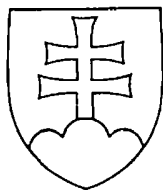


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

(11), (21) Číslo dokumentu:

78-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷:

**A61K 39/39,
A61K 39/385,
A61K 39/21,
A61K 39/00**

- (22) Dátum podania prihlášky: **21. 7. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/144 965**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **21. 7. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **5. 8. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **8/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/19816**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/07081**

(71) Prihlasovateľ: **LEXIGEN PHARMACEUTICALS, CORPORATION, Lexington, MA, US;**

(72) Pôvodca: **Gillies Stephen D., Carlisle, MA, US;
Lo Kin-Ming, Lexington, MA, US;
Wesolowski John S., Jr., Weymouth, MA, US;**

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Kompozícia na vyvolanie imunitnej odpovede, jej použitie, kit, fúzny proteín, nukleová kyselina a expresný vektor**

(57) Anotácia:
Sú opísané spôsoby a prípravky na zosilnenie imunogenicity preselektovaného antigénneho proteínu alebo peptidu cicavca. Imunogenicitu je zosilnená fúziou preselektovaného antigénu ku konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu za vzniku Fc-antigénneho fúzneho proteínu. Fc-antigénne fúzne proteíny viažu Fc receptory na povrchu buniek prezentujúcich antigén, čím cieľia antigén k bunkám prezentujúcim antigén cicavca. Okrem toho je opísaná rodina adjuvancií, napríklad Fc-adjuvantný fúzny proteín, na použitie s Fc-antigénnymi fúznymi proteínmi na zosilnenie alebo moduláciu konkrétnej imunitnej reakcie proti preselektovanému antigénu.

Kompozícia na vyvolanie imunitnej odpovede, jej použitie, kit, fúzny proteín, nukleová kyselina a expresný vektor

Táto prihláška si nárokuje prioritu z U.S.S.N. 60/144 965, podanej 21. júla, 1999, ktorej opis je zahrnutý formou odkazu v tomto texte.

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka spôsobov a prípravkov na zosilnenie imunogenicity preselektovaného antigénneho proteínu alebo peptidu cicavca. Konkrétne sa vynález týka spôsobov a prípravkov obsahujúcich kódujúce nukleové kyseliny a aminokyselinové sekvencie definujúce fúzne proteíny obsahujúce konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu a preselektovaný antigén, pričom preselektovaný antigén vo fúznom proteíne je schopný u cicavca vyvolať silnejšiu imunitnú reakciu v porovnaní s preselektovaným antigénom samotným.

Doterajší stav techniky

Vývoj vakcín je tradične zameraný na vytváranie protektívnych protilátok schopných neutralizovať infekčné agens. Až doposiaľ agens používaná ako vakcíny typicky obsahovala inaktivované alebo oslabené mikroorganizmy (napríklad baktérie alebo vírusy), ich produkty (napríklad toxíny) alebo purifikované antigény. S nástupom modernej molekulárnej biológie a metód klonovania génov je možné vyrobiť čistejšie a oveľa špecifickejšie vakcíny. Okrem toho znalosť imunitného systému na molekulárnej úrovni umožnila

PP 78-2002

izoláciu a charakterizáciu imunitných reakciou stimulovaných infekčnými agens. Dve zložky imunitného systému, o ktorých sa predpokladá, že sú ústredné na úspešnú tvorbu imunitných reakcií, zahŕňajú: hlavnú úlohu regulačných a cytotoxických T lymfocytov a spôsob, ktorým je týmto bunkám prezentovaný antigén bunkami prezentujúcimi antigén (antigén presenting cell - APC). (pozri napríklad W. E. Paul, vyd. (1993) Fundamentals Of Immunology, Raven Press, Ltd., New York).

Typicky je antigénny proteín alebo peptid prijatý z vonkajšku APC (exogénny antigén) degradovaný v endocytárnom vezikule alebo endozóme APC, hneď potom výsledné peptidové fragmenty tvoria komplex s proteínmi hlavného histokompatibilného systému (MHC) II. triedy. Výsledný komplex sa presunie na bunkový povrch, kde je vystavený imunitným bunkám obklopujúcim APC. Peptidový fragment je prispôsobený priestoru definovanom MHC molekulou a komplex môže byť rozpoznávaný T lymfocytom exprimujúcim receptor lymfocytu T, ktorý má pre komplex väzbovú špecificitu. Interakcia medzi molekulou MHC II. triedy opatrenou peptidom a pomocným T lymfocytom, nazývaným v odbore T lymfocytom CD4, je ďalej stabilizovaná ďalšou interakciou medzi molekulou MHC II. triedy samotnou a CD4+ receptorom na povrchu T lymfocytu. Teda exogénny antigén, ktorý je spracovaný v APC bunkách, je predložený na bunkovom povrchu prostredníctvom molekúl MHC II. triedy. Komplex MHC II. triedy, keď je prezentovaný CD4+ T lymfocytom, vedie na to, že CD4+ pomocné lymfocyty sekretujú cytokíny, ktoré stimulujú B lymfocyty na tvorbu protilátok proti peptidu. (pozri Paul, vyššie).

Vakcinácia exogénnym antigénom má typicky za následok CD4 lymfocytmi sprostredkovanú T lymfocytárnu reakciu, ktorá všeobecne končí produkciou protilátky. Cytotoxické T lymfocyty

(CTL) nie sú touto dráhou typicky stimulované. CTL sú zjavne stimulované v situáciách, keď antigén vzniká z vnútrajšku APC samotnej (endogénny antigén), napríklad prostredníctvom produkcie vírusových proteínov v bunke infikovanej vírusom alebo proteínov špecifických pre nádory v karcinómových bunkách. V skutočnosti sa pre množstvo vírusových ochorení verí, že vytvorenie CTL je rozhodujúce na elimináciu buniek infikovaných vírusom, a teda zotavenie z infekcie.

Štúdie ukazujú, že endogénne a exogénne antigény sú spracovávané odlišne. Počas syntézy vznikajúcich polypeptidov je časť polypeptidu degradovaná intracelulárnou štruktúrou nazývanou proteozóm. Fragментy z tohto procesu tvoria komplex s novo syntetizovanými molekulami MHC I. triedy skôr ako MHC II. triedy, hneď potom výsledné komplexy MHC I. triedy obsahujúce antigén sú transportované na bunkový povrch. Opäť T lymfocyty so špecificitou pre špecifický peptidový fragment viažu T lymfocyty, ale v tomto prípade potrebná interakcia koreceptorov nastáva medzi molekulou MHC I. triedy a CD8 molekulou. V súlade s tým je endogénny antigén na povrchu APC prezentovaný CD8+ T lymfocytom. Aj keď existujú niektoré typy CD8+ T lymfocytov, ktoré nie sú cytotoxické, CD8+ T lymfocyty tvoria väčšinu CTL.

Preto sa zdá, že návrh/konštrukcia vakcíny schopnej indukovať silnú CTL reakciu vyžaduje, aby antigénna molekula (všeobecne proteín) bola buď vytvorená vo vnútri bunky alebo dopravená do vhodného bunkového kompartmentu, aby mohla vstúpiť do dráhy MHC I. triedy. Jedna stratégia je zaviesť gén kódujúci požadovaný proteín alebo peptid do vírusu, a potom použiť modifikovaný vírus ako vakcínu (Lorenz et al. (1999) HUM. GENE THER. 10:623-631). Ďalšou stratégiou je injikovať DNA vektor kódujúci proteín do bunky, a potom podávať bunku

zvieratú alebo pacientovi, kde je exprimovaná bunkou, a je potom predložená na bunkovom povrchu prostredníctvom molekúl MHC I. triedy (Donnelly et al. (1997) ANNU. REV. IMMUNOL. 15:617). Bolo ukázané, že jednoduchšia technika injikovania DNA vektorov priamo do svalu alebo kože indukuje CTL a/alebo protilátkovú reakciu na niekoľko antigénov (Lai et al. (1988) CRIT. REV. IMMUNOL. 18: 449-84 a patent Spojených Štátov č. 5 589 466). Štúdie ukázali, že antigén je zabraný a spracovaný APC, kde je prezentovaný imunitnému systému (Lai et al., vyššie).

Aplikácia exogénnych peptidov alebo proteínov dráhy MHC I. triedy bola čiastočne úspešná vďaka použitiu chemických adjuvancií, ako je napríklad Freundovo adjuvans a zmesi skvalenov a detergentov (Hilgers et al. (1999) VACCINE, 17: 219-228) a novšie vďaka použitiu malých perličiek potiahnutých antigénom, ktoré sú fagocytované makrofágmi a indukujú CTL reakcie prostredníctvom alternatívnej dráhy MHC I. triedy (De Bruijn et al. (1995) EUR. J. IMMUNOL. 25: 1274-1285). Okrem toho ďalšie metódy na zosilnenie imunitnej reakcie na antigén môžu obsahovať použitie chemických adjuvancií v kombinácii s rekombinantnými imunostimulačnými cytokínmi, napríklad IL-2, IL-12, GM-CSF a ďalšími. Napríklad jeden spôsob používa anti-hapténovú protilátku fúzovanú k IL-2 ako spôsob spojenia tohto cytokínu k antigénnemu proteínu, ktorý chemicky reagoval s hapténom (Harvill et al. (1996) J. IMMUNOL. 157:3165).

Ďalšia technika využíva protilátkovú „antigenizáciu“, pomocou ktorej je časť variabilného úseku imunoglobulínu nahradená antigénnym peptidom. Antigénny peptid hybridnej molekuly je prezentovaný APC, akonáhle sa rekombinantná protilátka viaže na APC prostredníctvom interakcie s Fc receptormi na povrchu APC (Lama et al. (1993) PROC. NATL.

ACAD. SCI. USA 90: 11683-11687). Rozšírenie tohto prístupu používa splenickú injekciu plazmidovej DNA kódujúcej „antigenizovaný“ ťažký reťazec imunoglobulínu, po ktorej B lymfocyty pochádzajúce zo sleziny sekretujú rekombinantnú protilátku, akonáhle je poskytnutý partner ľahký reťazec imunoglobulínu.

Imunogenicita aplikačného systému pre antigén je ale jeden z hlavných technických prekážok v rozvoji moderných vakcín. Cieľom vakcinácie je vyvolať silnú imunitnú reakciu. Ale pretože hostiteľský imunitný systém je vyvinutý pre boj proti baktériám a vírusom, keď sú baktérie alebo vírusy použité ako vektory, je posol/vektor typicky zničený spolu so správou. Okrem toho silné imunitné reakcie na určité vírusové vektory, napríklad vakcíniu a adenovírus, obmedzujú ich použiteľnosť a predpokladá sa, že podobné problémy môžu povstať v priebehu použitia bakteriálnych toxínov ako proteínových vektorov. Podobne „proteínové vektory“ založené na protilátke používajúce variabilné úseky, ktoré vďaka svojej vlastnej povahe, nie sú považované za vlastné („self“) imunitným systémom, sú potenciálne imunogénne. Predpokladá sa, že mnohonásobné použitie týchto nosičských molekúl môže indukovať anti-idiotypové reakcie, a tým napred vylúčiť ich účinné použitie. V súlade s tým je predmetom predkladaného vynálezu poskytnúť vakcínu, ktorá vytvorí silnú a dlhodobú imunitu proti preselektovanému antigénnemu proteínu alebo peptidu.

Podstata vynálezu

Tento vynález je čiastočne založený na objave, že je možné zvýšiť imunogenicitu preselektovaného peptidu alebo antigénneho proteínu cicavca fúziou preselektovaného antigénu

ku konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Výsledný fúzny proteín (v tomto texte tiež nazývaný „Fc-antigénny fúzny proteín“ alebo „antigénny fúzny proteín“) alebo sekvencia nukleovej kyseliny kódujúca fúzny proteín potom môžu byť podávané cicavcovi vo forme vakcíny, aby sa vyvolala imunitná reakcia proti preselektovanému antigénu. Okrem toho bolo objavené, že intenzita a typ imunitnej reakcie vyvolanej proti preselektovanému antigénu môžu byť modulované podávaním špecifických adjuvancií spolu s Fc-antigénnym fúznym proteínom alebo sekvenciou nukleovej kyseliny kódujúcou Fc-antigénny fúzny proteín.

V súlade s tým vynález poskytuje spôsob zvýšenia imunogenicity preselektovaného antigénu cicavca. V jednom aspekte spôsob obsahuje podávanie cicavcovi Fc-antigénneho fúzneho proteínu obsahujúceho konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu spojený polypeptidovou väzbou k preselektovanému antigénu v množstve postačujúcom na to, aby sa vyvolala imunitná reakcia. V ďalšom aspekte spôsob obsahuje podávanie cicavcovi sekvencie nukleovej kyseliny, napríklad deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) alebo ribonukleovej kyseliny (RNA), kódujúcej Fc-antigénny fúzny proteín obsahujúci konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu fúzovaný k preselektovanému antigénu. Preselektovaný antigén, keď je časťou Fc-antigénneho fúzneho proteínu (buď podávaný ako fúzny proteín alebo nukleová kyselina, ktorá je potom exprimovaná v príjemcovi za vzniku fúzneho proteínu), je charakterizovaný tým, že je schopný stimulácie imunitnej reakcie cicavca, ktorá je silnejšia ako reakcia vyvolaná porovnateľným množstvom (napríklad hmotnosťou alebo počtom molekúl) preselektovaného antigénu samotného, to je preselektovaným antigénom nefúzovaným ku konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu.

Okrem toho imunitné reakcie vyvolané proti preselektovanému antigénu Fc-antigénneho fúzneho proteínu môžu byť zosilnené alebo modulované podávaním Fc-antigénneho fúzneho proteínu spolu s adjuvans. Aj keď v praxi vynálezu môže byť použiteľný celý rad adjuvancií, napríklad chemická adjuvancia, ako je napríklad Freundovo kompletne adjuvans alebo oligonukleotíd obsahujúci nemetylovanú CpG sekvenciu, bežne výhodná adjuvancia na použitie s Fc-antigénnymi fúznymi proteínmi zahŕňajú druhý Fc fúzny proteín (v tomto texte nazývaný „Fc-adjuvantný fúzny proteín“ alebo „adjuvantný fúzny proteín“) alebo nukleovú kyselinu kódujúcu taký Fc fúzny proteín. Výhodné Fc-adjuvantné fúzne proteíny zahŕňajú konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu spojený polypeptidovou väzbou na adjuvantný proteín, napríklad cytokínu. Výhodné cytokíny použiteľné na konštrukciu Fc-adjuvantných fúznych proteínov zahŕňajú napríklad interferón- γ (IFN- γ), interleukín-2 (IL-2), interleukín-4 (IL-4), interleukín-12 (IL-12), IL-18, faktor nekrotizujúci nádory (TNF), faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov (GM-CSF). Ďalšia trieda Fc-adjuvantných fúznych proteínov zahŕňa úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu fúzovaný k adjuvantnej skupine zodpovedajúcej extracelulárnej doméne proteínu, ktorá je obvykle čiastočne alebo výlučne viazaná na membránu. Napríklad CD40 ligand je fúzovaný k Fc skupine, aby bol použitý ako zosilnený adjuvantný proteín.

Spoločné podávanie Fc-antigénneho a Fc-adjuvantného fúzneho proteínu, buď súčasne alebo jedného po druhom (napríklad Fc-antigén nasledovaný Fc-adjuvans alebo Fc-adjuvans nasledované Fc-antigénom), môže byť použité na moduláciu typu imunitnej reakcie, ktorá je stimulovaná proti preselektovanému antigénu. Dva druhy imunitnej reakcie,

nazývané Th1 a Th2, sú spúšťané ako reakcie na odlišné podnety a zapájajú odlišné cytokíny. Th1 sprostredkované imunitné reakcie sú typicky bunkovej povahy, zatiaľ čo Th2 sprostredkované imunitné reakcie sú typicky humorálnej povahy. V súlade s tým Th1 reakcia môže byť použiteľná na napadnutie zmenených buniek, ako sú napríklad karcinómové bunky alebo bunky infikované vírusom, zatiaľ čo Th2 reakcia môže byť použiteľná na napadnutie extracelulárnych agens, ako sú napríklad paraziti. Často je užitočné podávať cytokíny, fúzané ku konštantným úsekom ťažkého reťazca imunoglobulínu, na stimuláciu buď všeobecnej imunitnej reakcie alebo na spustenie alebo tiež moduláciu špecifických Th1 alebo Th2 reakcií.

Napríklad Fc-adjuvantný fúzny proteín obsahujúci konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu spojený peptidovou väzbou k GMCSF je účinný všeobecný stimulátor imunitnej reakcie, vrátane obidvoch reakcií Th1 a Th2. Fc-adjuvantný fúzny proteín obsahujúci IL-12 alebo IFN- γ môže byť spoločne podávaný na stimuláciu primárne bunkovej alebo Th1 sprostredkovanej imunitnej reakcie. Alternatívne môže byť Fc-adjuvantný fúzny proteín obsahujúci IL-4 podávaný na stimuláciu primárne humorálnej alebo Th2 sprostredkovanej imunitnej reakcie.

Okrem toho výber konkrétneho cytokínu prítomného v Fc-adjuvantnom fúznom proteíne môže ovplyvniť triedu protilátky vytváratej proti preselektovanému antigénu Fc-antigénneho fúzneho proteínu. Napríklad Fc-adjuvantný fúzny proteín obsahujúci IL-12 môže stimulovať pomocné T lymfocyty a produkciu IgG2a triedy protilátok. Alternatívne adjuvantný fúzny proteín obsahujúci IL-4 môže stimulovať produkciu IgE triedy protilátok.

Ako bolo diskutované vyššie, vo výhodnom uskutočnení spôsob zahŕňa podávanie Fc-antigénneho fúzneho proteínu alebo nukleovej kyseliny kódujúcej Fc-antigénny fúzny proteín v kombinácii s Fc-adjuvantným fúznym proteínom. S použitím dvoch fúznych proteínov, každý obsahujúci konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu, je možné spoločne lokalizovať ako preselektovaný antigén tak adjuvantnému proteínu (napríklad cytokín) v rovnakých alebo podobných bunkových typoch cicavca. Napríklad makrofágy, B lymfocyty, granulocyty a dendritické bunky exprimujú Fc receptory na svojom bunkovom povrchu. V súlade s tým spoločným podávaním Fc-antigénu a Fc-adjuvantných fúznych proteínov schopných viazať Fc receptory je možné spoločne lokalizovať antigén antigénneho fúzneho proteínu a adjuvans adjuvantného fúzneho proteínu v rovnakých bunkových typoch. Adjuvans potom môže stimulovať, zosilniť alebo inak modulovať imunitnú reakciu v okolí preselektovaného antigénu.

V tomto výhodnom uskutočnení používa vynález dve odlišné formy lokalizácie alebo koncentrácie. Po prvé vynález používa spoločnú skupinu, ktorá je fúzovaná ako na antigén tak na adjuvans, ktoré sú koncentrované v určitých oblastiach organizmu. Týmto spôsobom je zvýšená účinná lokálna koncentrácia antigénu v susedstve adjuvans. Po druhé vynález cieli antigén k mechanizmom imunitného systému na spracovanie a prezentáciu antigénu. Prvý koncentračný krok môže byť uskutočňovaný fúziou antigénu a adjuvantných proteínov k skupine, čo má za následok koncentráciu v niektorej časti organizmu, ktorá je dostupná imunitnému systému. Druhý cieliaci krok môže byť uskutočňovaný fúziou antigénneho proteínu ku ktorejkoľvek skupine, ktorá zosilňuje prezentáciu alebo spracovanie systémom prezentujúcim antigén.

V súlade s tým vynález dosahuje týchto koncentračných účinkov dvoma alternatívnymi metódami. Prvou metódou je konštrukcia a podávanie dvoch rôznych fúzných proteínov, fúzny proteín lokalizujúci antigén a fúzny proteín lokalizujúci adjuvans. Druhou metódou je konštrukcia a podávanie fúzie obsahujúcej antigén, adjuvans a lokalizujúci proteín. Fc skupina je príklad lokalizujúceho proteínu.

Dôležitý charakteristický rys konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu je to, že na rozdiel od preselektovaného antigénu v Fc-antigénnom fúznom proteíne, je výhodne neimunogénny alebo je len slabo imunogénny pre predpokladaného príjemcu. Inak povedané, v Fc-antigénnom fúznom proteíne je preselektovaný antigén navrhnutý tak, aby bol viacej imunogénny pre príjemcu ako konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu. Podobne sa predpokladá, že Fc-adjuvantný fúzny proteín by tiež bol neimunogénny alebo slabo imunogénny pre predpokladaného príjemcu. Imunogenicita konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu môže byť redukovaná a v určitých prípadoch eliminovaná s použitím sekvencií konštantného úseku imunoglobulínu pochádzajúcich z rovnakého živočíšneho druhu alebo podobných sekvenciám prítomným v rovnakom živočíšnom druhu, ako je predpokladaný príjemca. Napríklad sú konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu, výhodne humánneho pôvodu, použité na vytvorenie fúzných proteínov na podávanie človeku. Podobne, keď je predpokladaný príjemca človek, je adjuvantný proteín v Fc-adjuvantnom fúznom proteíne tiež výhodne humánneho pôvodu. Výberom vhodných aminokyselinových sekvencií definujúcich konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu a adjuvantné proteíny, je možné optimalizovať imunitné reakcie priamo primárne proti preselektovanému antigénu.

Vo výhodnom uskutočnení konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu Fc-antigénneho fúzneho proteínu obsahuje kĺbový úsek imunoglobulínu a voliteľne doménu konštantného úseku imunoglobulínu vybranú zo skupiny, ktorú tvorí CH2 doména, CH3 doména a CH4 doména alebo ich kombinácie. Ale konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu je výhodne bez aspoň CH1 domény. Okrem toho Fc fúzne proteíny podľa vynálezu sú výhodne bez domény variabilného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu (V_H). Keď má byť fúzny proteín podávaný človeku, konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu výhodne obsahuje kĺbový úsek a CH2 doménu alebo CH3 doménu a najvýhodnejšie obsahuje kĺbový úsek a obidve CH2 doménu a CH3 doménu. Predpokladá sa, že konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu použiteľné v praxi vynálezu môžu pochádzať z imunoglobulínov patriacich do ktorejkoľvek z piatich imunoglobulínových tried nazývaných v odbore IgA ($Ig\alpha$), IgD ($Ig\delta$), IgE ($Ig\epsilon$), IgG ($Ig\gamma$) a IgM ($Ig\mu$). Sú ale výhodné konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu z IgG triedy.

Predpokladá sa, že ktorýkoľvek požadovaný preselektovaný antigén môže byť zahrnutý v Fc-antigénnom fúznom proteíne podľa vynálezu. Vo výhodnom uskutočnení je preselektovaný antigén vybraný zo skupiny, ktorú tvorí membránový antigén špecifický pre prostatu, ektodoména cytokínového receptora, vírusový proteín a antigén špecifický pre karcinóm alebo nádor.

Fc-antigénne fúzne proteíny majúce veľký počet konfigurácií môžu byť použiteľné v praxi vynálezu. Napríklad N-koncová časť preselektovaného antigénu môže byť spojená polypeptidovou väzbou s C-koncovou časťou konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Alternatívne môže byť C-

koncová časť preselektovaného antigénu spojená polypeptidovou väzbou s N-koncovou časťou konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Okrem toho sa predpokladá, že Fc-antigénne fúzne proteíny môžu obsahovať veľké množstvo jedného alebo viacej preselektovaných antigénov, z ktorých jeden alebo viacej môže byť spojených priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkera k sebe navzájom alebo ku konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Okrem toho dva alebo viacej Fc-antigénnych fúzných proteínov môžu byť spojené spolu buď nekovalentne alebo kovalentne, napríklad jednou alebo viacerými disulfidovými väzbami za vzniku dimérnych alebo multimérnych prípravkov. Predpokladá sa, že Fc-antigénne fúzne proteíny v dimérnych konštruktoch môžu byť rovnaké alebo navzájom odlišné. Napríklad aj keď obidva Fc-antigénne fúzne proteíny môžu obsahovať rovnaký konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu, preselektované antigény sa môžu líšiť. Predpokladá sa, že podobné konfigurácie môžu byť použité tiež s Fc-adjuvantnými fúznymi proteínmi.

Okrem toho v praxi vynálezu môže byť použiteľný celý rad sekvencií nukleových kyselín kódujúcich Fc fúzne proteíny. Napríklad sekvencie nukleovej kyseliny môžu kódovať v smere od 5' ku 3', buď konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu a preselektovaný antigén alebo preselektovaný antigén a konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu. Okrem toho sekvenice nukleovej kyseliny voliteľne môžu tiež obsahovať „vedúcu“ alebo „signálnu“ sekvenciu založenú napríklad na sekvencii ľahkého reťazca imunoglobulínu fúzovanej priamo ku kľbovému úseku konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Vo výhodnom uskutočnení, keď Fc úsek je založený na IgG sekvenciách, Fc úsek kóduje v smere od 5' ku 3' aspoň kľbový úsek imunoglobulínu (to je kľbový úsek obsahujúci aspoň jednu aminokyselinu cysteín schopnú tvorby

disulfidovej väzby s druhou sekvenciou kĺbového úseku imunoglobulínu), imunoglobulínovú CH2 doménu a CH3 doménu. Okrem toho sekvencie nukleovej kyseliny kódujúce Fc-antigénne fúzne proteíny môžu tiež byť integrované do replikovateľného expresného vektora, ktorý môže buď exprimovať Fc fúzny proteín napríklad v bakteriálnom hostiteľovi, v predpokladanom príjemcovi alebo v obidvoch.

Predpokladá sa, že injekcia sekvencií nukleovej kyseliny kódujúcich Fc-antigénny fúzny proteín, buď samotných alebo v kombinácii so sekvenciami nukleovej kyseliny kódujúcimi Fc-adjuvantný fúzny proteín, môže mať za následok vznik bunkovej imunitnej reakcie, humorálnej imunitnej reakcie alebo obidvoch. Kombinácia imunizácie založenej na nukleovej kyseline a imunizácie založenej na proteíne (napríklad podávanie Fc-antigénneho fúzneho proteínu pred podávaním, počas podávania alebo po podávaní nukleovej kyseliny kódujúcej Fc antigénny fúzny proteín) môže pôsobiť synergicky, aby sa vyvolala silnejšia imunitná reakcia proti preselektovanému antigénu relatívne k imunizácii buď so samotnou nukleovou kyselinou alebo samotným proteínom.

Predchádzajúce a ďalšie ciele, charakteristické rysy a výhody predkladaného vynálezu budú jasné z nasledujúceho podrobného opisu, obrázkov a patentových nárokov, ktoré nasledujú.

Opis obrázkov

Predchádzajúcim a ďalším cieľom, charakteristickým rysom a výhodám predkladaného vynálezu, a tiež vynálezu samotnému bude dostatočne porozumené z nasledujúceho opisu výhodných

uskutočnení pri spoločnom čítaní so sprievodnými obrázkami, v ktorých:

Obrázky 1A-1G sú schematické zobrazenia príkladov Fc-fúzných proteínov použiteľných v praxi vynálezu. Obrázok 1A predstavuje Fc-antigénny alebo Fc-adjuvantný fúzny proteín, kde konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 je pripojený k N-koncovej časti antigénu alebo adjuvans 2. Obrázok 1B predstavuje Fc-antigénny alebo Fc-adjuvantný fúzny proteín, kde konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 je pripojený k C-koncovej časti antigénu alebo adjuvans 2. Obrázky 1C a 1D predstavujú dimerný proteín, kde jeden alebo obidva polypeptidové reťazce obsahujú Fc-antigénny alebo Fc-adjuvantný fúzny proteín. Na obrázku 1C, v aspoň jednom polypeptidovom reťazci, je konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 pripojený k N-koncovej časti antigénu alebo adjuvans 2 a na obrázku 1D, konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 je pripojený k C-koncovej časti antigénu alebo adjuvans 2. Obrázok 1E predstavuje dimerný proteín, kde jeden alebo obidva polypeptidové reťazce obsahujú Fc-antigén-antigén, Fc-adjuvans-adjuvans, Fc-adjuvans-antigén alebo Fc-antigén-adjuvans fúzny proteín. Obrázok 1F predstavuje dimerný fúzny proteín, kde jeden alebo obidva polypeptidové reťazce obsahujú antigén-Fc-adjuvantný alebo adjuvans-Fc-antigénny fúzny proteín. Obrázok 1G predstavuje dimerný fúzny proteín, kde jeden alebo obidva polypeptidové reťazce obsahujú antigén-adjuvans-Fc alebo adjuvans-antigén-Fc fúzny proteín.

Obrázky 2A-2B sú schematické znázornenia DNA sekvencií použiteľných v praxi vynálezu. Obrázok 2A predstavuje expresný vektor humánneho Fc fúzneho proteínu. Obrázok 2B predstavuje génovú fúziu na expresiu myšacieho IgG2a Fc fúzneho proteínu.

Obrázky 3A-3F sú grafy ukazujúce účinok chemických a Fc-cytokínových adjuvancií na produkciu protilátok myši imunizovaných Fc-antigénnym fúznym proteínom, fúznym proteínom myšacieho Fc - humánnym ektodoménom receptora IL-4 (Fc-IL-4R). Na obrázku 3A boli myši imunizované Fc-IL-4R a Fc-IL-2 vo Freundovom kompletnom adjuvans (CFA). Na obrázku 3B boli myši imunizované Fc-IL-4R vo fyziologickom roztoku pufrovanom fosfátmi (PBS). Na obrázku 3C boli myši imunizované Fc-IL-4R v CFA. Na obrázku 3D boli myši imunizované Fc-IL-4R a Fc-IL-2 v PBS. Na obrázku 3E boli myši imunizované Fc-IL-4R a Fc-GMCSF v CFA. Na obrázku 3F boli myši imunizované Fc-IL-4R a Fc-GMCSF v PBS. Na obrázkoch 3A-3F štvorce, kosoštvorce a trojuholníky predstavujú dáta pochádzajúce od troch jednotlivých myší. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Obrázky 4A-4D sú grafy ukazujúce účinok imunizácie myši s humánnym karcinómovým antigénom, PSMA, vo forme Fc-antigénneho fúzneho proteínu s použitím premenného množstva Fc-GMCSF ako adjuvans. Na obrázku 4A boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA fúzneho proteínu samotného. Na obrázku 4B boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA a 0,5 μg Fc-GMCSF ako adjuvans. Na obrázku 4C boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA a 0,5 μg Fc-GMCSF ako adjuvans. Na obrázku 4D boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA a 5 μg Fc-GMCSF. Na obrázkoch 4A-4D štvorce, kosoštvorce a trojuholníky predstavujú dáta pochádzajúce od troch jednotlivých myší.

Obrázky 5A-5F sú grafy porovnávajúce špecifické protilátkové reakcie na PSMA antigén podávané buď ako natívny proteín (5A-5C) alebo ako myšací Fc-PSMA fúzny proteín (5D-

5F). Na obrázku 5A boli myši imunizované 50 μg PSMA ako antigénom. Na obrázku 5B boli myši imunizované 50 μg PSMA ako antigénom a 0,2 μg GMCSF ako adjuvans. Na obrázku 5C boli myši imunizované 50 μg PSMA ako antigénom a 0,5 μg Fc-GMCSF ako adjuvans. Na obrázku 5D boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA ako antigénom. Na obrázku 5E boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA ako antigénom a 0,2 μg GMCSF ako adjuvans. Na obrázku 5F boli myši imunizované 50 μg Fc-PSMA ako antigénom a 0,5 μg Fc-GMCSF ako adjuvans. Na obrázkoch 5A-5F štvorce, kosoštvorce a trojuholníky predstavujú dáta pochádzajúce od troch jednotlivých myší. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Obrázok 6 je graf porovnávajúci adjuvantné účinky Fc-GMCSF alebo Fc-F3L spoločne podávaného s Fc-PSMA na produkciu protilátok proti humánnemu PSMA. Všetky zvieratá dostali 50 μg Fc-PSMA buď samotného alebo v kombinácii s uvedeným Fc-cytokínom ako adjuvans. V jednotlivých pokusoch boli testované tri myši.

Obrázky 7A-7B sú grafy ukazujúce pre jednotlivé myši imunogenicitu Fc-EpCAM fúzneho proteínu, buď samotného alebo v kombinácii s Fc-GMCSF adjuvans. Obrázky 7A a 7B predstavujú protilátkové titre merané 7 a 14 dní po zosilňovacej injekcii, v danom poradí. Zosilňovacia injekcia bola podávaná tri týždne po primárnej imunizácii. Na obidvoch obrázkoch prázdne kosoštvorce predstavujú myši imunizované subkutánne 10 μg Fc-EpCAM samotného a plné trojuholníky predstavujú myši imunizované subkutánne 10 μg Fc-EpCAM a 1 μg Fc-GMCSF ako

adjuvans. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Obrázky 8A-8B sú grafy ukazujúce pre myši imunogenicitu EpCAM-Fc (opačná orientácia Fc úseku a antigénu) buď samotného alebo v kombinácii s Fc-GMCSF adjuvantným fúznym proteínom. Obrázky 8A a 8B predstavujú protilátkové titre merané 14 dní a 21 dní (to je 7 dní po zosilňovacej injekcii) po imunizácii, v danom poradí. Na obidvoch obrázkoch prázdne kosoštvorce predstavujú priemerné titre troch myši imunizovaných 25 µg EpCAM-Fc fúzneho proteínu a plné trojuholníky predstavujú myši imunizované 25 µg EpCAM-Fc a 2,5 µg Fc-GMCSF ako adjuvans. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Obrázok 9 ukazuje schému konštrukcie plazmidového vektora kódujúceho EpCAM-Fc-GMCSF fúzny proteín. V tomto prípade je antigén EpCAM fúzovaný k amínokoncovej časti konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu (Fc úsek) a adjuvans GMCSF je fúzované ku karboxykoncovej časti Fc úseku.

Obrázky 10A-10D sú grafy ukazujúce protilátkové titre myši, ktorým bola podaná injekcia plazmidových vektorov kódujúcich Fc-EpCAM fúzny proteín s použitím buď PBS alebo 25% (hmotnosť/objem) roztoku sacharózy ako nosiča. Obrázky 10A-10D predstavujú protilátkové titre zaznamenané 14 dní, 27 dní, 55 dní a 69 dní po počiatočnej injekcii, v danom poradí. Na obrázkoch prázdne kosoštvorce predstavujú titre pre jednotlivé myši, ktorým bola podaná injekcia Fc-EpCAM kódujúceho plazmidu v PBS a plné trojuholníky predstavujú titre pre jednotlivé myši, ktorým bola podaná injekcia Fc-EpCAM kódujúceho plazmidu

v sacharóze. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Obrázky 11A-11B sú grafy ukazujúce stimuláciu inkorporácie ^3H -tymidínu ako reakciu na in vitro stimuláciu antigénom splenocytov izolovaných z myší imunizovaných DNA vakcináciou alebo injekciou proteínu. Obrázok 11B ukazuje rozšírený prehľad dát v nižšej časti obrázku 11A. Na obrázkoch plné kosoštvorce predstavujú splenocyty odoberané myšiam imunizovaným 100 μg plazmidovej DNA kódujúcej CMV-Fc-EpCAM fúzny proteín, prázdne krúžky predstavujú splenocyty odoberané myšiam imunizovaným 100 μg plazmidovej DNA kódujúcej CMV-EpCAM-Fc fúzny proteín a krížiky predstavujú splenocyty odoberané myšiam imunizovaným 10 μg Fc-EpCAM proteínu. Sleziny boli odstránené myšiam v 70. deň po prvej injekcii plazmidovej DNA alebo proteínu a dvoch zosilňovacích injekciách v 3 týždňových intervaloch.

Obrázky 12A-B sú grafy ukazujúce test usmrcovania cytotoxickými T lymfocytmi (CTL) s použitím splenocytov z myší imunizovaných plazmidovou DNA alebo Fc-EpCAM proteínom. Obrázok 12A ukazuje aktivitu splenocytov proti myšacím CT26 nádorovým bunkám exprimujúcim humánnu EpCAM proteín. Obrázok 12B ukazuje aktivitu splenocytov proti parentálnym myšacím CT26 nádorovým bunkám. Na obidvoch obrázkoch prázdne kosoštvorce predstavujú splenocyty imunizované DNA nesúce konštrukt (CMV-promotor)-EpCAM, prázdne štvorce predstavujú splenocyty z myší imunizovaných DNA nesúce fúzny konštrukt (CMV-promotor)-Fc-EpCAM, prázdne trojuholníky predstavujú splenocyty z myší imunizovaných DNA nesúce fúzny konštrukt (CMV-promotor)-EpCAM-Fc a krížiky predstavujú splenocyty z myší imunizovaných Fc-EpCAM fúznym proteínom. CTL test

používal splenocyty z imunizovaných myší pestovaných päť dní s 10 U/ml IL-2. Označené cieľové bunky boli zmiešané s označenými efektormi a inkubované štyri hodiny. Uvoľňovanie rádioaktivity bolo použité na výpočet percenta špecifickej lýzy.

Obrázok 13 je graf ukazujúci protilátkové titre myší imunizovaných subkutánne 50 μg Fc-MCSP fúzneho proteínu v PBS buď samotného alebo v kombinácii s 5 μg Fc-GMCSF ako adjuvans. Plné kosoštvorce predstavujú protilátkové titre v normálnom sére, prázdne štvorce predstavujú protilátkové titre v sére myší imunizovaných Fc-MCSP fúznym proteínom samotným a plné trojuholníky predstavujú protilátkové titre v sére myší imunizovaných Fc-MCSP fúznym proteínom v kombinácii s Fc-GMCSF adjuvans. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Obrázky 14A-B sú grafy ukazujúce protilátkové titre myší imunizovaných Fc-gp41 pep 626 fúznym proteínom buď samotným alebo v kombinácii s Fc-cytokínovým adjuvans. Obrázky 14A a 14B predstavujú protilátkové titre dosiahnuté 7 a 33 dní po druhej zosilňovacej injekcii, v danom poradí. Na obrázkoch prázdne kosoštvorce predstavujú protilátkové titre myší imunizovaných intradermálnou injekciou 25 μg Fc-gp41 pep 626 antigénu samotného, prázdne štvorce predstavujú titre myší imunizovaných intradermálnou injekciou 25 μg Fc-gp41 pep 626 antigénu v kombinácii s 2,5 μg Fc-GMCSF adjuvans a plné trojuholníky predstavujú protilátkové titre myší imunizovaných intradermálnou injekciou 2,5 μg Fc-gp41 pep 626 antigénu v kombinácii s 2,5 μg Fc-IL2 adjuvans. Hladiny protilátok k antigénu boli merané testom ELISA, Y-os ukazuje optickú denzitu odčítanú v teste ELISA.

Detailní opis vynálezu

Predkladaný vynález sa týka účinnej aplikácie antigénnych proteínov alebo peptidov in vivo na indukciu humorálnej imunitnej reakcie (to je založenej na protilátkach) alebo Th2 bunkami sprostredkovanej imunitnej reakcie, bunkovej alebo Th1 bunkami sprostredkovanej imunitnej reakcie a v niektorých prípadoch obidvoch typov imunitnej reakcie cicavca. Teraz bolo objavené, že je možné zosilniť imunogenicitu preselektovaného antigénneho proteínu alebo peptidu cicavca fúziou preselektovaného antigénu ku konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu, aby sa vytvoril Fc-antigénny fúzny proteín. Výsledný Fc-antigénny fúzny proteín alebo sekvencia nukleovej kyseliny kódujúca Fc-antigénne fúzne proteíny potom môžu byť podávané cicavcovi, napríklad človeku, vo forme vakcíny, aby sa vyvolala imunitná reakcia proti preselektovanému antigénu.

Fc-antigénny fúzny proteín selektívne cieli antigén k bunkám prezentujúcim antigén (APC). Bez ohľadu na akékoľvek teórie sa má za to, že väzba Fc-antigénneho fúzneho proteínu k APC je sprostredkovaná Fc receptormi exprimovanými na početných typoch imunitných buniek, vrátane napríklad: dendritických buniek, makrofágov, B lymfocytov a granulocytov. Fc-antigénny fúzny proteín sa pri podávaní cicavcovi viaže na Fc receptory, a potom je Fc-antigénny fúzny proteín pohltený APC endocytózou. Predpokladá sa, že fúzny proteín pohltený endocytózou, vrátane preselektovaného antigénu, je potom degradovaný na malé peptidy, ktoré sú potom prezentované na bunkovom povrchu. Predložené peptidy potom sprostredkovávajú humorálnu a/alebo bunkovú imunitnú reakciu. Konkrétny typ stimulovanej imunitnej reakcie môže byť modulovaný spoločným

podávaním Fc-antigénneho fúzneho proteínu s adjuvans, napríklad adjuvantným fúznym proteínom.

V jednom spôsobe podávania je príjemcovi podávaný Fc-antigénny fúzny proteín. V ďalšom spôsobe podávania je príjemcovi podávaná sekvencia nukleovej kyseliny kódujúca Fc-antigénny fúzny proteín. Preselektovaný antigén, buď v podávanom Fc-antigénnom proteíne alebo ako exprimovaný z podávanej nukleovej kyseliny, je viacej imunogénny ako antigén samotný, to je antigén, ktorý nie je fúzovaný polypeptidovou väzbou ku konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Okrem toho za určitých okolností môže byť postupné podávanie fúzneho proteínu nasledované podávaním nukleovej kyseliny, ktorá kóduje fúzny proteín alebo alternatívne podávanie nukleovej kyseliny kódujúcej fúzny proteín nasledované podávaním rovnakého fúzneho proteínu použité na maximalizáciu imunogenicity preselektovaného antigénu. Má sa za to, že optimálna imunitná reakcia bola vyvolaná, keď sú aktívne obidve zložky Fc-antigénnych fúznych proteínov. Inak povedané, preselektovaný antigén v Fc-antigénnom fúznom proteíne je schopný vyvolať imunitnú reakciu a konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu je schopný väzby Fc receptora na povrchu APC.

Okrem toho, ako bolo diskutované, sila a typ imunitnej reakcie vyvolanej proti preselektovanému antigénu môže byť modulovaný spoločným podávaním špecifických adjuvancií s Fc-antigénnym fúznym proteínom a/alebo nukleovou kyselinou kódujúcou Fc-antigénny fúzny proteín. Aj keď chemická adjuvancia, napríklad alum alebo Freundovo kompletne alebo nekompletne adjuvans, môžu byť za určitých okolností, napríklad pri veterinárnych aplikáciách, použiteľné v praxi vynálezu, ich vedľajšie účinky, napríklad zjazvenie tkaniva,

ich môžu robiť neprijateľnými na humánne použitie. V súlade s tým výhodné adjuvancie obsahujú druhý Fc fúzny proteín, kde konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu je fúzovaný k adjuvantnému proteínu za vzniku Fc-adjuvantného fúzneho proteínu. Má sa za to, že čo sa týka Fc-antigénnych fúznych proteínov, je optimálna imunitná reakcia vyvolaná, keď sú aktívne obidve zložky Fc-adjuvantného fúzneho proteínu. Inak povedané, adjuvans v Fc-adjuvantnom fúznom proteíne je schopné modulácie imunitnej reakcie a konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu je schopný väzby Fc receptora na povrchu APC.

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu sú obidva antigén a adjuvans podávané ako Fc fúzne proteíny alebo nukleové kyseliny kódujúce takéto fúzne proteíny. Inak povedané, antigén je podávaný ako Fc-antigénny fúzny proteín a adjuvans je podávaný ako Fc-adjuvantný fúzny proteín. Určité výhodné uskutočnenia Fc fúznych proteínov použiteľné v praxi vynálezu sú ukázané na obrázkoch 1A-1G.

Obrázok 1A ukazuje názorný Fc fúzny proteín, v ktorom je C-koncová časť konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 pripojená, buď priamo alebo polypeptidovou spájacou časťou (linker), k N-koncovej časti preselektovaného antigénu alebo adjuvans 2. Ako sa v tomto texte používa, termín „polypeptidový linker“ označuje sekvenciu jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov, ktoré spájajú dva proteíny dohromady. Polypeptidový linker je často rad aminokyselín dlhých približne 10-15 zvyškov, obsahujúci napríklad opakujúce sa glycínové a/alebo serínové zvyšky. Obrázok 1B ukazuje názorný Fc fúzny proteín, v ktorom C-koncová časť preselektovaného antigénu alebo adjuvans 2 je pripojená, buď priamo alebo polypeptidovým linkerom, k N-

koncovej časti konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1.

Obrázok 1C ukazuje dimérny konštrukt obsahujúci dva Fc fúzne proteíny spojené kovalentne dvoma disulfidovými väzbami. Dimérny konštrukt obsahuje dva Fc fúzne proteíny, v ktorých C-koncová časť každého konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 je pripojená k N-koncovej časti preselektovaného antigénu adjuvans 2. Podobne, obrázok 1D ukazuje dimérny konštrukt obsahujúci dva Fc fúzne proteíny spojené kovalentne dvoma disulfidovými väzbami. Dimérny konštrukt obsahuje dva Fc fúzne proteíny, v ktorých C-koncová časť každého preselektovaného antigénu alebo adjuvans 2 je pripojená k N-koncovej časti konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1.

Obrázok 1E ukazuje dimérny konštrukt obsahujúci dva Fc fúzne proteíny spojené dvoma disulfidovými väzbami. Dimérny konštrukt obsahuje dva Fc fúzne proteíny, v ktorých C-koncová časť každého konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1 je pripojená, buď priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkeru, k N-koncovej časti preselektovaného antigénu alebo adjuvans 2, ktorého C-koncová časť je pripojená, buď priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkeru, k druhému antigénu alebo adjuvans 2'.

Obrázok 1F ukazuje dimérny konštrukt obsahujúci dva Fc fúzne proteíny tiež spojené dvoma disulfidovými väzbami. Dimérny konštrukt obsahuje dva Fc fúzne proteíny, v ktorých C-koncová časť antigénu alebo adjuvans 2 je pripojená, buď priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkeru, k N-koncovej časti konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1, ktorého C-koncová časť je pripojená, buď

priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkeru, k N-koncovej časti odlišného adjuvans alebo antigénu 2'. Napríklad tieto fúzne proteíny môžu obsahovať, v smere od N- k C-konci, preselektovaný antigén-konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu-adjuvans.

Obrázok 1G ukazuje dimérny konštrukt obsahujúci dva Fc fúzne proteíny tiež spojené dvoma disulfidovými väzbami. Dimérny konštrukt obsahuje dva Fc fúzne proteíny, v ktorých C-koncová časť antigénu alebo adjuvans 2 je pripojená, buď priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkeru, k N-koncovej časti odlišného adjuvans alebo antigénu 2', ktorého C-koncová časť je pripojená, buď priamo alebo prostredníctvom polypeptidového linkeru k N-koncovej časti konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu 1. Napríklad tieto fúzne proteíny môžu obsahovať, v smere od N- k C-konci, preselektovaný antigén-adjuvans-konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu.

V praxi vynálezu je všeobecne výhodné umiestniť Fc skupinu do N-koncovej polohy relatívne k adjuvantnej skupine. Keď je adjuvantná skupina umiestnená N-koncovo k Fc skupine, potom sa fúze adjuvans-Fc môže viazať na receptor adjuvans na imunitnej bunke a Fc skupina je v rovnakej orientácii, ktorá je prijatá, keď sa protilátka viaže na bunkový povrch. Výsledkom je ADCC alebo fixácia komplementu. Ale keď je Fc skupina umiestnená N-koncovo k adjuvantnej skupine, nenastane ADCC a fixácia komplementu.

Konštrukty ukázané na obrázkoch 1C-1G sú ukázané ako diméry zosietené párom disulfidových väzieb medzi cysteínmi na susedných kĺbových úsekoch. Na obrázkoch sú disulfidové mostíky ukázané ako spájajúce dohromady časti dvoch

konštantných úsekov ťažkého reťazca imunoglobulínu prostredníctvom kĺbového úseku charakteristického pre natívne formy týchto molekúl. Aj keď sú výhodné konštrukty zahŕňajúce kĺbové úseky imunoglobulínov, vynález predpokladá, že môže byť vybrané zosietenie v iných polohách, keď je žiadúce. Okrem toho v niektorých prípadoch môžu nekovalentne asociovať dva alebo viacej monomérov za vzniku dimérov alebo multimérov použiteľných v praxi vynálezu.

Ako sa v tomto texte používa, termín „konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu“ je zameniteľný s termínom „Fc úsek“ a označuje karboxy-koncovú časť konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu alebo jej analóg alebo časť schopnú väzby Fc receptora. Ako je známe, každý konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu obsahuje štyri alebo päť domén. Domény sú nazvané postupne, ako nasledujú: CH1-kĺbový úsek-CH2-CH3(-CH4). CH4 sa vyskytuje v IgM, ktorý nemá kĺbový úsek. Konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu použiteľný v praxi vynálezu výhodne obsahuje kĺbový úsek imunoglobulínu a výhodne tiež zahŕňa CH3 doménu. Konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu najvýhodnejšie obsahuje kĺbový úsek imunoglobulínu, CH2 doménu a CH3 doménu. Ako sa v tomto texte používa, termín „kĺbový úsek“ imunoglobulínu označuje celý kĺbový úsek imunoglobulínu alebo aspoň časť kĺbového úseku imunoglobulínu postačujúcu na vznik jednej alebo viacej disulfidových väzieb s druhým kĺbovým úsekom imunoglobulínu.

Predpokladá sa, že vhodné konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu môžu pochádzať z protilátok patriacich do každej triedy imunoglobulínov nazývaných IgA, IgD, IgE, IgG a IgM, ale sú výhodné konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu z triedy IgG. Okrem toho sa predpokladá, že

konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu môžu pochádzať z ktorejkoľvek podtriedy IgG protilátky v odbore nazývaných IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4.

Domény konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu majú skríženú homológiu medzi imunoglobulínovými triedami. Napríklad CH2 doména IgG je homolóna k CH2 doméne IgA a IgD a k CH3 doméne IgM a IgE. Výhodné konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu obsahujú proteínové domény zodpovedajúce CH2 úseku a CH3 úseku IgG alebo jeho funkčnej časti alebo derivátom. Konštantné úseky ťažkého reťazca imunoglobulínu sú ale výhodne bez aspoň CH1 domény. Okrem toho Fc-antigénne alebo Fc-adjuvantné fúzne proteíny sú voliteľne bez variabilného úseku imunoglobulínu. Vo výhodnejšom uskutočnení konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu obsahuje, v smere od N-konca k C-konci, kĺbový úsek imunoglobulínu, CH2 doménu a CH3 doménu, ktoré sú všetky založené na sekvenciách z molekuly IgG. Výber vhodných konštantných úsekov ťažkého reťazca imunoglobulínu je detailne diskutovaný v patentoch Spojených Štátov č. 5 541 087 a 5 726 044. Výber konkrétnych sekvencií konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu z určitých imunoglobulínových tried a podtried na dosiahnutie konkrétneho výsledku je považovaný za rutinnú činnosť na úrovni znalostí v odbore.

Za niektorých okolností môže byť užitočné modifikovať konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu, napríklad mutáciou, deléciou alebo inými zmenami sprostredkovanými genetickým inžinierstvom alebo inými prístupmi tak, že určité aktivity, ako napríklad fixácie komplementu alebo stimulácie cytotoxicity sprostredkované bunkami závislé na protilátkach (ADCC), sú redukované alebo odstránené. Ale je považované za

nutné, že je udržiavaná schopnosť konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu viazať Fc receptor.

V praxi tohto vynálezu je zložka konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu Fc-antigénnych alebo Fc-adjuvantných fúzných proteínov výhodne pre predpokladaného príjemcu neimunogénna alebo slabo imunogénna. Fc úsek je považovaný za neimunogénny alebo slabo imunogénny, keď konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu nevyvolá detekovateľnú protilátkovú reakciu namierenú proti konštantnému úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. V súlade s tým by konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu mal pochádzať z imunoglobulínov prítomných v rovnakom živočíšnom druhu alebo by mal byť založený na aminokyselinových sekvenciách zodpovedajúcich imunoglobulínov prítomných v rovnakom živočíšnom druhu, akého je predpokladaný príjemca fúzneho proteínu. Inak povedané, keď Fc fúzny konštrukt (Fc-antigén a/alebo Fc-adjuvantný fúzny proteín) má byť podávaný človeku, mali by byť použité humánne sekvencie konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu. Nukleotídové a aminokyselinové sekvencie humánnych Fc IgG sú opísané napríklad v Ellison et al. (1982, NUCLEIC ACIDS RES. 10: 4071-4079). Podobne by mali byť použité myšacie Fc sekvencie, keď Fc fúzny proteín má byť podávaný myšiam. Nukleotídové a aminokyselinové sekvencie myšacích Fc IgG2a sú opísané napríklad v Bourgois et al. (1974, EUR. J. BIOCHEM. 43: 423-435). Mala by byť použitá rovnaká logika, keď Fc fúzne proteíny majú byť podávané iným zvieratám vrátane domácich zvierat, napríklad mačiek a psov, a hospodárskych zvierat, napríklad kráv a koní.

Ako sa v tomto texte používa, termín „preselektovaný antigén“ označuje ktorýkoľvek proteín alebo jeho fragment

alebo polypeptid, ktorý je schopný buď samotný alebo v kombinácii s inými reagensiami indukovať imunitnú reakciu cicavca. Predpokladá sa, že v Fc-antigénnom fúznom proteíne podľa vynálezu môže byť obsiahnutý ktorýkoľvek požadovaný preselektovaný antigén. Vo výhodnom uskutočnení preselektovaný antigén je vybraný zo skupiny, ktorú tvorí membránový antigén špecifický pre prostatu (PSMA), ektodoména cytokínového receptora, napríklad ektodoména humánneho IL-4 receptora, nádorový špecifický antigén (napríklad antigén, ktorý je riadene zvýšene exprimovaný alebo je v nádorovej bunke inak prítomný v zvýšených hladinách relatívne k normálnej bunke) a vírusový proteín, napríklad proteín kódovaný genómom humánneho vírusu imunodeficiencie (HIV).

Ako sa v tomto texte používa, termín „adjuvans“ označuje ktorúkoľvek látku, ktorá je schopná pôsobiť ako imunomodulátor, napríklad zosilnením imunitnej reakcie (buď humorálnej alebo bunkovej) proti preselektovanému antigénu. Ako sa v tomto texte používa, termín „humorálna“ imunita označuje imunitu sprostredkovanú protilátkami prítomnými v telesných tekutinách, napríklad v plazme alebo v lymfe, zatiaľ čo termín „bunková“ imunita, v odbore tiež nazývaná imunita „sprostredkovaná bunkami“, označuje imunologické reakcie spúšťané T lymfocytmi a sprostredkované efektorovými T lymfocytmi a/alebo makrofágmi.

Ako je diskutované vyššie, v imunizácii cicavcov okrem človeka môže byť použiteľný celý rad chemických adjuvancií, napríklad Freundovo kompletné adjuvans. Aj keď je široko používané pre zvieratá na vytváranie vysokých titrov protilátky alebo významných reakciou cytotoxických T lymfocytov (CTL), jeho vedľajšie účinky, napríklad jazvenie tkaniva, ho robí neprijateľným na humánne použitie. Je teda

potrebné indukovať silné imunitné reakcie bez sprievodného zápalu v mieste injekcie. Jedna nesporná výhoda použitia Fc-adjuvantných fúzných proteínov podľa vynálezu je schopnosť vyvolať silnú imunitnú reakciu bez potreby chemických adjuvancií, ako je napríklad Freundovo adjuvans.

Výhodné adjuvancie použiteľné v praxi vynálezu zahŕňajú Fc-adjuvantný fúzny proteín alebo nukleovú kyselinu, ktorá ho kóduje. Výhodné adjuvantné proteíny na zahrnutie do Fc fúzných proteínov sú cytokíny. Ako sa v tomto texte používa, termín „cytokín“ označuje ktorýkoľvek proteín alebo peptidový analóg alebo jeho funkčný fragment, ktorý je pre cicavca schopný modulovať aktivitu imunitných buniek, napríklad T lymfocytov, B lymfocytov, makrofágov, neutrofilov, eosinofilov, basofilov, dendritických buniek a ich prekurzorov. Výhodné cytokíny zahŕňajú napríklad IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12, IL-18, TNF a GMCSF. Extracelulárna doména CD40 ligandu je tiež výhodný proteín na fúziu k Fc za vzniku Fc-adjuvans. Keď je podávaný s Fc-adjuvans, antigén v Fc-antigénnom fúznom proteíne môže vyvolať imunitnú reakciu, ktorá je silnejšia, ako keď je Fc-antigénny fúzny proteín podávaný bez Fc-adjuvantného fúzneho proteínu. V niektorých prípadoch je hladina protilátky dosiahnutá po len dvoch imunizáciách Fc-antigénu s Fc-adjuvans tiež taká vysoká alebo vyššia ako hladina dosiahnutá s Freundovým adjuvans, a bez zistiteľnej reakcie kože.

Čo sa týka konštantných úsekov ťažkého reťazca imunoglobulínu Fc-antigénnych alebo Fc-adjuvantných fúzných proteínov, adjuvantný proteín je výhodne pre predpokladaného príjemcu neimunogénny alebo len slabo imunogénny. To môže byť uskutočnené zavedením do Fc adjuvantných fúzných proteínov, cytokínov definovaných amínokyselinovými sekvenciami

zodpovedajúcimi cytokínom, ktoré je možné izolovať z rovnakého živočíšneho druhu, ako je predpokladaný príjemca. Napríklad keď má byť Fc adjuvantný fúzny proteín podávaný človeku, je výhodne adjuvantný proteín (napríklad cytokín) humánneho pôvodu.

Spoločné podávanie Fc-antigénnych a Fc-adjuvantných fúznych proteínov, buď súčasne alebo jeden po druhom, môže byť použité na moduláciu typu imunitnej reakcie, ktorá je stimulovaná proti preselektovanému antigénu. Dva druhy imunitnej reakcie, nazývané Th1 a Th2, sú stimulované ako reakcie na odlišné typy infekcie a zapájajú odlišné cytokíny. Th1 sprostredkované imunitné reakcie majú typicky bunkovú povahu, zatiaľ čo Th2 sprostredkované imunitné reakcie majú typicky humorálnu povahu. V súlade s tým Th1 reakcia môže byť použiteľná na napadnutie zmenených buniek, ako sú napríklad nádorové bunky alebo bunky infikované vírusom, zatiaľ čo Th2 reakcia môže byť použiteľná na napadnutie extracelulárnych agens, ako sú napríklad paraziti. Často je užitočné podávať cytokíny, fúzované ku konštantným úsekom ťažkého reťazca imunoglobulínu, na stimuláciu buď všeobecnej imunitnej reakcie alebo na spustenie alebo moduláciu špecifických Th1 alebo Th2 reakcií.

Okrem toho výber konkrétneho cytokínu prítomného v Fc-adjuvantnom fúznom proteíne môže ovplyvniť triedu protilátky vytváratej proti preselektovanému antigénu Fc-antigénneho fúzneho proteínu. Napríklad Fc-IL12 stimuluje reakciu pomocných T lymfocytov stimuláciou produkcie pôsobkov, ktoré sú známe ako Th1 cytokíny, napríklad IFN- γ , IL-2 a TNF, ktoré podporujú silnú bunkovú imunitu a produkciu IgG2a triedy protilátok. Naopak Fc-IL-4 stimuluje produkciu Th2 cytokínov,

napríklad IL-5, IL-6, IL-10 a IL-4, ktoré podporujú humorálnu imunitu.

Ako je diskutované vyššie, vo výhodnom uskutočnení spôsob obsahuje podávanie Fc-antigénneho fúzneho proteínu alebo nukleovej kyseliny kódujúcej Fc-antigénny fúzny proteín v kombinácii s Fc-adjuvantným fúznym proteínom. S použitím dvoch fúznych proteínov, z ktorých každý obsahuje konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu, je možné spoločne lokalizovať ako preselektovaný antigén tak adjuvantný proteín (napríklad cytokín) v rovnakých alebo podobných bunkových typoch cicavca. Napríklad makrofágy, B lymfocyty, granulocyty a dendritické bunky exprimujú Fc receptory na svojom bunkovom povrchu. V súlade s tým spoločným podávaním Fc-antigénnych a Fc-adjuvantných fúznych proteínov schopných viazať Fc receptory je možné spoločne lokalizovať antigén antigén-fúzneho proteínu a adjuvans adjuvantného fúzneho proteínu v rovnakom bunkovom kompartmente APC. Adjuvans potom môže zosilňovať alebo inak modulovať imunitnú reakciu v okolí preselektovaného antigénu.

Kombinácia Fc-cytokínov môže byť tiež použitá synergicky na stimuláciu všeobecnej reakcie a potom na ovplyvnenie, či nastane bunková (Th1) alebo humorálna (Th2) reakcia. Napríklad Fc-GMCSF je silný všeobecný stimulátor imunitných reakcií. Ale aby sa modulovala reakcia ďalej smerom k bunkovej alebo Th1 sprostredkovej imunite, môže byť Fc-IL12 alebo Fc-IFN γ adjuvantný proteín spoločne podávaný napríklad s Fc-GMCSF. Aby sa podporovala viacej humorálna alebo Th2 sprostredkovaná reakcia, môže byť Fc-IL4 adjuvantný proteín spoločne podávaný napríklad s Fc-GMCSF na moduláciu reakcie na vytváranie Th2 buniek. V závislosti na presnej povahe požadovanej fyziologickej reakcie môžu tiež byť použité ďalšie Th1 alebo

Th2 podporujúce cytokíny, použité ako fúzne cytokíny pre Fc. Predpokladá sa, že tento všeobecný prístup môže tiež byť použitý na moduláciu existujúcej patologickej reakcie, ako je napríklad autoimunita (Th1-sprostredkované ochorenie) a alergia (Th2-sprostredkované ochorenie) posunutím reakcie smerom ku konkrétnemu antigénu a preč od škodlivej reakcie imunizáciou k novej reakcii opačného Th typu.

Za niektorých okolností, pri imunizácii zvierata Fc-antigénnym fúznym proteínom, je užitočné použiť nukleové kyseliny ako adjuvancie. Nukleové kyseliny, napríklad oligonukleotídy obsahujúce sekvencie obohatené cytosín-fosfodiesterová väzba-guanosín (CpG), môžu nasmerovať imunitnú reakciu smerom k Th1 reakcii a môžu voliteľne byť použité v kombinácii s ďalšími adjuvanciami, ako napríklad cytokínmi (pozri napríklad Brazolot et al. (1998) PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 95: 15553-8, Liu et al. (1998) BLOOD 92: 3730-6 a Klinman et al. (1997) IMMUNOL. 158: 3635-3639). V súlade s tým sa predpokladá, že oligonukleotídy obsahujúce CpG môžu byť spoločne podávané s Fc-antigénovou fúziou na dosiahnutie zosilnenej a príslušne modulovanej imunitnej reakcie. Takéto molekuly nukleovej kyseliny môžu byť akokoľvek dlhé, ale sú výhodné nukleotídy dlhšie ako 8 nukleotídov. Sekvencie nukleovej kyseliny výhodne obsahujú sekvenciu CpG a výhodnejšie sekvenciu purín-purín-C-G-pyrimidín-pyrimidín, pričom cytosíny v centrálnej CpG sú nemetylované. Frekvencia CpG dinukleotídov v DNA adjuvans je výhodne aspoň približne 5% a výhodnejšie približne 10%. Napríklad ako adjuvans môže byť použitá dvojvláknová forma oligodeoxynukleotídu TCCATGACGTTCTGACGTT (sekv. id. č. 22). V závislosti na type imunitnej reakcie, ktorá je hľadaná, môže byť užitočné zmiešať nukleovú kyselinu s alumom.

Predkladaný vynález používa obvyklú metodológiu rekombinantnej DNA na tvorbu Fc fúzných proteínov použiteľných v praxi vynálezu. Fc fúzne konštrukty sú výhodne tvorené na úrovni DNA a výslednej DNA integrovanej do expresných vektorov a exprimované za vzniku Fc-antigénnych alebo Fc-adjuvantných fúzných proteínov podľa vynálezu. Ako sa v tomto texte používa, termín „vektor“ označuje ktorúkoľvek nukleovú kyselinu obsahujúcu nukleotídovú sekvenciu kompetentnú na zavedenie do hostiteľskej bunky a na rekombináciu a integráciu do genómu hostiteľskej bunky alebo na autonómnu replikáciu ako epizóm. Takéto vektory zahŕňajú lineárne nukleové kyseliny, plazmidy, fagemidy, kosmidy, RNA vektory, vírusové vektory a podobne. Neobmedzujúce príklady vírusových vektorov zahŕňajú retrovírusy, adenovírusy a adeno-asociované vírusy. Ako sa v tomto texte používa, termín „génová expresia“ alebo „expresia“ Fc fúzneho proteínu označuje transkripciu DNA sekvencie, transláciu mRNA transkriptu a sekréciu Fc fúzneho proteínového produktu. Fc fúzne proteíny obsahujúce IL2, CD26, Tat, Rev, OSF-2, bIG-H3, IgE receptor, PSMA alebo gp120 boli exprimované s použitím expresných systémov typov diskutovaných v tomto texte. Rovnaké alebo podobné expresné konštrukty sú opísané v patentoch Spojených štátov č. 5 541 087 a 5 726 044.

Ako alternatíva na fúziu proteínov technikami genetického inžinierstva môže byť na fúziu proteínových skupín použitá chemická konjugácia s použitím obvyklých chemických zosieťovacích činidiel.

Základné vektory použiteľné v praxi vynálezu zahŕňajú selekčný (to je selektovateľný) marker, napríklad gén kódujúci dihydrofolátreduktázu (DHFR), riadený transkripčnými regulačnými sekvenciami, pochádzajúcimi napríklad z vírusu SV40 a bakteriálne plazmidové sekvencie na selekciu a

udržiavanie plazmidu v *E. coli*. Expresia sekvencií Fc-fúzneho proteínu je riadená promotorom a voliteľne zosilňujúcimi sekvenciami, napríklad cytomegalovírusovým (CMV) promotorom a zosilňujúcimi sekvenciami.

Keď Fc-fúzny proteín alebo nukleová kyselina kódujúca tento fúzny proteín má byť podávaná človeku, sekvencie kódujúce Fc fúzny proteín výhodne začínajú v smere od 5' k 3' „vedúcou sekvenciou“ pochádzajúcou napríklad z protilátkového ľahkého (L) reťazca, fúzovanou v zhodnom čítacom rámci aspoň s časťou ťažkého reťazca imunoglobulínu alebo jej mutantnou formou, výhodne z Fc γ 1 úseku humánneho imunoglobulínového g1 génu. Fc γ 1 úsek imunoglobulínového Fc γ 1 génu výhodne zahŕňa aspoň časť kĺbovej domény a CH3 domény a výhodnejšie zahŕňa aspoň kĺbovú doménu, CH2 doménu a CH3 doménu. Keď Fc fúzny proteín má byť podávaný myšiam, výhodné sekvencie nukleovej kyseliny kódujúce konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu zahŕňajú sekvencie nukleovej kyseliny kódujúce v smere od 5' k 3' kĺbový úsek, CH2 doménu a CH3 doménu z myšacej IgG2a protilátky. Keď je nutné, je karboxy-koncová časť konštantného úseku ťažkého reťazca imunoglobulínu modifikovaná na úrovni nukleovej kyseliny tak, aby bola možná ligácia v zhodnom čítacom rámci so sekvenciami kódujúcimi buď preselektovaný antigén (v prípade Fc-antigénu) alebo imunostimulačný cytokín (v prípade Fc-adjuvantného cytokínu). DNA kódujúca sekrečnú kazetu môže byť vo svojej genómovej konfigurácii alebo svojej cDNA konfigurácii.

Časť DNA kódujúca signálnu sekvenciu výhodne kóduje peptidový segment, ktorý riadi sekréciu Fc fúzneho proteínu a potom je odštiepený od zvyšku Fc fúzneho proteínu. Signálna sekvencia je podľa vynálezu polynukleotíd, ktorý kóduje aminokyselinovú sekvenciu, ktorá zahajuje transport proteínu

cez membránu endoplazmatického retikula. Signálne sekvencie, ktoré sú použiteľné vo vynáleze zahŕňajú signálne sekvencie protilátkového ľahkého reťazca, napríklad protilátky 14.18 (Gillies et al. (1989) J. of IMMUNOL. METH., 12: 191), signálne sekvencie protilátkového ťažkého reťazca, napríklad signálne sekvencie ťažkého reťazca protilátky MOPC141 (Sakano et al. (1980) NATURE 286: 5774) a každé ďalšie signálne sekvencie, ktoré sú v odbore známe (pozri napríklad Watson (1984) NUCLEIC ACIDS RESEARCH 12: 14).

Signálne sekvencie boli v odbore dobre charakterizované a je známe, že typicky obsahujú 16 až 30 amínokyselinových zvyškov a môžu obsahovať viacej alebo menej amínokyselinových zvyškov. Typický signálny peptid sa skladá z troch úsekov: základný N-koncový úsek, centrálny hydrofóbny úsek a polárnejší C-koncový úsek. Centrálny hydrofóbny úsek obsahuje 4 až 12 hydrofóbných zvyškov, ktoré zakotvujú signálny peptid cez membránovú lipidovú dvojvrstvu počas transportu vznikajúceho polypeptidu. Po iniciácii je signálny peptid obvykle štiepený v lúmen endoplazmatického retikula bunkovými enzýmami známymi ako signálne peptidázy. Potenciálne štiepené miesta signálneho peptidu všeobecne sledujú „(-3, -1) pravidlo“. Teda typický signálny peptid má malé neutrálne amínokyselinové zvyšky v polohách -1 a -3 a je bez prolínových zvyškov v tomto úseku. Signálna peptidáza štiepi tento signálny peptid medzi -1 a +1 amínokyselinami. Teda signálna sekvencia môže byť štiepená z amíno-koncovej časti fúzneho proteínu v priebehu sekrécie. To má za následok sekréciu Fc fúzneho proteínu. Sekvencie signálneho peptidu použiteľné v praxi vynálezu sú v odbore dobre známe. (pozri napríklad von Heijne (1986) NUCLEIC ACIDS RES. 14: 4683).

Ako je odborníkovi zrejmé, vhodnosť konkrétnej signálnej sekvencie na použitie v sekréčnej kazete môže vyžadovať určité rutinné experimenty. Tieto experimenty môžu zahŕňať stanovenie schopnosti signálnej sekvencie viesť sekréciu Fc fúzneho proteínu a/alebo stanovenie optimálnej konfigurácie, genómovej alebo cDNA sekvencie, ktorá bude použitá, aby sa dosiahla účinná sekrécia Fc fúznych proteínov. Okrem toho je odborník schopný vytvoriť umelý signálny peptid sledujúci predložené pravidlá (von Heijne, odkaz vyššie) a testovať takú umelú signálnu sekvenciu na účinnosť rutinnými experimentami. Termíny „signálna sekvencia“, „signálny peptid,“ „vedúca sekvencia“ alebo „vedúce peptidy“ sú v tomto texte použité zameniteľne.

Predpokladá sa, že môže byť použitý veľký počet rôznych spôsobov podávania Fc fúznych proteínov alebo sekvencií nukleovej kyseliny kódujúcej fúzny proteín na imunizáciu príjemcu proti preselektovanému antigénu. Na vyvolanie CTL reakciou môžu byť použité dve odlišné aplikácie podľa predkladaného vynálezu, jedna založená na injekcii DNA kódujúcej Fc-antigénny fúzny proteín a druhá založená na podávaní Fc-antigénneho fúzneho proteínu schopného dodať proteín dráhe MHC I. triedy.

Injekcia antigénnych proteínov je použitá typicky, aby sa vyvolala imunitná reakcia cicavcov. Ale vynález tiež poskytuje spôsoby dodania antigénu k APC injekcií DNA. Všeobecne používaná technika je injikovať DNA expresné vektory kódujúce antigénny proteín do svalu. Publikácia je dôkazom toho, že antigénny proteín je exprimovaný svalovými bunkami, ale že antigén nie je týmito bunkami prezentovaný imunitnému systému. Miesto toho sa má za to, že špecializované APC, napríklad makrofágy a dendritické bunky, migrujú do miesta injekcie,

naviažu a prezentujú antigén procesom, ktorý ešte nebol upresnený. Použitie expresných vektorov pre Fc-antigénny fúzny proteín robí tento postup účinnejší, pretože sekretovaný fúzny proteín sa viaže účinnejšie k APC ako natívny antigénny proteín.

Jeden dôsledok prístupu s injekciou DNA je, že môže mať často za následok vyvolanie ako humorálnej tak bunkovej reakcie. Typicky majú proteíny podávané exogénne horšiu príležitosť na vstup do dráhy na prezentáciu na molekulách MHC I. triedy. Ale podávanie Fc fúznych proteínov podľa vynálezu zosilní vytváranie cytotoxických buniek, pravdepodobne prezentáciou preselektovaného exogénneho antigénu prostredníctvom MHC I. triedy. Kombinácia DNA imunizácie a proteínovej imunizácie môže tiež pôsobiť synergicky, najskôr inštruovať imunitný systém a potom zosilniť stupeň reakcie vo forme ako produkcia protilátok tak cytotoxických bunkových reakcií. Spoločné podávanie Fc-adjuvantného fúzneho proteínu, napríklad Fc-IL-2, Fc-GM-CSF, Fc-IL-12 a ligandu Fc-Flt3, spolu s Fc-antigénnym fúznym proteínom, zaistí spoločnú lokalizáciu fúznych proteínov do rovnakého bunkového kompartmentu APC, a tým stimuláciu účinnejšej imunitnej reakcie proti preselektovanému antigénu.

Prípravky podľa predkladaného vynálezu (to je Fc-antigén a/alebo Fc-adjuvantné fúzne proteíny alebo sekvencie nukleovej kyseliny kódujúce tieto fúzne proteíny) môžu byť poskytnuté zvieratú ktorýmkoľvek vhodným prostriedkom, priamo (napríklad lokálne, ako injekciou, implantáciou alebo topickým podávaním do určitého miesta tkaniva) alebo systémovo (napríklad parenterálne alebo perorálne). Kde má byť prípravok poskytnutý parenterálne, ako napríklad intravenóznym, subkutánnym, oftalmickým, intraperitoneálnym, intramuskulárnym, bukálnym,

rektálnym, vaginálnym, intraorbitálnym, transdermálnym, intracerebrálnym, intrakraniálnym, intraspinálnym, intraventrikulárnym, intratekálnym podávaním, podávaním do cisterien, intrakapsulárnym, intranazálnym podávaním alebo podávaním aerosolu, obsahuje prípravok výhodne časť vodnej alebo fyziologicky kompatibilnej tekutej suspenzie alebo roztoku. Teda nosič alebo vehikulum je fyziologicky prijateľné tak, že okrem aplikácie požadovaného prípravku pacientovi neovplyvní nijako nepriaznivo pacientovu elektrolytovú rovnováhu a/alebo rovnovážny objem. Tekuté médium pre prípravok môže teda zahŕňať normálny fyziologický roztok (napríklad 9,85% vodný NaCl, 0,15 M, pH 7-7,4).

Výhodné dávky Fc-antigénneho fúzneho proteínu pri podávaní sú v rozmedzí 50 ng/m² až 1 g/m², výhodnejšie 5 µg/m² až 200 mg/m² a najvýhodnejšie 0,1 mg/m² až 50 mg/m². Výhodné dávky Fc-adjuvantného fúzneho proteínu pri podávaní sú v rozmedzí 1 ng/m² až 0,1 g/m², výhodnejšie 0,5 µg/m² až 20 mg/m² a najvýhodnejšie 10 µg/m² až 5 mg/m². Výhodné dávky nukleových kyselín kódujúcich Fc-antigénne alebo Fc-adjuvantné fúzne proteíny pri podávaní sú v rozmedzí 1 µg/m² až 100 mg/m², výhodnejšie 20 µg/m² až 10 mg/m² a najvýhodnejšie 400 µg/m² až 4 mg/m².

Predpokladá sa, že maximálna imunizácia môže byť dosiahnutá uskutočňovaním početných samostatných imunizácií, napríklad jedna až tri inokulácie približne 3 týždne až šesť mesiacov od seba. Okrem toho, ako je diskutované vyššie, maximálne imunitné reakcie môžu byť dosiahnuté za určitých okolností striedaním medzi podávaním Fc fúzných proteínov a nukleových kyselín kódujúcich tieto Fc fúzne proteíny. Predpokladá sa, že Fc-antigénny fúzny proteín alebo nukleová

kyselina kódujúca fúzny proteín môže byť podávaná cicavcovi pred podávaním Fc adjuvantného fúzneho proteínu alebo nukleovej kyseliny kódujúcej Fc adjuvantný fúzny proteín, súčasne s týmto podávaním alebo po ňom. Predpokladá sa ale, že optimálne spôsoby podávania, dávky a zosilňovacie režimy môžu byť stanovené rutinnými experimentami v rozsahu schopností odborníka.

Vynález je ďalej ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi, ktoré rozsah vynálezu nijako neobmedzujú.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Konštrukcia expresných vektorov pre Fc-antigén a Fc-adjuvans

Aby sa starostlivo otestovala imunogenicita Fc fúznych proteínov v myšacom modele, boli konštruované expresné vektory s použitím sekvencií nukleovej kyseliny kódujúcich Fc úseky myšacieho IgG2a. To znížilo riziko, že Fc úsek každého fúzneho proteínu indukuje pre cicavca imunitnú reakciu. Okrem toho ako fúzni partneri v Fc-adjuvantných fúznych konštruktoch boli použité myšacie cytokíny, pretože ich biologické aktivity môžu byť vysoko špecifické pre daný živočíšny druh. Teda vektory publikované skôr (Lo et al. (1998) PROTEIN ENGINEERING 11: 495-500) boli modifikované (pozri obrázok 2) nahradením humánnej Fc sekvencie IgG1 sekvenciami cDNA kódujúcej Fc myšacieho IgG2a (patent Spojených Štátov č. 5 726 044).

Fc sekvencie myšacieho IgG2a boli klonované z knižnice myšacích splenocytov amplifikáciou polymérázovou reťazovou

reakciou (PCR). PCR priméry obsahovali adaptérové sekvencie na spojenie vedúcej sekvencie na 5' konci, a unikátne restriktčné miesto SmaI/XmaI na 3' konci na ligáciu so sekvenciami kódujúcimi buď antigény alebo adjuvantné cytokíny. Antigén a adjuvantné (cytokínové) sekvencie boli pripravené s miestom 5' SmaI a udržiavaním čítacieho rámca medzi Fc a antigénom alebo adjuvantnými proteínmi a unikátnym miestom XhoI umiestneným hneď po translačnom stop signále.

Výsledný DNA konštrukt kódoval vedúcu sekvenciu ľahkého reťazca fúzovanú priamo ku kľbovému úseku H reťazca myšacieho IgG2a a pokračoval CH2 a CH3 exóny myšacieho IgG2a a fúznym partnerom (buď antigén alebo adjuvantný cytokín). Transkripcia bola riadená CMV promotorom/enhancerom, ktorý bol označený ako použiteľný na expresiu vo väčšine typov buniek v kultúre, a tiež na expresiu v svale a ďalších typoch buniek po DNA injekcii in vivo. Selekčný marker, gén dihydrofolátreduktázy (DHFR), bol vložený do každého vektora na zjednodušenie selekcie trvale transfekovaných klonov, a tiež sekvencie potrebnej na udržiavanie plazmidovej DNA v E. coli.

Nasledujúce názorné konštrukty Fc-antigénu boli tvorené zavedením správne upravených sekvencií medzi unikátne miesta SmaI až XhoI vo vektore nazvanom pdCs-muFc, kde „mu“ vyjadruje, že Fc je myšacieho pôvodu:

Ektodoména (extracelulárna časť) humánneho IL4 receptora (IL-4R) bola klonovaná z humánných mononukleárnych buniek periférnej krvi (PBMC) PCR amplifikáciou. Použité priméry boli:

5' GTCCCGGGTATGAAGGTCTTGCAGGAGC (sekv. id. č. 1) a

5' CCCCTCGAGCTAGTGCTGCTCGAAGGGCTCCCTG (sekv. id. č. 2),

ktoré obsahovali miesta SmaI a XhoI, v danom poradí, na inzerciu do pdCs-muFc vektora. PCR reakčné podmienky použité pre toto a nasledujúce klonovanie sú uvedené ďalej. Na amplifikáciu požadovaného génu(ov) boli použité Advantage KlenTaq a Polymeraz Mix (Clontech, Palo Alto, CA) a špecifické priméry. Reakčné zmesi obsahovali 10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01% želatínu (hmotnosť/objem), 0,2mM každý z dNTP a 1,25 jednotky KlenTaq v celkovom objeme 100 µl. Bolo uskutočňovaných tridsať PCR cyklov, každý cyklus sa skladal z tepelnej denaturácie v 94°C počas 1 minúty, nasadenie primérov v 42 °C počas 45 sekúnd a predlžovanie primérov v 72°C počas 1 minúty. Amplifikovaný produkt bol potom subklonovaný do SK vektora (Stratagene, San Diego, CA) a jeho DNA sekvencia overená štandardným sekvencovaním.

Ektodoména humánneho membránového antigénu špecifického pre prostatu (PSMA) bola klonovaná z bunkovej línie LnCAP karcinómu prostaty (ATCC CRL1740) prostredníctvom PCR s použitím primérov:

5' AAGCTTAAATCCTCCAATGAAGC (sekv. id. č. 3) a

5' CTCGAGTTAGGCTACTTCACTCAAAG (sekv. id. č. 4),

pre sensia a anti-sensia vlákna, v danom poradí. DNA sekvencia bola overená a PCR fragment vložený do pdCs-muFc vektora za vzniku pdCs-muFc-PSMA fúzneho konštruktú.

Ektodoména humánneho EpCAM (tiež známa ako K5 antigén), povrchového proteínu epitelovej bunky zvýšene exprimovaného na väčšine karcinómových buniek, bola klonovaná z LnCAP buniek prostredníctvom PCR s použitím primérov:

5' CCCCgggTAAACAGGAAGAATGTGTCTGTG (sekv. id. č. 5) a

5' CTCGAGTCATTTTAGACCCTGCATTGAG (sekv. id. č. 6)

pre sensia a anti-sensia vlákna, v danom poradí. DNA sekvencia bola overená štandardným sekvencovaním a PCR fragment bol vložený do vektora pdCs-muFc za vzniku fúzneho konštruktú pdCs-muFc-EpCAM. Ďalší vektor bol konštruovaný s použitím EpCAM ektodomény ako N-koncového fúzneho partnera a v tomto prípade PCR produkt obsahoval prirodzenú vedúcu sekvenciu z EpCAM cDNA a sekvenciu zrelej ektodomény na hranici membránou prechádzajúcej domény (membránovej domény). 3' koniec tohto PCR produktu obsahoval vložené AflII miesto na ligáciu k 5' AflII miestu myšacieho Fc fragmentu. Použité PCR priméry zahŕňali:

5' TCTAGAGCAGCATGGCGCCCCCGC (sekv. id. č. 7) a

5' CCTTAAGCACCTGCATTGAGAATTCAG (sekv. id. č. 8).

V tomto prípade, myšací Fc bol bez 3' inzerčného miesta na zavedenie fúzneho proteínu, ale obsahoval translačný terminačný signál na konci sekvencie kódujúcej Fc.

Relatívne konzervatívna časť úseku HIV gp41 v blízkosti membrány, rozprestierajúcej sa od Hind III miesta k lysínovému zvyšku priláhlému k membránovému úseku, bola exprimovaná ako Fc fúzny proteín, ako príklad krátke polypeptidové antigénové sekvencie. Aj keď bola použitá proteínová sekvencia z kmeňa HIV IIIB, kódujúca sekvencia bola optimalizovaná na optimálnu expresiu v eukaryotických bunkách s použitím kodónov s vysokým obsahom GC. DNA sekvencia kódujúca aminokyselinové zvyšky 626 až 669, ktorá mala nasledujúcu sekvenciu: C CCG GGA TCC CTG ATC CAC TCC CTG ATC GAG GAA TCC CAG AAC CAG CAA GAG AAG AAC GAG CAG GAG CTG CTG GAG CTC GAC AAG TGG GCC TCC CTG TGG AAC TGG TTC AAC ATC ACC AAT TGG CTG TGG TAC ATC AAG TGA CTCGAG (sekv. id. č. 9) bola syntetizovaná chemicky a ligovaná do vektora pdCs-muFc. Aminokyselinová sekvencia fúzovaného polypeptidu bola: SLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK (sekv. id. č. 10).

Ďalšie sekvencie kódujúce HIV proteín boli použité na konštrukciu Fc-antigénnych fúzných proteínov, ako bolo opísané skôr (patenty Spojených Štátov č. 5 541 087 a 5 726 044) s použitím skôr Fc myšacieho IgG2a ako pôvodného Fc humánneho IgG1. Tieto konštrukty predstavujú ďalšie uskutočnenie vynálezu.

Rad Fc-adjuvantných (cytokínových) fúzných proteínov obsahujúcich Fc myšacieho IgG2a a niekoľko myšacích cytokínov bol konštruovaný rovnakým spôsobom ako Fc-antigénny fúzny proteín. Špecifické cytokíny a klonovacie priméry sú diskutované nižšie.

Myšací IL-2 bol klonovaný z myšacích mononukleárných buniek periférnej krvi (PBMC) prostredníctvom PCR s použitím PCR primérov (sensia):

5' GGCCCGGGTAAAGCACCCACTTCAAGCTCC (sekv. id. č. 11) a (antisensia):

5' CCCTCGAGTTATTGAGGGCTTGTG (sekv. id. č. 12).

Myšací GMCSF bol klonovaný z myšacích PBMC prostredníctvom PCR s použitím PCR primérov (sensia):

5' CCCGGGAAAAGCACCCGCCGCTCACCC (sekv. id. č. 13) a (antisensia):

5' CTCGAGTCATTTTTGGCTTGGTTTTTTC (sekv. id. č. 14).

Myšací ligand Flt3 bol klonovaný z myšacieho tymu prostredníctvom PCR s použitím PCR primérov (sensia):

5' CAAGCTTACACCTGACTGTTACTTCAGC (sekv. id. č. 15) a (antisensia):

5' CTCGAGTCAAGGCTCTGGGAGCTCCGTGGC (sekv. id. č. 16).

Myšací IL-12 p35 bol klonovaný z myšacích PBMC prostredníctvom PCR s použitím PCR primérov (sensia):

5' CCCCAGGTAGGGTCATTCCAGTCTCTGG (sekv. id. č. 17) a (antisensia):

5' CTCGAGTCAGGCGGAGCTCAGATAGC (sekv. id. č. 18).

Myšací IL-12 p40 bol klonovaný z myšacích PBMC prostredníctvom PCR s použitím PCR primérov (sensia):

5' TCTAGACCATGTGTCCTCAGAAGCTAAC (sekv. id. č. 19) a (antisensia):

5' CTCGAGCTAGGATCGGACCCTGCAG (sekv. id. č. 20).

Všetky PCR produkty, okrem myšacieho IL-12 p40, boli klonované ako fragmenty SmaI/XhoI, analyzované štandardným DNA sekvencovaním a ligované do vektora pdCs-muFc obsahujúceho ako svoj Fc úsek myšací Fc IgG2a. PCR produkt myšací IL-12 p40 bol exprimovaný oddelene (nie ako Fc fúzny proteín) vo vektore obsahujúcom rovnaký CMV promotor enhancer, vedúci sekvenciu ľahkého reťazca fúzovanú priamo k zrelej p40 podjednotke myšacieho IL-12 a gén rezistencie na neomycín v mieste selekčného markerového génu DHFR vo vektore pdCs-muFc. Výsledný vektor bol nazvaný pNC-mp40, kde „N“ označuje gén na selekciu neomycínom.

Všetky plazmidové konštrukty indukovali syntézu a sekréciu špecifických fúznych proteínov prechodnou expresiou v bunkách 293 z ľudskej obličky. Stručne, plazmidy boli zavedené do monovrstvy buniek 293 z ľudskej obličky prostredníctvom koprecipitácie s fosforečnanom vápenatým (Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor, N.Y.). Bunky boli nechané cez noc (16 hodín), premyté PBS a živené čerstvým tkanivovým kultivačným médiom (DMEM obsahujúce 10% fetálne bovinné sérum (FBS)). Po ďalších 2-3

dňoch bolo kultivačné médium testované na sekretované fúzne proteíny Fc špecifickým testom ELISA (Gillies et al. (1989) J. IMMUNOL. METHODS 125: 191) s použitím protilátok špecifických pre myšací IgG-Fc proteín. V prípade myšacieho Fc-IL12 boli obidve Fc-p35 a p40 DNA expresných plazmidov prechodne exprimované v rovnakej bunkovej kultúre, takže heterodimérny cytokínový fúzny proteín bol zostavený pred sekréciou bunkou (Gillies et al. (1998) J. IMMUNOL. 160:6195).

Potom boli vytvorené trvale transfekované bunky exprimujúce rôzne Fc fúzne proteíny vnesením linearizovanej DNA do myšacích myelómových buniek NS/0 štandardnou technikou elektroporácie. Stručne, bunky boli suspendované v kyvete prístroja Gene Pulser (BioRad) v koncentrácii 10^7 buniek/ml a 0,5 ml suspenzie bolo zmiešané s 10 μ g DNA a zmes bola chladená na ľade počas 10 minút. Elektroporácia bola uskutočňovaná s použitím prístroja Gene Pulser (BioRad) s nastavením 0,25 V a 500 μ F. Bunky sa nechali zotaviť na ľade počas 10 minút, potom boli resuspendované v rastovom médiu a prenesené na 96 jamkové doštičky. Bunky boli živené každé 2-3 dni selekčným médiom obsahujúcim 0,1M metotrexát počínajúc 2 dni po elektroporácii. Rezistentné kolónie rastúce na 96 jamkových doštičkách boli testované na expresiu testom ELISA podľa protokolu pre Fc.

Na expresiu myšacieho Fc-IL12 fúzneho proteínu bola transfekovaná bunková línia NS/0 už exprimujúca p40 podjednotku myšacieho IL-12 transfekovaná, ako bolo opísané vyššie, expresným vektorom s myšacou Fc-p35 podjednotkou. Línia exprimujúca p40 bola získaná elektroporáciou buniek NS/0 vektorom pNC-mp40, opísaným vyššie, a selekciou v médiu obsahujúcom neomycínový analóg 6418 (Life Sciences

Technologies). Po druhej transfekcii bol uskutočňovaný screening prežívajúcich bunkových klonov testom Fc ELISA a testom ELISA pre myšací IL-12 (Genzyme, Cambridge, MA).

Štruktúrna integrita výsledných fúzných proteínov bola testovaná elektroforézou na SDS-polyakrylamidovom géli (SDS-PAGE). Najprv boli fúzne proteíny naviazané k malému objemu (10-20 μ l na ml média) proteínu A Sepharose (Repligen, Needham, MA). Naviazaná látka bola premytá PBS obsahujúcim Tween-20 (0,01%), potom eluovaná v gélovom pufri obsahujúcom SDS a potom 2 minúty varená za prítomnosti 5% 2-merkaptoetanolu. Redukované proteíny potom boli analyzované na SDS-PAGE géloch (dopredu naliatych) a zafarbené modrošťou Coomassie. Purifikácie vo veľkej mierke zo stabilných bunkových klonov boli uskutočňované s použitím kolón proteín A Sepharose (Repligen, Needham, MA) podľa inštrukcií výrobcu.

Príklad 2

Imunogenicita Fc-antigénu a účinok chemického alebo Fc-cytokínového adjuvans na produkciu protilátok

Konštrukt myšacej Fc-huIL-4R alfa podjednotky pripravený v príklade 1 bol použitý ako antigén na testovanie potenciálneho účinku týchto proteínov na cielenie APC vo zvieracom modele. Ektodoména IL-4R alfa podjednotky predstavuje dosť konzervatívnu molekulu medzi živočíšnymi druhmi, ktorá má viac ako z 50 % identickej sekvencie medzi človekom a myšou.

Skupinám myší bola podaná injekcia 50 μ g Fc-antigénneho fúzneho proteínu (Fc-IL-4R) subkutánne buď v PBS alebo

emulgovaného vo Freundovom kompletnom adjuvans (CFA). Niektoré skupiny tiež dostali dávku 5 µg (zmiešané s Fc-IL-4R) Fc-adjuvantného proteínu, a to buď Fc-IL2 alebo Fc-GMCSF. Dva týždne pozdejšie bola myšiam podaná injekcia rovnakej zmesi, ale bola podaná do peritoneálnej dutiny. CFA formulácie tvoria micely, ktoré slúžia ako zdroj pomaly uvoľňovaného antigénu, ktorý umožňuje kontinuálnu stimuláciu imunitného systému. Mycobakteriálne proteíny v CFA tiež indukujú silnú zápalovú reakciu stimuláciou cytokínov, a tým ďalej zosilňujú imunitnú reakciu. CFA ale vyvoláva vážne vedľajšie účinky vrátane poškodenia kože, čím je pre ľudí nepoužiteľné. Ukazuje sa ale, že zmesi s Fc-adjuvantnými fúznymi proteínmi v PBS, nevyvolávajú žiadnu viditeľnú kožnú reakciu alebo akúkoľvek inú zjavnú známku toxicity zvierata.

Dva týždne po zosilňovacej injekcii (to je 28 dní po prvej injekcii) bola zvieratám odobraná krv a séra boli pripravené tak, že sa plná krv nechala zraziť v mikroskúmavkách, bunky a zrazenina sa stočili pri vysokej rýchlosti 12 000 RPM počas 5 minút a bol získaný supernatant. Výsledné séra boli nariedené testovacím pufrom (PBS obsahujúce 0,01% Tween-20) a testované na protilátky reaktívne s humánnym IL-4R. Bola uskutočňovaná antigén-špecifická ELISA s použitím 96 jamkových doštičiek potiahnutých humánnym Fc-huIL-4R (100 µl s koncentráciou 5 µg/ml v PBS sa pridalo do každej jamky a inkubovalo v 4°C cez noc). Antigénom potiahnuté doštičky boli potom premyté a blokované blokujúcim pufrom (1% BSA, 0,01% Tween-20 v PBS) pred použitím. Nariedené testované séra boli inkubované v jamkách počas 2 hodín pri teplote miestnosti, a potom boli jamky osemkrát premyté testovacím pufrom. Bola pridaná sekundárna proti-myšacia Fc-špecifická protilátka konjugovaná s chreňovou peroxidázou (riedenie 1:2000, Jackson

ImmunoResearch) a doštičky boli inkubované ďalšiu hodinu. Po ôsmych ďalších premytiach testovacím pufrom bol pridaný roztok o-fenylendiamindihydrochloridu (OPD) obsahujúci 25mM kyselinu citrónovú, 50mM NaHPO₄, pH 5 a 0,03% čerstvo pridaný H₂O₂. Reakcia bola zastavená približne po 30 minútach pridaním 100 µl 4N H₂SO₄. Výsledné doštičky boli odčítané v 490 nm na prístroji na odčítanie doštičiek, ktorý automaticky subtrahoval pozadie odčítané v 650 nm. Výsledky boli vynesené do grafu ako optická denzita versus riedenie antiséra. Relatívne protilátkové titre boli určované množstvom riedenia séra, ktoré bolo potrebné na to, aby sa optická denzita znížila pod arbitrárnu hodnotu, napríklad 1 jednotku O.D.

Výsledky imunizačných protokolov sú ukázané na obrázku 3. Injekcia myšacieho Fc-IL-4R fúzneho proteínu samotného v PBS podľa tohto protokolu indukovala protilátkovú reakciu len pre jednu myš (obrázok 3B). Pridanie CFA ale malo za následok viacej reagujúcich myší, ale titre boli zhruba rovnaké ako pre reagujúce myši, ktorým bola podaná injekcia Fc-IL4R fúzneho proteínu samotného v PBS (obrázok 3C). Spoločné podávanie myšacieho Fc-IL2 adjuvans s Fc-IL4R v PBS indukovalo reakciu všetkých zvierat, ale množstvo vytvorenej protilátky sa v jednotlivých prípadoch menilo (obrázok 3D). Kombinácia CFA a myšacieho Fc-IL2 adjuvans spoločne (obrázok 3A) mala za následok vyššie protilátkové titre ako každá zlúčenina samotná (obrázky 3C a 3D). Spoločné podávanie myšacieho Fc-GMCSF adjuvans v PBS indukovalo najsilnejšiu imunitnú reakciu zo všetkých skupín (obrázok 3E), vrátane skupiny, ktorá bola imunizovaná kombináciou obidvoch Fc-GMCSF adjuvans a CFA (obrázok 3F). Inak povedané, myšacie Fc-GMCSF adjuvans v PBS, keď bolo podávané spoločne s myšacím Fc-IL4R antigénom,

odstránilo potrebu použitia CFA. Predpokladá sa, že taký spôsob by bol vhodnejší na použitie pre človeka.

Príklad 3

Účinok Fc-GMCSF adjuvantnej dávky na protilátku vytváranú proti karcinómovému antigénu, PSMA, v Fc-PSMA fúznom proteíne

PSMA v súčasnej dobe predstavuje lákavý cieľový antigén asociovaný s humánnymi nádormi vďaka svojej obmedzenej distribúcii v normálnom tkanive. PSMA je v súčasnosti testovaný v klinických skúškach ako uvažovaná nádorová vakcína. V tomto príklade bola hodnotená imunogenicitá PSMA antigénu v Fc-PSMA fúznom proteíne.

Myšací Fc-PSMA fúzny proteín bol pripravený tak, ako bolo prejednané v príklade 1. Skupinám myší bola podaná subkutánne injekcia 50 µg myšacieho Fc-PSMA v PBS, spolu s meniacou sa koncentráciou Fc-adjuvantného fúzneho proteínu Fc-GMCSF, a potom im bola intraperitoneálne podaná zosilňovacia injekcia 14 dní pozdejšie. Protilátkové titre boli merané testom ELISA zachytávajúcim Fc-PSMA antigén, ako bolo opísané v príklade 2 pre Fc-IL4R fúzny proteín. Výsledky boli vynesené do grafu na obrázku 4 ako protilátkový titer (riedenie, v ktorom OD bola znížená na 1) versus čas po prvej injekcii.

V neprítomnosti Fc-GMCSF mali myši protilátkové titre proti PSMA v rozmedzí od 1000 do približne 20 000 (obrázok 4A). Spoločné podávanie takého malého množstva, ako 0,05 µg Fc-GMCSF ale malo za následok titre v rozmedzí od 30 000 do 140 000 (obrázok 4B). Desaťnásobné zvýšenie Fc-GMCSF ďalej stimulovalo protilátkové titre proti tomuto karcinómovému

antigénu (obrázky 4C a 4D). Najvyššia podaná dávka (5 μg Fc-GMCSF fúzneho proteínu na myš) ešte stále predstavuje približne 2 μg GMCSF na injekciu - dávka bez zrejmeho účinku na myšaciu kožu alebo bez akýchkoľvek systémových príznakov, že bolo zviera imunizované (pozri obrázok 4D). Okrem toho na rozdiel od CFA nebolo znateľné zväčšenie sleziny.

Príklad 4

Účinok Fc-sprostredkovaného podania PSMA na protilátkovú reakciu na imunizáciu

Špecifické účinky Fc zložky Fc-antigénnych a Fc-adjuvantných fúzných proteínov boli testované porovnaním indukovanej imunitnej reakcie u myší, ktorým bola podaná injekcia fúzných proteínov, nefúzovaného antigénu alebo adjuvantných proteínov alebo zmesi predchádzajúcich. Na tento účel bol použitý humánný PSMA systém.

Nefúzovaný PSMA bol pripravený proteolytickým štiepením humánneho Fc-PSMA fúzneho proteínu (Lo et al. (1998) PROTEIN ENGINEERING 11: 495-500) plazmínom podľa inštrukcií výrobcu. Uvoľňovaný Fc a neštiepený Fc-PSMA boli odstránené adsorpciou k proteínu A Sepharose (Repligen, Needham, MA).

Skupinám myší (n=3) bola podaná injekcia jednej subkutánnej dávky 50 μg PSMA buď samotného (obrázok 5A) alebo v kombinácii s 0,2 μg voľného GMCSF (obrázok 5B) alebo s 0,5 μg Fc-GMCSF (obrázok 5C) (0,5 μg Fc-GMCSF obsahuje približne 0,2 μg GMCSF). V ďalšom súbore myší bola každej myši podaná injekcia jednej subkutánnej dávky 50 μg myšacieho Fc-PSMA fúzneho proteínu samotného (obrázok 5D) alebo spolu s

0,2 µg voľného GMCSF (obrázok 5E) alebo s 0,5 µg Fc-GMCSF (obrázok 5F). Všetky injekčné formulácie boli v PBS bez chemického adjuvans. Protilátky reaktívne s myšacím Fc-PSMA boli merané 14. deň po imunizácii.

Dôležitosť Fc zložky Fc-antigénneho fúzneho proteínu vo Fc-PSMA fúznom proteíne na imunogenicitu PSMA bola nápadná, keď zvieratám bola podaná injekcia PBS formulácií bez chemických adjuvancií. V podstate nebola primárna imunitná reakcia na PSMA podávaný v PBS (obrázok 5A). Pridanie GMCSF alebo Fc-GMCSF na imunizáciu malo veľmi malý účinok (obrázky 5B a 5C), okrem slabej reakcie jedného zvierata (obrázok 5B). Na rozdiel od toho zvieratá, ktorým bola podaná injekcia Fc-PSMA samotného vykazovali silnú primárnu imunitnú reakciu vo všetkých prípadoch (obrázok 5D). Pridanie voľného GMCSF k Fc-PSMA slabo zosilňovalo účinok (obrázok 5E), ale spoločné podávanie obidvoch antigénu a cytokínu ako Fc fúznych proteínov poskytlo najvyšší stupeň reakcie (obrázok 5F).

Tieto výsledky ukazujú, že kombinácia Fc-antigénu a Fc-adjuvans je obzvlášť užitočná pri vytváraní imunitnej reakcie a preukazujú zrejmy prospech spoločnej lokalizácie antigénu a stimulačného cytokínu in vivo, pravdepodobne k APC.

Príklad 5

Porovnanie adjuvantných účinkov fúznych proteínov Fc-GMCSF alebo Fc-Flt3L

Bolo ukázané, že ligand pre Flt3, v odbore tiež nazývaný ligand Flt3 (Flt3L), má rozhodujúcu úlohu pri vytváraní a maturácii dendritických buniek (Soligo et al. (1998) BR. J.

HAEMATOL. 101: 352-63). Predpokladá sa, že dendritické bunky, spolu s makrofágmi tkaniva, sú najdôležitejšie APC. Štúdie na myšiach preukázali, že denné injekcie počas 10 dní zvyšujú počet a APC aktivitu dendritických buniek navrátilných z lymfatického tkaniva a sleziny a že tieto bunky sú neobyčajne účinné pri prezentácii antigénu obom CD4+ a CD8+ T lymfocytom. Predpokladá sa, že Langerhansove bunky kože predstavujú jeden typ dendritických buniek schopných prezentácie antigénu po vychytaní a migrácii do lokálnych lymfatických uzlín. Pretože sa predpokladá, že väčšina dendritických buniek neexprimuje usporiadanie Fc receptorov typicky zisťované na makrofágu (napríklad FcγRI), nemôže byť predpovedané, či by spoločný lokalizujúci účinok Fc fúzných proteínov zapojil túto líniu APC.

Aby sa otestovalo, či by Flt3L mohol pôsobiť ako adjuvans, skupinám myší bola podaná injekcia myšacieho Fc-PSMA a myšacieho Fc-Flt3L, skôr ako použitie myšacieho Fc-GMCSF fúzneho proteínu (silný stimulátor makrofágov a granulocytov). V tomto prípade sa očakávalo, že akýkoľvek adjuvantný účinok bude sprostredkovaný aktiváciou a vychytávaním dendritických buniek, čo bude mať nakoniec za následok protilátkovú reakciu na PMSA. Výsledky sú zhrnuté na obrázku 6.

Táto štúdia ukazuje, že myšací Fc-Flt3L je silné adjuvans, ktoré stimuluje anti-PSMA protilátky práve tak ako, ak nie lepšie, rovnaká dávka Fc-GMCSF. Výsledky podporujú pozorovanie, že kombinácia Fc-antigénu a Fc-adjuvans môže byť obzvlášť účinná pri indukcii imunitnej reakcie. Výsledky tiež ukazujú, že dendritické APC zrejme môžu byť ciele Fc-antigénom a Fc-cytokínom, a tiež makrofágom APC, čo svedčí pre to, že na týchto bunkách je prítomná aspoň jedna forma Fc receptora.

Príklad 6

Imunitná reakcia na Fc-EpCAM a EpCAM-Fc fúzne proteíny

Ďalší potenciálne dôležitý humánný karcinómový antigén, EpCAM (tiež nazývaný KSA a 17-1A antigén) bol produkovaný ako fúzny proteín Fc úsekom myšacieho IgG2a s použitím plazmidov a metód, ako boli opísané v príklade 1 a bol podávaný buď samotný alebo v kombinácii s Fc-GMCSF ako adjuvans. Myšiam bola podaná subkutánne injekcia a po 3 týždňoch zosilňovacia injekcia 10 μg Fc-EpCAM a 1 μg Fc-GMCSF v PBS. Kontrólne myši nedostali Fc-GMCSF. Titre protilátok namierených proti EpCAM boli merané 7 dní (obrázok 7A) a 14 dní (obrázok 7B) po zosilňovacej injekcii. Výsledky ukazujú, že Fc-EpCAM, keď bol podávaný samotný, je účinný imunogén (prázdne kosoštvorce) a že Fc-GMCSF môže ďalej zosilniť reakciu na tento antigén (plné trojuholníčky).

Okrem toho bol EpCAM antigén exprimovaný v opačnej orientácii vzhľadom na Fc fragment ako EpCAM- μFc (pozri príklad 1, obrázok 1B). Táto molekula bola použitá na imunizáciu Balb/c myšacou subkutánnou injekciou. Boli použité vyššie dávky EpCAM-Fc fúzneho proteínu (25 μg na dávku) a množstvo adjuvans (2,5 μg Fc-GMCSF) bolo zvýšené tiež. Titre protilátok namierených proti EpCAM boli merané 14 dní (obrázok 8A) a 21 dní (obrázok 8B) po imunizácii. EpCAM-Fc fúzny proteín samotný bol úplne imunogénny v neprítomnosti Fc-GMCSF (obrázky 8A a 8B, (prázdne kosoštvorce)). Pridanie Fc-cytokínu zvýšilo protilátkové titre približne 3krát (obrázok 8A a 8B, (plné trojuholníčky)).

Aby sa otestovalo, či by imunitná reakcia proti EpCAM mohla chrániť cicavca pred nádorovými bunkami exprimujúcimi tento antigén, neimunizovaným myšiam alebo myšiam imunizovaným EpCAM-Fc fúznym proteínom (a v niektorých prípadoch Fc-cytokínmi) bola podaná injekcia do žily chvôstu 10^5 buniek CT26 myšacieho karcinómu časti hrubého čreva transfekovaných humánnym EpCAM (Gillies et al. (1998) J. IMMUNOL. 160: 6195). Po 21 dňoch boli zvieratá usmrtené a rozsah pľúcnych metastáz bol hodnotený (1) určovaním štádia čo sa týka rozsahu na povrchu pľúc a (2) zvážením pľúc a porovnaním s normálnymi pľúcami zvierata, aby sa zistil rozdiel hmotnosti, ktorej zvýšenie bolo pripisované nádorovej mase. Výsledky zhrnuté v tabuľke 1 ukazujú, že všetky imunizované myši vykazovali štatisticky významnú redukciu nádorových metastáz v porovnaní s kontrolnými myšami, vrátane zvierat imunizovaných EpCAM-Fc fúznym proteínom samotným. Podobné výsledky boli dosiahnuté s použitím Fc-EpCAM fúzneho proteínu ako antigénu.

Tabuľka 1

Ošetrovaná skupina	Skóre metastáz	Priemerná hmotnosť pľúc
Kontrolná skupina	4, 4, 4, 1, 1	412+/-130
EpCAM-Fc	0, 0, 0, 0, 0	210+/-21
EpCAM-Fc + Fc-GM	0, 0, 0, 0, 0	240+/-19
EpCAM-Fc + Fc-IL2	0, 0, 0, 0, 0	230+/-19

Skóre metastáz bolo založené na rozsahu postihnutia povrchu pľúc s použitím nasledujúceho hodnotenia: 1 = 1-25% rozsah, 2 = 26-50% rozsah, 3 = 51-75% rozsah a 4 = 76-100% rozsah.

Príklad 7

Kombinácia antigén-Fc a cytokínových adjuvans v jednom fúznom proteíne

Proteín opísaný v príklade 6, EpCAM-Fc, slúži za vzor N-koncového antigénu, pripojeného k Fc úseku imunoglobulínu ako karboxylová proteínová doména. Tento proteín a ďalšie jemu podobné môžu byť spoločne podávané s Fc-adjuvantnými fúznymi proteínmi, napríklad Fc-cytokínmi, na zosilňovanie imunitnej reakcie na antigén. Alternatívne môžu byť antigén, konštantný úsek ťažkého reťazca imunoglobulínu a adjuvantný proteín (napríklad cytokín) tvorené ako jeden fúzny proteín, napríklad ako EpCAM-Fc-GMCSF fúzny proteín.

Expresný plazmid na tento proteín bol konštruovaný s použitím sekvencií myšacích IgG2a Fc a GM-CSF tak, že konštrukt mohol byť hodnotený v myšacom modele. Malý fragment XbaI až SmaI obsahujúci sekvencie kódujúce vedúce sekvencie-EpCAM-Fc bol získaný z pôvodného EpCAM-Fc expresného vektora (príklad 1) a ligovaný do veľkého fragmentu SmaI až XbaI expresného vektora Fc-GMCSF (obrázok 9).

Výsledný vektor, pdCs-EpCAM-Fc-GMCSF, bol zavedený do buniek 293 s použitím metódy precipitácie fosfátom vápenatým na prechodnú expresiu a do buniek NS/0 elektroporáciou na trvalú expresiu. Stabilné transfektanty boli vybrané pestovaním buniek v médiu obsahujúcom metotrexát (0,1 μ M). Exprimujúce klony boli identifikované testom Fc ELISA (pozri príklad 1) a klony s vysokým stupňom produkcie boli množené v kultúre. EpCAM-Fc-GMCSF proteín bol purifikovaný z kondicionovaných médií väzbou na proteín A Sepharose a

následnou elúciou (Repligen, Needham, MA) a štruktúrna integrita bola analyzovaná SDS-PAGE po redukcii 2-merkaptoetanolom. Výsledky ukázali, že proteín mal molekulárnu hmotnosť približne 90 kD, ako bolo očakávané pre jednoreťazcovú fúziu EpCAM, Fc a GMCSF.

Aby sa porovnala relatívna imunogenicita kombinovaného fúzneho proteínu, myšiam bola podaná subkutánne injekcia ekvivalentných dávok EpCAM-Fc-GMCSF a jednotlivých fúzných proteínov v kombinácii: EpCAM-Fc a Fc-GMCSF. Rovnaké injekcie boli podávané 14 dní pozdejšie a vzorky séra boli testované na špecifickú protilátkovú reaktivitu na humánny EpCAM 7 dní po zosilňovacej injekcii. Rovnaký prístup môže byť použitý pre iný antigénny proteín alebo peptid, a tiež pre iné stimulačné cytokíny, ako je napríklad IL-2, IL-12 a Flt3L.

Príklad 8

Imunizácia Fc-antigénom injekciou DNA

Rovnaké expresné vektory použité na transfekciu a produkciu myšacích Fc-EpCAM a EpCAM-Fc v cicavčích bunkách (pozri príklad 1) boli injikované ako „holá“ plazmidová DNA do svalu zadnej končatiny skupiny myší Balb/c. DNA bola injikovaná v koncentrácii 0,5 mg/ml a celkové množstvo 100 µg bolo podávané buď v PBS alebo roztoku 25% (hmotnosť/objem) sacharózy. Injekcie sa opakovali každé 3 týždne do celkového množstva 3 injekcií. Protilátkové reakcie boli merané v rôznej dobe a boli kvantifikované testom ELISA s použitím 96 jamkových doštičiek potiahnutých humánnym Fc-EpCAM na naviazanie antigénu a s použitím proti-myšacej Fc špecifickej polyklonálnej protilátky konjugovanej s HRP (Jackson

ImmunoResearch) na detekciu. Dáta predložené na obrázku 10 predstavujú protilátkové titre zaznamenávané 14 dní (obrázok 10A), 27 dní (obrázok 10B), 55 dní (obrázok 10C) a 69 dní (obrázok 10D) po injekcii.

Výsledky predložené na obrázku 10 ukazujú, že nízke titre špecifickej anti-EpCAM protilátky boli indukované v priebehu prvého mesiaca pri použití obidvoch formuácií (obrázky 10A a 10B). Oveľa vyššie titre boli získané 55. deň (obrázok 10C) a ešte vyššie hladiny 69. deň (obrázok 10D). Podobné výsledky boli získané s použitím DNA injekcie vektora exprimujúceho EpCAM-Fc, aj keď boli titre nižšie. Tieto dáta ukazujú, že antigén exprimovaný ako fúzna molekula obsahujúca antigénny proteín a Fc úsek imunoglobulínu môže indukovať imunitnú reakciu, keď je zavedený injekciou holej DNA a že perzistentná expozícia antigénu vedie na oddialenie reakcie väčšiny zvierat.

Bunkové imunitné reakcie boli testované pestovaním splenocytov z myší očkovaných DNA alebo imunizovaných proteínom (70 dní po injekcii) stimulovaných odlišnými koncentraciami Fc-EpCAM proteínu in vitro. Dáta ukázané na obrázku 11 (horný panel) ukazujú proliferatívnu reakciu (meranou inkorporáciou ³H-tymidínu) na antigén zvierat imunizovaných buď Fc-EpCAM proteínom (krížiky) alebo DNA vakcináciou expresným vektorom CMVpromotor-EpCAM-Fc (prázdne krúžky) alebo expresným vektorom CMVpromotor-Fc-EpCAM (plné kosoštvorce). Proteínom imunizované zvieratá vykazovali oveľa väčšie reakcie na antigén, dokonca aj pri veľmi nízkych dávkach. Reakcie pri DNA vakcinovaných zvierat (tiež ukázané v odlišnej mierke na dolnom paneli na obrázku 11) boli závislé na dávke, ale boli menšie ako u myší, ktorým bola podaná

injekcia proteínu. Tieto reakcie boli charakteristické pre reakcie CD4+ T lymfocytov obmedzených MHC II. triedy.

Aby sa otestovala cytotoxická aktivita (všeobecný ukazovateľ reakcií T lymfocytov obmedzených MHC I. triedy), kultúry splenocytov z myší imunizovaných DNA alebo proteínom boli pestované počas 5 dní za prítomnosti približne 10 U/ml IL-2. Efektorové bunky boli pestované splenocyty a cieľové bunky boli buď označené bunky CT26 exprimujúce EpCAM humánneho karcinómu časti hrubého čreva (syngénne pre myši Balb/c) alebo označené parentálne bunky (netransfekované bunky CT26). Efektorové a cieľové bunky boli zmiešané v odlišných pomeroch a bol určovaný rozsah lýzy. Hodnota 100 % lýzy bola dosiahnutá inkubáciou označených cieľových buniek za prítomnosti detergentu a bolo merané množstvo uvoľňovanej značky.

Výsledky sú ukázané na obrázku 12, kde obrázok 12A ukazuje aktivitu splenocytov proti bunkám CT26 exprimujúcim humánnu EpCAM, zatiaľ čo obrázok 12B ukazuje aktivitu splenocytov proti parentálnym bunkám CT26. Na obidvoch obrázkoch prázdne kosoštvorce predstavujú splenocyty izolované z myší imunizovaných DNA nesúce EpCAM konštrukt, prázdne štvorce predstavujú splenocyty izolované z myší imunizovaných DNA nesúce Fc-EpCAM fúzny konštrukt, prázdne trojuholníky predstavujú splenocyty izolované z myší imunizovaných DNA nesúce EpCAM-Fc fúzny konštrukt a krížiky predstavujú splenocyty izolované z myší imunizovaných Fc-EpCAM fúznymi proteínmi.

Obrázok 12 ukazuje, že aj keď DNA vakcinácia vyvolala slabé cytotoxické reakcie proti obidvom cieľovým bunkám, významne vyššia cytotoxicita bola pozorovaná u myší imunizovaných proteínom. Obidva druhy buniek, parentálne

nádorové bunky CT26 a nádorové bunky CT26 exprimujúce EpCAM, boli v teste usmrtené. Cytotoxicita pozorovaná proti parentálnym bunkám CT26 môže byť preto, že tieto bunky exprimujú vysoké hladiny myšacieho homológu EpCAM, ktorý je približne z 81 % identický s humánnym proteínom na aminokyselinovej úrovni. Ale imunizácia proteínom Fc-EpCAM nevyvolala významnú cytotoxickú aktivitu proti nádorovým bunkám CT26 exprimujúcim humánnu EpCAM, čím sa vysvetľuje účinná protektívna aktivita proti nádorom opísaná v príklade 6.

Príklad 9

Imunizácia Fc-fúznym proteínom obsahujúcim podoblasť karcinómového antigénneho proteínu

Aj keď niektoré celé proteíny nemusia byť použiteľné ako antigény na imunitnú terapiu, menšie podoblasti proteínov môžu byť oveľa účinnejšie. Napríklad proteíny obsahujú domény, ktoré sú post-translačne modifikované, aby boli menej imunogénne, a tým sa zníži imunitná reaktivita na aktuálne polypeptidové zložky. Veľké proteíny môžu indukovať protilátky, ktoré reagujú len s nepolypeptidovými časťami antigénu a ktoré nesprostredkujú bunkovú cytotoxicitu závislú na protilátkach (ADCC), potenciálne dôležitú zložku protinádorovej imunitnej reakcie. Ako dobrý príklad tejto situácie je možné uviesť proteoglykanový antigén chondroitinsulfát (MCSP) špecifický pre humánnu melanom, ktorý je exprimovaný fakticky na všetkých melanómoch, a tiež u niekoľkých typov karcinómu mozgu. Tento proteín je dosť glykosylovaný a je ďalej modifikovaný pripojením niekoľkých reťazcov glykosaminoglykanu. Protilátka známa ako 9.2.27 (Bumol et al. (1982) PROC. NATL. ACAD. SCI. 79: 1245-1249)

viaže tento proteín s vysokou afinitou, ale nesprostredkováva žiadnu efektorovú funkciu, ani ADCC alebo cytotoxicitu sprostredkovanú komplementom (CDC). Dokonca aj čiastočne humanizované (chimérické) formy tejto protilátky neuspeli pri sprostredkovaní tejto aktivity.

Aby sa vyvolali viacej zamerané reakcie na optimálne cieľové úseky tejto veľkej molekuly, boli v proteínovej sekvencii identifikované predpokladané miesta pripojenia glykanu. (Pluske et al (1996) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 93: 9710-9715). Bola vybraná podoblasť neďaleko od membránovej sekvencie a v určitej vzdialenosti od miesta pripojenia glykanu.

Peptidová sekvencia:

QGATLRLDPTVLDAGELANRTGSPVPRFRLLEGRHGRVV

RVPRARTEPGGSQQLVEQFTQQDLEDGRLGLEVGRPEGRAPGPAGD (sekv. id. č. 21) bola reverzne translatovaná, výsledná DNA sekvencia bola syntetizovaná chemicky a ligovaná do expresného vektora pDCs-Fc-X s použitím rovnakých restričných miest použitých v skorších príkladoch. Miesto terminácie translácie sa pridalo na 3' koniec, hneď za sekvenciu kódujúcu poslednú amínokyselinu, potom nasledovalo unikátne miesto XhoI. Konečný expresný plazmid bol elektroporáciou zavedený do myelómových buniek NS/0 a stabilné transfektanty exprimujúce požadovaný proteín boli získané tak, ako bolo opísané v príklade 1.

Proteín Fc-MCSP bol purifikovaný z supernatantov tkanív s použitím chromatografie s proteínom A Sepharose (Repligen, Needham, MA). Protilátkové titre boli merané u myší Balb/c subkutánne imunizovaných 50 µg Fc-MCSP fúzneho proteínu v PBS buď samotného alebo v kombinácii s 5 µg Fc-GMCSF ako adjuvans.

Výsledky sú ukázané na obrázku 13. Plné kosoštvorce predstavujú protilátkové titre v normálnom sére, prázdne štvorce predstavujú protilátkové titre v sére myši imunizovaných Fc-MCSP a plné trojuholníky predstavujú protilátkové titre v sére myši imunizovaných Fc-MCSP a Fc-GMCSF adjuvans.

Špecifické imunitné reakcie na túto podoblasť MCSP boli detekované 14. deň a významne sa zvýšili po imunizácii zosilňovacou injekciou. Výsledky ukazujú, že myši imunizované oboma Fc-GMCSF a Fc-MCSP stimulovali vyššie protilátkové titre proti MCSP (plné trojuholníky) ako myši imunizované Fc-MCSP samotným (prázdne štvorce).

Príklad 10

Imunizácia Fc-fúznym proteínom obsahujúcim vírusový antigén

Vývoj účinnej vakcíny proti vírusu humánneho imunodeficitu (HIV), vírusu, ktorý spôsobuje AIDS, je jeden z najdôležitejších cieľov vo výskume vakcín. Nedávno niekoľko publikácií ukázalo, že určité vlastnosti vírusového obalu slúžia na oklamanie imunitnej reakcie, aby zodpovedala na irelevantné epitopy, a tým sa maskujú dôležité a potenciálne neutralizačné úseky vírusovej častice. To zahŕňa prítomnosť vysoko imunodominantných antigénnych úsekov, ktoré slúžia ako návnady, a extenzívnej glykosylácie, ktorá fyzicky maskuje a redukuje imunogenicitu dôležitých epitopov (Wyatt et al. (1998) NATURE 393: 705-11).

Jeden možný spôsob, ako obísť mechanizmus návnady, je exprimovať malé úseky gén vírusového obalu, aby sa zabránilo imunodominantným reakciám, ktoré nie sú protektívne a

indukovala sa neutralizačná reakcia. Jeden problém pri použití vakcín s malými podjednotkami je znížená imunogenicita buď umelého peptidu alebo malého proteínu. Jeden prístup bol kondenzovať proteíny alebo peptidy k imunogénnym nosičským proteínom, ako je napríklad hemokyanín prílepky (KLH). To indukovalo silnú reakciu na KLH, a tiež na proteín alebo peptid. Ďalším prístupom je vyrobiť fúzny proteín s Fc, ako bolo opísané v príklade 1 pre podoblasť, napríklad ektodoménu gp41 (kotviaca doména vírusového obalu, gp160). Na rozdiel od iných nosičov sa na úsek imunoglobulínu dívame ako na vlastný („self“) antigén, čím sa minimalizuje akýkoľvek imunodominantný účinok.

Fc-gp41pep626 fúzny konštrukt obsahoval polypeptid so 44 amínokyselinami fúzovaný na karboxy-koncové časti Fc úseku myšacieho imunoglobulínu. Sekvencia HIV kmeňa IIIB v tomto úseku obsahuje signál pre N-viazanú glykosyláciu, takže Fc-gp41pep626 fúzny proteín, tvorený buď v bunkách 293 prechodnou expresiou alebo v myelómových bunkách NS/0 trvalou transfekciou, vykazoval vysoký stupeň variácie v mobilite pri analýze SDS-PAGE, čo indikovalo heterogenitu v rozsahu glykosylácie.

Napriek faktu, že tento vírusový antigén bol celkom malý (dlhý 44 amínokyselinových zvyškov) a bol heterogénne glykosylovaný, bolo možné vyvolať imunitnú reakciu u myší Balb/c (pozri obrázok 14). V tomto prípade bola skupinám piatich myší podaná intradermálna injekcia s 25 µg Fc-gp41pep626 1. deň a injekcia s dvojnásobným množstvom v dvojtýždňových intervaloch, buď samotného (prázdne kosoštvorce) alebo v kombinácii s 2,5 µg Fc-adjuvantných fúznych proteínov, Fc-GMCSF (prázdne štvorce) alebo Fc-IL2

(plné trojuholníky). Obrázky 14A a 14B predstavujú protilátkové titre dosiahnuté 7 a 33 dní po druhej zosilňovacej injekcii, v danom poradí.

Imunitné reakce boli viacej závislé na spoločnom podávaní Fc-cytokínov a trvalo dlhšie dosiahnuť vysoký titer. Predpokladá sa, že väčšia imunitná reakcia môže byť vyvolaná s použitím modifikácií tejto sekvencie, ktorá neobsahuje glykosylačný signál (v skutočnosti veľa kmeňov toto miesto nekóduje) alebo enzymatickým odstránením sacharidových vedľajších reťazcov in vitro.

Príklad 11

Adjuvantná aktivita Fc-fúzneho proteínu obsahujúceho extracelulárnu doménu molekuly bunkového povrchu

Na konštrukciu Fc-adjuvantných fúznych proteínov je niekedy užitočné fúzať na Fc extracelulárnu doménu proteínu, ktorý môže byť viazaný na membránu. Napríklad je fúzovaný CD40 ligand (CD40L) v N-koncovej časti C-koncovej časti k Fc. Voliteľne je použitý linker.

CD40L je použiteľný, pretože jeho receptor, CD40, je exprimovaný na povrchu B lymfocytov a je zapojený do stimulácie B lymfocytov lymfocytmi T. Ako faktor nekrotizujúci nádory, je CD40L trimer, ktorý spôsobuje dimerizáciu alebo trimerizáciu svojho receptora na bunkovom povrchu. Výsledkom je, že sú domény intracelulárneho receptora privedené do kontaktu a z tohto plynie signálna transdukcia. Tiež ako TNF, CD40L môže byť viazaný na membráne, ale môže byť tiež z bunkového povrchu odštiepený a pôsobiť ako cytokín.

Fc-CD40L fúzny proteín je zvieratám podávaný spoločne s Fc-antigénnym fúznym proteínom. V kontrolných experimentoch sú Fc-CD40L proteín a Fc-antigénny proteín podávané odlišným skupinám zvierat. Predpokladá sa, že zvieratá, ktorým bola podaná injekcia obidvoch fúznych proteínov, tvoria vyšší titer protilátok ako zvieratá, ktorým bola podaná injekcia každého fúzneho proteínu jednotlivo.

Alternatívne bol použitý jeden Fc fúzny proteín obsahujúci obidva antigény a CD40L skupinu, s voliteľnými linkerami (L) medzi Fc, CD40L a antigénovými skupinami. Fúzny proteín môže mať radenie od N-konca k C-koncu Fc-(L)-antigén-(L)-CD40L, FC-(L)-CD40L-(L)-antigén, antigén-(L)-CD40L-(L)-Fc, CD40L-(L)-antigén-(L)-Fc, antigén-(L)-Fc-(L)-CD40L alebo CD40L-Fc-(L)-antigén-(L). Fúzny proteín obsahujúci Fc, antigén a CD40L je injikovaný zvieratám a potom sú merané protilátkové titre. Predpokladá sa, že protilátkové titre vyvolané injekciou fúzneho proteínu s oboma CD40L a antigénom sú vyššie ako titre dosiahnuté injekciou fúznych proteínov obsahujúce len Fc a antigén alebo Fc a CD40L.

Vo vyššie uvedenom podávaní fúznych proteínov sú zvieratám podávané injekcie intravenózne, subkutánne alebo iným vhodným spôsobom podávania. Časy medzi primárnym a zosilňovacím podávaním antigénov a/alebo adjuvancií a meraním protilátkových titrov sú rovnaké, ako boli opísané v predchádzajúcich príkladoch. Alternatívne sú použité štandardné dávky a testovacie režimy.

Ekvivalenty

Vynález môže byť uskutočňovaný v iných špecifických formách bez odchýlenia sa od vynálezcovskej myšlienky alebo jej podstatných charakteristických vlastností. Predchádzajúce

uskutočnenie je teda nutné považovať vo všetkých ohľadoch skôr za ilustratívne ako za obmedzujúci vynález opísaný v tomto texte.

Rozsah vynálezu je teda daný pripojenými patentovými nárokmi vrátane všetkých zmien, ktoré spadajú do rozsahu patentových nárokov v zmysle ekvivalencie.

Zahrnutie formou odkazu

Náuka všetkých patentových dokumentov a vedeckých publikácií, na ktoré sa odkazujeme vyššie, je v tomto texte výslovne zahrnutá formou odkazu.

Zoznam sekvencií

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér IL-4R

<400> 1

gtccccgggta tgaaggtctt gcaggagc

28

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér IL-4R

<400> 2

ccccctcgagc tagtgctgct cgaagggctc cctg

34

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér PSMA

<400> 3

aagcttaaatt cctccaatga agc

23

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér PSMA

<400> 4

ctcgagtag gctacttcac tcaaag

26

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér EpCAM

<400> 5

ccccgggtaa acaggaagaa tgtgtctgtg

30

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér EpCAM

<400> 6

ctcgagtcac tttagaccct gcattgag

28

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér EpCAM

<400> 7

tctagagcag catggcgccc ccgc

24

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér EpCAM

<400> 8

ccttaagcac cctgcattga gaattcag

28

<210> 9

<211> 148

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: DNA kódujúca amínokyselinové
zvyšky 626-669 HIV IIIB gp41

<400> 9

cccgggatcc ctgatccact ccctgatcga ggaatcccag aaccagcaag agaagaacga 60

gcaggagctg ctggagctcg acaagtgggc ctccctgtgg aactggttca acatcaccaa 120
ttggctgtgg tacatcaagt gactcgag 148

<210> 10

<211> 44

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: fúzovaný polypeptid z vektora
pdC-muFC

<400> 10
 Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 1 5 10 15
 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn
 20 25 30
 Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
 35 40

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: priméry pre myšací IL2

<400> 11
 ggccccgggta aagcacccac ttcaagctcc 30

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací IL2

<400> 12
 ccctcgagtt attgagggt tgttg 25

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myši GMCSF

<400> 13
 cccgggaaaa gcacccgcc gctcacc 28

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací GMCSF

<400> 14

ctcgagtcac ttttggttg gttttttgc

29

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací ligand Flt3

<400> 15

caagcttaca cctgactggt acttcagc

28

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací ligand Flt3

<400> 16

ctcgagtcaa ggctctggga gctccgtggc

30

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací IL-12p35

<400> 17

ccccgggtag ggtcattcca gtctctgg

28

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací IL-12p35

<400> 18

ctcgagtcag gcggagctca gatagc

26

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací IL12 p40

<400> 19

tctagaccat gtgtcctcag aagctaac

28

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: primér pre myšací IL12 p40

<400> 20

ctcgagctag gatcggaccc tgcag

25

<210> 21

<211> 83

<212> PRT

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: MSCP peptid

<400> 21

Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu
1 5 10 15
Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
20 25 30
Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly
35 40 45
Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly
50 55 60
Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro
65 70 75 80

Ala Gly Asp

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> umelá sekvencia

<220>

<223> opis umelej sekvencie: oligodeoxynukleotíd, ktorý
môže byť použitý ako adjuvans

<400> 22

tccatgacgt tccatgacgtt

20

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kompozícia na vyvolanie imunitnej odpovede proti napred vybranému antigénu cicavca, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zahŕňa fúzny proteín zahŕňajúci konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu pripojený polypeptidovou väzbou k dopredu zvolenému antigénu a adjuvant zahŕňajúci oligonukleotidovú CpG sekvenciu.

2. Kompozícia na vyvolanie imunitnej odpovede proti napred vybranému antigénu cicavca, v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že zahŕňa:

i) dopredu vybraný antigén alebo

ii) fúzny proteín zahŕňajúci konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu pripojený polypeptidovou väzbou k dopredu vybranému antigénu alebo

iii) sekvenciu nukleovej kyseliny kódujúcej uvedený antigén alebo

iv) sekvenciu nukleovej kyseliny kódujúcej uvedený fúzny proteín zahŕňajúci tento antigén

a adjuvant zahŕňajúci fúzny proteín, ktorý zahŕňa konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu pripojený polypeptidovou väzbou k adjuvantnému proteínu alebo nukleovú kyselinu kódujúcu tento fúzny proteín.

3. Kompozícia podľa nároku 2 v y z n a č u j ú c a s a t ý m , že nukleová kyselina kódujúca fúzny proteín zahŕňajúci antigén kóduje v smere od 5' k 3' polohe konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu a antigén.

4. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 3, vyznačujúca sa tým, že fúzny proteín zahŕňajúci dopredu vybraný antigén a/alebo fúzny proteín zahŕňajúci adjuvant zahŕňa kľbovú oblasť imunoglobulínu.

5. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 4, vyznačujúca sa tým, že fúzny proteín zahŕňajúci dopredu vybraný antigén a/alebo fúzny proteín zahŕňajúci adjuvant zahŕňa doménu konštantnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu zvolenú zo súboru pozostávajúceho z CH2 domény, CH3 domény a CH4 domény.

6. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 5, vyznačujúca sa tým, že konštantá oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu zahŕňa CH2 doménu a CH3 doménu.

7. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 6, vyznačujúca sa tým, že dopredu vybraný antigén je zvolený zo súboru pozostávajúceho z membránového antigénu špecifického voči prostate ektodomény receptora cytokínu, vírusového proteínu a tumor-špecifického proteínu.

8. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 7, vyznačujúca sa tým, že fúzny proteín zahŕňajúci dopredu vybraný antigén a/alebo fúzny proteín zahŕňajúci adjuvant je pripojený disulfidovou väzbou k druhej konštantnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínu.

9. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 2 až 8, vyznačujúca sa tým, že adjuvantným proteínom je cytokín.

10. Kompozícia podľa nároku 9, vyznačujúca sa tým, že 9 cytokínom je ľudský cytokín.

11. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 10, vyznačujúca sa tým, že konštantná oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu je definovaná aminokyselinovou sekvenciou zodpovedajúcou aminokyselinovej sekvencii definujúcej konštantnú oblasť ťažkého reťazca ľudského imunoglobulínu.

12. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 2 až 11, vyznačujúca sa tým, že sekvencia nukleovej kyseliny kódujúcej fúzny proteín zahŕňajúci antigén a/alebo fúzny proteín zahŕňajúci adjuvant je operatívne usporiadaná v replikovateľnom expresnom vektore.

13. Kompozícia, vyznačujúca sa tým, že zahŕňa prvý fúzny proteín zahŕňajúci antigénny proteín s lokalizačným proteínom a druhý fúzny proteín zahŕňajúci adjuvantný proteín a uvedený lokalizačný proteín, pričom lokalizačný proteín vyvoláva nárast koncentrácie prvého a druhého fúzneho proteínu v oblasti cicavca, ktorá je dosiahnuteľná pre imunitný systém.

14. Kompozícia, vyznačujúca sa tým, že obsahuje fúzny proteín zahŕňajúci antigénny proteín, adjuvantný proteín a lokalizačný proteín, pričom lokalizačný proteín vyvoláva nárast koncentrácie antigénneho a adjuvantného proteínu v oblasti cicavca, ktorá je dosiahnuteľná pre imunitný systém.

15. Fúzny proteín zahŕňajúci antigénny proteín, adjuvantný proteín a lokalizačný proteín.

16. Sekvencia nukleovej kyseliny kódujúcej fúzny proteín podľa nároku 15.

17. Expresný vektor obsahujúci sekvenciu nukleovej kyseliny podľa nároku 16.

18. Fúzny proteín podľa nároku 15 alebo sekvencia nukleovej kyseliny podľa nároku 16 na použitie ako liečivo.

19. Kompozícia podľa niektorého z nárokov 1 až 14 na použitie ako liečivo.

20. Použitie kompozície podľa niektorého z nárokov 1 až 14 alebo fúzneho proteínu podľa nároku 15 na výrobu liečiva na vyvolanie imunitnej odpovede na antigén cicavca.

21. Použitie fúzneho proteínu podľa nároku 15 alebo sekvencie nukleovej kyseliny podľa nároku 16 na výrobu liečiva na vyvolanie imunitnej odpovede na antigén cicavca.

22. Farmaceutický kit, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa fúzny proteín zahŕňajúci konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu pripojený polypeptidovou väzbou na dopredu vybraný antigén podľa niektorého z nárokov 1, 4 až 8 a 11, a to v prvom zásobníku, a adjuvant zahŕňajúci oligonukleotidovú CpG sekvenciu v druhom zásobníku.

23. Farmaceutický kit, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa

i) dopredu vybraný antigén alebo

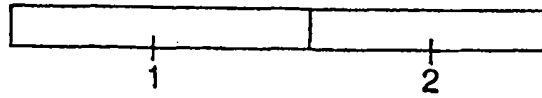
ii) fúzny proteín zahŕňajúci konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu pripojený polypeptidovou väzbou k dopredu vybranému antigénu alebo

iii) sekvenciu nukleovej kyseliny kódujúcej uvedený antigén alebo

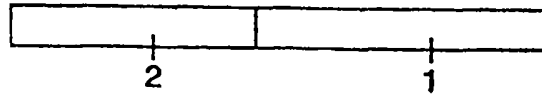
iv) sekvenciu nukleovej kyseliny kódujúcej uvedený fúzny proteín zahŕňajúci tento antigén

podľa niektorého z nárokov 2 až 8 a 11 až 12, a to v prvom zásobníku, a adjuvant zahŕňajúci fúzny proteín, ktorý zahŕňa konštantnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu pripojený polypeptidovou väzbou k adjuvantnému proteínu podľa niektorého z nárokov 2, 4 až 6 a 8 až 10 alebo nukleovú kyselinu kódujúcu tento fúzny proteín.

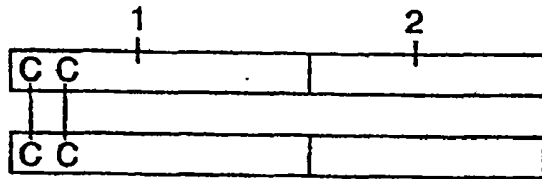
Obr. 1A



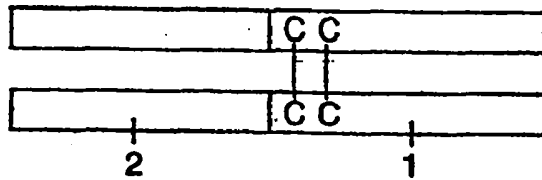
Obr. 1B



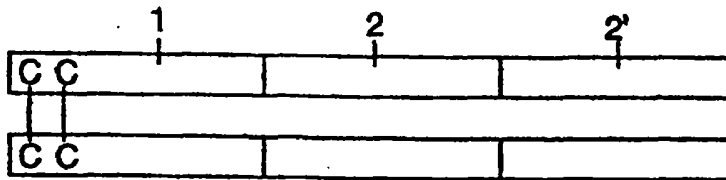
Obr. 1C



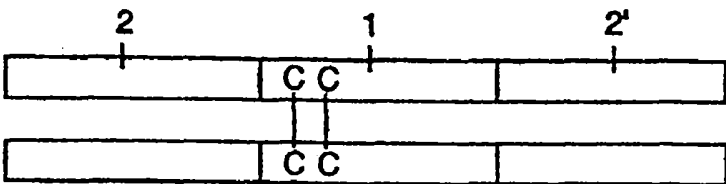
Obr. 1D



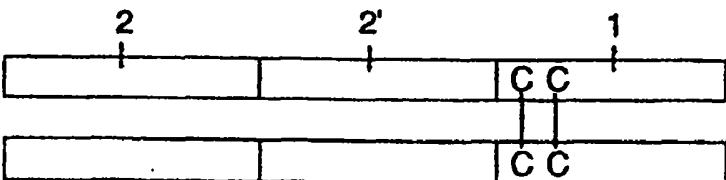
Obr. 1E

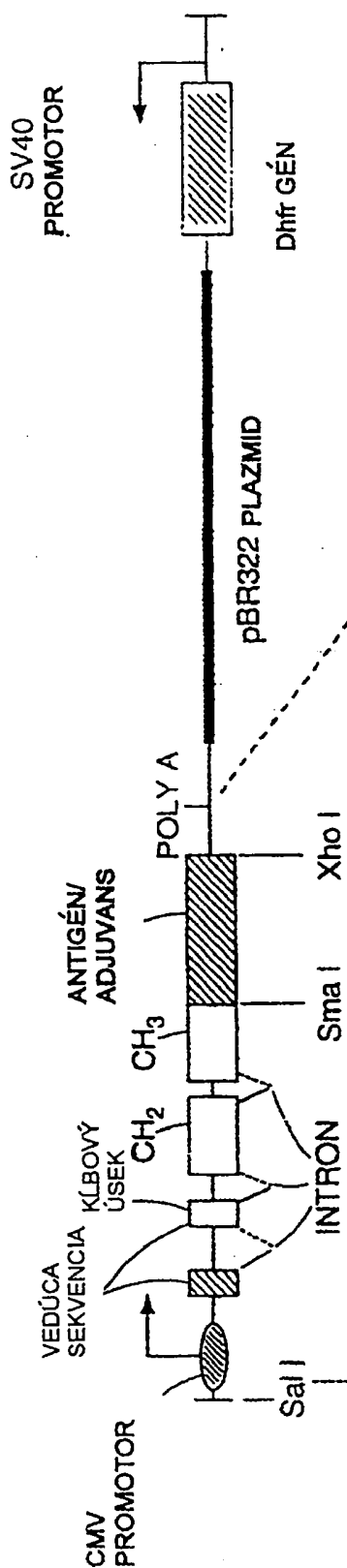


Obr. 1F

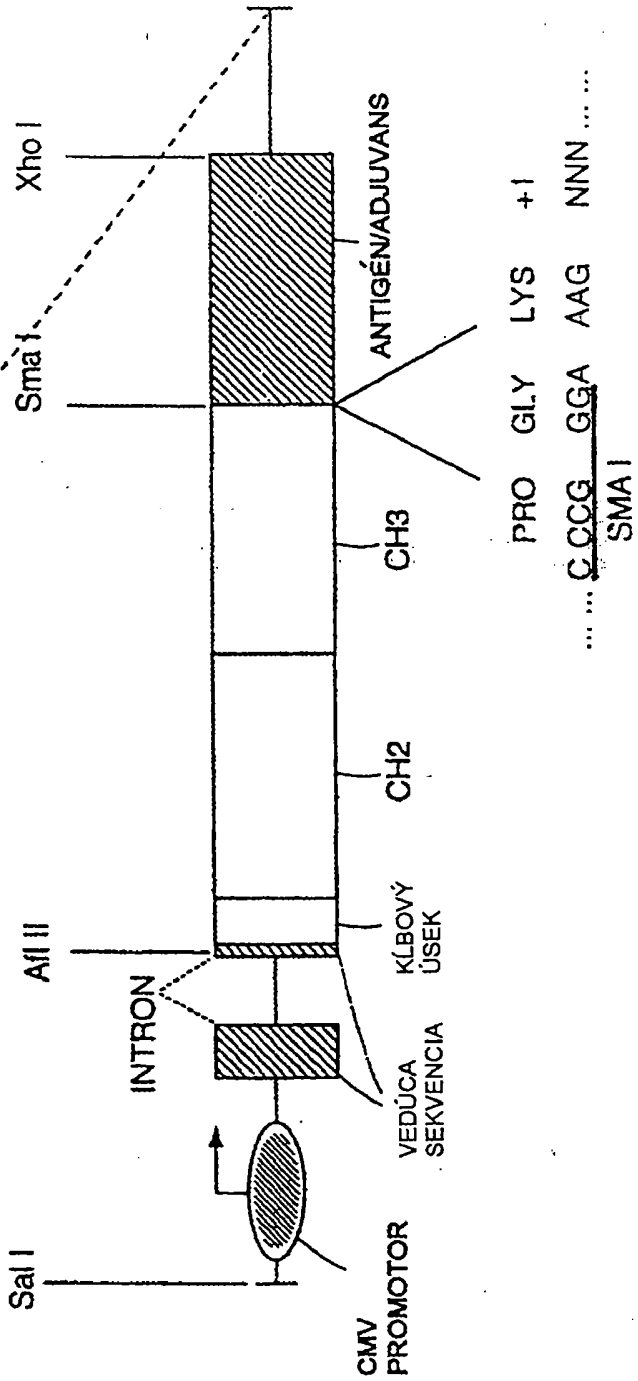


Obr. 1G

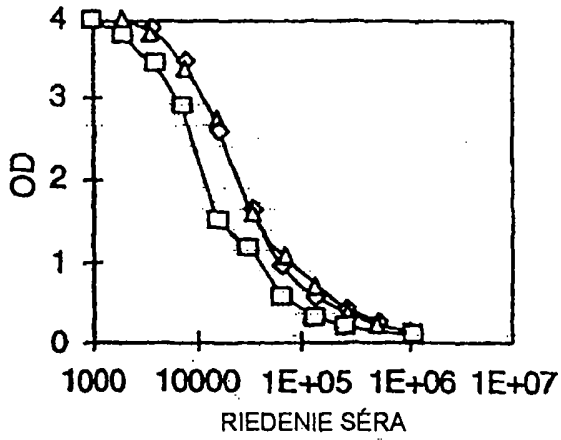




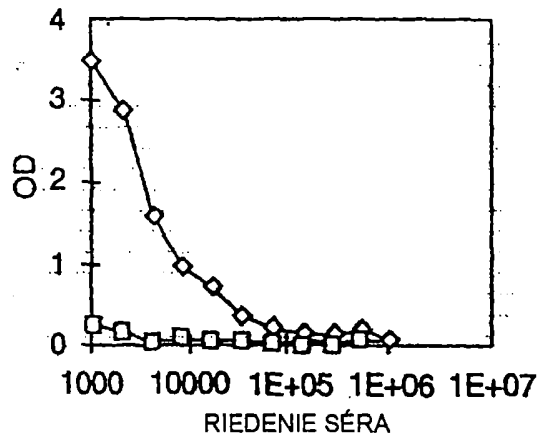
Obr. 2A



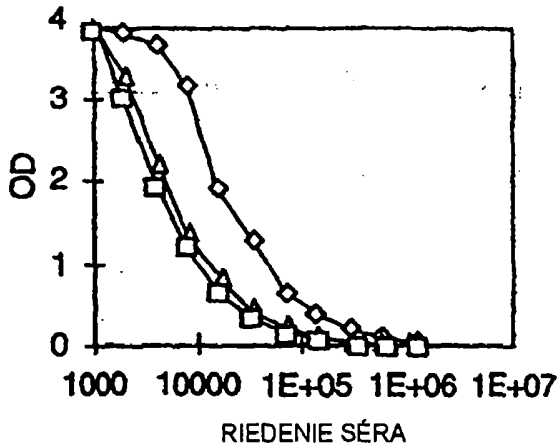
Obr. 2B



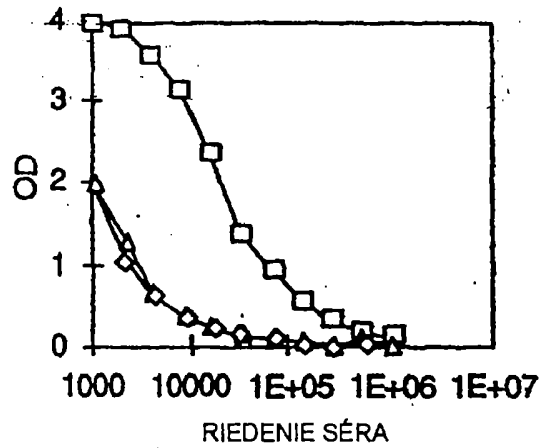
Obr. 3A



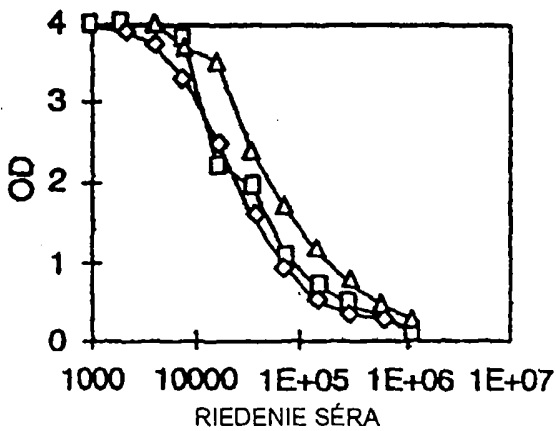
Obr. 3B



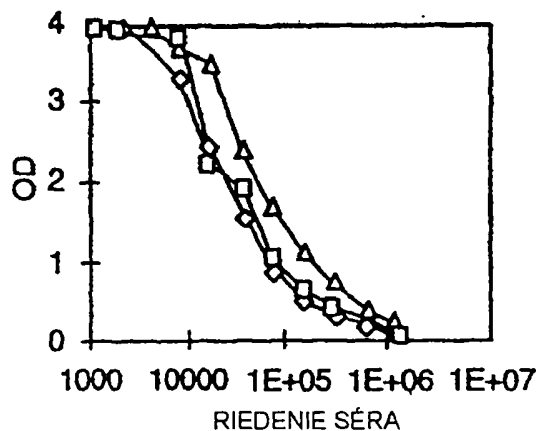
Obr. 3C



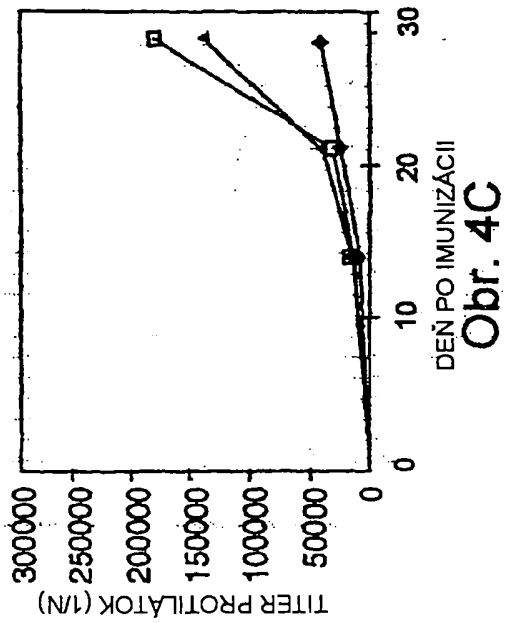
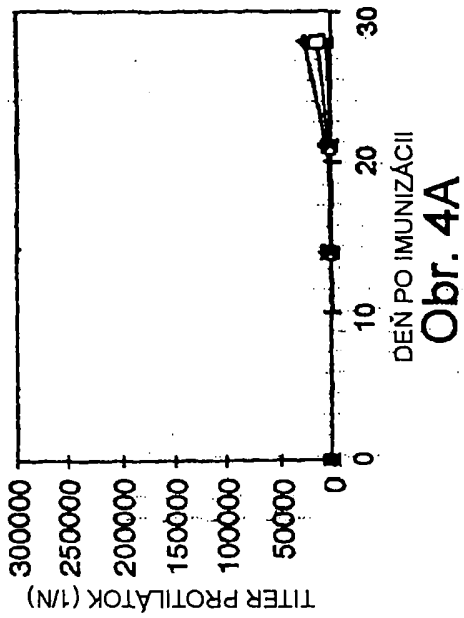
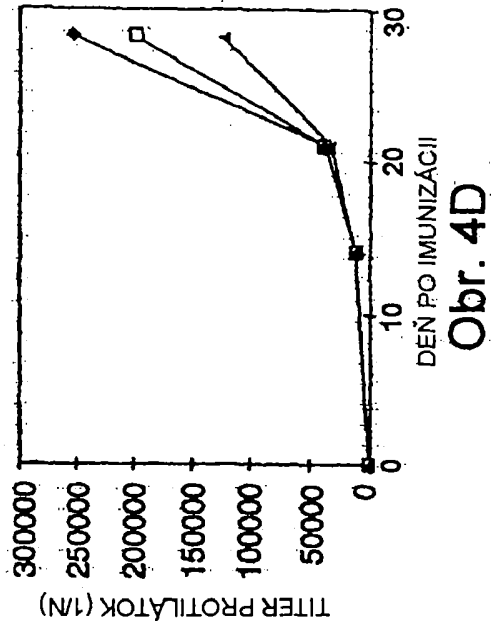
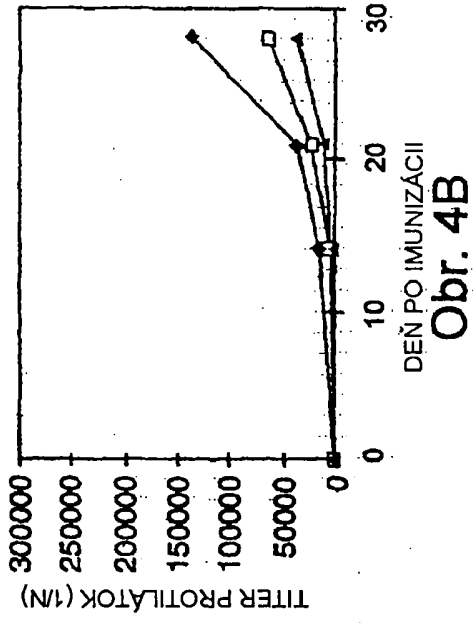
Obr. 3D

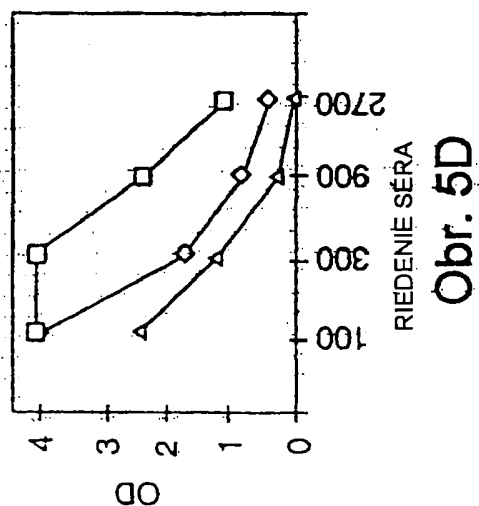
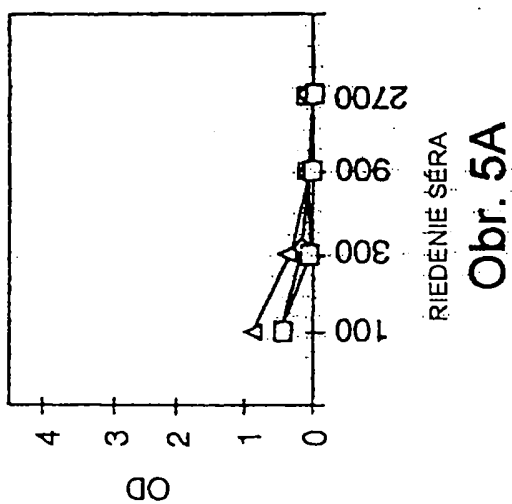
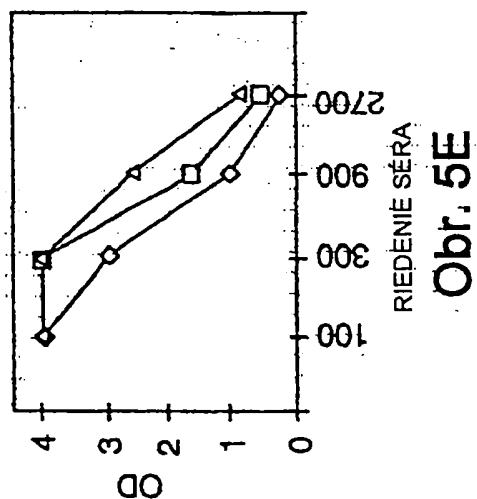
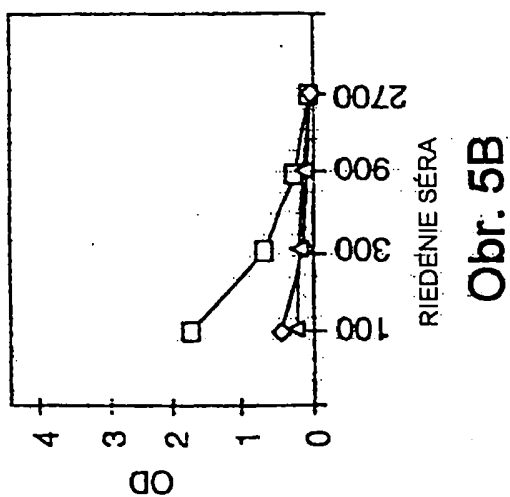
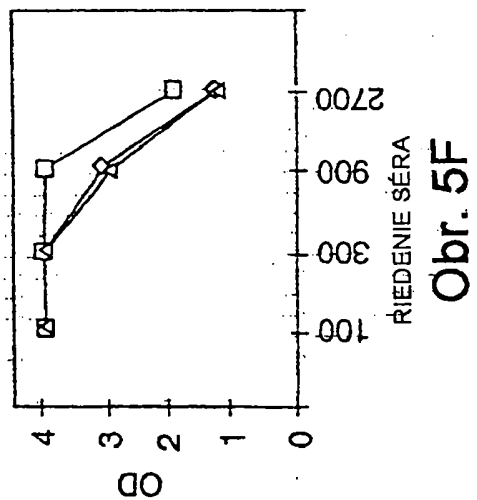
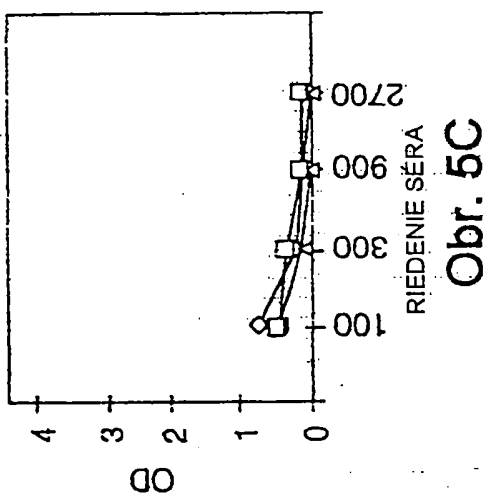


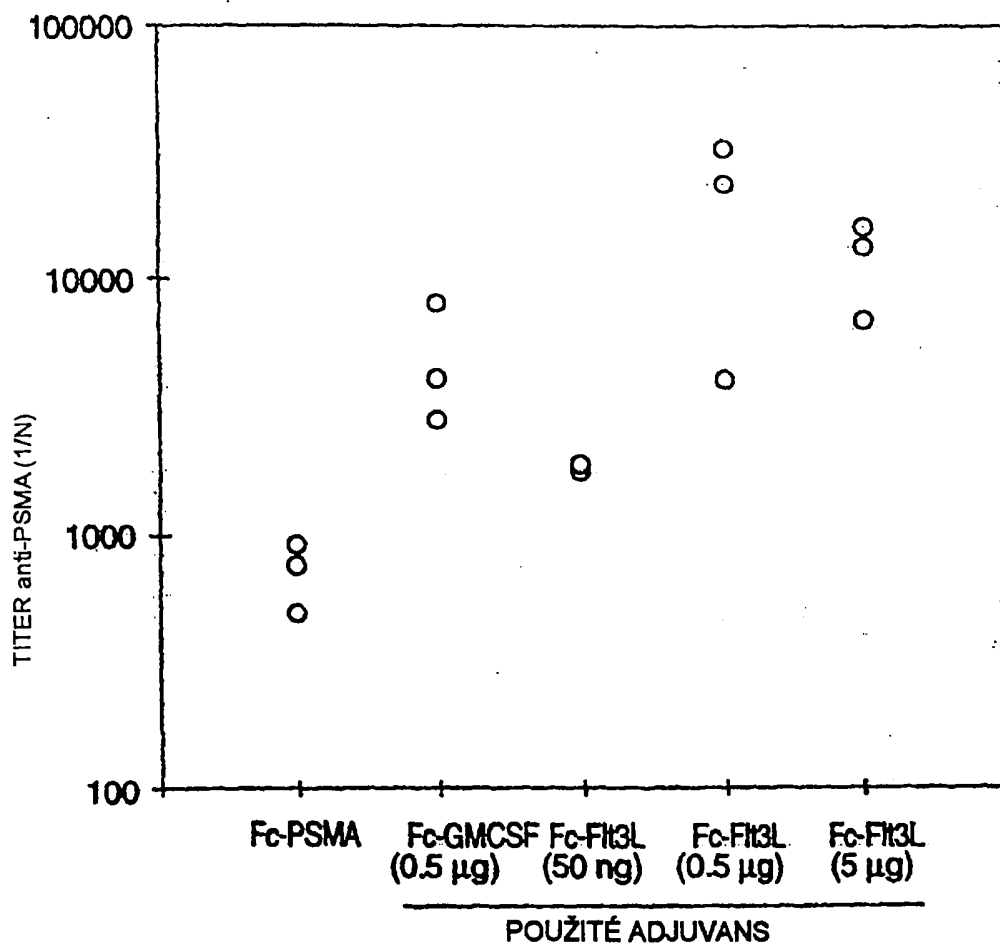
Obr. 3E



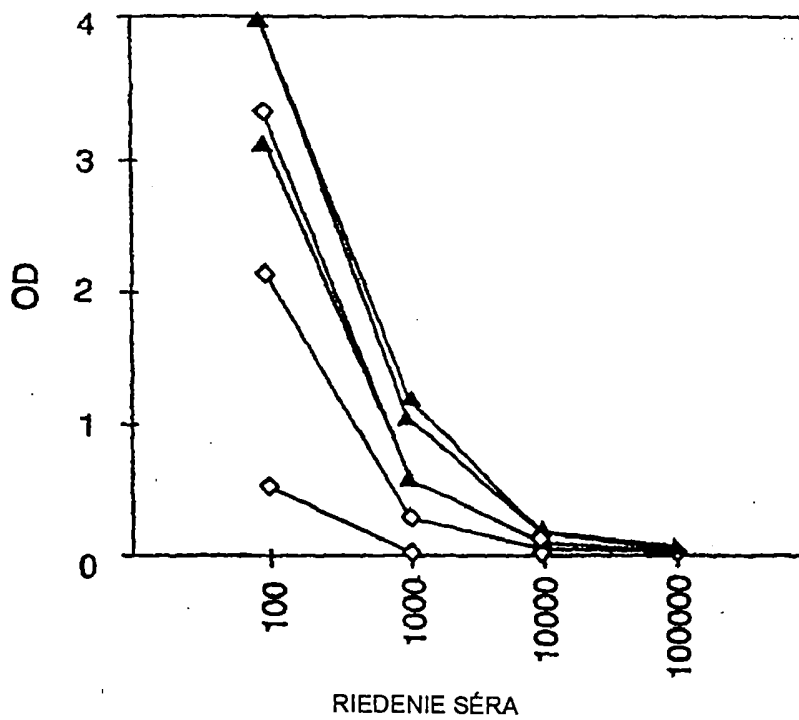
Obr. 3F



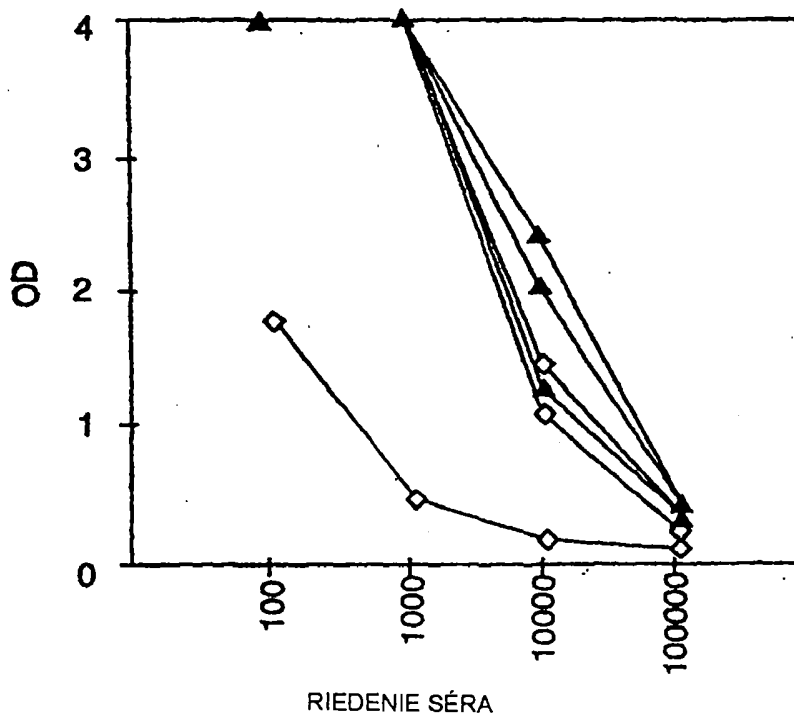




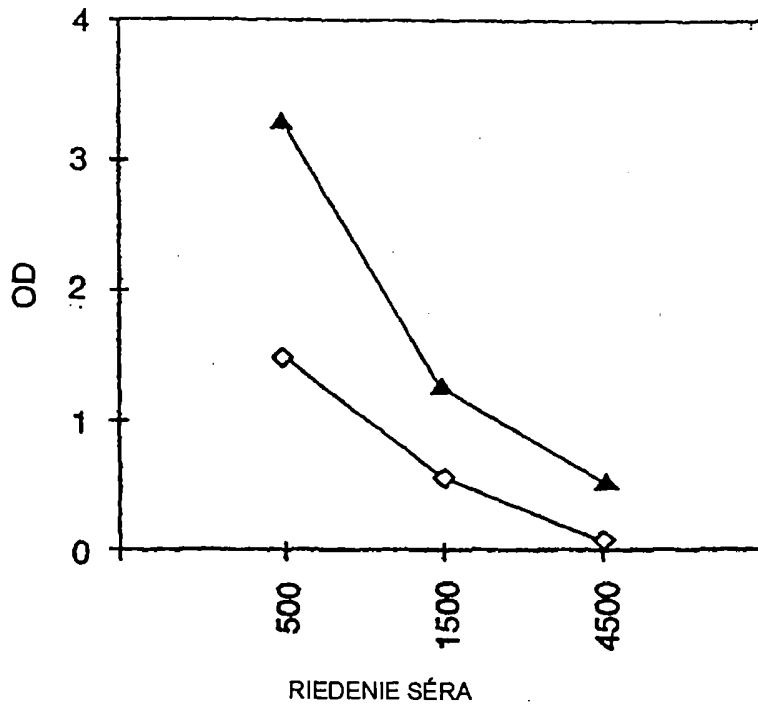
Obr. 6



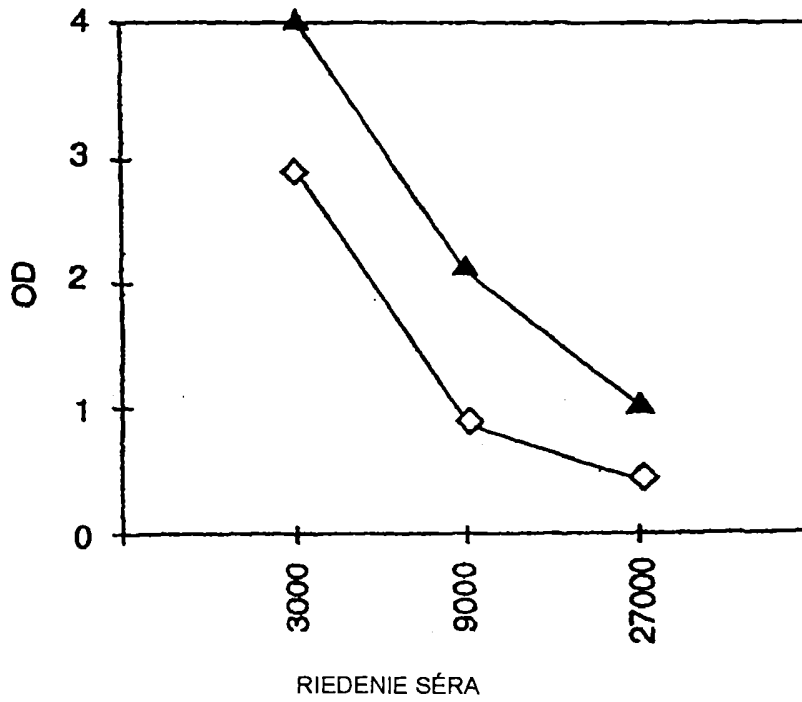
Obr. 7A



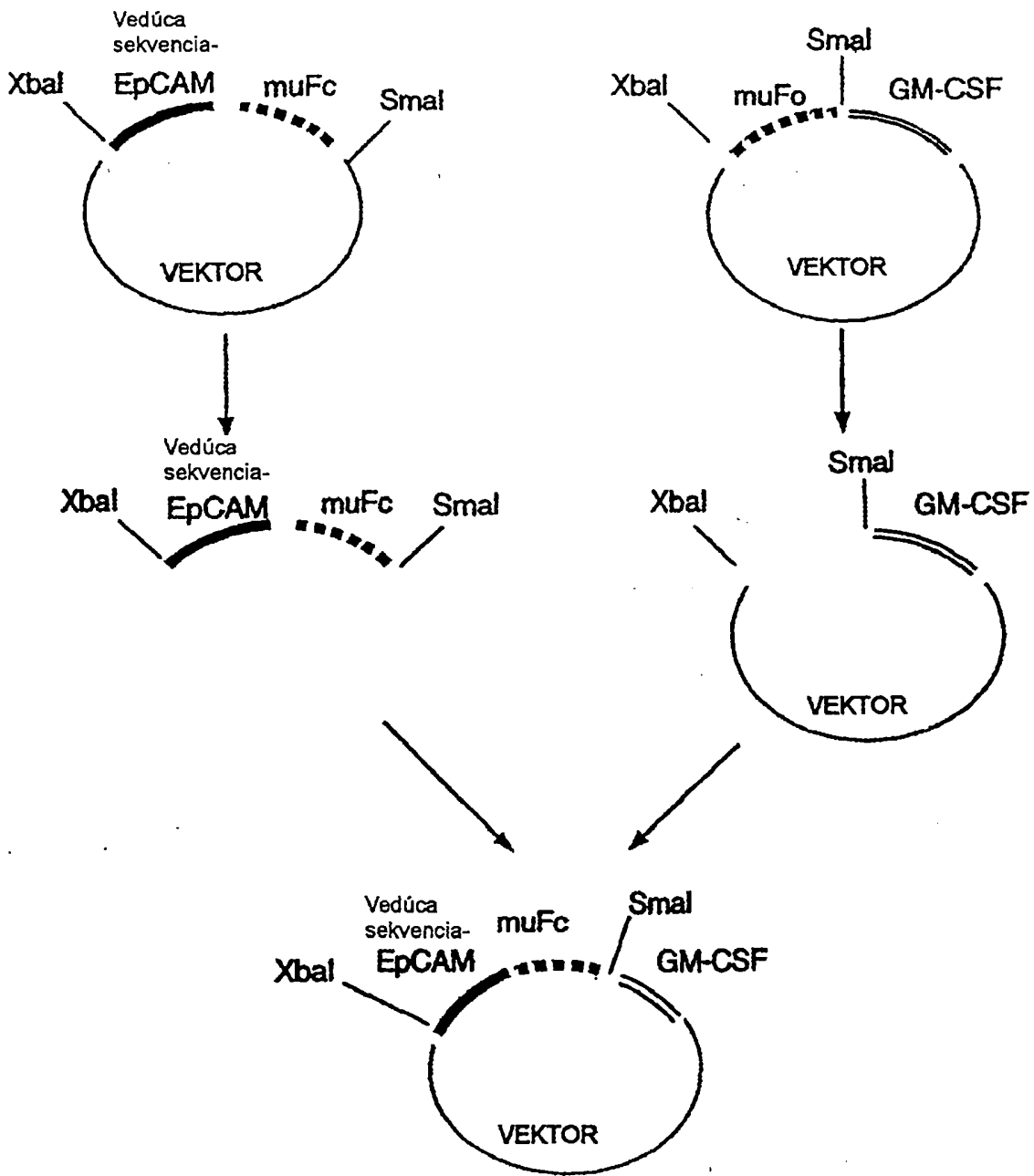
Obr. 7B



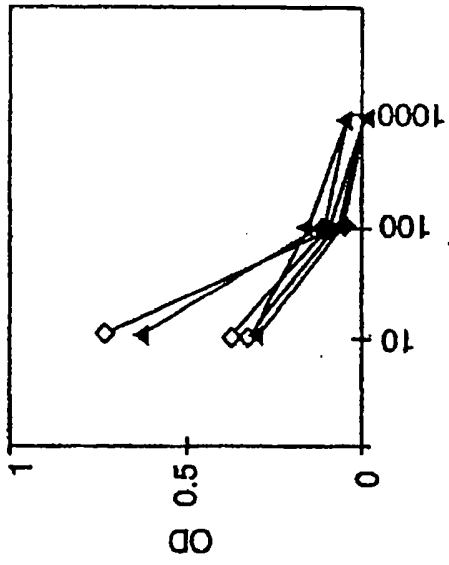
Obr. 8A



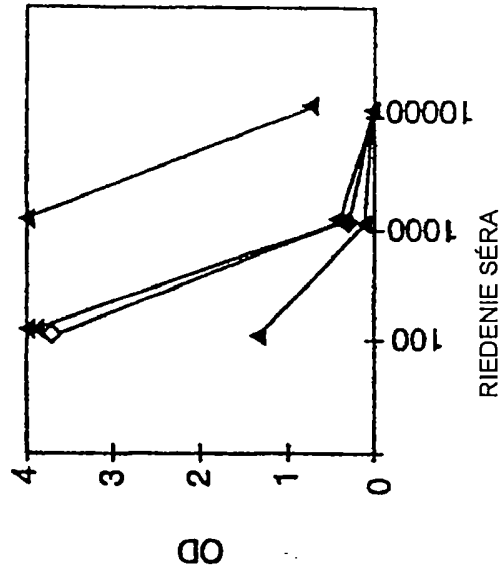
Obr. 8A



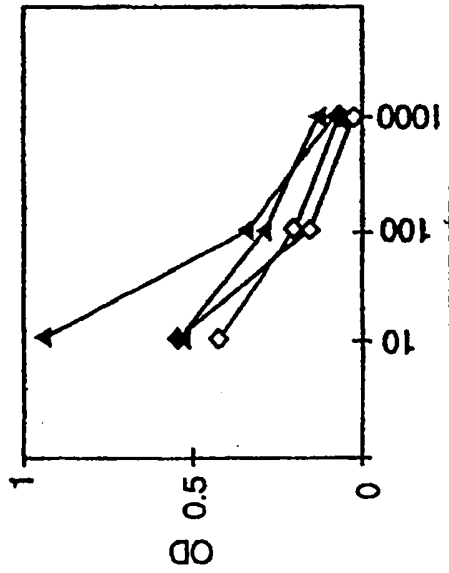
Obr.9



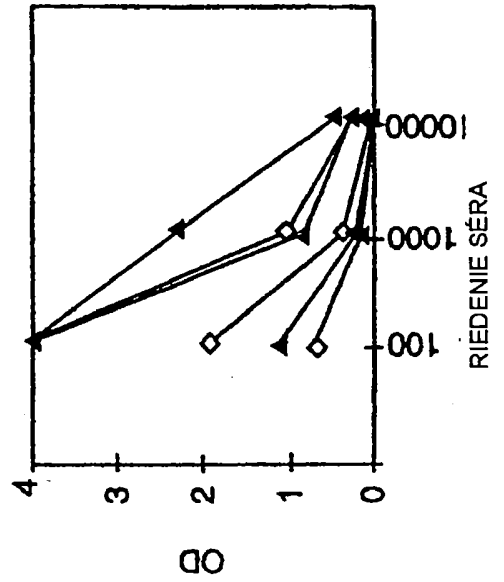
Obr. 10B



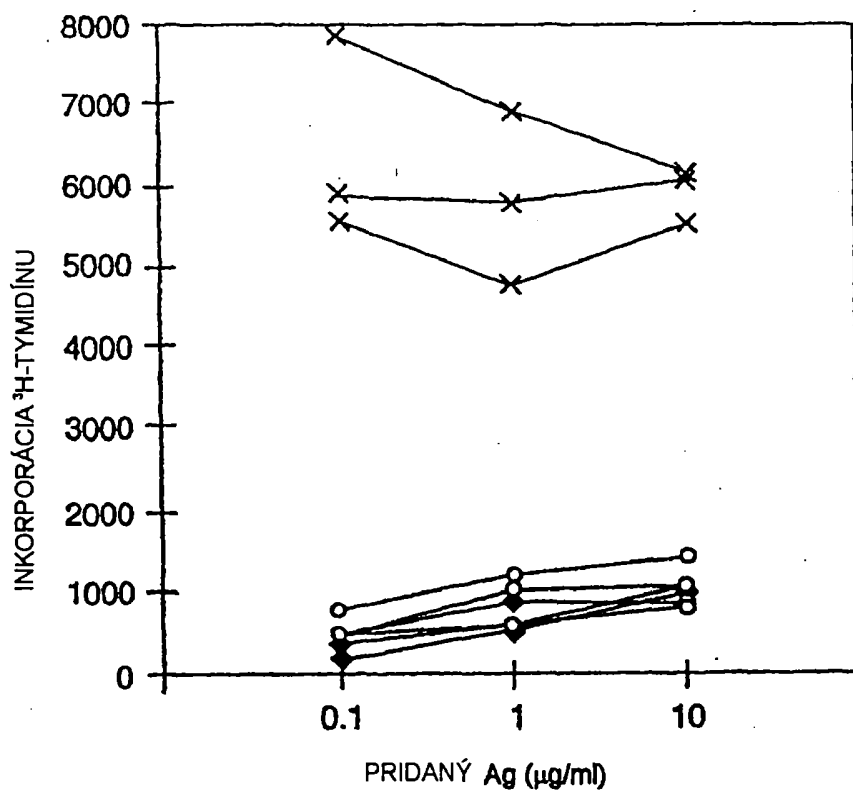
Obr. 10D



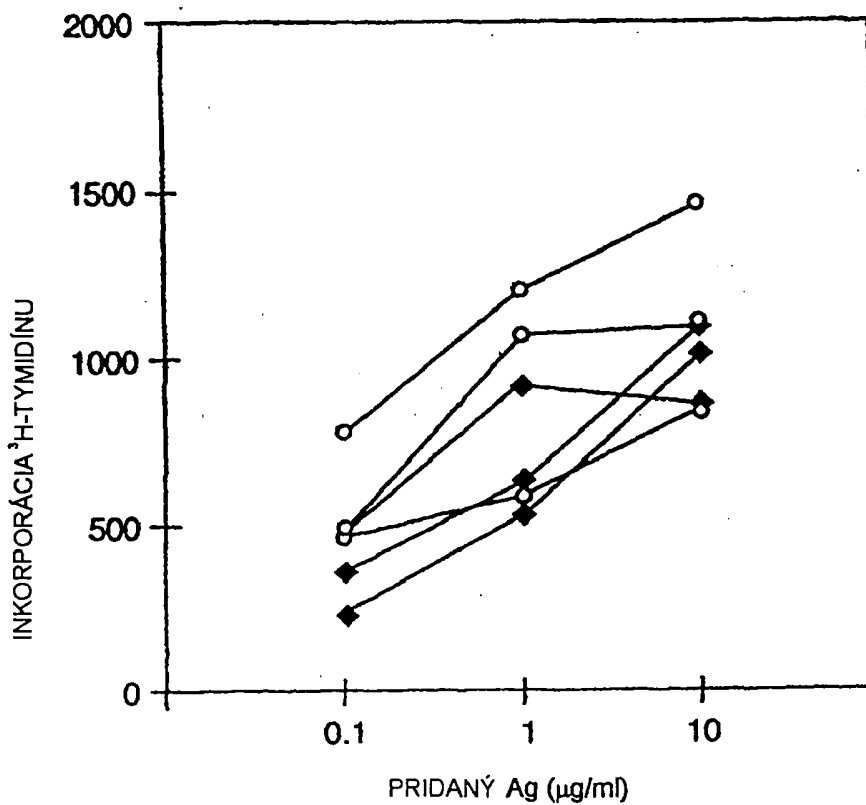
Obr. 10A



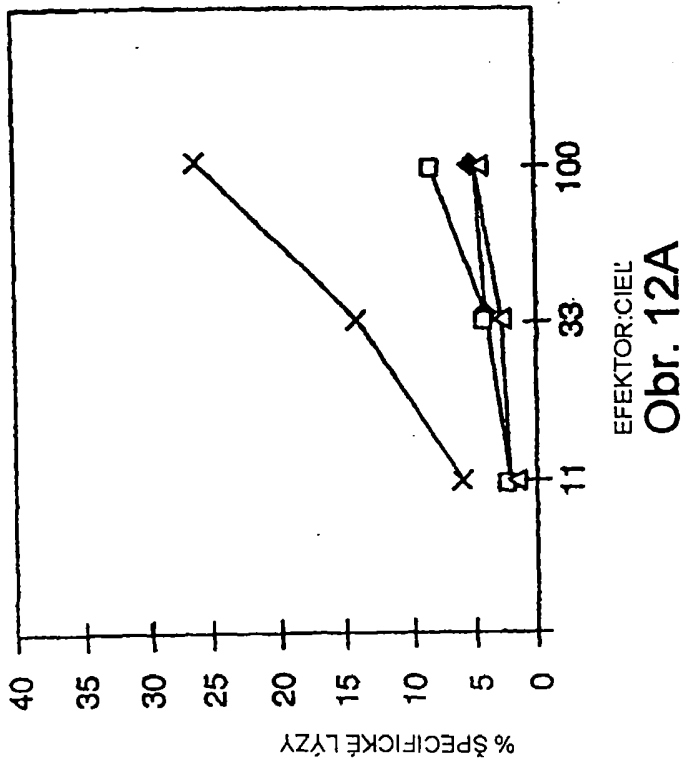
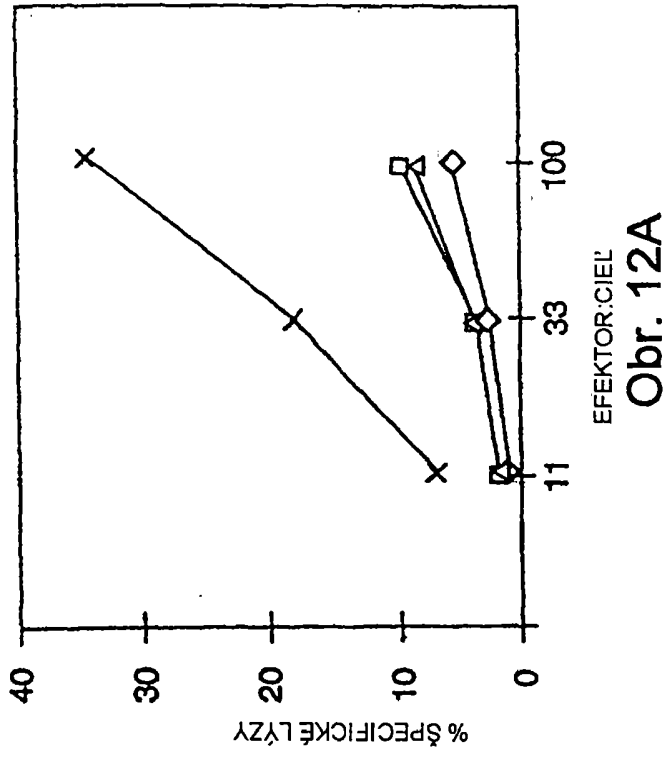
Obr. 10C

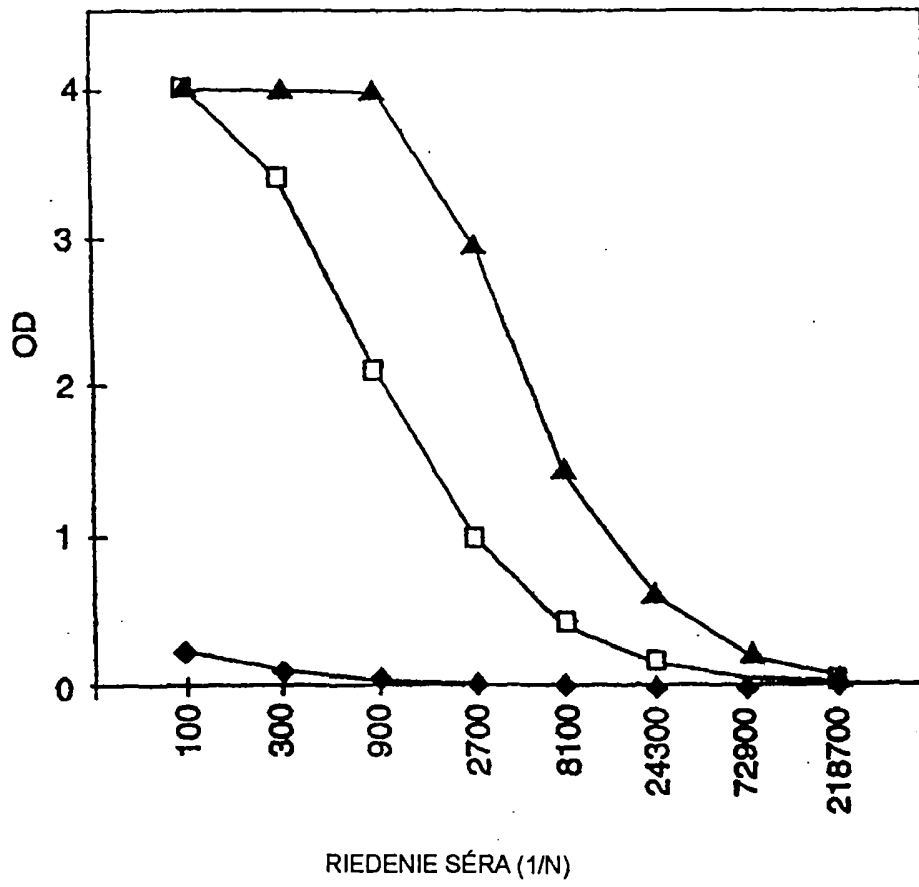


Obr. 11A

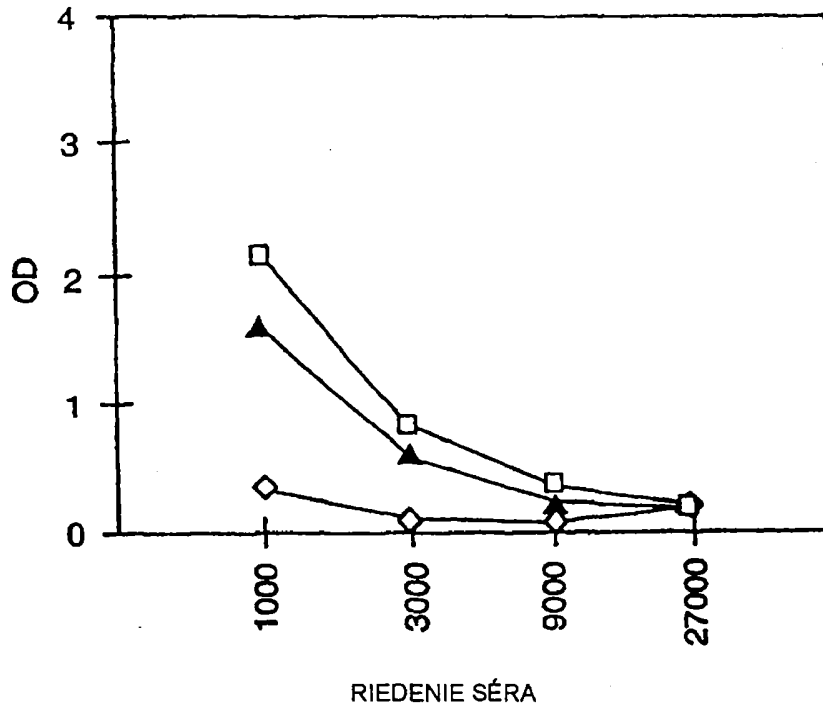


Obr. 11B

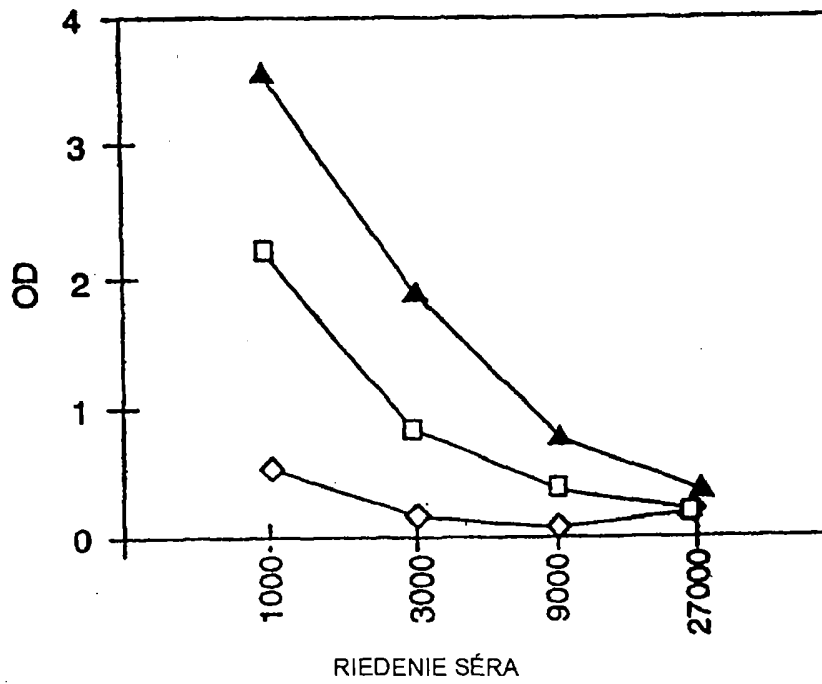




Obr. 13



Obr. 14A



Obr. 14B