značně zjednodušuje purifikaci. Secernovaný rekombinantní protein vzniklý z fermentace velkého rozsahu může být purifikován metodami analogickými k těm, které popsal Urdal et al., (J. Chromatog. 296: 171, 1984). Tento odkaz popisuje dva sekvenční, reversní fáze HPLC kroky pro purifikaci rekombinantního lidského GM-CSF na preparativní HPLC koloně.

Přípravky HER-2/neu polypeptidů syntetizovaných v rekombinantní kultuře mohou obsahovat non-HER-2/neu buněčné složky, včetně proteinů v množství a charakteru, který závisí na krocích purifikace vybraných pro získání HER-2/neu polypeptidu

21.10.97

z kultury. Tyto složky budou obyčejně kvasinkového, prokaryotního nebo non-lidského eukaryotního původu. Takové přípravky jsou obyčejně prosté od jiných proteinů, které mohou být normálně asociovány s HER-2/neu proteinem jak je tomu v přírodě a v druzích, ze kterých pochází.

Automatizované syntézy poskytují alternativní metodu pro přípravu polypeptidů podle předkládaného vynálezu. Například mohou být použity jakékoliv komerčně dostupné techniky pevné fáze, jako je Merrifield solid phase syntetická metoda, ve které jsou aminokyseliny sekvenčně přidávány k rostoucímu aminokyselinovému řetězci. (Viz Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2146, 1963). Vybavení pro automatizovanou syntézu polypeptidů je komerčně dostupné od dodavatelů jako je Applied Biosystems, Inc., z Foster City, CA, a může obecně pracovat podle návodu výrobce.

V jednom aspektu podle předkládaného vynálezu, použití HER-2/neu polypeptidu (nebo DNA molekuly, která řídí expresi takového peptidu) pro generování imunitní odpovědi na HER-2/neu protein (včetně toho, který je exprimován na malignitách, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován) může být detegován. Reprezentativní vzorky takových malignit zahrnují rakovinu prsu, ovaria, tlustého střeva, plic a prostaty. Imunitní odpověď na HER-2/neu protein, generovaná HER-2/neu polypeptidem, může být dlouhodobá a může být detegována dlouho po imunizaci, nezávisle na tom, zda je protein přítomen nebo nepřítomen v těle v době testování. Imunitní odpověď na HER-2/neu protein generovaná HER-2/neu polypeptidem může být detegována vyšetřením přítomnosti nebo nepřítomnosti, nebo zvýšení, specifické aktivace CD4+ nebo

21.10.97

CD8+ T buněk. Přesněji, T buňky izolované od imunizovaného jedince rutiním způsobem (jako je Ficoll/Hypaque centrifugace podle gradientu density lymfocytů periferní krve) jsou inkubovány s HER-2/neu proteinem. Například, T buňky mohou být inkubovány in vitro po 2 - 9 dní (typicky 4 dny) při 37 °C s HER-2/neu proteinem (typicky 5 µg/ml celého proteinu nebo stupňovaného počtu buněk syntetizujících HER-2/neu protein). Může být žádoucí inkubovat jiný podíl vzorku T buněk za absence HER-2/neu proteinu pro kontrolu.

Specifická aktivace CD4+ nebo CD8+ buněk může být detegována různými způsoby. metody pro detegování specifické aktivace T buněk zahrnují detekci proliferace T buněk, produkce cytokinů (např. lymfokinů) nebo generování cytolytické aktivity (např. generování cytotoxických T buněk specifických pro HER-2/neu protein). Pro CD4+ T buňky je preferovanou metodou pro detegování specifické aktivace T buněk detekce proliferace T buněk. Pro CD8+ T buňky je preferovanou metodou pro detegování specifické aktivace T buněk detekce generování cytolytické aktivity.

Detekce proliferace T buněk může být provedena různými způsoby. Například, proliferace T buněk může být detegována měřením stupně DNA syntézy. T buňky, které byly stimulovány ke proliferaci vykazují zvýšený stupeň syntézy DNA. Typickým způsobem pro měření stupně syntézy DNA jsou například pulsně značené kultury T buněk tritiovaným thymidinem, prekursorem nukleotidů, který je inkorporován do nově syntetizované DNA. Množství inkorporovaného tritiovaného thymidinu může být určeno za použití kapalinového scintilačního spektrofotometru. Jiné způsoby pro detegování proliferace T buněk zahrnují měření

21.10.97

zvýšení produkce interleukinu 2 (IL-2), Ca^+ tok, nebo vychytávání barviva, jako je

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium.

Alternativně, syntéza lymfokinů (jako je interferon gamma) může být měřena a nebo může být kvantifikován relativní počet T buněk, které mohou odpovídat na intaktní p185^{HER-2/neu} protein.

Za použití nebo exprese HER-2/neu polypeptidu mohou být T buňky, které rozpoznávají HER-2/neu protein proliferovány in vivo. Například, léčivo pro imunizaci s HER-2/neu peptidem (t.j. jako je vakcína) může indukovat kontinuální expansi počtu T buněk nezbytných pro terapeutický útok na tumor, se kterým je HER-2/neu onkogen asociován. Typicky, asi 0,01 $\mu\text{g/kg}$ až 100 mg/kg tělesné hmotnosti bude podáno intradermálně, subkutánně nebo intravenózním způsobem. Preferovaná dávka je okolo 1 $\mu\text{g/kg}$ do asi 1 mg/kg , a zejména preferováno je asi od 5 $\mu\text{g/kg}$ do asi 200 $\mu\text{g/kg}$. Odborníkům bude jasné, že počet a frekvence podání bude záviset na odpovědi pacienta. Může být žádoucí podat HER-2/neu polypeptid opakovaně. Odborníkům v oboru bude jasné, že může být podán více než jeden HER-2/neu polypeptid, buď simultánně nebo sekvenčně. Preferované peptidy pro použití v léčivu pro imunizaci jsou ty, které obsahují aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: začínající asi lysinovým zbytkem v aminokyselinové pozici 676 a sahající asi k valinovému zbytku v aminokyselinové pozici 1255. Odborníky v oboru bude oceněno, že předkládaný vynález předpokládá použití intaktního HER-2/neu polypeptidu stejně jako dělení takového polypeptidu na množství peptidů. Ani intaktní p185^{HER-2/neu} protein, ani peptid mající aminokyselinovou sekvenci jeho celé extracelulární domény (t.j. peptid mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od aminokyseliny v pozici 1 do

21.10.97

aminokyseliny v pozici 650, plus nebo minus jedna až pět pozic, a s nebo bez prvních 21 aminokyselinových pozic) nesou použity samostatně pro imunizaci.

HER-2/neu polypeptid (nebo nukleová kyselina) je preferovaně formulován pro použití ve výše uvedených metodách jako farmaceutická kompozice (např. vakcína). Farmaceutická kompozice obecně obsahuje jeden nebo více polypeptidů v kombinaci s farmaceuticky akceptovatelným nosičem, excipientem nebo ředidlem. Takové nosiče budou netoxické pro příjemce v použitých dávkách a koncentracích. Použití HER-2/neu polypeptidu v konjunkci s chemoterapeutickým agens je také předpokládáno.

Kromě HER-2/neu polypeptidu (který účinkuje jako antigen) může být také žádoucí zahrnout jiné složky do vakcíny, jako je vehikulum pro podání antigenu a imunostimulační substance pro zvýšení imunogenicity proteinu. Příklady vehikulí pro antigen obsahují soli hliníku, emulze voda v oleji, biodegradovatelná olejová vehikula, emulze olej ve vodě, biodegradovatelné mikrokapsle a liposomy. Příklady imunostimulačních substancí (adjuvans) zahrnují N-acetylmuramyl-L-alanin-D-isoglutamin (MDP), lipopolysacharidy (LPS), glukán, IL-12, GM-CSF, interferon gamma a IL-15. Odborníkům v oboru bude jasné, že HER-2/neu polypeptid pro vakcínu může být připraven synteticky nebo může být přirozeně odvozen.

Zatímco jakýkoliv vhodný odborníkům v oboru známý nosič může být využit ve farmaceutických kompozicích podle předkládaného vynálezu, typ nosiče bude velmi záviset na způsobu podání a na tom, zda je požadováno trvalé uvolňování. Pro parenterální

21.10.97

podání, jako je subkutánní injekce, nosič preferovaně obsahuje vodu, salinický roztok, alkohol, tuk, vosk nebo pufr. Pro orální podání může být použit jakýkoliv z výše uvedených nosičů nebo pevný nosič jako je manitol, laktosa, škrob, stearát hořečnatý, sacharid sodný, talek, celulóza, glukosa, sukrosa, a uhličitan hořečnatý. Biodegradovatelné mikrosféry (např. polymléčný galaktid) mohou být také využity jako nosiče pro farmaceutické kompozice podle předkládaného vynálezu. Vhodné degradovatelné mikrosféry jsou popsány například v U.S. patentech č. 4897286 a 5075109. HER-2/neu polypeptid může být enkapsulován uvnitř biodegradovatelné mikrosféry nebo může být asociován s povrchem mikrosféry. Například, v preferovaném provedení, polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od aminokyseliny 676 do aminokyseliny 1255 je enkapsulován v biodegradovatelné mikrosféře. V tomto ohledu je preferováno, aby byla mikrosféra větší než přibližně 25 mikrometrů.

Farmaceutické kompozice (včetně vakcin) mohou také obsahovat ředidla jako jsou pufrы, antioxidanty jako je kyselina askorbová, polypeptidy o nízké molekulové hmotnosti (menší než 10 zbytků), proteiny, aminokyseliny, uhlovodany jako je glukosa, sacharosa nebo dextransy, chelatační agens jako je EDTA, glutathion nebo jiné stabilizátory nebo excipients. Neutrální pufovaný salinický roztok nebo salinický roztok smísený s nespecifickým sérovým albuminem jsou příklady vhodných ředidel. Preferovaně, produkt je formulován jako lyofilizát za použití vhodných excipientních roztoků (např. sacharosy) jako ředidel.

Jako alternativu pro presentaci HER-2/neu polypeptidů obsahuje předmět vynálezu kompozice schopné dopravení molekul nukleové

21.10.97

kyseliny kodujících HER-2/neu polypeptid. Takové kompozice zahrnují rekombinantní virové vektory (např. retrovirové (viz WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 a WO 94/03622), adenovirové (viz Berkner, Biotechniques 6: 616 - 627, 1988; Li et al., Hum. Gen. Ther., 4: 403 - 409, 1993; Vincent et al., Nat. Genet., 5: 130 - 134, 1993; a Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215 - 219, 1994), pŕox virové (viz U.S. patent č. 4769330; U.S. patent č. 5017487; a WO 89/01973), naked DNA (viz WO 90/11092), molekula nukleové kyseliny komplexovaná na polykationtovou molekulu (viz WO 93/03709) a nukleová kyselina asociovaná s liposomy (viz Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851, 1987). V jistých provedeních může být DNA navázána na usmrčený nebo inaktivovaný adenovirus (viz Curiel et al., Hum. Gen. Ther., 3: 147 - 154, 1992; Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6094, 1992). Jiné vhodné kompozice obsahují DNA ligand (viz Wu et al., J. Biol. Chem., 264: 16985 - 16987, 1989) a lipid-DNA kombinace (viz Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 - 7417, 1989). Kromě toho, účinnost vychytávání "naked DNA" do buněk může být zvýšena potažením DNA na biodegradovatelné korálky.

Kromě přímých in vivo procedur mohou být použity ex vivo procedury, ve kterých jsou buňky odstraněny ze zvířete, modifikovány a umístěny do stejného nebo do jiného zvířete. Je jasné, že může být využita jakákoliv kompozice uvedená výše pro zavedení HER-2/neu molekuly nukleové kyseliny do buněk tkáně v ex vivo kontextu. Protokoly pro virové, fyzikální a chemické metody vychytávání jsou v oboru dobře známé.

V souladu s tím je předkládán vynález užitečný pro posílení

21.10.97

nebo vyvolání buněčné imunitní odpovědi (např. generování pro antigen specifických cytolytických T buněk) u pacienta nebo v buněčné kultuře. Jak je zde použito, termín "pacient" označuje jakékoliv teplokrevné zvíře, preferovaně člověk. Pacient může být postižen rakovinou, jako je rakovina prsu, nebo může být normální (t.j. bez detegovatelné choroby nebo infekce). "Buněčná kultura" je jakýkoliv přípravek T buněk nebo izolovaných složek buněk (včetně, ale nejenom, makrofágů, monocytů, B buněk a dendritických buněk). Takové buňky mohou být izolovány jakoukoliv z množství technik odborníkům dobře známých (jako je Ficoll-hypaque denzitní centrifugace. Buňky mohou (ale nemusí) být izolovány od pacienta postiženého s HER-2/neu asociovanou malignitou, a mohou být znovu zavedeny do pacienta po léčbě.

Předkládaný vynález také popisuje, že HER-2/neu polypeptid, kromě toho, že je imunogení pro T buňky, pravděpodobně stimuluje B buňky k produkci protilátek schopných rozpoznávat HER-2/neu polypeptid. Protilátky specifické (t.j. ty, které vykazují vazebnou afinitu okolo 10^7 litrů/mol nebo vyšší) pro HER-2/neu protein mohou být nalezeny v mnoha tělesných tekutinách včetně séra a ascitu. Stručně, vzorek tělesné tekutiny je odebrán od teplokrevného zvířete, jako je člověk, u kterého je požadavek na určení přítomnosti protilátek specifických pro HER-2/neu polypeptid. Tělesná tekutina je inkubována s HER-2/neu polypeptidem za podmínek a po dobu dostatečnou pro umožnění tvorby imunokomplexů mezi polypeptidem a protilátkami specifickými pro protein. Například, tělesná tekutina a HER-2/neu polypeptid mohou být inkubovány při 4 °C po 24 - 48 hodin. Po inkubaci je reakční směs testována na přítomnost imunokomplexů. Detekce jednoho nebo více imunokomplexů vytvořených mezi

21.10.97

HER-2/neu polypeptidem a protilátkou specifickou pro HER-2/neu polypeptid může být provedena množstvím různých technik, jako je radioimunotest (RIA) a enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA).

Vhodné imunotesty zahrnují sendvičovou imunotestovací techniku s použitím dvojích monoklonálních protilátek podle David et al., (U.S. patent 4376110); sendvičové testy s použitím monoklonální - polyklonální protilátky (Wide et al., v Kirkham and Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh, 1970); "western blot" metodu podle Gordon et al., (U.S. patent 4452901); imunoprecipitaci značeného ligandu (Brown et al., J. Biol. Chem. 255: 4980 - 4983, 1980); enzymově vázané imunosorbentní testy popsané například, Raines and Ross (J. Biol. Chem. 257: 5154 - 5160, 1982); imunocytochemické techniky, včetně použití fluorochromů (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 39: 477, 1980); a neutralizace aktivity (Bowen - Pope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2396 - 2400 (1984)), všechny jsou zde uvedeny jako odkaz. Kromě imunotestů popsaných výše je dostupný velký počet jiných imunotestů, včetně těch, které jsou popsány v U.S. patentech č. 3817827; 3850752; 3901654; 3935074; 3984533; 4034074; a 4098876, kdy jsou zde všechny tyto uvedené jako odkaz.

Pro účely detekce může být HER-2/neu polypeptid ("antigen") buď značený, nebo neznačený. Pokud je neznačený, pak nachází antigen uplatnění v aglutinačních testech. Kromě toho, neznačený antigen může být použit v kombinaci se značenými molekulami, které jsou reaktivní s imunokomplexy, nebo v kombinaci se značenými protilátkami (sekundárními protilátkami), které jsou reaktivní s protilátkou namířenou proti HER-2/neu polypeptidu,

21.10.97

jako je protilátka specifická pro imunoglobulin. Alternativně může být antigen značen přímo. Pokud je značen, pak může značkovací skupina obsahovat radioizotopy, fluorofory, enzymy, luminiscenční agens, nebo částice barviva. Tyto a jiné značky jsou dobře známé v oboru a jsou popsány, například, v následujících U.S. patentech: 3766162; 3791932; 3817837; 3996345; a 4233402.

Typicky v ELISA testu je antigen adsorbován na povrch mikrotitrační jamky. Residuální vazebná místa pro protein jsou potom blokována vhodným agens, jako je hovězí sérový albumin (BSA), teplem inaktivované normální kozí sérum (NGS), nebo BLOTTO (pufrovaný roztok netučného sušeného mléka, který také obsahuje preservativy, sole, a protipěnění agens). Jamka je potom inkubována se vzorkem, o kterém je předpokládáno, že obsahuje specifickou protilátku. Vzorek může potom být aplikován neředěný, nebo, častěji, může být ředěn, obvykle v pufrovacím roztoku který obsahuje malé množství (0,1% - 5,0% hmotnosti) proteinu, jako je BSA, NGS nebo BLOTTO. Po inkubaci po dostatečnou dobu pro to, aby mohla proběhnout specifická vazba, je jamka promyta pro odstranění nenavázaného proteinu a potom je inkubována se značenou protilátkou specifickou pro druh imunoglobulinu, která je značena značkovací skupinou. Značkovací skupina může být vybrána z množství enzymů, včetně křenuvé peroxidasy, beta galaktosidasy, alkalické fosfatasy a glukosa oxidasy. Je umožněna dostatečně dlouhá doba pro výskyt specifické vazby, potom je jamka znovu promyta pro odstranění nenavázaného konjugátu a je přidán substrát pro enzym. Je umožněn vývoj barvy a optická densita obsahu jamky je měřena vizuálně nebo instrumentálně.

21.10.97

V jednom preferované provedení tohoto aspektu předkládaného vynálezu je značkovací skupina navázána na HER-2/neu protein. Krok detekce imunokomplexů vyžaduje odstranění v podstatě všeho nenavázaného HER-2/neu proteinu a detegování přítomnosti nebo nepřítomnosti značkovací skupiny.

V jiném preferovaném provedení je značkovací skupina navázána na druhou protilátku schopnou vazby na protilátky specifické pro HER-2/neu protein. Krok detegování imunokomplexů vyžaduje (a) odstranění v podstatě všechny nenavázané protilátky, (b) přidání druhé protilátky, (c) odstranění v podstatě všechny nenavázané druhé protilátky a potom (d) detegování přítomnosti nebo absence značkovací skupiny. Pokud je protilátka specifická pro HER-2/neu protein odvozena od lidské, pak je druhou protilátkou anti lidská protilátka.

Ve třetím preferovaném provedení pro detegování imunokomplexů je značkovací skupina navázána na molekulu schopnou vazby na imunokomplexy. Krok detegování vyžaduje (a) přidání molekuly, (b) odstranění v podstatě veškeré nenavázané molekuly, (c) detegování přítomnosti nebo absence značkovací skupiny. Příkladem molekuly schopné vazby na imunokomplexy je protein A.

Odborníkům v oboru je jasné, že množství metod pro detegování imunokomplexů může být použito v předkládaném vynálezu. Značkovací skupiny vhodné pro použití v jakékoliv z těchto metod zahrnují radioizotopy, fluorofory, enzymy, luminiscenční agens, a částice barviva.

V příbuzném aspektu předkládaného vynálezu může být detekce

21.10.97

imunokomplexů tvořených mezi HER-2/neu polypeptidem a protilátkami v tělesných tekutinách specifickými pro HER-2/neu polypeptid použita pro monitorování účinnosti protinádorové terapie nádorů, které obsahují HER-2/neu polypeptid, malignit, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován. Vzorky tělesné tekutiny od jedince odebrané před a po začátku terapie mohou být analyzovány na imunokomplexy metodami popsány výše. Stručně, je srovnáván počet imunokomplexů detegovaných v obou vzorcích. Významná změna v počtu imunokomplexů ve druhém vzorku (po zahájení terapie) vzhledem k prvnímu vzorku (před terapií) odráží úspěšnou terapii.

Následující příklady jsou nabídnuty jako ilustrace a nikoliv jako omezení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Exprese a purifikace rekombinantního lidského HER-2/neu polypeptidu

Lidský HER-2/neu polypeptid byl získán PCR metodou (např. U.S. patent č. 4683195; 4683202; 4800159) z plasmidu připraveného podle Di Fiore et al., (King et al., Science 229: 974 - 976, 1985; Di Fiore et al., Science 237: 178 - 182, 1987) za použití oligonukleotidových primerů, které mají navíc zavedené BssHII restriční místo a enterokinasové proteasové místo na 5' konci a EcoRI místo na 3' konci. Primer pro 5' konec byl

21.10.97

5'-TCTGGCGCGCTGGATGACGATGACAAGAAACGACGGCAGCAGAAGATC-3' (SEQ ID NO: 3), zatímco primer pro 3' konec byl 5'-TGAATTCTCGAGTCATTACTGGCACGTCCAGACCCAG-3' (SEQ ID NO: 4). Vzniklý 1,8 kb PCR fragment byl subklonován do T-vektoru od Novagen (Madison, WI, USA) a sekvence vybraných klonů byla určena na ABI 373 automatizovaném DNA sekvenátoru (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) za použití překrývajících se sekvenčních primerů. PCR fragmenty, které korespondovaly s publikovanou DNA sekvencí pro lidský HER-2/neu cDNA (SEQ ID NO: 1; Coussens et al., Science 230: 1132, 1985; Yamamoto et al., Nature 319: 230, 1986) byly potom připojeny v řádném čtecím rámečku přes BssHII místo do modifikované E. coli thioredoxin reduktasy. 6Xhistidin afinitní smyčka použitá v Ni-NTA afinitní purifikaci exprimovaného fúzního proteinu byla inkorporována do thioredoxin reduktasového fúzního partnera. Tato cDNA pro trxA-lidský HER-2/neu polypeptid fúzní protein byla subklonována do modifikovaného pET expresního vektoru pro expresi v E. coli.

Ačkoliv u thioredoxin reduktasy bylo popsáno, že stabilizuje a solubilizuje jiné heterologní proteiny exprimované v E. coli, nezdá se, že by nabízela jakoukoliv výhodu pro expresi lidského HER-2/neu polypeptidu v E. coli. Ačkoliv signifikantní část trxA-HER-2/neu polypeptid fúzního proteinu byla solubilní, většina ho byla exprimována v inklusních tělískách. fúzní protein byl proto podroben degradaci během exprese v E. coli. Přítomnost thioredoxin reduktasového fúzního partnera může, nicméně, stabilizovat protein v průběhu purifikace. Dostupnost monoklonálních protilátek k thioredoxin reduktase poskytuje vhodný marker pro sledování v průběhu purifikace.

21.10.97

Pro purifikaci lidského HER-2/neu polypeptidu s thiredoxin reduktasa fusním partnerem obsahujícím 6XHis afinitní smyčku byly *E. coli* pelety resuspendovány s inhibitory proteas a lysozymem a sonikovány. Inklusní tělíška byla izolována centrifugací a byla třikrát promyta deoxycholátem, kdy poslední promytí bylo přes noc pro odstranění LPS. Promytá inklusní tělíška byla solubilizována v GuHCl pro Ni purifikaci. Ni kolona byla eluována imidazolem v močovině a dialyzována proti 10 mM Tris pH 8. Získání HER-2/neu polypeptidu za použití tohoto protokolu bylo okolo asi 80% - 95% čistoty kompletního proteinu, kdy hlavním kontaminantem byl degradovaný protein. Z 500 ml fermentace bylo získáno 20 mg. To byl > 98% HER-2/neu polypeptid. Techniky zde použité jsou odborníkům dobře známé a byly popsány, například, v J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Příklad 2

Dendritické buňky mohou navodit lidský HER-2/neu polypeptid

A. Generování DC kultur z kostní dřeně

DC kultury byly generovány z CD34+ hematopoetických progenitorových buněk (HPC). CD34+ buňky byly purifikovány z kostní dřeně normálních dárců za použití buněčného separačního systému Ceprate LC kit (CellPro, Bothell, WA, USA). Čistota získaných CD34+ buněk byla určena analýzou průtokovou cytometrií v séru-prostém mediu (X-VIVO 10, Biowhittaker, Inc., Walkersville, MD, USA) doplněném L-glutaminem (584 µg/l), penicilinem (10 IU/ml), streptomycinem (100 µg/ml), 100 ng/ml

21.10.97

lidského rGM-CSF a 50 ng/ml lidského rIL-6 (Immunex, Seattle, WA, USA). Po 0 až 17 dňové kultivační době byly buňky sklizeny a použity pro fenotypizační testy a pro testy stimulace T buněk. O GM-CSF samotném nebo v kombinaci s IL-4 nebo TNF α bylo popsáno, že indukují in vitro růst DC. V pokusech za použití KLH a OVA jako antigenů pro nastavení naivních T buněk dávaly GM-CSF plus IL-6 srovnatelnou celkovou stimulaci, ale s nižším pozadím, a proto vyšší stimulační index ve srovnání s GM-CSF plus IL-4 nebo TNF α .

B. Test nastavení T buněk

Z kostní dřeně odvozené CD34+ HPC kultivované v sérum prostém mediu obsahujícím GM-CSF a IL-6 byly použity jako APC po kultivační periodě 0 - 17 dní. Nastavovací (priming) schopnost DC byla určena jejich kultivací s autologními, naivními T lymfocyty za přítomnosti nebo absence proteinového antigenu, kterým je lidský HER-2/neu polypeptid (hHNP) (10 μ g/ml). CD4+ T lymfocyty byly izolovány z mononukleárních buněk periferní krve pozitivní selekcí za použití imunoafinitních kolon (CellPro, Bothell, WA, USA). CD4+ CD45RA+ (naivní) T lymfocyty byly selektovány z CD4+ T lymfocytů za použití anti-CD45RA mAb přímo konjugované na FITC (Immunotech, Westbrook, ME, USA) tříděním průtokovou cytometrií.

Získané CD4+ CD45RA+ T buňky byly 99% čistoty. DC kultury byly umístěny do 96 jamkových ploten s plochým dnem (Corning, Corning, NY, USA) v různých koncentracích a byly inkubovány po 16 - 18 hodin s hHNP v konečné koncentraci 10 μ g/ml. Antigenem pulsované DC byly ozářeny (10 Gy) a autologní CD4+ CD45RA+ T lymfocyty byly přidány (5 x 10⁴/jamku). Proliferativní odpověď T buněk byla měřena vychytáváním (³H) thymidinu (1 μ Ci/jamku), který byl

21.10.97

přidán v den 6 na 16 - 18 hodin. Proliferační testy byly provedeny v séru prostém a cytokinu prostém mediu. Výsledky jsou ukázány na obrázku 1. Obrázek 2 ukazuje výsledky testování CD4+ T buněk, od normálního dárce, na odpověď na hHNP. Podobná data byla získána s T buňkami od devíti z desíti normálních jedinců.

Příklad 3

Test pro detekci nízké frekvence lymfocytárních prekursorů

Tři testy byly použity pro detegci CD4+ odpovědí: standardní proliferační test, vyšetřovací metoda pro události s nízkou frekvencí a test limitního ředění (LDA). Běžné proliferační testy jsou schopné snadno detegovat navozené odpovědi. Stimulační index proliferativní odpovědi poskytuje hrubou korelaci s frekvencí prekursorů antigen reaktivních T buněk. Jakákoliv specifická proliferativní odpověď detegovaná z PBL je považována za navozenou odpověď.

Pro poskytnutí více kvantitativní interpretace odpovědí CD4+ T buněk byl použit testovací systém vyvinutý pro detegci odpovědí lymfocytárních prekursorů o nízké frekvenci (popsaný dále). Tento test je jednoduchý a finančně výhodný. Za okolností, kdy je potřeba přesnější určení, je frekvence prekursoru určena testem limitujícího ředění (Bishop and Orosz, Transplantation 47: 671 - 677, 1989).

Odpovědi větší, než jsou detegovány u normálních jedinců jsou definovány jako navozená odpověď a naznačují existující imunitu. Nízké odpovědi, detegovatelné pouze LDA podmínkami, jsou

21.10.97

považovány za nenavozené odpovědi. Absence odpovědi v LDA nebo odpovědi nižší, než jsou definovány pro normální populaci jsou považovány za toleranci/anergii.

Obecně, navozené odpovědi CD4+ T buněk mohou být detegovány v běžných testech proliferace, zatímco nenavozené odpovědi nejsou těmito testy detegovatelné. Detekce malého množství nenavozených T buněk je omezena matoucím pozadím vychytávání thymidinu, které obsahuje autologní smíšenou lymfocytární odpověď (AMLR) na vlastní MHC antigen plus odpovědi na zpracované proteiny vlastního séra a na exogení přidané sérové proteiny.

Pro vyvolání a detegování nenavozených T buněk byl použit testovací systém pro odpovědi o nízké frekvenci založený na Poissonově statistice vzorku (v: Pinnacles, Chiron Corporation, 1: 1 - 2, 1991). Tento typ analýzy se specificky používá na evy nízké frekvence v tom, že pokud je frekvence prekursoru nižší než počet buněk v replikované kultuře, pak je požadováno mnoho replikátů pro detegování statisticky signifikantního počtu pozitivních. Teoreticky, bude opravena pro autologní odpovědi za zadání známé pozitivní kontroly (jako je PHA nebo tetanický toxoid) a známé negativní kontroly (žádný antige) a hodnocení všech dat od nejnižších do nejvyšších bez ohledu na experimentální skupiny, ke kterým patří. Hraniční hodnota je vypočítána na základě rovnice $= M + (F + SD)$, kde M = aritmetický průměr, $F = 3,29$, faktor z tabulek standardizované normální distribuce vybrány tak, aby ne více než 0,1 % "správně negativních" z normálně distribuovaného pozadí nebylo nad hraniční hodnotou, a SD = standardní odchylka. V tomto vyšetřovacím testu jsou jamky nad hraniční hodnotou považovány za

21.10.97

pravdivě pozitivní v tom, že potenciálně obsahují lymfocyty, které jsou specificky proliferující proti požadovanému antigenu. Ačkoliv hodnocení frekvence prekursorů lymfocytů je možné za použití této metody, přesné určení vyžaduje formální LDA analýzy.

Příklad 4

Vakcina založená na HER-2/neu polypeptidu zvyšuje imunitu vůči HER-2/neu proteinu

A. Zvířata

Krysy použité v této studii byly Fischer kmen 344 (CDF (F-344)/CrlBR) (Charles River Laboratories, Portage MI). Zvířata byla chována v University of Washington Animal facilities za specifických podmínek bez patogenů a rutinně byla používána pro studie ve věku 3 a 4 měsíce.

B. Imunizace

Fischer krysy byly imunizovány rekombinantním krysím HER-2/neu polypeptidem (rHNP) v různých adjuvans (MPL, Vacci; Rib, Bozeman, MT, USA). Zvířata dostala 50 µg rHNP smíšeného s adjuvans subkutánně. O dvacet dní později byla zvířatům podána dosycovací dávka v druhé imunizaci za podání 50 µg rHNP podaného stejným způsobem. Dvacet dní po dosycovací imunizaci byla zvířata testována na přítomnost protilátek namířených proti krysímu HER-2/neu proteinu (neu).

21.10.97

C. Buněčné linie

Dvě buněčné linie byly použity jako zdroj neu proteinů. SKBR3, lidská buněčná linie rakoviny prsu, která se vyznačuje nadměrnou expresí HER-2/neu (American Type Culture Collection, Rockville, MD) byla uchovávána v kultuře v 10% fetálním hovězím séru (FBS) (Gemini Bioproducts, Inc., Calabasas, CA) a RPMI. DHFR-G8, NIH(3T3 buněčná linie kotransfektovaná s cneu-p a pSV2-DHFR (American Type Culture Collection, Rockville, MD) byla použita jako zdrojnetransformujícího krysího neu proteinu (Bernards et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6854 - 6858, 1987). Tato buněčná linie byla uchovávána v 10% FBS a Dulbecco modifikovaném Eaglově mediu s 4,5 g/l glukosy. DHFR-G8 buňky byly pasážovány přes stejné medium doplněné 0,3 μ M methotrexatem v každé třetí pasáži pro udržení neu transfektantů.

D. Příprava buněčných lysátů

Lysáty jak SKBR3, tak DHFR-G8 byly připraveny a použity jako zdroj neu proteinu. Stručně, byl připraven pufr pro lýsu, který se skládal z tris base, chloridu sodného a Triton-X (1%) pH 7,5. Byly přidány inhibitory proteas; aprotinin (1 μ g/ml), benzamidin (1 mM) a PMSF (1 mM). 1 ml pufru pro lýsu byl použit pro suspendování 10^7 buněk. Buňky byly vortexovány po 15 sekund každých 10 minut po jednu hodinu, dokud nebyly narušeny. Pšechny postupy byly provedeny na ledu v místnosti s teplotou 4 °C. Po narušení byly buňky mikrofugovány při 4 °C po 20 minut.

Ze supernatantu byla odstraněna buněčná drť a byl uskladněn v malých aliquotách při -70 °C do použití. Přítomnost lidského a krysího neu v lysátech byla dokumentována Western blot analýzami.

21.10.97

E. ELISA na krysí neu protilátkovou odpověď

96 jamkové Immulon 4 plotny (Baxter SP, Redmond, WA: Dynatech Laboratories) byly inkubovány přes noc při 4 °C s krysí neu specifickou monoklonální protilátkou (Oncogene Science), 7.16.4, v koncentraci 10 µg/ml ředěnou v karbonátovém pufru (ekvimolární koncentrace Na₂CO₃ a NaHCO₃, pH 9,6). Po inkubaci byly všechny jamky blokovány PBS-1% BSA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), 100 µg/jamku po 3 hodiny při pokojové teplotě. Plotna byla promyta PBS-0,5% Tween a a lysáty DHFRG8, myší buněčné linie transfektované krysí neu DNA (American Type Culture Collection, Rockville, MD); zdroj krysího neu proteinu, byly přidány. Plotna byla inkubována přes noc při 4 °C. Plotna byla potom promyta PBS-0,5% Tween a pokusné sérum bylo přidáno v následujících ředěních: 1:25 až 1:200. Sérum bylo ředěno v PBS-1% BSA-1% FBS-25 µg/ml myší IgG-0,01% NaN₃ a potom seriově do PBS-1% BSA. 50 µl ředěného séra bylo přidáno na jamku a inkubováno po jednu hodinu při pokojové teplotě. Každé pokusné sérum bylo přidáno do jamky s krysím neu a do jamky bez krysího neu. Ovčí anti-krysí Ig F(ab')₂ křenová peroxidasa (HRP) byly přidány do jamek v ředění 1:5000 v PBS-1% BSA a byly inkubovány po 45 minut při pokojové teplotě (Amersham Co., Arlington Heights, IL, USA). Po konečném promytí bylo přidáno TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) vývojové reagens. Byla čtena optická densita barevné reakce při 450 nm. OD pro každé ředěné séra byla kalkulována jako OD krysím neu potažených jamek minus OD PBS-1% BSA potažených jamek. Sérum od zvířat imunizovaných samotným adjuvans a zvířat imunizovaných hHNP (cizorodým proteinem) byla také hodnocena obdobným způsobem. Výsledky jsou ukázány na obrázku 3.

21.10.97

F. Testy proliferace T buněk

Pro analýzu specifických odpovědí na HER-2/neu polypeptid: čerstvé buňky sleziny nebo lymfatické uzliny jsou získány mechanickým poškozením a pásáží přes drátěné síto a promytím. 2×10^5 buněk sleziny na jamku a 1×10^5 buněk lymfatické uzliny na jamku bylo umístěno na 96 jamkovou mikrotitrační plotnu s plochým dnem (Corning, Corning, NY) s šesti replikáty na pokusnou skupinu. Medium se skládalo z EHAA 120 (Biofluids) s L-glutaminem, penicilin/streptomycinem, 2-merkapttoethanolem a 5% FBS. Buňky byly inkubovány s polypeptidy. Po 4 dnech byly jamky pulsovány $1 \mu\text{Ci}$ (^3H) thymidinu na 6 - 8 hodin a počítány. Data jsou vyjádřena jako stimulační index (SI), který je definován jako průměr pokusných jamek dělený průměrem kontrolních jamek (bez antigenu). Pro analýzu specifických odpovědí na HER-2/neu protein: čerstvé buňky sleziny nebo lymfatické uzliny jsou kultivovány pro tři in vitro stimulace. V době analýz je 1×10^5 T buněk sleziny nebo lymfatické uzliny umístěno na 96 jamkovou mikrotitrační plotnu jak je popsáno výše. Buňky jsou inkubovány s $1 \mu\text{g/ml}$ imunoafinitní kolonou purifikovaného krysího neu (z DHFR-G8 buněk jako zdroje krysího neu). Po 4 dnech byly jamky pulsovány $1 \mu\text{Ci}$ (^3H) thymidinu na 6 - 8 hodin a počítány. Data jsou vyjádřena jako stimulační index, který je definován jako průměr pokusných jamek dělený průměrem kontrolních jamek (bez antigenu).

Příklad 5

Navozená odpověď k lidskému HER-2/neu polypeptidu může být detegována u pacientů s rakovinou prsu

21.10.97

Heparinizovaná krev byla získána od pacientů se stadiem II rakoviny prsu s nadměrnou expresí HER-2/neu. Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly separovány Ficoll Hypaque centrifugací podle density. PBMC byly umístěny v koncentraci 2×10^5 /jamku na 96 jamkovou mikrotitrační plotnu s plochým dnem (Corning, Corning, NY). Pro každou pokusnou skupinu bylo provedeno 24 replikátů jamek. Antigeny skládající se z HER-2/neu odvozených peptidů (15 - 20 aminokyselin délky s uvedeným číslem první aminokyseliny v sekvenci) 25 µg/ml, lidský HER-2/neu polypeptid (hHNP) 1 µg/ml, tetanický toxoid 1 µg/ml, a p30 peptid odvozený od tetanu 25 µg/ml, byly přidány do každé z replikovatelných 24 jamek. Test byl proveden v mediu obsahujícím 10% lidské sérum. proliferativní odpověď T buněk byla měřena vychytáváním (^3H) thymidinu (1 µCi/jamku) přidáním v den 4 na dobu 10 hodin. Pozitivní jamky, antigen reaktivní jamky, byly skorovány jako pozitivní, pokud bylo cpm vyšší než průměr a 3 standardní odchylky jamek bez antigenu. Výsledky jsou ukázány na obrázku 4. Tito pacienti se II. stadiem rakoviny prsu mají signifikantní odpověď na rekombinantní hHNP.

Z předešlého popisu je jasné, že ačkoliv specifická provedení vynálezu zde byla popsána za účelem ilustrace, mohou být provedeny různé modifikace bez narušení smyslu a rozsahu vynálezu.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Přihlašovatel: University of Washington

(ii) Název vynálezu: Sloučeniny pro vyvolání nebo posílení imunitní reaktivity k HER-2/neu proteinu pro prevenci nebo léčbu malignit, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován

(iii) Počet sekvencí: 4

(iv) Adresa pro korespondenci

(A) Adresa: Seed and Berry LLP

(B) Ulice: 6300 Columbia Center. 701 Fifth Avenue

(C) Město: Seattle

(D) Stát: Washington

(E) Země: USA

(F) ZIP: 98104-7092

(v) Počítačová čtecí forma:

(A) Typ media: Floppy disk

(B) Počítač: IBM PC kompatibilní

(C) Operační system: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, verze #1.30

(vi) Údaje o současné přihlášce:

(A) Číslo přihlášky:

(B) Datum podání: 28.3.1996

(C) Klasifikace:

21.10.97

(viii) Zástupce/agent informace

- (A) Jméno: Sharkey, Richard G.
- (B) Registrační číslo: 32629
- (C) Reference/číslo rejstříku: 920010.448PC

(ix) Telekomunikační informace:

- (A) Telefon: (206) 622-4900
- (B) Telefax: (206) 682-6031

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 334 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(ix) Vlastosti:

- (A) Jméno/klíč: CDS
- (B) Umístění: 1...3765

21.10.97

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 1:

ATG GAG CTG GCG GCC TTG TGC CGC TGG GGG CTC CTC CTC GCC CTC TTG	48
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu	
1 5 10 15	
CCC CCC GGA GCC GCG AGC ACC CAA GTG TGC ACC GGC ACA GAC ATG AAG	96
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys	
20 25 30	
CTG CGG CTC CCT GCC AGT CCC GAG ACC CAC CTG GAC ATG CTC CGC CAC	144
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His	
35 40 45	
CTC TAC CAG GGC TGC CAG GTG GTG CAG GGA AAC CTG GAA CTC ACC TAC	192
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr	
50 55 60	
CTG CCC ACC AAT GCC AGC CTG TCC TTC CTG CAG GAT ATC CAG GAG GTG	240
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val	
65 70 75 80	
CAG GGC TAC GTG CTC ATC GCT CAC AAC CAA GTG AGG CAG GTC CCA CTG	288
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu	
85 90 95	
CAG AGG CTG CGG ATT GTG CGA GGC ACC CAG CTC TTT GAG GAC AAC TAT	336
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr	
100 105 110	
GCC CTG GCC GTG CTA GAC AAT GGA GAC CCG CTG AAC AAT ACC ACC CCT	384
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro	

21.10.97

115	120	125	
GTC ACA GGG GCC TCC CCA GGA GGC CTG CGG GAG CTG CAG CTT CGA AGC Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser 130 135 140			432
CTC ACA GAG ATC TTG AAA GGA GGG GTC TTG ATC CAG CGG AAC CCC CAG Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln 145 150 155 160			480
CTC TGC TAC CAG GAC ACG ATT TTG TGG AAG GAC ATC TTC CAC AAG AAC Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn 165 170 175			528
AAC CAG CTG GCT CTC ACA CTG ATA GAC ACC AAC CGC TCT CGG GCC TGC Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys 180 185 190			576
CAC CCC TGT TCT CCG ATG TGT AAG GGC TCC CGC TGC TGG GGA GAG AGT His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser 195 200 205			624
TCT GAG GAT TGT CAG AGC CTG ACG CGC ACT GTC TGT GCC GGT GGC TGT Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys 210 215 220			672
GCC CGC TGC AAG GGG CCA CTG CCC ACT GAC TGC TGC CAT GAG CAG TGT Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys 225 230 235 240			720
GCT GCC GGC TGC ACG GGC CCC AAG CAC TCT GAC TGC CTG GCC TGC CTC Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu 245 250 255			768
CAC TTC AAC CAC AGT GGC ATC TGT GAG CTG CAC TGC CCA GCC CTG GTC His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val 260 265 270			816
ACC TAC AAC ACA GAC ACG TTT GAG TCC ATG CCC AAT CCC GAG GGC CGG Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg 275 280 285			864
TAT ACA TTC GGC GCC AGC TGT GTG ACT GCC TGT CCC TAC AAC TAC CTT Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu 290 295 300			912

TCT ACG GAC GTG GGA TCC TGC ACC CTC GTC TGC CCC CTG CAC AAC CAA Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln 305 310 315 320	960
GAG GTG ACA GCA GAG GAT GGA ACA CAG CGG TGT GAG AAG TGC AGC AAG Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys 325 330 335	1008
CCC TGT GCC CGA GTG TGC TAT GGT CTG GGC ATG GAG CAC TTG CGA GAG Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu 340 345 350	1056
GTG AGG GCA GTT ACC AGT GCC AAT ATC CAG GAG TTT GCT GGC TGC AAG Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys 355 360 365	1104
AAG ATC TTT GGG AGC CTG GCA TTT CTG CCG GAG AGC TTT GAT GGG GAC Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp 370 375 380	1152
CCA GCC TCC AAC ACT GCC CCG CTC CAG CCA GAG CAG CTC CAA GTG TTT Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe 385 390 395 400	1200
GAG ACT CTG GAA GAG ATC ACA GGT TAC CTA TAC ATC TCA GCA TGG CCG Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro 405 410 415	1248
GAC AGC CTG CCT GAC CTC AGC GTC TTC CAG AAC CTG CAA GTA ATC CGG Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg 420 425 430	1296
GGA CGA ATT CTG CAC AAT GGC GCC TAC TCG CTG ACC CTG CAA GGG CTG Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu 435 440 445	1344
GGC ATC AGC TGG CTG GGG CTG CGC TCA CTG AGG GAA CTG GGC AGT GGA Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly 450 455 460	1392
CTG GCC CTC ATC CAC CAT AAC ACC CAC CTC TGC TTC GTG CAC ACG GTG Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val 465 470 475 480	1440

CCC TGG GAC CAG CTC TTT CGG AAC CCG CAC CAA GCT CTG CTC CAC ACT	1488
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr	
485 490 495	
GCC AAC CGG CCA GAG GAC GAG TGT GTG GGC GAG GGC CTG GCC TGC CAC	1536
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His	
500 505 510	
CAG CTG TGC GCC CGA GGG CAC TGC TGG GGT CCA GGG CCC ACC CAG TGT	1584
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys	
515 520 525	
GTC AAC TGC AGC CAG TTC CTT CGG GGC CAG GAG TGC GTG GAG GAA TGC	1632
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys	
530 535 540	
CGA GTA CTG CAG GGG CTC CCC AGG GAG TAT GTG AAT GCC AGG CAC TGT	1680
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys	
545 550 555 560	
TTG CCG TGC CAC CCT GAG TGT CAG CCC CAG AAT GGC TCA GTG ACC TGT	1728
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys	
565 570 575	
TTT GGA CCG GAG GCT GAC CAG TGT GTG GCC TGT GCC CAC TAT AAG GAC	1776
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp	
580 585 590	
CCT CCC TTC TGC GTG GCC CGC TGC CCC AGC GGT GTG AAA CCT GAC CTC	1824
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu	
595 600 605	
TCC TAC ATG CCC ATC TGG AAG TTT CCA GAT GAG GAG GGC GCA TGC CAG	1872
Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln	
610 615 620	
CCT TGC CCC ATC AAC TGC ACC CAC TCC TGT GTG GAC CTG GAT GAC AAG	1920
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys	
625 630 635 640	
GGC TGC CCC GCC GAG CAG AGA GCC AGC CCT CTG ACG TCC ATC ATC TCT	1968
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser	
645 650 655	
GCG GTG GTT GGC ATT CTG CTG GTC GTG GTC TTG GGG GTG GTC TTT GGG	2016

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly	
660 665 670	
ATC CTC ATC AAG CGA CGG CAG CAG AAG ATC CGG AAG TAC ACG ATG CGG	2064
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg	
675 680 685	
AGA CTG CTG CAG GAA ACG GAG CTG GTG GAG CCG CTG ACA CCT AGC GGA	2112
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly	
690 695 700	
GCG ATG CCC AAC CAG GCG CAG ATG CGG ATC CTG AAA GAG ACG GAG CTG	2160
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu	
705 710 715 720	
AGG AAG GTG AAG GTG CTT GGA TCT GGC GCT TTT GGC ACA GTC TAC AAG	2208
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys	
725 730 735	
GGC ATC TGG ATC CCT GAT GGG GAG AAT GTG AAA ATT CCA GTG GCC ATC	2256
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile	
740 745 750	
AAA GTG TTG AGG GAA AAC ACA TCC CCC AAA GCC AAC AAA GAA ATC TTA	2304
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu	
755 760 765	
GAC GAA GCA TAC GTG ATG GCT GGT GTG GGC TCC CCA TAT GTC TCC CGC	2352
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg	
770 775 780	
CTT CTG GGC ATC TGC CTG ACA TCC ACG GTG CAG CTG GTG ACA CAG CTT	2400
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu	
785 790 795 800	
ATG CCC TAT GGC TGC CTC TTA GAC CAT GTC CGG GAA AAC CGC GGA CGC	2448
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg	
805 810 815	
CTG GGC TCC CAG GAC CTG CTG AAC TGG TGT ATG CAG ATT GCC AAG GGG	2496
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly	
820 825 830	
ATG AGC TAC CTG GAG GAT GTG CGG CTC GTA CAC AGG GAC TTG GCC GCT	2544
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala	

21.10.97

835	CGG AAC GTG CTG GTC AAG AGT CCC AAC CAT GTC AAA ATT ACA GAC TTC Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe 850 855 860	2592
840	GGG CTG GCT CGG CTG CTG GAC ATT GAC GAG ACA GAG TAC CAT GCA GAT Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp 865 870 875 880	2640
845	GGG GGC AAG GTG CCC ATC AAG TGG ATG GCG CTG GAG TCC ATT CTC CGC Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg 885 890 895	2688
	CGG CGG TTC ACC CAC CAG AGT GAT GTG TGG AGT TAT GGT GTG ACT GTG Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val 900 905 910	2736
	TGG GAG CTG ATG ACT TTT GGG GCC AAA CCT TAC GAT GGG ATC CCA GCC Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala 915 920 925	2784
	CGG GAG ATC CCT GAC CTG CTG GAA AAG GGG GAG CGG CTG CCC CAG CCC Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro 930 935 940	2832
	CCC ATC TGC ACC ATT GAT GTC TAC ATG ATC ATG GTC AAA TGT TGG ATG Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met 945 950 955 960	2880
	ATT GAC TCT GAA TGT CGG CCA AGA TTC CGG GAG TTG GTG TCT GAA TTC Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe 965 970 975	2928
	TCC CGC ATG GCC AGG GAC CCC CAG CGC TTT GTG GTC ATC CAG AAT GAG Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu 980 985 990	2976
	GAC TTG GGC CCA GCC AGT CCC TTG GAC AGC ACC TTC TAC CGC TCA CTG Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu 995 1000 1005	3024
	CTG GAG GAC GAT GAC ATG GGG GAC CTG GTG GAT GCT GAG GAG TAT CTG Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu 1010 1015 1020	3072

GTA CCC CAG CAG GGC TTC TTC TGT CCA GAC CCT GCC CCG GGC GCT GGG	3120
Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly	
1025 1030 1035 1040	
GGC ATG GTC CAC CAC AGG CAC CGC AGC TCA TCT ACC AGG AGT GGC GGT	3168
Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly	
1045 1050 1055	
GGG GAC CTG ACA CTA GGG CTG GAG CCC TCT GAA GAG GAG GCC CCC AGG	3216
Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg	
1060 1065 1070	
TCT CCA CTG GCA CCC TCC GAA GGG GCT GGC TCC GAT GTA TTT GAT GGT	3264
Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly	
1075 1080 1085	
GAC CTG GGA ATG GGG GCA GCC AAG GGG CTG CAA AGC CTC CCC ACA CAT	3312
Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His	
1090 1095 1100	
GAC CCC AGC CCT CTA CAG CGG TAC AGT GAG GAC CCC ACA GTA CCC CTG	3360
Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu	
1105 1110 1115 1120	
CCC TCT GAG ACT GAT GGC TAC GTT GCC CCC CTG ACC TGC AGC CCC CAG	3408
Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln	
1125 1130 1135	
CCT GAA TAT GTG AAC CAG CCA GAT GTT CGG CCC CAG CCC CCT TCG CCC	3456
Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro	
1140 1145 1150	
CGA GAG GGC CCT CTG CCT GCT GCC CGA CCT GCT GGT GCC ACT CTG GAA	3504
Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu	
1155 1160 1165	
AGG CCC AAG ACT CTC TCC CCA GGG AAG AAT GGG GTC GTC AAA GAC GTT	3552
Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val	
1170 1175 1180	
TTT GCC TTT GGG GGT GCC GTG GAG AAC CCC GAG TAC TTG ACA CCC CAG	3600
Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln	
1185 1190 1195 1200	

GGA GGA GCT GCC CCT CAG CCC CAC CCT CCT CCT GCC TTC AGC CCA GCC Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala 1205 1210 1215	3648
TTC GAC AAC CTC TAT TAC TGG GAC CAG GAC CCA CCA GAG CGG GGG GCT Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala 1220 1225 1230	3696
CCA CCC AGC ACC TTC AAA GGG ACA CCT ACG GCA GAG AAC CCA GAG TAC Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr 1235 1240 1245	3744
CTG GGT CTG GAC GTG CCA GTG TGA Leu Gly Leu Asp Val Pro Val 1250 1255	3768

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 1255 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

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

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

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

21.10.97

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815

21.10.97

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
1010 1015 1020

Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
1025 1030 1035 1040

Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly
1045 1050 1055

21.10.97

Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg
 1060 1065 1070

Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly
 1075 1080 1085

Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His
 1090 1095 1100

Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
 1105 1110 1115 1120

Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln
 1125 1130 1135

Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro
 1140 1145 1150

Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1155 1160 1165

Arg Pro Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1170 1175 1180

Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln
 1185 1190 1195 1200

Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
 1205 1210 1215

Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1220 1225 1230

Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 48 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 3:

TCTGGCGCGC TGGATGACGA TGACAAGAAA CGACGGCAGC AGAAGATC 48

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 39 párů basí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Řetězec: jednoduchý
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence:SEQ ID NO: 4:

TGAATTCTCG AGTCATTACA CTGGCACGTC CAGACCCAG

39


JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELAR
VŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

21.10.97

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Polypeptid kodovaný DNA sekvencí vybranou z:

a) nukleotidů 2026 až 3765 SEQ ID NO: 1; a

b) DNA sekvencí, které hybridizují na nukleotidovou sekvenci komplementární k nukleotidům 2026 až 3765 SEQ ID NO: 1 za středně přísných podmínek, kde DNA sekvence koduje polypeptid, který produkuje imunitní odpověď na HER-2/neu protein.

2. Polypeptid mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od lysinu, aminokyseliny 676, do valinu, aminokyseliny 1255, nebo jeho varianta, která produkuje alespoň ekvivalentní imunitní odpověď.

3. Polypeptid podle nároku 2, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 od aminokyseliny 676 do aminokyseliny 1255.

4. Kompozice obsahující polypeptid podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 v kombinaci s farmaceuticky akceptovatelným nosičem nebo ředidlem.

5. Polypeptid podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 nebo kompozice podle nároku 4 pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

6. Použití polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1, 2

21.10.97

nebo 3 nebo kompozice podle nároku 4 pro výrobu léčiva pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

7. Molekula nukleové kyseliny řídící expresi polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro imunizaci transfekcí buněk teplokrevného zvířete molekulou nukleové kyseliny.

8. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 7, kde buňky jsou transfektovány ex vivo a následně podány zvířeti.

9. Použití molekuly nukleové kyseliny řídící expresi polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro výrobu léčiva pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

10. Virový vektor řídící expresi polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro imunizaci infekcí buněk teplokrevných zvířat vektorem.

11. Virový vektor podle nároku 10, kde buňky jsou infikovány ex vivo a následně podány zvířeti.

12. Použití virového vektoru řídícího expresi polypeptidu podle jakéhokoliv z nároků 1, 2 nebo 3 pro výrobu léčiva pro imunizaci teplokrevných zvířat proti malignitám, se kterými je HER-2/neu onkogen asociován.

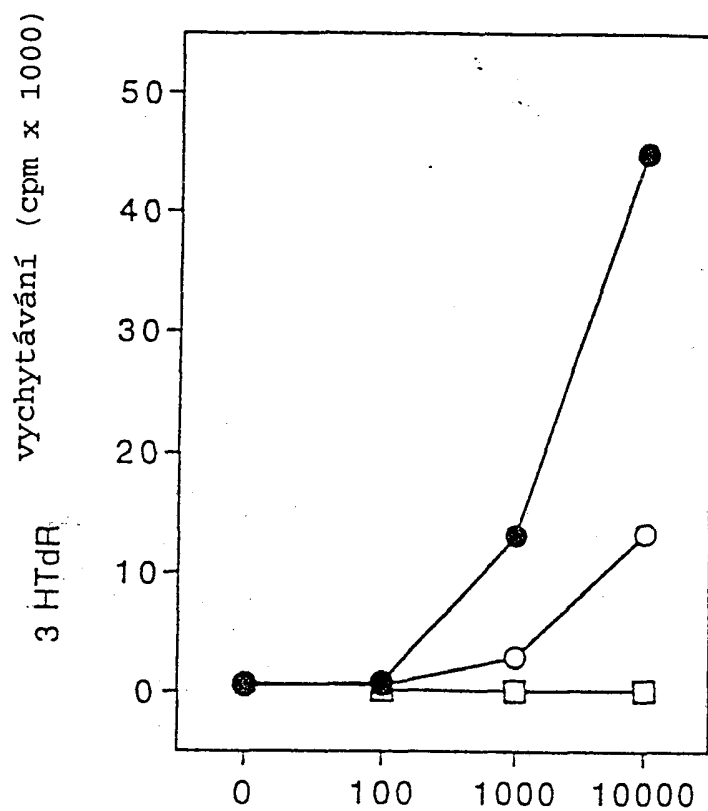


JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

SPOLEČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELARIE
JŠETEČKA ZELENÝ ŠVORČÍK KALENSKÝ
A PARTNEŘI
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika

21.10.97

1/4



Počet stimulačních buněk na jamku

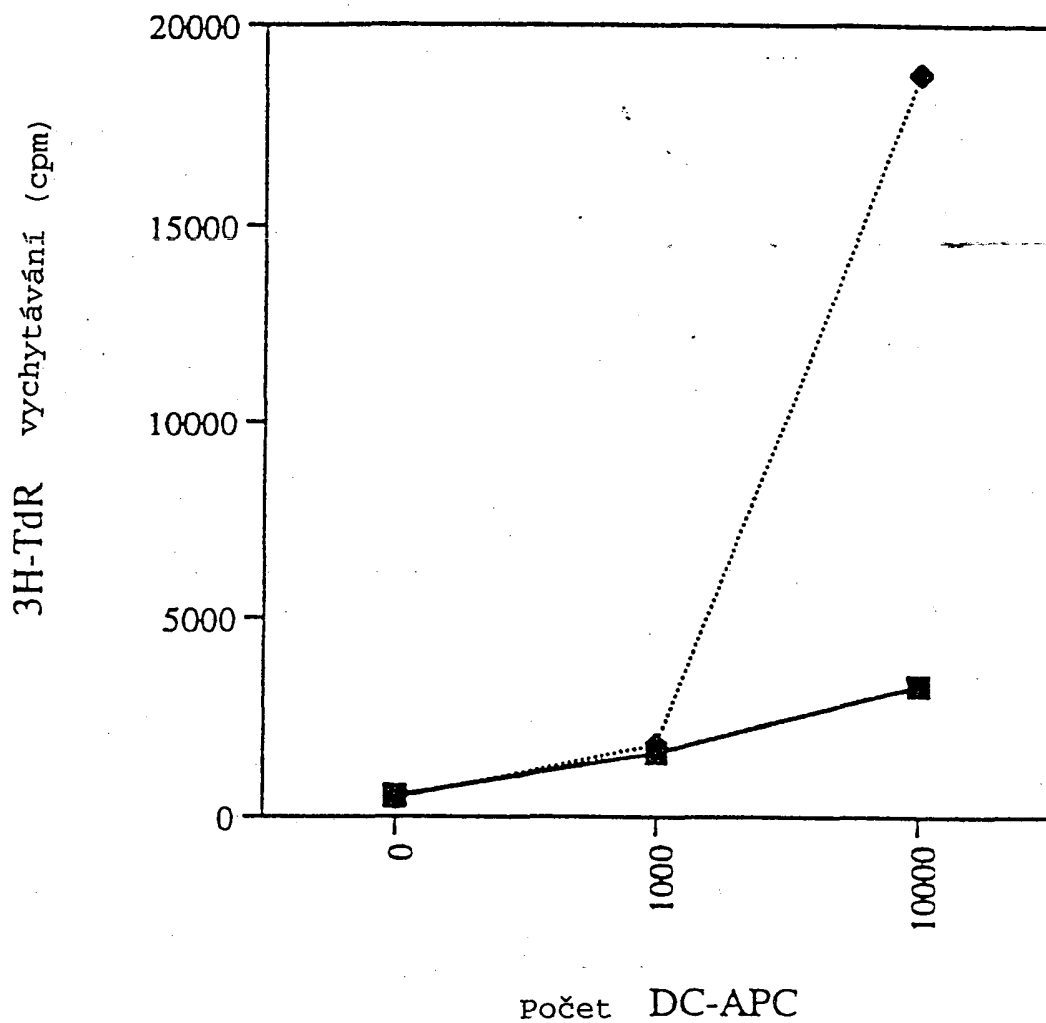
Obrázek 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

JUDr. Petr Kleník
advokát

21.10.97

2/4



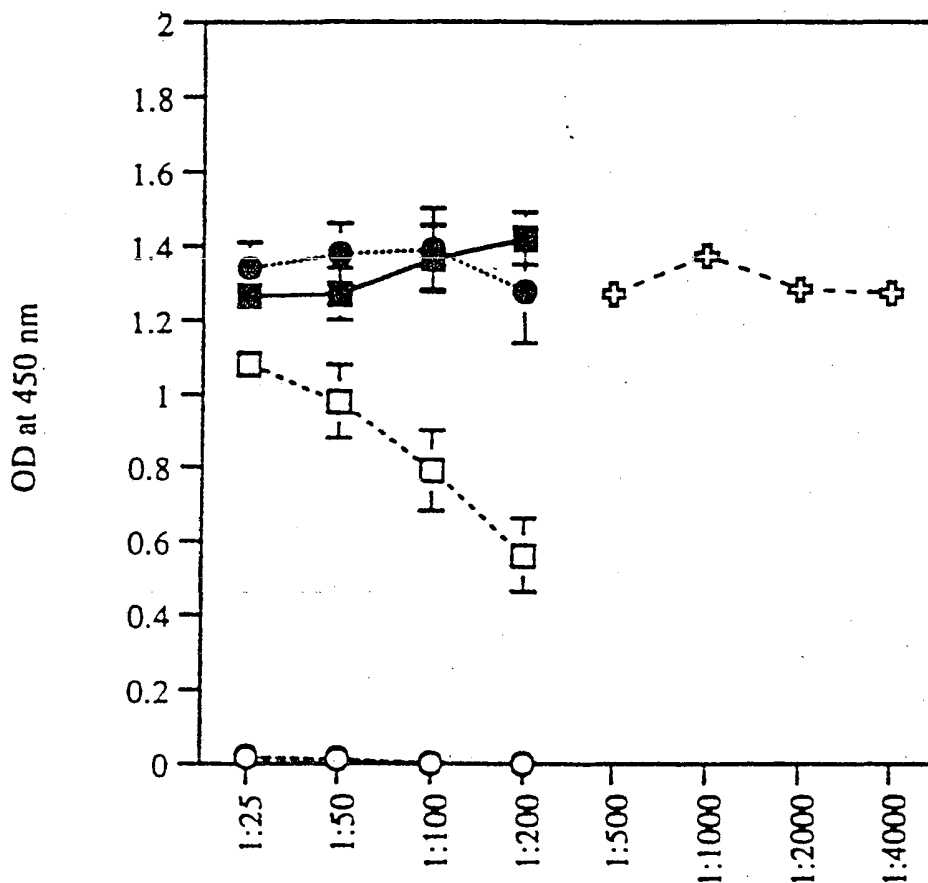
Obrázek 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[Signature]
JUDr. Petr VALENSKÝ
advokát

21.10.97

3/4



titr ke krysímu neu

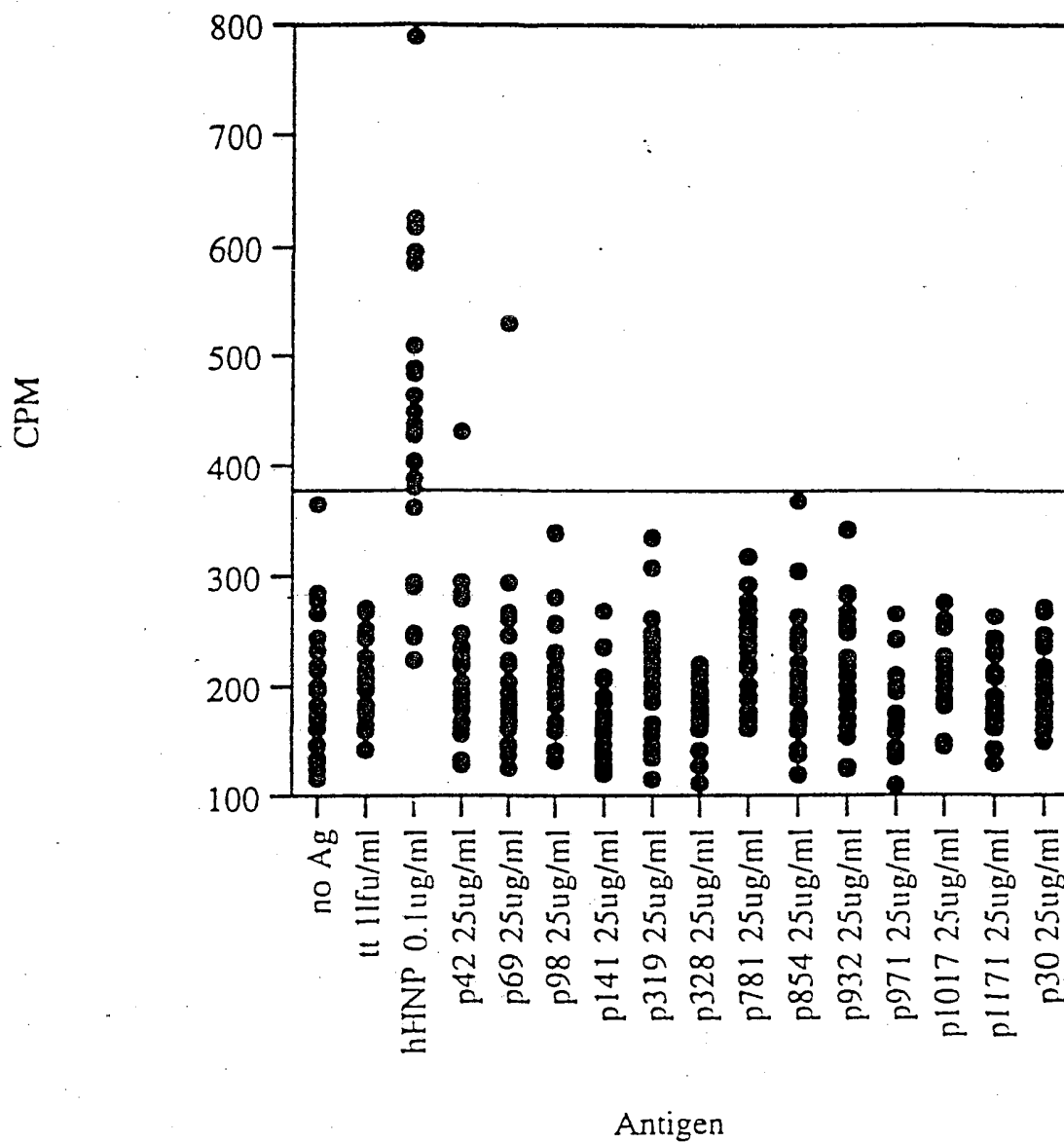
Obrázek 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)


JUDr. Petr KALENSKÝ
advokát

21.10.97

4/4



Obrázek 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

JUDr. Petr
advokát