



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 304 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 00870
(22) A bejelentés napja: 1993. 09. 17.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
92402644.6 1992. 09. 25. EP
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 93/02519
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/08026

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/86

C 12 N 15/00

A 61 K 39/235

C 12 N 15/11

C 12 N 5/10

A 61 K 48/00

(40) A közzététel napja: 1996. 06. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 03. 28.

(72) Feltalálók:

Kahn, Axel, Párizs (FR)
Le Gal La Salle, Gildas, Saint-Cloud (FR)
Mallet, Jacques, Párizs (FR)
Perricaudet, Michel, Quarville (FR)
Peschanski, Marc, Créteil (FR)
Robert, Jean-Jacques, Sceaux (FR)

(73) Szabadalmasok:

Institut National de la Santé et de la Recherche
Medicale (INSERM), Párizs (FR)
RHONE-POULENC RORER S. A., Antony (FR)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Rekombináns adenovírus eredetű vektorok idegen géneknek
a központi idegrendszer sejtjeibe való bejuttatására,
ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények, és eljárások az előállításukra**

KIVONAT

A találmány rekombináns adenovirális DNS-vektorra vonatkozik géneknek a központi idegrendszer sejtjeibe, különösen az agy sejtjeibe történő bejuttatására, és az említett sejtekben való expresszáására, melyre jellemző, hogy tartalmaz

- (i) legalább egy részt egy adenovírus genomjából, beleértve azokat a régiókat, amelyek ezen adenovírral normál körülmények között megfertőzhető sejtekbe történő behatoláshoz szükségesek, és
- (ii) egy kiválasztott nukleotidszekvenciát, mely az adenovírus genomjának említett részébe van beépítve

egy, az említett sejtekben működőképes promoter szabályozása alá, amely vagy jelen van az említett genomrészben, vagy abba be van építve, ahol a nukleotidszekvencia transzkripció vagy expresszió terméke a központi idegrendszer sejtjeire fejt ki hatását, vagy ezekben a sejtekben termelődik.

A találmány szerinti rekombináns vektorok elsősorban a központi idegrendszer betegségeinek kezelésében és a génterápiában nyernek felhasználást.

HU 219 304 B

A találmány rekombináns adenovirális DNS-vektorokra vonatkozik géneknek a központi idegrendszer sejtjeibe, különösen az agy sejtjeibe történő bejuttatására.

Terápiás DNS biztonságos és eredményes bejuttatása a központi idegrendszerbe félelmetes kihívást jelent az agybetegségek aktív terápiájának fejlesztése számára.

Számos vektorral, főként retrovirális vektorokkal és Herpes simplex eredetű (WO 92/07945) vektorokkal végeztek ez ideig vizsgálatokat. Azonban az ilyen géntranszportot biztosító hordozók használhatósága mind-

eddig korlátozott volt. A legtöbb esetben azért nem használhatók a retrovirális vektorok, mivel nem képesek megfertőzni a posztmitotikus sejteket, beleértve a legtöbb idegsejtet [W. C. Culver et al., *Science*, 256, 1550–1552 (1992)]. A Herpes simplex eredetű vektorok megfertőzték az idegsejteket, de a patogenitással és a génexpresszió stabilitásával kapcsolatos problémák megoldatlanok maradtak [P. A. Johnson, A. Miyahara, F. Levine, T. Cahill, T. Friedman, *Virol.*, 66, 2952–2965 (1992); K. D. Fink et al., *Hum. Gene Ther.*, 3, 11–19 (1992)]. Ezenkívül a Herpes simplex eredetű vektorokra eddig az a megállapítás volt érvényes, hogy expressziójuk csak korlátozott. Egy legújabb közleményben [J. H. Wolfe, S. L. Deshmane, N. W. Fraser, *Nature genetics*, 1, 379–384 (1992)] a szerzők a korábban ismertetett HSV-1 eredetű vektorok vonatkozásában megemlégték a rövid ideig tartó expressziót, ugyanis a legtöbb használt promotor csak a vírusfertőzés akut fázisa folyamán volt aktív (a fertőzést követő 10 napnál rövidebb ideig). Vizsgálták a központi idegrendszer egy sejtjében egy β -glükuronidáz génexpresszióját a LAT promotor szabályozása alatt, amely rendes körülmények között a vírus latenciaasszociált átírat (latency-associated-transcript=LAT) szekvenciájával társul. A szerzők azonban azt is közölték, miszerint kísérleteik bebizonyították, hogy a fertőzött sejtekben a genetikai enzimhiányosság kijavítása érdekében használt LAT promotor a központi idegrendszer sejtjeiben az idegen gének hosszú ideig tartó expresszióját tudta biztosítani, mégis túl kevés sejt javítódott ki ahhoz, hogy a betegség fenotípusát megváltoztassa. Ennélfogva vektorrendszerüket tökéletesíteniük kellett, hogy elégséges sejt javítódjék ki a klinikailag szignifikáns hatás eléréséhez.

A találmány célul tűzte ki ezen nehézségek leküzdését, valamint sokkal hatékonyabb olyan vektorrendszerek előállítását, amelyek képesek idegen gének szállítására, és ahol szükséges, transzkripció termékeiknek vagy expressziós termékeiknek a központi idegrendszer sejtjeihez – elsősorban a proliferációra képtelen, végső differenciáltságú (posztmitotikus) sejtekhez – való szállítására.

A találmány további célja olyan vektorrendszerek előállítása, amelyek megfelelően biztonságosak ahhoz, hogy lehetővé tegyék a klónozott géneknek in vitro tanulmányozását és szabályozását az ilyen sejtekben vagy kísérleti állatokban, továbbá e klónozott gének használatával végzett terápiát – beleértve a génterápiát – amikor is emberben vagy állatban egy kiválasztott expressziós termék in situ termelődik.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy az adenovírus eredetű vektorok, különösen a nem replikáló adenovírus-vektorok, képesek ezeknek a célok-
nak a teljesítésére mind in vitro, mind in vivo. Hatékony szállítórendszereket biztosítanak a géneknek a központi idegrendszer sejtjeibe, főként az agysejtekbe való szállításához. Megfelelően erős fertőzőképességi fokozat jellemzi ezeket a vírusokat, és ez jelentékeny sejtpopuláció megfertőzését biztosítja. A következőkben ismertetett biológiai vizsgálatok bemutatják, hogy az adenovírus eredetű vektorok (vagy adenovírus-vektorok) eredményesen képesek megfertőzni az idegsejteket, elsősorban a neuronokat mind in vitro, mind in vivo.

Adenovírus-vektorokat ez ideig csak nem osztódó, posztmitotikus izomsejtekbe történő géntranszferhez alkalmaztak [B. Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (7), 2581–84 (1992)]. A találmány tehát eljárást ismertet rekombináns adenovirális DNS-vektor előállítására, amely vektort egy olyan eljárásban használnak, amelyben egy kiválasztott polipeptidet kódoló nukleotidszekvencia transzkripció terméke vagy expressziós terméke a központi idegrendszer sejtjeiben – ilyenek például az agysejtek, elsősorban a neurális, a glia- vagy endodermasejtek – fejt ki hatását, vagy ezekben a sejtekben termelődik. Az említett rekombináns vektor ezekben a sejtekben egy olyan adenovírus-vektor, amely egy adenovírus genomjának legalább egy részét tartalmazza, és a genom azon részeit foglalja magában, amelyek azzal a genetikai információval rendelkeznek, amely ahhoz szükséges, hogy az adenovírus az ezzel normálkörülmények között megfertőzhető sejtekbe behatoljon, és az említett nukleotidszekvenciát az említett genomrészbe építjük be egy olyan promotor szabályozása alá, amely vagy jelen van a szóban forgó adenovirális vektorban, vagy abba be van építve, és ez a promotor az említett sejtben működőképes.

Pontosabban a találmány tehát egy olyan adenovírus eredetű vektor használatára vonatkozik, amely egy kiválasztott nukleotidot fejez ki a központi idegrendszer sejtjeiben.

A találmány egy olyan rekombináns adenovirális DNS-vektorra is vonatkozik, amely képes egy kiválasztott nukleotidszekvencia expressziójának és/vagy transzkripciójának az irányítására a központi idegrendszer sejtjeiben, és jellemzően (i) egy adenovírus genomjának legalább egy részét tartalmazza, beleértve azokat a szakaszokat, amelyek ahhoz szükségesek, hogy ez az adenovírus behatolhasson a központi idegrendszer sejtjeibe, és (ii) az említett nukleotidszekvencia, amely az adenovírus említett részébe van beépítve egy olyan promotor szabályozása alatt áll, amely működőképes az említett sejtben, és vagy jelen van az említett genomrészben vagy abba be van építve.

Az adenovírus-vektoroknak azon különleges adottságát, miszerint génfragmentumokat képesek bevinni nyugvó idegsejtekbe, a későbbiekben ismertetett kísérletekkel szemléltetjük, amelyeket kifejezett patkányok idegsejtjeiben végeztünk egy olyan adenovírus-vektorral, amely az *E. coli* LacZ génjét vagy a humán tirozin-hidroxiláz gént hordozza. Az idegsejtek (beleértve a

neuronokat, asztrocitákat, a mikroglia- és ependyma-sejteket) nagy számában fejeződtek ki ezek a transzgenek, az agy különböző területeire való beoltásuk után legalább 60 nappal. Nem okozott észlelhető citopátiás hatásokat $10 \mu\text{l } 3 \times 10^5$ pfu bevitele, ilyen hatásokat magasabb fertőző titerenél ($>10^7$ pfu/ $10 \mu\text{l}$) figyeltünk meg, és nagyon valószínű, hogy ez az injekció helyéhez közeli idegsejtekben a vírusrészekké masszív endocitóziséval függött össze.

Ezenkívül úgy manipulálhatjuk az adenovírusok genomját, hogy 7,5 kb hosszú vagy ennél hosszabb idegen géneket tudjunk bennük elhelyezni. Széles a vírus gazdasejtspektruma, emberre alacsony a patogenitása és a vírust magas titerekben tudjuk izolálni [L. D. Stratford-Perricaudet, M. Levrero, J. F. Chase, M. Perricaudet P. Briand, Hum. Gene Ther., 1, 241–256 (1990)].

Könnyen felmérhető, hogy ezek az eredmények erősen alátámasztják azt a feltételezést, hogy az adenovírus mint vektor egy új és figyelemre méltó eszközt kínál az idegrendszer nyugvó sejtjeinek genetikai módosításához, nagy fertőzőképessége, hosszú ideig tartó expressziója, széles gazdasejtspektruma és alacsony toxicitása miatt. Tehát az adenovírust be kell iktatni a klónozott géntermékek funkciójának tanulmányozásába, ezek fiziológiai és anatómiai összefüggését tekintve. Az a képessége, hogy megfertőzi a hippokampust (később tárgyaljuk), nagy jelentőségű az integrált jelenségek – ilyen a hosszú ideig tartó működőképesség – állapotokban való tanulmányozása szempontjából.

Ezenkívül világosan kitűnik, hogy az adenovírus hatékony eszköz az idegen géneknek az agyba terápiás céllal való bejuttatásához. Az adenovírus-vektorok komoly lehetőséget teremtenek az idegrendszer betegségeinek génterápiájában, például degeneratív betegségek esetén a növekedési faktorok és neurotranszmitterek bevitele révén, és még inkább a megfelelő sejtekben a hibás gének helyettesítése révén. Viszonylag alacsony titerű adenovírus-vektorok is eredményesen tudnak idegen géneket átvenni jelentős mennyiségű agysejtbe anélkül, hogy káros hatásokat váltanának ki. Az agysejtekbe beviendő idegen géneket tartalmazó rekombináns adenovírus-vektorok, dózisaik optimalizálása mellett, új utakat nyitnak számos genetikai és szerzett neurológiai betegség kezelésében, következésképpen más megoldást nyújtanak a gyógyszeres kezelés vagy a fetális szövetek agyi transzplantációja helyett.

Az adenovírusok, elsősorban a 2. vagy 5. típusú (Ad2 vagy Ad5) adenovírusok különösen előnyösek. Ezek viszonylag stabilak, könnyen tenyésztethetők, és gyorsan (a vírusciklus körülbelül 30 óra) magas titeret eredményeznek, fertőzött sejtenként 10^4 – 10^5 plak-képző egységet (pfu=plaque forming unit). Ezek a típusok nem onkogének. Virális genomjuk teljes szekvenciáját meghatározták [J. Chroboezek et al, Virology, 186, 280–285 (1992)], és molekuláris biológiájukat behatóan tanulmányozták. Számos mutáns, főként deléciós mutánsokat állítottak elő, amelyek nagyméretű fragmentumoknak a vírusba való beépítését tették lehetővé [K. L. Berkner, Biotechniques, 6, 612–629 (1988)].

Előnyös, ha a találmány szerint használt rekombináns vektorok hibás (defektív) adenovírusok, amelyeknek a genomja már nem tartalmazza azokat a nukleinsavszekvenciákat, amelyek a vírusnak a normálkörülmények között vele fertőzhető sejtekben (nem agysejtekben) való replikációjához szükségesek. Pontosabban, nem tartalmazzák az E1 szakaszt, beleértve a korai E1a szakaszt, amely a vírus replikációjához szükséges további korai transzkripciós egységeket aktiválja, továbbá az E1b szakaszt, amely a teljesen transzformált fenotípus kialakításában és a virális infekció folyamán a DNS-szekvenciák védelmében vesz részt, és amely az infekció későbbi szakaszában a virális folyamatok normál előrehaladásához szükséges.

Ugyancsak előnyös, hogy ezekből a vektorokból hiányzik az E3 szakasz, amely az in vivo sejtes immunitásban játszik szerepet, és teljesen nélkülözhető az in vitro növekedés szempontjából.

Előnyös mégis, ha a találmányhoz felhasznált rekombináns vektor minden olyan szekvenciát tartalmaz, amelyek az adenovírus kapszidképzéséhez szükségesek.

A promoter, amely a kívánt vagy a központi idegrendszer sejtjeiben termelt, kiválasztott polipeptidet kódoló szekvenciát szabályozza, lehet akár endogén, akár exogén, figyelembe véve a rekombináns vektor adenovirális részeit.

Bármelyik olyan homológ promoter előnyös, amelyet valószínűleg felismernek az ilyen adenovírusokkal fertőzött emberi vagy állati sejtek polimerázai, gyakorlatilag az RNS-polimeráz II. Különösen előnyös endogén promoter a 2. típusú humán adenovírus [M. Levrero et al., Gene, 101, 195–202 (1991)] erős fő késői promotere (major late strong promoter=MLP). Egy másik használható promoter az adenovírus E1a szakaszának korai promotere. Ez utóbbi esetben az előnyös hibás adenovírus nem tartalmazza 5'-szakaszt, amely a korai promoterhez képest rendes körülmények között 5'-irányban helyezkedik el, és ekkor az E1a szakaszt helyettesítjük az idegsejtekbe bevenni kívánt nukleotidszekvenciával.

Az adenovírusok endogén promotereit más, heterológ vagy exogén eredetű, bárhol előforduló promoterral is helyettesíthetjük, például:

- a Rous-szarkóma-vírus (RSV) hosszú ismétlődő végszakaszában (LTR=long terminal repeat) lévő promoter vagy a fent ismertetett LAT promoter,
- a citomagalovírus IE génjének egy promotere,
- indukálható MMTV promoterek [egér- emlőtumor-vírus (mouse mammary tumor virus=MMTV) eredetű promoterek] vagy metallotionin promoterek.

Más promotereket is használhatunk. Elsősorban a neurális és gliális promoterek az előnyösek, különösen olyan esetekben, amikor az adenovirális vektorba beépített nukleotidszekvenciával inkább az idegsejtek speciálisabb osztályait célozzuk meg. Megemlítjük például a következő promotereket, főként azokat, amelyek a neurotransmitter-szintetizáló enzimeket kódoló génekben találhatók:

TH (tirozin-hidroxiláz)
 CHAT (kolin-acetil-transzferáz)
 TPH (triptofán-hidroxiláz)
 GFAP (gliális fibrillaris savanyú protein)
 (glial fibrillary acidic protein)
 Enoláz g (neuron protein marker)
 Aldoláz C

A találmány olyan rekombináns vektorok előállítására alkalmas eljárásra is vonatkozik, mely eljárás abból áll, hogy a kiindulási vektorokba beépítjük azt a nukleotidszekvenciát, amelynek az expresszióját kívánjuk, és a megfertőzhető sejteket az említett vektorokkal transzformáljuk. Ahol a vektor teljes élő vírus, a rekombináns vírusok a sejtenyésző táptalajból izolálhatók. Ha a rekombináns vektor hibás vírus, egy előnyös eljárás szerint, ezzel olyan transzformálható eukarióta sejtvonalat (előnyösen emberi vagy állati eredetű sejtvonalat) transzformálunk, amely maga is tartalmaz egy megkülönböztethető nukleotidszekvenciát. Ez a szekvencia képes az adenovírus-genom azon részét kiegészíteni, amely a vírus replikációja szempontjából lényeges, és amely az említett vektorból hiányzik. Előnyös, ha a kiegészítő szekvenciát az említett sejtvonal genomjába visszük be.

Az ilyen előnyös sejtvonalakkal kapcsolatban meg kell említenünk a humán embrionális vese eredetű úgynevezett „293 sejtvonalat”, amely genomjába integrálva tartalmazza az Ad5 vírus genom 5'-szakaszának első 11%-át. Az Ad5 genomjának ez a darabja biztosítja, hogy a rekombináns vírusok ezen hibás szakaszban – e szakasz egy részének deléciója miatt – megfelelően kiegészüljenek. Hibás vírusok termelésére alkalmas eljárás leírását részletesebben tartalmazza az EP 185573 számú európai szabadalmi bejelentés (benyújtva: 1985. november 20-án).

Ilyen sejtvonalak transzformációja után a hibás rekombináns vírusokat szaporítjuk, izoláljuk és tisztítjuk.

Szükségtelen megemlíteni, hogy ugyanez az eljárás alkalmazható más hiányos adenovírusok előállítására, amelyekben a deléció nem a fent említett 5'-szakaszban jön létre, és magától értetődik, hogy az ilyen eljárásban használt sejtvonalaknak tartalmazniuk kell saját genomjukban az adenovírus genomból származó deletált szekvenciát, hogy lehetővé váljék ezáltal az ilyen hibás adenovírusok kiegészülése.

A találmány először bocsát rendelkezésre komoly megoldást arra, hogy injekcióval olyan sejteket – például az aktuális genetikai információt hordozó embrionális sejteket – juttassunk az agyba, amelyek a génterápiában a célsejtekben – elsősorban a posztmitotikus neuronokban – meglévő metabolikus hiányosságok vagy hibák kijavítását célozzák. Mindez az adenovírusok jelentékeny fertőzőerejének a következménye, amely a megfelelő hibás adenovírus eredetű vektorban megmarad, és így e vírusok képesek szétszóródni az érintett neurális vagy idegszövetekben, miközben lényegében meg is maradnak a kiválasztott szöveten belül, ha speciálisan ebbe voltak beoltva, továbbá képesek a hosszú ideig tartó transzkripcióra, és a legtöbb esetben az ilyen adenovirális vektorok által az idegszövetbe bevitt nukleotidszekvencia expressziójára.

A nukleotidszekvencia, amelynek a központi idegrendszer sejtjeibe való bevezetésére törekszünk, bármilyen olyan szekvenciából állhat, amely e sejtek anyagcseréjével kölcsönhatásba lépő molekulákat képes szolgáztatni. Ezek a molekulák olyan kiválasztott antiszensz RNS-ekből vagy antiszensz oligoribonukleotidokból állhatnak, amelyek képesek hibás messzenzsér RNS-ekkel reagálni, és így e hibás mRNS-ek további működését – ami a megfelelő betegségeket eredményezi – képesek blokkolni, például számos neuropszichiátriai betegségben, epilepsziában stb. Úgy tűnik, hogy ez a metodológia különös érdeklődésre tarthat számot az Alzheimer-szindróma kezelésében. Az antiszensz módszer használhatnánk – csak a példa kedvéért – egy β -amiloid-prekursor-blokád bevezetésére, hogy megelőzzük a szenilis plakkokban a β -amiloid-peptid felhalmozódását. Olyan antiszensz oligonukleotidot is fel lehetne használni, amely képes meggátolni az Alzheimer-betegségben szerepet játszó proteinek, például a TAU protein rendellenes foszforilációjában részt vevő enzimek expresszióját. Ugyancsak más eljárás szerint, a nukleotidszekvencia lenne az, amely eltávolítaná a specifikusan kötődő proteineket, önmaga pedig normálisan részt venne azon DNS- vagy RNS-szekvencia feldolgozásában, amelynek a transzkripcióját vagy expresszióját óhajtjuk meggátolni.

Az a nukleotidszekvencia, amelyet a központi idegrendszer sejtjeibe kívánunk bevezetni, olyan expressziós terméket kódolhat, amely biológiai tulajdonsággal rendelkezik. Az említett expressziós termék képes lehet például (1) egy megfelelő hibás természetes polipeptidet tartalmazó olyan terméket kompenzálni, amelyet egy hibás megfelelő nukleotidszekvencia kódol, vagy (2) a megfelelő természetes endogénpolipeptidet tartalmazó termék célsejtekben való endogéntermelésének a hiányát kompenzálni, vagy (3) új terápiás hatásokat bevezetni a fertőzött sejtekbe. Hibás polipeptidet tartalmazó termékek lehetnek például a neurotransmitter-szintetizáló enzimek és a növekedési faktorok. Például a Parkinson-szindróma esetében (amelyet a dopaminergsejtek sebezhetősége jellemez) lokális DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanin) vagy dopamintermelést lehet elérni tirozin-hidroxiláz vagy növekedési faktort – ilyen a BDNF (brain derived neurotrophic factor=agyú eredetű neurotrof faktor) – kódoló cDNS kifejeződése révén, ami kedvező lehet a dopaminerg neuronok túlélése szempontjából. Hasonló a helyzet az Alzheimer-szindrómánál, ahol az egyik hiányzó neurotransmitter az acetil-kolin, amelyet a kolin-acetil-transzferáz szintetizál. Ezenfelül az NGF (nerve growth faktor=idegnövekedési faktor) tudná megelőzni a kolinerg neuronok degenerációját.

Egy másik potenciálisan hasznos kifejezendő faktor a CNTF (ciliary neurotrophic factor=ciliáris neurotrof faktor), amely megelőzheti a neuronok elhalását. A CNTF az agyban is jelentős hatást fejt ki, blokkolja például a perifériás idegek romlását (amely valószínűleg diabéteszben szenvedő betegekben indukálódik). További trofikus faktorok – amelyeknek a kifejeződését meg lehet kísérelni – például a következők: IGF, GMF, α FGF, β FGF, NT3 és NT5.

Növekedési faktorok termelését általában olyan betegek idegsejtjeiben indíthatjuk meg, akik neuropátiáktól, hűdésektől szenvednek, akiknél gerincvelő-sérülés, miotrofiás laterális szklerózis, Huntington-chorea, Alzheimer- és Parkinson-kór, valamint központi bénulás (little-kór) áll fenn. Más lehetőségek mellett, az epilepsziát a GABA (gamma-amino-vajsav) neurotranszmitter központi idegrendszerben való helyi termelésével – a glutaminsav-dekarboxiláz expressziójának eredménye – lehetne kezelni.

A találmány különösen lényeges az öröklött betegségek kezelésére használt olyan készítmények előállítás szempontjából is, amelyek a mutáns gén hibás vagy hiányos termékét befolyásolják: a lizoszomális enzimeket a lizoszomális betegségekben [például: hexóz-aminidázok a Tay–Sachs és Sandhoff-szindrómában, aril-szulfatáz a metakromatikus leukodisztrofiában, glükocerebrozidáz a Gaucher-szindrómában, b-glükuronidáz a mukopoliszacharidózisban és a HGPRT (hipoxantin-guanin-foszfo-ribozil-transzferáz) a Lesh–Nyhan-szindrómában stb...]. Az öröklött progresszív neurondegenerációkat a betegséget okozó gén normál változatának adenovírus-vektorok révén való átvitelével kezelhetjük, vagy – mint előbb tárgyaltuk – növekedési faktorok helyi termelésének megindításával. Kimutatták például, hogy a CNTF-termelés lelassítja egerekben a progresszív motoneuron degenerációt (pmd) [Sendtner et al., *Nature*, 358, 502–504 (1992)], megfigyelték, hogy patkánynál, öröklött retinadisztrofiában az α FGF ugyanilyen hatással volt a fotoreceptor degenerációjára [Faktorovich et al., *Nature*, 347, 83–86 (1990)]. A szerzett gerincvelő-betegségeknek – ilyen a gyakori és mindig halálós miotrof laterális szklerózis (ALS = Amyotrophic Lateral Sclerosis) – talán ugyanígy hasznos lehetne a CNTF lokális termelése, mint ahogyan a motoneuronok védelménél is jó hatásának bizonyult.

Az öröklött diszmielinizációs betegségeken szintén lehetne javítani úgy, hogy a mielinszintetizáló sejtekbe adenovírus közvetítésével gént vinnénk be.

Végül a potenciális terápiás szerek bizonyos más típusait is elő lehetne állítani a központi idegrendszerben, így például enkefalinokat az erős fájdalmak csillapítására, például rákos betegekben.

A találmány továbbá a rekombináns adenovírus-vektorokat tartalmazó gyógyszerkészítményekre is vonatkozik, amely vektorok az előbbieken meghatározott szekvenciákat tartalmazzák olyan gyógyszerészeti-leg elfogadott hordozóval társítva, amely a kiválasztott alkalmazási módhoz, például az aktuális idegszövetben előállított vírusszuszpenzió közvetlen in situ alkalmazásához megfelelő, vagy – bár a legkevésbé előnyös, főként, ha az adenovírus-vektor olyan promotert is tartalmaz, amely szelektíven működik a meghatározott idegszövetben vagy sejtekben – az általánosan használt módon, például intravénásan adjuk be.

A találmány nem korlátozódik az adenovírus-vektorok előbb említett terápiás felhasználására. Az adenovírus-vektorok, erős fertőzőképességüknek köszönhetően, felhasználhatók az idegsejtek meghatározott populációinak in vitro vizsgálataiban, például egy promotor

kapacitásának tanulmányozására (amelyet ezután megfelelő „marker”-hez – ilyen a b-gal – kötünk), hogy vajon a szóban forgó idegsejtek polimerázai felismerik-e. Ezeket az adenovírus-vektorokat felhasználhatjuk még arra, hogy kimutassuk vagy kiértékeljük a rekombináns vírus (a nukleotidszekvencia kifejeződése az ilyen sejtekben egy működőképes promotor szabályozása alatt történik) kölcsönhatását az idegsejtek egy adott populációjával vagy egy összetettebb idegszövettel. Egy ilyen kiértékelés vagy kimutatás például arra irányulhat, hogy lokalizálja az összetett szövet azon sejtjeit, amelyek receptort hordoznak a vírus számára. A kimutatáshoz bármelyik megfelelő klasszikus jelzési módszer használható. Használhatunk például jelzett antitesteket a vizsgált nukleotidszekvencia expressziós termékének a kimutatására. E vizsgálatoknak jelentős jövője lehet a neuroanatómia területén.

A találmány szerinti rekombináns vektor egy olyan módszerben is felhasználható, amelyben egy kiválasztott polipeptidet kódoló nukleotidszekvencia transzkripció terméké vagy expressziós terméké egy állat központi idegrendszerének sejtjeiben – például az agy és gerincvelő sejtjeiben, elsősorban a neurális, glia- vagy ependymasejtjeiben – fejt ki hatását, vagy ezekben termelődik, és az említett állatban vizsgáljuk az észlelt fiziológiai és viselkedésszerű módosulásokat, amelyeket az említett transzkripció termék vagy az említett expressziós termék indukált.

Például a szeptohippokampális rostköteg sérülése esetén, amely kimeríti a hippocampusban az acetilkolint, lehetőség nyílna a kolin-cetil-transzferázt (CHAT) kódoló gén hippocampusba való bevitelének a tanulmányozására. Ennek a génnek a célzott bevezetése a kolinergrostok (amelyeket a sérülés vágott el) belsejében megindíthatja a rendelkezésre álló acetilkolin mennyiségi növekedését, következésképpen megszüntetheti hiányát. A hiányt a memorizálási viselkedési vizsgálatokkal állapíthatjuk meg. Például az „uszodába” dobott egerek meg tudják tanulni, hogy újból hogyan találják meg azt a platót, amelynek a segítségével kimenekülhetnek a vízből (Morris-féle uszoda). Azok az állatok azonban, amelyekben a septo-hippocampus rostkötegét károsodás érte, ennél a műveletnél nagy hátrányban vannak. Hogy az acetil-kolin-termelés a gén-expresszió következtében megnövekedett-e, abból ítéltethető meg, hogy az állatok újból könnyen meg tudják találni a platót.

Egy másik példa szerint, a találmány lehetővé teszi a motoros megnyilvánulásban mutatkozó zavaroknál – amelyet a striatum denervációja okoz, különösen a középagy dopaminerg belsejének (substantia nigra) sérülés esetén – a kompenzáció fokának az analizését. A tirozinhidroxilázt (TH) kódoló gén bevezetése striatumba ki tudja javítani a hiányt. A kompenzáció a patkányok rotációs tesztben való viselkedésének a tanulmányozásával állapítható meg: az egyik oldalon megsebzett állatok csak repetitív módon forognak (percenként több mint tíz forgás), ha apomorfinitjekciót kapnak. Ebben a viselkedési tesztben állapítható meg a dopamintermelés (amely a TH gén bevezetéséhez kapcsolódik).

Egy további példa mutatja, hogy a találmány más esetekben is elősegíti az elektrofizikai és viselkedési vizsgálatokat. Például a háti gerincvelőszerv, amely a nociceptív stimulációhoz kötött információkat közvetíti (fájdalomcsatornák), érzékeny morfinra, amely aktivitás csökkenését okozza. Egy endomorfinkódoló gén bevezetése a gerincvelőbe előidézhetheti ennek az anyagnak a szekrécióját, amely – mint a morfin – hatást gyakorol ezekre a sejtekre. Egy ilyen hatás viselkedési tesztekkel (az állatok reakcióküszöbe nociceptív stimulációra) értékelhető ki, valamint magának a gerincvelő neuronjain végzett elektrofiziológiai vizsgálatokkal. E sejtek aktivitásának a megfigyelése lehetővé teszi az átvitt gén expressziója által indukált változás értékelését.

A találmány által nyújtott lehetőségeket a későbbiekben szemléltetjük, ugyanakkor példák leírásával, amelyeket a jelen leíráshoz csatolt ábrák részben alátámasztanak, nem korlátozzuk a találmány oltalmi körét. Elsősorban az Ad.RSVb-gal használható sokat ígérő eszköz gyanánt az agy speciális területein a neuron- és gliamorfológia analízisének, ugyanis az injekció helyén a sejtek Golgi-szerű festődését teszi lehetővé. Az axonok enzimmel való feldarabolása további módokat nyújt az elkülöníthető neuronpopulációk kihatásainak tanulmányozásához. Vagy megfordítva, a vírus felvétele a terminálok által és ezt követően visszairányuló transzportja a neuron sejtest felé, lehetővé teszi, hogy az afferens idegpályák egyes csoportjait egy speciális területhez rendeljük.

Ennek a technikának a fő előnye a neuroanatómia számára abban van, hogy az X-gal festés könnyen kombinálható minden más jelzési technikával, főként immunokémiai technikákkal. A vektorok használata az nls (nuclear localization signal) szekvencia elhagyásával, javíthatja egy ilyen technika eredményességét.

A adenovirális vektor alapul szolgál továbbá az RSV LTR promotert helyettesítő – tekintetbe véve a különböző idegsejt-populációkat – más promoterek hatásainak tanulmányozásához.

A találmányt az alábbi, nem korlátozó jellegű példákkal közelebbről ismertetjük.

1. példa

Az Ad.RSVb-gal jelű, replikációhibás adenovírust használtuk, amely egy magra irányuló β -galaktozidázt (b-gal) fejez ki a Rous-szarkóma-vírus hosszú ismétlődő végszakasz (RSV LTR) promoter által szabályozottan [L. D. Stratford-Perricaudet, I. Makeh, M. Perricaudet, P. Briand; J. Clin. Invest., 90, 626 (1992)]. Az említett vektorban az SV40 nls (nuclear localization signal) gondoskodott a vektor sejtmagokhoz történő irányításáról. Vizsgáltuk, hogy a vektor képes-e megfertőzni a ganglion cervicale superiusokból (superior cervical ganglia=SCG) származó szimpatikus neuronok és a szimpatikus asztrociták primer tenyészeit. A b-gal aktivitását hisztokémiai módszerrel tettük láthatóvá, amikor is szubsztátumként 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktozidázt (X-gal) használtunk [J. R. Sanes, J. L. Rubinstein, J. F. Nicolas; Embo. J., 5, 3133 (1986)]. Az antimitotikus szer jelenlétében tenyésztett

SCG alkalmas eszközül szolgál arra, hogy tiszta és homogén neuronkészítményt kapjunk [L. D. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet; Human Gene Transfer, (szerkesztő: O. Cohen-Haguenauer, M. Boiron; J. Libbey; Eurotext Ltd., 1991) 51. oldal].

Tehát az Ad.RSVb-gal adenovírral való inkubálás után a szimpatikus neuronokban és asztrocitákban a b-gal expressziója a következőképpen megy végbe.

Kétnapos Wistar-patkányokból eltávolítjuk az SCG-t, szétválasztjuk, 16 mm-es kollagénnel bevont lemezekre visszük, és az előbb említett „Human Gene Transfer” (1991) című kiadványban leírt módon tenyésztjük. A tenyészethez az első hét folyamán citozin-arabino-furanozidot (10 μ M) adunk, hogy megakadályozzuk a ganglion eredetű nem idegsejtek proliferációját. 6 nap múlva a sejtenyészeteket vagy kontrollként csak a táptalajt, 10⁶ plak-képző egység (pfu) Ad.RSVb-gal vírussal oltjuk be. 24 óra múlva a vírust eltávolítjuk, és a sejteket 2 napon át a táptalajban hagyjuk. A sejteket mossuk, paraformaldehiddel fixáljuk, majd a b-gal-aktivitást hisztokémiai festéssel mutatjuk ki [lásd előbb, J. R. Sanes, J. L. Rubinstein, (1986)].

6 napig tartó tenyésztés után a következő megfigyeléseket tettük: látszólag minden sejt b-gal-pozitív volt, nyilvánvaló toxikus hatás vagy morfológiai változás nélkül. Ha beoltatlan párhuzamos tenyészetben végeztük a festési reakciót, pozitívan jelzett sejteket nem észleltünk.

Asztrocitákban dúsított patkányhippocampus primer szövetenyészetben is vizsgáltuk az adenovírus fertőzőképességét. Az oltás a sejtek körülbelül kétharmad részében eredményezett kék magfestődést. A b-gal-pozitív sejtek asztrocitákként való azonosítását úgy igazoltuk, hogy további festést végeztünk gliális fibrilláris savanyú protein (GFAP=glial fibrillary acidic protein) elleni antitesttel.

A vizsgálatot pontosabban a következőképpen végeztük. Dúsított asztrocita primer tenyészeteket készítettünk újszülött patkány hippocampus szövetből McCarthy és DeVellis [K. D. McCarthy, J. De Vellis; J. Cell Biol., 85, 890 (1980)] leírása szerint. A sejteket 35 mm átmérőjű műanyag csészékre vittük, ahol 5 napig tenyésztettük Dulbecco által módosított, kiegészített Eagle táptalajban (DMEM). Minden csészét 2 μ l adenovírus-oldattal (titer: 10⁸ pfu/ml) oltottunk be, majd 24 óra múlva a sejteket mostuk, paraformaldehidben fixáltuk. A b-gal kifejező sejteket X-gal hisztokémiai vizsgálat alkalmazásával analizáltuk. Megfigyeltük, hogy a két jelzés egymás fölé helyeződött (nem mutattuk be).

2. példa

Az adenovírus alkalmazhatóságát agysejtek in vivo fertőzésére számos jellemző struktúrában vizsgáltuk meg.

Tizenhét hím Wistar-patkányba (10 hetes korú) mély anesztéziában 10¹⁰ pfu/ml titerű nagymértékben tisztított vírust tartalmazó 1–5 μ l táptalajt oltottunk sztereotaxis berendezésben vagy a hippocampusba vagy a substantia nigrába. Az állatokat a beoltás után

1, 2, 3, 5, 7, 30 és 60 nap múlva leöltük. A pozitív sejtekben a b-gal-aktivitást hisztokémiai módszerrel mutattuk ki, X-gal-szubsztrátum használatával és protein elleni antitesttel [az antitest egy affinitással tisztított b-gal elleni nyúl IgG frakció volt (Cappel, 1:800 hígítás), amelyet azután egy sztreptavidin-biotinezett peroxidázkomplexhez (Amersham) kötöttünk diamino-benzidinnel, mint kromogénnel, nikkellel aktiválva]. Az utóbbi módszer érzékenyebb, és bizonyos esetekben kimutatta a b-gal-t finom citoplazmatikus folyamatokban is, ami az átvitt gén intenzív expressziójának tudható be.

Mindegyik oltott állat magas b-gal-aktivitást mutatott. Az expressziót korán, az oltás után már 24 óra múlva ki tudtuk mutatni, de fennmaradt a 2 hónap múlva vizsgált állatokban is. A vírus diffúziója erősebb volt a hippocampusban, mint a substantia nigrában, és szétterjedt az egész dorzális hippocampusban. A substantia nigrában az infekció teljes képe korlátozottabb volt, és egy mediolaterális irány mentén oszlott el. Ez a különbség valószínűleg visszatükrözi a vírusnak azt a hajlamát, hogy inkább az alacsony tapadóképeségű olyan szövetekben szóródjon, mint a fissura hippocampalis és mint a gyrus dentatus szemcsesejtrétege és az ezt körülvevő szövetek közötti határreteg.

A hippocampusban a fertőzött terület kiterjedése az alkalmazott vírusoldat térfogatával korrelált. A hippocampusba való oltás után a 3. és 7. nap között elölt patkányokban a fertőzött terület általában 1–4 mm³-t tett ki, 3–5 µl beoltott vírus (10¹⁰ pfu/ml) esetén. Érdekes módon a vizsgálati idő folyamán a hippocampális metszetek gondos vizsgálata a jelzés mintázatában változást mutatott ki. Míg az oltás utáni első hét alatt csak csekély különbségeket észleltünk, 1 hónap múlva a jelzett sejtek eloszlásában jelentős átalakulás ment végbe. Ez az új mintázat 2 hónapig megmaradt. Ebben a hosszú ideig tartó mintázatban a b-gal-pozitív sejtek eloszlása kevésbé volt diffúz, és úgy tűnt, hogy egy meghatározott sejtrétegre korlátozódik.

A beoltott állatokban nem észleltünk nyilvánvaló toxikus hatást, mindegyik túlélte az oltást szemmel látható viselkedési rendellenességek nélkül. A vírussal fertőzött agy vizsgálata kimutatta, hogy az oldalkamra (ventriculus lateralis) nem nagyobbodott meg, és a struktúrák sejt szerkezete nem bomlott fel. Az egyetlen észrevehető változás egy helyi szövetelhalás és reaktív gliosis volt, amely az oltás helyére korlátozódott. Ez a jelenség túlnyomórészt magának az injekciónak tudható be, ugyanis hasonló hatást figyeltünk meg a fiziológias konyhasóoldattal oltott állatoknál is. Végül a hippocampális metszetek Nissl-festéssel sejtszinten végzett analízise sem sejtvesztést, sem citolízist utaló bizonyítékot nem tárt fel sem a piramissejtrétegekben, sem a gyrus dentatus szemcsesejt rétegében.

3. példa

A megelőző eredményekből leszűrhető, hogy az adenovírus képes megfertőzni az agysejteket. A következő kísérlet részletesebben szemlélteti a neuronok in vivo fertőzhetőségét.

Gliasejteket és neuronsejteket fertőztünk Ad.RSVb-gal adenovírral közvetlen in vivo injekcióval. A mikroglia sejtekben b-gal expressziót immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki az oltás helyéhez közeli területen egy olyan patkánynál, amely a leölés előtt 5 nappal kapott intrahippokampális injekciót. Az immunhisztokémiai reakciót nikkellel aktivált peroxidázzal végeztük és fluoreszcenciával konjugált második antitesttel.

Röviddel az injekció után sok b-gal-pozitív sejt tipikus mikroglia sejt morfológiát mutatott. Ezek a kis sejtek a sejtestről körös-körül kinyúló, erősen elágazó finom nyúlványokat mutatnak. Bár 1 héten át a mikroglia sejtek képezték a b-gal kifejező sejtek nagy részét, számuk drasztikusan csökkent az injekciót követő hosszabb idő folyamán. A korai időpontokban kettős festéssel, X-gal szubsztátum használatával és asztrogliális gliális fibrilláris savanyú protein (GRAP=gliális fibrillary acidid protein) elleni antitest segítségével más fertőzött sejtekről kimutattuk, hogy asztrociták (az eredményeket nem mutatjuk be).

Mindkét beoltott agyi struktúrájánál meggyőző bizonyítékot találtunk arra, hogy néhány fertőzött sejt neuron volt. A substantia nigra esetében a b-gal jelenlétét a dopaminerg sejtekben egy tirozin-hidroxiláz (TH) – a katekolaminerg neuronok klasszikus markere – ellenes antitest használatával tudtuk bizonyítani. Nagyobb nagyítással világosan látszott, hogy a TH antitestekkel jelzett sejtek kék sejtmagot is mutattak. Ezek a sejtek a b-gal-pozitív sejtek körülbelül 50%-át tették ki a fertőzött dopaminerg sejttálmányon belül. A hippocampusban számos jelzett sejtet kétségtelenül mint neuront azonosítottunk mind morfológiai, mind anatómiai jellemzők alapján (1. ábra). Néhány sejtben a festés Golgi-szerű képet mutatott a b-gal diffúziójának eredményeként, és ez az enzim nagyon intenzív expressziójának tudható be. Ezt a mintázatot jórészt a 48. órától számított 1 hétig figyeltük meg. Piramissejteket, szemcsesejteket és hilus interneuronokat (pyramidal neurons, granule cells and hilar interneurons) láttunk a CA1 piramissejtrétegben, a szemcsesejtrétegben és a gyrus dentatus hilusában. Ez utóbbi sejtek könnyen azonosíthatók a hippocampus jellemző sejt szerkezete miatt, amely megkülönböztethetően elkülönített és réteges sejtalcsoportokból áll. Ritkán, hosszú festett nyúlványokat figyeltünk meg a sejtestől több mint 400 µm távolságra, ami ezeknek a sejteknek idegi természetét erősíti meg. Ezenkívül láttuk, hogy több óriás visszeres csomó fut át a hiluson, ami azt jelenti, hogy a puha rostok is jelölődtek.

Mint fent kihangsúlyoztuk, az oltás után 1 vagy 2 hónappal, mindegyik leölt patkánynál a pozitív b-gal sejtek eloszlása és száma jelentősen különbözött a korábbi időpontokban megfigyeltétől. A b-gal-pozitív sejtek eloszlását a gyrus dentatusban az Ad.RSVb-gal adenovírral való oltás után 1 hónappal, X-gal hisztokémiai vizsgálattal értékeltük. Azt találtuk, hogy a beoltott hippocampusban a kékre festődött sejtek a bal oldali gyrus dentatusban koncentráálódtak, összehasonlítva a nem oltott ellenkező oldallal (2. ábra; skálabeosztás 1 mm). A fertőzött sejtek elhelyezkedését a gyrus

dentatusban immunhisztokémiai b-gal kimutatással igazoltuk (festés peroxidáz plusz nikkel használatával). Nagy nagyításban (40×) a gyrus dentatus szemcsesejt rétegében nagy számban sűrűn összezsúfolódott b-gal jelzett sejtmagok voltak láthatók (3. ábra, skálabeosztás 300 μm).

Abból a molekularétegből, amely az oltás után már rövidebb időn belül erősen fertőzött volt, eltávolítottuk a festődött sejteket. Krezil-ibolyával utánpfestett metszeteknél (az adatokat nem mutatjuk be) azt találtuk, hogy a b-gal-pozitív sejtek a szemcsesejtréteg sejtjeivel estek egybe, és pozitív sejteket nem lehetett látni a réteg legfelső részében, amely a kosársejtek nagy részét tartalmazza és kevés gliasejtet. A 2 hónap múlva leölt patkányban a kék színeződés kifejezetten a szemcsesejtrétegben koncentrált.

4. példa

A következőkben ismertetett kísérletek eredményei ugyancsak azt mutatják, hogy az idegsejt eredményesen fertőzhető adenovírusal.

Módszerek:

LacZ gént tartalmazó adenovírus-vektorokat szerkesztettünk már előbb leírt eljárások szerint [lásd előbb, Stratford-Perricaudet et al., (1990)]. Tizenhárom kifejlett Sprague-Dawley-patkányt (Charles River, Franciaország) klorál-hidráttal (400 mg/kg; ip.) érzéstelenítettünk, majd az állatokat sztereotaxis berendezésbe helyeztük. Vírususzpenziót ($3,3 \times 10^{10}$ – 10^{11} pfu/ml) injektáltunk Hamilton-fecskendővel (10 μl, összesen $3,3 \times 10^8$ – 10^9 pfu) 10 percen át a XII. idegmagba (nucleus) (n=6) vagy az előagy különböző területeibe (n=7). Négy napos túlélés után a patkányokat újból érzéstelenítettük, és transzkardiálisan 4%-os paraformaldehiddel – 0,1 M foszfátpufferben, pH 7,4 – perfundáltunk. A központi idegrendszert eltávolítottuk, 4 órán át utófixálást végeztünk, majd 30%-os szacharóiban fagyasztottuk egy éjszakán át. Kriosztátban paraszagittális metszeteket (vastagság: 48 μm) készítettünk. Minden negyedik metszetet 4–12 órán át 28–30 °C-on X-gal színezéssel inkubáltunk, az előzőekben leírtak szerint [J. R. Sanes et al., (1986)]. Három patkánynál az X-gal kezelt metszeteket foszfátpufferben öblítettük, majd a továbbiakban klasszikus immunkémiai technikákkal, Vectastain-készlettel (Vector Labs) kezeltük vagy GFAP elleni nyúl poliklonális antitest (1/500) vagy az OX-42 egér monoklonális antitest használatával, amely specifikusan festi a patkány központi idegrendszerben a mikroglia sejtjeit. A metszeteket zselatinezett tárgylemezre vittük, és minden második metszetet krezil-ibolyával utánpfestettünk mielőtt végül toluolból fedőlemezzel lezártuk.

A 4. ábrán a patkánygyógy különböző sejtpopulációiban a fent említett adenovírus injekció után a b-galaktozidáz hisztokémiai festésének mikrofotói láthatók. Az a. és b. festődést a tizenkettedik (XII.) idegmagba (nucleus) való injekció után figyeltük meg. A XII. nukleuszban gyakorlatilag minden neuron megfertőződött, a festődés minden neuronnyúlványra, beleértve az axonokat (nyíl az a. képen), kiterjedt, és ez „Golgi-

szzerű” megjelenést adott a sejteknek. Néhány fertőzött sejtet asztrocitaként azonosítottunk (nyílhegyek) a barna reakciótermék révén, ami a GFAP-val szembeni immunreaktivitást mutatja. A d. képen egy intraventriculáris injekciót követően, az ependymasejtek (ep) festődése látható. Az a., b. és d. metszeteket krezil-ibolyával utánpfestettük.

Az alábbiakat figyeltük meg.

Az oltás nem okozott látható mellékreakciókat az állat egészségében és viselkedésében az oltás után 60 napig tartó megfigyelés alatt (a leghosszabb vizsgálati idő). Mindegyik esetben a sejtek nagy száma festődött hisztokémiaiilag. Az idegsejtek, beleértve a neuronokat, megfertőződtek (4a. és 4b. ábra), és a gliasejteket asztrocitaként (4c. ábra) vagy mikroglia sejtjeiként (nem láthatók) azonosítottuk a kettős festéssel végzett kísérletekben, specifikus immunkémiai markerek használatával. Ha az injekciók célja a ventrikuláris rendszer volt, az ependymasejtek sokasága fejezte ki a gént (4d. ábra).

Jelzett sejteket az agyparenchimában főként a túnyomtól 500–1000 μm-en belül találtunk. Úgy tűnik, hogy a fertőzött sejteket tartalmazó terület pereme tekintetbe veszi az anatómiai határokat, például a nagyrostos idegpályákat vagy lemezeket (lamellák). Azok az injekciók például, amelyek a XII. nukleuszt (idegmagot) vették célba (4a. és 4b. ábra) gyakorlatilag a nukleuszban belüli összes neuron teljes és intenzív festődését okozták, míg a körülvevő területek csak elszórtan tartalmaztak fertőzött sejteket. Ehhez hasonlóan a kamrába adott injekciók után, több milliméteren keresztül, fertőzött ependymasejteket figyeltünk meg, míg a szomszédos idegszövet egyáltalán nem tartalmazott festődött sejteket (4d. ábra). Valószínű tehát, hogy az injekció helyén a b-galaktozidáz kifejező sejtek topográfiája megfelel a vírus partikukák szöveten belüli korlátozott szóródásának, és az anatómiai határok, így például a nagyrostos idegpályák vagy a glia limitans, megakadályozzák a diffúziójukat.

5. példa

A túnyom körüli festődött sejteken kívül – ahol a vírusrészek endocitózisa hasonló volt a perikariális szinten megfigyelt endocitózishoz – olyan neuroncsoportok is megfertőződtek, amelyek axonnyúlványokat bocsátottak ki az injekciós területre, mint például a substantia nigra neuronjai a striatumba való injekció után (5b. ábra).

Az 5. ábra tulajdonképpen olyan mikrofotókat mutat be, amelyek a striatumba adott adenovírus injekció után b-galaktozidáz hisztokémiai festést mutatnak. A módszerek a 4. példában ismertetett vizsgálatokkal azonosak voltak. (a) Az injekció helyét környező sejtekben lévő reakciótermék. Reakciótermék főként a nukleáris-perinukleáris területen volt látható, és intenzitása a nagyon gyengétől (nyílhegyek) az erősig változott, a substantia nigrában (sn) a neuronokba és a ventrális tegmentális területre (vta=ventral tegmental area) terjed ki, amelyek a virális vektort a striatumból visszafelé szállították (20-szoros nagyítás).

A nigra sejtekben a festődés nukleáris-perinukleáris helyzete, valamint a nigro-striatalis axon pályában az erős festődés hiánya arra mutat, hogy inkább a vírusrészcskéket és nem az enzimet vették fel az axon termináljai, és szállították vissza a striatumból a substantia nigrához. Ezzel szemben nem észleltünk biokémiai festődést azokban a neuronokban, amelyek axonjai kereszték az injekció helyét (de nem végződtek benne), és ebből arra lehetett következtetni, hogy vírusrészcskéket nem kebeleztek be endocitózis révén az átmenő axonok.

6. példa

Az előző eredmények megerősítik, hogy az idegsejtek nagyon erősen fertőződnek adenovírus-sal. Ezt az alábbiak szerint végzett kísérletek is igazolják.

Módszerek: $3,3 \times 10^{10}$ pfu/ml titerű szuszpenziót injektáltunk közvetlenül vagy az oltás előtt fiziológias konyhasóoldattal hígítva 10 patkány agyába. A további módszerek megegyeztek a 4. példában leírtakkal, kivéve, hogy a metszeteket koronális síkban (coronal plane) készítettük.

A különböző hígítású adenovírus-szuszenziók talamuszba való oltása után 1 héttel készített mikrofotók a következő eredményeket mutatják (a metszeteket krezil-ibolyával utánfestettük). (a) $3,3 \times 10^{10}$ pfu/ml vírusszuszpenzióból 10 μ l (összesen $3,3 \times 10^8$ pfu) beoltása után citolitikus hatást figyeltünk meg, továbbá sejtvesztést és gliosis területet (a nyílak a vírus injekció által okozott sejtpusztulást mutatják; 20-szoros nagyítás; X-gal-lal nem kezelt metszet). (b) Összesen $3,3 \times 10^5$ pfu injekciója utáni festődés. Több ezer sejt még mindig kifejezi a gént, ezek főként nukleáris-perinukleáris festést mutatnak, kivéve néhány rövid neurit (nyílhegy). Nem látható citolitikus hatás. (200-szoros nagyítás). (c) $3,3 \times 10^3$ pfu injekciója utáni festődés. Kevés sejt még mindig kifejezi a gént (nyílhegyek) egy kis területen, amely megfelel a tühegynyomnak. Nincs nyilvánvaló citolitikus hatás (400-szoros nagyítás).

Magas titerű vírusszuszpenziókkal való oltás után a sejtek jelentékeny része fertőződött, de sok sejt fertőződött akkor is, ha sokkal alacsonyabb titereket használtunk. Azokban a patkányokban, amelyeket 10 μ l $3,3 \times 10^7$ pfu/ml titerű (maximálisan $3,3 \times 10^5$ fertőző részcské) szuszpenzióval oltottunk, több ezer idegsejt fejezte ki a LacZ gént még 8 nappal az oltás után is (6b. ábra); alacsony, mintegy 3300 pfu titerű injekciók közel 100 sejt festődését eredményezték (6c. ábra). A jelzés intenzitása egy másik bizonyítéka az idegsejtek kiváló fertőzőképességének. Amikor magas titerű vírusszuszpenziót használtunk (10^9 pfu/ml titernél magasabbat), a festődés intenzitása rendszerint nagyon erős volt az injekció helye körüli területen, ahol a sejtek a vírusrészcskék legnagyobb koncentrációjával érintkeztek. A b-galaktózidázhoz adott nls-szekvencia ellenére a jelzés olyan intenzív volt, hogy az nemcsak az egyes sejtek magjára korlátozódott, hanem bediffundált a citoplazmába és a nyúlványokba (például a neuronok dendriteibe és axonjaiba), ami a sejtek teljes „Golgi-szerű” festődését okozta (6a., b. és 5a. ábra). Ez-

zel szemben, az injekció helyének peremén elhelyezkedő legtöbb sejtben és a retrográd módon fertőződött sejtekben csak a nukleuszok voltak jelzettek (5a., b. ábra). Hasonlóan, az enzim magban való elhelyezkedése volt az általános, ha alacsony titerű vírusszuszpenziókat alkalmaztunk (6b., c. ábra).

Egyetlen idegsejt – különösen egy neuron – masszív mennyiségű vírusrészcskét képes endocitózis révén bekebelezni. Ez a nagyfokú fertőzőképesség a legvalószínűbb magyarázat a citopatogenitásra (neuronpusztulás, gliózis, vaszkuláris gyulladásos válasz és szövetszerveség jellemzi), amelyet a magas titerű szuszpenziók oltásakor az injekció helyén megfigyeltünk (6a. ábra). Az alacsony titerű vírusszuszpenzióknál a citopatogenitás nyilvánvaló hiánya ($\leq 10^7$ pfu/ml) alátámasztja ezt a feltevést. Nagyon valószínű tehát, hogy a citopatogenitás az injekció helyéhez egészen közel elhelyezkedő sejtek által endocitózissal bekebelezett roppant mennyiségű vírusrészcskével függ össze.

7. példa

Az adenovírus-fertőzésnek nincs szisztémás citopátiás hatása, ugyanis az oltás után 45 nappal még jól működő, LacZ gént kifejező idegsejteket figyeltünk meg. Kilenc patkányt oltottunk be, és az injekció után minden második héten leoltunk ($n=3$) egyet. A 4. példában leírt sebészeti és szövettani módszereket alkalmaztuk, kivéve, hogy a metszeteket a koronális síkban készítettük. A mikrofotók b-galaktózidáz hisztokémiai rakcióterméket mutattak egy olyan patkányban, amelyet 45 napig élve hagytunk a XII. idegmagba (XII.) adott adenovírus injekció után. Néhány sejtben még kifejeződött a gén, amint ezt a nukleáris-perinukleáris hisztokémiai festődés kimutatta. Ezek között voltak motoneuronok is, ahogy ezt a 7. ábra szélén lévő kisebb kép szemlélteti (krezil-ibolyával utánfestve). Néhány axon is tartalmazott enzimet (nyíl) (a 7. ábra 40-szeres nagyítású, a betétkép 1000-szeres nagyítású).

Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a központi idegrendszer sejtjeibe; köztük a neuronokba, eredményesen lehet nagyszámú replikációhiányos adenovírust beoltani, amely ezután kifejezi az átvitt idegen gént.

A találmány kihatása a génterápiára jelentős. Jóllehet a találmány, mint előbb említettük, arra törekszik, hogy arra az esetre, amikor egy betegbe, akinek a sejtjei genetikailag hibás gént hordoznak, és az említett genetikai hiba kompenzálására főként embrióból származó nukleinsavszekvenciát tartalmazó teljes idegsejteket ültetnek át, egy más megoldást biztosítson, magától értendő, hogy az ilyen átültetési technikákra a továbbiakban még lehet találni tökéletesebb megoldást. Pontosabban, az átültetendő sejteket fel lehet „dúsítani” a kívánt nukleinsavszekvenciával, vagy el lehet látni ezekkel úgy, hogy a sejteket in vitro transzformáljuk egy, a kívánt nukleinsavszekvenciát tartalmazó adenovírus-vektorral, még mielőtt ezeket a sejteket a sejterápiában már használt technikáknak megfelelően átültetnénk. Ez a tökéletesítés különösen jelentős lehet olyan neuronok primer tenyészteteinek esetében, amelyek nem mentek át változáson.

8. példa

Ez a példa a humán tirozin-hidroxiláz (hTH) cDNS-t kifejező rekombináns hibás adenovirális vektor – AdLTR.hTH – szerkesztését ismerteti.

Az AdLTR.hTH adenovírus szerkesztésénél úgy jártunk el, hogy 293 sejteket pLTR-IX-hTH plazmiddal és Ad-d11324 adenovírus deléciós mutánsal [Thim-mappaya et al., Cell, 31, 543 (1982)] kotranszfektáltunk.

1. A pLTR-IX-hTH plazmid szerkesztése.

A pLTR-IX-hTH plazmidot úgy szerkesztettük, hogy a hTH-1 cDNS-t tartalmazó pSP6 HTH-1 [Horellou et al.; J. Neurochem., 51, 652 (1988)] 1769 bp méretű SalI-BstXI fragmentumát beépítettük a pLTR-IX plazmid egyetlen SalI helye és EcoRV helye közé az RSVLTR promoterhez képest 3' irányban. A beépítés érdekében a BstXI restrikciós helyet T4 DNS-polimeráz segítségével tompa végűvé alakítottuk.

A pLTR-IX plazmidot a pLTR β -gal plazmidból [Stratford-Perricaudet et al.; J. Clin. Invest., 90, 626 (1992)] úgy kaptuk, hogy a β -gal gént tartalmazó ClaI-XhoI helyet töröltük, Klenow-enzimmal emésztettük, és T4 DNS-ligázzal ligáltuk.

2. Az AdLTR.hTH hibás rekombináns adenovírus szerkesztése.

A pLTR-IX-hTH plazmidot és az Ad-d11324 adenovírus deléciós mutáns Clal-gyel linearizáltuk, és ezekkel kotranszfektáltuk a 293 sejtvonalat kalcium-foszfat jelenlétében, ami a homológ rekombinációt segíti elő. Rekombináció után az adenovírusokat szelektáltuk, a 293 sejtvonalban elszaporítottuk, és cézium-kloridos centrifugálással izoláltuk [Graham et al.; Virology, 52, 456 (1973)].

9. példa

Ebben a példában a hTH in vitro és in vivo termelését ismertetjük AdLTR.hTH adenovírus használatával.

9.1. A hTH in vitro termelése.

A 8. példa szerinti AdLTR.hTH adenovírus rekombináns vektort használtuk a 293 sejtvonal fertőzéséhez. A fertőzés után 24–48 órával a tenyészetet lecentrifugáltuk (1000 fordulat/perc; 5 perc), és az így kapott sejttöredéket használtuk a TH enzimaktivitás in vitro meghatározásához (a) és Western-analíziséhez (b).

(a) TH enzimaktivitás meghatározása.

A TH enzimaktivitást a Reinhard és munkatársai [Life Sci., 39, 2185 (1986)] által módosított módszerrel határoztuk meg. A lefagyasztott sejttöredéket 30 másodpercig ultrahanggal kezeljük jég hideg 0,2%/100 mM NaHEPES-pufferben (pH 6,99), majd centrifugáljuk (10 000 g; 10 perc). A felülúszó egy részét (10 μ l) használjuk TH-aktivitás-vizsgálathoz, amikor is 100 μ l reakcióelegyben [100 mM NaHEPES, pH 6,99, 50 μ g kataláz (Sigma), 25 μ M L-tirozin (szabad bázis; Sigma), 0,2 μ Ci L-[3,5-³H]tirozin (Amersham), 1 mM vas(II)-szulfát, 0,5 mM DL-6-metil-5,6,7,8-tetrahidropterin, 5 mM ditiotritol] való inkubálás (10 perc; 37 °C) alatt az L-[3,5-³H]tirozinból felszabaduló ³H₂O mennyiségét mérjük. A reakciót 1 ml 7,5%-os (tömeg/térfogat) aktív szén (Sigma) – 1 M sósavban – hozzáadásával ál-

lítjuk le. A keveréket ezután Vortex-keverővel homogenizáljuk (3 másodperc), majd centrifugáljuk (10 000 g; 10 perc). A felülúszóból 100 μ l alikvot mennyiségeket mérünk 10 ml szcintillációs koktélt (aqueous counting scintillant; Amersham) tartalmazó szcintillációs fiolákba, a képződött ³H₂O mennyiségének mérése céljából. L-tirozin törzsoldat készítéséhez az L-[3,5-³H]tirozint először vákuumban (speed-vacuum) szárítjuk a ³H₂O szennyezés eltávolítására, mielőtt hozzáadunk 500 μ l 500 mM hideg L-tirozint. Az eredményeket az 1 mg proteinből 1 óra alatt a [³H]tirozin hidroxilezése révén képződött ³H₂O mennyiségével adjuk meg, pM-ban kifejezve. A protein mennyiségi meghatározását Bradford és munkatársai módszere szerint végezzük.

Ez a vizsgálat azt mutatja, hogy az Ad.LTR.hTH-val fertőzött 293 sejtek olyan TH-aktivitást fejtenek ki, amely 5 μ M DOPA/óra/mg protein képzésére képes, míg a nem fertőzött 293 sejteknek nincs TH-aktivitása.

(b) Western-analízis.

A Western-alanízist úgy végezzük, hogy a proteinkivonatokat SDS-PAGE (10% akrilamid) gélre visszük, és az elvándorolt proteint nitrocellulóz membránra visszük át. A nitro-cellulóz membránokat 48 órán át 4 °C-on 1:1000 hígítású anti-TH szérummal (Institut Jacques Boy) inkubáljuk. A hígítást 2% NS/0,05 Triton X-100-tartalmú PBS-sel végezzük (NS=normál szérum). Háromszori öblítés után a membránokat 2,5 órán át PBS/0,0% Triton X-100/2 NS oldattal 1:50-re hígított sertés antinyúl-IgG-vel (Dakopatts, Dánia) inkubáljuk. További háromszori öblítés után a membránokat 0,05 Triton X-100-tartalmú PBS-sel százszorosára hígított nyúlperoxidáz-antiperoxidázzal (Dakopatts) inkubáljuk, majd 3,4-diamino-benzidinnel (Sigma) és hidrogén-peroxiddal festjük. Ezután mikroszkópos analízishez készítjük elő.

Az Ad.LTR.hTH-val fertőzött 293 sejtekben az anti-TH antitestek egy, a TH molekulatömegének megfelelő 62 kD sávot mutattak ki, ugyanakkor a nem fertőzött 293 sejtekben sáv nem mutatkozott.

9.2. hTH-termelés in vivo.

Fiatal, kifejlett nőstény Sprague-Dawley-patkányokat (ALAB, Stockholm, Svédország) használtunk minden kísérletben. Equithesin anesztézia alatt (3 ml/kg ip.) sztereotaxis berendezésben (agycélzó készülék) 12 patkányba a jobb leszálló meostriális DA pályába 6-OHDA-t injektáltunk.

A forgási viselkedést először a 6-OHDA okozta léziót követően 10 nap múlva monitoroztuk, apomorfín vagy d-amfetamin alkalmazása után. A motor aszimmetriát d-amfetamin (5 mg/kg ip.) injekció vagy apomorfín-hidroklorid (0,05 mg/kg, s. c. a nyakba) injekció után automata forgórudas készülékben (Ugerstedt and Arbuthnott, 1970) 40 percig monitoroztuk. A 6-OHDA lézió után 11 nap múlva Ad.LTR.hTH (6 patkány) vagy Ad.RSV β -gal (6 patkány kontrollként) rekombináns adenovírus-vektort injektáltunk a striatumba, 3 különböző helyre (injekciónként 3 μ l-ben 10⁷ pfu). A forgási viselkedés (lásd előbb) vizsgálatát és a szövettani vizsgálatot a 20. és 27. napon végeztük. Az eredmények a következők.

– Az Ad.LTR.hTH nem volt toxikus a patkányokra (a dopaminreceptor működőképes maradt);

– Az Ad.LTR.hTH-val oltott patkányok TH-proteint termeltek, amit immunológiai reaktivitásuk bizonyított: az agyakat 100 mM kálium-foszfát-tartalmú 20%-os szacharózoldatba merítettük 1–2 napig, ezután 40 µm vastag metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotommal. Minden harmadik metszetet krezil-ibolyával festettünk meg, és a szomszédos metszetet a TH immunkémiai vizsgálatához készítettük elő egy előző leírás (Doucet et al, 1990) szerint. Röviden kifejtve, foszfáttal pufferolt konyhasóoldattal (PBS végzett 3–4-szeri öblítés után az úsztatott metszeteket 1 órán át 10% normál sertésszérumot (NSS=normal seine serum) és 0,5% Triton X–100-at tartalmazó PBS-ben előinkubáltunk, majd ezután 1000-szeresre hígított anti-TH szérummal (Institut Jaques Boy) inkubáltuk. (A hígítást 5% NSS és 0,5% Triton X–100-tartalmú PBS-sel végeztük). Háromszori öblítés után a metszeteket 2,5 órán át 50-szeresére hígított sertés-antinyúl-IgG-vel (Dakopatts, Dánia) inkubáltuk. (A hígítást 0,5% Triton X–100 és 5% NSS-tartalmú PBS-sel végeztük). Újbóli háromszori öblítés után a metszeteket Triton X–100-at tartalmazó PBS-sel 1:100 hígítású nyúlperoxidáz-anti-peroxidázzal (Dakopatts) inkubáltuk, majd 3,4-diaminobenzidinnel (Sigma) és hidrogén-peroxiddal kezeltük, végül tárgylemezre montíroztuk.

– Az Ad.LTR.hTH-val oltott patkányok forgási viselkedése volt jobb, ami az Ad.LTR.hTH injekció jótékony hatását igazolta.

10. példa

Ebben a példában az Ad.LTR.CNTF rekombináns hibás adenovirális vektor szerkesztését ismertetjük, amely az egérfélék ciliáris neurotrof faktorát (murine ciliary neurotrophic factor=CNF) fejezi ki.

Az Ad.LTR.CNTF adenovírust úgy szerkesztettük, hogy 293 sejteket a pLTR–IX–CNTF plazmiddal és az Ad–d11324 adenovírus deléciós mutánssal [Thimmappaya et al.; Cell, 31, 543 (1982)] kotranszfektáltuk.

1. A pLTR–IX–CNTF plazmid szerkesztése.

A pLTR–IX–CNTF plazmid szerkesztésénél úgy jártunk el, hogy az egér CNTF cDNS-t (exon 1 és 2, intron 1) és az NGF vezérszekvenciát tartalmazó pRC.CMV.CNTF plazmid [Sendtner et al., Nature, 358, 502 (1992)] 1800 bp méretű HindIII–XbaI fragmentumát beépítettük a pLTR–IX plazmid egyetlen EcoRV helyére, az RSVLTR promoterhez képest 3' irányban. A beépítéshez az 1800 bp hosszú HindIII–XbaI fragmentumot tompa végűvé alakítottuk Klenow-DNS-polimeráz segítségével.

Az LTR–IX plazmidot a pLTRβ-gal plazmidból [Stratford–Perricaudet et al.; J. Clin. Invest., 90, 626 (1992)] kaptuk, a β-gal gént hordozó ClaI–XhoI fragmentum törlése, továbbá Klenow-enzimmal való emésztés és T4 DNS-ligázzal végzett ligálás révén.

2. Az Ad.LTR.CNTF hibás rekombináns adenovírus szerkesztése.

293 sejtvonalat kotranszfektáltunk EagI-gyel lineáris pLTR–IX–CNTF DNS-sel és ClaI-gyel linearizált

Ad–d11324 adenovírus deléciós mutánssal kalcium-foszfát jelenlétében, ami a homológ rekombinációt segíti elő. Rekombináció után az adenovírusokat szelektáltuk, a 293 sejtvonalban elszaporítottuk, és cézium-kloridos centrifugálással izoláltuk [Graham et al.; Virology, 52, 456 (1973)].

11. példa

A példa a hexóزامинидáz A a-láncát kódoló cDNS-t tartalmazó Ad.LTR.HEXA rekombináns hibás adenovirális vektor szerkesztésének leírását tartalmazza. A HEXA génben lévő genetikai hibák felelősek a Tay–Sachs lizoszómális szindrómáért.

Az Ad.LTR.HEXA adenovírus szerkesztésekor úgy jártunk el, hogy 293 sejteket pLTR–IX–HEXA plazmiddal és ad–d11324 adenovírus deléciós mutánssal [Thimmappaya et al.; Cell, 31, 543 (1982)] kotranszfektáltuk.

1. A pLTR–IX–HEXA plazmid szerkesztése.

A pLTR–IX–HEXA plazmidot úgy szerkesztettük, hogy az lgt máj cDNS-tár szűrése révén kapott hexóزامинидáz A a-láncát kódoló cDNS-t [lásd még: Proia et al.; J. Biol. Chem., 262, 5677 (1987)] tartalmazó egy 2000 bp hosszú EcoRI fragmentumot beépítettünk a pLTR–IX plazmid egyetlen EcoRV helyére, az RSVLTR promoterhez viszonyítva 3' irányban. Ehhez a beépítéshez a 2000 bp méretű fragmentumot tompa végűvé alakítottuk T4 DNS-polimeráz segítségével.

A pLTR–IX plazmidot a pLTRβ-gal plazmidból [Stratford–Perricaudet et al.; J. Clin. Invest., 90, 626 (1992)] kaptuk egy, a β-gal gént hordozó ClaI–XhoI fragmentum törlése révén, valamint Klenow-enzimes emésztés és T4 DNS-ligázzal való ligálás segítségével.

2. Az Ad.LTR.HEXA hibás rekombináns adenovírus szerkesztése.

A sejtvonalat AseI-gyel linearizált pLTR–IX–HEXA DNS-sel és ClaI-gyel linearizált Ad–d11324 adenovírus deléciós mutánssal kotranszfektáltuk kalcium-foszfát jelenlétében, amely elősegíti a homológ rekombinációt. Rekombináció után az adenovírust szelektáltuk, 293 sejtvonalban elszaporítottuk, és cézium-kloridos centrifugálással izoláltuk [Graham et al.; Virology, 52, 456 (1973)].

12. példa

Ez a példa az egérfélék idegnövekedési faktor (mNGF= murine Nerve Growth Factor) cDNS-ét (Prepro NGF) kifejező AdLTR.NGF rekombináns hibás adenovirális vektor szerkesztését tartalmazza.

Az Ad.LTR.NGF adenovírust úgy szerkesztettük, hogy a 293 sejteket a pLTR–IX–NGF plazmiddal és az Ad–d11324 adenovírus deléciós mutánssal [Thimmappaya et al.; Cell, 31, 543 (1982)] kotranszfektáltuk.

1. A pLTR–IX–NGF plazmid szerkesztése.

A pLTR–IX–NGF plazmid szerkesztését úgy végeztük, hogy egy Prepro NGF cDNS-t tartalmazó 1 kb méretű EcoRI–PstI fragmentumot beépítettünk a Bluescript plazmid (Stratagene) megfelelő helyére. E cDNS-t ezután mint ClaI–BamHI fragmentumot izoláltuk, a fragmentumot Klenow-enzimmal tompa végűvé

konvertáltuk, és beépítettük a pLTR-IX plazmid egyetlen ClaI és EcoRV helye közé, az RSVLTR promoterhez viszonyítva 3'-irányban.

A pLTR-IX plazmidot a pLTR β -gal plazmidból [Stratford-Perricaudet et al.; J. Clin. Invest., 90, 626 (1992)] kaptuk a β -gal gént hordozó ClaI-XhoI fragmentum törlése révén, továbbá Klenow-enzimmel való emésztés és T4 DNS-ligázzal végzett ligálás révén.

2. Az Ad.LTR.NGF hibás rekombináns adenovírus szerkesztése.

A pLTR-IX-NGF plazmidot és az Ad-d11324 deletió mutáns adenovírust ClaI-gyel linearizáltuk, és ezekkel kotranszfektáltuk a 293 sejtvonalat kalciumfoszfát jelenlétében, ami elősegíti a homológ rekombinációt. Rekombináció után az adenovírust szelektáltuk, 293 sejtvonalban elszaporítottuk, és cézium-kloridos centrifugálással izoláltuk [Graham et al.; Virology, 52, 456 (1973)].

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Rekombináns adenovirális DNS-vektor géneknek a központi idegrendszer sejtjeibe, különösen az agy sejtjeibe történő bejuttatására és az említett sejtekben való expresszáására, *azzal jellemezve*, hogy tartalmaz

(i) legalább egy részt egy adenovírus genomjából, beleértve azokat a régiókat, amelyek ezen adenovírral normál körülmények között megfertőzhető sejtekbe történő behatoláshoz szükségesek, és

(ii) egy kiválasztott nukleotidszekvenciát, mely az adenovírus genomjának említett részébe van beépítve egy, az említett sejtekben működőképes promoter szabályozása alá, amely vagy jelen van az említett genomrészben, vagy abba be van építve,

ahol a nukleotidszekvencia transzkripció vagy expresszió terméke a központi idegrendszer sejtjeire fejt ki hatását vagy ezekben a sejtekben termelődik.

2. Az 1. igénypont szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy olyan hibás adenovírus, amely az adenovirális genomból minden olyan szekvenciát tartalmaz, amely az ilyen adenovírral megfertőzött sejtekben az adenovírus kapszidképzéséhez szükséges.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy hiányzik az E1a és E1b régió, és adott esetben az adenovírus genom E3 régiója.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a promoter az adenovirális genomra nézve exogén.

5. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a promoter képes a nukleotidszekvencia expresszióját a neurális sejtek még specifikusabb osztályaiba irányítani.

6. Az 5. igénypont szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a promoter neuron-, glia- vagy endoteliális sejtek promoter.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a promoter képes a nukleotidszekvencia expresszióját az agyba és a gerincvelő-

sejtekbe, különösen a neuron-, glia- vagy endoteliális sejtekbe irányítani.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia egy neurotranszmittert vagy egy neurotranszmitter-szintetizáló enzimet, vagy az említett neurotranszmitter vagy neurotranszmitter-enzim egy részét kódolja, amely olyan aktivitást fejt ki, mint az említett neurotranszmitter vagy neurotranszmitter-szintetizáló enzim.

9. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia egy transzmitter-prekurzort vagy ennek egy részét kódolja, melynek biológiai aktivitása megegyezik az említett prekursoréval.

10. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia egy trofikus faktort vagy ennek egy részét kódolja, melynek biológiai aktivitása megegyezik az említett trofikus faktoréval.

11. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia egy növekedési faktort vagy ennek egy részét kódolja, amelynek tulajdonságai megegyeznek az említett növekedési faktor tulajdonságaival.

12. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia egy antiszensz szekvencia.

13. A 12. igénypont szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia egy olyan antiszensz szekvencia, amelynek transzkripció terméke azoknak a toxikus proteineknek, beleértve a prionokat, kinázokat, TAU proteinek és β -amyloidot, vagy enzimeknek a blokkolására képes, amelyek az említett toxikus proteinek vagy glutamátok bioszintézisben részt vesznek.

14. A 12. igénypont szerinti rekombináns vektor, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvencia képes olyan antiszensz RNS-sé vagy antiszensz oligonukleotiddá átíródni, amelyek egy kiválasztott messzendező RNS-sel kölcsönhatást tudnak létesíteni.

15. Gyógyszerkészítmény, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektort tartalmaz a gyógyszergyártásban elfogadott segédanyagokkal együtt.

16. A 15. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, *azzal jellemezve*, hogy a központi idegrendszer rendelkezésére alkalmas formában van.

17. Eljárás egy, az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy kiválasztott nukleotidszekvenciát beépítünk egy adenovírus genomjának legalább egy részébe – amely tartalmazza azokat a régiókat, amelyek ezen adenovírral normál körülmények között megfertőzhető sejtekbe történő behatoláshoz szükségesek – egy promoter szabályozása alá, amely vagy jelen van az említett genomrészben vagy abba be van építve, ahol a nukleotidszekvencia transzkripció vagy expresszió terméke a központi idegrendszer sejtjeire fejt ki hatását, vagy ezekben a sejtekben termelődik.

18. Eljárás gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 17. igénypont szerinti eljárással előállított rekombináns vektort egy gyógyszer-gyártásban elfogadható segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

19. Eljárás rekombináns polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy olyan idegsejteket tenyésztünk, amelyek egy, az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti vektort tartalmaznak, és e vektorban a kiválasztott nukleotidszekvencia az előállítandó polipeptidet kódolja.

20. Módszer egy promoter hatékonyságának vagy működőképességének kimutatására valamely idegsejt-populáció egy részében vagy minden sejtjében, *azzal jellemezve*, hogy

– megfertőzzük az említett idegsejt-populációt egy rekombináns adenovirális vektorral, amely vektor a megfelelő adenovírus azon szakaszait tartalmazza, amelyek az adenovírus által normálkörülmények között megfertőzhető sejtekbe való behatoláshoz szükséges genetikai információval rendelkeznek; a vektor tartalmaz továbbá egy markert kódoló nukleotidszekvenciát beépítve az adenovírus említett szakaszába; és a vizsgált promotert is genetikai szerkesztéssel építjük be a rekombináns vektorba oly módon, hogy az említett nukleotidszekvencia a promoter szabályozása alá kerüljön; és

– kimutatjuk a megfertőzött idegsejt-populációból azokat a sejteket, amelyekben a marker expressziója megtörténik.

21. Patológias állatmodell, *azzal jellemezve*, hogy egy nem emberszabású állatot foglal magában, amelynek idegsejtjei vagy ezek közül legalább néhány sejt egy, 1–14. igénypont szerinti rekombináns vektort tartalmaz, melyet az állatba vagy egy ősébe bevezettünk.

22. A 21. igénypont szerinti patológiás állatmodell, *azzal jellemezve*, hogy neurodegeneratív betegségek modellje.

23. Központi idegrendszer egy sejtpopulációja, főként agy- vagy gerincvelősejtek, elsősorban ideg-, glia- vagy endymasejtek, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1–14. igénypont szerinti rekombináns vektorral transzformált.

24. A 23. igénypont szerinti sejtpopuláció, *azzal jellemezve*, hogy alkalmas formában van ahhoz, hogy egy gazdaszervezetbe – főként abba, amelyből származik – átültessük.

25. Eljárás terápiás értékű protein vagy polipeptid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 23. igénypontban meghatározott sejtpopulációt – ahol a rekombináns vektorban a kiválasztott nukleotidszekvencia az előállítandó proteint vagy polipeptidet kódolja – tenyésztjük.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kiválasztott nukleotidszekvencia a 8–11. igénypontok bármelyikében meghatározott.

27. Az 1. igénypont szerinti rekombináns adenovirális vektor, *azzal jellemezve*, hogy a vektor egy replikációhiányos rekombináns adenovírus.

28. A 27. igénypont szerinti vektor, *azzal jellemezve*, hogy a kiválasztott nukleotidszekvencia a humán tirozin-hidroxiláz gént kódolja.

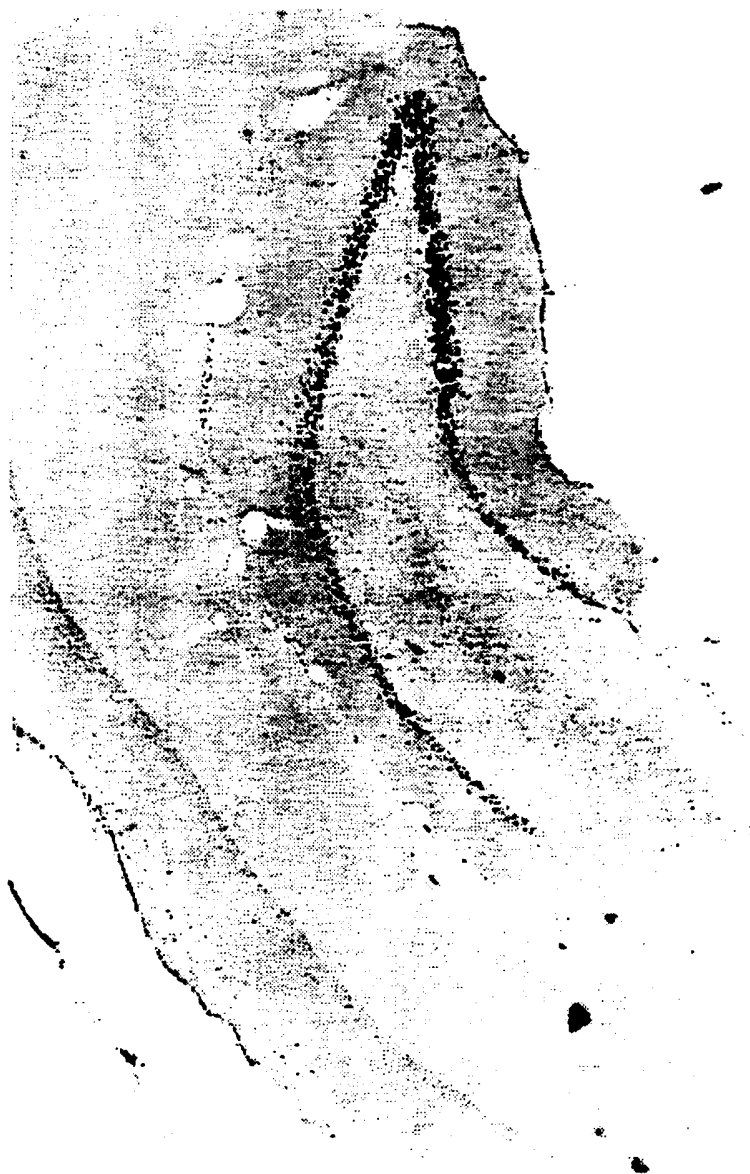
29. A 27. igénypont szerinti vektor, *azzal jellemezve*, hogy a kiválasztott nukleotidszekvencia a CNTF gént kódolja.

30. A 27. igénypont szerinti vektor, *azzal jellemezve*, hogy a kiválasztott nukleotidszekvencia a HEXA gént kódolja.

31. A 27. igénypont szerinti vektor, *azzal jellemezve*, hogy a kiválasztott nukleotidszekvencia az NFG gént kódolja.



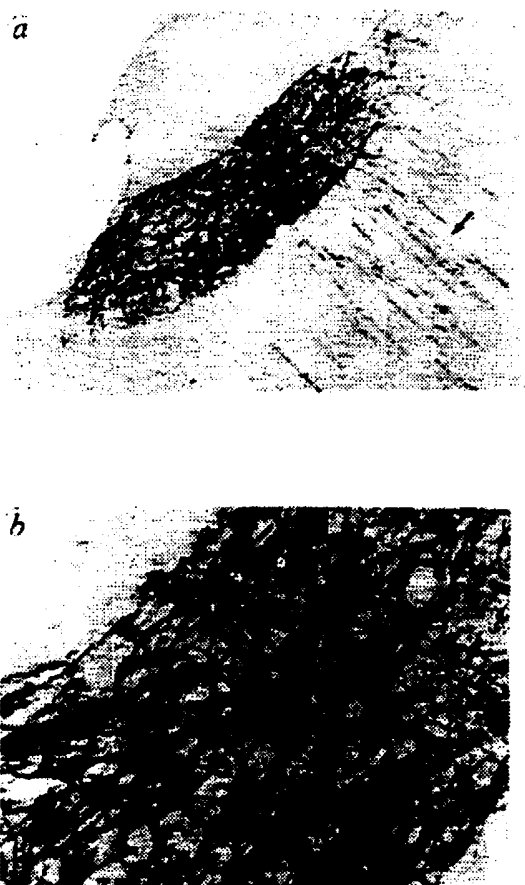
1. ábra



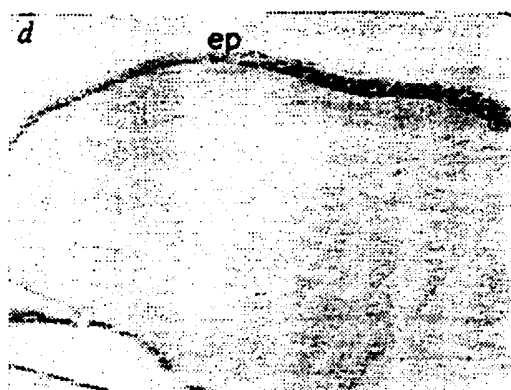
2. ábra



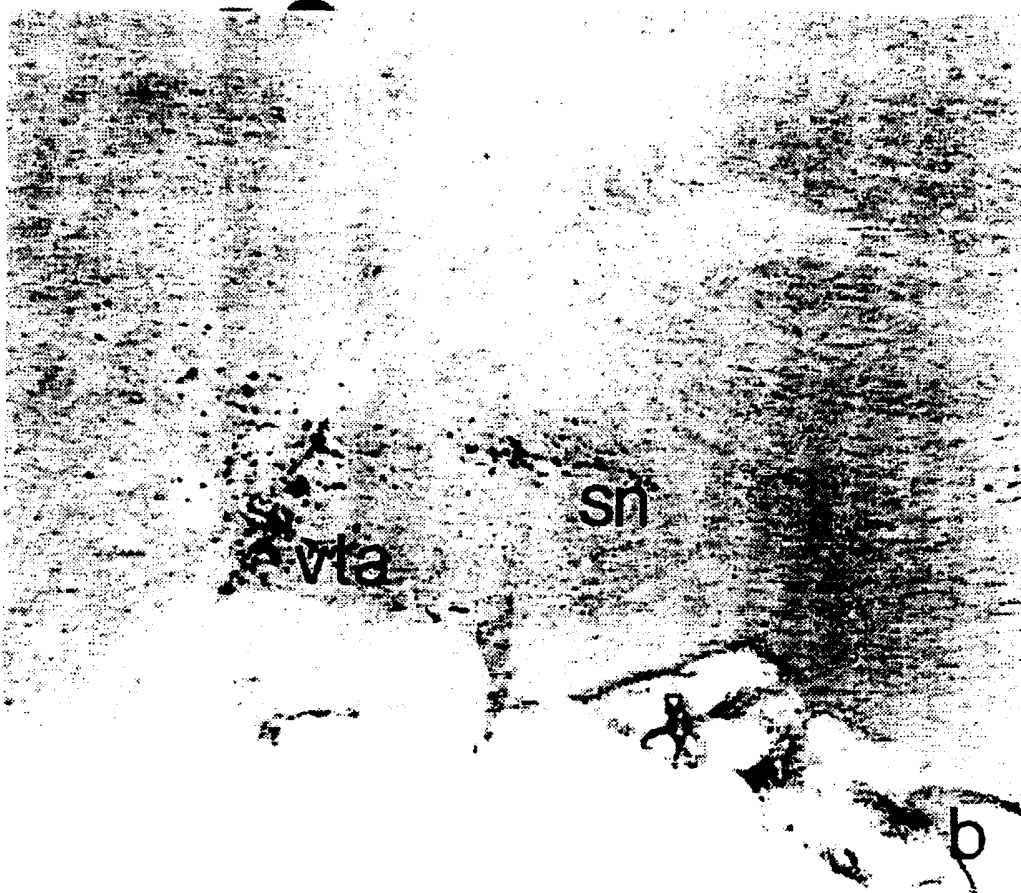
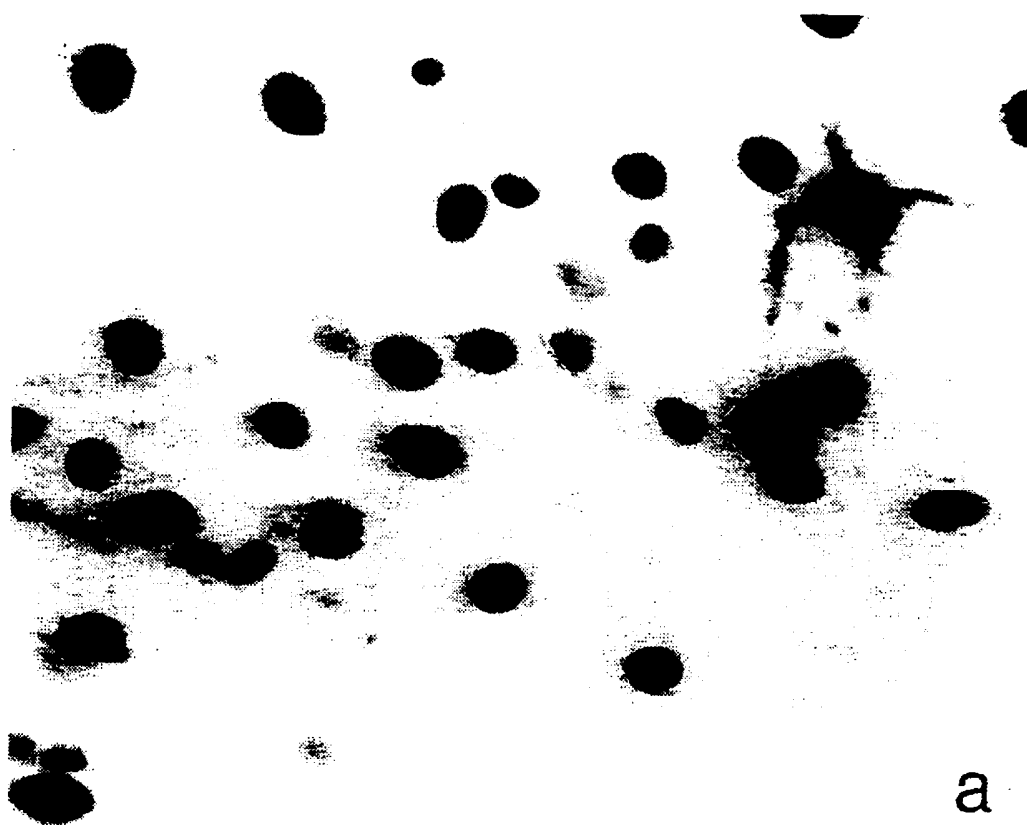
3. ábra



4. ábra



4. ábra (folytatás)



5. ábra



6. ábra



7. ábra