

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

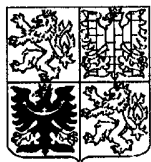
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2915-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12. 03. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.03.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9603207**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 12. 97**

(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/FR97/00435**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/34009**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 12 N	15/86
C 12 N	5/10
C 12 N	15/12
C 07 K	14/705
A 61 K	48/00
A 61 K	39/00

(71) Přihlašovatel:

RHONE-POULENC RORER S. A., Antony,

FR;

LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER

RESEARCH, London, GB;

(72) Původce:

Boon Falleur, Bruxelles, BE;

Duffour Marie-Thérèse, Paris, FR;

Haddada Hedi, Alfortville, FR;

Lurquin Christophe, Kraainem, BE;

Perricaudet Michel, Ecrosnes, FR;

Uyttenhoveghesquiere Catherine,

Chaumont-Gistoux, BE;

Warnier Guy, Linkebeek, BE;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,

17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob ošetření lidských nádorů genovou
terapií a odpovídající rekombinantní viry**

(57) Anotace:

Defektní rekombinantní viry, které nesou sekvenci kódující specifický antigen lidského nádoru, a jejich použití pro prevenci nebo léčbu lidských nádorů stejně jako vytvoření in vitro nebo ex vivo specifických CTL. Farmaceutické kompozice, které obsahují tento virus, zejména ve formě injektovatelné.

CZ 2915-98 A3

Způsob ošetření lidských nádorů genovou terapií a odpovídající rekombinantní viry

Oblast techniky

Předložený vynález se týká metody léčení lidských nádorů genovou terapií. Týká se zejména defektních rekombinantních virů nesoucích sekvenci kódující specifický antigen lidských nádorů a jejich použití pro preventivní nebo kurativní léčení lidských nádorů, stejně jako pro vytvoření specifických CTL in vitro nebo ex vivo. Týká se také farmaceutických kompozic těchto virů zejména v injektovatelné formě.

Dosavadní stav techniky

Genová terapie spočívá v opravě snížení schopnosti nebo anomálie vložení genetické informace do buňky nebo do postiženého orgánu. Tato informace může být vložena, buď in vitro do buněčného extraktu orgánu a potom reinjektována do organismu, nebo in vivo přímo do postižené tkáně. Co se týče molekul s vysokou molekulovou hmotností a s negativním nábojem, DNA obtížně spontánně přechází přes fosfolipidovou buněčnou membránu. Používají se tedy různé vektory, aby umožnily přenos genu: používají se jednak virové vektory, jednak chemické vektory nebo/a biochemické, přírodní nebo syntetické. Chemické vektory nebo/a biochemické vektory jsou například kationty (fosforečnan vápenatý, DEAE-dextran, ...), které působí vytvořením sraženiny s DNA, která může být fagocitována buňkami. Může se také jednat o lipozomy do kterých je DNA zahrnuta, a která fúzuje s plazmidovou membránou. Syntetické vektory pro přenos genů jsou všeobecně lipidy nebo kationické polymery, které vytvářejí komplex s DNA a tvoří s ní částice nesoucí na povrchu pozitivní náboj.

Tyto částice jsou schopné interagovat s negativním nábojem buněčné membrány a potom jsou schopné projít buněčnou membránou. Jako příklad se mohou uvést vektory dioktadekylamidoglycylspermin (DOGS, Transfectam™) nebo N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamonium chlorid (DOTMA, Lipofectin TM). Byly také vyvinuty chiméřní proteiny: jsou tvořeny polykationickou částí, která kondenzuje DNA, vázanou k ligandu, který se fixuje na membránovém receptoru a odnáší komplex do buněk endocytosou. Je teoreticky možné zacílit tkáň nebo určitou buněčnou populaci ke zvýšení biodisponibility přenášeného genu in vivo (viz Behr, 1993, Cotten et Wagner, 1993). Mezi potencionálně použitelnými viry jako vektory pro přenos genů se mohou uvést zejména retroviry (RSV, HMS, MMS, atd.) virus HSV, adeno associated virusch a adenoviry. Tyto viry byly použity pro infikování různých buněčných typů.

Byly vyvinuty přístupy genové terapie pro léčení různých typů patologií, včetně poruch nervového systému, kardiovaskulární nemocí nebo rakovin. Co se týče zejména oblasti rakovin, byly navrženy různé přístupy ve vedlejších oborech. Studie popisují použití lymfocytů ex vivo kultivací v přítomnosti 2-interleukinu nebo transfekcí s genem 2-interleukinu. Přijaté imunoterapeutické studie byly také založeny na purifikovaných monocytes makrofágů, které byly aktivovány ex vivo interferonem pro zvýšení jejich tumorocidní schopnosti, potom reinjektovány pacientu (Anderssen et al., Cancer Res. 50 (1990) 7450). Byla také popsána možnost použití geneticky modifikovaných makrofágů (W095/06120). Další série přístupů je založena na přenosu toxických genů schopných způsobit přímo nebo nepřímo smrt rakovinových buněk. Tento typ přístupu byl popsán například s genem thymidin-kinasy přenesené in vivo buď adenovirovým vektorem (PCT/FR94/01284, PCT/FR94/01285) nebo štěpováním buněk produkujících retrovirální vektor (Caruso et al., PNAS 90 (1993) 7024). Další použité geny jsou například gen

cytosindeaminasy.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se vztahuje k nové metodě léčení rakovin. Tato metoda je zaměřena na léčení lidských nádorů, zejména melanomů. Metoda podle vynálezu je založena na přenosu a expresi in vivo specifických antigenů lidských nádorů jako jsou melanomy schopné vyvolat (i) imunitní ochranu proti vzniku tohoto typu rakoviny a (ii) šíření populace specifických cytotoxických buněk T (CTL) představujících tyto antigeny a také destrukci imunitním systémem odpovídajících nádorových buněk.

Imunitní systém má, mezi jinými funkcemi, schopnost zajistit ochranu proti virovým infekcím. Tato schopnost je zajištěna cytotoxickými lymfocyty T (CTL). CTL mají dvě význačné charakteristiky: jsou vysoce specifické a vysoce účinné. Ničí infikované buňky po určení virového antigenu na jejich povrchu. Antigen, o který se jedná, se projevuje ve formě peptidu spojeného s molekulou histokompatibilního komplexu třídy I (CMH-I). V oblasti tumorů bylo pozorováno, zpočátku u myši, že maligní buňky tvoří komplexy peptidových molekul CMH-I schopných vyvolat, jako v rámci antivirové odpovědi, imunitní odpověď řízenou CTL. Tyto peptidy pocházejí zejména z proteinů kódovaných mutovanými geny nebo selektivně aktivovanými geny v nádorových buňkách. Tyto proteiny jsou označeny specifickými antigeny nádorů. Na lidských nádorech byly charakterizovány různé antigeny rozpoznané CTL.

Předložený vynález se týká nové metody léčení lidských nádorů. Vyplyvá zejmén z upřesnění vektorů virového původu schopných přenést a exprimovat in vivo specifické antigeny lidských nádorů nebo melanomů. Je založen zejména na myších

modelech, které ukazují, že defektní rekombinantní adenoviry jsou schopné vyvolat imunizaci proti tomuto typu antigenů umožňujících získat in vivo lymfocytovou odpověď proti těmto antigenům, zejména nádorovým buňkám je nesoucích. Tato metoda podle vynálezu umožňuje tedy přenosem těchto genů působit na vývoj lidských nádorů účinným způsobem, tím že zastaví jejich vývoj, může vést k odstranění.

První předmět vynálezu tedy spočívá v rekombinantním defektním adenoviru obsahujícím vložený ve svém genomu, nukleovou kyselinu kódující protein nebo specifický peptid nádoru, zejména celek nebo část specifického antigenu nebo melanomu.

Jedná se především o antigen lidského melanomu. Jedná se zejména o fragment specifického antigenu lidského melanomu odpovídajícího části vyjádřené CTL ve spojení s molekulami CMH-I. Specifické antigeny lidských nádorů byly již popsány (Thierry Boon et al., US5,342,774; US5,405,940; WO92/20356; WO94/23031; WO94/21126). Tyto antigeny označené výrazem MAGE, jsou selektivně exprimovány v nádorových buňkách, zejména v lidských nádorech. Byly popsány různé lidské geny MAGE, zejména MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MAGE-7, MAGE-8, MAGE-9, MAGE-10, MAGE-11, MAGE-12. Jako reprezentativní příklad myších homologických genů se mohou uvést geny S-MAGE-1 a S-MAGE-2. Co se týče zejména genů BAGE, GAGE a RAGE, jsou to zástupci jiné podobné rodiny genů.

Podle upřednostňovaného způsobu provedení vynálezu, předložený vynález se týká defektního rekombinantního adenoviru, který obsahuje, vložený ve svém genomu, nukleovou kyselinu kódující protein nebo peptid odvozený od proteinu vybraného mezi proteiny Mage-1, Mage-3, Bage, Gage a Rage. Tyto antigeny jsou vlastně nejvíce selektivní v tom smyslu, že nebyly detekovány na žádné nenádorové somatické buňce. Byla popsána sekvence antigenu mage-1 a odpovídajícího genu (Van der Bruggen et al., Science 254 (1991) 1644). Byla také

Jak je již naznačeno, upřednostňovaný způsob provedení vynálezu je reprezentován defektním rekombinantním adenovirem, který obsahuje, zahrnutý ve svém genomu, nukleovou kyselinu kódující peptid proteinu Mage-1, Mage-3, Bage nebo Gage obsahující část vyjádřenou CTL ve spojení s molekulami CMH-I. Geny Mage, Bage a Gage kódují proteiny značné velikoti. Tyto proteiny jsou degradovány enzymovou digescí v buňce, která vede k degeneraci peptidů. Jsou to peptidy, které jsou tedy umístěny na povrchu buněk, a které jsou rozpoznány CTL ve spojení s molekulami CMH-I (viz obrázkem 2). Vynález se týká zejména rekombinantních adenovirů, které obsahují nukleovou kyselinu kódující peptid proteinu Mage-1, Mage-3, Bage nebo Gage obsahující část vyjádřenou CTL.

Podle jiného specifického způsobu provedení vynálezu se předložený vynález týká rekombinantních adenovirů obsahujících, zahrnutou ve svém genomu sekvenci SEQ ID n°2. Tato sekvence obsahuje sekvenci kódující nonapeptid (27pb) Mage-3, který je vyjádřen molekulou HLA.A1 cytotoxických lymfocytů T.

Podle jiného způsobu provedení vynálezu předložený vynález se týká rekombinantních adenovirů obsahujících, zahrnutou ve svém genomu, nukleovou kyselinu, která kóduje antigenní peptid genu P1A mastocyтому p815 myši DBA/2 (SEQ ID

n°3).

Jak je již naznačeno adenoviry podle vynálezu umožňují přenos a účinnou expresi těchto antigenních peptidů in vivo. Umožňují také výrazně stimulovat in vivo vznik specifických cytotoxických lymfocytů T těchto antigenů, který selektivně ničí každou buňku, která má na svém povrchu tento antigen.

Viry podle vynálezu jsou tedy použitelné pro přípravu farmaceutické kompozice určené pro léčení rakovin, jejichž buňky mají antigen Mage na svém povrchu. Pro přípravu takovýchto kompozic, nádorové buňky (zejména melanomy) pacienta jsou přednostně odebrány a analyzovány pro (i) určení exprese genu Mage například RT-PCR a (ii) případně typizování tohoto antigenu Mage. Adenovirus, který obsahuje nukleovou kyselinu kódující celek nebo část odpovídajícího antigenu je konstruován a použit pro podávání.

Viry podle vynálezu mohou být také použity in vitro (nebo ex vivo), pro vytvoření populace specifických cytotoxických buněk T určitého nádorového antigenu. Proto populace buněk je infikovaná virem podle vynálezu, potom uvedena do kontaktu s prekurzorem buněk CTL. Specifické buňky antigenu mohou být tedy selekovány in vitro, amplifikovány, potom použity například jako medikamenty pro specifickou destrukci odpovídajících nádorů. Buněčná populace infikovaná virem podle vynálezu obsahuje výhodně buňky, které obsahují antigeny (APC). Může se jednat zejména o makrofágy (W095/06120) nebo buňky B.

V adenovirech podle vynálezu, vložená nukleová kyselina může být fragment komplementární DNA (cDNA), genomické DNA (gDNA) nebo hybridní konstrukce složená například z cDNA, do které je vložen jeden nebo více intronů. Může se také jednat o syntetické nebo semisyntetické sekvence. Jak je již naznačeno jedná se o nukleovou kyselinu, která kóduje každý protein nebo peptid odvozuující protein vybraný mezi Mage-1,

Mage-3, Bage a Gage. Ve smyslu předloženého vynálezu, exprese peptidu odvozuujícího tento protein naznačuje, že nukleová kyselina může kódovat fragment proteinu, a že tento fragment může být vhodný pro vytvoření CTL. Fragment podle vynálezu nese tedy alespoň antigenní determinant rozpoznáný specifickou CTL. Tyto fragmenty mohou být získány všemi odborníky známými technikami zejména genetickou modifikací nebo/a chemickou modifikací nebo/a enzymovou modifikací nebo také klonováním exprese, umožňující selekci variant v závislosti na jejich biologické aktivitě. Genetické modifikace začleňují suprese, delece, mutace atd.

Vložená nukleová kyselina je především cDNA nebo gDNA.

Vložená nukleová kyselina obsahuje také sekvence umožňující expresi v infikovaných buňkách antigenu nebo fragmentu antigenu. Může se jednat o sekvence, které jsou přirozeně odpovědné za expresi výše uvedeného antigenu, když tyto sekvence schopné fungovat v infikované buňce. Může se také jednat o sekvence různého původu, označené heterologní sekvence (odpovědné za expresi jiných proteinů, nebo stejných syntetických). Může se jednat zejména o promotory eukaryontních nebo virových genů nebo odvzených sekvencí stimulujících nebo potlačujících transkripci genu specificky nebo nespecificky, induktivně nebo neinduktivně. Například se může jednat o sekvence promotorů pocházejících z genomu buňky, která se požaduje infikovat, nebo z genomu viru a zejména se může jednat o promotory genů E1A, MLP adenovirů, promotor CMV, LTR-RSV, SR α , atd. Mezi eukaryontními promotory se mohou uvést promotory ubikvitinové (HPRT, vimentin, α -actin, tubulin atd.) promotory středních filament (desmin, neurovlákna, keratin, GFAP, atd.) promotory terapeutických genů (typ MDR, CFTR, faktor VIII atd.) specifické tkáňové promotory (pyruvátkinasa, villin, promotor střevního proteinu vázání mastných kyselin, promotor actinu α buněk hladkého svalstva, specifické promotory pro játra, Apo AI, Apo AII,

lidský Albumin atd.) nebo také promotory odpovídající na stimuly (receptory steroidních hormonů, receptor kyseliny retinové atd.). Mimo jiné tyto sekvence exprese mohou být modifikovány adicí aktivačních sekvencí, regulačních sekvencí atd. Když vložená nukleová kyselina neobsahuje sekvence exprese může být vložena do genomu defektního viru po směru této sekvence.

Viry podle vynálezu jsou defektní, tudíž nejsou schopné se autonomě replikovat v cílové buňce. Genom defektních virů použitých v rámci předloženého vynálezu je tedy zbaven alespoň sekvence nezbytné pro replikaci výše uvedeného viru v infikované buňce. Tyto oblasti mohou být buď vyloučeny (úplně nebo zčásti) nebo zbaveny funkčnosti substitucí jinými sekvencemi, zejména vloženým genem. Defektní virus nicméně zachovává sekvence genomu, které jsou nezbytné pro enkapsidaci virových částic.

Viry podle vynálezu mohou být získány od různých adenovirových serotypů. Existují různé adenovirové serotypy, jejichž struktura a vlastnosti se poněkud různí. Mezi těmito serotypy se přednostně používá v rámci předloženého vynálezu lidský adenovirus typu 2 nebo 5 (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenovirus zvířecího původu (viz přihláška WO94/26914). Mezi adenoviry zvířecího původu použitelných v rámci předloženého vynálezu se mohou uvést adenoviry psího, hovězího, myšího původu (například Mavl, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovčího, prasečího, ptačího nebo také opičího původu (například SAV). Adenovirus zvířecího původu je přednostně adenovirus psí, přednostně adenovirus CAV2 (souche manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800)). V rámci předloženého vynálezu se přednostně používá adenovirus lidského původu nebo původu psího nebo jejich směs.

Defektní adenovirus podle vynálezu obsahuje ITR, sekvenci umožňující enkapsidaci a nukleovou kyselinu zájmu. V genomu adenoviru podle vynálezu je alespoň oblast E1

nefunkční. Požadovaný virový gen může být zbaven funkčnosti všemi odborníky známými technikami, zejména úplnou supresí, substitucí, částečnou delecí nebo adicí jedné nebo více basí v požadovaném genu nebo požadovaných genech. Tyto modifikace mohou být získány in vitro (na izolované DNA) nebo in situ například prostřednictvím technik genové terapie nebo také působením mutagenních činidel. Mohou být modifikovány také jiné oblasti zejména oblast E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) a L5 (WO95/02697). Podle upřednostňovaného způsobu provedení vynálezu adenovirus podle vynálezu obsahuje delecí v oblastech E1 a E4. Podle jiného upřednostňovaného způsobu provedení adenovirus obsahuje delecí v oblasti E1 na úrovni, ve které jsou vloženy oblast E4 a nukleová kyselina (viz FR94 13355). Delece v oblasti E1 zasahuje výhodně nukleotidy 454 až 3328 (Fragment PvuII-BgIII) nebo 382 až 3446 (fragment HinfII-Sau3A). Delece v oblasti E4 výhodně obsahuje alespoň fáze ORF3 a ORF6.

Nukleová kyselina zájmu může být vložena do různých oblastí genomu adenoviru. Genom adenoviru je složen z lineární dvouvláknové DNA velikosti 36 kb. Obsahuje zejména sekvenci obrácené repetice (ITR) na každém konci, sekvenci enkapsidace (Psi), rané geny a pozdní geny (viz obrázek 1). Zásadní rané geny jsou obsaženy v oblastech E1, E2, E3 a E4. Mezi nimi geny obsažené v oblasti E1 jsou nezbytné pro virovou propagaci. Hlavní pozdní geny jsou obsaženy v oblastech L1 až L5. Genom adenoviru Ad5 byl zcela sekvenován a je dostupný na základě dat (viz zejména Genebank M73260). Právě tak části genomů, ba dokonce celek genomu adenovirů (Ad2, Ad7, Ad12 atd.) byl také sekvenován. Nukleová kyselina zájmu je přednostně vložena do nepodstatné oblasti k produkci defektních rekombinantních virů. Je přednostně vložena na úrovni oblasti E1, která je defektní ve viru a doplněna produkovanou linií, na úrovni oblasti E3, která není podstatná pro produkci rekombinantních virů (její inaktivace nemusí být transkomplementární) nebo také v oblasti E4. V

tomto posledním případě je nezbytné doplnit funkce E4 během produkce, buď společnou transfekcí s plazmidem nebo pomocným virem nebo prostřednictvím přijatelné linie. Je jasné, že mohou být použita i jiná místa. Přístup k nukleové sekvenci genomu umožňuje odborníkovi identifikovat oblasti umožňující vložit nukleovou kyselinu zájmu.

Defektní rekombinantní adenoviry podle vynálezu mohou být připraveny všemi odborníky známými technikami (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573, Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Adenoviry jsou produkovány transfekcí DNA rekombinantního viru v odpovídající buněčné kapsidační linii. Může se jednat o jednoduchou transfekci, když se může připravit konstrukce nesoucí společně genom rekombinantního viru nebo, jako je to v nejčastějším případě společnou transfekcí více fragmentů DNA nesoucích různé části rekombinantního virového genomu. V tom případě proces zahrnuje jednu nebo více etap obecné rekombinace mezi různými konstrukcemi v buněčné enkapsidační linii pro vytvoření DNA rekombinantního viru. Různými způsoby mohou být připraveny různé fragmenty použité pro produkci viru. Nejvšeobecněji používaná technika spočívá v izolaci virové DNA a potom modifikaci in vitro klasickými metodami molekulární biologie (digesce, ligace atd.). Získané konstrukce jsou potom purifikovány a použity pro transfekci enkapsidační linie. Jiné techniky spočívají v použití plazmidu nesoucího část genomu rekombinantního viru, který je společně transfektován s virem nesoucím chybějící část genomu. Jiné možnosti spočívají v použití prokaryontních plazmidů pro přípravu virových DNA použitelných pro transfekci (viz Bett et al., PNAS 91 (1994) 8802, FR95 01632).

Použitá buněčná linie musí přednostně (i) být transformovatelná výše uvedenými elementy a (ii) obsahovat sekvence schopné doplnit část genomu defektního adenoviru přednostně ve formě integrované pro vyhnutí se nebezpečí

rekombinace. Jako příklad linie se může uvést ledvinová linie lidského embrya 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), která obsahuje, začleněnou ve svém genomu levou část genomu adenoviru Ad5 (12%) nebo linie schopné doplnit funkce E1 a E4 tak, jak je popsáno zejména v přihláškách vynálezů n°W094/26914 a W095/02697.

Adenoviry, které jsou rozmnoženy, jsou získány a purifikovány podle klasických technik molekulární biologie, jak je naznačeno v příkladech.

Předložený vynález se týká také každé farmaceutické kompozice obsahující jeden nebo více defektních rekombinantních adenovirů tak, jak je popsáno. Farmaceutické kompozice podle vynálezu mohou být formulovány z pohledu podávání a to orálně, parenterálně, intranasálně, intravenózně, intramuskulárně, podkožně, transdermikálně...

Předložený vynález se týká také každé farmaceutické kompozice obsahující buňky infikované defektním rekombinantním adenovirem tak, jak je popsáno. Kompozice podle vynálezu výhodně obsahuje buňky poskytující antigen (APC) infikované defektním rekombinantním adenovirem tak, jak je již popsáno. Jako příklad se mohou uvést makrofágy nebo lymfocyty B. Vynález se také týká kompozice obsahující cytotoxické buňky T (CTL) specifické nádorovému antigenu, připravené kultivací buněčných prekursorů v přítomnosti buněk poskytujících antigeny (APC) infikované defektními rekombinantními adenoviry tak jak je popsáno.

Farmaceutická kompozice podle vynálezu obsahuje vhodné farmaceutické vehikulum pro injektovatelnou formu. Může se jednat zejména o roztoky solí (dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý nebo hořečnatý atd. nebo směs těchto solí), sterilní, izotonické nebo kompozice suché zejména lyofilizované, které po přidavku, podle případu, sterilované vody nebo

fyziologického séra umožňují injektovatelnou formu kompozice.

Dávka viru použitá pro injekci může být přizpůsobena různým parametrům zejména způsobu použitého podávání, patologii, genu určeného k exprimování nebo také délce léčení. Všeobecně rekombinantní adenoviry podle vynálezu jsou formulovány a podávány ve formě dávek, která obsahuje mezi 10^4 a 10^{14} pfu, přednostně 10^6 až 10^{10} pfu. Termín pfu ("plaque forming units") odpovídá infekční schopnosti virového roztoku a je určena infekcí určité buněčné kultury a následném měření po 15 dnech počtu plaků infikovaných buněk. Techniky určení velikosti pfu virového roztoku jsou dobře popsány v odborné literatuře.

Adenoviry podle vynálezu mohou být použity pro léčení nebo prevenci rakovin zahrnující zejména lidské nádory (pro antigeny Mage-1 až Mage-12, Gage a Bage a Rage) sarkomy (pro antigeny Mage-1).

Následující obrázky a příklady blíže ilustrují vynález, aniž by však v jakémkoliv směru omezovaly jeho rozsah.

Legenda k obrázkům a tabulkám

Obrázek 1: Genetické uspořádání adenoviru Ad5

Obrázek 2: Exprese a opracování antigenů mage

Obrázek 3: Konstrukce plazmidů pAd.SR α -MAGE

Obrázek 4: Protokol č.1 imunizace myši DBA/2 ad-P1A nebo kontrolou

Obrázek 5: Protokol č.2 imunizace myši DBA/2 ad-P1A nebo kontrolou

Tabulka 1: Prokázání specifické lýzy CTL infikovaných buněk Ad-Mage podle vynálezu

Tabulka 2: Prokázání schopnosti buněk infikovaných

Ad-Mage podle vynálezu stimulovat produkci TNF klonem CTL

Tabulka 3: Prokázání imunizace myši DBA/2 injekcí podle protokolu č.1, Ad-P1A (Tabulka 3A) nebo adenovirové kontroly, Ad- β Gal (Tabulka 3B)

Tabulka 4: Prokázání imunizace myši DBA/2 injekcí podle protokolu č.2, Ad-P1A (Tabulka 4A) nebo adenovirové kontroly, Ad- β Gal (Tabulka 4B)

Všeobecné techniky klonování, molekulární biologie

Klasické metody molekulární biologie takové jako jsou odstředování plazmidové DNA v gradientu chloridu cesnatého/ethidiumbromidu, digesce restrikčními enzymy, elektroforéza na gelu, transformace v *E. coli*, srážení nukleových kyselin atd. jsou popsány v odborné literatuře (Maniatis et al., 1989).

Enzymy byly dodány firmou New-England Biolabs (Beverly, MA).

Pro ligaci byly fragmenty DNA rozděleny na základě velikosti na 0,8 - 1,5% agarosových gelech, purifikovány GeneClean (BIO101, LaJolla CA) a inkubovány přes noc při teplotě 14°C v pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 mM ATP v přítomnosti DNA-ligasy fágu T4.

Byla také provedena amplifikace PCR (Polymerase Chain Reaction) podle Maniatis et al., 1989 s následujícími specifikacemi:

- koncentrace v MgCl₂ 8 mM

- teplota denaturace 95°C, teplota hybridace 55°C, teplota elongace 72°C. Tento cyklus byl 25x opakován v PE9600 Thermacycler (Perkin Elmer, Norwalk CO).

Oligonukleotidy chráněné v β skupinou kianoethylovou byly syntetizovány za použití fosforamidové chemie (Sinha et al., 1984, Giles 1985) automatickým syntetizátorem DNA Applied Biosystem model 394 (Applied Biosystem, Foster City CA) podle doporučení dodavatele.

Sekvenování bylo provedeno na dvouvláknové matici metodou terminace řetězce za použití fluorescenčních nástrojů. Byla použita souprava pro sekvenování Taq Dye Primer Kit od Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City CA) podle doporučení výrobce.

Příklad 1: Konstrukce defektního rekombinantního adenoviru, který kóduje fragment antigenu P1A

Tento příklad popisuje konstrukci defektního rekombinantního adenoviru podle vynálezu, který kóduje fragment antigenu P1A. Adenovirus nese sekvenci SEQ ID n°3. Konstruovaný adenovirus je adenovirus serotypu 5, který má delecí v oblastech E1 a E3, nukleovou kyselinu zájmu, která je vložena do oblasti E1 na úrovni delece.

Nukleová kyselina vložena na úrovni oblasti E1 obsahuje zejména:

- promotor SR α . Promotor SR α obsahuje raný počátek replikace SV40 a část LTR HTLV1 (odpovídající oblasti R a části U5), následuje spojení 16S SV40 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 466).

- minigen P1A 44pb (SEQ ID N°3)

- polyadenylační místo viru SV40

Tato nukleová kyselina byla extrahována z plazmidu pcD-SR α -P1A, odpovídajícího plazmidu pcD-SR α , ve kterém byl minigen P1A klonován v místě EcoRI. Získaný inzert byl pak klonován v plazmidu pAd.RSV- β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626) místo fragmentu obsahujícího LTR RSV a gen LacZ.

Takto získaný plazmid pAd-SR α -P1A byl potom použit pro tvorbu rekombinantního adenoviru. Proto byly buňky linie 293 společně transfektovány 5 μ g plazmidu pAd-SR α -P1A a 5 μ g DNA adenovirového mutantu dl 324 v přítomnosti fosforečnanu vápenatého. Vytvořené rekombinantní adenoviry byly selekovány purifikací na plaku. Po izolaci byl rekombinantní adenovirus amplifikován v buněčné linii 293, to vedlo ke kultivačnímu supernatantu, který obsahuje nepurifikovaný rekombinantní

adenovirus, který má okolo 10^{10} pfu/ml.

Virové částice se potom purifikují odstředováním v gradientu chloridu cesnatého podle známých technik (viz zejména Graham et al., Virology 52 (1973) 456). Analýza virové DNA digescí pomocí restrikčních enzymů EcoRI ukazuje na přítomnost inzertu v genomu. Adenoviry mohou být uchovávány při -80°C v 10% glycerolu.

Příklad 2: Konstrukce defektního rekombinantního adenoviru, který kóduje fragment antigenu Mage-1

Tento příklad popisuje konstrukci defektního rekombinantního adenoviru podle vynálezu, který kóduje fragment antigenu Mage-1. Adenovirus nese sekvenci SEQ ID n°1, kódující fragment nesoucí antigenový nonapeptid Mage-1. Konstruovaný adenovirus je adenovirus serotypu 5, který má delecii v oblastech E1 a E3, nukleovou kyselinu zájmu, která je vložena do oblasti E1 na úrovni delece.

Nukleová kyselina vložena na úrovni oblasti E1 obsahuje zejména:

-promotor $\text{SR}\alpha$. Promotor $\text{SR}\alpha$ obsahuje raný počátek replikace SV40 a část LTR HTLV1 (odpovídající oblasti R a části U5) následuje spojení 16S SV40 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 466).

-minigen MAGE-1 116 pb (SEQ ID N°1). Tento fragment byl získán PCR od úplného genu Mage-1. Obsahuje ATG v poloze 15, terminační kodon v poloze 121 a část exonu 3 genu Mage-1. Obsahuje sekvenci odpovídající nonapeptidu (27 pb), který je vyjádřen molekulou HLA.A1 cytotoxických lymfocytů T (Obrázek 2).

-polyadenilační místo viru SV40

Tato nukleová kyselina byla extrahována z plazmidu pcD-SR α -Mage-1, odpovídajícího plazmidu pcD-SR α , ve kterém byl minigen Mage-1 klonován v místě EcoRI. Získaný inzert byl pak klonován v plazmidu pAd.RSV- β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626) místo fragmentu obsahujícího LTR RSV a gen LacZ (Obrázek 3).

Takto získaný plazmid pAd-SR α -MAGE-1 byl potom použit pro tvorbu rekombinantního adenoviru. Proto byly buňky linie 293 společně transfektovány plazmidem pAd-SR α -MAGE-1 a DNA adenovirý mutant dl 324 v přítomnosti fosforečnanu vápenatého. Vytvořené rekombinantní adenoviry byly selekovány purifikací na plaku. Po izolaci rekombinantní adenovirus byl amplifikován v buněčné linii 293, to vedlo ke kultivačnímu supernatantu, který obsahuje nepurifikovaný rekombinantní adenovirus, který má okolo 10^{10} pfu/ml.

Virové částice se potom purifikují odstředováním v gradientu chloridu cesnatého podle známých technik (viz zejména Graham et al., Virology 52 (1973) 456). Analýza virové DNA digescí pomocí restrikčních enzymů EcoRI ukazuje na přítomnost inzertu v genomu. Adenoviry mohou být uchovávány při -80°C v 10% glycerolu.

Příklad 3: Konstrukce defektního rekombinantního adenoviru, který kóduje fragment antigenu Mage-3

Tento příklad popisuje konstrukci defektního rekombinantního adenoviru podle vynálezu, který kóduje fragment antigenu Mage-3. Adenovirus nese sekvenci SEQ ID n°2, kódující fragment nesoucí antigenový nonapeptid Mage-3. Konstruovaný adenovirus je adenovirus serotypu 5, který má delecii v oblastech E1 a E3, nukleovou kyselinu zájmu, která je vložena do oblasti E1 na úrovni delece.

Nukleová kyselina vložena na úrovni oblasti E1 obsahuje

zejména:

-promotor SR α . Promotor SR α obsahuje raný počátek replikace SV40 a část LTR HTLV1 (odpovídající oblasti R a části U5) následuje spojení 16S SV40 (Takebe et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 466).

-minigen MAGE-3 44 pb (SEQ ID N°2). Tento fragment byl získán PCR od úplného genu Mage-3. Obsahuje ATG v poloze 12, terminační kodon v poloze 44 a sekvenci odpovídající nonapeptidu (27 pb), který je vyjádřen molekulou HLA.A1 cytotoxických lymfocytů T (Obrázek 2).

-polyadenilační místo viru SV40

Tato nukleová kyselina byla extrahována z plazmidu pcD-SR α -Mage-3, odpovídajícího plazmidu pcD-SR α , ve kterém byl minigen Mage-3 klonován v místě EcoRI. Získaný inzert byl pak klonován v plazmidu pAd.RSV- β G místo fragmentu obsahujícího LTR RSV a gen LacZ (Obrázek 3).

Takto získaný plazmid pAd-SR α -MAGE-3 byl potom použit pro tvorbu rekombinantního adenoviru. Proto byly buňky linie 293 společně transfektovány plazmidem pAd-SR α -MAGE-3 a DNA adenovirový mutant dl 324 v přítomnosti fosforečnanu vápenatého. Vytvořené rekombinantní adenoviry byly selekovány purifikací na plaku. Po izolaci rekombinantní adenovirus byl amplifikován v buněčné linii 293 to vedlo ke kultivačnímu supernatantu, který obsahuje nepurifikovaný rekombinantní adenovirus, který má okolo 10^{10} pfu/ml.

Virové částice se potom purifikují odstředováním v gradientu chloridu cesnatého podle známých technik (viz zejména Graham et al., Virology 52 (1973) 456). Analýza virové DNA digescí pomocí restričních enzymů EcoRI ukazuje na přítomnost inzertu v genomu. Adenoviry mohou být uchovávány při -80°C v 20% glycerolu.

Příklad 4: Funkční charakteristika adenovirů podle vynálezu

Tento příklad ukazuje, že viry podle vynálezu jsou schopné indukovat expresi genu zájmu, který kóduje protein, jehož degradace vede k expresi antigenního peptidu na povrchu cílové buňky.

Expresí minigenu MAGE-1 a přítomnost peptidu byly prokázány na buňkách infikovaných Ad-Mage (4.1.), určením specifické lýsy (4.2.) a stimulace produkce TNF (4.3.).

4.1. Buněčné linie

Buněčné linie byly infikovány následujícím způsobem:

-ClR.A1: linie lymfocytů B transformovaná EBV (Storkus, W.J., Howell, D. N., Salter, R. D., Dawson, J. R., Cresswell, P: NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. J. Immunol. 138: 1675 - 1659, 1987) a transfektována genem HLA.A1 klonovaným v plazmidu pHEBO.

-Gerl III β E⁻F⁻: Buňky lidského melanomu HLA.A1 imunoselektované pro ztrátu antigenu MAGE-1 (označené Gerlach E⁻ v Tabulkách 1 a 2).

Tyto dvě linie exprimují tedy molekulu HLA.A1, ale neexprimují antigen MAGE-1.

4.2. Určení specifické lýzy

Tento příklad ukazuje existenci specifické lýzy buněk specifickým klonem CTL antigenu (test uvolňování radioaktivního chromu). Proto buňky zmíněné v 4,1. byly infikovány adenovirem Ad-Mage-1 (příklad 2) nebo kontrolním adenovirem (Ad- β Gal) při několikanásobné infekci 500 pfu/buňka. Infikované buňky byly označeny chromem 51 potom inkubovány během 4 hodin, v poměru 1000 buněk/jamka, se

specifickým CTL (klon 82:30) v různých poměrech účinné buňky/cílové buňky (E/T). Byla stanovena procenta lysis. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1. Jasně ukazují, že buňky infikované virem podle vynálezu vyjadřují citlivost k lýze specifickým CTL jasně lepší než buňky infikované kontrolním adenovirem. Tyto buňky jasně ukazují také zvýšenou citlivost vzhledem k buňkám přímo transfektovanými antigenem Mage-1, tím ukazuje terapeutickou účinnost vektorů vynálezu.

Tyto výsledky jasně ukazují, že viry podle vynálezu jsou schopné dodat buňkám velkou citlivost k lýze specifickým CTL.

4.3. Stimulace produkce TNF

V tomto příkladě byla určena schopnost buněk Gerl III β E⁻F⁻ stimulovat produkci TNF stejným klonem CTL. Proto byly buňky Gerl III β E⁻F⁻ infikovány adenovirem Ad-Mage-1 (příklad 2) nebo kontrolním adenovirem (Ad- β Gal) při několikanásobné infekci 50 až 100 pfu/buňka, potom inkubovány s klonem CTL. Po 24 hodinách bylo měřeno množství TNF přítomné v supernatantu stanovením jejich cytotoxicity na linii citlivé k TNF (linie WEHI-164-13). Životaschopnost buněk byla měřena kolorimetrickým testem (MTT). Výsledky jsou vyjádřeny v optické denzitě v množství TNF (pg/ml). Tento test nebyl prováděn na buňkách ClR.A1, protože přirozeně vylučují TNF. Kontrolní buňky Gerlach E⁺ jsou melanomové buňky melanomu exprimující Mage-1 a HLA-A1.

Tyto získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2. Jasně ukazují, že buňky infikované virem podle vynálezu indukují produkci TNF CTL, to jasně potvrzuje biologické a terapeutické vlastnosti virů podle vynálezu.

Příklad 5: Aktivita in vivo virů PIA vynálezu

Příklad 4 ukázal, že in vitro nebo ex vivo, buňky infikované adenovirem podle vynálezu jsou dobře rozpoznány v testu TNF a lýzovány v testu uvolňování radioaktivního chromu specifickou CTL.

Tento příklad nyní ukazuje, že in vivo, adenoviry podle vynálezu jsou schopné vytvořit specifickou odpověď CTL. Tento příklad ukazuje, že dvě injekce 10^9 virových partikulí (pfu) do myši DBA/2 v týdenním intervalu vytvářejí u části z nich silnou specifickou odpověď CTL.

Byly provedeny dvě pokusné série. Postup obou sérií je uveden na Obrázku 4 a 5. V první pokusné sérii (viz Obrázek 4) byly virové částice podávány jedné polovině v peritoneální kavitě a druhé polovině byly podávány pod kůži (ve čtyřech místech). V druhé pokusné sérii (viz Obrázek 5) virové částice byly podávány podkožně injekcemi, intraperitoneálně, intranasálně a intratracheálně. Tyto dvě série pokusů byly provedeny podle následujícího postupu. Myši byly usmrceny 15 dní po druhé sérii injekcí adenovirů. Splenocyty těchto myši byly zkontaktovány s antigenem P815A prostřednictvím buněk L1210A1 (syngenická leukémie transfektovaná s genem P₁A mastocytomu P815) ozářené v osmidenní periodě. Jako příklad této kultivace se může uvést směs tumor-lymfocyty (MLTC), lymfocyty řízené proti antigenu P815A, které byly proliferovány a diferencovány ve vražedných lymfocytech T. Tyto jsou uvedeny v kontakt s buňkami značenými radioaktivním chromem. Jedná se o buňky P511, varianta azaguaninu, který je rezistentní k myšimu mastocytomu P815, který nese antigen A a PI.204, varianta stejného mastocytomu, který ztratil antigen A. Tento poslední bude pro kontrolu negativní. Aby se vyloučila každá možnost nespecifické reakce, byly cílové buňky označené radioaktivním chromem uvedeny v přítomnost s syngenickými buňkami (L1210), které nesou na svém povrchu antigen stimulační buňky v MLTC, kromě antigenu A P815.

Získané výsledky v první pokusné sérii, vyjádřené v procentech specifické lýzy, jsou uvedeny v Tabulkách 3A a 3B.

Získané výsledky v druhé pokusné sérii, vyjádřené v procentech specifické lýzy, jsou uvedeny v Tabulkách 4A a 4B.

V obou případech uvedené výsledky ukazují, myš od myši, úrovně lýzy v poměrných průměrných hodnotách výkonných/cílových (E/T). CTL byly získány z jakéhokoliv místa injekce adenoviru (Tabulka 4A a 4B). Výsledky jasně ukazují, že adenoviry podle vynálezu jsou schopné vytvořit in vivo imunitu proti buňkám, které nesou nádorový antigen.

Tabulka 1

E/T	C1R infikovaný Ad Mage-1	C1R infikovaný Ad β gal	C1R transfektovaný Mage-1	Gerlach E-infikovaný Ad Mage-1	Gerlach E-infikovaný Ad β gal
30	62	3	33	15	0
10	59	2	40	15	0
3	61	4	45	13	0
1	44	3	30	6	0
0,3	44	1	25	5	0
0,1	28	2	19	2	2
spontání 100 ml	143	173	209	860	1049
maximum supernatant	1563	1958	1618	8320	7334
spont/max	9%	9%	13%	10%	14%
% modrých buněk		40%			100%
pfu/c	500	500		500	500

Tabuľka 2

P82:30			
Anti-Mage-1 CTL klon			
Gerlach	pfu/buňka	+CTL	
		-CTL	+CTL
Gerlach E+	(HLA A1+) (Mage 1+)	1,049=0pg TNF	0,17=45pg TNF
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-) infikovaný Ad. βgal	50	1,082=0pg TNF 0,995=0pg TNF
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-) infikovaný Ad. βgal	100	1,045=0pg TNF 0,98=0pg TNF
Gerlach E-	(HLA A1+) (Mage 1-) infikovaný Ad. Mage 1-	50	1,015=0pg TNF 0,58=4pg TNF
GerlachE-	(HLA A1+) (Mage 1-) infikovaný Ad. Mage 1	100	1,028=0pg TNF 0,355=12pg TNF
kontrola medium			
CTL P82:30			
		1,102=0pg TNF	1,086=0pg TNF
Gerlach: 40 až 50% s 50 pfu a 60 až 70% se 100 pfu			
% modrých buněk			

Tabulka 3A: Injektované myši rekombinantním adenovirem PlA

[illegible]

Tabulka 3B: Injektované myši rekombinantním adenovirem β gal

E/T	P511	P1.204	L1210A+st.	L1210	L1210+st.	L1210	L1210A+ L1210
myš č. 1							
375	1	2	2		0	11	20
125	5	5	0		0	6	2
42	3	0	1		0	1	6
14	4	0	0		0	1	3
5	2	1	0		0	0	1
2	0	0	0		0	0	1
463	11	0	10		0	12	14
154	6	0	0		0	10	0
51	5	3	0		0	2	1
17	2	0	0		0	3	7
6	2	0	1		2	2	0
2	3	0	0		0	0	5
438	4	0	0		0	8	12
146	7	2	0		0	1	11
49	0	0	5		0	0	7
16	2	0	0		0	3	4
5	0	0	0		0	0	1
2	2	0	0		0	0	8
488	6	2	2		0	13	4
163	8	1	0		0	0	4
54	6	0	0		0	2	11
18	1	0	1		0	3	0
6	4	0	0		0	2	4
2	2	0	0		0	0	6
myš č. 2							
myš č. 3							
myš č. 4							

Tabulka 3B - pokračování:

E/T	P511	P1.204	L1210A+cold	L1210	L1210+cold	L1210	L1210A+ L1210
spontání	236	194	140		116	125	95
maximum	1722	1170	786		547	790	449
spont/max	14%	16%	10%		21%	16%	21%
					5A94		

Tabulka 4A:

		E/T	P511	P1.204	P511 + st. L1210 50><1	P511 + st. L1210 50><1
podkožně	myš č.1	490	9	2	0	1
		163	5	3	0	0
		54	3	1	0	0
		18	3	0	0	0
		8	2	1	0	0
		2	0	0	0	0
	myš č.2	50	5	0	0	0
		27	3	0	0	0
		9	5	0	3	1
		3	6	0	0	8
		1	4	0	1	0
		0,3	2	0	0	0
intraperi- toneálně	myš č.1	258	51	9	48	0
		85	43	10	37	0
		28	43	8	27	0
		9	38	3	12	1
		3	18	2	8	0
		1	7	0	1	0
	myš č.2	295	9	4	9	2
		88	8	6	2	0
		33	7	4	2	0
		11	3	2	1	0
		4	1	2	0	0
		1	0	0	0	1
	myš č.3	400	68	12	76	0
		133	77	12	82	0
		44	88	14	73	0
		15	14	7	66	0
		6	10	6	30	0

		E/T	P511	P1.204	P511 + st. L1210 50><1	P511 + st. L1210 50><1	
intratratra- cheálně		3	10	1	14	0	
	myš č. 4	185	8	2	3	0	
		5	3	0	3	0	
		57	10	2	3	0	
		8	4	1	2	0	
		2	3	0	0	0	
		0,8	2	0	2	0	
myš č. 1		440	67	11	50	3	
		247	78	13	52	2	
		49	64	6	49	0	
		18	34	8	23	0	
		6	31	7	9	0	
		2	14	0	2	0	
	myš č. 2		410	6	7	3	2
			137	6	7	3	1
			45	6	4	0	1
			15	5	2	2	0
		9	1	3	0	0	
myš č. 3		2	1	2	0	2	
		344	8	2	3	1	
		115	4	0	2	0	
		38	8	0	1	0	
		13	8	0	0	0	
		4	4	1	0	0	
		1	1	0	0	0	
	myš č. 4		265	80	9	52	0
			85	46	8	47	0
			28	42	7	21	0
		9	33	3	9	0	
		3	17	2	2	0	

		E/T	P511	P1.204	P511 + st. L1210 50><1	P511 + st. L1210 50><1
		1	5	2	1	0
myš č. 5	230	2	0		1	0
	77	4	0		3	0
	25	2	0		0	0
	8	2	0		0	0
	3	1	1		0	0
	1	1	2		0	0
myš č. 6	210	13	2		11	0
	70	10	0		7	0
	23	6	0		2	1
	3	1	0		0	0
	3	2	0		0	0
	1	2	0		0	0
intrana- sálně						
myš č. 1	430	58	0		52	6
	160	52	0		58	1
	53	84	4		65	0
	18	84	2		52	0
	6	51	2		33	0
	2	52	0		20	0
myš č. 2	205	4	0		0	2
	69	4	0		0	0
	83	1	0		0	0
	8	5	0		0	0
	2	3	0		0	0
	0,8	2	0		0	0
myš č. 3	250	1	0		0	0
	83	0	0		0	0
	28	1	0		0	0
	9	1	0		0	0
	3	1	0		0	0

		E/T	P511	P1.204	P511 + st. L1210 50><1	P511 + st. L1210 50><1
myš č. 4		1	1	0	0	0
	280	2	0	0	1	0
	87	8	1	0	0	0
	29	1	0	0	0	0
	10	2	0	0	1	0
	3	0	0	0	0	0
myš č.5		1	1	1	0	0
	240	3	0	0	0	2
	80	1	0	0	0	0
	27	1	0	0	0	1
	9	1	1	0	0	0
	3	1	0	0	0	0
myš č. 6		1	1	1	1	0
	125	0	0	0	0	0
	42	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0
	5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1
	0,6	0	0	0	0	0

Tabulka 4B:

		E/T	P511	P1.204	P511 + st. P1.204 L1210 50><1 st. L1210 50><1	+
podkožně	myš č.1	300	0	0	0	0
		100	0	0	0	0
		33	0	0	0	0
		11	0	0	0	0
		4	0	0	0	1
		1	0	0	0	0
	myš č.2	230	4	3	0	1
		77	1	1	0	0
		25	1	4	0	0
		8	0	0	0	0
		3	0	0	0	0
		1	0	0	0	0
itraperi- toneálně						
myš č.1	220	1	2	1	0	
	73	0	0	0	1	
	24	1	1	1	2	
	8	0	0	0	0	
	3	0	0	0	1	
	1	0	0	0	0	
	myš č.2	410	9	1	0	3
		137	1	1	0	2
		45	0	0	0	0
		15	0	1	0	0
		5	0	1	0	0
		2	0	0	0	0
intratra- cheálně						
myš č. 1	310	0	0	0	0	
	103	0	0	0	0	
	34	0	0	0	0	

11.09.98

33

E/T	P511	P1.204	P511 + st.	P1.204 +
	L1210	50><1	st.	L1210
			50><1	
	11	0	0	0
	4	0	0	0
	1	0	0	0
myš č. 2	270	2	1	1
	90	1	0	0
	30	0	0	0
	10	0	0	0
	3	1	0	0
	1	1	0	0
intrana- sálně				
myš č. 1	400	0	0	0
	18	1	0	1
	5	0	0	0
	2	0	0	0
myš č. 2	230	3	0	1
	77	2	0	0
	25	0	0	0
	3	0	0	0
	1	1	0	0
spont.	106	127	122	110
max.	1	971	957	988
	041			
spont/	10%	13%	13%	12%
max				

Seznam sekvencí

(1) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 1:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 126 párů basí

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: dvě

(D) konfigurace: lineární:

(ii) typ molekuly: cDNA

(ix) popis sekvence SEQ ID NO: 1:

TTGAATTCGC CGCCATGGAG TCCTTGCAGC TGGTCTTTGG CATTGACGTG	50
AAGGAAGCAG ACCCCACCGG CCACTCCTAT GTCCTTGTCA CCTGCCTAGG	100
TCTCTCCTAT GATGGCTAGA ATTCTT	126

(1) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 2:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 44 párů basí

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: dvě

(D) konfigurace: lineární:

(ii) typ molekuly: cDNA

(ix) popis sekvence SEQ ID NO: 2:

AATTCGCCGC CATGGAAGTG GACCCCATCG GCCACTTGTA CTAG	44
--	----

(1) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 3:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 44 párů basí

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: dvě

(D) konfigurace: lineární:

(ii) typ molekuly: cDNA

(ix) popis sekvence SEQ ID NO: 3:

AATTCGCCGC CATGCTGCCT TATCTAGGGT GGCTGGTCTT CTAG

44

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Defektní rekombinantní adenovirus obsahující, zahrnutou ve svém genomu, nukleovou kyselinu kódující protein nebo specifický peptid nádoru, schopný indukovat imunitní ochranu a destrukci odpovídajících nádorových buněk imunitním systémem.

2. Defektní rekombinantní adenovirus podle nároku 1 v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje nukleovou kyselinu kódující protein nebo specifický peptid lidského nádoru.

3. Defektní rekombinantní adenovirus podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č e n ý t í m, že nukleová kyselina vložená do genomu kóduje celek nebo část specifického antigenu melanomu.

4. Defektní rekombinantní adenovirus podle nároku 3 v y z n a č e n ý t í m, že se jedná o nukleovou kyselinu kódující fragment specifického antigenu lidského melanomu, který obsahuje část vyjádřenou CTL ve spojení s molekulami CMJ-I.

5. Defektní rekombinantní adenovirus podle jednoho z předchozích nároků v y z n a č e n ý t í m, že nukleová kyselina kóduje protein nebo peptid, z něho odvozený, vybraný mezi proteiny Mage-1, Mage-3, Bage, Rage a Gage.

6. Defektní rekombinantní adenovirus obsahující, zahrnutou ve svém genomu, nukleovou kyselinu, která kóduje

peptid proteinu Mage-1 nebo Mage-3 obsahující část vyjádřenou CTL.

7. Defektní rekombinantní adenovirus obsahující, vloženou ve svém genomu, sekvenci SEQ ID n°1.

8. Defektní rekombinantní adenovirus obsahující, vloženou ve svém genomu, sekvenci obsaženou mezi rezidui 55 až 82 sekvence SEQ ID n°1.

9. Defektní rekombinantní adenovirus obsahující, vloženou ve svém genomu, sekvenci SEQ ID n°2.

10. Adenovirus podle jednoho z předchozích nároků v y z n a č e n ý t í m, že je vybrán mezi lidskými serotypy Ad2 a Ad5.

11. Adenovirus podle jednoho z nároků 1 až 9 v y z n a č e n ý t í m, že je vybrán mezi psími serotypy.

12. Adenovirus podle jednoho z předchozích nároků v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje delecii v oblasti E1.

13. Adenovirus podle nároku 11 v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje mimo jiné delecii v oblasti E1.

14. Adenovirus podle jednoho z předchozích nároků v y z n a č e n ý t í m, že nukleová kyselina je vložena do

oblasti E1 nebo E3 nebo E4.

15. Farmaceutická kompozice obsahující alespoň adenovirus podle jednoho z předchozích nároků.

16. Použití adenoviru podle jednoho z předchozích nároků 1 až 14 pro produkci in vitro nebo ex vivo specifických cytotoxických lymfocytů lidských nádorů.

17. Kompozice obsahující buňky infikované defektním rekombinantním adenovirem podle jednoho z předchozích nároků 1 až 14.

18. Kompozice podle nároku 17 v y z n a č e n á t í m, že obsahuje buňky nesoucí antigen (APC) infikované defektním rekombinantním adenovirem podle jednoho z předchozích nároků 1 až 14.

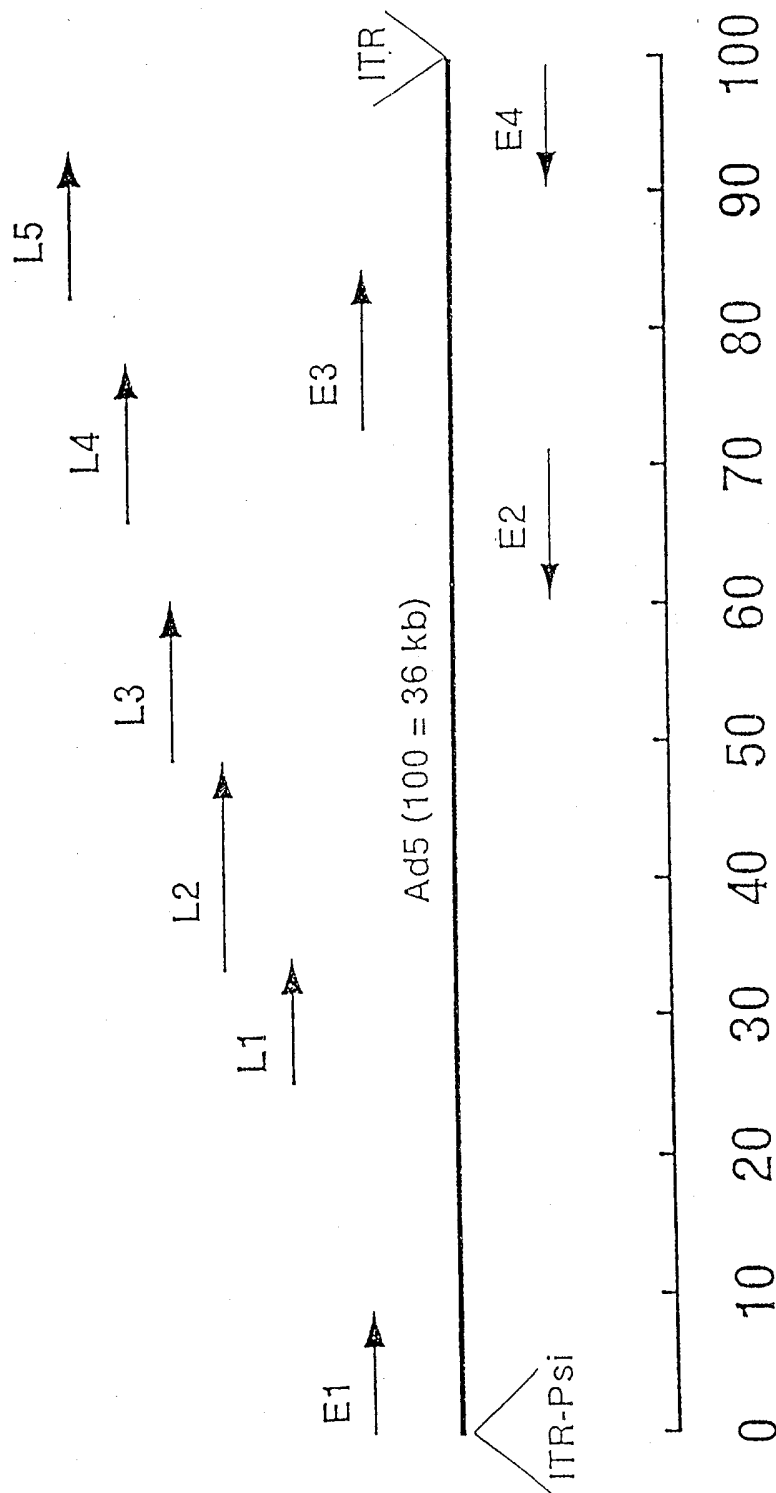
19. Postup přípravy specifických cytotoxických buněk T nádorového antigenu obsahující uvedení do kontaktu prekurzor buněk CTL s populací buněk infikovaných virem podle jednoho z nároků 1 až 14.

14.09.98

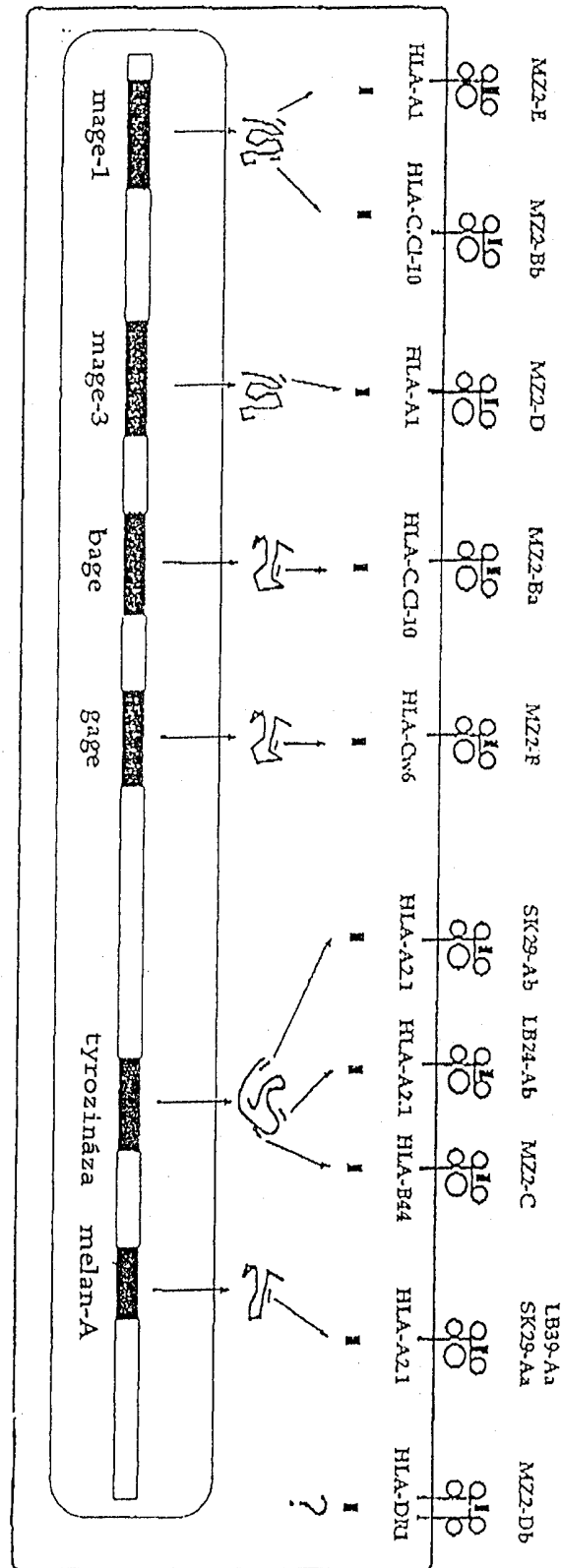
PV 2915-98

0412

1/5



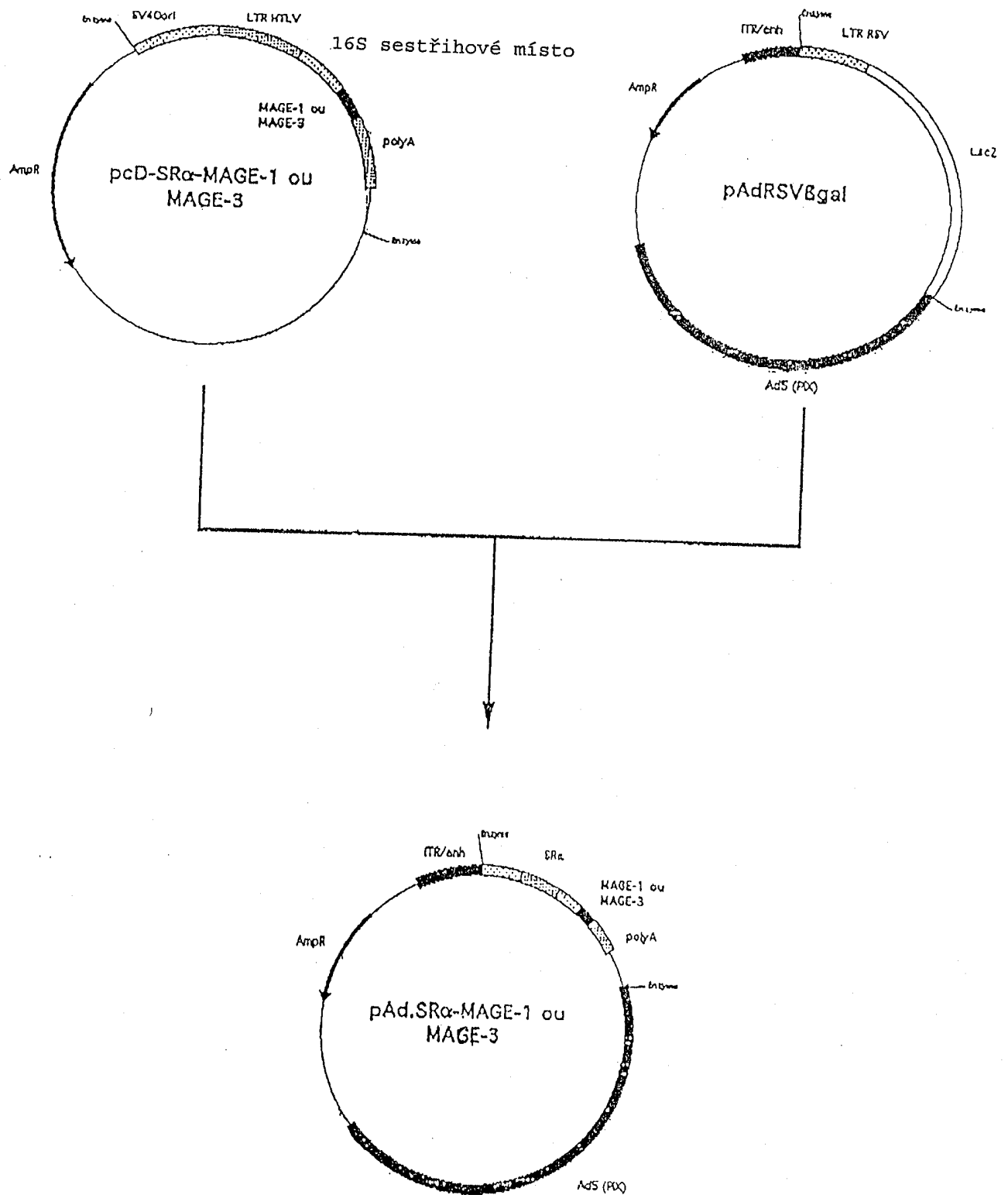
Obr. 1



Obr. 2

14.09.98

3/5



Obr. 3

Imunizace myši DBA/2 rekombinantním adenovirem P1A nebo lacZ

IMUNIZACE	STIMULACE	TEST	VÝSLEDKY
<u>Adenovirus P1A</u> 10⁹ virových částic 50% rozděleno na 4 místa s.c. a 50% i.p. 4 F idem D7 4 F 2 skupiny D0 4 F D2 12 s.	MLTC 5.10-6 spc. 2.10-5 L1210A+ irr. V médiu MLC Y J14 nebo 21	pro myši 1x injikované P511 P1.204 pro myši 2x injikované P511 P1.204 a L1210 A+ L1210 s nebo bez chládové kompetice Y D21 nebo 28	myši inji- kované 1x P1A 0/4. myši inji- kované 2x P1A u 3/4 se proje- vila odpověď specificky namí- řená proti P1A
<u>Adenovirus Bgal</u> 2 skupiny D0 4 F D2 12 s.	idem 4 F idem D7 4 F		

Obr. 4

Imunizace myší DBA2 dávkou P1A (dávka č. 3) nebo β gal-rekombinantního adenoviru

způsoby injekce

10^9 pfu v každé injekci

IMUNIZACE		STIMULACE	TEST	VÝSLEDKY
1° : Ad.P1A				
intra-nazálně	6F12w 20 μ l			1 / 6
	20 μ l			
intra-tracheálně	6F12w 50 μ l			2 / 6
	50 μ l			
IP	4F12w 100 μ l			2 / 4
	100 μ l			
SC	4F12w 100 μ l			1 / 3
	100 μ l			
2° : Ad. β gal				
IN	3F12w 20 μ l			0 / 2
	20 μ l			
IT	3F12w 50 μ l			0 / 2
	50 μ l			
IP	3F12w 100 μ l			0 / 2
	100 μ l			
SC	3F12w 100 μ l			0 / 2
	100 μ l			
		MLTC	P511 P1.204 a P511 P1.204 s nebo bez chladorové kompetice (L1210 v poměru 50 k 1)	
		5.10 ⁶ spc.+ 2.10 ⁵ irr. L1210A+ v médiu MLC		
		REM: Mediastinální lymfatické uzliny myši injikovaných IN a IT a peritoneocyty myši injikovaných IP se stimulují L1210A+ (2x10 ⁵) (1 až 2x 10 ⁶ efektorových buněk v každé jamce)		
		↓ ŽÁDNÁ LÝZA		
			▼	
		d28 (13.0)		d35 (20.0)

Obbr. 5.

14.09.98