

ÖZET**HETEROLOG GENLERLE DONATILMIŞ ONKOLİTİK ADENOVİRÜSLER**

5 Mevcut açıklama, örneğin bir terapötik ve / veya haberci transgeni, özellikle bir serotip 11 adenovirüs gibi bir B grubu virüsü veya Ad11'in fiber, penton ve hekzonlu bir kimerik virüsünü, örneğin bu virüsü ihtiva eden bir farmasötik formülasyon gibi bir kompozisyon içeren en az bir transgen ile donatılan bir modifiye edilmiş adenovirüs ile, özellikle tedavide, daha da özel olarak kanserin tedavisinde virüs ve virüs formülasyonlarının kullanımı ile ilgilidir. Açıklama ayrıca virüs hazırlama proseslerini
10 de kapsar.

İSTEMLER

1. Bir replikasyona uygun grup B onkolitik adenovirüs olup, özelliği; aşağıdaki formül (I)'in bir sekansını içermesi:

5'ITR- B₁- B_A- B₂- B_X- B_B- B_Y- B₃- 3'ITR

5 burada:

B₁'in E1A, E1B ya da E1A- E1B içermesi;

B_A'nın - E2B- L1- L2- L3- E2A- L4 içermesi;

B₂'nin bir bağ olması veya E3 içermesi;

10 B_X'in bir bağ olması ya da bir kısıtlama bölgesi, bir ya da daha fazla transgen ya da her ikisini içeren bir DNA sekansı olması; B_B'nin L5 içermesi;

B_Y'nin, bir transgen ve bir ek yeri alıcı sekansı içeren bir transgen kaseti içermesi ve B₃'ün bir bağ olması ya da E4'ü içermesi,

15 burada transgen kasetinin, E4 ve büyük geç promotörden oluşan gruptan seçilen bir endojen promotörün kontrolü altında olması ve transgen kasetinin, bir RNAi sekansı, bir protein, bir antikor ya da bunların bir bağlama fragmanı, bir kemokin, bir sitokin, bir immünomodülatör ve bir enzimden oluşan gruptan seçilen bir terapötik gen kodlayıcı materyali içermesidir.

2. İstem 1'e göre replikasyona uygun bir adenovirüs olup, özelliği; burada promotörün, büyük geç promotör olmasıdır.

20 3. İstem 1 veya 2'ye göre replikasyona uygun bir adenovirüs olup, özelliği; burada B_Y'nin aynı zamanda, SEK ID NO: 11'de gösterilen sekansı veya sıkı koşullar altında kendisine hibridleşen bir DNA sekansını içermesidir.

25 4. İstem 1 ile 3'ten herhangi birine göre replikasyona uygun bir adenovirüs olup, özelliği; burada ek yeri alıcısının, CAGG, SEK ID NO: 17 ve SEK ID NO: 18'den seçilmesidir.

5. İstem 1 ile 4'ten herhangi birine göre replikasyona uygun bir adenovirüs olup, özelliği; transgen kasetinin ayrıca, bir iç ribozom giriş sekansı veya yüksek bir kendi kendine bölünme verimliliğine sahip 2A peptidi içermesidir.

30 6. İstem 1 ile 5'ten herhangi birine göre replikasyona uygun bir adenovirüs olup, özelliği; transgenin, ayrıca bir Kozak sekansı içermesidir.

7. İstem 1 ila 6'dan herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; transgen kasetinin ayrıca bir poliadenilasyon sekansı içermesidir.
8. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; transgen kasetinin ayrıca, DNA sekansının 3' ucunda ve / veya DNA sekansının 5' ucunda bir kısıtlama bölgesi içermesidir.
9. İstem 1 ila 8'in herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; en az bir transgen kasetinin, monosistronik mRNA'yı veya bir polisistronik mRNA'yı kodlamasıdır.
10. İstem 1 ila 9'a göre bir adenovirüs olup, özelliği; antikor veya bunun bağlayıcı parçasının, OX40, OX40 ligandı, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40 ligandı, CD70, CD137, GITR, 4- 1BB, ICOS, ICOS ligandı, CTLA- 4, PD- 1, PD- L1, PD- L2, VISTA, B7- H3, B7- H4, HVEM, ILT- 2, ILT- 3, ILT- 4, TIM- 3, LAG- 3, BTLA, LIGHT, CD160, CTLA- 4, PD- 1, PD- L1, PD- L2'ye özgü olmasıdır.
11. İstem 1 ila 10'dan herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; kodlanmış proteinin, IL- 1 α , IL- 1 β , IL- 6, IL- 9, IL- 12, IL- 13, IL- 17, IL- 18, IL- 22, IL- 23, IL- 24, IL- 25, IL- 26, IL- 27, IL- 33, IL- 35, IL- 2, IL- 4, IL- 5, IL- 7, IL- 10, IL- 15, IL- 21, IL- 25, IL- 1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TGF β , lenfotoksin α (LTA) ve GM- CSF içeren gruptan bağımsız olarak seçilen bir sitokin olmasıdır.
12. İstem 1 ila 11'den herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; kodlanmış proteinin IL- 8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 ve CRTH2'yi içeren gruptan bağımsız olarak seçilen bir kemokin olmasıdır.
13. İstem 1 ila 12'den herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; burada transgenin, bir haberci gen, örneğin sodyum iyodür simporatör, hücre içi metaloproteinler, HSV1- tk, GFP, lusiferaz veya östrojen reseptörü olmasıdır.
14. İstem 1 ila 13'ten herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; burada adenovirüsün Ad11 olmasıdır.
15. İstem 1 ila 13'ten herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; burada adenovirüsün, sekans ID No: 12'de gösterilen EnAd olarak da bilinen virüs olmasıdır.

16. İstem 1 ila 15'ten herhangi birine göre bir adenovirüs olup, özelliği; burada virüsün, SEK ID NO: 1, SEK ID NO: 2, SEK ID NO: 3, SEK ID NO: 4, SEK ID NO: 5, SEK ID NO: 6, SEK ID NO: 7, SEK ID NO: 8, SEK ID NO: 9, SEK ID NO: 46, SEK ID NO: 48, SEK ID NO: 49, SEK ID NO: 50, SEK ID NO: 51, SEK ID NO: 52, SEK ID NO: 53, SEK ID NO: 58, SEK ID NO: 59, SEK ID NO: 60, SEK ID NO: 61, SEK ID NO: 63, SEK ID NO: 67, SEK ID NO: 68, SEK ID NO: 69 ya da SEK ID NO: 73 sekansını içermesidir.

17. İstemler 1 ila 16'dan herhangi birine göre bir adenovirüsü içeren bir kompozisyon.

18. İstemler 1 ila 16'dan herhangi birine ait bir adenovirüs veya istem 17'ye göre bir bileşim olup, özelliği; tedavide kullanıma yönelik olmasıdır.

TARİFNAME

HETEROLOG GENLERLE DONATILMIŞ ONKOLİTİK ADENOVİRÜSLER

Mevcut açıklama, örneğin bir terapötik ve / veya haberci transgeni, özellikle bir serotip 11 adenovirüs gibi bir B grubu virüsü veya Ad11'in fiber, penton ve hekzonlu bir kimerik virüsünü, örneğin bu virüsü ihtiva eden bir farmasötik formülasyon gibi bir kompozisyon içeren en az bir transgen ile donatılan bir modifiye edilmiş adenovirüs ile, özellikle tedavide, daha da özel olarak kanserin tedavisinde virüs ve virüs formülasyonlarının kullanımı ile ilgilidir. Açıklama ayrıca virüs hazırlama proseslerini de kapsar.

ARKA PLAN

Yinelenmesi yetersiz olan adenovirüs vektörleri, transgenlerin verilmesi için birkaç yıldır araştırılmaktadır. Çoğunlukla, viral genomun bu bölgeleri vektörler için gerekli olmadığından, genler E1 bölgesine ve / veya E3 bölgesine yerleştirilmiştir.

Transgenlerin adenovirüs genomuna sokulması için alternatif yerler üzerinde şaşırtıcı bir şekilde nispeten az bir çalışma yapıldı. Buna ek olarak, çalışmaların çoğu Ad5'te gerçekleştirildi.

Hali hazırda tıbbi tedavide, replikasyona elverişli onkolitik adenovirüslerin yeni nesli bulunmaktadır. Bu virüsler, kopyalanmaları için tamamlayıcı hücre dizilerine ihtiyaç duymaz. E1, viral replikasyon için önemli bir bölgedir ve E3 bölgesi teoride, bir transgenin yerleştirilmesi için bir yer olarak kullanılabilirken, bu konumdan daha fazlasına bir transgenin yerleştirilebilmesi yararlı olacaktır. Bununla birlikte, virüsün yaşam döngüsü ve / veya virüsün terapötik özellikleri gibi avantajlı virüs özelliklerini bozmamaya dikkat edilmelidir.

Enadenotucirev (EnAd), daha önce EnAd (WO2005 / 118825) olarak bilinen kimerik bir onkolitik adenovirüstür, Ad11p'den fiber, penton ve hekzona sahiptir, dolayısıyla bir alt grup B virüsüdür. Ad11p ve Ad3'ten DNA içeren bir kimerik E2B bölgesi vardır. E3 bölgesinin neredeyse tamamı ve E4 bölgesinin bir kısmı EnAd'de silinir. Dolayısıyla, genomda, ek genetik materyal canlı kalırken, bunu barındıracak önemli bir alana sahiptir. Dahası, EnAd bir alt grup B adenovirüs olduğundan, insanlardaki önceden var olan bağışıklık, örneğin Ad5'e göre daha az yaygındır. Ad11 fiberli,

pentonlu ve hekzonlu kimerik onkolitik virüslerin diğer örnekleri arasında OvAd1 ve OvAd2 bulunur (bkz. WO 2006 / 060314).

EnAd, tümör hücrelerini tercih edilen şekliyle enfekte ediyor gibi görünmekte, bu hücrelerde hızla çoğalmakta ve hücre lizisine neden olmaktadır. Bu da, inflamatuvar bağışıklık tepkileri üretebilir, böylece vücudu kanserle savaşmaya teşvik eder. EnAd'in başarısının bir kısmının, virüsün *in vivo olarak* hızlı replikasyonu ile ilişkili olduğu hipotezi ortaya atılmıştır.

EnAd, seçici olarak tümör hücrelerini parçalarken, virüsün terapötik etkinliğinin artırılması ya da bir hücre sinyal proteinini kodlayan bir transgen gibi transgenlerle veya bir hücre sinyal proteinini (veya proteinlerini) uyaran bir varlığı kodlayan bir transgeni veya bir antikora donatılarak virüsün yan etkilerinin azaltılması gibi başka yararlı özellikleri sunmak da mümkündür.

Avantajlı bir şekilde, kanser hücresi içerisinde eksprese edilebilen belirli proteinleri kodlayan DNA ile bir virüs donatmak, örneğin hücreleri bağışıklık sistemi için daha fazla görünür hale getirerek veya tercih edilen şekliyle tümör hücrelerini hedefleyen terapötik bir gen / proteini vererek tüm hücrelere karşı daha etkili bir şekilde mücadele etmek için vücudun kendi savunmalarının kullanılmasını sağlayabilir.

Dahası, haberci olan transgenleri genoma ekleyebilme kabiliyeti klinik veya klinik öncesi çalışmalara yardımcı olabilir.

Transgenlerin ekspresyonunun, virüsün replikasyonunu veya diğer avantajlı özelliklerini olumsuz bir şekilde etkilememesi önemlidir. Bu nedenle, gen veya genler, virüsün replikasyon yeterliliğini ve diğer avantajlı özelliklerinden ödün vermeyen bir yere yerleştirilmelidir. Buna ek olarak, adenovirüslerin genomu sıkı bir şekilde sarılmıştır ve bu nedenle transgenlerin yerleştirilmesi için uygun bir yer bulmak zor olabilir. Bu da, yerleştirilebilecek transgenlerin boyutunu sınırlar.

Terapötik ürünlerde, etken maddenin özelliklerini tam olarak kontrol etmek önemlidir, böylece iyi tanımlanmış ve tekrarlanabilir şekilde hazırlanabilir. Rasgele yerleştirilen transpozonları kullanan önceki tekniğe ait sistemler, farmasötik ürünlerde kullanım için çok uygun değildir, çünkü transgen, rastgele virüs genomuna yerleşir ve ekleme bölgesi, transgenin kendisi tarafından etkilenebilir. Transpozon ile yerleştirilen genlerin alternatif genlerle değiştirilmesi de zor olabilir.

Bu nedenle, çok çeşitli transgenlere toleranslı olan sağlam ve tekrarlanabilir bir silahlı adenovirüs üretme aracı geliştirmek arzu edilir.

Mevcut buluş sahipleri, tümör hücrelerinde transgeni eksprese eden, canlı, stabil, geri kazanılabilir bir virüse yol açan, endojen veya egzogen bir promotörün kontrolü altındaki çok çeşitli transgenleri yerleştirmek için uygun bir adenovirüs sağlama yöntemi geliştirmiştir. Yöntem sağlam ve tekrarlanabilir ve kesinlikle kontrol edilebilir.

Transgen, virüsün stabilitesini olumsuz olarak etkilemeyen, genin 5' ucunda ve / veya 3' ucunda, fiber proteinini kodlayan genin yakınında (bitişik) bulunur.

Mevcut buluş sahipleri, antikorlar veya antikor parçaları ve hücre sinyal proteinleri formundaki karmaşık proteinlerin adenovirüslerin genomundaki bu lokasyona, örneğin Ad11 ve Ad11'den türetilmiş virüsler gibi B grubu virüslere örneğin endojen E4 ya da önemli geç promotörün kontrolü altında sokulabileceğini ve başarılı bir şekilde eksprese edildiğini tespit etmiştir, böylece protein sentezlenmekte ve virüs replikasyonu tehlikeye atılmamaktadır.

Mevcut buluş sahipleri tarafından geliştirilen bir plazmid, mevcut buluşun virüslerini temin etmek üzere L5 (fiber) geninin yakınında transgen kasetlerinin sokulması için kullanılabilen yeni adenovirüs genomu bölgeleri sunmaktadır. Alternatif olarak, bu yerleştirme yeri mevkilerinde transgenleri veya transgen kasetleri içeren plazmitler, bir klonlama basamağı olmadan ve dolayısıyla kısıtlama bölgelerini kullanmak zorunda kalmadan doğrudan tam olarak sentezlenebilir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Mevcut buluş, formül (I)'in dizisini içeren bir genomu ihtiva eden bir kopyalamaya yetkin B grubu onkolitik adenovirüs sağlanmaktadır:

5'ITR- B₁- B_{bir}- B₂- B_x- B_B- B_Y- B₃- 3'ITR (I)

burada:

B₁ bir bağdır veya E1A, E1B veya E1A- E1B içerir;

B_A E2B- L1- L2- L3- E2A- L4'tür;

B₂ bir bağdır veya E3 içerir;

B_x bir bağ veya bir kısıtlama bölgesi, bir veya daha fazla transgen veya her ikisini de içeren bir DNA sekansıdır;

B_B L5 içerir;

B_Y bir transgen ve bir ek yeri alıcı sekansı içeren bir transgen kasetini içerir; ve

B₃ bir bağdır ya da E4'ü içerir;

5 burada transgen kaseti, E4 ve büyük geç promotörden oluşan gruptan seçilen bir endojen promotörün kontrolü altındadır ve transgen kaseti, bir RNAi sekansı, bir antikoru veya bunun bir bağlama fragmanından, kemokinler, sitokinler, immünomodülatör ve enzimlerden oluşan gruptan seçilen bir terapötik gen kodlayıcı materyali içerir.

10 Bir düzenlemede B_x Bir kısıtlama bölgesi, örneğin 1, 2, 3 veya 4, mesela 1 veya 2 gibi bir kısıtlama bölgesi içerir. Bir düzenlemede B_x en az bir transgen, örneğin 1 veya 2 transgen içerir. Bir düzenlemede B_x özellikle de kısıtlama bölgelerinin, bunu/bunları spesifik olarak genomdan kesmesine ve / veya değiştirmesine müsaade eden bir geni veya genleri içeren DNA sekansını sıkıştırdığı yerlerde en az bir transgen, örneğin 1 veya 2 transgen ve bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi, örneğin 2 veya 3
15 kısıtlama bölgesi ihtiva eder. Alternatif olarak, kısıtlama bölgeleri her geni sıkıştırabilir, örneğin iki transgen olduğu zaman, genlerin seçilmesini ve / veya değiştirilebilmesini sağlamak için üç farklı kısıtlama bölgesi gereklidir. Bir düzenlemede, bir veya daha fazla, örneğin tüm transgenler bir transgen kaseti biçimindedir. Bir düzenlemede, B_x SEK ID NO: 10'u kapsar. Bir düzenlemede, SEK
20 ID NO: 10, örneğin bir transgen ile kesilir. Bir düzenlemede, SEK ID NO: 10 sürekli (kesilmemektedir). Bir düzenlemede, B_x bir kısıtlama alanı içermez. Bir düzenlemede, B_x bir bağdır. Bir düzenlemede, B_x bir veya daha fazla transgen ihtiva eder veya bunlardan oluşur.

25 Bir düzenlemede B_Y Bir kısıtlama bölgesi, örneğin 1 veya 2 gibi 1, 2, 3 veya 4 kısıtlama bölgesi içerir. Bir düzenlemede B_Y en az bir transgen, örneğin 1 veya 2 transgen içerir. Bir düzenlemede B_Y özellikle de kısıtlama bölgelerinin, bunu/bunları spesifik olarak genomdan kesmesine ve / veya değiştirmesine müsaade eden bir geni veya genleri içeren DNA sekansını sıkıştırdığı yerlerde en az bir transgen, örneğin 1 veya 2 transgen ve bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi, örneğin 2 veya 3
30 kısıtlama bölgesi ihtiva eder. Alternatif olarak, kısıtlama bölgeleri her geni sıkıştırabilir, örneğin iki transgen olduğu zaman, genlerin seçilmesini ve / veya değiştirilebilmesini sağlamak için üç farklı kısıtlama bölgesi gereklidir. Bir

düzenlemede, bir veya daha fazla, örneğin tüm transgenler bir transgen kaseti biçimindedir. Bir düzenlemede B_Y SEK ID NO: 11'i içerir. Bir düzenlemede, SEK ID NO: 11, örneğin bir transgen ile kesilir. Bir düzenlemede, SEK ID NO: 11 sürekli (kesilmemektedir). Bir düzenlemede, B_Y bir kısıtlama alanı içermez. Bir düzenlemede, B_Y bir veya daha fazla transgen ihtiva eder veya bunlardan oluşur.

Bir düzenlemede B_X ve B_Y nin her biri bir kısıtlama bölgesi, örneğin 1 veya 2 gibi 1, 2, 3 veya 4 kısıtlama bölgesi içerir. Bir düzenlemede B_X ve B_Y her biri en az bir transgene, örneğin 1 veya 2 transgen ihtiva eder. Bir düzenlemede B_X ve B_Y 'nin her biri özellikle de kısıtlama bölgelerinin, bunu/bunları spesifik olarak genomdan kesmesine ve / veya değiştirmesine müsaade eden bir geni veya genleri içeren DNA sekansını sıkıştırdığı yerlerde en az bir transgen, örneğin 1 veya 2 transgen ve bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi, örneğin 2 veya 3 kısıtlama bölgesi ihtiva eder. Alternatif olarak, kısıtlama bölgeleri her geni sıkıştırabilir, örneğin iki transgen olduğu zaman, genlerin seçilerek kesilmesini ve / veya değiştirilebilmesini sağlamak için üç farklı kısıtlama bölgesi gereklidir. Bir düzenlemede, bir veya daha fazla, örneğin tüm transgenler bir transgen kaseti biçimindedir. Bir düzenlemede B_X ve B_Y sırasıyla SEK ID NO: 10 ve SEK ID NO: 11 içerir. Bir düzenlemede B_X ve B_Y bir kısıtlama alanı içermez. Bir düzenlemede B_X bir bağıdır ve B_Y bir bağ değildir.

Bir düzenlemede transgen B_X'te yerleşiktir. Bir düzenlemede transgen veya transgen kaseti B_Y'de yerleşiktir. Bir düzenlemede bir transgen veya transgen kaseti B_X ve B_Y'de konumludur, örneğin, transgenler her konumda aynı veya farklı olabilir.

Avantaj sağlayan haliyle, mevcut virüs yapılarındaki transgen, erken genlerden çıkarılan bir yere sokulur, çünkü bu durum virüs geni ekspresyonunu veya replikasyon hızını etkileme ihtimalini azaltır.

Bir düzenlemede, serotip 11'in veya bunun virüs türevinin replikasyonuna yetkin bir onkolitik adenovirüs sağlanır; burada fiber, heksan ve kapsid serotip 11'dir, burada virüs genomu bir terapötik antikor veya antikor bağlayıcı fragmanı kodlayan bir DNA sekansı içerir, adı geçen DNA sekansı, virüs replikasyonuna müdahale etmeyecek şekilde, E4'den ve büyük geç promotörden seçilen adenovirüs için endojen olan bir promoterin kontrolü altındadır, burada örneğin, terapötik antikor veya antikoru bağlayan fragmanı kodlayan DNA sekansı, E4 promotörünün kontrolü altında veya alternatif olarak büyük geç promotörün kontrolü altındadır, özellikle de virüs genom

sekansında L5'den sonra (yani, virüs sekansının 3' ucuna doğru) yer alan bir antikoru veya antikoru bağlayan fragmanı kodlayan DNA sekansıdır. Avantajlı bir şekilde, bir endojen promotörün kullanılması transgenlerin yerleştirilmesi için mevcut alan miktarını en üst düzeye çıkarmaktadır.

- 5 Avantaj sağlayan haliyle, bu promotörlerin kontrolü altındayken, virüs çoğalmaya elverişli kalır ve antikoru tam uzunlukta bir antikor veya uygun bir bağlama fragmanı veya başka bir protein olarak eksprese edebilir. Böylece antikor veya seçilen diğer protein, kanser hücresi tarafından eksprese edilecektir. Bir endojen promotör kullanmak, avantajlı olabilir, çünkü bu antikoru, fragmanı veya başka bir proteini
- 10 eksprese etmek için dahil edilmesi gereken transgen kasetinin boyutunu azaltır; başka bir deyişle kaset daha küçük olabilir; çünkü egzogen bir promotörün dahil edilmesi gerekmez.

Virüste bir endojen promotörün kullanılması, terapötik bir bağlamda avantajlı olabilir, çünkü transgen sadece, sürekli olarak transgeni kopyalayacak ve antikorun veya

15 fragmanın uygun olmayan bir konsantrasyonuna yol açabilecek yapıcı bir egzogen promotörün aksine virüs çoğalıyorken eksprese edilir.

Bir düzenlemeden, antikorun veya fragmanın ifadesi büyük geç promotörün kontrolü altındadır.

Bir düzenlemede, antikorun veya fragmanın ekspresyonu E4 promotörünün kontrolü

20 altındadır.

Bir yaklaşımda, serotip 11'in veya bunun virüs türevinin replikasyonuna yetkin bir onkolitik adenovirüs sağlanır; burada fiber, hekzon ve kapsid serotip 11'dir, burada virüs genomu bir terapötik antikor veya virüs çoğalma döngüsünde geç eksprese edilen ve transgenin virüs çoğalması ile çakışmadığı şekilde virüs genomunun bir

25 kısmında konumlu antikor bağlayıcı fragmanı kodlayan bir DNA sekansı içerir, adı geçen DNA sekansı, virüs replikasyonuna müdahale etmeyecek şekilde, adenovirüs için endojen olan bir promoterin kontrolü altındadır, burada örneğin, terapötik antikor veya antikoru bağlayan fragmanı kodlayan DNA sekansı, CMW promotörünün kontrolü altındadır, özellikle de bir antikoru veya antikoru bağlayan fragmanı

30 kodlayan DNA sekansı virüs genom sekansında L5'den sonra (yani, virüs sekansının 3' ucuna doğru) yer alır. Bir egzogen promotör kullanmak, avantajlı olabilir, çünkü örneğin bazı durumlarda çok yararlı olabilen, örneğin hastanın çok yaygın kansere

sahip olduğu durumda, antikor veya fragmanı kuvvetli şekilde ve yapısal olarak eksprese edebilir. Bir düzenlemede, antikorun veya fragmanın ekspresyonu bir CMV promotörünün kontrolü altındadır. Bir düzenlemede, egzojen promotör, bu DNA sekansı ile ilişkilidir, örneğin antikor veya fragmanı kodlayan ekspresyon kasetinin bir parçasıdır.

Bir düzenlemede, antikor veya fragmanını kodlayan DNA sekansı, virüs sekansında L5 geninden sonra bulunur. Avantaj sağlayan haliyle, mevcut buluş sahipleri, virüsün yaşam döngüsünü veya vektörün stabilitesini olumsuz bir şekilde etkilemeksizin bir egzojen ya da endojen promotörün kontrolü altında B_x ve/veya B_y'ye çeşitli transgenlerin eklenebileceğini tespit etmiştir.

Bir düzenlemede transgen, en az bir kodlama dizisi (yani, en az bir transgen) ve isteğe bağlı olarak aşağıdakilerden bağımsız olarak seçilen bir veya daha fazla öge içeren bir transgen kasetinin parçasıdır:

- i. Bir egzojen promotör veya ek yeri alıcı gibi bir gen ekspresyon düzenleyicisi;
- ii. Bir iç ribozom girişi (IRES) DNA sekansı;
- iii. Yüksek kendiliğinden bölünme verimli 2A peptidini kodlayan bir DNA sekansı;
- iv. Bir poliadenilasyon sekansını kodlayan bir DNA sekansı ve
- v. Bunların kombinasyonları.

Dolayısıyla, bir yapılanmada, transgen kaseti i) veya ii) veya iii) veya iv) içerir.

Bir düzenlemede transgen kaseti, i) ve ii) veya i) ve iii) veya i) ve iv) veya ii) ve iii) veya ii) ve iv) veya iii) ve iv) içerir.

Bir düzenlemede, transgen kaseti i) ve ii) ve iii), veya i) ve ii) ve iv), veya i) ve iii) ve iv), veya ii) ve iii) ve iv) içerir.

Bir düzenlemede, transgen kaseti i) ve ii)'yi ve iii) ve iv)'ü içerir.

Bir düzenlemede, transgen veya transgen kaseti, örneğin bir protein kodlama sekansının başlangıcında mRNA'nın translasyonuna yardımcı olan bir Kozak sekansı içerir.

Mevcut açıklamaya göre bir virüs içeren bir kompozisyon, özellikle de tarifnameye göre bir adenovirüs ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan içeren bir farmasötik kompozisyon sağlanmaktadır.

Mevcut açıklama, bundan başka, tedavide kullanılmak üzere örneğin kanser tedavisinde kullanım için buluşa uygun bir adenovirüs veya kompozisyon ile de ilgilidir.

- 5 Açıklama aynı zamanda, burada tarif edildiği gibi bir virüsün ya da bunu içeren bir kompozisyonun terapötik olarak etkili bir miktarının ihtiyaç halindeki bir hastaya, özellikle bir insan bir hastaya uygulanmasını kapsayan bir tedavi yöntemi ile ilgilidir.

Detaylı Açıklama

- 10 Burada kullanılan transgen, virüs için doğal olmayan (egzojen) veya normalde virüsün bulunduğu yerde bulunmayan bir gen olan genom dizisine eklenen bir geni belirtir. Transgenlerin örnekleri aşağıda verilmektedir. Burada kullanıldığı haliyle transgen ayrıca, genin, eklendiğinde tam uzunluktaki genin işlevini veya işlevinin çoğunu gerçekleştirmek için uygun olduğu genin bir kısmı olan fonksiyonel bir fragmanını da içerir.

- 15 Transgene ve kodlama sekansı aksi belirtilmediği sürece burada viral genom içerisindeki ekler bağlamında birbirlerinin yerine kullanılır. Burada kullanıldığı haliyle kodlama sekansı, örneğin fonksiyonel bir RNA, peptit, polipeptit veya proteini kodlayan bir DNA sekansı anlamına gelir. Tipik olarak, kodlama sekansı, ilgilenilen fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya proteini kodlayan transgen için cDNA'dır. Fonksiyonel RNA, peptitler, polipeptit ve ilgili proteinler aşağıda tarif edilmiştir.

- 20 Açık bir şekilde, virüs genomu DNA kodlama sekanslarını içermektedir. Virüsün genomik dizilimindeki endojen (doğal olarak oluşan genler), bu tarifnamenin bağlamında, doğal olmayan bir yerde ya da bir doğal olmayan bölgede olduğu gibi rekombinant teknikler ile modifiye edilmediği sürece transjen olarak kabul edilmemektedir.

- 25 Bir düzenlemede burada kullanılan haliyle transgen, bir organizmadan izole edilmiş ve farklı bir organizmaya yani mevcut açıklamanın virüsüne sokulan bir gen veya cDNA sekansını ihtiva eden bir DNA bölümünü belirtir. Bir düzenlemede DNA'nın bu doğal olmayan segmenti, fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein üretme kabiliyetini koruyabilir.

- 30 Dolayısıyla, bir düzenlemede yerleştirilen transgen, bir insan veya hümanize protein, polipeptit veya peptidi kodlar.

Bir düzenlemede, yerleştirilen bu transgen, örneğin bir fare, sıçan, tavşan, deve, lama veya benzerinden alınan bir insan dışı protein, polipeptit veya peptit (insan olmayan bir memeli proteini, polipeptit veya peptit gibi) veya RNA molekülünü kodlar. Avantaj sağlayan haliyle, mevcut açıklamadaki virüsler, transgenlerin kanserli hücre içinde taşınmasına izin verir. Böylece, insan hasta tarafından insan dışı bir sekansa (örneğin bir protein) karşı oluşturulan tepkiler, bu hücre içine verme ile en aza indirilebilir.

Bir DNA dizisi, birden fazla transgeni, örneğin 1 veya 2 gibi 1, 2, 3 veya 4 transgen içerebilir.

10 Bir transgen kaseti, birden fazla transgeni, örneğin 1 veya 2 gibi 1, 2, 3 veya 4 transgen içerebilir.

Bir veya daha fazla düzenlemede bu kaset, Şekillerin veya örneklerin birinde veya daha fazlasında gösterildiği gibi düzenlenmektedir.

15 Bu kullanıldığı haliyle, transgen kasedi, bir ya da daha çok kodlama sekansı ve bir ya da daha çok düzenleyici öge biçiminde bir ya da daha çok transgen kodlayan bir DNA dizisini ifade etmektedir.

Bir transgen kaset, bir veya daha fazla monosistronik ve / veya polisistronik mRNA dizisini kodlayabilir.

20 Bir düzenlemede, transgen veya transgen kaseti, monosistronik veya polisistronik bir mRNA'yı kodlar ve örneğin, kaset, bir endojen promotör veya egzojen promotör veya bunların bir kombinasyonunun kontrolü altında bir yerde adenovirüs genomuna yerleştirilmeye uygundur.

Burada kullanıldığı haliyle, monosistronik mRNA, tek bir fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya proteini kodlayan bir mRNA molekülünü ifade eder.

25 Bir düzenlemede, transgen kaseti monosistronik mRNA'yı kodlar.

Bir düzenlemede, monosistronik mRNA'yı kodlayan bir kaset bağlamında transgen kaseti, isteğe bağlı olarak bir egzojen promotör (transgenin aktif olduğu yeri ve zamanı belirleyecek bir düzenleyici sekans olan) ya da bir ek yeri bölgesi (bir mRNA molekülünün splayozom tarafından ne zaman bölüneceğini belirleyen bir düzenleyici sekans olan), bir kodlama sekansı (yani, transgen) içeren bir DNA segmentini ifade

30

eder, genellikle ilgili proteinin cDNA'sından türetilir, opsiyonel olarak da bir poliA sinyal sekansı ve bir sonlandırma sekansı içerir.

Bir düzenlemede, transgen kaseti, bir veya daha fazla polisistronik mRNA sekansını kodlar.

- 5 Burada kullanıldığı haliyle, polisistronik mRNA, iki veya daha fazla fonksiyonel RNA, peptit veya protein veya bunların bir kombinasyonunu kodlayan bir mRNA molekülünü ifade eder. Bir düzenlemede, transgen kaseti bir polisistronik mRNA'yı kodlar.

- 10 Bir düzenlemede, polokistronik mRNA'yı kodlayan bir kaset bağlamında transgen kaseti, isteğe bağlı olarak bir egzogen promotör (transgenin aktif olduğu yeri ve zamanı belirleyecek bir düzenleyici sekans olan) ya da bir ek yeri bölgesi (bir mRNA molekülünün splayozom tarafından ne zaman bölüneceğini belirleyen bir düzenleyici sekans olan), iki ya da daha kodlama sekansı (yani, transgenler) içeren, genellikle ilgili proteinin cDNA'sından türetilen, örneğin her kodlama sekansının ya bir IRES ya
- 15 da bir 2A peptidi ile ayrıldığı bir DNA segmenti içerir. Transkripsiyon yapılacak son kodlama sekansını takiben, kaset isteğe bağlı olarak bir poliA sekansı ve bir sonlandırma sekansı içerebilir.

- Bir düzenlemede transgen kasedi, ardından bir monosistronik mRNA'yı kodlar, bunu polisistronik mRNA takip eder. Başka bir düzenlemede, transgen kaseti bir
- 20 polisistronik mRNA'yı, ardından bir monosistronik mRNA'yı kodlar.

Mevcut açıklama, bir grup B adenovirüsü ile ilgilidir. Grup B adenovirüsü, bir insan adenovirüsüdür. Mevcut açıklamaya göre olan adenovirüs, ayrıca, herhangi bir, henüz tanımlanmamış veya sınıflandırılmamış adenoviral serotipleri de kapsar.

Şu anda 50'den fazla bilinen adenoviral serotipler AF'lerin alt gruplarına ayrılmıştır.

- 25 Bakın, örneğin, **Tablo 1**'de gösterildiği gibi Strauss, "Adenovirus infections in humans," in The Adenoviruses, Ginsberg, ea. , Plenum Press, New York, NY, pp. 451- 596 (1984) ve Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," in Fields Virology, Vol. 2, Fourth Edition, Knipe, 35ea. , Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265- 2267 (2001).

Alt Grup	Adenoviral serotip
----------	--------------------

A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51
C	1, 2, 5, 6
D	8- 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22- 30, 32, 33, 36- 39, 42- 49, 50
E	4
F	40, 41

Mevcut açıklamada adı geçen adenovirüs, örneğin, Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34 ve Ad51'den oluşan ya da bunları içeren gruptan bağımsız olarak seçilen, mesela Ad11, özellikle de Ad11p (Slobitski suşu) gibi bir alt grup B'dir. Bir düzenlemede buluşa ait adenovirüs, Ad11, özellikle de Ad11p gibi bir alt grup B adenovirüsünün hekzonu ve / veya elyafı gibi kapsid'e sahiptir. Bir düzenlemede adenovirüs, Ad11'dir veya Ad11p gibi, Ad11'in fiberine ve / veya hekzon ve / veya pentonuna sahiptir.

Bir düzenlemede, bu bir grup A virüsü değildir.

- 5 Bir düzenlemede bu adenovirüs, bir C grubu virüsü değildir. Bir düzenlemede bu adenovirüs, Ad5 **değildir**. Burada kullanılan şekliyle Ad5, serotip 5 olarak adlandırılan bilinen adenovirüsleri belirtir, Ad5'in dizilerini içeren genetik olarak işlenmiş virüsleri kapsamaz. Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait virüsler bir Ad5 kapsidine sahip değildir.
- 10 Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait adenovirüs, kimeriktir. Bir adenovirüs kimerik olduğu zaman, serotipi belirlemek için dış kapsid karakteristikleri kullanılacaktır. Burada kullanılan haliyle kimerik, aynı grup içinde farklı serotipler de dahil olmak üzere en az iki farklı virüs serotipinden DNA içeren bir virüse karşılık gelir.
- 15 Bir düzenlemede, onkolitik virüs aynı serotipten, örneğin ikincisinin genomik sekansının 30812- 31789, 18254- 21100 ve 13682- 15367 pozisyonlarında bulunan mesela Ad11, özellikle Ad11p'den bir fiber, hekzon ve penton proteinlerine sahiptir,

burada nükleotid pozisyonları gen bankası ID 217307399 (erişim numarası: GC689208) ile ilişkilidir.

Bir düzenlemede, adenovirüs enadenotucirev'tir (EnAd olarak ve daha önce EnAd olarak da bilinir). Burada kullanılan haliyle enadenotucirev, SEK ID NO: 12'nin
5 kimerik adenovirüsünü belirtir. Bu, yabani tipte adenovirüslere kıyasla arttırılmış terapötik özelliklere sahip olan bir replikasyona yetkin onkolitik kimerik adenovirüstür (bkz. WO2005 / 118825). EnAd, Ad11p ve Ad3'ten DNA'ya ve E3 / E4'te delesyonlara sahip olan bir kimerik E2B bölgesine sahiptir. Enadenotucirev'deki yapısal değişiklikler, Ad11p'den yaklaşık 3. 5 kb daha küçük bir genom ile sonuçlanır,
10 böylece transgenlerin eklenmesi için ek "alan" sağlanır.

OvAd1 ve OvAd2 ayrıca genomda ilave "alan" bulunan enadenotucirev'e benzer kimerik adenovirüslerdir (bkz. WO2008 / 080003). Dolayısıyla bir düzenlemede, bu adenovirüs OvAd1 veya OvAd2'dir.

Bir düzenlemede, bu adenovirüs onkolitiktir. Burada kullanılan şekliyle onkolitik
15 adenovirüs, kanserli olmayan hücrelerle karşılaştırıldığında tercih edilen şekliyle kanser hücrelerini öldüren bir adenovirüs anlamına gelir.

Bir düzenlemede, onkolitik virüs apoptotiktir. Yani, programlanmış hücre ölümünü hızlandırır.

Bir düzenlemede, onkolitik virüs sitolitiktir. Açıklamanın onkolitik adenovirüslerinin
20 sitolitik aktivitesi, temsili tümör hücre dizilerinde belirlenebilir ve veriler, örneğin, standart olarak kullanılan Ad5 gibi C alt grubuna ait bir adenovirüs ile potansiyelin bir ölçümüne dönüştürülür (yani, bir 1'lik bir potansiyel verir). Sitolitik aktivitenin belirlenmesi için uygun bir yöntem, bir MTS tahlilidir (bkz. Örnek 4, Şekil 2, WO2005 / 118825).

25 Bir düzenlemede, bu onkolitik virüs nekrolitiktir. Yani, hücre nekrozu veya immünojenik hücre ölümüne neden olur veya bunu hızlandırır. Bir düzenlemede, nekrolitik hücre ölümü, hastaların (konakçı) bağışıklık tepkilerini tetiklediği, indüklediği için avantajlıdır.

Mevcut tarifname bağlamında replikasyona yetkin olma, hücrelerde *in vitro* ve *in vivo*,
30 çoğaltılması için gerekli tüm düzeneğe sahip olan, yani bir sarma hücre hattının yardımı olmayan bir virüs anlamına gelir. Örneğin, E1 bölgesinde silinmiş,

tamamlayıcı bir paketleme hücre dizisinde çoğalabilen bir viral vektör mevcut bağlamda replikasyona uygun bir virüs değildir.

Viral vektörler replikasyon bakımından yetersizdir ve replikasyona izin vermek için tamamlayıcı bir gen sağlamak üzere bir paketleme hücresi gerektirir.

- 5 Burada kullanılan şekliyle adenovirüs genomu, bir adenovirüsün fonksiyon / yaşam döngüsü ile ilgili yapısal proteinleri ve elemanları kodlayan DNA sekansı anlamına gelir.

Bugüne kadar incelenen tüm insan adenovirüs genomları aynı genel organizasyona sahiptir, yani spesifik fonksiyonları kodlayan genler viral genomda (burada yapısal 10 öğeler olarak anılacaktır) aynı pozisyonda bulunur. Viral genomun her ucu, viral replikasyon için gerekli ters uç tekrarı (veya ITR) olarak bilinen kısa bir diziye sahiptir. Viral genom beş erken transkripsiyon ünitesini (E1A, E1B, E2, E3 ve E4), üç gecikmiş erken üniteyi (IX, IVa2 ve E2 geç) ve bir geç üniteyi (büyük geç) içerir; bu geç mRNA'ların (L1- L5) beş ailesini oluşturmak için işlenir. Erken genler tarafından 15 kodlanan proteinler, en başta, enfeksiyona replikasyon ve konakçı hücrenin yanıtının modülasyonunda yer alırken, geç genler viral yapısal proteinleri kodlar. Erken genlere E harfi ile ön ek olarak eklenir ve geç genlerin önüne L harfi gelir.

Adenovirüslerin genomu sıkı bir şekilde paketlenir, yani, kodlanmayan sekans azdır ve bu nedenle transgenlerin yerleştirilmesi için uygun bir yer bulmak zor olabilir. 20 Mevcut buluş sahipleri, transgenlerin tolere edildiği iki DNA bölgesini tespit etmiştir; özellikle tespit edilen bu bölgeler, antikorları kodlayanlar gibi karmaşık transgenlerin yerleştirilmesi için uygundur. Yani, transgen, virüsün yaşayabilirliğini, onkolitik özellikler veya replikasyon gibi doğal özelliklerini olumsuz bir şekilde etkilemeksizin eksprese edilir.

25 Bir düzenlemede, açıklamaya göre olan onkolitik veya kısmen onkolitik virüs, E4 ve/veya E3 bölgesindeki silinmenin bir sonucu gibi, örneğin E4 bölgesinin bir kısmında silinmiş veya E3 bölgesinde tamamen silinmiş veya alternatif olarak, E4 bölgesinde (örn. , E4orf4) kısmen silinmiş ve E3 bölgesinde tamamen silinmiş gibi, örneğin burada açıklanan sekanslarda örneklendirildiği gibi olabilir.

30 Bir düzenlemede, açıklamanın onkolitik virüsü kimeriktir. Burada kullanılan kimerik, iki veya daha fazla farklı serotipten DNA içeren ve onkolitik virüs özelliklerine sahip olan virüse karşılık gelir.

Bir düzenlemede, onkolyitik virüs, EnAd veya bunun bir aktif türevi olup, Virüsün esas yararlı özelliklerini korur. EnAd, WO 2005 / 118825'de açıklanmaktadır ve virüs için tam sekans burada SEK ID NO: 12 olarak verilmektedir. Kimerik E2B bölgesi, burada SEK ID NO: 47 olarak açıklanmaktadır.

- 5 Alternatif onkolyitik virüsler, sırasıyla SEK ID NO: 2 ve 3 olarak WO2008 / 080003'te açıklanan OvAd1 ve OvAd2'yi içerir.

Avantaj sağlayan haliyle, mevcut açıklamanın adenovirüsleri, *in vitro olarak* çeşitli farklı kolon kanseri hücre dizilerinin enfeksiyonunun ardından EnAd'a benzer virüs etkinliği, örneğin replikasyon ve / veya enfekte edicilik profilleri sergilemektedir

10 ADENOVİRÜSLERİN YAPISAL ELEMANLARI

Mevcut açıklama ayrıca, burada açıklanan plazmidler gibi virüslerin veya viral bileşenlerin / yapıların yeni dizileri ile ilgilidir.

- 15 Bir düzenlemede formül (I) 'in bir bileşimi sağlanır, burada B_x ve B_y bir bağ değildir ve bir transgen, bir kısıtlama bölgesi veya her ikisini birden içerir, örneğin B_x ve B_y 'nin ikisi de bir transgendir.

Bir bağ, bir DNA sekansını başka bir DNA sekansına bağlayan, örneğin virüs genomunun bir bölümünü diğerine bağlayan kovalent bir bağ ifade eder. Dolayısıyla, burada formül (I) 'deki bir değişken bir bağ temsil ettiğinde, bağ ile temsil edilen özellik veya eleman yoktur, yani silinir.

- 20 Adenovirüslerin yapısı genel olarak benzer olduğu için, aşağıda yer alan öğeler, uzman kişi tarafından bilinen yapısal elemanlar ve bunlara atıfta bulunan yaygın olarak kullanılan nomenklatür açısından ele alınmaktadır. Burada bir elemana atıfta bulunulduğunda, bir adenovirüs içindeki elemanın aynı yapısal proteinini kodlayan bir DNA sekansını veya elemanı kodlayan DNA sekansına atıfta bulunuruz. İkincisi, 25 DNA kodunun fazlalığı nedeniyle ilgilidir. Virüslerin kodon kullanımı tercihleri, en iyi sonucu almak için göz önünde bulundurulmalıdır.

- 30 Mevcut açıklamanın virüslerinde kullanılan bir adenovirüsten herhangi bir yapısal eleman, doğal sekansı içerebilir veya bunlardan oluşabilir veya verilen uzunluk üzerinden en az % 95, mesela % 96, % 97, % 98, % 99 veya % 100 benzerliğe sahip olabilir. Orijinal sekans, genetik materyalin % 10, % 9, % 8, % 7, % 6, % 5, % 4, % 3, % 2 veya % 1'i dahil edilmeyecek şekilde modifiye edilebilir. Teknikte uzman kişiler,

değişiklik yaparken, yapısal proteinlerin ekspresyonu bozulmayacak şekilde virüsün okuma çerçevelerinin bozulmamasının gerektiğinin farkındadırlar.

Bir düzenlemede belirli eleman, tam uzunlukta bir sekans yani tam uzunluktaki gendir.

- 5 Bir düzenlemede belirli bir eleman, tam uzunluğun altındadır ve tam uzunlukta sekans ile aynı veya karşılık gelen fonksiyonu muhafaza eder.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamanın yapılarında isteğe bağlı olan belirli bir eleman için DNA sekansı tam uzunluğun altında olabilir ve işlevsellik taşımaz.

- 10 Adenovirüsün yapısal veya işlevsel proteinlerini kodlayan yapısal genler genellikle DNA'nın kodlamayan bölgeleriyle bağlantılıdır. Dolayısıyla, mevcut açıklamanın virüslerine bir transgenin sokulması amacıyla söz konusu yapısal elemanın genomik diziliminin "nerede kesileceği" (özellikle bunların kodlamayan bölgelerini) konusunda bir miktar esneklik vardır. Bu nedenle, mevcut tarifnamenin amaçları için, eleman, amaç için uygun olduğu ve yabancı malzemeyi kodlamadığı ölçüde, referans yapısal
- 15 bir unsur olarak düşünülür. Böylece, uygunsa, gen, örneğin virüsün doğal yapısında olduğu gibi, uygun kodlamayan bölgelerle ilişkilendirilecektir.

- Dolayısıyla bir düzenlemede bir kısıtlama bölgesi ve / veya transgeni kodlayan DNA gibi bir ek, genomik virüs DNA'sının kodlanmamış bir bölgesine, örneğin bir intron veya intergenik sekansa sokulur. Adenovirüsün bazı kodlamayan bölgelerinin,
- 20 örneğin alternatif ek yeri, transkripsiyon düzenleme ya da translasyon düzenlemesinde bir işleve sahip olabileceğini söyleyerek bunun dikkate alınması gerekebilir.

- Burada tanımlanan, L5 bölgesi ile bağlantılı olan alanlar, RNAi, sitokinler, antikorlar gibi tek zincirli veya multimerik proteinler gibi kompleks varlıkları kodlayan çeşitli DNA
- 25 sekanslarını yerleştirmek için uygundur.

Burada kullanıldığı şekliyle gen, kodlama ve bununla bağlantılı herhangi bir kodlamayan sekansı, örneğin intronlar ve ilişkili eksonları belirtir. Bir düzenlemede bir gen, sadece kodlayıcı bölge gibi, gerekli yapısal bileşenleri içerir veya bunlardan oluşur.

- 30 Aşağıda, adenovirüslerin spesifik yapısal öğeleri ile ilgili bir tartışma bulunmaktadır.

Ters Çevrilmiş Uç Tekrarlama (ITR) sekansları, bilinen tüm adenovirüslerde ortaktır ve simetrisi yüzünden bu şekilde adlandırılmışlardır ve replikasyonun viral kromozom kökenleridir. Bu sekansların bir diğer özelliği de bir saç tokası oluşturma kabiliyetidir.

- 5 Burada kullanıldığı haliyle 5'ITR, uygun bir lokasyonda bir adenovirüs içine dahil edildiğinde ITR'nin işlevini muhafaza eden bir adenovirüsün 5' ucundan bir ITR'nin bir kısmına veya tamamına değinmektedir. Bir düzenlemede, 5'ITR, SEK ID NO: 12'nin yaklaşık 1bp ila 138 bp'si arasındaki bir diziyi veya tüm uzunluk boyunca % 90, 95, 96, 97, 98 veya 99 aynı olan bir sekansı içerir ya da bunlardan oluşur, özellikle de
10 SEK ID NO: 12'nin yaklaşık 1bp ila 138 bp'sinden oluşur.

- Burada kullanılan şekliyle 3'ITR, uygun bir lokasyonda bir adenovirüs içine dahil edildiğinde ITR'nin işlevini muhafaza eden bir adenovirüsün 3' ucundan bir ITR'nin bir kısmını veya tamamını ifade eder. Bir düzenlemede, 3'ITR, SEK ID NO: 12'nin yaklaşık 32189 bp ila 32326bp'si arasındaki bir diziyi veya tüm uzunluk boyunca %
15 90, 95, 96, 97, 98 veya 99 aynı olan bir sekansı içerir ya da bunlardan oluşur, özellikle de SEK ID NO: 12'nin yaklaşık 32189 bp ila 32326 bp'sinden oluşur.

- B₁ burada kullanıldığı haliyle, bir adenovirüsün bir E1A'sının bir kısmını veya tamamını, bir adenovirüsün E1B bölgesinin bir kısmını veya tamamını ve bağımsız olarak bir adenovirüsün E1A ve E1B bölgesinin bir kısmını veya tamamını kodlayan
20 DNA sekansını belirtir.

- Burada kullanılan şekliyle E1A, bir adenovirüs E1A bölgesinin bir kısmını veya tamamını kodlayan DNA sekansı anlamına gelir. İkincisi, polipeptit / protein E1A'ya değinmektedir. E1A geni tarafından kodlanan protein, vahşi tipli (yani karşılık gelen mutasyona uğramamış protein) ile aynı işleve, vahşi tipli proteine kıyasla artmış
25 fonksiyona; örneğin vahşi tipli proteine kıyasla işlevsiz olma gibi azaltılmış işleve sahip olacak şekilde konservatif veya konservatif olmayan amino asit değişikliklerine sahip olacak şekilde mutasyona uğratılabilir veya vahşi tipli proteine veya uygun şekilde bunun bir kombinasyona kıyasla yeni bir fonksiyona sahiptir.

- Burada kullanıldığı haliyle E1B, bir adenovirüs E1B bölgesinin (yani, polipeptit veya
30 proteinin) bir kısmını veya tümünü kodlayan DNA sekansını ifade eder; E1B geni/bölgesi tarafından kodlanan protein, vahşi tipli (yani karşılık gelen mutasyona uğramamış protein) ile aynı işleve, vahşi tipli proteine kıyasla artmış fonksiyona;

örneğin vahşi tipli proteine kıyasla işlevsiz olma gibi azaltılmış işleve sahip olacak şekilde konservatif veya konservatif olmayan amino asit değişikliklerine sahip olacak şekilde mutasyona uğratılabilir veya vahşi tipli proteine veya uygun şekilde bunun bir kombinasyona kıyasla yeni bir fonksiyona sahiptir.

- 5 Böylece B₁ bir vahşi tip E1A ve / veya E1B gibi bir vahşi tip E1 bölgesine göre modifiye edilebilir veya modifiye edilemez. Tecrübeli kişi, E1A ve / veya E1B'nin mevcut olup olmadığını (kısmen) silinmiş veya mutasyona uğratılmış olup olmadığını kolayca tespit edebilir.

10 Burada kullanılan şekliyle vahşi tip, bilinen bir adenovirüs anlamına gelir. Bilinen bir adenovirüs, dizinin bulunup bulunmadığına bakılmaksızın tanımlanır ve adlandırılır.

Bir düzenlemede B₁ SEK ID NO: 12'ye ait 139bp ila 3932bp arasındaki bir diziye sahiptir.

15 Burada kullanıldığı haliyle B_A, uygun olan herhangi bir kodlamayan sekansı da kapsayacak şekilde E2B- L1- L2- L3- E2A- L4 bölgelerini kodlayan DNA sekansını ifade eder. Genellikle bu dizi, bir transgen içermeyecektir. Bir düzenlemede sekans, bilinen bir adenovirüs'ten, örneğin Tablo 1'de gösterilen bir serotip, özellikle bir B grubu virüsü, örneğin Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 ya da bunların Ad3, Ad11 gibi bir kombinasyonu veya bunların bir kombinasyonu gibi bir B grubu virüsü bitişik bir sekansla esas olarak benzer veya aynıdır. Bir düzenlemede,

20 E2B- L1- L2- L3- E2A- L4, bu elementleri ve bölge ile bağlantılı diğer yapısal elementleri içermeyi ifade eder, örneğin B_A genel olarak protein IV2a'yı kodlayan diziyi, örneğin aşağıdaki gibi; IV2A IV2a- E2B- L1- L2- L3- E2A- L4'ü içerecektir.

Bir düzenlemede E2B bölgesi kimeriktir. Yani, örneğin Ad3 ve Ad11'den gibi iki veya daha fazla farklı adenoviral serotipten, mesela Ad11p gibi DNA dizileri içerir. Bir

25 düzenlemede E2B bölgesi, SEK ID NO: 12'nin yaklaşık 5068bp ila 10355bp'si arasındaki bir sekansa veya bunun tüm uzunluğu boyunca % 95, % 96, % 97, % 98 veya % 99 aynı olan bir sekansa sahiptir.

Bir düzenlemede bileşen B_A'daki E2B, SEK ID NO: 47'de gösterilen dizileri içermektedir (WO2005 / 118825'de açıklanan SEK ID NO: 3' karşılık gelmektedir).

30 Bir düzenlemede B_A SEK ID NO: 12'nin 3933bp ila 27184bp arasındaki bir dizisine sahiptir.

Burada kullanıldığı haliyle E3B, bir adenovirüs E3B bölgesinin (yani, proteinin / polipeptidin) bir kısmını veya tümünü kodlayan DNA sekansını ifade eder; E3B geni/bölgesi tarafından kodlanan protein, vahşi tipli (yani karşılık gelen mutasyona uğramamış protein) ile aynı işleve, vahşi tipli proteine kıyasla artmış fonksiyona; 5 örneğin vahşi tipli proteine kıyasla işlevsiz olma gibi azaltılmış işleve sahip olacak şekilde konservatif veya konservatif olmayan amino asit değişikliklerine sahip olacak şekilde mutasyona uğratılabilir veya vahşi tipli proteine veya uygun şekilde bunun bir kombinasyona kıyasla yeni bir fonksiyona sahiptir.

10 Bir düzenlemede E3 bölgesi, Tablo 1'de verilen bir adenovirüs serotipinden veya bunların bir kombinasyonundan, özellikle bir grup B serotipi, örneğin Ad3, Ad7, Ad11 (özellikle Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 ya da bunların bir kombinasyonu, örneğin Ad3, Ad11 (özellikle Ad11p) ya da bunların bir kombinasyonundandır.

15 Bir düzenlemede E3 bölgesi kısmen silinir, örneğin % 95, % 90, % 85, % 80, % 75, % 70, % 65, % 60, % 55, % 50, % 45, % 40, % 35, % 30, % 25, % 20, % 15, % 10, % 5 silindi. Bir düzenlemede B₂ E3 bölgesini kodlayan DNA'nın mevcut olmadığı bir bağdır.

20 Bir düzenlemede E3 bölgesini kodlayan DNA, bir transgen ile değiştirilebilir veya kesilebilir. Burada kullanıldığı şekliyle "bir transgen ile değiştirilen E3 bölgesi", E3 bölgesinin bir kısmı veya tamamını içerir, bir transgen ile değiştirilir.

Bir düzenlemede B₂ bölgesi SEK ID NO: 12'nin 27185bp ila 28165bp arasındaki bir dizisini içerir.

Bir düzenlemede B₂ SEK ID NO: 12'nin 27185bp ila 28165bp arasındaki bir diziden oluşur.

25 Burada kullanıldığı haliyle B_x, B_B'deki L5 geninin 5' ucunun yakınındaki DNA sekansını ifade eder. Burada kullanılan şekliyle L5 geninin 5' ucunun etrafında veya yakınında L5 geninin 5' ucuna komşu (bitişik) veya bununla doğal olarak bağlantılı olan, yani L5 geninin 5' ucuna dayanan veya bitişik olan ya da doğal olarak bununla bağlantılı olan bir kodlayıcı olmayan bölge bir kodlamayan bölgeyi ifade eder. 30 Alternatif olarak, etrafında ya da yakınında terimleri, L5 genine yakın olmayı ifade eder, öyle ki B_x bölgesi ve L5 geninin 5'ucu arasında hiç kodlama sekansı bulunmaz.

Bundan dolayı, bir düzenlemede B_x, örneğin L5 geninin bir kodlama dizisinin başlangıcını temsil eden bir L5 tabanına doğrudan birleştirilir.

Bu sayede, bir düzenlemede B_x örneğin kodlanmamış bir sekansın başlangıcını temsil eden veya L5 ile doğal olarak bağlantılı olan kodlamayan bir bölgeye doğrudan birleştirilen bir L5 tabanına doğrudan birleştirilir. Burada kullanıldığı haliyle doğal olarak L5 ile ilişkilendirilen kodlamayan bir bölge, L5 geninin bir parçası olan veya bununla bitişik olan, ancak başka bir genin bir parçası olmayan kodlayıcı olmayan tüm bölgelerin bir kısmını ifade eder.

Bir düzenlemede B_x SEK ID NO: 10 dizisini içermektedir. Bu dizi, örneğin bir transgen (veya transgen kasedi), bir kısıtlama bölgesi veya bunların bir kombinasyonunu içeren bir DNA dizisinin içine sokulabileceği yapay kodlanmayan bir sekanstır. Bu sekans, virüs stabilitesi ve yaşayabilirliği üzerindeki yıkıcı etkileri en aza düşürürken, transgenin tam yeri üzerinde bazı esneklik sağlayan bir tampon görevi gördüğü için avantajlıdır.

Eklemeler herhangi bir SEK ID NO: 10 içinde 5' ucundan, 3' ucuna kadar herhangi bir yerde ya da 1 ila 201 baz çiftleri arasındaki herhangi bir noktada örneğin 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, 34/35, 35/36, 36/37, 37/38, 38/39, 39/40, 40/41, 41/42, 42/43, 43/44, 44/45, 45/46, 46/47, 47/48, 48/49, 49/50, 50/51, 51/52, 52/53, 53/54, 54/55, 55/56, 56/57, 57/58, 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 63/64, 64/65, 65/66, 66/67, 67/68, 68/69, 69/70, 70/71, 71/72, 72/73, 73/74, 74/75, 75/76, 76/77, 77/78, 78/79, 79/80, 80/81, 81/82, 82/83, 83/84, 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 88/89, 89/90, 90/91, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96, 96/97, 97/98, 98/99, 99/100, 100/101, 101/102, 102/103, 103/104, 104/105, 105/106, 106/107, 107/108, 108/109, 109/110, 110/111, 111/112, 112/113, 113/114, 114/115, 115/116, 116/117, 117/118, 118/119, 119/120, 120/121, 121/122, 122/123, 123/124, 124/125, 125/126, 126/127, 127/128, 128/129, 129/130, 130/131, 131/132, 132/133, 133/134, 134/135, 135/136, 136/137, 138/137, 138/139, 139/140, 140/141, 141/142, 142/143, 143/144, 144/145, 145/146, 146/147, 147/148, 148/149, 150/151, 151/152, 152/153, 153/154, 154/155, 155/156, 156/157, 157/158, 158/159, 159/160, 160/161, 161/162, 162/163, 163/164, 164/165, 165/166, 166/167, 167/168, 168/169, 169/170, 170/171, 171/172, 172/173, 173/174, 174/175, 175/176, 176/177, 177/178, 178/179, 179/180, 180/181, 181/182,

182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188, 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195, 195/196, 196/197, 197/198, 198/199, 199/200 veya 200/201 ortaya çıkabilir.

5 Bir düzenlemede B_x, bp 27 ile bp 28 arasına veya SEK ID NO: 12'nin 28192bp ve 28193bp pozisyonları arasında karşılık gelen bir yere sokulan bir DNA sekansına sahip SEK ID NO: 10'u içerir.

10 Bir düzenlemede eklenti, bir kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede, kısıtlama bölgesi eklentisi bir veya iki kısıtlama bölgesi içerir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi, 2 kısıtlama bölgesi içeren bir 19bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi eklentisi, 1 kısıtlama bölgesi içeren bir 9bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi eklentisi bir veya iki kısıtlama bölgesi ve en az bir transgene, örneğin bir veya iki transgen içerir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi, 2 kısıtlama bölgesi ve en az bir transgene, örneğin bir veya iki transgen ihtiva eden bir 19bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi eklentisi, 1 kısıtlama bölgesi ve en az bir transgene, örneğin bir, iki veya üç transgen mesela bir ya da iki transgen ihtiva eden bir 9bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede iki kısıtlama bölgesi, bir veya daha fazla mesela, iki transgeni (örneğin bir transgen kasetinde) sıkıştırır. Bir düzenlemede B_x bahsedilen kısıtlama bölgeleri birbirinden farklı olduğunda iki kısıtlama bölgesi içermektedir. Bir düzenlemede, B_x 'deki söz konusu bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi eklendikleri belirli bir adenovirüs genomunda doğal olarak bulunmazlar. Bir düzenlemede, B_x'deki bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi adenovirüs genomunun herhangi bir yerinde bulunan diğer kısıtlama bölgelerinden, örneğin doğal olarak oluşan kısıtlama bölgelerinden ve / veya genomun diğer bölümlerine, örneğin B_y'ye dahil edilen bir kısıtlama bölgesi farklıdır. Dolayısıyla bir düzenlemede kısıtlama bölgesi veya bölgeleri, kesitteki DNA'nın spesifik olarak kesilmesine olanak tanır.

Avantaj sağlayan haliyle, "benzersiz" kısıtlama bölgelerinin kullanılması, basitçe uygun kısıtlama enzimini kullanarak virüs genomunun kesildiği yerin seçiciliğini ve kontrolünü sağlar.

30 Burada kullanılan şekliyle spesifik olarak kesme, kısıtlama bölgeleri için spesifik bir enzimin kullanılmasının, virüsü sadece arzu edilen yerde, genellikle bir konumda kesmesine ve bazen de bir çift konum olabileceğine işaret etmektedir. Burada

kullanıldığı gibi bir çift konum, aynı enzim tarafından kesilecek şekilde tasarlanan birbirine yakın iki kısıtlama bölgesini (yani, birbirinden ayırt edilemez) ifade eder.

Bir düzenlemede, kısıtlama yeri eklentisi, SEK ID NO: 55'tir.

5 Bir düzenlemede B_x SEK ID NO: 12'nin 28166bp ila 28366bp'si arasında bir diziye sahiptir.

Bir düzenlemede, B_x bir bağıdır.

Burada kullanıldığı haliyle, B_B L5 bölgesi kodlayan DNA sekansını ifade eder. Burada kullanıldığı şekliyle, L5 bölgesi, bağlamda uygun olarak, fiber polipeptidini / proteinini kodlayan geni ihtiva eden DNA dizisine karşılık gelir. Fiber gen / bölge, 10 adenovirüslerin önemli bir kapsid bileşenini oluşturan lif proteinini kodlar. Fiber, reseptör tanımda işlev görür ve adenovirüsün hücreleri seçici olarak bağlama ve enfekte etme kabiliyetine katkıda bulunur.

Mevcut açıklamaya ait virüslerde, fiber bir grup B virüsünden, özellikle Ad11'den, mesela Ad11p'den gelmektedir.

15 Bir düzenlemede B_B SEK ID NO: 12'nin 28367bp ila 29344bp'si arasında bir diziye sahiptir.

B_Y ile ilişkili DNA sekansı, burada kullanıldığı haliyle, B_B'nin L5 geninin 3' ucunun yakınındaki DNA sekansını ifade eder. Burada kullanılan şekliyle L5 geninin 3' ucunun etrafında veya yakınında L5 geninin 3' ucuna komşu (bitişik) veya bununla 20 doğal olarak bağlantılı olan, yani L5 geninin 3' ucuna dayanan veya bitişik olan ya da doğal olarak bununla bağlantılı olan (yani, L5'e endojen olan kodlayıcı olmayan bir dizinin tümü veya bir kısmı) bir kodlayıcı olmayan bölge bir kodlamayan bölgeyi ifade eder. Alternatif olarak, etrafında ya da yakınında terimleri, L5 genine yakın olmayı ifade eder, öyle ki B_Y bölgesi ve L5 geninin 3' ucu arasında hiç kodlama sekansı 25 bulunmaz.

Bundan dolayı, bir düzenlemede B_Y doğrudan bir kodlama sekansının "ucunu" temsil eden bir L5 tabanına birleştirilir.

Bu sayede, bir düzenlemede B_Y kodlanmamış bir sekansın "bitişini" temsil eden veya L5 ile doğal olarak bağlantılı olan kodlamayan bir bölgeye doğrudan birleştirilen bir 30 L5 tabanına doğrudan birleştirilir.

Tabiatı gereği ve doğal olarak burada birbirlerinin yerine kullanılırlar. Bir düzenlemede B_Y SEK ID NO: 11 dizisini içermektedir. Bu dizi, örneğin bir transgen (veya transgen kasedi), bir kısıtlama bölgesi veya bunların bir kombinasyonunu içeren bir DNA dizisinin içine sokulabileceği kodlanmayan bir sekanstır. Bu sekans, virüs stabilitesi ve yaşayabilirliği üzerindeki yıkıcı etkileri en aza düşürürken, transgenin tam yeri üzerinde bir miktar esneklik sağlayan bir tampon görevi gördüğü için avantajlıdır.

Eklentiler, SEK ID NO: 11'in içinde 5' ucundan, 3' ucundan veya bp 1 ila 35 arasındaki herhangi bir noktada, örneğin 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16 / 17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34 veya 34/35 taban çiftleri arasında herhangi bir yerde meydana gelebilir.

Bir düzenlemede B_Y, bp 12 ve 13 pozisyonları arasına yerleştirilen bir DNA sekansına veya SEK ID NO: 12'de 29356 bp ve 29357 bp'ye tekabül eden bir yere sahip bir SEK ID NO: 11 ihtiva eder. Bir düzenlemede eklenti, bir kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede, kısıtlama bölgesi eklentisi bir veya iki kısıtlama bölgesi içerir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi, 2 kısıtlama bölgesi içeren bir 19bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi eklentisi, 1 kısıtlama bölgesi içeren bir 9bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi eklentisi bir veya iki kısıtlama bölgesi ve en az bir transgene, örneğin bir veya iki veya üç transgen, mesela bir veya iki transgen içerir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi, 2 kısıtlama bölgesi ve en az bir transgene, örneğin bir veya iki transgen ihtiva eden bir 19bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede kısıtlama bölgesi, 1 kısıtlama bölgesi ve en az bir transgene, örneğin bir veya iki transgen ihtiva eden bir 9bp kısıtlama bölgesi eklentisidir. Bir düzenlemede iki kısıtlama bölgesi, bir veya daha fazla mesela, iki transgeni (örneğin bir transgen kasetinde) sıkıştırır. Bir düzenlemede B_Y bahsedilen kısıtlama bölgeleri birbirinden farklı olduğunda iki kısıtlama bölgesi içermektedir. Bir düzenlemede, B_Y 'deki söz konusu bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi eklendikleri belirli bir adenovirüs genomunda doğal olarak (benzersizdirler) bulunmazlar. Bir düzenlemede, B_Y'deki söz konusu bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi adenovirüs genomunun herhangi bir yerinde bulunan diğer kısıtlama bölgelerinden, örneğin doğal olarak oluşan kısıtlama bölgelerinden veya genomun diğer bölümlerine, örneğin B_X'e dahil edilen bir kısıtlama bölgesinden

farklıdır. Dolayısıyla bir düzenlemede kısıtlama bölgesi veya bölgeleri, kesitteki DNA'nın spesifik olarak kesilmesine olanak tanır.

Bir düzenlemede, kısıtlama bölgesi eklentisi, SEK ID NO: 54'tür.

5 Bir düzenlemede B_Y SEK ID NO: 12'nin 29345 bp ila 29379 bp'si arasında bir diziye sahiptir.

Bir düzenlemede, B_Y bir bağıdır.

Bir düzenlemede eklenti, SEK ID NO: 11'de bp 12'den sonra yer alır.

Bir düzenlemede eklenti, SEK ID NO: 12'nin yaklaşık 29356 bp'lik bir konumundadır.

10 Bir düzenlemede eklenti, bir veya daha fazla örneğin 1, 2 veya 3, mesela 1 veya 2 transgen içeren bir transgen kasetidir.

Burada kullanıldığı haliyle E4, bir adenovirüs E4 bölgesinin (yani, polipeptit / protein bölgesinin) bir kısmını veya tümünü kodlayan DNA sekansını ifade etmekte olup, bu E4 geni tarafından kodlanan protein, konservatif ya da konservatif olmayan amino asit değişikliklerine ve vahşi tipli (yani karşılık gelen mutasyona uğramamış protein) ile aynı işleve sahip olacak; vahşi tipli ile kıyaslandığında arttırılmış fonksiyona; vahşi tipli proteine kıyasla hiç bir işleve sahip olmama gibi azaltılmış fonksiyona ya da vahşi tipli proteine kıyasla yeni bir fonksiyona ya da uygun biçimde bunların bir kombinasyonuna sahip olacak şekilde mutasyona uğratılabilir.

20 Bir düzenlemede E4 bölgesi kısmen silinir, örneğin % 95, % 90, % 85, % 80, % 75, % 70, % 65, % 60, % 55, % 50, % 45, % 40, % 35, % 30, % 25, % 20, % 15, % 10, % 5 silinir. Bir düzenlemede E4 bölgesi, SEK ID NO: 12'nin 32188bp ila 29380bp'si arasındaki bir diziye sahiptir.

Bir düzenlemede B₃ bir bağıdır, yani E4 mevcut değildir. Bir düzenlemede B₃ SEK ID NO: 12'nin 32188bp ila 29380bp'si arasında bir diziye sahiptir.

25 Burada kullanılan sayı aralıkları bitiş noktalarını kapsar.

Teknikte uzman kişiler burada formül (I) gibi formüllerde yer alan elementlerin bitişik olduğunu ve burada bahsedilen genlerin ve kodlayıcı DNA sekanslarının (yapısal özellikler) yanı sıra kodlamayan DNA sekanslarını da kapsanabileceğini takdir edeceklerdir. Bir veya daha fazla düzenlemede, mevcut açıklamanın formülleri, 30 adenovirüs genomunda doğal olarak oluşan bir sekansı tarif etmeye çalışmaktadır.

Bu bağlamda, deneyimli bir kişi için formülün, genomun ilgili bölümünü karakterize eden başlıca unsurlara atıfta bulunduğu ve DNA genomik esnemesinin kapsamlı bir tarifi olmayı amaçlamadığı açıktır.

5 Burada kullanılan şekliyle E1A, E1B, E3 ve E4, her biri bağımsız olarak, burada tarif edildiği gibi her bölgenin vahşi tipini ve bunların eşdeğerlerini, mutasyona uğramış veya kısmen silinmiş formlarını, bilhassa bilinen bir adenovirüsten bir vahşi tipli diziyi ifade eder.

10 Burada kullanıldığı şekliyle "eklenti", 5' ucunda, 3' ucunda ya da referans sekansını kesecek şekilde veya belirli bir DNA sekansı referans segmentine birleştirilmiş bir DNA sekansını ifade eder. İkincisi, eklentinin yerleştirilmesi ile ilişkili referans noktası olarak kullanılan bir referans dizisidir. Mevcut açıklamanın bağlamında, eklentiler genellikle ya SEK ID NO: 10 ya da SEK ID NO: 11 içinde ortaya çıkar. Bir eklenti, ya bir kısıtlama bölgesi eklentisi, bir transjen kaseti veya her ikisi olabilir. Dizi kesildiğinde, virüs orijinal diziyi hala içerecek, ancak genel olarak eklentiye sıkıştıran
15 iki fragman gibi olacaktır.

Bir düzenlemede transgen veya transgen kaseti, TN7 bir transpozon veya bunun bir parçası gibi yansız bir yerleştirme transpozonu içermez. Burada kullanılan haliyle Tn7 transpozonu, WO2008 / 080003'de tarif edildiği gibi yansız bir yerleştirme transpozonunu ifade eder.

20 **Kısıtlama Bölgeleri**

Burada açıklanan konumlardaki kısıtlama bölgeleri (örneğin B_x ve / veya B_y), virüslerde ve mevcut açıklamanın plazmid gibi yapılarında faydalıdır, çünkü bunlar transgenin hızlı bir şekilde değiştirilmesine ve seçimli olarak transgenin (lerin) etrafındaki kısıtlama bölgelerinin benzersiz olacağı zamana olanak tanırırlar.

25 Burada kullanıldığı şekliyle benzersiz, virüsün veya yapının tamamında yalnızca tek bir oluşumu ifade eder.

Bir düzenlemede, transgen veya transgen kaseti her uçta bir kısıtlama bölgesi içerir ve böylece kasetin değiştirilmesi sağlanır.

30 Bir kısıtlama bölgesi, bir kısıtlama enzimi, genellikle sekansa özgü bir enzim tarafından kesilebilen bir DNA sekansındaki bir konumdur. Bir düzenlemede ise kısıtlama bölgesi, 3 ila 22, örneğin 4 ila 22 arasında, mesela 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ya da 22 taban çifti içerir. Kısıtlama enzimleri tarafından kesilen kısıtlama bölgelerinin örnekleri arasında bunlarla sınırlı olmamak üzere;

- 5' - GGCC çıkıntıları bırakarak NotI ve CciNI ile kesilen GCGGCCGC sekansı
- 5 • 3' - CCGG çıkıntıları bırakarak FseI ve RgiI tarafından kesilen GGCCGGCC sekansı
- 3' - AT çıkıntı bırakarak AsiSI, RgaI, SgfI ve SfaAI tarafından kesilen GCGATCGC sekansı
- 3' - TGCA çıkıntıları bırakarak SbfI, SdaI ve Sse83871 tarafından kesilen
10 CCTGCAGG sekansı
- 5' - GATC çıkıntıları bırakarak BclI, FbaI, Ksp221 ve BsiQ1 tarafından kesilen TGATCA sekansı
- 3' - GTGA çıkıntıları bırakarak I- CreI tarafından kesilen CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG [SEK ID NO: 74] sekansı
- 15 • 3' - CTAA çıkıntıları bırakarak I- CeuI tarafından kesilen TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA [SEK ID NO: 75] sekansı
- 3' - ATAA çıkıntıları bırakarak I- SceI tarafından kesilen TAGGGATAACAGGGTAAT [SEK ID NO: 76] sekansı
- kör uçları bırakarak SrfI tarafından kesilen GCCCGGGC sekansı
- 20 • kör uçları bırakarak MssI, PmeI tarafından kesilen GTTTAAAC sekansı
- kör uçları bırakarak SwaI, SmaI tarafından kesilen ATTTAAAT sekansı
- 5' - CGCG çıkıntıları bırakarak AscI, PaeA1 ve SgsI tarafından kesilen GGCGCGCC sekansı

Aynı tanıma bölgelerini kesen diğer kısıtlama enzimleri de uygun olabilir.

- 25 Bir düzenlemede, B_x ve B_y'deki bir veya daha fazla kısıtlama bölgesi burada tarif edilen bir enzim örneğin *NotI*, *FseI*, *AsiSI*, *SgfI* ve *SbfI* için spesifik bir kısıtlama bölgesi arasından bağımsız olarak seçilmektedir, özellikle, eklenen kısıtlama bölgeleri mesela *NotI* için spesifik bölgeler ve B_x'te konumlu *FseI* ve B_y'de konumlu *SgfI* ve *SbfI* için spesifik bölgeler tamamen farklıdır.

Bir düzenlemede yukarıda tartışıldığı gibi, bölge B_x ve / veya B_y bir kısıtlama bölgesi içermez. Avantaj sağlayan haliyle, bu açıklamanın virüsleri ve yapıları, örneğin sentetik teknikler kullanılarak kısıtlama bölgeleri olmadan hazırlanabilir. Bu teknikler, virüslerin ve yapıların oluşturulmasında büyük bir esneklik sağlar. Dahası mevcut buluş sahipleri, virüslerin ve yapıların sentetik tekniklerle hazırlandıklarında özelliklerinin azalmadığını tespit etmiştir.

Düzenleyiciler

Burada kullanılan haliyle düzenleyici, belirli bir genin veya genlerin transkripsiyonunu başlatan bir DNA bölgesi anlamına gelir. Düzenleyiciler genelde DNA üzerinde aynı iplikçikte ve kaynak yönünde (yani 5') kopyaladıkları genlerin yakınında bulunurlar. Bu bağlamda kullanıldığı şekliyle proksimal, bir düzenleyici olarak işlev görmeye yeterince yakın olmayı ifade eder. Bir düzenlemede düzenleyici, transkripsiyon başlangıç bölgesinin 100 bp'si dahilindedir. Dolayısıyla burada kullanılan şekliyle endojen promotör, transgenin sokulduğu adenovirüste (veya yapıda) doğal olarak bulunan bir promotöre karşılık gelir (yani doğaldır). Bir veya daha fazla düzenlemede kullanılan endojen promotör, virüste virüs genomundaki orijinal yerinde doğal olarak bulunan promotördür, özellikle de bu, transgenin veya transgenlerin sentezlenmesinde kullanılan primer veya sadece promotördür. Bir düzenlemede, transgenin translasyonunu ve isteğe bağlı olarak transkripsiyonunu teşvik etmek için kullanılan endojen promotör, adenovirüs genomuna entegre edilen ve daha önce rekombinant tekniklerle uygulanmamış bir promotördür.

Burada kullanıldığı haliyle, bir endojen promotörün kontrolü altında, transgen / transgen kasetinin, bahsedilen endojen promotörün kontrolü altına alınacak uygun oryantasyona sokulduğu yeri ifade etmektedir. Yani, promotör genellikle antisens iplikçik üzerinde olduğunda, kaset, örneğin antisens yönünde yerleştirilir.

Bunu söyleyerek, genler iki oryantasyondan birinde eksprese edilebilir. Bununla birlikte, genellikle bir oryantasyon, belirli bir (özel) transgen için, diğer oryantasyon üzerinde artan ekspresyon seviyeleri sağlar.

Bir düzenlemede bu kaset, duyu yönündedir. Yani, 5' ile 3' yönünde kopyalanır. Bir düzenlemede ise kaset antisens yönündedir. Yani, 3' ile 5' yönünde kopyalanır.

Virüsteki endojen promotörler, örneğin bir transgen ve bir ek yeri alıcı sekansını kodlayan bir genin kullanılmasıyla kullanılabilir. Dolayısıyla bir düzenlemede kaset,

bir endojen promotörün kontrolü altındayken bir ek yeri alıcı sekansı içerecektir. Dolayısıyla bir düzenlemede kodlama sekansı, örneğin antikoru veya antikoru bağlayan fragmanı kodlayan sekans, ayrıca bir ek yeri alıcı sekansı içerir.

Bir düzenlemede transgen, transgenler veya transgen kaseti, bir E4 promotörünün ya da büyük geç promotör (ML promotörü) gibi büyük bir geç promotörün kontrolü altındadır.

Burada kullanıldığı şekliyle kontrol altında olma, belirli bir promotör talimat verdiğinde transgenin aktive edildiği, yani kopyalanacağı anlamına gelir.

Burada kullanılan şekliyle Büyük Geç Promotör (ML promotörü veya MLP), L5 geni gibi "geç eksprese edilen" genlerin ekspresyonunu kontrol eden adenovirüs promotörünü ifade etmektedir. MLP bir "duyu iplikçığı" promotörüdür. Yani, promotör, 5'- 3' yönündeki promotörün aşağı yönünde olan genleri etkiler. Burada kullanılan en büyük ilerleyen promotör, virüs genomunda yer alan orjinal büyük geç promotörü belirtir.

Burada kullanılan şekliyle E4 promotörü, E4 bölgesinin adenovirüs promotörünü ifade eder. E4 bölgesi bir antisens bölgedir; bu nedenle promotör de bir antisens promotörüdür. Yani, promotör 3'- 5' yönünde E4 bölgesinin kaynak yönüdür. Dolayısıyla, E4 promotörünün kontrolü altındaki herhangi bir transgen kaseti uygun şekilde yönlendirilmelidir. Bir düzenlemede, E4 promotörünün kontrolü altındaki kaset antisens yönündedir. Bir düzenlemede kaset, E4 promotörünün kontrolü altında duyu yönündedir. Burada kullanıldığı şekliyle E4 promotörü, virüs genomunda bulunan orijinal E4 promotörünü ifade eder.

Bu nedenle bir düzenlemede, replikasyona yetkin onkolitik bir adenovirüs serotipi 11 (mesela Ad11p gibi) ya da fiber, hekson ve kapsidin serotip 11 (mesela Ad11p gibi) olduğu bunun bir virüs türevi sağlanmaktadır, burada virüs genomu bir terapötik antikoru ya da antikor bağlama fragmanını kodlayan bir DNA sekansı içerir, bahsedilen DNA sekansı E4 ve büyük geç promotörden (yani, E4 promotörü veya büyük geç promotör) oluşan gruptan seçilen adenovirüs için endojen olan bir promotörün kontrolü altındadır, öyle ki transgen virüs replikasyonunu engellemez, örneğin L5 bölgesi (yani bahsedilen bölgeden önce ya da sonra) ile ilişkilidir, mesela SEK ID NO: 1 ila 9, 46, 48 ila 53, 56 ila 63, 66- 69 ve 72- 73'da gösterildiği gibi örneğin virüs genomunda L5'ten sonra gelir.

Bir düzenlemede, bir endojen promotör, örneğin transgen kasetinde tanıtılan, rekombinant teknikler vasıtasıyla istenen bir yerde viral genoma dahil edilir. Bununla birlikte, mevcut tarifname bağlamında, bu düzenleme, genellikle, bir egzojen promotör olarak ifade edilecektir.

- 5 Bir düzenlemede transgen kaseti, bir egzojen promotör içerir. Burada kullanıldığı şekliyle egzojen promotör, transgenin sokulduğu adenovirüste doğal olarak bulunmayan bir promotörü ifade eder. Genellikle egzojen promotörler diğer virüslerdendir veya memeli promotörleridir. Burada kullanılan şekilde egzojen promotör, genin transkripsiyonunu düzenleyen, genellikle ilgilenilen genin yukarı
- 10 yönünde yer alan bir DNA elemanı anlamına gelir.

Bir düzenlemede gen ekspresyonu düzenleyici, CMV (sitomegalovirüs promotör), CBA (tavuk beta aktin promotörü) veya PGK (fosfogliserat kinaz 1 promotörü) gibi, mesela CMV promotörü gibi egzojen bir promotördür.

- Bir düzenlemede, kullanılan CMV egzojen promotör, SEK ID NO: 13'ün nükleotid
- 15 sekansına sahiptir. Bir düzenlemede, kullanılan PGK egzojen promotör, SEK ID NO: 14'ün nükleotid sekansına sahiptir. Bir düzenlemede, kullanılan CBA egzojen promotör, SEK ID NO: 15'in nükleotid sekansına sahiptir.

- Bir düzenlemede, replikasyona yetkin onkolotik bir adenovirüs serotipi 11 (mesela Ad11p gibi) ya da fiber, hekzon ve kapsidin serotip 11 (mesela Ad11p gibi) olduğu
- 20 bunun bir virüs türevi sağlanmaktadır, burada virüs genomu, virüs replikasyon döngüsü içinde geç eksprese edilen ve bu sayede transgenin virüs replikasyonunu engellemediği bir şekilde virüs genomunun bir kısmında bulunan bir terapötik antikoru ya da antikor bağlama fragmanını kodlayan bir DNA sekansı içerir, bahsedilen DNA sekansı adenovirüs (örneğin, CMV promotör) için egzojen bir
- 25 promotörün kontrolü altındadır. Bir düzenlemede, bir antikor veya fragmanı kodlayan DNA sekansı burada başka yerde tarif edildiği gibi L5 bölgesi ile bağlantılıdır.

- Bir düzenlemede, egzojen promotör, bir antijen sunucu hücre promotörüdür. Burada kullanıldığı şekliyle antijen sunucu hücre promotörü, dendritik hücreler veya
- 30 makrofajlar gibi antijen sunucu hücreler tarafından seçimli olarak eksprese edilen bir gen için bir promotörü ifade eder. Bu gibi genler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere FLT- 3, FLT- 3 ligandı, TLR'ler, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83,

CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, GTR Ligandı, IFN- α 2, IL- 12, IL- 23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, TSLP Reseptörü, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 ya da CD304; CTIIA veya GILT gibi antijen işleme ve sunum araçları bulunur. Dolayısıyla bir düzenlemede, egzojen promotörü, bahsedilen antijen sunucu hücrelerdeki transgenlerin seçimli olarak ekspresyonu için uygundur.

Diğer Düzenleyici Sekanslar

Burada kullanıldığı şekliyle "gen ekspresyon düzenleyicisi" (veya düzenleyici / düzenleyici eleman), gen ekspresyonunda, tipik olarak transkripsiyonu veya translasyonu başlatarak veya zenginleştirerek bir rol oynayan bir promotörü, güçlendiriciyi veya bir ek yeri alıcı dizisi gibi bir genetik özelliği ifade eder.

Bu kullanıldığı haliyle, "ek yeri alıcı dizisi", "ek yeri alıcısı" ya da "ek yeri bölgesi", bir mRNA molekülünün, spliceozom kompleksinin küçük nükleer ribonükleoproteinleri tarafından ne zaman tanınacağını belirleyen bir düzenleyici sekansı ifade eder. Bir kez birleştirildikten sonra, spliceozom, mRNA molekülünün ek yeri alıcı sahası ile, bir tekli polipeptit veya protein üretmek üzere dönüştürülecek olgun bir mRNA molekülü üreten bir yukarı doğru ek yeri verici bölgeye bağlanmasını katalize eder.

Mevcut buluşta farklı boyutlu ek yeri alıcı dizileri kullanılabilir ve bunlar kısa ek yeri alıcısı (küçük), ek yeri alıcısı (orta) ve dallı ek yeri alıcısı (geniş) olarak tanımlanabilir.

Burada kullanıldığı haliyle SSA, tipik olarak sadece ekleme bölgesini, örneğin 4 bp içeren kısa bir ek yeri alıcısı anlamına gelmektedir. Burada kullanıldığı haliyle "SA", tipik olarak kısa ek yeri alıcısı ve polipirimidin bölgesinden, örneğin 16 bp'den oluşan bir ek yeri alıcısı anlamına gelmektedir. Burada kullanılan şekilde "bSA", tipik olarak kısa ek yeri alıcısı, polipirimidin bölgesi ve dallanma noktası, örneğin 26 bp'yi içeren dallı bir ek yeri alıcısı anlamına gelir.

Bir düzenlemede, açıklamanın yapılarında kullanılan ek yeri alıcısı, SEK ID NO: 16 ila 18'de gösterilmiştir. Bir düzenlemede SSA, SEK ID NO: 16'nın nükleotid sekansına sahiptir. Bir düzenlemede SA, SEK ID NO: 17'nin nükleotid sekansına sahiptir. Bir düzenlemede bSA, SEK ID NO: 18'in nükleotid sekansına sahiptir. Bir düzenlemede, ek yeri alıcı sekansı bağımsız olarak TGCTAATCTT CCTTTCTCTC TTCAGG (SEK ID NO: 18), CCTTTCTCTCTCTT CAGG (SEK ID NO: 17) ve CAGG (SEK ID NO: 16) içeren gruptan seçilir.

Bir düzenlemede ek yeri bölgesi, CCACC'yi içeren bir konsensüs Kozak dizisi ile hemen ilerletilir (yani, 5' ila 3' yönünde takip edilir). Bir düzenlemede ek yeri bölgesi ve Kozak dizisi, 100 veya daha düşük bp'ye kadar serpiştirilir. Bir düzenlemede, Kozak sekansı, SEK ID NO: 45'in nükleotid sekansına sahiptir.

- 5 Tipik olarak, endojen veya egzojen bir promotörün (endojen promotör gibi) kontrolü altında olduğu zaman, kodlama sekansı bir Kozak sekansından hemen önce gelecektir. Kodlama bölgesinin başlangıcı, başlatma kodonu (AUG) ile gösterilir, örneğin dizi (gcc) gccRcc**AUG**g [SEK ID NO: 77] 'nin bağlamı içindedir, kodlayıcı dizilerin başlangıcının başlangıcı koyu renkli tabanlarla gösterilir. Küçük harfli bir karakter, bu pozisyondaki ortak tabanları belirtir (yine de değişebilir) ve büyük harfli karakterler, oldukça korunmuş tabanları belirtir, *yani* 'AUGG' dizisi sabittir veya nadiren değişir; 'R', bu pozisyonda genellikle bir pürinin (adenin veya guanin) gözlemlendiğini ve parantez içindeki sekansın (gcc) belirsiz önem taşıdığını gösterir. Dolayısıyla bir düzenlemede AUG başlatma kodonu, bir Kozak dizisine dahil edilir.
- 15 Burada kullanıldığı haliyle "Dahili Ribozom Giriş DNA Sekansı", bir Dahili Ribozom Giriş Sekansını (IRES) kodlayan bir DNA dizisine karşılık gelir. Burada kullanılan haliyle "IRES", bir mRNA sekansı içinde başlayan başlatma da dahil olmak üzere, bir haberci RNA (mRNA) sekansının translasyonun başlatılmasına izin veren bir nükleotid dizisi anlamına gelir. Bu, kaset polisistronik mRNA'yı kodladığında özellikle faydalıdır. Bir IRES'in kullanılması, çoklu protein veya peptitlere dönüştürülen bir polisistronik mRNA'ya yol açar. Bir düzenlemede, Dahili Ribozom Giriş DNA sekansı, SEK ID NO: 19'un nükleotid sekansına sahiptir. Bir düzenlemede belirli bir IRES, genomda sadece bir kez kullanılır. Bu, genomun kararlılığı açısından fayda sağlayabilir.
- 25 Burada kullanıldığı haliyle, "yüksek kendiliğinden bölünme verimliliği 2A peptit" ya da "2A peptit", translasyon sonrasında verimli bir şekilde parçalanan bir peptidi belirtir. Uygun 2A peptitleri arasında P2A, F2A, E2A ve T2A bulunur. Mevcut buluş sahipleri, belirli bir 2A peptidini kodlayan spesifik bir DNA sekansı bir kez kullanıldığında, aynı spesifik DNA sekansı ikinci kez kullanılamayacağını kaydetmiştir. Bununla birlikte, DNA kodundaki fazlalık, aynı 2A peptidine çevrilen bir DNA sekansı oluşturmak için kullanılabilir. 2A peptitlerin kullanılması kaset polisistronik mRNA'yı kodlarken özellikle yararlıdır. 2A peptitlerin kullanılması translasyon sonrası, birden fazla tek tek
- 30

protein veya peptit üretmek için translasyona tabi tutulmuş tek bir polipeptit zincirine yol açar.

Bir düzenlemede, kullanılan kodlanmış P2A peptidi SEK ID NO: 25'in amino asit dizisine sahiptir. Bir düzenlemede, kullanılan kodlanmış F2A peptidi SEK ID NO: 26'nın amino asit dizisine sahiptir. Bir düzenlemede, kullanılan kodlanmış E2A peptidi SEK ID NO: 27'nin amino asit dizisine sahiptir. Bir düzenlemede, kullanılan kodlanmış T2A peptidi SEK ID NO: 28'in amino asit dizisine sahiptir.

Bir düzenlemede transgen tarafından kodlanan bir mRNA veya her mRNA, örneğin SEK ID NO: 20'de gösterildiği şekilde tipik olarak bir mRNA dizisinin sonundaki gibi bir poliadenilasyon sinyal dizisi içerir. Bu nedenle bir düzenleme, transgen veya transgen kasedi, bir poliadenilasyon sinyal dizisini kodlayan en az bir diziyi içermektedir.

Burada kullanıldığı haliyle, "poliA", "poliadenilasyon sinyali" ya da "poliadenilasyon dizisi", genellikle bir AATAAA bölgesi içeren bir DNA dizisi anlamına gelir; bu, bir kez transkribe edilen, ortaya çıkan mRNA molekülünü parçalayan ve poliadenilleyen bir çoklu protein kompleksi tarafından tanınabilir.

Bir düzenlemede, poliadenilasyon sekansı, SEK ID NO: 20'in nükleotid sekansına sahiptir.

Bir düzenlemede yapı, bir poliadenilasyon sekansı içermez. Bir düzenlemede, gen ekspresyonunun düzenleyicisi bir ek yeri alıcı sekansıdır.

Bir düzenlemede bir antikor veya antikor fragmanı gibi bir protein / polipeptit / peptidi kodlayan sekans ayrıca bir poliadenilasyon sinyali içerir.

Transgen Kodlamaları

Bir düzenlemede transgen veya transgenler, bir protein, peptit, RNA molekülünü, örneğin bir RNA molekülünü bağımsız olarak kodlarlar. Avantajlı bir şekilde, transgen hücre içi olarak verilebilir ve sonrasında transkribe edilebilir ve eğer uygunsa dönüştürülür. Bir transgen tarafından kodlanan genetik materyallerin örnekleri arasında, örneğin antikorlar veya bunların bağlayıcı fragmanları, kemokinler, sitokinler, immün modülatörler, enzimler (örneğin etken madde içerisinde ön ilacı dönüştürme kabiliyeti) ve bir RNAi molekülü bulunur.

Burada kullanıldığı haliyle peptit, 2 ila 50 rezidü, örneğin 5 ila 20 rezidü içeren bir amino asit dizisini ifade etmektedir. Burada kullanılan haliyle polipeptit, üçüncül yapı içermeyen, bilhassa ikincil ve üçüncül yapı olmaksızın, 50'den fazla rezidü içeren bir amino asit dizisini belirtir. Protein, ikincil ve / veya üçüncül yapıya, özellikle de ikincil ve üçüncül yapı 50'den fazla rezidü içeren bir amino asit dizisine atıfta bulunmaktadır.

Bir düzenlemede, kodlama dizisi, bir terapötik RNA, terapötik peptit, terapötik polipeptit veya terapötik proteini (yani, bir terapötik geni) kodlar.

Burada kullanılan haliyle terapötik gen, hastalığın tedavisinde, iyileştirilmesinde veya önlenmesinde faydalı olabilecek bir varlığı kodlayan bir geni ifade eder, örneğin gen, kanser gibi bir hastalığı ilerlemesini en azından yavaşlatan, durduran veya tersine çeviren bir terapötik protein, polipeptit, peptit veya RNA'yı eksprese eder.

Bir düzenlemede, transgen tarafından kodlanan varlık bir kanser hücresi gibi bir hücrede transkribe edildiğinde veya dönüştürüldüğünde, hücre tarafından tehlike sinyallerinin üretimini artırır. Burada kullanıldığı şekliyle "tehlike sinyalleri", alarm sinyalleri olarak davranan yaralanma, stres veya apoptotik olmayan ölümle sonuçlanan hücreler tarafından örneğin doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücrelerini direkt olarak tepki vermeye teşvik ederek ve bunun yanı sıra adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerinin aktivasyonunu arttırmak üzere görev yaparak üretilmiş çeşitli moleküllere karşılık gelir.

Tümörlerin mikrobölgesinin genellikle doğal insan bağışıklık tepkilerinin aşağı düzenlendiği şekilde değiştiği bilinmektedir. Dolayısıyla, tümör içerisinde bağışıklık tepkilerini yeniden başlatma kabiliyeti, kanser tedavisinde potansiyel olarak çok ilginçtir.

Bir düzenlemede, kodlanmış terapötik peptit veya protein, hücre dışı çevreye salgılanacak şekilde tasarlanır. Bir düzenlemede, fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein, örneğin antikör, hücrenin dış mikro çevresine, örneğin kültür süpernatantına veya *in vivo* olarak; doku, stroma, dolaşım, kan ve / veya lenfatik sisteme salınır.

Bir düzenlemede, transgen tarafından kodlanan peptit, polipeptit veya protein, bir sinyal sekansı içerir. Burada kullanıldığı haliyle sinyal peptidi, proteinlerin N- ucunda bulunan, salgılama veya membran ekspresyonu için salgı yoluna girmesine yardımcı

olan kısa bir 13- 36 rezidürlü peptit sekansını ifade eder. Bir düzenlemede, öncü sekans (sinyal peptidi), SEK ID NO: 21 ya da 22'nin amino asit dizisine sahiptir.

Bir başka düzenlemede, kodlanmış terapötik peptit veya protein, örneğin bir antikor hücrenin yüzey zarında membran ile sabitlenmiş bir form olarak, örneğin proteinde bir transmembran bölgesinin ya da bir lipid membran bağlantısının eklenmesine yönelik bir alanın kodlanması da dahil edilerek eksprese edilecek biçimde tasarlanır.

Bir düzenlemede, fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein, örneğin bir antikor, örneğin aktif salgılama ile veya hücre lizisinin bir sonucu olarak adenovirüs tarafından enfekte edilen hücreden salınır. Dolayısıyla bir düzenlemede adenovirüs, hücreyi parçalar ve böylece antikor gibi fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein serbest bırakılır.

Başka bir düzenlemede, kodlanmış terapötik peptit veya protein, örneğin bir antikor, bozulmamış hücre içinde tutulacak şekilde tasarlanmıştır.

Avantaj sağlayan haliyle, mevcut açıklamaların adenovirüsleri tarafından eksprese edilen fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein, örneğin antikorlar dokuda *in vivo* olarak hem mRNA (şekil 16, şekil 41C'ye bakınız) ve hem de antikor proteini (bakınız şekil 17A, şekil 35B) halinde tespit edilebilir. Dahası, eksprese edilen fonksiyonel RNA, peptit veya protein örneğin antikor, kendi ligandını ELISA içinde bağlayabilir (bakınız şekil 17B). Bununla birlikte, fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein, örneğin antikor erken tespit edilebilir (enfeksiyonu izleyen 3 gün içinde şekil 18B'ye bakınız) ve ekspresyon, birkaç hafta boyunca sürdürülür (bakınız şekiller 17 ve 18B).

Bir düzenlemede, mevcut açıklamadaki adenovirüsler yaklaşık 3 gün içinde ya da enfeksiyondan daha ziyade, örneğin, yaklaşık 36, 48, 60 veya 72 saatte ya da örneğin yaklaşık 2, 3, 4, 5 veya 6 günde antikorlar gibi fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya protein eksprese eder.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait adenovirüsler, birkaç hafta boyunca örneğin, yaklaşık 1, 2, 3, 4, 5 veya 6 hafta antikorlar gibi fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya proteini ifade eder. Örneğin, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 veya 42 gün.

Avantaj sağlayan haliyle, antikör ekspresyonu gibi fonksiyonel RNA, peptit veya protein ekspresyonu, kandaki antikör gibi fonksiyonel RNA, peptit, polipeptit veya proteini algılayabilmek için yeterince yüksektir (bakınız şekil 19, şekil 35B).

5 Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait adenovirüs tarafından eksprese edilen fonksiyonel RNA, peptit veya protein örneğin, antikörler kan dolaşımına ve / veya lenfatik sisteme girer.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait adenovirüs, kanser hücreleri için arttırılmış bir terapötik endekse sahip olan bir onkolitik virüstür.

10 Bir düzenlemede, kodlama sekansı fonksiyonel RNA'yı, örneğin terapötik RNA'yı kodlar.

Burada kullanıldığı şekliyle işlevsel RNA, bir protein veya peptidi kodlamaktan başka bir fonksiyona sahip olan ve örneğin, shRNA ve miRNA gibi RNAi de dahil olmak üzere gen etkinliğini inhibe etmek veya azaltmak için uygun RNA yapıları içeren RNA'ya karşılık gelir. Burada kullanılan şekliyle shRNA, kısa saç tokası RNA'sını ifade etmekte olup, bu RNA interferansı (RNAi) yoluyla hedef gen ekspresyonunu bastırmak için kullanılabilen sıkı bir saç tokası dönüşü yapan bir RNA sekansıdır. Burada kullanılan haliyle, miRNA (mikroRNA), mRNA molekülleri içindeki tamamlayıcı sekanslarla baz eşleştirme yoluyla, transkripsiyonel veya transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen küçük bir kodlamayan RNA molekülünü (yaklaşık 22 nükleotid içerir) ifade eder. miRNA ile bağlanan mRNA iplikleri bastırılır, çünkü artık ribozomlarla proteinlere çevrilemez ve bu gibi kompleksler çoğunlukla hücre tarafından aktif bir şekilde parçalanır.

Bir düzenlemede transgen, bir proteini kodlar. Burada kullanılan şekliyle protein, bir protein ligandı, bir protein reseptörü veya bir antikör molekülünü içerir.

25 Burada kullanılan şekliyle protein ligandı, hücrenin işlevini etkilemek üzere hücre reseptörlerine bağlanan veya hücrenin reseptörüne yapışan, örneğin hücre içi sinyalleme uyararak ve hücre içindeki gen transkripsiyonunu modüle ederek hücre yüzey membranını veya bunun parçalarını bağlayan salgılanan proteinleri belirtir. Bir düzenlemede eksprese edilen protein, hücrenin yüzeyinde eksprese olacak ve / veya 30 hücreden salınacak şekilde tasarlanır.

Bir düzenlemede kodlanmış protein, örneğin, bir DNase, bir kollajenaz, bir matris metalloproteinaz (MMP2 veya 14 gibi) veya benzeri gibi tümörün ekstra hücrel matrisinin bozunmasına yardımcı olan bir enzimdir.

Uygun antikörler ve antikör fragmanları, agonistik veya antagonistik olabilir ve antikanser etkinliği olanları ve konakçı hücrenin kansere karşı tepkilerini modüle edenleri içerir, örneğin bir agonist veya antagonistik antikör veya antikör fragmanı, vaskülarizasyonu azaltabilir veya tümörün vaskülarizasyonunu normalleştirebilir. Bir düzenlemede, agonistik antikörler veya diğer kodlanmış proteinler konakçı hücrenin, konakçının doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkileri için daha görünür olmasını örneğin antijenleri, tehlike sinyallerini, sitokinleri veya kemokinleri çekip onları aktive etmek için eksprese etme veya uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini arttırmak için bunları birlikte uyarma ya da kontrol noktası yolu moleküllerine bağlama yoluyla sağlayabilir.

Burada kullanılan haliyle terapötik antikör veya antikör bağlama fragmanı, onkolitik virüse eklendiğinde, hastadaki bir patoloji üzerinde, örneğin tedavi edilen kanser üzerinde faydalı bir etkiye sahip olan antikora veya antikoru bağlayan parçaya karşılık gelir.

Burada kullanılan şekliyle, fayda sağlayan etki, *in vivo* olarak eksprese edilen antikörün arzu edilen ve / veya avantajlı bir etkisini ifade eder.

Terapötik antikörlerin ve antikör bağlama fragmanlarının sınıfları arasında anti- EGF antikörleri, anti- VEGF antikörleri, anti- PDGF antikörleri, anti- CTLA antikörleri, anti- PD1 antikörleri, anti- PDL1 antikörleri ve anti- FGF antikörleri bulunur.

Mevcut açıklamanın virüslerine dahil edilmek için uygun olan tescilli terapötik antikörler, absiksimab, adalimumab, alemtzumab, basiliksimab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, setuksimab, certolzumab, daclizumab, denosumab, eculzumab, efaliksumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuksetan, infliksimab, ipilimumab, muromonab- CD3, ofatumumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituksimab, tocilizumab, tositumom ve trastuzumab içerir.

Bir düzenlemede, kullanılan bir antikörün veya antikör fragmanının antikör değişken bölgesi sekansları, bevacizumab'ın (Avastin® olarak da bilinir) değişken bölgelerine % 95 ve 100 arasında, mesela % 96, 97, 98 ya da 99 benzer ya da özdeştir.

Mevcut açıklamanın virüslerine dahil edilmek için ayrıca uygun olanlar, örneğin, trastuzumab, tositumomab, rituksimab, panitumumab, ofatumumab, ipilimumab, ibritumomab tiuksetan, gemtuzumab, denosumab setuksimab, brentuksimab vedotin, avastin ve adalimumab gibi kanser indikasyonları için onaylanmış antikörler ve bağlama fragmanlarına yönelik kodlama sekanslarıdır.

Bir düzenlemede kullanılan bir antikörün veya antikör fragmanının antikör değişken bölge sekansları, bilinen bir antikörün veya burada açıklanan bir antikörün değişken bölgelerine % 95 ve 100 arasında benzer veya özdeştir.

Burada kullanılan şekliyle "antikör molekülü", antikörleri ve bunların bağlama fragmanlarını içerir.

Burada kullanılan haliyle antikör genel olarak bir tam uzunluktaki antiköre ve bunları içeren bispesifik veya çok spesifik formatlara karşılık gelir.

Antikör bağlayan fragmanlar, türetildiği orijinal "antikör" ile aynı, benzer veya daha iyi özgünlüğe sahip antijeni hedefleyebilen bir antikör fragmanını içerir. Antikör fragmanları, Fab, değiştirilmiş Fab, Fab', değiştirilmiş Fab', F (ab'),₂, Fv, tek alanlı antikörler (örn. , VH veya VL veya VHH), scFv, bi, tri veya tetra- valent antikörler, Bis-scFv, diabodyler, triabodyler, tetrabodyler ve yukarıdakilerden herhangi birine ait epitop bağlama fragmanları içerir (örneğin, bakınız Holliger ve Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126- 1136; Adair ve Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2 (3), 209- 217). Bu antikör fragmanlarının oluşturulması ve üretilmesine yönelik yöntemler teknikte iyi bilinmektedir (örneğin bakınız Verma ve diğerleri, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165- 181). Mevcut buluşta kullanılmak üzere diğer antikör fragmanları, uluslararası patent başvuruları WO2005 / 003169, WO2005 / 003170 ve WO2005 / 003171 içinde tarif edilen Fab ve Fab' fragmanlarını içerir. Çok değerli antikörler, örneğin bispesifik olmak üzere çoklu özgünlük içerebilir veya monospesifik olabilir (örneğin, bakınız WO 92/22853, WO05 / 113605, WO2009 / 040562 ve WO2010 / 035012).

Burada kullanıldığı şekliyle spesifik ifadesi, sadece spesifik olduğu antijeni tanıyan bir antikörü veya fragmanı ya da spesifik olmadığı antijenlere olan bağlanma afinitesi ile karşılaştırıldığında spesifik olduğu antijene önemli oranda yüksek bağlanma afinitesine, örneğin 5, 6, 7, 8, 9, 10 kat daha büyük bir bağlanma afinitesine sahip olan bir antikörü ya da fragmanı ifade eder.

Bilinen antikorlar veya antikor bağlama fragmanları, aynı CDR'ler veya aynı değişken bölgelere sahip alternatif antikor formatları üretmek için kullanılabilir, örneğin tam uzunluktaki bir antikor bir Fab, Fab' veya scFv fragmanına kolayca dönüştürülebilir.

İnsan dışı hayvanlar, insan antikor molekülleri, insanlaştırılmış antikor molekülleri ve kimerik antikor moleküllerinden gelen antikor molekülleri de dahil olmak üzere mevcut açıklamaların yapılarında çok çeşitli farklı antikor formları kullanılabilir.

Bir düzenlemede, antikor veya bağlama fragmanı monoklonaldır. Monoklonal antikorlar, teknolojiye bilinen herhangi bir yöntemle, örneğin hibridoma tekniği (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495- 497), trioma tekniği, insan B- hücresi hibridoma tekniği (Kozbor ve diğerleri, 1983, Immunology Today, 4:72) ve EBV- hibridoma tekniği (Cole ve diğerleri, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, sf77- 96, Alan R Liss, Inc. , 1985) ile hazırlanabilir.

Bir düzenlemede, antikor veya bağlama parçası insan dışıdır, yani tamamen insan dışı kaynaklıdır. Antikorlar ve fragmanlar kanser hücresi içine virüs tarafından verilebildiğinden dolayı bu mümkündür.

Bir düzenlemede antikor kimeriktir, örneğin insan sabit bölgesi (leri) ve insan dışı değişken bölgeler içerir.

Bir düzenlemede, antikor veya bağlama parçası insanidir, yani tamamen insan kaynaklıdır.

Bir düzenlemede, antikor veya bağlama fragmanı insanlaştırılmıştır. İnsanlaştırılmış antikorlar (CDR graftlı antikorları içerir), insan olmayan bir türe ait bir veya daha fazla tamamlayıcılık belirleyen bölge (CDR) ve bir insan immünoglobülin molekülünden bir çerçeve bölgesi olan antikor molekülleridir (bakınız, örneğin US 5585089; WO91 / 09967). Takdir edileceği gibi, sadece CDR'lerin tamamından ziyade CDR'lerin özgünlük belirleyici rezidülerini aktarmak gerekli olabilir (bakınız örneğin, Kashmiri ve diğerleri, 2005, Methods, 36, 25- 34). İnsancıllaştırılmış antikorlar isteğe bağlı olarak, örneğin CDR'lerin türetildiği insan dışı türlerden türetilmiş bir veya daha fazla çerçeve rezidüsü içerebilir.

Bir düzenlemede kodlama sekansı, bir antikor ağır zincirini, bir antikor hafif zincirini veya bir antikor fragmanını kodlar. Burada kullanılan şekliyle ağır zincir (HC), bir antikorun geniş polipeptit altbirimini ifade eder. Burada kullanıldığı şekliyle hafif zincir

(LC), bir antikorun küçük polipeptit alt birimine karşılık gelir. Bir düzenlemede antikor hafif zinciri, bir CL bölgesi, ya bir kapa veya lambda içerir.

Mevcut açıklamada kullanılmak üzere antikorlar, teknikte bilinen herhangi bir uygun yöntem kullanılarak elde edilebilir. Polipeptidi (aktifleştirilmiş T hücreleri gibi) eksprese eden hücrelerin (rekombinant veya doğal olarak) dahil olduğu füzyon proteinlerini içeren antijen polipeptidi / proteini, antijeni spesifik olarak tanıyan antikorlar üretmek için kullanılabilir. Polipeptit, 'olgun' polipeptit veya bunun biyolojik açıdan aktif bir fragmanı veya türevi olabilir.

Bir konakçı hayvana bağışıklık kazandırmak için kullanılmak üzere polipeptitler, ekspresyon sistemleri içeren genetik olarak işlenmiş konak hücrelerinden teknikte iyi bilinen yöntemlerle hazırlanabilir veya doğal biyolojik kaynaklardan toplanabilirler. Mevcut başvuruda, "polipeptitler" terimi peptitleri, polipeptitleri ve proteinleri kapsar. Aksi belirtilmedikçe bunlar birbirlerinin yerine kullanılır. Antijen polipeptit, bazı durumlarda, örneğin bir afinite etiketine kaynaştırılmış bir füzyon proteini gibi daha büyük bir proteinin bir parçası olabilir.

Antikor polipeptidine karşı üretilen antikorlar, bir hayvanın aşılmasının gerekli olduğu durumlarda, iyi bilinen ve rutin protokolleri kullanarak polipeptitlerin bir hayvana, tercih edilen şekliyle bir insan dışı hayvana uygulanması ile elde edilebilir, örneğin bakınız Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Tavşanlar, fareler, sıçanlar, koyunlar, inekler, develer veya domuzlar gibi sıcakkanlı hayvanlara bağışıklık kazandırılabilir. Bununla birlikte, genellikle fareler, tavşanlar, domuzlar ve sıçanlar en uygun olanlardır.

Buluştaki kullanılmaya yönelik antikorlar ayrıca, spesifik antikorların üretimi için seçilen tek lenfositlerden üretilen immünoglobülin değişken bölge cDNA'ları, örneğin, Babcook, J. Ve diğerleri, (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843- 7848I); WO92/02551; WO2004/051268 ve Uluslar arası Patent Başvurusu WO2004/106377 tarafından tarif edilen yöntemlerle klonlama ve eksprese etme yoluyla tek lenfosit antikor yöntemleri kullanılarak üretilir. Natl. Acad. Sci. (SİLİNECEK) USA 93 (15): 7843- 7848BEN; VVO92 / 02551; WO2004 / 051268 ve Uluslararası Patent Başvurusu numarası WO2004 / 106377.

Antikorların taranması, antijene bağlanmayı ölçmek için tahliller kullanılarak ve/veya reseptörü antagonize etme kabiliyetini ölçmek için tahliller kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bir bağlanma tahlili örneği, özellikle, plakaların üzerinde hareketsiz kılınan bir füzyon proteini (isteğe bağlı olarak bir haberci içeren) kullanan ve füzyon proteinine bağlanmış anti- antijen antikorunu saptamak için bir konjuge sekonder antikor kullanan bir ELISA'dır.

Bu buluşun antikor molekülünün, eğer mevcutsa, sabit bölge alanları, antikor molekülünün önerilen fonksiyonu ve özellikle gerekli olabilecek efektör fonksiyonları dikkate alınarak seçilebilir. Örneğin, sabit bölge alanları, insan IgA, IgD, IgE, IgG veya IgM alanları olabilir. Özellikle, antikor molekülü terapötik kullanımlar için tasarlandığında ve antikor efektör işlevleri gerektiğinde, insan IgG sabit bölge alanları, özellikle de IgG1 ve IgG3 izotipleri kullanılabilir. Alternatif olarak, IgG2 ve IgG4 izotipleri, antikor molekülü terapötik amaçlar için tasarlandığında ve antikor efektör işlevleri gerekmediğinde, örneğin agonize edici aktivite için veya hedef nötralizasyonu için kullanılabilir. Takdir edilecektir ki, bu sabit bölge alanlarının sekans varyantları da kullanılabilir. Örneğin 241 pozisyonundaki serinin, Angal ve diğerleri, Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105- 108'de tarif edildiği şekilde prolin haline getirildiği IgG4 molekülüleri kullanılabilir.

Bazı antikor işlevleri için, örneğin bağışıklık sisteminin hücreleri gibi antikorun hedef molekülünü taşıyan hücrelere aktivasyon sinyalleri vermek için, antikorun membrana sabitlenmiş versiyonlarının kullanılması avantaj sağlayabilir, böylece antikor, eksprese eden hücrenin yüzeyi üzerinde eksprese edilir. Bu gibi hücre yüzeyinde eksprese edilmiş bağlanma molekülüleri, hedef molekülden alıcı hücreye aktivasyon sinyallerinin iletilmesini güçlendiren, başka bir hücrenin yüzeyindeki hedef sinyal molekülü arasında etkili multimerik etkileşimler sağlar.

Avantaj sağlayan haliyle, bu açıklamanın adenovirüsleri, tam uzunluğa sahip ve antikorların scFv biçimlerini eksprese edebilmektedir.

Bir düzenlemede antikoru veya antikor parçasını kodlayan sekans, dahili bir ribozom giriş sekansı içerir veya bunlardan başkalarını da içerir. Burada kullanılan haliyle dahili ribozom giriş dizisi (IRES), bir haberci RNA (mRNA) sekansının ortasında translasyon başlatılmasına izin veren bir nükleotid sekansı anlamına gelir.

Bir düzenlemede kodlanmış terapötik proteinler veya peptitler, hedef spesifik proteinler, polipeptitler veya peptitlerdir.

Burada kullanılan haliyle hedefe özgü proteinler veya peptitler, ya hedef proteinlerin kendilerini ya da hedef proteinlerin veya peptitlere direkt olarak bağlanan (örn. , hedefe özgü olan) veya bunun dışında, bunların seviyelerini değiştiren farklı protein veya peptitleri belirtir. Bir öncekine dair bir örnek bir sitokin olurken, ikincisine yönelik bir örnek ise sitokine karşı bir antikör olacaktır.

İlgilenilen hedefler genellikle hastalıkla, özellikle kanser ile ilişkili belirli hücreler, hücresel ürünler, antijenler veya sinyal yolları ile ilgilidir. Hedef, bağlama bağlı olarak, mRNA ile ya da örneğin, RNAi tipi teknoloji ile inhibe edilebilen, protein veya polipeptidi kodlayan genden kopyalanan benzeri ile de ilgilidir. Böylece RNA, mesela RNAi teknolojisi bağlamında, söz konusu hedef hedefin geni tarafından kodlanan mRNA'dır.

İlgilenilen hedeflerin örnekleri arasında uyarıcı T hücresi ortak reseptörleri ve bunlara yönelik ligandlar, kontrol noktası engelleyici T hücresi ortak reseptör molekülleri ve bunlara yönelik ligandlar, reseptörler ve düzenleyici T hücreleri tarafından eksprese edilen ligandlar, miyeloid türevi baskılayıcı hücreler ve immünosüpresif bağışıklık hücreleri, dendritik hücre ve antijen sunan hücre reseptörleri ve bunlara yönelik ligandlar, antijen işleme ve sunum araçları, sitokinler ve sitokin reseptörleri, kemokinler ve kemokin reseptörleri, transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri, hücre içi alışveriş molekülleri ve hücre fonksiyonunun düzenleyicileri, tümör hücresi ve tümör mikro çevre reseptörleri ve ürünleri, İDO gibi hücre içi tümör hücresi enzimleri, bağışıklık hücreleri tarafından tanınma için antijenler bulunur, ancak bunlarla sınırlı değildirler.

Dolayısıyla bir düzenlemede burada kullanılan haliyle hedef, burada uygun bir şekilde örneğin, burada bir antikör veya bağlayıcı fragman tarafından inhibe edilebilen, nötralize edilebilen veya aktive edilebilen bir protein veya polipeptidi ifade eder. Hedef, sitokinler bağlamında, tek başına bir sitokini veya sitokine özgü bir antikoru veya bunun bir bağlama parçasını belirtir. Böylece, virüs sitokinin kendisini kodlayabilir ve eksprese edebilir, çünkü bunun salınması "konakçı" bağışıklık tepkilerini uyarabilmektedir. Ligand bağlamında, ligandın mutasyona uğratılmış biçimleri, reseptörü bağlamak için doğal ligand ile yarışan virüs tarafından

kodlanabilir. Mutasyona uğramış ligand, reseptör için artan bağlanma afinitesine sahip olabilir, örneğin, yavaş bir kapanma hızına sahiptir, bu yüzden reseptörü işgal eder ve buradan sinyali artırır veya azaltır. Alternatif olarak, mutasyona uğramış ligandın aktivitesi, vahşi tipli liganda kıyasla azaltılabilir ve böylece doğal ligandan reseptör aracılığıyla bağlanma ve genel aktivite azaltılır.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya uygun virüs veya yapı, bir ön ilaç, bir bağışıklık düzenleyiciyi ve / veya bir enzimi kodlar.

Burada kullanıldığı şekliyle ön- ilaç, daha sonra genellikle normal metabolik işlemler vasıtasıyla vücutta etken bir farmakolojik maddeye dönüştürülen aktif olmayan (veya tam olarak aktif olmayan) türev olarak verilen bir molekül anlamına gelir. Bir ön ilaç, istenen ilaca bir öncül türü olarak hizmet eder. Bir ön ilaç dönüştürme enzimi, bir ön ilacı farmakolojik olarak aktif formuna dönüştüren enzim olarak işlev görür.

Burada kullanılan bağışıklık düzenleyici, bağışıklık tepkisinin bir düzenleyicisi anlamına gelir. Bağışıklık düzenleyiciler, bağışıklığın güçlenmesinde, bağışıklığı baskılanmasında ya da immünolojik toleransın indüklenmesindeki gibi, bağışıklık tepkisinin istenilen bir seviyeye ayarlanmasında işlev görür.

Burada kullanıldığı haliyle enzim, canlı organizmalarda bir katalizör görevi gören ve kimyasal reaksiyonların sürecin kendisinde değişiklik yapılmadan hızlanma oranını düzenleyen bir madde anlamındadır.

Aşağıda, örnek hedef peptitler / polipeptitler ve proteinlerin kapsamlı olmayan bir tartışması bulunmaktadır.

Bir düzenlemede, hedef bir veya daha fazla CTLA- 4, PD- 1, PD- L1, PD- L2, VISTA, B7- H3, B7- H4, HVEM, ILT- 2, ILT- 3, ILT- 4, TIM- 3, LAG- 3, BTLA, LIGHT veya CD160'ı içeren gruptan, örneğin CTLA- 4, PD- 1, PD- L1 ve PD- L2'den bağımsız olarak seçilir. Bir düzenlemede, bunlardan birine özgü bir antikor veya bunun bir bağlama fragmanı sağlanmıştır. Bu nedenle bir düzenlemede, bir transgen veya transgen kasedi, CTLA- 4, PD- 1, PD- L1 veya PD- L2'ye özgü bir antikor veya antikor parçasını kodlar. Bir düzenlemede, adenovirüs CTLA- 4, PD- 1, PD- L1 veya PD- L2'ye özgü bir antikor veya antikor fragmanını ifade eder.

Bir düzenlemede antikor, bir kontrol noktası inhibitörü antikorudur, örneğin anti- PD- L1'dir. Bir düzenlemede, adenovirüs, tam uzunluğa sahip anti- insan PD- L1 antikorunu ifade eder. Bir düzenlemede tam uzunluğa sahip anti- insan PD- L1

antikorumun ekspresyonu, özellikle B γ pozisyonunda, büyük geç promotör (MLP) gibi bir endojen promotörün kontrolü altındadır. Bir düzenlemede adenovirüs, anti- insan PD- L1 antikorumun scFv formunu eksprese eder. Bir düzenlemede bir anti- insan PD- L1 antikorumun bir scFv formunun ekspresyonu, özellikle B γ pozisyonunda, büyük geç promotör gibi bir endojen promotörün kontrolü altındadır.

Bir düzenlemede, bir virüs veya mevcut açıklamanın yapısı tarafından kodlanan anti- PD- L1 antikor VH zincirinin amino asit sekansı, SEK ID NO: 30'dur. Bir düzenlemede anti- PD- L1 antikor sabit ağır zincirinin amino asit sekansı SEK ID NO: 33veya 34'dür. Bir düzenlemede, anti- PD- L1 antikor VL zincirinin amino asit sekansı, SEK ID NO: 32'dir. Bir düzenlemede, anti- PD- L1 antikor sabit hafif zincirinin amino asit sekansı, SEK ID NO: 35'tir. Bir düzenlemede, anti- PD- L1 scFv antikor fragmanının amino asit sekansı, SEK ID NO: 37'dir.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya uygun, burada örneklendiği gibi CTLA- 4'e özgü tam uzunlukta bir antikor veya scFv için bir antikor veya bunun bir bağlama parçasını kodlayan bir virüs veya yapı sağlanmaktadır.

Bir düzenlemede hedef, CD16, CD25, CD33, CD332, CD127, CD31, CD43, CD44, CD162, CD301a, CD301b ve Galektin- 3 içeren gruptan bağımsız olarak seçilen biri ya da ikisidir. Bir düzenlemede, bir antikor ya da buna özgü olan bir bağlama antikor, örneğin bir tam uzunluklu antikor ya da bir scFv sağlanmaktadır.

Bir düzenlemede, örneğin bir antikor ya da bağlama fragmanı tarafından hedeflenen bir hedef, FLT- 3, FLT- 3 ligandı, TLRs, TLR ligandları, CCR7, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, GITR Ligandı, IFN- α 2, IL- 12, IL- 23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, TSLP Reseptörü, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 ve CD304 içeren gruptan bağımsız olarak seçilen biri ya da ikisidir.

Bazı TLR ligandları, bağışıklık tepkilerini uyarma kabiliyetine sahiptir ve örneğin, adjuvanlar olarak kullanılırlar. Bir düzenlemede virüs, bir TRL ligandını kodlar ve salgılar.

Bir düzenlemede hedef, bir antijen işlemcisi ve antijen sunum aracısından, örneğin CTIIA veya GILT arasından seçilir.

Bir düzenlemede, örneğin bir antikor veya bağlama parçası tarafından hedeflenebilen hedef, bir kanser hedefidir.

Bir düzenlemede hedef, OX40, OX40 ligand, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40 ligandı, CD70, CD137, GITR, 4- 1BB, ICOS ya da ICOS ligandını içeren gruptan bağımsız olarak seçilen biri ya da daha fazlasıdır, örneğin CD40 ve CD40 ligandıdır.

5 Bir düzenlemede transgen kaseti, CD40 veya CD40 ligandı veya CD40 veya CD40 ligandını hedefleyen bir antikor, antikor fragmanı veya shRNA içeren bir ligandı kodlar. Bir düzenlemede adenovirüs, CD40 veya CD40 ligandı veya CD40 veya CD40 ligandını hedefleyen (bunlara özgü) bir antikor, antikor fragmanı veya shRNA içeren bir ligandı eksprese eder.

10 Bir düzenlemede, hedef IL- 1 α , IL- 1 β , IL- 6, IL- 9, IL- 12, IL- 13, IL- 17, IL- 18, IL- 22, IL- 23, IL- 24, IL- 25, IL- 26, IL- 27, IL- 33, IL- 35'i içeren gruptan bağımsız olarak seçilen biri ya da daha fazlasıdır. İnterlökin- 2 (IL- 2), IL- 4, IL- 5, IL- 7, IL- 10, IL- 15, IL- 21, IL- 25, IL- 1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TGF β , lenfotoksin α (LTA) ve GM-CSF.

15 Bir düzenlemede, transgen kaseti, IL- 12, IL- 18, IL- 22, IL- 7, IL- 15, IL- 21, IFN α , IFN γ , TNF α , TGF β veya lenfotoksin α (LTA)'ya özgü bir antikor veya antikor fragmanını kodlar. Bir düzenlemede, adenovirüs, IL- 12, IL- 18, IL- 22, IL- 7, IL- 15, IL- 21, IFN α , IFN γ , TNF α , TGF β veya lenfotoksin α (LTA) eksprese eder.

20 Bir düzenlemede, IFN γ 'nin amino asit dizisi SEK ID NO: 41'dir. Bir düzenlemede, IFN α 'nın amino asidi dizisi, SEK ID NO: 42'dir. Bir düzenlemede, TNF α 'nın amino asidi dizisi, SEK ID NO: 40'tır.

Bir düzenlemede hedef, bir kemokindir, örneğin IL- 8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 ve CRTH2'yi içeren gruptan bağımsız olarak seçilen biri ya da daha fazlasıdır.

25 Bir düzenlemede, transgen kaseti, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 ya da CXCR4'e özgü bir antikor veya antikor fragmanını kodlar. Kemokinler bağlamında hedef, örneğin kansere karşı konak bağışıklık tepkilerini indüklemek veya arttırmak için virüslerin kemokini kodladığı ve eksprese ettiği yeri içerir.

30 Bir düzenlemede adenovirüs, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 ya da CXCR4'e özgü bir antikor veya antikor fragmanını eksprese eder.

Bir düzenlemede hedef, STAT3, STAT1, STAT4, STAT6, CTIIA, MyD88 ve NFκB aile üyelerinden oluşan gruptan bağımsız olarak seçilen biri veya daha fazlasıdır, örneğin protein, bir inhibitör, örneğin bir antikor veya bunun bir bağlama fragmanı ile hedeflenir, veya ilgili genden kopyalanan mRNA, RNAi gibi bir mekanizma tarafından engellenir.

Bir düzenlemede hedef, HSp70'dir veya hücre hayatta kalımı ve mesela survivin gibi ölümüne dair bir düzenleyicidir, örneğin protein, bir inhibitör, örneğin bir antikor veya bunun bir bağlama fragmanı ile hedeflenir veya ilgili genden kopyalanan mRNA, RNAi gibi bir mekanizma, örneğin tarafından engellenir.

10 Bir düzenlemede hedef, amfiregülin, BTC, NRG1a, NRG1b, NRG3, TGFα, LRIG1, LRIG3, EGF, EGF- L6, Epigen, HB- EGF, EGFR, Her2, Her3 ve Her4 içeren gruptan bağımsız olarak seçilen biri veya daha fazlasıdır, örneğin protein, bir inhibitör, örneğin bir antikor veya bunun bir bağlama fragmanı ile hedeflenir, veya ilgili genden kopyalanan mRNA, RNAi gibi bir mekanizma tarafından engellenir.

15 Bir düzenlemede hedef, hedgehog, FGF, IGF, Wnt, VEGF, TNF, TGFβ, PDGF ve Notch içeren gruptan bağımsız olarak seçilen birine veya daha fazlasına yönelik bir ligand veya reseptördür.

Bir düzenlemede adenovirüs, VEGF'ye özgü bir antikor veya antikor fragmanı eksprese eder. Bir düzenlemede, antikor bir anti- VEGF antikorudur. Örneğin, antikor

20 Bevacizumab'ın amino asit sekansına sahip olan bir antikor veya bunun eşdeğeri gibi. Bir düzenlemede, adenovirüs, tam uzunluğa sahip anti- insan VEGF antikorunu ifade eder. Bir düzenlemede tam uzunluğa sahip anti- insan VEGF antikorunun ekspresyonu, özellikle B_γ pozisyonunda, büyük geç promotör (MLP) gibi bir endojen promotörün kontrolü altındadır. Bir düzenlemede adenovirüs, anti- insan VEGF

25 antikorunun scFv formunu eksprese eder. Bir düzenlemede bir anti- insan VEGF antikorunun bir scFv formunun ekspresyonu, özellikle B_γ pozisyonunda, büyük geç promotör gibi bir endojen promotörün kontrolü altındadır. Bir düzenlemede, anti- VEGF antikoru VH zincirinin amino asit sekansı, SEK ID NO: 29'dur. Bir düzenlemede anti- VEGF antikor sabit ağır zincirinin amino asit sekansı SEK ID NO: 30 33 veya 34'dür. Bir düzenlemede, anti- VEGF antikoru VL zincirinin amino asit sekansı, EQ ID NO: 31'dir. Bir düzenlemede, anti- VEGF antikoru sabit hafif zincirin

amino asit sekansı, SEK ID NO: 35'tir. Bir düzenlemede, anti- VEGF scFv antikor fragmanının amino asit sekansı, SEK ID NO: 36'dır.

Bir düzenlemede, hedef IDO'dur.

Bir düzenlemede hedef, Sitomegalovirüs antijenleri, grip antijenleri, hepatit B yüzey ve çekirdek antijenleri, difteri toksoidi, Crm197, tetanoz toksoidi gibi bulaşıcı organizmalar; T hücresi olarak bilinen böyle antijenlerden veya antikor epitoplardan, ya da bu antijenlerin genetik olarak işlenmiş kompozitlerinden ya da multimerlerinden türetilen peptitler; antijenler olarak tümör türevi proteinler; T hücresi olarak bilinen bu tip antijenlerden ya da epitoplardan türetilen peptitler ve genetik olarak işlenmiş bu tip antijenlerin kompozitler veya multimerler örneğin, WT1, MUC1, LMP2, idioype, HPV E6&E7, EGFRvIII, HER- 2/neu, MAGE A3, p53 nonmutant, p53 mutant, NY- ESO- 1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, gp100, CEA, MelanA/MART1, Ras mutant, proteinaz3 (PR1), bcr- abl, tyrosinase, survivin, PSA, hTERT, özellikle WT1, MUC1, HER- 2/neu, NY- ESO- 1, survivin ya da hTERT içeren gruptan bağımsız olarak seçilen bir ya da daha fazla protein ya da peptit için bağışıklık hücreleri tarafından tanınmaya yönelik bir antijendir.

Teknikte uzman kişiler, kodon artıklığına bağlı olarak belirli bir amino asit dizisini kodlayan nükleik asit sekansları için birçok olasılığın olduğunu, sessiz nükleik asit baz çiftinin mutasyonlarının tolere edildiğini ve belirli bir amino asit dizisini kodlayan tüm nükleik asit dizilerinin SEK ID NO:'larının mevcut açıklama tarafından öngörüldüğünü takdir edecektir.

Bir düzenlemede, bir transgen ile kodlanan peptit, polipeptit veya protein bir mimotoptur. Burada kullanılan haliyle bir mimotop, bir epitopun yapısını taklit eden bir molekül, çoğunlukla bir peptittir. İkinci özellik, epitop tarafından ortaya çıkarılana benzer bir antikor tepkisine neden olur. Belirli bir epitop antijeni için bir antikor, o epitopu taklit eden bir mimotopu tanıyacaktır. Mimotoplar, yaygın şekilde biopanning yoluyla faj görüntüleme kütüphanelerinden elde edilir. Mimotopları kullanan aşılarda geliştirilmektedir. Bu nedenle, bilinen özgünlüklerin antikorları, kütüphanelerin taranması için kullanılabilir (örneğin, faj gösteriminde peptit kütüphaneleri - örneğin Ab sekans kütüphaneleri veya antikor olmayan peptit kütüphaneleri, özellikle daha kararlı 3D yapılaraya sahip peptitlerin üretilmesi için optimize edilmiş olanlar) - Mimotopların üretilmesi teknikte iyi açıklanmıştır (bkz. Tribbick G, Rodda S. Antikor

benzeri molekülere bağlanan peptit ligandlarının keşfi için kombine yöntemler. J Mol Recognit. 2002 15 (5): 306- 10; Masuko T, Ohno Y, Masuko K, Yagi H, Uejima S, Takechi M, Hashimoto Y. Yeşil flüoresan proteine kaynaştırılmış hedef molekülleri eksprese eden transfektanlar ile bağışıklık kazandırılmış sıçanlar kullanılarak sağlam bir strateji ile zar onkoproteinlerine yönelik terapötik antikorlara doğru. Cancer Sci. 2011 102 (1): 25- 35).

Bir düzenlemede, bir mimotop veya diğer tasarlanmış aşı antijenleri bir transgen ile kodlanır ve alıcı hastada bir antikor tepkisi uyandırmak için eksprese edilir, burada indüklenen antikorlar istenen terapötik etkiye sahiptir. Bir düzenlemede, istenen insan ligandından gelen peptit sekansları olan GFP- peptit füzyon proteinleri, kendine karşı hedef antikor tepkilerini indüklemek için kullanılır, örneğin hedef molekül PD- 1'e bağlanmak için önemli olan PD- L1'in bir peptit bölgesi, GFP veya diğer yüksek derecede immünojenik yabancı taşıyıcı proteinlerle genetik olarak bağlantılı olabilir, böylece peptite karşı bir immün antikor tepkisi, doğal PDL1 molekülü ile çapraz reaksiyona giren ve dolayısıyla PD- L1: PD- 1 etkileşimlerini bir anti- PDL1 antikorunu doğrudan kodlayarak yapanla aynı şekilde engellemeyi içerir. Kendine karşı terapötik antikor tepkilerini indükleyen aşılarda kavramlar teknikte iyi tarif edilmiştir (bkz. Spohn G, Bachmann MF. Reseptör- ligand etkileşimlerini bloke etmek için terapötik aşılama. Expert Opin Biol Ther. 2003 3 (3): 469- 76; Link A, Bachmann MF. Immunodrugs; terapötik antisidokin aşılıyla B- hücreleri toleransını bozma, ancak T- hücrelerinin bozmama. Immunotherapy 2010 2 (4): 561- 74; Delavallée L, Assier E, Semerano L, Bessis N, Boissier MC. Antitokokin aşılarının yeni ortaya çıktığı uygulamalar. Expert Rev Vaccines. 2008 7 (10): 1507- 17).

Bir veya daha fazla düzenleme, kullanılan transgen, SEK ID NO: 29 ila 44, 67 & 70- 71'in herhangi birinde gösterilen bir sekansı kodlar.

Avantaj sağlayan haliyle, mevcut açıklamadaki adenovirüsler antikor formlarını ve bir transgende kodlanan sitokinler gibi diğer proteinleri kültür süpernatana *in vitro* olarak veya tümör dokusu stromasına *in vivo* olarak eksprese eder ve salar (bakınız şekiller 4- 8, 11- 12, 16- 19, 28- 29, 33, 35, 38- 40, 42- 43, 47, 49, 51).

Öncü sekanslar, kanser hücrelerinden çıkan kodlanmış protein / polipeptit veya peptite yardımcı olabilir. Dolayısıyla, bir düzenlemede kodlanmış "protein", bir öncü sekans içerir. Burada kullanıldığı haliyle, öncü sekans, promotör sekans ve kodlama bölgesi

arasında bulunan, transkripsiyon ya da translasyon seviyesinde gen ekspresyonunu düzenleyen bir polinükleotid dizisine karşılık gelir.

Bir düzenlemede kodlama sekansı, bir peptidi kodlar. Burada kullanılan şekliyle peptit, tam bir fonksiyonel protein olmayan bir amino asit zincirine karşılık gelir. Tipik olarak proteinin işlevinin bir kısmını veya tamamını tutan bir fragman, T- hücreleri tarafından tanınabilen ya da bağışıklık sistemi tarafından tanınabilen 8 ya da daha fazla amino asitlik peptitlerin bir fragmanıdır.

Bir düzenlemede transgen, örneğin lusiferaz, GFP veya eGFP veya kırmızı flüoresan proteini gibi biyolojik olarak parlak, floresan görüntüleme ajanları (aktive edilebilir fluoresan görüntüleme ajanları dahil) içeren bir görüntüleme ajanını kodlayan bir haberci gendir.

Burada kullanılan haliyle haberci gen veya haberci sekansı, ökaryotik hücrelerde kolayca tespit edilen bir ürün üreten bir gen veya DNA sekansı anlamına gelir ve DNA'sının yakından bağlantılı veya birleştirildiği başka bir genin aktivitesini belirlemek için bir markör olarak kullanılabilir. Haberci genler, onları kolaylıkla tanımlayan ve ölçülen hücreler veya organizmalar üzerinde özellikleri sunar veya bunlar, seçilebilir işaretlerdir. Haberci genler, belirli bir genin hücre ya da organizma popülasyonundan alınıp alınmadığının ya da bunlarda sentezlenip sentezlenmediğinin göstergesi olarak sıklıkla kullanılır. Yaygın haberci genlerin örnekleri bunlarla sınıflı olmamak kaydıyla LacZ, lusiferaz, GFP, eGFP, neomisin fosfotransferaz, kloramfenikol asetiltransferaz, sodyum iyodür simportör (NIS), nitroreduktaz (örneğin, NfsA, NfsB) hücre içi metaloproteinler, HSV1- tk veya östrojen reseptörünü içerir.

Bir düzenlemede, genetik materyal (özellikle transgene), bir görüntüleme ajanı, lusiferaz, GFP veya eGFP gibi bir haberci geni kodlamaz veya eksprese etmez.

Bir düzenlemede, NIS 'in amino asidi sekansı, SEK ID NO: 67'tir.

Mevcut açıklamaya uygun virüsler, tümör hücrelerinin bir panelinde litik potansiyelinin incelenmesiyle spesifik bir tümör türüne yönelik tercihleri için araştırılabilir, örneğin, kolon tümör hücre dizileri arasında HT- 29, DLD- 1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 ve Colo320DM bulunur. Mevcut herhangi bir kolon tümör hücre dizisi böyle bir değerlendirme için eşit derecede yararlı olacaktır.

Prostat hücre dizileri, DU145 ve PC- 3 hücrelerini içerir. Pankreas hücre hatları arasında Panc- 1 hücreleri bulunur. Meme tümör hücre hatlarını, MDA231 hücre dizisini içerir ve yumurtalık hücre dizileri OVCAR- 3 hücre hatlarını içerir. Hemopoietik hücre hatları arasında, bunlarla sınırlı olmaksızın, Raji ve Daudi B- lenfoid hücreleri, K562 eritroblastoid hücreler, U937 miyeloid hücreleri ve HSB2 T- lenfoid hücreleri bulunur. Mevcut diğer tümör hücre çizgileri de eşit derecede yararlıdır.

Mevcut açıklama, burada açıklanan yeni dizileri de kapsar. Bir düzenlemede, virüs burada açıklanan sekanslardan herhangi birinde, örneğin SEK ID NO:'lar: 1 ila 9, SEK ID NO:'lar: 48- 53, SEK ID NO: 56- 63, SEK ID NO: 66, SEK ID NO: 68- 69 ve SEK ID NO: 72- 73'te gösterilir.

Formülasyonlar

Mevcut açıklama, burada tarif edildiği gibi bir virüsün farmasötik bir formülasyonunu da kapsar.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya göre çoğalmaya elverişli bir onkolitiğin örneğin, infüzyonu ya da enjeksiyonu için bir sıvı parenteral formülasyon sağlanır, burada formülasyon dozun hacmi başına 1×10^{10} ila 1×10^{14} viral partikül aralığında bir doz temin eder.

Parenteral formülasyon, GI (gastrointestinal) yol vasıtası ile verilmeyecek şekilde tasarlanmış bir formülasyon anlamındadır. Tipik parenteral uygulama yolları arasında enjeksiyon, implantasyon veya infüzyon bulunur. Bir düzenlemede formülasyon, bolus verilmesine yönelik bir formda sağlanır.

Bir düzenlemede, parenteral formülasyon bir enjeksiyon formundadır. Enjeksiyon intravenöz, deri altına, intra- tümöral veya intramüsküler enjeksiyonları içerir. Burada kullanılan haliyle enjeksiyon, bir şırınga yoluyla sıvının vücuda sokulması anlamına gelir. Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait yöntem, tümör içi enjeksiyonu içermez.

Bir düzenlemede, parenteral formülasyon bir infüzyon formundadır.

Burada kullanıldığı şekliyle infüzyon, sıvıların damla, infüzyon pompası, şırınga sürücüsü veya eşdeğer cihaz ile daha yavaş bir hızda uygulanması anlamına gelir.

Bir düzenlemede infüzyon, 1. 5 dakika ila 120 dakika arasındaki bir periyot boyunca, mesela yaklaşık 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35,

40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 ya da 115 dakika uygulanır.

Bir düzenlemede, formülasyonun bir dozu, bir şırınga sürücüsü tarafından uygulanan şekilde örneğin 100 ml'den azdır, örneğin 30 ml'dir.

- 5 Bir düzenlemede, enjeksiyon, yavaş bir enjeksiyon olarak, örneğin 1. 5 ila 30 dakikalık bir periyot boyunca uygulanır.

Bir düzenlemede formülasyon, intravenöz (i. v.) uygulama içindir. Bu yol, onkolitik virüsün verilmesinde özellikle etkilidir, çünkü organ ve doku yoğunluğuna hızlı erişim sağlar ve metastazların, örneğin özellikle karaciğer ve akciğerler gibi yüksek oranda vaskülarize bölgelerde konumlu bulunan metastazların tedavisi için özellikle yararlıdır.

15 Terapötik formülasyonlar, tipik olarak, üretim ve muhafaza koşulları altında steril ve kararlı olacaktır. Bileşim, bir insana uygulamak için uygun bir çözelti, mikroemülsiyon, lipozom veya başka parenteral formülasyon olarak formüle edilebilir ve bir şırınga veya tüp gibi önceden doldurulmuş bir cihaz, özellikle tek bir doz olarak formüle edilebilir.

Formülasyon genel olarak farmasötik açıdan kabul edilen bir seyreltici veya taşıyıcı, örneğin virüsle uyumlu olan ve virüsün gerekli süre boyunca kararlı olduğu toksik olmayan, izotonik bir taşıyıcıyı içerir.

20 Taşıyıcı, örneğin su, etanol, poliol (mesela, gliserol, propilen glikol ve sıvı polietilen glikol ve benzeri) ve bunların uygun karışımlarını içeren bir çözücü veya dağıtma ortamı olabilir. Uygun akışkanlık, örneğin, lesitin gibi bir dağıtıcı (dispersan) veya yüzey aktif madde ya da polisorbitat 80 veya 40 gibi iyonik olmayan bir yüzey aktif madde kullanılarak muhafaza edilebilir. Dispersiyonlarda, istenen parçacık boyutunun korunması bir yüzey aktif maddenin varlığı ile desteklenebilir. İzotonik maddelerin örnekleri arasında, şekerler, mannitol, sorbitol gibi polialkoller veya bileşim içinde sodyum klorür bulunmaktadır.

30 Bir düzenlemede, kullanılan parenteral formülasyonlar aşağıdakilerden bir veya daha fazlasını içerebilir: örneğin 4- (2- hidroksietil) - 1- piperazinetansülfonik asit, bir fosfat tamponu ve / veya bir Tris tamponu gibi bir tampon; örneğin, bir dekstroza, manoz, sükroz ya da benzerleri gibi bir şeker; sodyum klorür, magnezyum klorür ya da potasyum klorür gibi bir tuz; brij, PS- 80, PS- 40 ya da benzerleri gibi iyonik olmayan

bir yüzey aktif madde benzeri bir deterjan. Formülasyon aynı zamanda, EDTA veya etanol veya bir EDTA ve etanolün kombinasyonu gibi bir koruyucu ihtiva edebilir ve bunun da muhtemel bozulmaların bir veya daha fazla yolunu önlediği düşünülür.

5 Bir düzenlemede, formülasyon mevcut açıklamaya göre saflaştırılmış onkolitik virüs içerecektir, örneğin doz başına 1×10^{10} ila 1×10^{14} viral partikül, mesela doz başına 1×10^{10} ila 1×10^{12} viral partikül içerecektir. Bir düzenlemede, formülasyon içindeki virüs konsantrasyonu, 2×10^8 ila 2×10^{14} vp / mL aralığındadır, örneğin 2×10^{12} vp / ml'dir.

Bir düzenlemede, parenteral formülasyon gliserol içerir.

10 Bir düzenlemede formülasyon, burada tarif edildiği gibi onkolitik adenovirüs, HEPES (N- 2- hidroksietilpiperazin- N'- 2- etansülfonik asit), gliserol ve tampon içerir.

Bir düzenlemede, parenteral formülasyon, buluşun virüsünden, örneğin 5 mM HEPES'ten, örneğin % 5- 20 (v/v) gliserolden, örneğin pH'ı 7- 8 aralığına ayarlamak için hidroklorik asitten ve enjeksiyon için sudan oluşur.

15 Bir düzenlemede, 2×10^{12} vp/mL'lik bir konsantrasyonda buluşa ait 0. 7 mL virüs, 7. 8'lik bir nihai pH'la, 5 mM HEPES, % 20 gliserol içinde formüle edilir.

Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcıların kapsamlı bir tartışması Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Yayıncılık Şirketi, NJ 1991)'da bulunabilir.

20 Bir düzenlemede, formülasyon, solunum dahil topikal uygulamalar için bir formülasyon halinde sağlanır.

Uygun solunabilir preparatlar, solunabilir tozları, itici gazlar içeren ölçüm aerosollerini veya itici gazlar içermeyen solunabilir solüsyonları içerir. Açıklamaya uygun solunabilir tozlar genel olarak burada tarif edildiği gibi bir fizyolojik olarak kabul edilebilir ekspiyan içeren bir virüs ihtiva edecektir.

25 Bu solunabilir tozlar, monosakaritler (örneğin, glukoz veya arabinoz), disakkaritler (örneğin, laktoz, sakkaroz, maltoz), oligo- ve polisakkaritler (örneğin, dekstranlar), polialkoller (örneğin, sorbitol, manitol, ksilitol), tuzlar (örneğin, sodyum klorür, kalsiyum karbonat) veya bunların birbirleriyle karışımlarını içerebilir. Mono- veya disakaritler uygun şekilde kullanılmaktadır, özellikle laktoz veya glukozun kullanımı
30 söz konusudur, ancak yalnızca bunların hidratları şeklinde değildir.

Akciğerde birikim için parçacıklar 10 mikrondan küçük, örneğin 1- 9 mikron, örneğin 0.1 ila 5 µm, özellikle 1 ila 5 µm gibi bir parçacık boyutu gerektirir. Virüs taşıyan parçacık boyutu, birincil önem taşımaktadır ve bu nedenle, bir düzenlemede, mevcut açıklamaya uygun virüs emdirilebilir veya verilen boyuttaki bir laktoz parçacığı gibi bir parçacık üzerinde emilebilir.

Solunabilir aerosollerin hazırlanması için kullanılabilen itici gazlar teknikte bilinmektedir. Uygun itici gazlar, n- propan, n- bütan veya izobutan gibi hidrokarbonlar ve metan, etan, propan, bütan, siklopropan veya siklobütanın klorlu ve / veya florlanmış türevleri gibi halohidrokarbonlar arasından seçilir. Yukarıda bahsedilen itici gazlar kendi başına veya bunların karışımları içinde kullanılabilir.

Özellikle uygun itici gazlar, TG 11, TG 12, TG 134a ve TG227 arasından seçilmiş halojenlenmiş alkan türevleridir. Yukarıda belirtilen halojenli hidrokarbonların arasından özellikle TG134a (1,1,1,2- tetrafloroetan) ve TG227 (1,1,1,2,3,3,3- heptafluoropropan) ve bunların karışımları uygundur.

İtici gaz içeren solunabilir aerosoller ayrıca yardımcı çözücüler, dengeleyiciler, yüzey aktif maddeler (süfaktanlar), antioksidanlar, kayganlaştırıcılar ve pH ayarlama vasıtaları gibi diğer katkı maddelerini de içerebilir. Bütün bu malzemeler teknikte bilinmektedir.

Buluşa göre itici gaz içeren solunabilir aerosoller ağırlıkça % 5'e kadar aktif madde içerebilir. Buluşa uygun aerosoller, etken maddenin örneğin ağırlıkça % 0.002 ila 5, ağırlıkça % 0.01 ila 3, ağırlıkça % 0.015 ila 2, ağırlıkça % 0.1 ila 2, ağırlıkça % 0. 5 ila 2 veya ağırlıkça % 0. 5 ila 1 'ini içerir.

Alternatif olarak, akciğere yapılan topikal uygulamalar, bir sıvı solüsyon veya süspansiyon formülasyonunun örneğin, bir nebülizör gibi bir cihaz, mesela bir kompresöre bağlı bir nebülizör kullanılarak uygulanması ile olabilir (örn. , Pari Respiratory Equipment, Inc. , Richmond, VA tarafından imal edilen bir Pari Master (R) kompresörüne bağlı Pari LC- Jet Plus(R) nebülizör).

Buluşa ait virüs bir çözücü içinde, örneğin bir solüsyon veya bir süspansiyon halinde, örneğin parenteral formülasyonlar için yukarıda halihazırda tarif edildiği gibi, dağıtılmış olarak verilebilir. Bu, uygun bir fizyolojik çözelti içinde, örneğin salin veya farmakolojik olarak kabul edilebilir başka bir çözücü veya tamponlanmış bir çözelti içerisinde süspansiyon haline getirilebilir. Teknike bilinen tamponlanmış çözelti,

yaklaşık 4.0 ila 5.0 arasında bir pH'a ulaşmak amacıyla 0.05 mg ila 0.15 mg disodyum edetat, 8.0 mg ila 9.0 mg NaCl, 0.15 mg ila 0.25 mg polisorbitat, 0.25 mg ila 0.30 mg susuz sitrik asit ve 1 ml su başına 0.45 mg ila 0.55 mg sodyum sitrat içerebilir.

- 5 Terapötik süspansiyonlar veya çözelti formülasyonları ayrıca bir veya daha fazla yardımcı madde (eksiyian) içerebilir. Yardımcı maddeler teknikte iyi bilinmektedir ve tampon maddeleri (örneğin, sitrat tamponu, fosfat tamponu, asetat tamponu ve bikarbonat tamponu), amino asitler, üre, alkoller, askorbik asit, fosfolipidler, proteinler (örn. , serum albümini), EDTA, sodyum klorür, lipozomlar, manitol, sorbitol ve gliserol
- 10 içerir. Çözeltiler veya süspansiyonlar, lipozomlar veya biyolojik olarak parçalanabilir mikroküreler içine kapsüllenebilir. Formülasyon genellikle steril imalat prosesleri kullanılarak büyük ölçüde steril bir formda temin edilecektir.

Bu, formülasyon için kullanılan tampon çözücü / solüsyonun filtrasyonu, steril tamponlanmış çözücü solüsyonunda antikorun aseptik süspansiyonu ve sanayide

15 sıradan tecrübeye sahip kişilerce bilinen yöntemlerle formülasyonun steril kaplara dağıtılması yoluyla imalat ve sterilizasyon içerebilir.

Mevcut açıklamaya uygun nebülize edilebilir formülasyon, örneğin, folyo zarflarla paketlenmiş tekli doz üniteleri (örn. sızdırmaz plastik kaplar veya tüpler) olarak sağlanabilir. Her tüp, bir hacim, örneğin 2 mL, çözücü / solüsyon tamponunda bir

20 birim doz içerir.

Tedavi

Mevcut buluş, bir başka açıdan, tedavide, bilhassa kanser tedavisinde kullanılmak üzere burada tarif edilen bir virüsü veya bunun bir formülasyonunu da kapsar.

Bir düzenlemede tedavi yöntemi, bir tümörün tedavisinde kullanılmak içindir.

- 25 Burada kullanılan haliyle tümör, neoplazm olarak da adlandırılan, kontrolsüz ve ilerleyici aşırı hücre bölünmesinden kaynaklanan anormal bir doku kütesine atıfta bulunmayı hedeflemektedir. Tümörler iyi huylu (kansersiz değil) veya kötü huylu olabilir. Tümör, kanser ve metastazların her biçimini kapsar.

Bir düzenlemede, tümör katı bir tümördür. Katı tümör, lokalize veya metastatik

30 olabilir.

Bir düzenlemede, tümör epitel kaynaklıdır.

Bir düzenlemede tümör, kolorektal kanser, hepatom, prostat kanseri, pankreas kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri, tiroid kanseri, böbrek kanseri, mesane kanseri, baş- boyun kanseri veya akciğer kanseri gibi bir malignansidir.

Bir düzenlemede tümör, bir kolorektal malignansidir.

- 5 Burada kullanılan malignansi, kanserli hücreler anlamına gelir.

Bir düzenlemede, onkolitik adenovirüs metastazın tedavisinde veya önlenmesinde kullanılır.

Bir düzenlemede buradaki yöntem veya formülasyon, ilaca dirençli kanserlerin tedavisinde kullanılır.

- 10 Bir düzenlemede virüs, bir başka kanser tedavisi veya terapisinin uygulanması ile kombinasyon halinde uygulanır.

Bir düzenlemede, kanseri, örneğin yukarıda tarif edilen bir kanseri tedavi etmek için bir ilacın üretiminde kullanılmak üzere mevcut açıklamaya uygun bir virüs veya formülasyon sağlanmıştır.

- 15 Bir başka yönüyle, mevcut açıklamaya uygun bir virüsün veya formülasyonun terapötik olarak etkili bir miktarının ihtiyacı olan bir hastaya, örneğin bir insan hastaya uygulanmasını içeren bir kanser tedavisi yöntemi sunulmaktadır.

Bir düzenlemede, buradaki onkolitik virüs veya formülasyon başka bir terapi ile kombinasyon halinde uygulanır.

- 20 Burada kullanıldığı şekliyle "kombinasyon" terimi, onkolitik virüsün kanser tedavisi veya terapisinin öncesinde, eş zamanlı olarak ve / veya sonrasında uygulandığı yerleri kapsamayı hedefler.

Kanser terapisi, cerrahi, radyasyon terapisi, hedeflenmiş terapi ve / veya kemoterapiyi içerir. Burada kullanılan haliyle, kanser tedavisi terapötik bir bileşik veya biyolojik ajanın, örneğin kanseri tedavi etmeyi ve / veya bunun idame terapisini sürdürmeyi amaçlayan bir antikor ile tedaviyi ifade eder.

- 25

Bir düzenlemede, kanser tedavisi, bir kemoterapötik ajan, hedeflenen bir anti kanser ajanı, radyoterapi, radyo- izotop terapisi veya bunların herhangi bir kombinasyonu dahil olmak üzere herhangi bir başka anti- kanser tedavisinden seçilir.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamanın virüsü mesela bir onkolitik virüs, tümörün küçültülmesi, metastazın tedavi edilmesi ve / veya metastazın veya daha ileri metastazın önlenmesi için ameliyat (neoadjuvan terapi) gibi terapi açısından ön tedavi olarak kullanılabilir. Onkolitik adenovirüs, örneğin ameliyat (adjuvan terapisi) gibi bir terapiden sonra metastazı tedavi etmek ve / veya metastazı veya daha ileri metastazı önlemek için kullanılabilir.

Burada kullanılan haliyle eş zamanlı olma, ek kanser tedavisinin onkolitik adenovirüs formülasyonu ile aynı zamanda veya yaklaşık olarak aynı zamanda uygulanmasıdır. Tedavi, aynı formülasyon içerisinde bulunabilir veya ayrı bir formülasyon halinde uygulanabilir.

Bir düzenlemede, virüs, bir kemoterapötik ajanın uygulanmasıyla kombinasyon halinde uygulanır.

Burada kullanılan haliyle kemoterapötik ajan, habis hücreler ve dokular için seçimli olarak tahrip edici olan spesifik antineoplastik kimyasal ajanları veya ilaçları ifade etmeyi amaçlamaktadır. Örneğin, alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antrasiklinler, bitki alkaloidleri, topoizomeraaz inhibitörleri ve diğer antitümör ajanlar. Kemoterapinin diğer örnekleri arasında doksorubisin, 5- fluorourasil (5- FU), paklitaksel, kapesitabin, irinotekan ve örneğin, cisplatin ve oksaliplatin gibi platinler bulunur. Tercih edilen doz, tedavi edilen kanserin niteliğine göre uygulayıcı kişi tarafından seçilebilir.

Bir düzenlemede, terapötik madde, bağışıklık tepkilerinin ve / veya tümör vaskülarizasyonunun kontrol edilmesine yardımcı olabilen gansiklovirdir.

Bir düzenlemede, buradaki yöntemde kullanılan bir veya daha fazla terapi metronomiktir, yani düşük doz anti kanser ilaçları ile kesintisiz veya devamlı tedavidir, genellikle diğer tedavi yöntemleriyle birlikte verilir.

Alt grup B onkolitik adenovirüsler, özellikle Ad11 ve EnAd gibi bunlardan türetilenler özellikle kemoterapötiklerle sinerjik olabilirler, çünkü bunların çoğunlukla apoptozdan bağımsız bir etki mekanizmasına sahip oldukları ve ağırlıklı olarak nekrolitik bir mekanizma ile kanser hücrelerini öldürdüğü görülmektedir. Dahası, kemoterapi sırasında ortaya çıkan bağışıklık bastırma, onkolitik virüsün daha büyük bir etki ile çalışmasına izin verebilir.

Burada kullanılan haliyle terapötik doz, uygun bir tedavi rejiminde kullanıldığında amaçlanan terapötik etkiyi sağlamak için uygun, örneğin hastalığın semptomlarını

veya durumlarını iyileştiren onkolitik adenovirüs gibi virüs miktarını belirtir. Bir doz, viral parçacıkların sayısı aşağıdaki sonuçlara yani, tümör veya metastatik büyümenin yavaşlatılması veya durdurulması ya da tümör veya metastaz boyutunda küçülmenin bulunmasına ve / veya hastanın ömrü uzatılmasına neden olduğunda, kanser veya metastazların tedavisinde terapötik bir doz olarak düşünülebilir. Uygun terapötik dozlar genellikle terapötik etki ve tolere edilebilir toksisite arasında örneğin yan etki ve toksisitenin, terapi ile elde edilen fayda göz önüne alındığında tolere edilebildiği durumda bir dengedir.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya uygun bir virüs veya terapötik yapı (bunu içeren bir formülasyon da dahil olmak üzere) haftalık olarak uygulanır, örneğin bir hafta 1, doz 1, 3, 5. günlerde, bunu takiben her bir haftada bir kez uygulanır.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya uygun bir virüs veya terapötik yapı (bunu içeren bir formülasyon da dahil olmak üzere) iki veya üç haftalık olarak uygulanır, örneğin 1. haftada 1, 3 ve 5. günlerde uygulanır ve 2 ve 3. hafta da bunun 1, 3 ve 5. günlerinde uygulanır. Bu doz rejimi, uygun olduğu sürece çok kez tekrarlanabilir.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya uygun bir virüs veya terapötik yapı (bunu içeren bir formülasyon da dahil olmak üzere) ayda bir uygulanır.

Bir düzenlemede, mevcut açıklamaya ait virüsler ve yapılar rekombinant tekniklerle hazırlanır. Teknikte uzman kişiler, temin edilmiş adenovirüs genomunun, genomun tamamen veya tüm genomun bir bölümünü içeren bir plasmidin sentezlenmesi de dahil olmak üzere, diğer teknik vasıtalarla üretilebileceğini takdir edeceklerdir. Uzman kişiler, genomun sentezlenmesi durumunda ekleme bölgesinin, sonraki, klonlama yöntemleri kullanılarak genlerin sokulmasını takip eden artefaktlar olduğu için kısıtlama bölgesi nükleotidlerini içermeyebileceğini takdir edecektir.

Bir düzenlemede, temin edilmiş adenovirüs genomu örneğin, SEK ID NO: 63'e göre tamamen sentetik olarak üretilir.

Buradaki açıklama ayrıca, bir transgen veya transgen kasetinin sokulmasıyla elde edilen veya elde edilebilen bir formül (I) adenovirüsünü veya bir alt formülünü de kapsar.

Burada kullanıldığı anlamıyla "var" anlamına gelir.

Bu şartnamenin içeriğinde "içeren", "dahil" olarak da yorumlanacaktır.

Buluşun belirli özellikleri / unsurları içeren düzenlemelerinin, ilgili elemanların / özelliklerden "oluşan" veya "esasen oluşan" alternatif düzenlemeleri kapsamı da hedeflenmektedir.

Teknik açıdan uygun olduğunda, buluşun düzenlemeleri birleştirilebilir.

- 5 Burada spesifik ve açıkça belirtilen tüm düzenlemeler, tek başına veya bir veya daha fazla başka düzenlemede kombinasyon halinde bir feragatnamenin temelini oluşturabilir.

Mevcut buluş ayrıca, ekteki şekillere atıfta bulunan aşağıdaki örneklerde sadece örnekleme yoluyla açıklanmaktadır; bu şekillerde

10 ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

Şekil 1

- NG- 135 virüs genomuyla transfeksiyon sonrası HEK293 hücrelerinde NG- 135 virüs parçacıklarının transfeksiyonunu ve amplifikasyonunu gösterir. HEK293 hücreleri, saflaştırılmış NG- 135 genomik DNA'sı ile transfekte edildi ve sitopatik etki (CPE) 15 gözlemlenerek virüs üretimi açısından izlendi. Mikroskopik görüntüler (A- E), hücre tek katmanında plak oluşumu ile karakterize edilen CPE'yi gösterir, transfeksiyondan 144 saat sonra görülebildi; virüs, enfeksiyondan 216 saat sonra hasat edildi (E). Hasat edilen virüs, HEK293 hücrelerinde çoğaltıldı, 72 saat sonra CPE gözlemlendiğinde (F- G) hasat edildi ve ikinci kez çoğaltıldı, 48 saat sonra CPE gözlemlendiğinde hasat 20 edildi (H- I).

Şekil 2

- NG- 74 virüs genomuyla transfeksiyon sonrası HEK293 hücrelerinde NG- 74 virüs parçacıklarının transfeksiyonunu ve amplifikasyonunu gösterir. HEK293 hücreleri, saflaştırılmış NG- 74 genomik DNA'sı ile transfekte edildi ve sitopatik etki (CPE) 25 gözlemlenerek virüs üretimi açısından izlendi. Mikroskopik görüntüler (A- J), hücre tek katmanında plak oluşumu ile karakterize edilen CPE'yi gösterir, transfeksiyondan 336 saat sonra görülebildi; virüs, enfeksiyondan 384 saat sonra hasat edildi (J). Hasat edilen virüs, HEK293 hücrelerinde (K- R) çoğaltıldı, 240 saat sonra CPE gözlemlendiğinde hasat edildi (R) ve daha sonra ikinciye (S- V), üçüncüye (W- X), 30 dördüncüye (Y- Z) ve beşinciye (@) çoğaltıldı, büyük oranda CPE gözlemlendiğinde hasat edildi.

Şekil 3

NG- 73 virüs genomuyla transfeksiyon sonrası HEK293 hücrelerinde NG- 73 virüs parçacıklarının transfeksiyonunu ve amplifikasyonunu gösterir. HEK293 hücreleri, saflaştırılmış NG- 73 genomik DNA'sı ile transfekte edildi ve sitopatik etki (CPE) gözlemlenerek virüs üretimi açısından izlendi. Mikroskopik görüntüler (A- G), hücre tek katmanında plak oluşumu ile karakterize edilen CPE'yi gösterir, transfeksiyondan 144 saat sonra görülebildi; virüs, enfeksiyondan 192 saat sonra hasat edildi. Hasat edilen virüs, HEK293 hücrelerinde (H) çoğaltıldı ve daha sonra ikinci bir (IL) ve üçüncü kez (M) çoğaltıldı, önemli oranda CPE gözlemlendiğinde hasat edildi.

Şekil 4

NG- 135 ile enfekte edilmiş HEK293 hücrelerinden salgılanan Anti- VEGF antikorunun ELISA bulgulasını gösterir. HEK293 hücreleri, ya bir kontrol virüsü, NG- 47 ya da anti- VEGF antikorunu eksprese eden virüs, NG- 135 ile 72 saat süreyle in vitro enfekte edildi. Kültür süpernatantlarındaki insan IgG1 anti- VEGF antikor seviyeleri, insan VEGF kaplı plakalar ve bir anti- insan IgG- Fc algılama antikoruna (A) kullanılarak ELISA ile ölçüldü. Antikor seviyeleri, saflaştırılmış insan anti- VEGF antikoruna bevacizumab'ın (B) standart eğrisi kullanılarak nicelleştirildi.

Şekil 5

NG- 135 ile enfekte edilmiş HEK293 hücrelerinden salgılanan Anti- VEGF antikorunun ELISA bulgulasını gösterir. HEK293 hücreleri, anti- VEGF antikorunu eksprese eden virüs, NG- 135 ile 24 saat boyunca in vitro olarak enfekte edildi. Kültür süpernatantlarındaki insan IgG1 anti- VEGF antikoruna, bir anti- insan IgG tespit antikoruna ile western blotlama yoluyla değerlendirildi.

Şekil 6

saflaştırılmış insan anti- VEGF antikoruna, bevacizumab, standart eğrisini gösterir. Saflaştırılmış insan anti- VEGF antikoruna, bevacizumab, seri olarak seyreltildi ve insan VEGF kaplı plakalar kullanılarak ELISA ile nicelleştirildi. Bu, ELISA'da kullanılacak bir bevacizumab standart eğrisinin üretimi için gerekli konsantrasyonları belirledi.

Şekil 7

NG- 76 ile enfekte edilmiş HEK293 hücrelerinden salgılanan anti- VEGF antikorunun western blot bulgulasını gösterir. HEK293 hücrelerine NG- 76 virüsü ile enfekte

edilmiş, 24 ya da 44 saat boyunca kültürlenmiş ve daha sonra kodlanmış ScFv ürününün saptanması için bir anti- His etiketli antikör kullanılarak Western- blot ile anti- VEGF ScFv ekspresyonu bakımından değerlendirilmiştir.

Şekil 8

- 5 NG- 76 veya NG- 78 ile enfekte olmuş kolon karsinom hücrelerinden salgılanan anti- VEGF ScFv'nin western blot bulgulasını gösterir. HT- 29 kolon karsinoma hücreleri, EnAd, NG- 76 ya da NG- 78 virüsleriyle enfekte edilmiş, 22, 46 ya da 70 saat süreyle kültürlenmiş daha sonra kodlanmış ScFv ürününün (A) saptanması için bir anti- His etiketli antikör kullanılarak Western- blot ile anti- VEGF ScFv
- 10 ekspresyonu bakımından değerlendirilmiştir.

Şekil 9

- HT- 29 hücrelerinde enfeksiyondan 48 saat sonra NG- 76 virüs replikasyonunu gösterir. HT- 29 kolon karsinom hücreleri, hücre başına (ppc) 10 veya 1 NG- 76 virüs parçacığı ile enfekte edildi, 48 saat süreyle kültürlendi ve daha sonra qPCR ile virüs
- 15 genomu ekspresyonu için değerlendirildi.

Şekil 10

- anti- VEGF antikoru transgen kasetlerinin yapısını özetleyen şematik çizgileri göstermektedir. Tam (ağır ve hafif zincirler) sekanslar veya anti- VEGF antikörlerinin ScFv versiyonları, virüs L5 (Fiber) geninin akış aşağısında yer alan Sbf ve Sgf
- 20 kısıtlama bölgeleri arasındaki EnAd2. 4 genomuna yerleştirildi.

Şekil 11

- NG- 135 virüs replikasyonunu ve gen ekspresyonunun, kolon karsinoma hücre dizilerinde EnAd ile karşılaştırılabilir olduğunu gösterir. HT- 29 ve DLD insan kolorektal karsinoma hücre hatları, in vitro olarak ya EnAd ya da NG- 135 ile enfekte
- 25 edildi ve 3 gün boyunca kültürlendi. Virüs replikasyonu (qPCR kullanılarak viral DNA ölçümü ile ölçülmüştür) ve virüs geni (hekzon) ekspresyonu (RTqPCR kullanılarak viral RNA ölçümü ile ölçülmüştür) değerlendirildi. Benzer veriler, her iki virüsle (A & B) elde edildi.

Şekil 12

- 30 NG- 135 ile enfekte olmuş kolon karsinoma hücre hatlarında saptanabilir anti- VEGF antikör geni ekspresyonunu göstermektedir. HT- 29 ve DLD insan kolorektal

karsinoma hücre hatları in vitro olarak ya EnAd ya da NG- 135 ile enfekte edilmiş, 3 gün süreyle kültürlenmiş ve daha sonra hücrelerden RNA'nın RTqPCR'si ile anti-VEGF antikorunun ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir.

Şekil 13

- 5 anti- VEGF antikorunun, NG- 135 ile enfekte olmuş kolon karsinoma hücre çizgilerinin süpernatantlarında mevcut olduğunu ve hVEGF- 165'e bağlanabildiğini gösterir. HT- 29, DLD ve HCT- 116 insan kolorektal karsinoma hücre hatları, in vitro olarak ya EnAd ya da NG- 135 ile enfekte edildi ve 3 gün boyunca kültürlendi. Kültür süpernatantlarındaki insan IgG1 anti- VEGF antikor seviyeleri, insan VEGF kaplı
- 10 plakalar ve bir anti- insan IgG- Fc algılama antikor (A) kullanılarak ELISA ile ölçüldü. Antikor seviyeleri, saflaştırılmış insan anti- VEGF antikor bevacizumab'ın (B) standart bir eğrisi kullanılarak nicelleştirildi.

Şekil 14

- anti- VEGF ScFv'nin, NG- 76 ile enfekte olmuş kolon karsinoma hücre hatlarının
- 15 süpernatantlarında mevcut olduğunu ve hVEGF- 165'e bağlanabildiğini gösterir. HT- 29 kolon karsinoma hücreleri, EnAd, NG- 76 ya da NG- 78 virüsleriyle enfekte edilmiş, 22, 46 ya da 70 saat süreyle kültürlenmiş daha sonra kodlanmış ScFv ürününün (A) saptanması için bir anti- His etiketli antikor kullanılarak Western- blot ile anti- VEGF ScFv ekspresyonu bakımından değerlendirilmiştir. İnsan embriyonik
- 20 böbrek hücrelerinde ScFv ekspresyonu, VEGF bağlayıcı ELISA ile değerlendirildi. VEGF için ifade edilen ScFv'nin özgüllüğü, saflaştırılmış insan anti- VEGF antikor bevacizumab'ın ELISA'da (B) düşük bir konsantrasyonda dahil edilmesiyle VEGF bağlanmasının inhibisyonu ile teyit edildi.

Şekil 15

- 25 NG- 135 virüs replikasyonu, DLD hücreleri ile implante edilen subkütan bir ksenograft modelinde EnAd ile karşılaştırılabilir. DLD insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu / nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan tümörlere 5×10^9 EnAd veya NG- 135 virüs parçacıkları enjekte edildi. Tümörlerde virüs replikasyonu qPCR ile 3, 7. günlerde (A, n = 4 / zaman noktası başına) veya
- 30 enfeksiyondan sonra 28. günde (B, n = 10) değerlendirildi.

Şekil 16

anti- VEGF antikor geni ekspresyonunun NG- 135 ile tedavi edilen subkütan DLD tümör modelinde tespit edildiğini gösterir. DLD insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu / nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan tümörlere 5×10^9 EnAd veya NG- 135 virüs parçacıkları enjekte edildi. Tedavi sonrası 3. ve 7. günlerde, virüs hekzon geni (A) ve kodlanmış anti- VEGF antikor ağır zincir geni ekspresyonu (B) (mRNA), tümör dokusu RNA'nın RTqPCR'si ile değerlendirildi.

Şekil 17

Anti- VEGF antikorunun, NG- 135 ile tedavi edilen subkütan DLD tümör modelinde eksprese edildiğini gösterir. DLD insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu / nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan tümörlere 5×10^9 EnAd (n=4) veya NG- 135 (n=8) virüs parçacıkları enjekte edildi. Tümörler, enfeksiyondan 28 gün sonra kesilip çıkartıldı, homojen hale getirildi ve çözülebilir özütler, toplam insan IgG1 içeriği (A) ve anti- VEGF antikor (B) ELISA ile değerlendirildi. EnAd tümörlerinin birinden alınan özütler, her ELISA'da pozitif bir kontrol olarak 8ng / ml insan anti- VEGF antikor (bevacizumab) ile aniden yükseltildi.

Şekil 18

Subkütan bir ksenograft modelinin NG- 135 enfeksiyonu, HCT- 116 tümörlerinde anti- VEGF antikor ekspresyonunu ve virüs replikasyonunu gösterir. HCT- 116 insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu / nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan tümörlere 5×10^9 EnAd veya NG- 135 virüs parçacıkları enjekte edildi. Tümörler 3, 7 ve 14. günlerde (n = 5 zaman noktası başına) kesilip çıkartıldı. Virüs replikasyonu qPCR (A) ile değerlendirildi ve anti- VEGF antikorunun (insan IgG1) doku ekspresyonu, insan IgG ELISA (B) ile belirlendi.

Şekil 19

anti- VEGF antikor, bir ksenograft tümör modelinde NG- 135 tedavisinden 28 gün sonra çevresel dolaşımda tespit edilebilir. DLD insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu / nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan tümörlere 5×10^9 EnAd veya NG- 135 virüs parçacıkları enjekte edildi. Tümör taşıyan farelerin çevresel dolaşımındaki anti- VEGF antikor seviyeleri, insan IgG1 ELISA tahlilleri ile değerlendirildi. 450 nm'deki arka plandan çıkarılan emilim (A) 'da

gösterilmektedir ve anti- VEGF antikorunun konsantrasyonu saflaştırılmış insan anti- VEGF antikoru bevacizumab'ın (B) bir standart eğrisi kullanılarak nicelleştirilmiştir.

Şekil 20

transgen kasetinde mevcut olabilecek örnek elemanların şematik görünüşüdür.

5 **Şekil 21**

transgen kasetlerinde kodlanmış örnek elemanların şematik görünüşüdür.

Şekil 22

haberci genleri kodlayan transgen kasetlerinin şematiklerini göstermektedir.

Şekil 23

10 sitokinleri kodlayan transgen kasetlerinin şematiklerini göstermektedir.

Şekil 24

antikorları veya antikor alanlarını kodlayan transgen kasetlerinin şematiklerini göstermektedir.

Şekil 25

15 NG- 47 ve NG- 61 virüsleri ile enfekte edilmiş kolon karsinoma hücre hatlarındaki virüs replikasyonunu ve işlevsel haberci protein ekspresyonunu gösterir. HT- 29 insan kolorektal karsinoma hücre hatları, sırasıyla haberci proteinler GFP'yi veya lusiferazı eksprese eden EnAd veya virüsler NG- 47 veya NG- 61 ile 24, 48, 72 veya 96 saat süresince enfekte edilmiştir. Virüs replikasyonu, her zaman noktasında qPCR
20 ile değerlendirildi ve EnAd (A- B) ile mukayese edildi. GFP ekspresyonu, hücre lizatlarındaki saptanabilir floresan düzeyine göre değerlendirildi (C).

Şekil 26

NG- 47 ve NG- 61 virüsünün onkolitik potensinin EnAd ile karşılaştırılabilir olduğunu gösterir. HT- 29 insan kolorektal karsinoma hücre çizgileri EnAd, NG- 47 veya NG-
25 61 virüs parçacıkları ile enfekte edildi. Enfekte edildikten 72 saat sonra hücre yaşayabilirliği nicelleştirildi ve %'ce hücre sağkalımı (A- B) çizildi. Hem NG- 47 hem de NG- 61 virüsü potansi, HT29 hücre hatlarında (A- B) ve HT29, WI38 ve MRC5 hücre hatlarında (C) EnAd'e eşdeğerdir.

Şekil 27

haberci genlerini eksprese eden bir EnAd virüsleri panelinde, virüs replikasyonunu ve transgen ekspresyonunu gösterir. HT- 29 insan kolorektal karsinom hücre çizgileri, EnAd veya bir dışsal promotör, CMV, endojen büyük geç promotörü (MLP) veya endojen E4 promotörü altında GFP eksprese eden bir virüs paneli ile enfekte edildi.

5 24, 48, 72 veya 96 saat sonra virüs replikasyonu qPCR ile değerlendirildi (A) ve GFP ekspresyonu, bir plaka okuyucuda flüoresans algılaması ile nicelleştirildi (B).

Şekil 28

NG- 135 ile enfekte olmuş kolon ve akciğer karsinoma hücre çizgilerinde anti- VEGF antikor üretimini gösterir. HT- 29 insan kolorektal karsinomu veya A549 akciğer

10 karsinom hücre hatları, 24, 48 veya 72 saat boyunca NG- 135 virüs partikülleri ile enfekte edildi. Her zaman noktasında, hücresel süpernatanın antikor üretimi, IgG1 ELISA ile 5 dakika, 1 saat veya 3 saat boyunca değerlendirildi (HT- 29 verileri A'da, A549 verileri B'de gösterilmektedir). 24, 48 veya 72 saat içinde 1e6 hücre başına üretilen IgG1 miktarının hesaplanması tablo (C)'de gösterilmektedir.

Şekil 29

NG- 139 virüsü üretimi ve virüs NG- 139 ile enfekte edilmiş kolon karsinoma hücre dizilerinde TNF α 'nın ekspresyonunu göstermektedir. Virüs üretimi, CPE'nin görselleştirilmesi ve virüs kapsid proteini Hexon'ın imünohistokimyasal (IHC) (A- B) ile üretilmesi için boyama ile değerlendirilmesinden önce, HT- 29 hücreleri 36 saat

20 boyunca NG- 139 virüsü ile enfekte edilmiştir. NG- 139 ile enfekte edilmiş hücre süpernatantında TNF α üretimi, ELISA ile değerlendirildi ve (C)'de gösterilen tabloda nicelleştirildi. DLD insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu / nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan tümörler 3 defa 5×10^9 EnAd veya NG- 135 virüs parçacıkları tedavi edildi. Tedaviden 15 gün sonra tümörlerdeki TNF

25 seviyeleri ELISA ile değerlendirildi (D).

Şekil 30

Adenovirüslerin genom mimarisinin bir haritasını gösterir.

Şekil 31

DLD hücreleri ile implante edilen subkütan bir ksenograft modelinde tedavi sonrası 3.

30 gün ve 7. günde NG- 61 virüs replikasyonunu göstermektedir.

Şekil 32

DLD hücreleri ile implante edilen subkütan bir ksenograft modelinde tedavi sonrası 7. günde tümörlerdeki lüsiferaz transgen ekspresyonunu göstermektedir.

Şekil 33

5 kolon, akciğer ve yumurtalık karsinoma hücre hatlarındaki NG- 135 virüs replikasyonunu ve anti- VEGF antikoru ekspresyonunu gösterir. HT- 29, HCT- 116, DLD (kolon), SKOV (yumurtalık) veya A549 (akciğer) karsinoma hücre hatları, 24- 120 saat boyunca NG- 135 veya EnAd virüs partikülleri ile enfekte edilmiştir. Virüs replikasyonu, her 24 saatte bir qPCR ile değerlendirildi ve zaman periyodu boyunca maksimum replikasyon (A)'da çizildi. Anti- VEGF antikoru üretimi de her 24 saatte bir
10 IgG1 ELISA ile ölçüldü ve her zaman noktasında hücre süpernatantı içine salgılanan toplam antikor, (B)'de gösterildi.

Şekil 34

bir tümör ile bağlantılı antijen, antikorlar veya antikor alanlarını kodlayan transgen kasetlerinin şematiklerini göstermektedir.

15 Şekil 35

IT dozlama yoluyla in vivo olarak enfekte edilmiş HCT- 116 subkütan ksenograft tümörlerinin ex vivo kültür eksplantlarında NG- 135 virüs replikasyonunu ve anti- VEGF antikor ekspresyonunu gösterir. HCT- 116 insan kolon karsinom hücreleri, CD1 nu/nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi ve oluşturulan
20 tümörlere 5×10^9 NG- 135 virüs parçacıkları enjekte edildi. 10 gün sonra tümörler kesilerek çıkartıldı ve ex vivo kültürden 7 gün önce veya sonra virüs genomu (A) ve anti- VEGF antikoru (B) seviyeleri için test edildi. Sera'da anti- VEGF antikor seviyeleri.

Şekil 36

25 farelerdeki bir in vivo A549 hücre akciğer tümörü modelinde, NG- 135 virüs replikasyonunu ve tümör dokuları üzerindeki etkiyi göstermektedir. Akciğerlerde nodüler tümörler oluşturmak için insan A549 hücreleri intravenöz olarak SCID farelerine enjekte edildi. 8 haftada, tümörler oluşturulduğunda, EnAd veya NG- 135 virüsleri (5×10^9 parçacık) intravenöz olarak enjekte edildi ve tümör üzerindeki etkiler,
30 farklı zaman noktalarında izlendi. Dozaj rejimi (A)'da gösterilmiştir. Akciğerlerde (insan geni PTGER2 için qPCR ile ölçüldüğünde) NG- 135'in tümör yükü üzerindeki

etkisi, doz uygulamasından sonra 3. ve 25. günlerde farklı fareler için (B)'de gösterilmiştir. (C), virüs genomlarının (qPCR) tümör seviyeleri ile ilişkili seviyelerini gösterir (insan PTGER2 qPCR). Görünür tümör nodüllerine ayrılmış akciğerler ve kalan akciğer dokusu virüs genomu seviyeleri için de değerlendirildi (D).

5 **Şekil 37**

intraperitoneal enjeksiyon (5e6 hücre / fare) yoluyla CB17- SCID farelerine implante edilmiş lusiferazı istikrarlı bir şekilde eksprese eden insan SKOV- 3 yumurtalık karsinoma hücreleri kullanılarak, yumurtalık kanserinin mürin ortotopik ksenograft modelinde NG- 135 ve EnAd aktivitesini gösterir. İmplantasyondan 22 gün sonra, fareler intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verilen PBS (kontrol) veya 5e7 EnAd, NG- 135 veya NG- 78 virüs partikülleri ile tedavi edildi ve zamanla, tümör büyümesi lüsiferaz aktivitesi olarak izlendi.

Şekil 38

bir biyoreaktörde kültürlen HEK293 hücrelerinden virüs materyalinin artan üretimini ve saflaştırılmasını takiben, NG- 135 virüsünün karakterize edilmesini ve eksprese edilen anti- VEGF antikorunu gösterir. NG- 135, potens (A) ve replikasyon (B) bakımından bir EnAd virüs standardıyla mukayese edildi ve kültür süpernatantlarında zamanla artan antikor seviyeleri (C) tespit edildi. Saflaştırılmış antikorun Western blotu (D) ve Biacore (E) karakterizasyonu, ticari olarak üretilen anti- VEGF antikor (Avastin) ile karşılaştırılabilirlik göstermektedir.

Şekil 39

kendiliğinden bölünebilir P2A peptit (NG- 165) ile bağlanmış anti- VEGF antikor H & L zincirlerini kodlayan EnAd virüslerinin üretimini ve karakterizasyonunu, EnAd ve NG- 135'e karşı virüs potensi (A), replikasyon (B) ve anti- VEGF antikor üretimini (C) karşılaştırmalı veriler ile birlikte gösterir.

Şekil 40

endojen veya egzogen promotörlerin kontrolü altındaki anti- VEGF antikor ScFv'lerini kodlayan EnAd virüsleri NG- 76 ve NG- 78'in karakterizasyonunu gösterir. Her iki virüs de standart EnAd virüsüne (A & B) karşı benzer bir onkolitik potens göstermiştir. NG- 78 için, ScFv'nin hem supernatantta hem de hücre lizatı fraksiyonlarında

VEGF'ye doğrudan bağlanma aktivitesi (C)'de gösterilmiş ve ticari anti- VEGF antikor (bevacizumab) ile VEGF bağlanması için rekabet (D)' de gösterilmiştir.

Şekil 41

virüs replikasyonu (A), hekzon mRNA (B) ve ScFv mRNA (C) ölçümleri ile tümör taşıyan farelerde EnAd'a karşı NG- 76 virüs aktivitesinin bir karşılaştırmasını gösterir.

Şekil 42

HT- 29 hücrelerinde NG- 135 ile hem antikor replikasyonunun hem de ekspresyonunun sürecini gösterir. Salgılanan antikor, test edilen tüm MOI'ler için 72 saatte tespit edilebilir, ancak antikor ekspresyon seviyesi, MOI girdisine bağlıdır (A). 1 veya 10 virüs ppc ile enfeksiyonu takiben 24, 48 ve 72 saatte antikor üretimi ve replikasyonu (B- D) 'de gösterilmiştir.

Şekil 43

HT- 29 karsinomunda ve WI38 ve MRC5, stromal fibroblast hücrelerinde NG- 135 replikasyonunu (A), anti- VEGF antikorunu (B) ve bulaşıcı virüs parçacıklarının (C) üretimini gösterir.

Şekil 44

(B)'de gösterilen bir egzojen (CMV) promotörün (NG- 47) ya da (D)'de gösterilen endojen MLP (NG- 107)'nin kontrolü altında birincil insan dendritik hücrelerinde eksprese edilen bir eGFP haberci transgenin seçimli ekspresyonunu gösterir. EnAd'a maruz bırakılan dendritik hücreler için eGFP haberci transgen ekspresyonu (A)'da gösterilmektedir ve enfekte edilmemiş kontrol hücreleri için olansa (C)'de gösterilmiştir.

Şekil 45

tümörlerde lüsiferaz transgen ekspresyonunu ve transgen ekspresyonu bir egzojen (CMV) promotörünün (NG- 61) veya endojen MLP promoterinin (NG- 63) kontrolünün altındayken, BALB / c farelerindeki transgen, virüs veya tümöre karşı fonksiyonel bağışıklık tepkisini gösterir. İmmünolojik olarak bozulmamış BALB / c farelerinin böğründe yetiştirilen CT- 26 tümörlerine, virüslerin her biri ile tümör içine enjekte edildi ve zamanla lüminesans görüntüleme (A) ile lüsiferaz ifadesi izlendi ve lüsiferaza (B), EnAd'ye (C) veya tümör (D) antijenlerine karşı T- hücreleri tepkileri ELISPOT tahlili ile ölçüldü.

Şekil 46

antikorları (NG- 190) ya da ScFv antikor varyantını (NG- 221) kodlayan virüslerin, standart bir karşılaştırıcı olarak EnAd virüsü ile karşılaştırmalı olarak, bağışıklık kontrol noktası inhibitörü yol proteini PD- L1'e karşı onkolitik potensini (A, B) ve replikasyonunu (C, D) gösterir.

Şekil 47

NG190 ve NG- 221 ile enfekte HT- 29 hücrelerinin süpernatantlarında anti- PD- L1 antikorunun veya ScFv üretiminin (A) ve PD- L1 ligand bağlama aktivitelerinin (B, C, D) karakterizasyonunu, özgüllük kontrolü olarak anti- VEGF IgG1 antikoru üreten NG- 165 için bağlama ve IgG1 üretimi ile karşılaştırmalı olarak gösterir.

Şekil 48

NG- 190 ile enfekte olmuş A549 hücrelerinin süpernatantında eksprese edilen anti- PD- L1 antikorunun fonksiyonel aktivitesinin, kültür süpernatantlarında IL- 2 olarak ölçülen, karışık bir lenfosit reaksiyonunda T hücresi aktivasyonunun derecesi ile değerlendirildiğini göstermektedir. İki farklı donörün PBMC'lerinden farklılaştırılmış dendritik hücreler, üçüncü bir donörden saflaştırılmış CD4 T- hücrelerine sahip uyarıcı hücreler olarak kullanıldı. NG- 190 süpernatantları ile T hücresi tepkisinin güçlendirilmesi, saflaştırılmış bir anti- PDL1 monoklonal antikoru ve NG- 165 kültürlerinden süpernatantlar ile karşılaştırıldı.

Şekil 49

NG- 177 ile enfekte olmuş 293 hücrenin süpernatantında eksprese edilen anti- PD- L1 antikorunun fonksiyonel aktivitesini, antikor özgüllük kontrolü olarak NG- 135'le karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Her iki virüs, 293 hücrede benzer IgG1 seviyeleri üretmiştir (A). NG- 177 süpernatantları, NG- 135 (B) ile kıyasla seçimli olarak PD- L1'in ligand PD1'e bağlanmasını engelledi ve bu aynı NG- 177 süpernatantları, bir MLR tahlilinde pozitif kontrol (C) olarak saflaştırılmış monoklonal anti- PD- L1 ile IL- 2 üretimini arttırabilmiştir.

Şekil 50

saflaştırılmış monoklonal anti- PD- L1 antikorunun ve NG- 135 üst fazlarının bağlanmasıyla karşılaştırmalı olarak, IFNg ile uyarılan A549 hücreleri üzerindeki NG-

177 süpernatantlarının hücresel PD- L1 bağlanma aktivitesinin FACS analizini göstermektedir.

Şekil 51

antikoru bağışıklık kontrol noktası inhibitörü yol protein CTLA- 4'e (NG- 242) kodlayan EnAd virüsünün karakterizasyonunu gösterir. Virüs replikasyonu, EnAd kontrolü ile mukayese edildi (A). NG- 242 ile IgG1 üretimi, NG- 135 ile karşılaştırıldı (B). NG242 süpernatantlarındaki anti- CTLA4 antikorunun işlevsel aktivitesi, NG- 165 kontrol süpernatantları ile karşılaştırmalı olarak doğrudan ligand bağlama (C) ve bunun yanı sıra ELISA deneylerinde rekombinant CTLA4- Fc'nin kendi ligandı B7- 1'e bağlanmasının engellenmesi (D) ile gösterildi.

Şekil 52

antijen TAA, NY- ESO- 1 (NG- 220) ile ilişkili tümörü kodlayan virüslerin karakterizasyonunu gösterir. NG- 220 (A) veya NG- 217 (B) için virüs replikasyonu EnAd kontrolü ile karşılaştırıldı. NY- ESO- 1, NG- 220 ile enfekte edilmiş hücrelerin lizatında western leke ile tespit edilebilmiş, ancak EnAd kontrol hücrelerinde (C) tespit edilememiştir.

Şekil 53

genomun (NG- 185) Bx ve By bölgelerinde eklenmiş özgün kısıtlama alanlarına sahip EnAd virüsünün karakterizasyonunu gösterir. Hücre canlılığı analizi (A) ve virüs replikasyonu (B) ile karşılaştırıldığında virüs onkolitik aktivitesi, EnAd kontrolüyle mukayese edildi.

Şekil 54

birden fazla ScFvs, shRNA veya sodyum iyodür simporatör proteinini kodlayan transgen kasetlerinin şematiklerini gösterir.

25 SEKANSLAR

SEK ID NO: 1 By bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 77 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, 5' dallı ek yeri alıcı sekansı (bSA), 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir IRES, 5' öncüsüne sahip bir ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı

ihativa eder.

- SEK ID NO: 2** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 135 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, 5' kısa ek yeri alıcı sekansı (SSA), 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir IRES, 5' öncüsüne sahip bir ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 3** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kaseti içeren bir virüs genomu sekansı. Transgen kaseti, bir SSA, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir SSA ve 5' öncüsüne sahip ab hafif zincir sekansı içerir.
- SEK ID NO: 4** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kaseti içeren bir virüs genomu sekansı. Transgen kaseti, bir SSA, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir SSA ve 5' öncüsüne sahip ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 5** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasedine sahip bir EnAd genomunu içeren NG- 74 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir bSA, 5' öncüsüne sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 6** B γ bölgesine eklenen, bir C- ucu His6 etiketli bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasedine sahip bir EnAd genomunu içeren NG- 78 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir bSA, 5' öncüsüne sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve 3' 6 x histidin sekansı ve poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 7** B γ bölgesine eklenen, bir C- ucu His6 etiketli bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasedine sahip bir EnAd genomunu içeren NG- 76 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir CMV promotörü, 5' öncüsüne sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve 3' 6 x histidin sekansı ve poli (A) sekansı ihtiva eder.

- SEK ID NO: 8** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasedine sahip bir EnAd genomunu içeren NG- 73 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir CMV promotörü, 5' öncüsüne sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 9** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikor kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 134 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir CMV promotörü, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir IRES, 5' öncüsüne sahip bir ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 10** EnAd genomunun bp 28166- 28366'sına karşılık gelen ve bunlara içeren B α DNA sekansı.
- SEK ID NO: 11** EnAd genomunun bp 29345- 29379'una karşılık gelen ve bunları içeren B γ DNA sekansı.
- SEK ID NO: 12** EnAd genomu.
- SEK ID NO: 13** CMV egzojen promotör.
- SEK ID NO: 14** PGK egzojen promotör.
- SEK ID NO: 15** CBA egzojen promotör.
- SEK ID NO: 16** Kısa ek yeri alıcısı (SSA). Null sekans
- SEK ID NO: 17** ek yeri alıcısı (SA).
- SEK ID NO: 18** dallı ek yeri alıcısı (bSA).
- SEK ID NO: 19** Dahili Ribozom Giriş sekansı (IRES).
- SEK ID NO: 20** poliadenilasyon dizisi.
- SEK ID NO: 21** Öncü sekans (HuVH).
- SEK ID NO: 22** Öncü dizi (HG3).

- SEK ID NO: 23** Histidin etiketi.
- SEK ID NO: 24** V5 etiketi.
- SEK ID NO: 25** P2A peptidi.
- SEK ID NO: 26** F2A peptidi.
- SEK ID NO: 27** E2A peptidi.
- SEK ID NO: 28** T2A peptidi.
- SEK ID NO: 29** anti- VEGF ab VH zinciri amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 30** anti- PD- L1 antikoru VH zinciri amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 31** anti- VEGF ab VL zinciri amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 32** anti- PD- L1 antikoru VL zinciri amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 33** insan IgG1 sabit ağır zincir amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 34** insan IgG1 modifiye edilmiş sabit ağır zincir amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 35** insan kappa sabit hafif zincir amino asit dizisi.
- SEK ID NO: 36** anti- VEGF ScFv amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 37** anti- PD- L1 ScFv amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 38** Yeşil floresan protein amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 39** Lusiferaz amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 40** İnsan Tümörü nekroz faktörü alfa (TNF α) amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 41** İnsan İnterferon gama (IFN γ) amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 42** İnsan İnterferon alfa (IFN α) amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 43** insan kanseri / testis antijeni 1 (NY- ESO- 1) amino asit sekansı.

- SEK ID NO: 44** insan MUC- 1 amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 45** Bir Kozak sekansı. gccaccatg (Null sekans)
- SEK ID NO: 46** B γ bölgesine eklenen bir anti- PD- L1 tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 177 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir CMV promotörü, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir IRES, 5' öncüsüne sahip bir ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 47** EnAd genomunun E2B bölgesine karşılık gelen DNA sekansı (bp 10355- 5068).
- SEK ID NO: 48** B γ bölgesine eklenen, bir C- ucu His6 etiketli bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasetine sahip bir EnAd genomunu içeren NG- 167 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir 5' SSA, 5' öncüsüne sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 49** B γ bölgesine eklenen sitokini, IFN γ 'yi kodlayan bir transgen kasetini içeren NG- 95 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir 5' CMV promotörü, IFN γ cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 50** B γ bölgesine eklenen sitokini, IFN α 'yı kodlayan bir transgen kasetini içeren NG- 97 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir 5' CMV promotörü, IFN α cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 51** B γ bölgesine eklenen sitokini, IFN γ 'yı kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 92 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir 5' CMV promotörü, IFN γ cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 52** B γ bölgesine eklenen sitokini, IFN α 'yı kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 96 virüs genom dizisi.

Transgen kaseti, bir 5' bSA, IFN α cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.

SEK ID NO: 53 B γ bölgesine eklenen sitokini, TNF α 'yı kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 139 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir 5' SSA, TNF α cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.

SEK ID NO: 54 Kısıtlama bölgesi eklentisi (B γ).

SEK ID NO: 55 Kısıtlama bölgesi eklentisi (B χ).

SEK ID NO: 56 B γ bölgesine eklenen tümörle ilişkili antijeni, NY- ESO- 1'i kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 220 virüs genom dizisi. Transgen kaset, bir 5' PGK promotörü, NY- ESO- 1 cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı içerir.

SEK ID NO: 57 B γ bölgesine eklenen tümörle ilişkili antijeni, NY- ESO- 1'i kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 217 virüs genom dizisi. Transgen kaset, bir 5' CMV promotörü, NY- ESO- 1 cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı içerir.

SEK ID NO: 58 B γ bölgesine eklenen bir anti- CTLA- 4 tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 242 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir SSA, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir IRES, 5' öncüsüne sahip bir ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.

SEK ID NO: 59 B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 165 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir SSA, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir P2A peptit sekansı, 5' öncüsüne sahip ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.

SEK ID NO: 60 B γ bölgesine eklenen bir anti- PD- L1 tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 190 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir SSA, 5' öncüsüne

sahip ab ağır zincir sekansı, bir P2A peptit sekansı, 5' öncüsüne sahip ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.

- SEK ID NO: 61** By bölgesine eklenen, bir C- ucu His6 etiketli bir anti- PD- L1 ScFv'yi kodlayan bir transgen kasedine sahip bir EnAd genomunu içeren NG- 221 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir 5' SSA, 5' öncüsüne sahip anti- PD- L1 ScFv sekansı ve 3' 6 x histidin sekansı sonra poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 62** B γ bölgesine eklenen bir anti- VEGF tam uzunlukta antikoru kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 258 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir CMV promotörü, 5' öncüsüne sahip ab ağır zincir sekansı, bir P2A peptit sekansı, 5' öncüsüne sahip ab hafif zincir sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 63** Bx ve B γ bölgesine eklenen benzersiz kısıtlama bölgeleri olan EnAd genomunu içeren NG- 185 virüs genom dizisi.
- SEK ID NO: 64** bakteri kökenli bir replikasyon (p15A), bir antibiyotik direnç geni (KanR) ve B γ bölgesinde eklenmiş benzersiz kısıtlama bölgelerine sahip EnAd genom sekansı içeren pNG- 33 (pColoAd2. 4) DNA plasmidi.
- SEK ID NO: 65** bakteri kökenli bir replikasyon (p15A), bir antibiyotik direnç geni (KanR) ve Bx ve B γ bölgesinde eklenmiş benzersiz kısıtlama bölgelerine sahip EnAd genom sekansı içeren pNG- 185 (pColoAd2. 6) DNA plasmidi.
- SEK ID NO: 66** B γ bölgesine eklenen GAPDH'ye bir shRNA'yı kodlayan bir transgen kasetini içeren NG- sh01 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir U6 RNA polIII promotörü ve bir shRNA'yı kodlayan DNA içerir.
- SEK ID NO: 67** Sodyum iyodür simportör (NIS) amino asit sekansı.

- SEK ID NO: 68** B_y bölgesine eklenen sodyum iyodür simpotörünü (NIS) kodlayan bir transgen kaset içeren NG- 280 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir 5' SSA, NIS cDNA sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 69** B_y bölgesine eklenen bir anti- VEGF ScFv'yi ve bir anti- PD- L1 ScFv'yi kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomu içeren NG- 272 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir SSA, 5' öncüsüne ve 3' 6 x his etiketine sahip anti- PD- L1 ScFv sekansı, P2A peptit dizisi, 5' öncüsüne ve 3' V5- etiketine sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 70** anti- CTLA- 4 VH zincir amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 71** anti- CTLA- 4 VL zincir amino asit sekansı.
- SEK ID NO: 72** B_x bölgesine eklenen bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasetine sahip EnAd genomu içeren NG- 257 virüs genom dizisi. Transgen kaseti, bir bSA, 5' öncüsüne ve 3' 6 x his etiketine sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve daha sonra 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 73** B_x bölgesine eklenen bir anti- VEGF ScFv'yi kodlayan bir transgen kasetine ve B_y bölgesine eklenen bir anti- PD- L1 ScFv'yi kodlayan bir ikinci transgen kasetine sahip EnAd genomunu içeren NG- 281 virüs genom sekansı. Transgen kaseti, bir bSA, 5' öncüsüne ve 3' 6 x his etiketine sahip anti- VEGF ScFv sekansı ve daha sonra 3' poli (A) sekansı ihtiva eder.
- SEK ID NO: 74** Kısıtlama bölgesi I- Cre1 enzimi tarafından tanınır ve kesilir.
- SEK ID NO: 75** Kısıtlama bölgesi I- Ceu1 enzimi tarafından tanınır ve kesilir.
- SEK ID NO: 76** Kısıtlama bölgesi I- Sce1 enzimi tarafından tanınır ve kesilir.
- DİZİ İD NO: 78-** primerleri gösterir.

ÖRNEKLER

Yapıların isimlendirilmesinde bir önek olarak kullanılan "p", yapının bir plazmid olduğunu gösterir.

Örnekler 1- 6

- 5 Virüsler, aşağıda tarif edilen yöntemler kullanılarak SEK ID NO: 2, 5, 6, 7 ve 8'de gösterilen sekanslarla hazırlanmıştır.

Hücre kültürü

- AD293 hücreleri (Agilent # 240085), glutamin (Gibco: 10109163), 5mM L- glutamin, 2mM Sodyum piruvat, 1mM zorunlu olmayan amino asitler (PAA: M11- 003) ve kalem / strep bulunan DMEM yüksek glikozda kültürlendi. Bu ortam, "AD293 ortamı" olarak adlandırılır. Rutin hücre kültürü ortamı için % 10 FBS (Gibco: 41965062) ve transfeksiyonlar ve enfeksiyonlar için % 2 FBS ilave edilir. Transfeksiyondan 24 saat önce 1. 2×10^6 AD293 hücreleri / şişesi T- 25 şişelerine ekildi, böylece transfeksiyondaki yoğunluk~% 75 birleşti.

15 *Virüs Genom Transfeksiyonu*

- Plasmidler, pNG- 135, pNG- 73, pNG- 74, pNG- 75 ve pNG- 76'ya yönelik plazmid DNA konsantrasyonu ölçüldü (Tablo 2) ve 7.0 µg veya daha sonra her biri 2 saat boyunca 37 derecede kısıtlama enzimi Ascl ile doğrusallaştırıldı. Parçalanmış DNA, 50 µl'lik nükleaz içermeyen su ile seyreltildi ve daha sonra fenol / kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Çıkarılan DNA, daha sonra, 300 µl % 95'ten büyük moleküler biyoloji dereceli etanol ve 10 µl'lik 3M Sodyum Asetat içerisinde 16 saat, - 20 °C'de çöktürüldü. Çökeltilmiş DNA, 14000 rpm'de, 5 dakika santrifüjle pelet haline getirildi ve tekrar santrifüje tabi tutulmadan önce 500 µl % 70 etanol içinde 14000 rpm'de, 5 dakika yıkandı. Temiz DNA pelleti hava ile kurutuldu, 15 µl'lik lipofektamin transfeksiyon reaktifi içeren 500 µl OptiMEM içinde yeniden süspansiyon edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Transfeksiyon karışımı daha sonra AD293 hücrelerini içeren T- 25 şişesine damla damla ilave edildi. 37 °C'de 2 saat süreyle transfeksiyon karışımı ile hücrelerinin inkübe edilmesinden sonra, % 5 CO₂ 4 ml'lik hücre ortamı (% 2 FBS ile takviye edilmiş glutaminli DMEM yüksek glikoz) hücrelere ilave edildi ve şişeler 37 °C'de, % 5 CO₂ inkübe edildi. Hücreler sitopatik etkinin (CPE) varlığı bakımından günlük olarak izlendi (Şekil 1A- E, Şekil 2A- J, Şekil 3A- G). Büyük CPE gözlemlendiğinde, virüs hasat edildi ve hasat zamanı Tablo 2'ye kaydedildi.

Virüs Hasatı ve amplifikasyonu

Ortamdaki hücreler şişenin altından pipetle alındı ve 15 ml'lik bir falcon tüpüne aktarıldı. Hücreler, 5 dk boyunca, 1500 rpm'de santrifüjle pelet haline getirildi ve süpernatant toplandı ve saklandı (~4 ml). Hücre peleti, 1 ml'lik AD293 ortamı içerisinde yeniden askıya alındı ve virüs, üç dondurma- çözme döngüsü kullanılarak hasat edildi. Bunun için hücre topları sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra 1200 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüje tabi tutulmadan ve virüs ihtiva eden süpernatanın toplanmasından önce 37 °C'lik bir su banyosu içinde eritildi. Hasat edilen virüsler, virüs stoklarını çoğaltmak için AD293 hücrelerini tekrar enfekte etmek için kullanıldı. Amplifikasyon esnasında uygun virüs üretimi, hücre tek katmanında belirgin CPE (Şekil 1F- G, Şekil 2K- R, Şekil 3H) gözlenmesi ile doğrulandı. CPE bir kez gözlemlendiğinde, virüs 293 hücreden üç donma- çözülme döngüsü ile hasat edildi. AD293 hücrelerindeki amplifikasyon, enfeksiyonun 48 saat içinde hücre tek katmanlarında belirgin CPE üreten virüs stokları üretilinceye kadar 5 kez tekrarlandı (Şekil 1H- I, Şekil 2S- Z, Şekil 2@ Şekil 3I- M, Tablo 2).

Virüs Saflaştırma

Güçlü virüs stokları bir kez büyütüldüğünde, virüsler, NG- 135, NG- 73, NG- 74, NG- 76 ve NG- 78 virüs stokları üretmek için çift sezyum klorür bantlaması ile saflaştırıldı. Bu stoklar, Abs 260/280 nm ölçülerek titrelenmiştir. (titreler Tablo 2'de kaydedilmiştir).

Tablo 2

Virüs ID	SEK NO:	ID	[plazmid DNA] ng / ml	Önemli CPE tespit edildi	Amplifikasyon Döngüleri	CsCl Bantlı virüs titres (v / ml)
NG- 135	SEK NO: 2	ID	241	216 saat	2	1. 51e12
NG- 73	SEK NO: 8	ID	260	192 saat	3	9. 90e10

NG- 74	SEK ID NO: 5	253	384 saat	5	1.09e11
NG- 76	SEK ID NO: 7	330	184 saat	2	9.00e10
NG- 78	SEK ID NO: 6	260	312 saat	3	4. 50e11

Örnek 7 VEGF Bağlayıcı ELISA:

Tam uzunlukta antikorun, bir SSA- Bev- PA geni (NG- 135) içeren EnAd tarafından enfekte edilmiş ve enzime bağlı immünosorbent analiz (ELISA) ile değerlendirilen hücrelerden salgılanan Bevacizumab'ın amino asit dizisi ile VEGF bağlanma aktivitesi.

AD293 hücreleri, 3. 25e5 hücre / ml'lik bir konsantrasyonda tohumlandı ve 20 saat boyunca büyümesine izin verildi. Hücreler ya SSA- Bev- PA transgen kasedi içeren EnAd ya da bir SSA- GFP- PA (NG- 107) transgen kasedi (Kontrol) içeren bir EnAd kontrol virüsü ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 44 saat sonra, enfekte olmuş hücrelerden süpernatantlar toplandı ve santrifüjle berrak hale getirildi.

ELISA plakaları (A Nunc Immuno MaxiSorp 96 oyuklu bir mikroparka), karbonat / bikarbonat tamponu içinde gece boyunca 4 °C'de insan VEGF- 165 (0. 5 µg/ml, R ve D Sistemleri, 293- VE- 050) ile kaplanarak hazırlandı. Plakalar, sonraki tüm bağlanma adımları arasında PBS % 0.05 Tween 20 ile yıkandı. Plakalar, PBS % 0.05 Tween 20 içinde % 3 BSA ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edildi. Berraklaştırılan enfeksiyon süpernatantları, PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 (1: 2, 1: 8, 1:32, 1: 128, 1: 512, 1: 2048) içine seyreltildi. Safılaştırılmış Bevacizumab'ın seri seyreltilmesi (1000ng / ml - 0.0128ng / ml) hazırlandı ve 40 ng/ml ve 0. 2 ng/ml seyreltilmiş Bevacizumab numuneleri aynı zamanda kontrol enfeksiyon süpernatantlarına katıldı. Tüm numuneler, VEGF- 165 kaplı plakalara ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, HRP substrat çözeltisi 3. 3. 5. 5'- terametiltilendiamin (TMB, Thermo- Fisher) ile HRP saptama gerçekleştirilmeden önce, oda sıcaklığında

1 saat boyunca saptama antikoru HRP'ye konjüge edilmiş anti- insan- Fc (Abcam, ab97225) uygulandı. Reaksiyonu durdurmak için 1M HCl kullanıldı ve gelişen renk 450 nm'de bir plaka okuyucu üzerinde ölçüldü. 450 nm'deki emilim, NGAd- 135 ile enfekte edilmiş hücrelerin süpernatantında salgılanmış anti- VEGF antikorunun

5 spesifik bağlanmasını gösteren EnAd ve Kontrol enfeksiyon süpernatantları (Şekil 4A) için çizilmiştir. Bevacizumab standart eğrisi çizildi (Şekil 6) ve standart eğriden (Şekil 4B) interpolasyon yapılarak VEGF'ye bağlanan salgılanan anti- VEGF antikoru veya yükselen Bevacizumab numunelerinin konsantrasyonları belirlendi.

Örnek 8: Üretim Nihat virüs anti- VEGF antikorları veya anti- VEGF ScFv'leri kodlayan EnAd virüslerin üretimi

Plazmid pEnAd2. 4 (aynı zamanda pColoAd2. 4 SEK ID NO: 64 olarak da adlandırılır), transgen kasetlerinin L5 ve E4 genleri arasında konumlu pEnAd2. 4 benzersiz kısıtlama bölgelerine doğrudan eklenmesi ile pNG- 135, pNG- 73, pNG- 74, pNG- 76, pNG- 78 ve pNG- 167 plazmidlerini üretmek için kullanıldı. Plazmid

15 üretme yöntemleri, Örnek 31'de verilmektedir.

Hazırlanan virüsler

pNG- 135, transgen kasetine bir anti- VEGF VH zincirinin (SEK ID NO: 29), bir antikor sabit ağır zincirinin (SEK ID NO: 33), bir anti- VEGF VL zincirinin (SEK ID NO: 31) ve bir antikor sabit hafif zincirinin (SEK ID NO: 35) dahil edilmesi ile kodlanan bir

20 anti- VEGF antikoru kodlayan bir transgen kaset içerir. pNG- 73 ve pNG- 74, ya bir egzogen promoter, CMV (SEK ID NO: 13) ya da EnAd endojen majör geç promotörün (MLP) kontrolü altında anti- VEGF ScFv'leri kodlayan transgen kasetleri (SEK ID NO: 36) ihtiva eder. pNG- 76, pNG- 78 ve pNG- 167, ya bir egzogen promoter, CMV (SEK ID NO: 13) ya da EnAd endojen majör geç promotörün (MLP) kontrolü altında C- uçlu

25 Histidin peptit etiketleri (SEK ID NO: 23) olan anti- VEGF ScFvs'yi (SEK ID NO: 36) kodlayan transgen kasetleri içerir. PNG- 135, pNG- 73, pNG- 74, pNG- 76, pNG- 78 ve pNG- 167 plasmidlerine yerleştirilen transgen kasetlerinin şematikleri, Şekil 24'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi.

Virüs Üretimi

30 NG- 135 (SEK ID NO: 2), NG- 73 (SEK ID NO: 8), NG- 74 (SEK ID NO: 5), NG- 76 (SEK ID NO: 7) ve NG- 78 (SEK ID NO: 6) virüs genomlarını üretmek üzere enzim AscI'ye sahip kısıtlayıcı sindirimi ile pNG- 135, pNG- 73, pNG- 74, pNG- 76 ve pNG-

78 plazmidleri lineer hale getirildi. Kısıtlayıcı sindirim reaksiyonları Tablo 3'e göre oluşturuldu ve 2 saat boyunca 37 °C'de gerçekleştirildi:

Tablo 3

Reaktif	Hacim (µl)	Tedarikçi
plazmid DNA (~7µg)	~15	
Ascl	2. 5	NEB R0558S
Tampon 4	5	NEB B7004S
Nükleaz içermeyen su	27. 5	Fisher Scientific (BPE 2484- 100)

- 5 Parçalanmış DNA, 50 µl'lik nükleaz içermeyen su ile seyreltildi ve daha sonra fenol / kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Çıkarılan DNA, daha sonra, 300 µl % 95'ten büyük moleküler biyoloji dereceli etanol ve 10 µl'lik 3M Sodyum Asetat içerisinde 16 saat boyunca, - 20 °C'de çöktürüldü. Çökeltilmiş DNA, 14000 rpm'de, 5 dakika santrifüjle pelet haline getirildi ve tekrar santrifüje tabi tutulmadan önce 500 µl % 70 etanol içinde 14000 rpm'de, 5 dakika yıkandı. Temiz DNA pelleti hava ile kurutuldu,
- 10 15 µl'lik lipofektamin transfeksiyon reaktifi içeren 500 µl OptiMEM içinde yeniden süspanse edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Transfeksiyon karışımı daha sonra % 70 hücre doluluk oranına yetişen HEK293 hücrelerini içeren T- 25 şişesine damla damla ilave edildi. 37 °C'de 2 saat süreyle transfeksiyon karışımı ile
- 15 hücrelerinin inkübe edilmesinden sonra, % 5 CO₂ 4 ml'lik hücre ortamı (% 2 FBS ile takviye edilmiş glutaminli DMEM yüksek glikoz) hücrelere ilave edildi ve şişeler 37 °C'de, % 5 CO₂ inkübe edildi. Transfekte edilmiş HEK293 hücreleri her 24 saatte bir izlendi ve her 48- 72 saatte bir ilave ortam ile takviye edildi. Virüs üretimi, hücre tek tabakasında belirgin bir sitopatik etki (CPE) gözlemleyerek izlendi (Şekil 1A- E, Şekil
- 20 2A- J ve Şekil 3A- G). CPE bir kez gözlemlendiğinde, virüs 293 hücreden üç donma- çözülme döngüsü ile hasat edildi. Hasat edilen virüsler, virüs stoklarını çoğaltmak için 293 hücreyi tekrar enfekte etmek için kullanıldı. Amplifikasyon esnasında uygun virüs üretimi, hücre tek katmanında belirgin CPE (Şekil 1F- G, Şekil 2K- RH, Şekil 3H) gözlenmesi ile doğrulandı. CPE bir kez gözlemlendiğinde, virüs 293 hücreden üç donma-

çözülme döngüsü ile hasat edildi. 293 hücrelerindeki amplifikasyon, 48 saatlik enfeksiyon içinde hücre tek katmanlarında belirgin CPE üreten virüs stokları üretilinceye kadar 5 kez tekrarlandı (Şekil 1H- I, Şekil 2S- Z, Şekil 2@ Şekil 3I- M). Güçlü virüs stokları bir kez büyütüldüğünde, virüsler, NG- 135, NG- 73, NG- 74, NG- 76 ve NG- 78 virüs stokları üretmek için çift sezyum klorür bantlaması ile saflaştırıldı.

Örnek 9: Kolon karsinoma hücre hatlarında EnAd ile karşılaştırılan NG- 135 virüs aktivitesinin karakterizasyonu

NG- 135 veya EnAd virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi), gen ekspresyonu (RTqPCR ile değerlendirildi) ve anti- VEGF antikoru ekspresyonu (VEGF bağlayıcı ELISA ile değerlendirildi), kolon karsinoma hücre hatlarında karşılaştırıldı. NG- 135 (SEK ID NO: 2), EnAd geç geni L5 (Fiber)'ten sonra bir anti- VEGF antikoru transgen kasedi içeren EnAd'den türemiş bir virüstür. Takılan kasetin bir şematiği, Şekil 10A ve Şekil 24'te gösterilmektedir. NG- 135 virüsünün üretimi, Örnek 8'de detaylandırılmıştır. HCT- 116, DLD veya HT- 29 kolon karsinoma hücre hatları, 6 oyuklu plakalarda HCT- 116 ve DLD hücreleri için 7. 5e5 hücre/oyuk hücre yoğunluklarında veya HT- 29 hücreleri için 2. e6 hücre/oyuk yoğunluğunda tohumlandı. Hücrelere hücre başına (ppc) 100 ya da 10 EnAd ya da NG- 135 virüs parçacıkları bulaştırılmadan önce ya da enfekte edilmemiş halde bırakılmadan önce plakalar 18 saat boyunca, 37 °C'de, % 5 CO₂ ile inkübe edildi. Analizler, enfeksiyondan 24, 48 veya 72 saat sonra gerçekleştirildi.

qPCR ile viral DNA'nın ölçülmesi

72 saat boyunca 10ppc EnAd ya da NG- 135 ile enfekte edilen ya da enfekte edilmeden bırakılan HT- 29 ve DLD hücreleri, qPCR ile viral DNA'nın ölçülmesi için kullanıldı. Hücre süpernatantları toplandı ve 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüjle temizlendi. Hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve 400 µl/oyuklu 1 x haberci liziz tamponu (Promega: E3971) içinde - 20 °C'de dondurularak çözülme yolu ile çözüldü. Üreticinin protokolüne göre Sigma Genelute DNA ekstraksiyon Kiti kullanılarak 3 µl'lik hücre lizatı veya 10 µl'lik süpernatanttan DNA ekstrakte edildi. EnAd virüs partikülleri (2. 5e10- 2. 5e5vp) kullanan standart bir eğri hazırlandı ve de Sigma Genelute Kit kullanılarak çıkarıldı. Çıkarılan her numune veya standart, Tablo 4'te ayrıntılı olarak verilen reaksiyon karışımında bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR ile analiz edildi

Tablo 4

Reaktif	Hacim / oyuk (µl)
Taqman hızlı ilerleme master karışımı (Lifetech)	5
EnAd İleri primer	0.08
EnAd Tersine primer	0.08
Prob	0.02
NFW	2. 82
Numune	2
Oyuk Hacmi	10

qPCR, Tablo 5'deki programa göre gerçekleştirildi:

Tablo 5

Hayır. Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	50	120
1	95	20
40	95	1
	60	20

- 5 Hücre başına tespit edilen virüs genomlarının sayısının nicelendirilmesi, NG- 135 ve EnAd virüs replikasyonunun hem HT- 29 hem de DLD hücre hatlarında karşılaştırılabilir olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 11A). Enfekte edilmemiş hücrelerde hiçbir virüs genomu tespit edilememiştir (veriler gösterilmemiştir).

RTqPCR ile viral (hekzon) veya anti- VEGF antikoru gen ekspresyonunun analizi

10ppc EnAd veya NG- 135 ile 72 saat enfekte edilmiş veya enfekte edilmemiş halde bırakılmış HT- 29 ve DLD hücre hatları, RTqPCR ile hekzon veya anti- VEGF antikor geni ekspresyonunun analizi için kullanılmıştır. Süpernatant her kuyudan çıkarıldı ve hücreler PBS ile yıkandı ve sonra β - merkapttoetanol (1: 100) içeren 600 μ l/oyuk RLT 5 tamponu (QIAgen) içinde eritildi. Hücre lizatları 3 dakika süreyle 13000 rpm'de santrifüje tabi tutularak berraklaştırıldı ve daha sonra, 200 μ l lizat RNA üreticisinin protokolüne göre Allprep DNA / RNA / protein ekstraksiyon kiti (QIAgen) kullanılarak ekstraksiyon amacıyla kullanılmıştır. Her numuneden çıkarılan RNA konsantrasyonu ölçülmüş ve üreticinin protokolüne göre qRT- PCR (Life Technologies; 11752- 050) 10 için SuperScript III First Strand Synthesis SuperMix kullanılarak 800ng cDNA sentezine yönelik kullanılmıştır. Her bir sentezlenmiş 1 μ l DNA numunesinden, aşağıda ayrıntılı olarak verilen reaksiyon karışımında bir EnAd hekzon spesifik primer- prob seti veya anti- VEGF antikor spesifik primer- prob seti kullanılarak qPCR ile analiz için kullanıldı, Tablo 6.

15 **Tablo 6**

Reaktif	Hacim / oyuk (μ l)
Taqman hızlı ilerleme master karışımı (Lifetech)	5
İleri primer	0.08
EnAd Tersine primer	0.08
Prob	0.02
NFW	3,82
Numune	1
Oyuk Hacmi	10

qPCR, Tablo 5'deki programa göre gerçekleştirildi. qPCR tarafından tespit edilen DNA kopyalarının sayısının nicelendirilmesi, NG- 135 veya EnAd ile enfekte edilmiş HT- 29 veya DLD hücrelerinde virüs geç geni Hexon'un karşılaştırılabilir 20 ekspresyonunu gösterdi (Şekil 11B). Bununla birlikte, anti- VEGF antikor geni

ekspresyonu, anti- VEGF antikorlu transgen kasedi içeren NG- 135 virüsüyle enfekte olan HT- 29 veya DLD hücrelerinde tespit edilmiştir (Şekil 12).

VEGF bağlayıcı ELISA ile anti- VEGF antikorlu ekspresyonunun analizi

VEGF bağlayıcı ELISA ile antikor ekspresyonunun analizi için, 100ppc EnAd veya NG- 135 ile 24, 48 veya 72 saat süreyle enfekte edilmiş veya enfekte edilmemiş halde bulunan HT- 29, DLD ve HCT- 116 hücreleri kullanılmıştır. Kültür süpernatantları, her oyuktan çıkarıldı ve hücre döküntülerini gidermek için 5 dakika 1200rpm'de santrifüje tabi tutuldu. ELISA plakaları (Nunc Immuno MaxiSorp 96 oyuklu mikro plaka), insan VEGF- 165 (0. 5 µg/ ml, R ve D Sistemleri, 293- VE- 050) ile kaplandı ve Örnek 7'de ayrıntılandırılan yöntemlere göre bloke edildi. Enfeksiyon süpernatantları, PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 (1: 2 veya 1: 4) içine seyreltildi ve saflaştırılmış anti- VEGF antikorunun (1000ng / ml - 0.0128ng / ml) seri seyreltilmesi hazırlandı. Tüm numuneler, VEGF- 165 kaplı plakalara ilave edildi ve Örnek 7'de ayrıntılandırılan yöntemlere göre analiz edildi. VEGF'ye bağlanan salgılanan anti- VEGF antikor konsantrasyonları, standart eğrilerinden interpolasyon yoluyla tespit edildi. Anti- VEGF antikor ekspresyonu, 72 saate kadar HT- 29, DLD ve HCT hücrelerinde zamanla artmış ve bu noktada, karşılaştırılan antikor ekspresyonu, tahlil edilen tüm hücre hatlarının süpernatantı içinde tespit edilmiştir (Şekil 13).

Örnek 10: Kolon karsinomu ve akciğer karsinom hücre çizgilerinde anti- VEGF antikor ekspresyonunun ölçülmesi

HT- 29 kolon karsinomu ve A549 akciğer karsinoma hücre çizgileri, HT- 29 için 1e6 hücre/oyuk ve A549 hücreleri için 5e5 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu plakalarda kaplanmıştır. Hücrelere hücre başına (ppc) 100 EnAd ya da NG- 135 virüs parçacıkları bulaştırılmadan önce ya da enfekte edilmemiş halde bırakılmadan önce plakalar 24 saat boyunca, 37 °C'de, % 5 CO₂ ile inkübe edildi. Analizler, enfeksiyondan 24, 48 veya 72 saat sonra gerçekleştirildi.

Her zaman noktasında, kültür süpernatantları her bir oyuktan çıkarıldı ve 400 µl hücre kültürü ortamı ile yer değiştirildi. Daha sonra, ortamlar her bir oyuktan toplanmadan önce plakalar 5 dakika, 1 saat veya 3 saat inkübe edildi ve hücre artıklarını temizlemek için 5 dakika, 1200 rpm'de santrifüje tabi tutuldu. ELISA plakaları (Nunc Immuno MaxiSorp 96 oyuklu mikroplaka), karbonat / bikarbonat tamponu içinde seyreltilmiş fare monoklonal anti- insan IgG1 Fc antikorlu (2 µl / ml,

ab1927, Abcam) ile 16 saat boyunca 4 °C'de kaplandı. Plakalar, PBS % 0.05 Tween 20 ile yıkanmadan önce oda sıcaklığında PBS % 0.05 Tween 20 içinde % 3 BSA ile 1 saat süreyle bloke edildi. Plakalar, daha sonraki tüm bağlanma aşamaları arasında 3 kez PBS % 0.05 Tween 20 ile yıkandı.

- 5 Berraklaştırılan enfeksiyon süpernatantları, % 3 BSA /PBS % 0.05 Tween 20 (1:2, 1:8, 1:32) içine seyreltildi. Saflaştırılan Bevacizumab'ın (200 ng / ml - 0.1 ng / ml) seri seyreltilmesi de PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20'de hazırlandı. Numuneler ve standartlar kaplanmış plakalara ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, HRP substrat çözeltisi 3. 3. 5. 5'- terametiletilediamin (TMB, Thermo-
- 10 Fisher) ile HRP saptama gerçekleştirilmeden önce, oda sıcaklığında 1 saat boyunca saptama antikoru HRP'ye konjüge edilmiş anti- insan- Fc (0. 5µg/ml Abcam, ab87422) uygulandı. Reaksiyonu durdurmak için 1M HCl kullanıldı ve gelişen renk 450 nm'de bir plaka okuyucu üzerinde ölçüldü. HT- 29 hücrelerinde (Şekil 28A) ve A549 hücrelerinde (Şekil 28B) salgılanan anti- VEGF antikor konsantrasyonları,
- 15 standart eğrilerden interpolasyon yoluyla belirlendi. 1e6 HT- 29 veya A549 hücreleri tarafından 24, 48 ve 72 saat boyunca eksprese edilmesi öngörülen toplam protein Şekil 28C'de özetlenmiştir.

Örnek 11: Kolon karsinomu hücre hattında anti- VEGF ScFv ekspresyonu

- NG- 76 (SEK ID NO: 7), NG- 78 (SEK ID NO: 6) ve EnAd anti- VEGF ScFv
- 20 ekspresyonu, HT29 kolon karsinomu hücrelerinde western blot ile karşılaştırıldı. NG- 76 ve NG- 78, EnAd geç geni L5'ten (Fiber) sonra anti- VEGF ScFv transgen kasetleri içeren EnAd'den türetilen virüslerdir. Eklenen kasetlerin şematikleri, Şekil 10B ve C'de gösterilmekte ve virüslerin üretimi Örnek 8'de açıklanmaktadır. HT- 29 hücreleri 6 oyuklu kültür plakalarına 4e6 hücre / oyuk yoğunluğunda ekildi ve 5 saat
- 25 37 °C'de, % 5 CO₂'de inkübe edildi. Hücreler daha sonra 22, 46 veya 70 saat boyunca, hücre başına 50 NG- 76, NG- 78 veya EnAd virüs partikülleri ile enfekte edildi. Ortam, oyuklardan çıkarıldı ve hücreler, anti- proteaz inhibitörü kokteyl III (Calbiochem: 539134) ihtiva eden 250 µl liziz tamponu (150mM NaCl, % 1 Triton X- 100, % 0. 5 SDS, 50mM Tris- HCl (pH7. 5)) içinde lizizden önce PBS ile bir kez
- 30 yıkandı. Lizatlara, genomik DNA'yı indirgemek üzere benzonaz ile muamele edildi ve NuPAGE LDS numune tamponu ve NuPAGE indirgeyici madde (Life Technologies) ihtiva eden liziz tamponu içinde 1: 4 oranında seyreltildi. Numuneler, üreticinin protokolüne göre % 4- 12 Bis- Tris NuPAGE jelleri (Life Technologies) kullanılarak

SDS- PAGE gerçekleştirilmeden önce 10 dakika, 70 °C'de ısıtıldı. Proteinler, Xcell II Blot Modülü (Life Technologies) kullanılarak western blot ile PVDF zarlarına aktarıldı. Bloke etme ve imünoblotlama % 5 süt tozu ile takviye edilmiş PBS % 0.1 Tween-20'de gerçekleştirildi ve tüm yıkama adımları PBS % 0.1 Tween- 20'de gerçekleştirildi. Anti- VEGF ScFv'ler, ScFv'nin C- ucunda His- etiketine karşı fare monoklonal anti- Ct- Hisx6 antikoru kullanılarak tespit edildi ve ikincil antikor tespiti, Tavşan anti- fare IgG- HRP kullanılarak gerçekleştirildi. Proteinler gelişmiş kemilüminesans ile görselleştirildi. ScFv ekspresyonu, NG- 76 veya NG- 78 ile enfekte edilmiş HT- 29 hücre lizatlarında tespit edilebildi, ancak EnAd ile enfekte edilmiş hücrelerde (sırasıyla, 76, 78 ve Şekil 14A'da Ad1 olarak etiketlenmiş) tespit edilemedi. ScFv ekspresyonu, ScFv ekspresyonunun bir endojen büyük geç promotörün kontrolü altında olduğu NG- 78 virüsüne kıyasla ScFv ekspresyonunun bir egzogen promotörün kontrolü altında olduğu NG- 76 virüsü ile enfekte edilmiş hücrelerde 22 saat, erken tespit edilebildi.

15 **Örnek 12: VEGF bağlayıcı ELISA ile tespit edilen anti- VEGF ScFv ekspresyonu**

NG- 76 (SEK ID NO: 7) ve EnAd, anti- VEGF ScFv ekspresyonu, insan embriyonik böbrek hücre hatlarında, VEGF bağlayıcı ELISA veya Western blot ile karşılaştırıldı. AD293 hücreleri, 6 oyuklu kültür plakalarına, oyuk başına 5e5 hücre yoğunluğunda ekildi. Ekimden 24 saat sonra, AD293 hücreleri, hücre başına 100 virüs parçacığında NG- 76 veya EnAd ile enfekte edildi. Hücreler, süpernatantlar oyuklardan toplanmadan önce 72 saat boyunca kültürlendi ve hücre artıklarını çıkarmak için 5 dakika 1200 rpm'de santrifüje tabi tutuldu. Berraklaştırılmış süpernatantlar daha sonra ya VEGF bağlayıcı ELISA ya da Western blot analizi için kullanıldı. ELISA için süpernatantlar % 3 BSA / PBS % 0.05 Tween içinde 1: 2 oranında seyreltildi ve daha sonra ya 8 ng/ml anti- VEGF antikoru yükseltildi ya da antikor bırakıldı. ELISA plakaları VEGF ile kaplandı ve Örnek 7'de ayrıntılandırılan yöntemle göre bloke edildi. Numuneler, plakalara 100 µl / oyuk ve deneyde eklenmiştir. Daha sonra, HRP substrat çözeltisi 3. 3. 5. 5'- terametilendiamin (TMB, Thermo- Fisher) ile HRP saptama gerçekleştirilmeden önce, oda sıcaklığında 1 saat boyunca saptama antikoru HRP'ye konjüge edilmiş poliklonal anti- His (Abcam, ab1187) uygulandı. Reaksiyonu durdurmak için 1M HCl kullanıldı ve gelişen renk 450 nm'de bir plaka okuyucu üzerinde ölçüldü. 450 nm'de emilim, EnAd, NG- 76 ve NG- 76 + 8ng / ml anti- VEGF antikoru enfeksiyonu süpernatantları için çizildi (Şekil 14B). NG- 76 ile

enfekte olmuş hücrelerin süpernatantlarındaki VEGF için eksprese edilen ScFv'nin özgüllüğü, 8 ng/ml saflaştırılmış insan anti- VEGF antikoru bevacizumabın eklenmesi ile VEGF bağlanma kısmen inhibe edilerek teyit edildi. Western blot için süpernatantlar hazırlandı ve Örnek 11'de detaylandırılan yöntemlere göre test edildi.

- 5 ScFv ekspresyonu, enfeksiyondan 24 saat sonra düşük seviyelerde tespit edilebildi ve ekspresyon 44 saat boyunca önemli ölçüde arttı (Şekil 7).

Örnek 13: Tümör taşıyan farelerde EnAd ile karşılaştırıldığında NG- 135 virüs aktivitesinin karakterizasyonu

- DLD veya HCT- 116 kolon karsinom hücreleri, CD1 nu/nu farelerinde subkütan bir ksenograft olarak implante edildi. Tümörler $\sim 100\text{mm}^3$ ulaştığında, fareler gruplandırılmış ve tek intra- tümöral enjeksiyon yoluyla verilen 5×10^9 EnAd veya NG- 135 virüs partikülleri ile muamele edilmiştir. Her çalışmaya, bir grup enfekte edilmemiş kontrol faresi de dahil edilmiştir. Tedaviden 3, 7 veya 28 gün sonra DLD tümörleri kesip çıkartıldı ve tedavi sonrası 3, 7 veya 14. gün HCT- 116 tümörlerinden kesip çıkartıldı.

qPCR ile virüs genom replikasyonu analizi

- Kesilip çıkartılan tümörler tartıldı ve 25 mg tümör başına 100 μl tampon konsantrasyonunda 1: 200 anti- proteaz inhibitörü kokteyl III'ü (Calbiochem) içeren 1X haberci liziz tamponu (Promega E3971) içinde homojenize edildi. Muamele edilmemiş tümör homojenatları, bir EnAd virüs standart eğrisi (2.5×10^{-2} - 2.5×10^5 vp / tümör lisat numunesi) hazırlamak için kullanıldı. Üreticinin protokolüne göre Sigma Genelute DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak her muamele edilmiş tümör numunesinin 2 μl 'sinden veya her bir standardın 100 μl 'sinden DNA ekstrakte edildi. Çıkarılan numuneler ve standartlar, Örnek 8'de detaylandırılan qPCR yöntemlerine göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR ile analiz edildi. Tümör başına virüs genomlarının sayısının nicelendirilmesi, tedavi sonrası 3. gün veya 7. gün (Şekil 15A) veya tedavi sonrası 28. gün (Şekil 15B) DLD tümörleri için gösterilmiştir. Enab veya NG- 135 ile tedaviden sonra 3. gün, 7. gün veya 14. gün HCT tümörleri için tümör başına virüs genomlarının sayısının nicelendirilmesi gösterilmektedir (Şekil 18A). Toplanan veriler, HCT veya DLD tümörlerinde EnAd ve NG- 135 virüs replikasyonu arasında belirgin bir fark göstermemektedir.

RTqPCR ile viral (hekzon) veya anti- VEGF antikoru gen ekspresyonunun analizi

Alınan tümörler tartıldı ve 20 mg tümör başına 350 µl'lik bir tampon konsantrasyonunda β- merkaptotanol (Sigma) içeren RLT liziz tamponu (QIAgen) içinde homojenize edildi. RNA, AllPrep DNA / RNA / Protein Mini kiti (QIAgen) kullanılarak tümör numunelerinden çıkarıldı ve üreticinin protokollerine göre RNAz içermeyen DNAz seti (QIAgen) ile muamele edildi. Her numuneden çıkarılan RNA konsantrasyonu ölçüldü ve 800 ng, Örnek 8'de ayrıntılı olarak açıklanan RTqPCR yöntemlerine göre cDNA sentezi ve qPCR için kullanılmıştır. qPCR tarafından tespit edilen RNA kopyalarının sayısının nicelendirilmesi, tedavi sonrası 3. gün veya 7. günde NG- 135 veya EnAd ile tedavi edilen DLD tümörlerinde virüs geç geni, hekzonun karşılaştırılabilir ekspresyonunu gösterdi (Şekil 16A). Aksine, anti- VEGF antikoru geni ekspresyonu (RNA), sadece NG- 135 virüsü ile tedavi edilen DLD hücrelerinde tespit edildi (Şekil 16B).

Anti- insan IgG1 veya VEGF bağlayıcı ELISA ile tespit edilen anti- VEGF antikoru ekspresyonu

Anti- insan IgG1 ELISA (Abcam Kit) veya VEGF bağlayıcı ELISA ile anti- VEGF antikoru ekspresyonunun analizinde, qPCR (yukarıda) için hazırlanan çıkartılmış tümör lizatları kullanılmıştır. Tümör rezeksiyonu noktasında alınan kan örneklerinden alınan serumlar ayrıca insan IgG1'i için ELISA ile test edildi. Muamele edilmiş ve kontrol farelerindeki tümör lizatları analiz edilmeden önce, % 2 Triton X- 100 ihtiva eden 150 µl 1X haberci veya liziz tamponu (Promega) içinde 1: 2 oranında seyreltildi, kısa süre vortekslendi ve sonikasyon yapan bir su banyosu içinde 5 dakika sonike edildi. Kan örnekleri 5000 rpm'de 5 dakika santrifüje tabi tutuldu ve serum toplandı. Saflaştırılmış anti- VEGF antikoru, bevacizumab'ın (1000ng / ml - 0.0128ng / ml) seri dilüsyonları hazırlandı ve muayene standart eğrileri üretmek üzere toplanan kontrol farelerinin lizatlarına ya da muamele edilmemiş farelerdeki serum numunelerine katılmıştır.

İnsan IgG1 ELISA (Abcam)

NG- 135 veya EnAd ile muamele edilen tümörlerden alınan ses dalgalarına maruz bırakılmış lizatlar, ayrıca 1: 2 oranında tahlil tamponuna seyreltildi ve pozitif bir kontrol olarak, EnAd ile muamele edilmiş fare tümörü lizatı numunesi, 8 ng/ml

saflaştırılmış bevacizumab ile yükseltildi. Serum numuneleri 1: 2 veya 1: 5 oranında tahlil tamponuna seyreltili. Daha sonra tüm numuneler ve standartlar, üreticinin protokolüne göre Abcam ELISA Kiti kullanılarak anti- insan IgG1 için denendi. Tümörlerdeki antikor konsantrasyonları, standart eğrilerden interpolasyon yoluyla belirlendi. İnsan IgG1 antikor ekspresyonu, NG- 135 ile muamele edilen DLD tümörlerinde tespit edilebildi ve tedaviden 28 gün sonra analiz edildi (Şekil 17A) ve bir NG- 135 ile muamele edilmiş fareden alınan bir serum numunesinde tedaviden 28 gün sonra analiz edildi (Şekil 19). Antikor ayrıca, NG- 135 ile tedavi edilen tüm HCT- 116 tümörlerinde tespit edildi ve tedaviden 3, 7 veya 14 gün sonra analiz edildi (Şekil 18B). EnAd ile tedavi edilen farelerin herhangi bir tümöründe veya kan örneğinde antikor ekspresyonu tespit edilemedi.

VEGF bağlayıcı ELISA

NG- 135 veya EnAd ile muamele edilen tümörlerden alınan ses dalgalarına maruz bırakılmış lizatlar, ayrıca 1: 2 oranında tahlil tamponuna seyreltili ve pozitif bir kontrol olarak, EnAd ile muamele edilmiş fare tümörü lizatı numunesine, 1. 6 ng/ml saflaştırılmış bevacizumab katıldı. ELISA plakaları (Nunc Immuno MaxiSorp 96 oyuklu mikro plaka), insan VEGF- 165 (0. 5 µg/ ml) ile Örnek 7'de ayrıtılandırılan yöntemlere göre kaplandı. Numuneler ve standartların süpernatantları, VEGF- 165 kaplı plakalara ilave edildi ve Örnek 7'de detaylandırılan yöntemlere göre analiz edildi. Tümörlerdeki anti- VEGF bağlayıcı antikor konsantrasyonları, standart eğriden interpolasyon yoluyla belirlendi. hVEGF- 165'e bağlanabilen anti- VEGF antikor, NG- 135 ile tedavi edilen DLD tümör numunelerinde saptanabildi, ancak EnAd ile muamele edilmiş numunelerde saptanamadı (Şekil 17B).

Örnek 14: Haberci genleri kodlayan EnAd virüslerinin üretimi ve karakterizasyonu

GFP ya da lusiferaz eksprese eden haberci virüslerin bir paneli üretilmiş olup, transgen ekspresyonu egzojen bir viral promotör olan CMV'nin (NG- 47, NG- 61, bir egzojen memeli promotörü, PGK (NG- 159)), endojen virüs büyük geç promotörün (NG- 62, NG- 63, NG- 93, NG- 98, NG- 105, NG- 106, NG- 107, NG- 108) ya da endojen virüs erken promotör E4'ün (NG- 109, NG- 110) kontrolü altındadır. Tüm virüsler, klonlama plazmidi pEnAd2. 4 (GB1322851. 5 numaralı başvuruda

açıklanmaktadır) kullanılarak türetildi ve EnAd geç gen L5'ten sonra yerleştirilen transgen kasetlerine sahipti.

Virüs Üretimi

Plasmid pEnAd2. 4, L5 ve E4 genleri arasında bulunan pEnAd2. 4 benzersiz restriksiyon bölgelerine yeşil floresan proteini (GFP, SEK ID NO: 38) kodlayan transgen kasetlerinin doğrudan sokulması ile pNG- 47, pNG- 62, pNG- 93, pNG- 105, pNG- 106, pNG- 107, pNG- 108, pNG- 109, pNG- 110 ve pNG- 159 plasmidlerini üretmek için kullanılmıştır. pNG- 47, pNG- 62, pNG- 93, pNG- 105, pNG- 106, pNG- 107, pNG- 108, pNG- 109, pNG- 110 ve pNG- 159 plazmidlerine yerleştirilmiş transgen kasetlerinin şematikleri Şekil 22'de gösterilmektedir. Plazmid pEnAd2. 4 (SEK ID NO: 64) ayrıca, lüminesan proteini, lusiferazı (SEK ID NO: 39) kodlayan transgen kasetlerinin pEnAd2. 4 benzersiz restriksiyon bölgelerine doğrudan sokulması ile pNG- 61 ve pNG- 63 plasmidlerini üretmek için de kullanılmıştır. pNG- 61 ve pNG- 63 plazmidlerine yerleştirilen transgen kasetlerinin şematikleri Şekil 22'de gösterilmektedir. Tüm plazmidler DNA dizilimi ile teyit edildi. Haberci genlerini kodlayan plasmidler, Örnek 8'de ayrıntılı olarak açıklanan 'virüs üretimi' yöntemlerine göre virüs parçacıkları üretmek üzere lineer hale getirildi ve HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Güçlendirilmiş virüs partikülleri, virüs stokları NG- 47, NG- 62, NG- 93, NG- 105, NG- 106, NG- 107, NG- 108, NG- 109, NG- 110, NG- 61 ve NG- 63'ü üretmek üzere çift sezyum klorür bantlaması ile saflaştırıldı.

Virüs Karakterizasyonu

NG- 47, NG- 62, NG- 93, NG- 105, NG- 106, NG- 107, NG- 108, NG- 109, NG- 110 veya EnAd virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirilir) ve GFP gen ekspresyonu (floresans tahlili ile değerlendirildi), kolon karsinoma hücre hattı HT- 29'da karşılaştırılmıştır. HT- 29 kolon karsinoma hücre hatları, 12 oyuklu plakalara 1e6 hücre / oyuk hücre yoğunluklarında ekildi. Hücreler yukarıda ayrıntılı olarak verilen virüslerin her birinde hücre başına 1 virüs partikülü (ppc) enfekte edilmeden önce veya enfekte edilmemiş olarak bırakılmadan önce plakalar, 24 saat boyunca, 37 °C'de, % 5 CO₂ ile inkübe edildi. Analizler, enfeksiyondan 24, 48, 72 veya 96 saat sonra gerçekleştirildi.

qPCR ile viral DNA'nın ölçülmesi

Hücre süpernatantları toplandı ve 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüjle temizlendi. Hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve 400 µl/oyuklu 1 x haberci liziz tamponu (Promega: E3971) içinde - 20 °C'de dondurularak çözülme yolu ile eritildi. Üreticinin protokolüne göre Sigma Genelute DNA ekstraksiyon Kiti kullanılarak 1 µl'lik hücre lizatı veya 10 µl'lik süpernatanttan DNA ekstrakte edildi. EnAd virüs partikülleri (2. 5e10- 2. 5e5vp) kullanan standart bir eğri hazırlandı ve de Sigma Genelute Kit kullanılarak çıkarıldı. Çıkarılan her numune veya standart, örnek 9'da detaylandırılan qPCR yöntemlerine göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR ile analiz edildi. Hücre başına virüs genomlarının sayısının ölçülmesi, enfeksiyondan 24, 48, 72 veya 96 saat sonra gösterilir (Şekil 27A).

Floresan ile transgen ekspresyonunun nicelleştirilmesi

Yukarıda hazırlanan hücre lizatları, ya 25µl çözülmüş düzgün parçalanmış ya da 1: 2 1x haberci liziz tamponu (Promega: E971) ile seyreltilmiş lizat kullanılarak test edilmiştir. Her kuyucuktaki GFP floresan seviyesi, bir plaka okuyucu (BioTek Synergy HT) üzerinde ölçüldü. 24, 48, 72 veya 96 saat boyunca enfekte olmuş numuneler için ölçülen, arka planı çıkarılmış, flüoresan, Şekil 27B'de çizilmiştir.

Örnek 15: Egzojen promotör CMV'nin kontrolü altında haberci genleri kodlayan EnAd virüslerinin karakterizasyonu

NG- 47 ve NG- 61 haberci virüsleri için virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi), onkolitik aktivite (hücre yaşayabilirlik tahlili ile değerlendirildi) ve haberci gen ekspresyonu (floresan ile değerlendirildi), EnAd ile karşılaştırıldı. NG- 47 ve NG- 61 virüslerinin üretimi ve tasarımı, Örnek 14'te detaylandırılmıştır.

Virüs replikasyonu ve transgen ekspresyonunun karakterizasyonu

HT- 29 kolon karsinoma hücreleri, WI38 fibroblast hücre hattı veya MRC5 fibroblast hücre hattı, 6 oyuklu plakalarda, 2. e6 hücre/oyuk hücre yoğunluğu ile tohumlandı. Hücreler, hücre başına (ppc) 1 EnAd, NG- 47 ya da NG- 61 virüs partikülleri ile enfekte edilmeden önce plakalar 18 saat boyunca, 37 °C, % 5 CO₂ ile inkübe edildi. Analizler, enfeksiyondan 24, 48, 72 veya 96 saat sonra gerçekleştirildi. Hücre süpernatantları toplandı ve 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüjle temizlendi. Hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve 400 µl/oyuklu 1 x haberci liziz tamponu (Promega: E3971) içinde - 20 °C'de dondurularak çözülme yolu ile eritildi. Üreticinin protokolüne göre Sigma Genelute DNA ekstraksiyon Kiti kullanılarak hücre lizatından

veya süpernatanttan DNA ekstrakte edildi. EnAd virüs partikülleri (2.5×10^{-2} - 2.5×10^5 vp) kullanan standart bir eğri hazırlandı ve de Sigma Genelute Kit kullanılarak çıkarıldı. Çıkarılan her numune veya standart, bir EnAd E3 genine özgü primer- prob kullanılarak qPCR ile analiz edildi. Hücre başına tespit edilen virüs genomlarının sayısının tespiti, HT29 hücrelerinde (Şekil 25A ve 25B) ve HT29, WI38 ve MRC5 hücre hatlarında (Şekil 26C) NG- 47 ve NG- 61 çoğalmasının EnAd (Şekil 25 ve 26'da EnAd olarak işaretlenmiştir) ile karşılaştırılabilir olduğunu gösterdi. Yukarıda hazırlanan NG- 47 ve EnAd hücre lizatları, ayrıca transgen ekspresyonunu değerlendirmek için kullanıldı. Bağlı GFP floresansı, ya düz bir lizat ya da 1X haberci liziz tamponunda 1: 2 oranında seyreltilmiş lizat üzerinde bir plaka okuyucuda (BioTek) ölçüldü (Şekil 25C).

Virüs onkolitik potensinin karşılaştırılması

HT- 29 kolon karsinoma hücreleri, 96 oyuklu plakalara 2.5×10^4 hücre /oyuk olan bir hücre yoğunluğunda ekildi. Hücrelere ya hücre başına 100- 0.39 partikül (ppc) enfeksiyon yoğunluğu aralığında EnAd, NG- 47 ya da NG- 61 virüs partikülleri ile enfekte edilmeden önce plakalar, 4 saat boyunca, 37°C 'de, % 5 CO_2 ile inkübe edildi. HT- 29 hücre yaşayabilirliği, enfeksiyondan 72 saat sonra Cell Titre 96 MTS Reagent (Promega: G3581) kullanılarak değerlendirildi. Her enfeksiyon yoğunluğunda % 'ce hücre sağkalımının niceleştirilmesi, NG- 47 ve NG- 61'in onkolitik potensinin, HT29 hücrelerinde EnAd ile karşılaştırılabilir olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 26A ve 26B).

Örnek 16: Bağışıklık kontrol noktası inhibitörü yol proteinlerine yönelik antikorları kodlayan EnAd virüslerinin üretimi

pEnAd2. 4 (SEK ID NO: 64) plazmidi, bir anti- insan PD- L1 antikoru (YW243. 551S70) kodlayan bir transgen kasetinin L5 ve E4 genleri arasında bulunan pEnAd2. 4 benzersiz kısıtlama bölgeleri arasına doğrudan yerleştirilmesi ile pNG- 177 plazmidinin üretilmesinde kullanıldı. PNG- 177 plazmidi, bir anti- PD- L1 VH zincirini (SEK ID NO: 30), bir antikör sabit ağır zincirini (SEK ID NO: 34), bir anti- VEGF VL zincirini (SEK ID NO: 32) ve bir antikör sabit hafif zincirini (SEK ID NO: 35) kodlar. NG- 177 virüs genomunda (SEK ID NO: 46) bulunan eklenmiş anti- PD- L1 antikör kasetinin bir şeması Şekil 24'te gösterilmektedir.

Örnek 17: Sitokinleri kodlayan EnAd virüslerinin üretimi ve karakterizasyonu **Virüs Üretimi**

pEnAd2. 4 plazmidi, insan interferon- γ (IFN γ (SEK ID NO: 41; pNG- 92 ve pNG- 95), insan Interferon- α (IFN α SEK ID NO: 42; pNG- 96 ve pNG97) ya da insan tümör nekroz faktörü alfa (hTNF α SEK ID NO: 40; pNG- 139) kodlayan transgen kasetlerinin L5 ve E4 genleri arasında bulunan (B γ bölgesi) pEnAd2. 4 benzersiz kısıtlama bölgelerine doğrudan yerleştirilmesi ile pNG- 92, pNG- 95, pNG- 96, pNG- 97, pNG- 139 ve pNG- 136 plazmitlerini üretmek için kullanıldı. PNG- 92, pNG- 95, pNG- 96, pNG- 97 ve pNG- 139 plazmitlerine yerleştirilen transgen kasetlerinin şematikleri Şekil 23'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi.

pNG- 92, pNG- 95 ve pNG- 139 plasmitleri, NG- 92 (SEK ID NO: 51) NG- 95 (SEK ID NO: 49) ve NG- 139 (SEK ID NO: 53) genomlarını üretmek için lineer hale getirildi. Örnek 8'de detaylandırılan 'virüs üretimi' yöntemlerine göre virüs parçacıkları üretmek için genomlar HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Güçlendirilmiş virüs parçacıkları, NG- 92, NG- 95 ve NG- 139 virüs stoklarını üretmek için çift sezyum klorür bantlaması ile saflaştırıldı. Yükseltme sırasında canlı NG- 139 virüs partiküllerinin üretimi, EnAd kapsid proteini Hexon için immün boyama ile teyit edildi. HT- 29 hücreleri 48 saat boyunca virüs lizatı ile enfekte edildi, daha sonra ortam hücrelerden uzaklaştırıldı, hücreler 1: 1 MeOH: Aseton içinde sabitlendi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca anti- adenovirüs antikoru (Abcam: ab7428) ile boyandı. Hücreler daha sonra yıkandı ve ikincil antikor tespiti, HRP konjüge anti- fare IgG (Abcam: ab6728) kullanılarak gerçekleştirildi. Hexon proteini, 25 dakika boyunca DAB substratı eklenerek görsel hale getirildi. Hekzon boyama, hücre tek katmanlarında tespit edilebilir (Şekil 29A ve Şekil 29B).

Kolon karsinoma hücre hatlarında TNF α üretiminin nicelendirilmesi ve bir kolon karsinomu subkütan ksenograft tümör modeli

HT- 29 kolon karsinoma hücre hatları, 5e5 hücre/oyuk bir yoğunluğunda 6 oyuklu plakalarda kaplanmıştır. Hücreler, hücre başına (ppc) 100 NG- 139 virüs partikülü ile enfekte edildi veya enfekte edilmemiş olarak bırakıldı. Analizler, enfeksiyondan 24 veya 36 saat sonra gerçekleştirildi.

Her zaman noktasında, kültür süpernatantları her oyuktan çıkarıldı ve hücre döküntülerini gidermek için 5 dakika 1200rpm'de santrifüje tabi tutuldu. Berraklaştırılmış süpernatantlar tahlil tamponuna seyreltildi ve üreticinin protokolüne göre TNF α ELISA içinde kullanıldı. Salgılanan TNF α konsantrasyonları, standart eğrilerden interpolasyon yoluyla belirlendi ve Şekil 29C'de gösterildi.

DLD kolon karsinom hücreleri, CD1 nu/nu farelerine subkütan bir ksenograft olarak implante edildi. Tümörler $\sim 100\text{mm}^3$ 'e ulaştığında, fareler gruplandırıldı ve 0, 3 ve 6. günlerde bir tekli tümör içine enjeksiyon yoluyla verilen 5×10^9 EnAd veya NG- 139 virüs partikülleri ile tedavi edildi. Her çalışmaya, bir grup enfekte edilmemiş kontrol faresi de dahil edilmiştir. DLD tümörleri tedaviden sonra 15. günde kesilip çıkartıldı ve üreticinin protokolüne göre ELISA ile TNF α üretimi için analiz edildi. Tümör içinde tespit edilen TNF α konsantrasyonları, standart eğriden interpolasyon yoluyla belirlendi ve Şekil 29D'de gösterildi.

Örnek 18: Kolon, yumurtalık ve akciğer karsinom hücre hatlarında virüs replikasyonu ve anti- VEGF antikor ekspresyonu

NG- 135 (SEK ID NO: 2) ve EnAd, virüs replikasyonu ve anti- VEGF antikoru ekspresyonu kolon (HT- 29, HCT116, DLD), akciğer (A549) ya da yumurtalık (SKOV3) karsinom hücre hatlarında hlgG1 ELISA ile karşılaştırıldı. Hücreler, 12 oyuklu kültür plakalarına, oyuk başına 5×10^5 - 1×10^6 hücre yoğunluğunda ekildi. Ekimden 24 saat sonra, hücre başına 100 virüs partikülü ile hücre hatları NG- 135 veya EnAd ile enfekte edildi. Hücreler, süpernatantlar oyuklardan toplanmadan önce 24, 48, 72, 96 ya da 120 saat boyunca kültürlendi ve hücre artıklarını çıkarmak için 5 dakika 1200 rpm'de santrifüje tabi tutuldu. Süpernatanın yarısı antikor üretimini değerlendirmek için kullanıldı ve diğer yarısı ise virüs genomlarını değerlendirmek için kullanıldı. Daha sonra her kuyucuktaki hücreler 1xPBS ile yıkandı ve 1X haberci liziz tamponu (Promega) içinde eritildi. Lizatlar dondurularak çözüldü ve daha sonra virüs replikasyonu için değerlendirildi.

Üreticinin protokolüne göre Sigma Genelute DNA ekstraksiyon Kiti kullanılarak 1- 5 μl 'lik hücre lizati veya 10 μl 'lik süpernatanttan DNA ekstrakte edildi. EnAd virüs partikülleri (2×10^{10} - $2 \times 10^5\text{vp}$) kullanan standart bir eğri hazırlandı ve de Sigma Genelute Kit kullanılarak çıkarıldı. Çıkarılan her numune veya standart, örnek 9'da detaylandırılan yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti

kullanılarak qPCR ile analiz edildi. Her bir hücre hattındaki tüm zaman noktalarında maksimum replikasyon, EnAd ve NG- 135 için Şekil 33A'da çizilmiştir.

ELISA plakaları (Nunc Immuno MaxiSorp 96 oyuklu mikropalakalar) gece boyunca 4 °C'de fare monoklonal anti- insan IgG1 Fc antikoru (ab1927 Abcam) ile karbonat / bikarbonat tamponunda kaplanarak hazırlandı. Plakalar, sonraki tüm bağlanma adımları arasında PBS % 0.05 Tween 20 ile yıkandı. Plakalar, PBS % 0.05 Tween 20 içinde % 3 BSA ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edildi. Berraklaştırılmış enfeksiyonlu süpernatantlar % 0.05 Tween 20 (1: 2, 1: 4, 1:16) içinde % 3 BSA'da seyreltildi. Saflaştırılmış Bevacizumab'ın seri bir seyreltilmesi (1000 ng / ml - 0.0128ng / ml) hazırlandı ve seyreltildi. 8 ng/ml'lik Bevacizumab örnekleri ayrıca kontrol enfeksiyon süpernatantlarına katıldı. Tüm numuneler, kaplanmış plakalara ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, HRP substrat çözeltisi 3. 3. 5. 5'-terametilendiamin (TMB, Thermo- Fisher) ile HRP saptama gerçekleştirilmeden önce, oda sıcaklığında 1 saat boyunca saptama antikoru HRP'ye konjüge edilmiş anti- insan- Fab uygulandı. Reaksiyonu durdurmak için 1M HCl kullanıldı ve gelişen renk 450 nm'de bir plaka okuyucu üzerinde ölçüldü. Salgılanan anti- VEGF antikor konsantrasyonları, Bevacizumab standart eğrisinden interpolasyon yoluyla tespit edildi (Şekil 33B).

Örnek 19: NG- 135 ile tedavi edilen tümörlerden antikor üretiminin karakterizasyonu

HCT- 116 kolon karsinom hücreleri, CD1 nu/nu farelerine subkütan bir ksenograft olarak implante edildi. Tümörler ~100mm³ ulaştığında, fareler gruplandırılmış ve bir tekli tümör içi enjeksiyon yoluyla verilen 5e9 EnAd veya NG- 135 virüs partikülleri ile muamele edilmiştir. Tedaviden 10 gün sonra, bazı hayvanlardan tümörler kesilip alındı, tartıldı ve ~100mg'lık bölümler halinde kesildi. Her bölüm, 12 oyuklu bir plakada bir filtre kabına (Nunc) yerleştirildi ve daha sonra ex vivo olarak % 10 FBS ile takviye edilmiş DMEM ortamında 7 gün boyunca kültürlendi. Tümör kesitleri ve ex vivo kültür ortamı, rezeksiyon sonrası 0 veya 7. günlerde viral genom replikasyonu veya antikor ekspresyonu için analiz edildi. Dolaşımdaki anti- VEGF antikorunun ölçümleri için diğer hayvanlardan serum alındı.

qPCR ile virüs genom replikasyonu analizi

Kültür ortamı filtre kaplarından ve çevreleyen oyuktan çıkarıldı. qPCR için, medya numuneleri, Sigma Genelute DNA ekstrasyon kiti yeniden süspansiyon tamponu içerisinde 1: 200 oranında seyreltildi ve kesilip çıkartılan tümörler veya kültürlenmiş tümör bölümleri, 1: 200 anti- proteaz inhibitörü kokteyli içeren 1 x haberci liziz 5 tamponu (Promega E3971) içinde 25 mg tümör başına 100 µl tampon konsantrasyonunda homojenleştirildi. EnAd standartları hazırlandı ve örnek 13'te ayrıntılı olarak açıklanan yöntemlere göre DNA ekstraksiyonu ve qPCR gerçekleştirildi. Rezeksiyon sonrası 0 veya 7. günlerde tümör başına virüs genomlarının sayısının nicelendirilmesi, hem EnAd hem de NG- 135 için 7. günde 10 toplam viral genomlarda bir artış gösterdi; *ex vivo* kültür süresince viral genom üretiminin devam ettiğini düşündürdü. NG- 135 için veriler Şekil 35A'da gösterilmektedir.

Anti- insan IgG1 ile anti- VEGF antikor ekspresyonunun analizi

Homojenize edilmiş tümör numuneleri veya qPCR için hazırlanmış temiz ortam 15 numuneleri, anti- insan IgG1 ELISA ile antikor ekspresyonunun analizi için kullanıldı. Numuneler 1: 2 oranında % 3 BSA / PBS % 0.05 Tween içine seyreltildi ve daha sonra Örnek 18'de detaylı olarak açıklanan yöntemlere göre gerçekleştirildi. HCT- 116 tümörlerinde rezeksiyon noktasında (gün 0) antikor tespit edilebildi, ancak 7 günlük *ex vivo* kültürün ardından tümörler tarafından üretilen saptanabilir antikor 20 miktarı belirgin şekilde artış gösterdi (Şekil 35B). Anti- insan IgG1 ELISA ile test edilen, NG- 135 ile IT enjeksiyonundan sonra 7. veya 14. günde alınan farelerden alınan serum, saptanabilir seviyelerde antikor 14. günde gösterdi (Şekil 35C). Serumda veya EnAd ile tedavi edilmiş farelerden alınan *ex vivo* kültür numunelerinde hiçbir antikor tespit edilemedi.

Örnek 20: Akciğer kanseri olan bir mürin ortotopik ksenograft modelinde NG- 135 virüs aktivitesinin karakterizasyonu

A549 akciğer karsinom hücreleri, intravenöz olarak CB17 SCID farelerine enjekte edildi ve tümörlerin, akciğerlerde gelişmesine izin verildi. Enjeksiyondan 8 hafta sonra fareler gruplandı ve intravenöz uygulama yoluyla verilen 5e9 EnAd veya NG- 30 135 virüs partikülleri ile muamele edildi veya sadece PBS enjeksiyonu yapılarak muamele edilmemiş şekilde bırakıldı. Akciğerler ve karaciğerler, muameleden 3, 11, 18 veya 25 gün sonra farelerin hasat edildi (Şekil 36A). Her zaman noktasında,

akciğerde görünen herhangi bir tümör nodülü kesilerek çıkartıldı ve hem her akciğerden toplanan nodüller hem de geri kalan akciğer dokuları hızla sıvı azot içinde donduruldu. Akciğer dokusu ve akciğer tümörü nodülleri, A549 tümör yükü ve virüs genomları için qPCR ile değerlendirildi.

5 **qPCR ile virüs genom replikasyonu veya A549 hücre yükünün analizi**

Kesilip çıkartılmış akciğer dokusu, tümör nodülleri veya karaciğer dokuları, 1x haberci liziz tamponunda homojenize edildi. DNA, üreticinin protokolüne göre Sigma Genelute DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak 10- 100 µl homojenize numunelerden ekstrakte edildi. Virüs genomunun replikasyonunu değerlendirmek için numuneler ve standart eğriler hazırlandı ve örnek 13'te ayrıntılandırılan yöntemlere göre analiz edildi. A549 hücre yükünü değerlendirmek için A549 hücrelerinin (2. 25e6 - 3. 6e3 hücre) muamele edilmemiş homojenize akciğer dokusuna eklenmesi ve ardından toplam DNA'nın Sigma Genelute DNA ekstraksiyon kiti kullanarak ekstrakte edilmesi ile standart bir eğri hazırlanmıştır. Çıkarılan standartlar ve numuneler, bir insan prostaglandin E reseptörü (PTGER2) gen spesifik primer- prob seti ve Örnek 9'da ayrıntılı olarak anlatılan EnAd qPCR için kullanılan reaksiyon karışımı ve program kullanılarak A549 hücre yükü için qPCR ile analiz edildi. Muamele sonrası 3. günde A549 tümör yükünün ölçülmesi, NG- 135 ile tedavi edilen ve PBS kontrol farelerinde benzer bir A549 tümör yükü gösterdi. Ancak, 25. günde, NG- 135 ile tedavi edilen farelerde tümör yükü, PBS kontrol grubuna göre belirgin derecede düşüktür (Şekil 36B). Bireysel fare akciğerlerinde tümör yükünün kapsamı, virüs replikasyonu ile korelasyon göstermiştir (Şekil 36C) ve virüs replikasyonunun bu seçiciliği, ayrıca makroskopik olarak görünür tümör nodülleri taşımayan çevreleyen akciğer dokuları ile karşılaştırıldığında tümör nodüllerindeki saptanabilir virüs parçacıklarında ~2 log artış göstermiştir (Şekil 36D).

Örnek 21: Yumurtalık kanseri olan murin ortotopik ksenograft modelinde NG-135 ve EnAd aktivitesinin karşılaştırılması

Stabil olarak lusiferaz eksprese eden SKOV- 3 yumurtalık karsinom hücreleri, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla bir fareye 5e6 hücre CB17- SCID farelerine implante edildi. İmplantasyondan 22 gün sonra, farelere intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verilen ya PBS (kontrol) ya da 5e7 EnAd, NG- 135 veya NG- 78 virüsü partikülleri ile muamele edildi. Fareler, 32 mg lusiferinin intraperitoneal enjeksiyonunu

takiben bir IVIS görüntüleme kamerası kullanılarak haftada iki kez görüntülendi. Bağlı hafif birimler (RLU), tümör yükünün bir ölçümü olarak, farklı zaman noktalarında ilgili bir sabit bölge açısından belirlendi. Veriler, EnAd, NG- 135 ve NG- 78 virüslerinin, bu modeldeki tümör yükünü PBS kontrollerine kıyasla önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 37).

Örnek 22: Bir biyoreaktörden alınan virüs malzemesinin artan üretimini ve saflaştırılmasını takiben NG- 135 virüsünün ve eksprese edilmiş anti- VEGF antikorunun karakterizasyonu.

HEK293 hücreleri, 5 L'lik bir karıştırılmış tank (cam kap) biyoreaktörü içinde 3 L'lik bir çalışma hacmine yayılmadan önce çalkalama şişelerinde eritildi ve yayıldı. Biyoreaktör denetleyicisi, parametreleri 37 °C'ye, pH ayar noktası 7. 4'e, çözünmüş oksijen (DO) 50'ye, hava akış hızı 100 mL / dakika'ya ve karıştırma 100 rpm'e ayarlandı. Biyoreaktör sistemi dengelendikten sonra, 1. 5 L EX- CELL kültür ortamının bir başlangıç hacmine, 5×10^5 hücre/mL canlı hücre yoğunluğundaki HEK293 hücreleri ekildi ve daha sonra 3 L'lik bir çalışma hacmine genişletildi ve hücreler uygun yoğunluğa eriştikten sonra kültür, 50ppc'lik bir MOI'de NG- 135 ile enfekte edildi. Enfeksiyon sonrası 48 saatte 3L kültür toplandı ve virüs, üretilen NG- 135 virüsünün önceden üretilmiş EnAd virüsü ile karşılaştırılabileceği şekilde, EnAd virüsünün GMP üretimi için daha önce oluşturulmuş işlemler (aşağıda özetlendi) tarafından saflaştırıldı. Virüsün saflaştırılmasına ilaveten, enfekte olmuş hücreler tarafından üretilen anti- VEGF antikorunu, bevacizumab klinik ürünü olan Avastin ile karşılaştırmak üzere yapısal ve fonksiyonel analizlerin yapılmasına izin vermek için hücre kültürü ortamından da arındırıldı.

NG- 135 virüs saflaştırması

NG- 135 virüsü biyoreaktör hasadından saflaştırılmıştır. Hasat edilen materyale, konakçı hücre DNA'sını parçalamak için Benzonase® ile muamele edildi ve daha sonra yoğunlaştırıldı ve 500 kD içi boş elyaf zar kullanılarak teğetsel akış filtrasyonu (TFF) ile tampon değişimi yapıldı. Bu aşamada, normalde atılacak olan TFF süzüntüsü toplanmış ve anti- VEGF antikorunun saflaştırılması için kullanılmıştır (aşağıya bakınız). NG- 135 virüsünü ihtiva eden konsantre edilmiş TFF tutulan materyal, bir Sartobind anyon değişim kromatografi reçinesi kullanılarak NG- 135 virüsünün seçici olarak yakalanması ve elüsyonu ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan

virüsün daha sonra 50 mM Tris- HCl, 2 mM MgCl₂, % 5 gliserol tamponu içine tampon değişimi yapıldı, HPLC ile titre edildi ve - 80 derecede saklandı.

NG- 135 Virüs Karakterizasyonu

Saflaştırılmış NG- 135 virüs yığını (NG- 135- BR1 olarak anılır) onkolitik aktivitesi (hücre yaşayabilirlik tahlili ile değerlendirildi), virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi) ve antikor ekspresyonu (ELISA ile değerlendirildi), EnAd veya önceden karakterize edilmiş NG- 135 referans malzemesi ile karşılaştırıldı.

EnAd ile karşılaştırmalı olarak onkolitik potensin değerlendirilmesi için, Örnek 15'te detaylandırılan yöntemlere göre bir hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. Saflaştırılmış NG- 135- BR1, üretilmiş EnAd referans materyali için benzer potens göstermiştir (Şekil 38A).

Virüs replikasyonu veya antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için, HT- 29 hücreleri 1e6 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu kültür plakalarına tohumlandı, yapışmalarına izin verildi ve 100ppc EnAd, NG- 135 veya NG- 135- BR1 ile enfekte edildi.

qPCR için DNA, örnek 18'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre hem hücreli lizatlardan hem de süpernatantlardan enfeksiyon sonrası 24, 48 veya 72. saatte hasat edildi. Çıkarılan DNA numuneleri, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR vasıtası ile EnAd standartlarına karşı analiz edildi. Enfeksiyon süresince saptanan toplam virüs genomları, test edilen tüm virüsler için aynıdır (Şekil 38B).

Anti- VEGF antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için berraklaştırılmış enfeksiyon süpernatantları PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20'ye seyreltildi, daha sonra Örnek 18'de ayrıntılarıyla verilen yöntemlere göre bir bevacizumab standart eğrisine karşı ELISA ile analiz edildi. Antikor konsantrasyonu, standart eğriden interpolasyon yoluyla belirlendi (Şekil 38C).

Anti- VEGF Antikor Saflaştırması

Anti- VEGF monoklonal antikor ihtiva eden toplanmış TFF süzöntüsü konsantre edildi ve tampon, 30kD içi boş elyaf zara sahip ikinci bir TFF adımı kullanılarak Protein A diyafiltrasyon tamponuna (200 mM Na₂PO₄, pH 7.0) değiştirildi. Konsantre edilmiş antikor, bir AKTA saflaştırıcı sistem üzerinde bir 1 ml Protein A sütununa

sahip Protein A kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ayrılan antikor fraksiyonu, bir Amicon Ultra 50kD yoğunlaştırıcı kullanılarak konsantre edildi ve tampon, bir PD10 kolonu kullanılarak bir saklama tamponuna (50 mM Tris- HCl, % 5 gliserol, pH 7.0) değiştirildi. Saflaştırılmış antikor konsantrasyonu 0.15 mg / ml olarak OD- ile belirlendi ve saflık SDS- PAGE ile teyit edildi.

Saflaştırılmış anti- VEGF antikorunun karakterizasyonu

İndirgenmemiş veya indirgenmiş SDS- PAGE'yi takiben, saflaştırılmış anti- VEGF antikorunun yapısı, western blot vasıtası ile klinik Avastin ile karşılaştırıldı ve antikorun VEGF'ye afinitesi Biacore tarafından değerlendirildi. Western blot için NuPAGE LDS numune tamponu içinde 7. 5 µg/ml Avastin veya 6 µg/ml saflaştırılmış antikor ürünü hazırlandı. Jelleri azaltmak için, tüm numuneler 10 dakika boyunca, 70 °C'de ısıtılmadan önce her numuneye NUPAGE indirgeme ajanı ilave edildi. Üreticinin protokolüne göre % 4- 12 Bis- Tris NuPAGE jelleri kullanılarak SDS- PAGE gerçekleştirildi. Proteinler, Xcell II Blot Modülü kullanılarak western blot ile PVDF zarlarına aktarıldı. Bloke etme ve imünoblotlama, % 5 süt tozu ile takviye edilmiş PBS % 0.1 Tween- 20 içinde gerçekleştirildi. Anti- VEGF antikorları, HRP konjüge edilmiş poliklonal anti- insan IgG (Promega, W4031) kullanılarak tespit edildi. Proteinler gelişmiş kemilüminesans (ECL) ile görselleştirildi. NG- 135 virüs üretim sürecinden üretilen saflaştırılmış anti- VEGF antikor, Avastin olarak indirgenmemiş ve indirgenmiş lekeler üzerinde karşılaştırılabilir tespit edilebilir protein bantları gösterdi (Şekil 38D).

Saflaştırılmış antikor maddesinin VEGF bağlanma afinitesinin Avastin'le karşılaştırmalı analizi için, bu malzeme onaylanmış bir VEGF- bağlama Biacore testi (BioOutsource tarafından gerçekleştirilmiştir, İngiltere) kullanılarak analiz edildi. Tanımlanan deney protokolünü takiben kinetik analiz (Biacore T200 Değerlendirme Yazılımı), saflaştırılmış anti- VEGF antikor numunesinin, Avastin referans standart materyaline benzer kinetik ve afinite ile VEGF165'i bağlayabildiğini göstermiştir (Şekil 38E).

Örnek 23: Kendiliğinden bölünebilir bir P2A peptidi (NG- 165) ile bağlanan anti- VEGF monoklonal antikor zincirlerini kodlayan EnAd virüslerinin üretilmesi ve karakterizasyonu

pEnAd2. 4 plasmidi (SEK ID NO: 64), L5 ve E4 genleri arasında bulunan pEnAd2. 4 benzersiz kısıtlama bölgeleri arasına bir anti- VEGF antikoru kodlayan bir transgen kasedini doğrudan ekleyerek pNG- 165 (SEK ID NO: 59) plazmidini üretmek için kullanıldı. PNG- 165 transgen kaseti, bir anti- VEGF VH zincir sekansının (SEK ID NO: 29), bir antikor sabit ağır zincir sekansının (SEK ID NO: 33), bir yüksek kendi kendine bölünme verimliliğine sahip bir P2A peptit sekansının (SEK ID NO: 25), bir anti- VEGF VL zincir sekansının (SEK ID NO: 31) ve bir antikor sabit hafif zincir sekansının (SEK ID NO: 35) eklenmesi ile bir anti- VEGF antikoru kodlar. Antikor kodlama dizisi, bir 5' kısa ek yeri alıcı dizisi (SEK ID NO: 16) ve bir 3' poliadenilasyon dizisi (SEK ID NO: 20) ile çevrelenmiştir. Eklenen transgen kasetinin bir şeması Şekil 34'te gösterilmektedir. Plazmitin yapısı, DNA dizilimi ile teyit edildi.

Virüs Üretimi

NG- 165 virüsü, Örnek 8'de ayrıntılandırılan NG- 135 virüsünün saflaştırılması için kullanılan yöntemlere göre çoğaltıldı ve saflaştırıldı.

Virüs Karakterizasyonu

NG- 165 onkolitik aktivitesi (hücre canlılığı testi ile değerlendirildi), virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi) ve anti- VEGF antikoru ekspresyonu (ELISA'lar ile değerlendirildi), kolon karsinom hücrelerinde EnAd veya NG- 135 ile karşılaştırıldı. EnAd ile karşılaştırmalı olarak onkolitik potensin değerlendirilmesi için, Örnek 15'te detaylandırılan yöntemlere göre bir hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. NG- 165 virüsü, üretilmiş EnAd referans materyali ile benzer potens gösterdi (Şekil 39A).

Virüs replikasyonu veya antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için, HT- 29 hücreleri 1e6 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu kültür plakalarına tohumlandı, yapışmalarına izin verildi ve 100ppc EnAd, NG- 135 veya NG- 135- BR1 ile enfekte edildi. qPCR için DNA, örnek 18'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre hem hücreli lizatlardan hem de süpernatantlardan enfeksiyon sonrası 24, 48 veya 72. saatte hasat edildi. Çıkarılan DNA numuneleri, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR vasıtası ile analiz edildi. Enfeksiyon süresi zarfında NG- 165 için tespit edilen toplam virüs genomları, EnAd referans virüsüne benzerdi (Şekil 39B).

Anti- VEGF antikoru ekspresyonunun değerlendirilmesi için berraklaştırılmış enfeksiyon süpernatantları enfeksiyondan 24, 48 ya da 72 saat sonra PBS /% 3 BSA

/% 0.05 Tween 20'ye seyreltildi, daha sonra Örnek 18'de ayrıntılarıyla verilen yöntemlere göre bir bevacizumab standart eğrisine kullanılarak IgG1 ELISA ile analiz edildi. IgG1 antikorunun konsantrasyonu standart eğrinin interpolasyonu ile belirlendi ve NG- 165'in NG- 135 referans virüsüne benzer seviyelerde IgG1 eksprese ettiğini gösterdi (Şekil 39C).

Örnek 24: Endojen veya egzojen promotörlerin kontrolü altında anti- VEGF ScFv'leri kodlayan EnAd virüslerinin karakterizasyonu

Daha önce örnek 8 ve 11'de tarif edilen NG- 76 ve NG- 78 virüsleri, kolon karsinom hücrelerindeki (hücre yaşayabilirlik tahlili ile değerlendirildi) onkolitik aktiviteleri ve fonksiyonel anti- VEGF ScFv proteininin ekspresyonu (VEGF bağlayıcı ELISA ile değerlendirildi) açısından da karakterize edildi. EnAd ile karşılaştırmalı olarak onkolitik potensin değerlendirilmesi için, Örnek 15'te detaylandırılan yöntemlere göre hücre canlılığı analizleri gerçekleştirildi. Hem NG- 76 hem de NG- 78, üretilmiş EnAd referans materyali için benzer onkolitik potens göstermiştir (Şekil 40A ve 40B).

NG- 76 için, bir egzojen (CMV) promotör altında eksprese edilen anti- VEGF scFv'nin bağlanma aktivitesi, örnek 12'de açıklanmaktadır. NG- 78 için, Endojen virüs büyük geç promotöründen eksprese edilen anti- VEGF scFv'nin bağlanma aktivitesi, doğrudan VEGF bağlayıcı ELISA ile veya VEGF bağlanması açısından rekabet etmek üzere bevacizumab klinik ürününün dahil edildiği bir ELISA ile değerlendirildi. Her iki ELISA için 293F hücreler 50ppc NG- 78 virüsüyle enfekte edildi ve 70 saat süreyle kültürlendi. Hücreler ve ortam, şişeden toplandı ve süpernatant ve hücreler, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjle ayrıldı. Süpernatant toplandı ve kalan hücrelerin pelletleri, hücreleri çözmek için 3 dondurma- çözme döngüsünü gerçekleştirilmeden önce 1 ml hücre ortamında tekrar süspanse edildi. Çözülmeden sonra, hücre artığı ve ortam, ikinci bir santrifüjleme basamağı ile ayrıldı ve lizattan gelen süpernatant toplandı. Süpernatantlar veya lisatlar, % 3 BSA/PBS % 0.05 tween içinde ile 1:2 oranında seyreltildi. Doğrudan bağlanan ELISA için, numuneler daha sonra en düşük seyrelme 1024'te 1 olacak şekilde seri olarak seyreltildi. Rekabetçi ELISA için, numunelere, 0, 0.05, 0. 5 ya da 5µg/ml konsantrasyonlarında bevacizumab ilave edildi. ELISA plakaları, VEGF ile kaplandı, bloke edildi ve örnek 7'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre yıkandı. Numuneler, 100 µl/oyuk olarak plakalara ilave edildi ve 1 saat boyunca VEGF'ye bağlandı, ScFv, HRP- konjuge poliklonal anti- His (Abcam ab1187) kullanılarak tespit edildi ve ardından TMB tespiti yapıldı. Emilim, bir

plak okuyucu üzerinde 450 nm'de okundu ve arka planda çıkarılmış emilim, numunelerin VEGF'ye (Şekil 40C) doğrudan bağlanması ve artmakta olan bevacizumab konsantrasyonlarının (Şekil 40D) varlığında doğrudan bağlanması için çizildi. Daha önce NG- 76 için gösterildiği gibi, VEGF165'e spesifik olarak bağlanan işlevsel anti- VEGF ScFv, NG- 78 ile enfekte olmuş hücrelerden eksprese edilebilir ve salgılanabilir.

Örnek 25. Tümör taşıyan farelerde EnAd ile karşılaştırılan NG- 76 virüs aktivitesinin karakterizasyonu

DLD kolon karsinom hücreleri, CD1 nu/nu farelerine subkütan bir ksenograft olarak implante edildi. Tümörler $\sim 100\text{mm}^3$ ulaştığında, fareler gruplandırılmış ve bir tekli tümör içi enjeksiyon yoluyla verilen 5×10^9 EnAd veya NG- 76 virüs partikülleri ile muamele edilmiştir. Her çalışmaya, bir grup enfekte edilmemiş kontrol faresi de dahil edilmiştir. Tedaviden sonra 7. gün DLD tümörleri kesilerek çıkartıldı ve (qPCR ile) virüs replikasyonu ve virüs veya anti- VEGF ScFv gen ekspresyonu (RTqPCR ile) açısından değerlendirildi.

qPCR ile virüs genom replikasyonu analizi

Kesilerek çıkartılan tümörler tartıldı, homojen hale getirildi ve örnek 13'te detaylarıyla verilen yöntemlere göre DNA özütlendi. Çıkarılan numuneler ve standartlar, Örnek 9'de detaylandırılan qPCR yöntemlerine göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR ile analiz edildi. Tümör başına virüs genomlarının sayısının nicelendirilmesi tedavi sonrası 7. gün DLD tümörleri için gösterildi ve NG- 76 ve EnAd'in girdinin üstünde önemli virüs replikasyonuna sahip olduğunu gösterir (Şekil 41A).

RTqPCR ile viral (hekzon) veya anti- VEGF ScFv antikoru gen ekspresyonunun analizi

cDNA, keserek çıkartılan tümörlerin RNA'sından örnek 13'te detaylarıyla verilen yöntemlere göre hazırlandı. qPCR tarafından tespit edilen cDNA kopyalarının sayısının nicelendirilmesi, tedavi sonrası 7. günde NG- 76 veya EnAd ile tedavi edilen DLD tümörlerinde virüs geç geni, hekzonun karşılaştırılabilir ekspresyonunu gösterdi (Şekil 41A). Aksine, anti- VEGF ScFv antikoru geni ekspresyonu, sadece NG- 76 virüsü ile muamele edilen DLD hücrelerinde tespit edildi (Şekil 41C).

Örnek 26: Endojen veya egzojen promotörler (NG- 135, NG- 47, NG- 61, NG- 63 ve NG- 107) kullanılarak virüs kodlamalı transgenlerin hücrelerinde veya tümörlerinde ekspresyon seçiciliği

NG- 135 antikor ekspresyonu virüs replikasyonuna bağlıdır.

- 5 NG- 135 virüsündeki anti- VEGF antikor kaseti, EnAd endojen Büyük Geç Promotörün (MLP) kontrolü altında kodlanır. Adenovirüs enfeksiyonu esnasında, büyük geç promotere ait gen ekspresyonunun çoğunluğunun virüs replikasyonuna bağlı olduğu önceden karakterize edilmiştir. EnAd MLP tarafından kontrol edildiğinde antikor ekspresyonunun da virüs replikasyonuna bağlı olduğunu göstermek için, NG-
10 135 virüs replikasyonunun kinetiği (qPCR ile değerlendirildi) ve antikor ekspresyonu (ELISA ile değerlendirildi), farklı MOI'lerde karşılaştırıldı.

HT- 29 kolon karsinoma hücreleri, 6 oyuklu plakalara 2e6 hücre /oyuk olan bir hücre yoğunluğunda ekildi. Ekimden 18 saat sonra hücreler 1, 10 veya 100ppc NG- 135 virüsüyle enfekte edildi.

- 15 Anti- VEGF antikoru ekspresyonunun değerlendirilmesi için berraklaştırılmış enfeksiyon süpernatantları enfeksiyondan 24, 48 ya da 72 saat sonra PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20'ye seyreltildi, daha sonra Örnek 9'da ayrıntılarıyla verilen yöntemlere göre anti- VEGF bağlayıcı ELISA ile analiz edildi. Antikor konsantrasyonu, standart eğriden interpolasyon yoluyla belirlendi.
- 20 qPCR ile virüs replikasyonunun analizi için örnek 9'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre hem hücresel lizatlardan hem de süpernatantlardan enfeksiyon 24, 48 veya 72 saat sonra DNA hasat edildi. Çıkarılan DNA numuneleri, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR vasıtası ile analiz edildi. Enfeksiyondan 72 saat sonra antikor
25 ekspresyonunun analizi, test edilen tüm MOI'ler için saptanabilir salgılanan antikor gösterir, ancak antikor ekspresyon seviyesi, giriş MOI'sine bağlıdır (Şekil 42A). Antikor ekspresyonunun kinetikleri, enfeksiyon süresi boyunca antikor ekspresyonu artışları gösterir, ancak tespit edilebilir antikor ekspresyonu girdinin üstünde belirgin bir virüs replikasyon seviyesiyle ilişkilidir (Şekil 42B ve 42C).

- 30 ***Karsinomda, stromal fibroblast ve primer hücreler NG- 135 antikor ekspresyonu***

NG- 135 enfeksiyonuna ve virüs replikasyonuna olanak tanıyan hücrelerde antikorun seçimli olarak eksprese edildiğini onaylamak için NG- 135 virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi), antikor ekspresyonu (ELISA ile değerlendirildi) ve bulaşıcı virüs partikülleri üretme kabiliyeti (yeniden- enfeksiyon analizi ile değerlendirildi), EnAd enfeksiyonuna müsaade ettiği bilinen kanser hücrelerinde (HT- 29) ve önceden, buna müsaade etmeyen olarak karakterize edilmiş fibroblast hücrelerinde (WI- 38 ve MRC- 5) belirlendi. Kısaca, hücreler, 12 gözlü plakalara ekildi ve enfeksiyon ortamı hücrelerden çıkartılmadan ve kültür ortamı ile yer değiştirmeden önce 4 saat boyunca 100 ppc NG- 135 virüsü ile tohumlamanın ardından 18 saat süresince enfekte edildi. 4 saatlik enfeksiyon periyodundan sonra 1. saatte veya 72. saatte, hücre süpernatantları ve lizatları örnek 18'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre plakalardan hasat edilmiştir. qPCR için, DNA çıkartılmış ve numuneler, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak analiz edilmiştir. Anti- VEGF antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için berraklaştırılmış enfeksiyon süpernatantları enfeksiyondan sonra PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 içinde seyreltildi, daha sonra Örnek 18'de ayrıntılarıyla verilen yöntemlere göre ELISA ile analiz edildi.

Enfeksiyonlu virüs partikülünün değerlendirilmesi için toplanan süpernatantlar düzgün biçimde 10 kere seri olarak seyreltilmiş ve 96 gözlü plakalarda 3×10^4 hücre / oyuk yoğunluğunda tohumlanmış HT- 29 hücrelerinin taze kültürlerini tekrar enfekte etmek için kullanılmıştır. Ortam, enfeksiyondan 72 saat sonra plakalardan çıkartıldı ve hücreler oda sıcaklığında Me: Ac ile 10 dakika süreyle sabitlendi. Oyuklar daha sonra PBS ile yıkandı ve hücreler, tavşan anti- hekzon birincil antikor (800'de 1 seyreltilmiş), daha sonra ikincil HRP- çiftli anti- tavşan saptama antikor ile inkübasyon yoluyla EnAd kapsid proteini ekspresyonu için boyandı. Hekzon proteini, DAB substratının eklenmesi ve ışık mikroskopisi kullanılan görüntüleme yoluyla görselleştirildi. Enfeksiyonlu titre (TCID₅₀ / ml), pozitif kapsid protein boyaması içeren tüm oyukların sayılması ile belirlendi.

Veri analizi, yalnızca HT- 29 hücrelerinin, enfeksiyon giriş seviyelerinin üstünde NG- 135 virüs replikasyonu gösterdiğini (Şekil 43A) veya tespit edilebilir antikor ekspresyonu gösterdiğini (Şekil 43B) ortaya koymuştur. IgG1 ELISA testi hassasiyet bilgisini kullanarak, tümör olmayan hücreler tarafından saptanabilir antikor ekspresyonunun olmaması, bu hücrelerin, HT- 29 tümör hücreleri için 24 saatte 100

fg/hücre'nin üzerindeki seviyelerle karşılaştırıldığında 24 saatte 0. 33 fg'den az hücre ürettiğini gösterir. Bu veriler, HT- 29 tümör hücrelerindeki bulaşıcı virüs partiküllerinin yaygın olarak üretilmesi ile bağlantılıydı, ancak fibroblast hücre hatlarında virüs üretimi tespit edilemedi (Şekil 43C).

5 ***Birincil bağışıklık hücrelerinde transgenlerin seçici ekspresyonu***

Birincil doğal immün hücrelerdeki transgenlerin seçici ekspresyonu, sırasıyla bir egzogen (CMV) promotörün veya endojen MLP'nin kontrolü altında, haberci gen eGFP'yi eksprese eden EnAd virüsleri NG- 47 ve NG- 107 için karakterize edildi. NG- 47 ve NG- 107 virüs karakterizasyonu, örnek 14'te detaylandırılmıştır.

- 10 Monositler, tam kandan izole edildi ve örnek 28'de ayrıntılarıyla verilen yöntemlere göre dendritik hücrelere farklılaşması için kültürlendi. Kültürün 5. gününde farklılaşmış monosit türevi dendritik hücreler, 96 oyuklu plakalara ekildi ve 200 ppc EnAd, NG- 47 veya NG- 107'ye maruz bırakıldı veya muamele edilmemiş olarak bırakıldı. 48 saat sonra hücreler oyuklardan toplandı, yıkandı ve PE / Cy5 konjüge
- 15 anti- CD83 antikoru (CD83- PE / Cy5 (BioLegend)) ile etiketlendi. DC'ler üzerindeki CD83 ve eGFP ekspresyonu, akış sitometrisi (Applied Biosystems) ile değerlendirildi ve veriler FlowJo yazılımı kullanılarak analiz edildi. GFP ekspresyonu ancak, eGFP ekspresyonunun, gen ekspresyonu için viral replikasyona bağımlı olmayan egzogen CMV promotörünün altında olduğu durumda, NG- 47'ye maruz bırakılan hücrelerde
- 20 tespit edilebilir (Şekil 44).

In vivo modellerde transgenlerin seçici ekspresyonu

- Transgen ekspresyonunun seçiciliğini *in vivo*, olarak araştırmak için EnAd virüs replikasyonuna izin vermediği bilinen mürin karsinoma hücre tümörlerinde transgen ekspresyonunu belirlemek için haberci virüsler kullanılmıştır. Transgen ekspresyonu
- 25 ve transgene, virüse veya tümöre karşı fonksiyonel bağışıklık yanıtı, burada transgen ekspresyonu, ya bir egzogen (CMV) promotörü ya da endojen MLP'nin kontrolü altında olduğunda değerlendirilir.

- Lüminesan proteini, lusiferazı eksprese eden haberci virüsler NG- 61 ve NG- 63 daha önce tarif edilmiş ve Örnek 14'te karakterize edilmiştir. BALB / c farelerine $1e^6$ sıçan
- 30 kolon karsinom hücreleri (CT26) deri altından böğürlerine implante edilmiştir. Bir kez yaklaşık $100mm^3$ ortalama boyutuna ulaşıldığında, tümörlere ya NG- 61 ya da NG- 63'ten $2.5e^9$ parçacık enjekte edildi. Fareler 32 mg lusiferinin intraperitoneal

enjeksiyonundan sonra bir IVIS görüntüleme kamerası kullanılarak muamele sonrası 14 gün boyunca düzenli olarak görüntülendi. Sabit bir boyuta sahip söz konusu bölgeler, her bir tümör için bağıl ışık ünitelerinin (RLU) ölçülmesine izin vermek için tümörlerin etrafına çekildi. Tedavi edilmeyen tümörlü fareler de görüntüleme arka planını belirlemek için görüntülendi. Tedavi grupları boyunca transgen ekspresyonunun nicelendirilmesi, lusiferazın yalnızca NG- 61 virüsü ile tedavi edilen tümörlerde saptanabildiğini göstermiştir (Şekil 45A), burada lusiferaz egzojen CMV promotörünün kontrolü altındadır. Tedavi sonrası 14. günde fareler rezeke edildi ve ayrıldı. Bir anti- interferon gama antikoru PVDF plakalarına immobilize edildi.

10 Splenositler ve uyarılar, ya EnAd virüsü, CT26 hücre lizatları ya da tripsinle sindirilmiş rekombinan lüsiferaz proteini, PVDF plakalarına ilave edildi ve gece boyunca inkübe edildi. Plakalar daha sonra yıkandı ve tekrar yıkanmadan önce bir biyotin etiketli anti- interferon gama antikoru ile yıkandı ve inkübe edildi ve bir streptavidin- ALP konjugatı ile inkübe edildi. Plakalar daha sonra yıkandı, BCIP / NBT

15 substratı eklendi ve daha sonra plakalar, belirgin noktalar görülebilene kadar gelişmeye bırakıldı. Plakalar tekrar yıkandı ve daha sonra, CTL Europe'ta (Almanya) analiz gerçekleştirilmeden önce kurutuldu. Nicemleme, NG- 61 ile muamele edilmiş farelerden gelen splenositlerin lusiferaz transgenine karşı spesifik tepkiler gösterdiği, ancak NG- 63 ile muamele edilmiş farelerden splenositlerin göstermediğini ortaya

20 çıkarmıştır (Şekil 45B). Bu sonuç, NG- 61 ile muamele edilmiş farelerde hem EnAd virüsü hem de CT26 tümör hücrelerine karşı artan tepkilerle bağlantılıdır (Şekil 45C ve 45D).

Örnek 27: Bağışıklık kontrol noktası inhibitörü yol protein PD- L1'e karşı antikorları (NG- 190, NG- 177) ya da ScFv antikor varyantlarını (NG- 221)

25 kodlayan EnAd virüslerinin üretimi ve karakterizasyonu

pEnAd2. 4 plasmidi (SEK ID NO: 64), L5 ve E4 genleri arasında bulunan benzersiz kısıtlama bölgelerine, ya anti- PD- L1 antikorunu (YW243) ya da YW243 antikorunun anti- PD- L1 ScFv'sini kodlayan transgen kasetlerinin doğrudan yerleştirilmesi ile pNG- 177 (örnek 16'da tarif edilen SEK ID NO: 46), pNG- 190 (SEK ID NO: 60) ve

30 pNG- 221 (SEK ID NO: 61) plazmitlerini üretmek için kullanılmıştır. pNG- 177 transgen kaseti, bir anti- PD- L1 VH zincir sekansının (SEK ID NO: 30), bir antikor sabit ağır zincir sekansının (SEK ID NO: 34), bir iç ribozom giriş sekansının (SEK ID NO: 19), bir anti- PD- L1 VL zincir sekansının (SEK ID NO: 32) ve bir antikor sabit

hafif zincir sekansının (SEK ID NO: 35) dahil edilmesiyle bir anti- PD- L1 antikorunu kodlar. pNG- 190 transgen kaseti, bir anti- PD- L1 VH zincir sekansının (SEK ID NO: 30), bir antikor sabit ağır zincir sekansının (SEK ID NO: 34), bir yüksek kendi kendine bölünme verimliliğine sahip bir P2A peptit sekansının (SEK ID NO: 25), bir anti- PD- L1 VL zincir sekansının (SEK ID NO: 32) ve bir antikor sabit hafif zincir sekansının (SEK ID NO: 35) dahil edilmesi ile bir anti- PD- L1 antikorunu kodlar. PNG- 221 transgen kaseti, bir anti- PD- L1 ScFv'yi kodlar (SEK ID NO: 37). Antikor ya da ScFv kodlama sekansları, bir 5' kısa ek yeri alıcı sekansı (SEK ID NO: 16) ve bir 3' poliadenilasyon sekansı (SEK ID NO: 20) ile çevrelenmiştir. Eklenen transgen kasetlerinin şematikleri, Şekil 34'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi.

Virüs Üretimi

NG- 190 ve NG- 221 virüsleri, Örnek 8'de detaylı olarak verilen NG- 135 virüsünün saflaştırılması için kullanılan yöntemlere göre çoğaltıldı ve saflaştırıldı.

Virüs Karakterizasyonu

Kolon karsinom hücrelerinde (ELISA ile değerlendirildi), NG- 190 ve NG- 221 onkolitik aktivitesi (hücre canlılığı tayini ile değerlendirildi), virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi) ve anti- PD- L1 antikor veya ScFv ekspresyonu, ya EnAd referans virüsü ile ya da daha önce karakterize edilen ve anti- VEGF antikorunu eksprese eden NG- 165, NG- 135 virüsleri ile karşılaştırıldı. EnAd ile karşılaştırmalı olarak onkolitik potensin değerlendirilmesi için, Örnek 15'te detaylandırılan yöntemlere göre bir hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. NG- 190 ve NG- 221 virüsleri, EnAd'a benzer bir onkolitik aktivite gösterdi (Şekil 46A, B).

Virüs replikasyonu veya antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için, HT- 29 hücreleri 1e6 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu kültür plakalarına tohumlandı ve yapışmanın ardından 100ppc EnAd, NG- 190, NG- 221 veya NG- 165 ile enfekte edildi. qPCR için DNA, örnek 18'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre hem hücresel lizatlardan hem de süpernatantlardan enfeksiyon sonrası 24, 48 veya 72. saatte hasat edildi. Çıkarılan DNA numuneleri, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR vasıtası ile analiz edildi. NG- 190 (Şekil 46C) veya NG- 221 (Şekil 46D) için tespit

edilen toplam virüs genomları, EnAd referans virüsü ile enfeksiyon zamanı boyunca benzerdi.

NG- 190 veya NG- 165 ile enfekte edilmiş hücrelerden salgılanmış antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için enfeksiyondan 24, 48 veya 72 saat sonra hasat edilen berraklaşmış enfeksiyon süpernatantları, PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20'de seyreltildi ve daha sonra Örnek 18'de detaylı olarak verilen yöntemlere göre anti- insan IgG1 ELISA ile saflaştırıldı. Benzer şekilde, NG- 177 veya NG- 135 ile enfekte olmuş hücrelerden salgılanmış antikor ekspresyonu, enfeksiyondan 72 saat sonra berraklaşmış süpernatantlarda değerlendirildi. Numunelerdeki antikor konsantrasyonu analiz standart eğrisinden interpolasyon yoluyla tespit edildi ve tespit edilebilir antikorun, NG- 165 karşılaştırmacı virüsüne nazaran NG- 190 ile enfekte olmuş hücrelerden karşılaştırılabilir seviyelerde salgılandığını (Şekil 47A) ve NG- 135 karşılaştırmacı virüsüne nazaran NG- 177 ile enfekte olmuş hücrelerden karşılaştırılabilir seviyelerde salgılandığını (Şekil 49A) gösterdi.

Örnek 28: anti- PD- L1 antikorunun ya da NG- 190, NG- 177 veya NG- 221 enfekte hücrelerden eksprese edilen ScFv'nin karakterizasyonu

PD- L1 Doğrudan Bağlanma Deneyi

NG- 190 ve NG- 221 ile enfekte olmuş hücrelerden eksprese edilen antikorun veya ScFv'in anti- PD- L1 bağlanma aktivitesi, doğrudan PD- L1 bağlayıcı ELISA ile değerlendirildi.

A549 akciğer karsinom hücreleri, 100ppc NG- 190, NG- 221 veya kontrol virüsü NG- 165 ile 72 saat enfekte edildi. Kültür süpernatantları hasat edildi ve hücre artıklarını gidermek üzere 5 dakika boyunca 300 g'de konsantre edildi. Kültür süpernatantları daha sonra 9K MWCO protein yoğunlaştırıcı spin sütununda (Pierce, 87748) 20 dakika boyunca 4000 g'de santrifüje edilerek 10 kat konsantre hale getirildi. ELISA plakaları (NunC Immuno MaxiSorp 96 oyuklu mikropalakalar) gece boyunca 4 °C'de rekombinant PDL1- Fc (0. 5 µg/ ml, R & D Systems, 156- B7- 100) ile kaplandı. Plakalar üç kez PBS- % 0.05 Tween- 20 ile yıkandı, daha sonra PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 ile bloke edildi. Konsantre süpernatantların seri çift katlı seyreltmeleri 1:2 ila 1:2048 arasında bir aralıkta PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 içinde hazırlandı, daha sonra ELISA plakasına eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

NG- 190 ve NG- 165 numuneleri için plakalar üç kez PBS- % 0.05 Tween- 20 ile yıkandı, daha sonra 50 µl 1/8000 Anti- Kappa hafif zincir antikoru (Abcam, ab124727) tüm oyuklara ilave edildi. 1 saat inkübasyondan ve yıkamadan sonra, Keçi Anti- Tavşan IgG H & L (HRP) (Abcam, ab6721) kullanılarak ikincil tespit gerçekleştirildi. Plaka daha sonra 50ul / oyuklu 1 Adımlı Ultra TMB- ELISA Substrat Çözültisi (thermo, 34028) ilave edilerek geliştirildi. 20 dakika sonra reaksiyon, 50 µl 1M HCl'nin eklenmesi ile durduruldu ve 450 nm'de absorban ölçüldü ve çizildi. Anti- PD- L1 bağlanma aktivitesi, NG- 190 ile enfekte edilmiş A549 hücrelerinin süpernatantlarında spesifik olarak tespit edilebildi, ancak NG- 165 ile enfekte edilmiş A549 hücrelerinde tespit edilemedi (Şekil 47B).

NG- 221 numuneleri için plakalar üç kez PBS- % 0.05 Tween- 20 ile yıkandı, daha sonra 50 µl 1:5000 Anti- 6X His etiketli® antikor (HRP) (Abcam, ab1187) oda sıcaklığında 1 saat süreyle tüm oyuklara ilave edildi ve daha sonra yıkandı. Plaka, 50ul 1 Adımlı Ultra TMB- ELISA Substrat Çözültisi (thermo, 34028) ilave edilerek geliştirildi. 20 dakika sonra reaksiyon, 50 µl 1M HCl'nin eklenmesi ile durduruldu ve 450 nm'de absorban ölçüldü. ScFv Anti- PD- L1 bağlanma aktivitesi, NG- 221 süpernatantlarında spesifik olarak tespit edilebilir (Şekil 47C).

PD- L1 Reseptör bağlanma inhibisyonu tahlili

NG- 190 veya NG- 177 ile enfekte edilmiş hücrelerin süpernatantı içerisinde eksprese edilen anti- PD- L1 antikorunun bloke edici aktivitesi bir PD- L1 ligandı: PD- 1 reseptör etkileşim tahlili ile değerlendirildi.

293 hücre, 100 ppc NG- 190 veya NG- 177 ile 72 saat enfekte edildi. Kültür süpernatantları, hasat edildi ve yukarıdaki detaylı olarak açıklanan yöntemle göre konsantre edildi. ELISA plakaları gece boyunca 4 °C'de PDL1- Fc (2 µg/ml, R&D Systems, 156- B7- 100) ile kaplandı. Plakalar üç kez PBS ile yıkandı, daha sonra oda sıcaklığında bir saat boyunca PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 ile bloke edildi. Konsantre süpernatantların seri ikiye katlanmış seyreltmeleri PBS içinde hazırlandı, daha sonra her seyreltiden 45ul ELISA plakasına eklendi. 10 ng rekombinant PD1- Fc (R&D Systems, 1086- PD- 050) her oyuğa eklendi ve plaka 1 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra bütün oyuklar PBS /% 0.05 Tween 20 ile üç kez yıkandı ve PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 ile 10 dakika bloke edildi. Daha sonra, insan PD- 1 (R & D Systems, BAF1086) için biyotinlenmiş afinitesi saflaştırılmış antikor, 1 saat

süresince 0. 4µg/ml'de oyuklara ilave edildi. 1 saat boyunca 1: 200 oranında streptavidin- HRP (R & D Systems, DY998) dilüsyonunun eklenmesinden önce oyuklar üç kez PBS /% 0.05 Tween 20 ile yıkandı. Plaka, 50ul 1 Adımlı Ultra TMB-ELISA Substrat Çözeltisi (termo, 34028) ilave edilerek geliştirildi. 20 dakika sonra
 5 reaksiyon, 50 µl 1M HCl'nin eklenmesi ile durduruldu ve 450 nm'de absorbans ölçüldü. PD- 1 bağlanma yüzdesini belirlemek için, ölçülen absorbans değerleri, anti-PD- L1 antikoru içermeyen kontrol numunelerinin bir yüzdesi olarak ifade edildi. NG- 190 ile enfekte olmuş hücrelerden salgılanan anti- PD- L1 antikoru, doza bağımlı bir şekilde PD- 1 reseptör bağlanmasını inhibe edebildi (Şekil 47D). Benzer şekilde, NG-
 10 135 ile enfekte olmuş hücrelerden gelen değil, NG- 177 ile enfekte olmuş hücrelerden gelen düzgün süpernatant, PD- 1 reseptörünün PD- L1'e % 50'den daha fazla bağlanmasını engelleyebildi.

(Şekil 49B)

Karışık Lenfosit reaksiyonu (MLR)

15 NG- 190 veya NG- 177 ile enfekte edilmiş hücrelerin süpernatantı içerisinde eksprese edilen anti- PD- L1 antikorunun fonksiyonel aktivitesi, karışık bir lenfosit reaksiyonunda T hücresi aktivasyonunun derecesi ile değerlendirildi. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PBMC'ler) taze insan kanından (Clinical Trials Laboratory Services) 1: 2 oranında seyreltilmiş kanın 13 ml'lik Ficoll- Paque Plus (GE sağlık
 20 yaşam bilimleri, 17- 1440- 02) üzerinde 1300 rpm'de 30 dakika santrifüjüyle izole edildi. CD14+ monositleri, üreticinin protokolüne göre insan CD14 Microbeads (Miltenyi, 130- 050- 201) kullanılarak izole edildi. İzole edilen monositler, 2 mM L- glutamin (GE Healthcare: M11- 003), 1 mM Sodyum piruvat (GE Healthcare: S11- 003), 1 mM zorunlu olmayan amino asitler (GE Healthcare: M11- 004), 1mM pen/strep (GE Healthcare: P11- 010) ve % 10 FBS (Thermo fisher, SV30160.03),
 25 500 U/ml IL- 4 (R&D Systems, 204- IL- 050) ve 800 U/ml GM- CSF (R&D Systems, 215- GM- 050) ile takviye edilmiş RPMI 1640'da (life technologies, 11875- 093) kültürlendi. Kültürler, kültür hacminin yarısı taze ortam ile değiştirilerek her 2 günde bir beslendi.

30 Monosit türevi dendritik hücreler, kültürün 5. gününde 24 saat boyunca 1 µg/ml LPS (Sigma- Aldrich, L2654) eklenmesiyle olgunlaştırıldı. Bu hücreler, 6. günde MLR tahlili için kullanıldı. Üreticilerin protokollerine göre bir insan CD4 + T Hücre İzolasyon

Kiti (Miltenyi, 130- 096- 533) kullanılarak PBMC'lerden (yukarıda açıklandığı gibi izole edilmiş) CD4 T hücreleri izole edildi. Yalıtılmış CD4 + T hücreleri, izolasyon gününde MLR'de kullanıldı.

MLR için oyuk başına 1e5 izole CD4 + T hücreleri, 2e4 LPS ile olgunlaştırılmış monosit türevi dendritik hücreler ile karıştırıldı ve daha sonra ya pozitif kontrol anti-PD- L1 antikor (5 µg/ml, Biolegend 329716) ya da 20 µl konsantre süpernatantlar (yukarıda hazırlanan) test oyuklarına ilave edildi. MLR, 4 gün boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Süpernatantlar plaktan çıkarıldı, berraklaştırıldı ve sitokin IL- 2 için ELISA ile analiz edildi. Kısaca, ELISA plakaları gece boyunca 4 °C'de insan IL- 2 mAb (R & D Systems, MAB602) ile kaplandı. Plakalar üç kez PBS ile yıkandı, sonra bir saat boyunca oda sıcaklığında PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween ile bloke edildi. Bir IL- 2 standart eğrisi, rekombinant IL- 2 proteinden (R & D Systems, 202- IL- 050) 2000 pg / ml ila 31. 3 pg / ml aralığında hazırlandı. MLR numuneleri, PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 içinde 4'te 1'in üstünde hazırlanan berraklaşmış süpernatantlar seyreltilerek hazırlandı. Numuneler ve standartlar, 1 saat boyunca oda sıcaklığında ELISA plakalarına 50 µl/oyuk ilave edildi, daha sonra biyotinlenmiş anti- insan IL- 2 saptama antikor (R & D Systems, BAF202) ilave edilmeden önce üç kez PBS /% 0.05 Tween 20 ile yıkandı. 1 saat inkübasyondan sonra plaka, PBS /% 0.05 Tween 20 ile üç kez daha yıkandı ve 1 saat boyunca streptavidin- HRP'nin (R & D Systems, DY998) 1: 200 oranında seyreltmesi ilave edildi. Plaka, 50 µl 1- Adımlı Ultra TMB- ELISA Substrat Çözeltisi (termo, 34028) ilave edilerek geliştirildi. 20 dakika sonra reaksiyon, 50 µl 1M HCl'nin eklenmesi ile durduruldu ve 450 nm'de absorbans ölçüldü. Bağımsız deneylerden elde edilen iki farklı DC: T hücre verici seti için artmış IL- 2 ekspresyonu açısından geliştirilmiş CD4 T hücre yanıtları, NG- 190 ile enfekte edilmiş kültür süpernatantları için tespit edilebilir, ancak NG- 165 ile enfekte edilmiş olanlar için tespit edilemez (Şekil 48A ve 48B). Benzer şekilde, CD4 T hücresi tepkileri de NG- 177 kültür süpernatantları için geliştirildi, ancak NG- 135 kültür süpernatantları için geliştirilmedi (Şekil 49C). Birlikte ele alındığında, bu veriler, fonksiyonel anti- PD- L1 antikorunun NG- 190 ve NG- 177 ile donatılmış virüsler için tümör hücresi enfeksiyonu bağlamında üretildiğini göstermektedir.

Hücresel PD- L1 ligand bağlama

NG- 177 ile enfekte edilmiş hücrelerden eksprese edilen antikorun anti- PD- L1 bağlanma aktivitesi, bir membran ortamında eksprese edilen rekombinant olmayan

PD- L1 ligandını doğrudan akciğer karsinom hücrelerinin yüzeyinde (A549) bağlama kabiliyeti açısından değerlendirildi.

A549 hücreleri ya hücre yüzeyinde PD- L1 ekspresyonunun yukarı regülasyonunu teşvik etmek için 50 ng/ml insan IFN γ 'sı ile uyarılır ya da uyarılmamış halde bırakılır.

- 5 24 saat sonra, hücreler tripsinleştirildi ve sadece, ortamla veya 50 μ l konsantre NG- 177 veya NG- 135 ile enfekte edilmiş hücre süpernatantı (yukarıda hazırlanmış) ile 1 saat süreyle 4 °C'de inkübe edildi. Hücreler, 4 °C'de 50 μ l Alexa- flor 488 etiketli keçi anti- insan IgG (H + L) (LifeTechnologies, A11013) ile 30 dakika inkübe edilmeden önce iki kez PBS /% 1 BSA ile yıkandı. Hücreler tekrar yıkandı, PBS /% 1 BSA içinde
- 10 yeniden süspanse edildi ve bir Attune akustik odaklama sitometresi (Life Technologies) ile analiz edildi. PE- etiketli saflaştırılmış bir anti- PD- L1 kontrol antikorunun bağlanmasına benzer bir PD- L1 bağlanma aktivitesi (Biolegend'den 29E. 23A), NG- 177 süpernatantlarında tespit edilebilir, ancak NG- 135 kontrol virüsü süpernatantlarında saptanmamıştır (Şekil 50).

15 **Örnek 29: Bağışıklık kontrol noktası inhibitörü yol proteini CTLA- 4'e (NG- 242) yönelik antikorları kodlayan EnAd virüslerinin üretimi ve karakterizasyonu**

- pEnAd2. 4 plazmidi, L5 ve E4 arasında bulunan eşsiz kısıtlama bölgelerine bir anti- CTLA- 4 antikorunu (11. 2. 1) kodlayan transgen kasetlerinin doğrudan sokulmasıyla pNG- 242 plazmidini (DİZİ İD NO: 58) üretmek için kullanıldı. pNG- 242 transgen
- 20 kaseti, bir anti- CTLA- 4 VH zincir sekansının (SEK ID NO: 70), bir antikor sabit ağır zincir sekansının (SEK ID NO: 33), bir iç ribozom giriş sekansının (SEK ID NO: 19), bir anti- CTLA- 4 VL zincir sekansının (SEK ID NO: 71) ve bir antikor sabit hafif zincir sekansının (SEK ID NO: 35) dahil edilmesiyle bir anti- PD- L4 antikorunu kodlar. Eklenen transgen kasetinin bir şeması Şekil 34'te gösterilmektedir. Plazmitin yapısı,
- 25 DNA dizilimi ile teyit edildi.

Virüs Üretimi

NG- 242 virüsü, Örnek 8'de ayrıntılandırılan NG- 135 virüsünün saflaştırılması için kullanılan yöntemlere göre çoğaltıldı ve saflaştırıldı.

Virüs Karakterizasyonu

- 30 Anti- VEGF antikorunu eksprese eden EnAd referans virüsü veya NG- 135 referans virüsü ile kolon karsinom hücrelerinde, NG- 242 onkolitik aktivite (hücre canlılığı testi ile değerlendirildi) ve anti- CTLA- 4 antikoru ekspresyonu (ELISA ile değerlendirildi)

karşılaştırıldı. EnAd ile karşılaştırmalı olarak onkolitik potensin değerlendirilmesi için, Örnek 15'te detaylandırılan yöntemlere göre bir hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. NG- 242 virüsü, üretilmiş EnAd referans materyali ile karşılaştırılabilir bir potens gösterdi (Şekil 51A).

- 5 Antikor ekspresyonunun değerlendirilmesi için, HT- 29 hücreleri 1e6 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu kültür plakalarına tohumlandı ve yapışmanın ardından 100ppc EnAd, NG- 242 ya da NG- 135 ile enfekte edildi. Enfeksiyon sonrası 24, 48 veya 72. saatlerde toplanan enfeksiyonlu süpernatantlar PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 içinde seyreltildi, daha sonra Örnek 18'de ayrıntılı olarak açıklanan yöntemlere göre anti- insan IgG1 ELISA ile denendi. Numunelerdeki antikor konsantrasyonu, analiz standart eğrisinden interpolasyon yoluyla tespit edildi ve saptanabilir antikorun NG- 242 ile enfekte olmuş hücrelerden karşılaştırmalı virüs NG- 135'e benzer seviyelerde saldıgını gösterdi (Şekil 51B).

CTLA- 4 Doğrudan Bağlanma Analizi

- 15 NG- 242 ile enfekte edilmiş hücrelerden eksprese edilen antikorun anti- CTLA- 4 bağlanma aktivitesi, doğrudan CTLA- 4 bağlayıcı ELISA ile değerlendirildi.

A549 hücreleri, bir IgG1 anti- VEGF antikorunu ifade eden 100ppc NG- 242 veya NG- 165 kontrol virüsü ile 72 saat enfekte edildi. Kültür süpernatantları hasat edildi ve hücre artıklarını gidermek üzere 5 dakika boyunca 300 g'de konsantre edildi. ELISA plakaları, 4 °C'de gece boyunca rekombinant CTLA4- Fc (0. 5µg/ml, R&D Systems, 325- CT- 200) ile kaplandı. Plakalar üç kez PBS /% 0.05 Tween 20 ile yıkandı, daha sonra PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 ile bloke edildi. Konsantre süpernatantların seri çift katlı seyreltmeleri 1:2 ila 1:2048 arasında PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 içinde hazırlandı, daha sonra ELISA plakasına eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu ELISA, daha sonra örnek 28'de ayrıntılı olarak açıklanan PD- L1 bağlanma yöntemlerine göre işlendi. Anti- CTLA- 4 bağlanma aktivitesi, NG- 242 ile enfekte edilmiş A549 hücrelerinin süpernatantlarında spesifik olarak tespit edilebildi, ancak NG- 165 ile enfekte edilmiş A549 hücrelerinde tespit edilemedi (Şekil 51C).

CTLA- 4 Reseptör bağlama inhibisyonu analizi

- 30 NG- 242 ile enfekte edilmiş hücrelerin süpernatantında eksprese edilen anti- CTLA- 4 antikorunun bloke edici aktivitesi, bir CTLA- 4 ligandı: B7- 1 reseptör etkileşim analizi ile değerlendirildi.

Yukarıda açıklanan NG- 242 ile enfekte edilmiş hücrelerden gelen kültür süpernatantları hasat edildi ve örnek 28'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre konsantre edildi. ELISA plakaları gece boyunca 4 °C'de CTLA4- Fc (2µg/ml, R&D Systems, 325- CT- 200) ile kaplandı. Plakalar üç kez PBS ile yıkandı, daha sonra oda sıcaklığında 1 saat boyunca PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 ile bloke edildi. Konsantre süpernatantların seri ikiye katlanmış seyreltmeleri PBS içinde hazırlandı, daha sonra her seyreltiden 45 µl ELISA plakasına eklendi. 10 ng rekombinant B7- 1- Fc (R & D Systems, 140- B1- 100) her oyuğa ilave edildi ve plaka 1 saat inkübe edildi. Sonra tüm oyuklar, PBS /% 0.05 Tween 20 ile üç kez yıkandı, daha sonra 10 dakika boyunca PBS /% 3 BSA /% 0.05 Tween 20 ile bloke edildi. 2 µg/ml biyotinlenmiş anti- insan B7- 1 antikoru (R & D Systems, BAM- 402) ilave edildi ve plaka 1 saat inkübe edildi. Üç yıkama gerçekleştirildi, daha sonra streptavidin- HRP'nin (R & D Systems, DY998) 1: 200 oranında dilüsyonu ilave edildi. Plaka, 50 µl 1- Adımlı Ultra TMB- ELISA Substrat Çözeltisi (termo, 34028) ilave edilerek geliştirildi. 20 dakika sonra reaksiyon, 50 µl 1M HCl'nin eklenmesi ile durduruldu ve 450 nm'de absorbans ölçüldü. Sonuçlar, numunenin Emilimini kontrolünkiyle (hiçbir test engelleyici olmadan) bölerek ve maksimum B7- 1 bağlanma yüzdesini belirlemek için 100 ile çarpılarak analiz edildi. NG- 242 ile enfekte edilmiş hücrelerden salgılanan anti- CTLA- 4 antikoru, B7- 1 reseptör bağlanmasını inhibe edebildi (Şekil 51D).

Örnek 30: Tümörle ilişkili antijenleri (TAA'lar) (NG- 217, NG- 220) kodlayan EnAd virüslerinin üretimi ve karakterizasyonu

pEnAd2. 4 plazmidi (SEK ID NO: 64), tümöre ilişkili antijen NY- ESO- 1 'i kodlayan transgen kasetlerinin L5 ve E4 genleri arasında bulunan benzersiz kısıtlama alanlarına doğrudan sokulmasıyla pNG- 217 (SEK ID NO: 57), pNG- 220 (SEK ID NO: 56) plazmitlerini üretmek için kullanıldı. PNG- 217 transgen kaseti, bir CMV promotör sekansı (SEK ID NO: 13) ve bir 3' poliadenilasyon sekansı (SEK ID NO: 20) ile çevrelenen NY- ESO- 1 genini (SEK ID NO: 43) kodlar. PNG- 220 transgen kaseti, bir PGK promotör sekansı (SEK ID NO: 14) ve bir 3' poliadenilasyon sekansı (SEK ID NO: 20) ile çevrelenmiş NY- ESO- 1 genini kodlar. Eklenen transgen kasetlerinin şematikleri, Şekil 34'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi.

Virüs Üretimi

NG- 217 ve NG- 220 virüsleri, Örnek 8'de detaylı olarak verilen NG- 135 virüsünün saflaştırılması için kullanılan yöntemlere göre çoğaltıldı ve saflaştırıldı.

Virüs Karakterizasyonu

Kolon karsinoma hücrelerinde (western blot ile değerlendirildi) NG- 220 ve NG- 217 virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi) ve NG- 220 NY- ESO- 1 transgen ekspresyonu, EnAd ile karşılaştırıldı. Virüs replikasyonunun değerlendirilmesi için, HT- 29 hücreleri 1e6 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu kültür plakalarına tohumlandı ve yapışmanın ardından 100ppc EnAd, NG- 220 ya da NG- 217 ile enfekte edildi. qPCR için DNA, örnek 18'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre hem hücreli lizatlardan hem de süpernatantlardan enfeksiyon sonrası 24 veya 48. saatte hasat edildi. Çıkarılan DNA numuneleri, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti kullanılarak qPCR vasıtası ile analiz edildi. NG- 220 (Şekil 52A) veya NG- 217 (Şekil 52B) için tespit edilen toplam virüs genomları EnAd referans virüsüne benzerdi.

NY- ESO- 1 ekspresyonunun değerlendirilmesi için HT- 29 hücreleri 6 oyuklu kültür plakalarına 4e6 hücre / oyuk yoğunluğunda ekildi ve 5 saat 37 °C'de, % 5 CO₂'de inkübe edildi. Hücreler daha sonra 48 veya 72 saat süreyle, hücre başına 100 NG- 220 veya EnAd virüs partikülleri ile enfekte edildi. Ortam, oyuklardan çıkarıldı ve hücreler, anti- proteaz inhibitörü kokteyl III (Calbiochem: 539134) ihtiva eden 250 µl liziz tamponu (150mM NaCl, % 1 Triton X- 100, % 0. 5 SDS, 50mM Tris- HCl (pH7. 5)) içinde lizizden önce PBS ile bir kez yıkandı. Lizatlara, genomik DNA'yı indirgemek üzere benzonaz ile muamele edildi ve NuPAGE LDS numune tamponu ve NuPAGE indirgeyici madde (Life Technologies) ihtiva eden liziz tamponu içinde 1: 4 oranında seyreltildi. Numuneler, üreticinin protokolüne göre % 4- 12 Bis- Tris NuPAGE jelleri (Life Technologies) kullanılarak SDS- PAGE gerçekleştirilmeden önce 10 dakika, 70 °C'de ısıtıldı. Proteinler, Xcell II Blot Modülü (Life Technologies) kullanılarak western blot ile PVDF zarlarına aktarıldı. Bloke etme ve imünotblotlama % 5 süt tozu ile takviye edilmiş PBS % 0.1 Tween- 20'de gerçekleştirildi ve tüm yıkama adımları PBS % 0.1 Tween- 20'de gerçekleştirildi. NY- ESO- 1, fare monoklonal anti- NY- ESO- 1 antikoru (3 µg/ml) kullanılarak tespit edildi ve ikincil antikor tespiti, Tavşan anti- fare IgG- HRP kullanılarak gerçekleştirildi. Proteinler gelişmiş kemilüminesans ile görselleştirildi. NY- ESO- 1 ekspresyonu hem enfeksiyon sonrası 48. hem de 72. saatlerde NG- 220 ile saptanabildi, ancak EnAd kontrolüyle saptanamadı (Şekil 52B).

Örnek 31: L5, Fiber, genin aşağı akışına transgen kasetlerinin sokulması için bir EnAd klonlama plasmidinin, pEnAd2. 4'ün oluşturulması.

Plazmid pEnAd2. 4 (SEK ID NO: 64) bir mekik vektörü, pEnAd2. 4 Mekik ve EnAd genomu arasındaki homolog rekombinasyon ile elde edildi. PEn2. 4 plazmidi, replikasyonun bir bakteriyel p15A kökenini, bir kanamisin direnç geni ve B_y bölgesine yerleştirilen benzersiz kısıtlama bölgeleri olan EnAd genomu içerir.

PColoAd2. 4 plasmidinin yapısı aşağıdaki gibidir. Bir ~12kb mekik plazmidi, pColoAd1 Mekiği, başlangıçta EnAd genomunun geç gen, L5, bölgesine (B_y bölgesi) benzersiz kısıtlama alanlarının sokulabilmesi için yapılmıştı. EnAd'in 5' (nt 1- 4632) ve 3' (nt 27837- 32326) uçları, 5' - TTGGCGGCGCGCCTATCTATATAATATAACC- 3' [SEK ID NO: 80] primeri ve sırası ile 5'- AATGCAAATCTGTGAGGGG- 3' [SEK ID NO: 82] ya da 5' - CTTAGTGGTGTGTGGTATTGG- 3' [SEK ID NO: 83] primerleri kullanarak PCR ile EnAd genomundan güçlendirildi. 5' kollu PCR ürünü, EnAd genomunda nt 4626'da PspOMI alanına tekabül eden bir 5' verilmiş Ascl bölgesi ve 3' PspOMI bölgesi içeriyordu. 3' kollu PCR ürünü, EnAd genomunda nt 27837'de PspOMI alanına karşılık gelen bir 5' PspOMI alanı ve bir verilmiş 3' Ascl bölgesi içeriyordu. PCR ürünleri, Ascl / PspOMI ile kısıtlamalı sindirildi ve replikasyonun bir p15A kökeni ve bir kanamisin direnç kaseti bulunan bir Ascl doğrusallaştırılmış plazmid içine bir adımlı üç yollu ligasyonda bağlandı. Bu, pEnAd Mekiği plasmidini üretti. PspOMI ve AclI kısıtlama bölgeleri ile çevrili olan ve geç gen L5'i (nt 27837- 30060) içeren EnAd genom bölgesine karşılık gelen bir DNA parçası, B_y bölgesindeki EnAd nt 29356'ya karşılık gelen pozisyona sokulmuş 19bp 5'- GCGATCGCTACCTGCAGG- 3' [SEK ID NO: 90] ilave bir bölge ile sentezlenmiştir. Bu ek bölge, EnAd genomunda (GCGATCGC ve CCTGCAGG) bulunmayan ve Sgf ve SbfI tarafından kesilebilen iki enzim için kısıtlama alanları içerir. Sentezlenen DNA parçası, enzimler PspOMI ve AclI ile kısıtlamalı sindirildi ve plazmid, pColoAd2. 4 mekiği oluşturmak için PspOMI / AclI sindirilmiş pColoAd1 mekik plazmidindeki karşılık gelen bölgeye klonlandı. pColoAd2. 4 plasmidini homolog rekombinasyonla elde etmek için, pColoAd2. 4 mekik plazmidi enzim PspOMI ile kısıtlamalı sindirilerek doğrusallaştırıldı ve 5' fosfatları çıkarmak için alkalın fosfataz ile işleminden geçirildi. Doğrusallaştırılmış plazmid ve EnAd genomu, üreticinin protokolüne göre elektroporasyon ile BJ5183 hücrelerine birlikte dönüştürüldü ve homolog rekombinasyon ile pColoAd2. 4

plasmidinin üretilmesi, kısıtlamalı sindirim ile saptandı. Tüm plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi.

Örnek 32: Transgen kasetlerinin L5, Fiber, geninin akış yukarısına veya akış aşağısına sokulması için bir EnAd klonlama plasmidinin, pColoAd2. 6 sentezi.

- 5 pColoAd2. 6 plazmidi (pNG- 185, SEK ID NO: 65), SGI- DNA (La Jolla, CA, ABD) tarafından sentetik gen segment birleştirme yöntemleriyle üretildi. Plazmidin doğru yapısı, sonraki nesil dizilimi ile teyit edildi (SGI- DNA). pNG- 185 plazmidi, replikasyonun bir bakteriyel p15A kökenini, bir kanamisin direnç geni ve B_x ve B_y bölgelerine yerleştirilen benzersiz kısıtlama bölgeleri olan EnAd genomu içerir.

10 **Virüs Üretimi**

NG- 185 virüsü, Örnek 8'de ayrıntılandırılan NG- 135 virüsünün saflaştırılması için kullanılan yöntemlere göre çoğaltıldı ve saflaştırıldı.

Virüs Karakterizasyonu

- 15 NG- 185'in onkolitik aktivitesi (hücre yaşayabilirlik tahlili ile değerlendirildi) ve virüs replikasyonu (qPCR ile değerlendirildi), EnAd referans virüsü ile karşılaştırıldı. EnAd ile karşılaştırmalı olarak onkolitik potensin değerlendirilmesi için, Örnek 15'te detaylandırılan yöntemlere göre bir hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. NG- 185 virüsü, EnAd'a benzer bir onkolitik aktivite gösterdi (Şekil 53A).

- 20 Virüs replikasyonunun değerlendirilmesi için, HT- 29 hücreleri 1e6 hücre/oyuk yoğunluğunda 12 oyuklu kültür plakalarına tohumlandı ve yapışmanın ardından 100ppc EnAd ya da NG- 185 ile enfekte edildi. qPCR için DNA, örnek 18'de ayrıntılı olarak verilen yöntemlere göre hem hücreli lisatlerden hem de süpernatantlardan enfeksiyon sonrası 48 veya 72. saatte hasat edildi. Çıkarılan DNA numuneleri, Örnek 9'da detaylı olarak verilen yöntemlere göre bir EnAd E3 genine özgü primer- prob seti
25 kullanılarak qPCR vasıtası ile analiz edildi. NG- 185 (Şekil 53B) için tespit edilen toplam virüs genomları, EnAd referans virüsü ile enfeksiyon zamanı boyunca benzerdi.

Örnek 33: Plazmid pColoAd2. 6'dan (pNG- 185) EnAd virüslerinin üretilmesi

- 30 pEnAd2. 6 plazmidi (SEK ID NO: 65), transgen kasetlerinin, B_x ve B_y bölgelerinde bulunan pEnAd2. 6 benzersiz kısıtlama alanlarına doğrudan sokulması ile pNG- 257 ve pNG- 281 plazmitlerinin üretilmesi için kullanıldı. pNG- 257, bir C- ucu His peptit

etiketine (SEK ID NO: 23) sahip, B_x bölgesine yerleştirilen 5' bSA (SEK ID NO: 18) ve 3' Poli(A) sekansı (SEK ID NO: 20) ile çevrilmiş bir anti- VEGF ScFv'yi (SEK ID NO: 36) kodlayan bir transgen kaseti içerir. pNG- 281, bir C- ucu Histidin peptit etiketlerine (SEK ID NO: 23) sahip, B_x bölgesine yerleştirilen 5' bSA (SEK ID NO: 18) ve 3' Poli(A) sekansı (SEK ID NO: 20) ile çevrilmiş bir anti- VEGF ScFv'yi (SEK ID NO: 36) kodlayan transgen kasetleri ve B_y bölgesine yerleştirilmiş 5' SSA (SEK ID NO: 16) ve 3' poli(A) sekansı (SEK ID NO: 20) ile çevrilmiş V5 etiketli (SEK ID NO: 24) bir anti- PD- L1 ScFv'yi (SEK ID NO: 37) kodlayan ikinci bir transgen kaseti içerir. pNG- 257 ve pNG- 281 plazmidlerine yerleştirilen transgen kasetlerinin şematikleri Şekil 54'de gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi. Bu plazmitler, EnAd virüs genomları, NG- 257 (SEK ID NO: 72) ve NG- 281'i (SEK ID NO: 73) ihtiva etmektedir.

Örnek 34: Birden fazla ScFv antikor varyantı olan EnAd virüsleri ekspresyonunun üretilmesi

pEnAd2. 4 plazmidi (SEK ID NO: 64), L5 ve E4 genlerinin (B_y bölgesi) arasında bulunan benzersiz kısıtlama bölgelerine, bir anti- VEGF ScFv ve bir anti- PD- L1 ScFv'yi kodlayan kasetin doğrudan sokulması ile pNG- 272 plazmidinin üretilmesi için kullanıldı. PNG- 272 transgen kaseti, bir anti- PD- L1 ScFv sekansının (SEK ID NO: 37), bir yüksek kendi kendine bölünme verimliliğine sahip bir P2A peptit sekansının (SEK ID NO: 25), bir anti- VEGF ScFv sekansının (SEK ID NO: 36) ve bir 3' poliadenilasyon sekansının (SEK ID NO: 20) dahil edilmesi ile bir anti- PD- L1 ScFv ve anti- VEGF ScFv'yi kodlar. Eklenen transgen kasetlerinin şematikleri, Şekil 54'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı DNA dizilimi ile teyit edildi.

Virüs Üretimi

NG- 272 virüsü (SEK ID NO: 69), Örnek 8'de ayrıntılandırılan NG- 135 virüsünü saflaştırmak için kullanılan yöntemlere göre çoğaltılır ve saflaştırılır.

Örnek 35: Transmembran proteini, sodyum / iyodür simportörü (NIS) kodlayan EnAd virüslerinin üretimi

pEnAd2. 4 plazmidi (SEK ID NO: 64), sodyum iyodür simportörünü (NIS) kodlayan bir transgen kasetinin B_y bölgesine doğrudan sokulması ile pNG- 280 plazmidini üretmek üzere kullanılır. PNG- 280 kaseti, bir 5' SSA (SEK ID NO: 16), NIS cDNA sekansı (SEK ID NO: 67) ve bir 3' poli (A) sekansı (SEK ID NO: 20) ihtiva eder ve

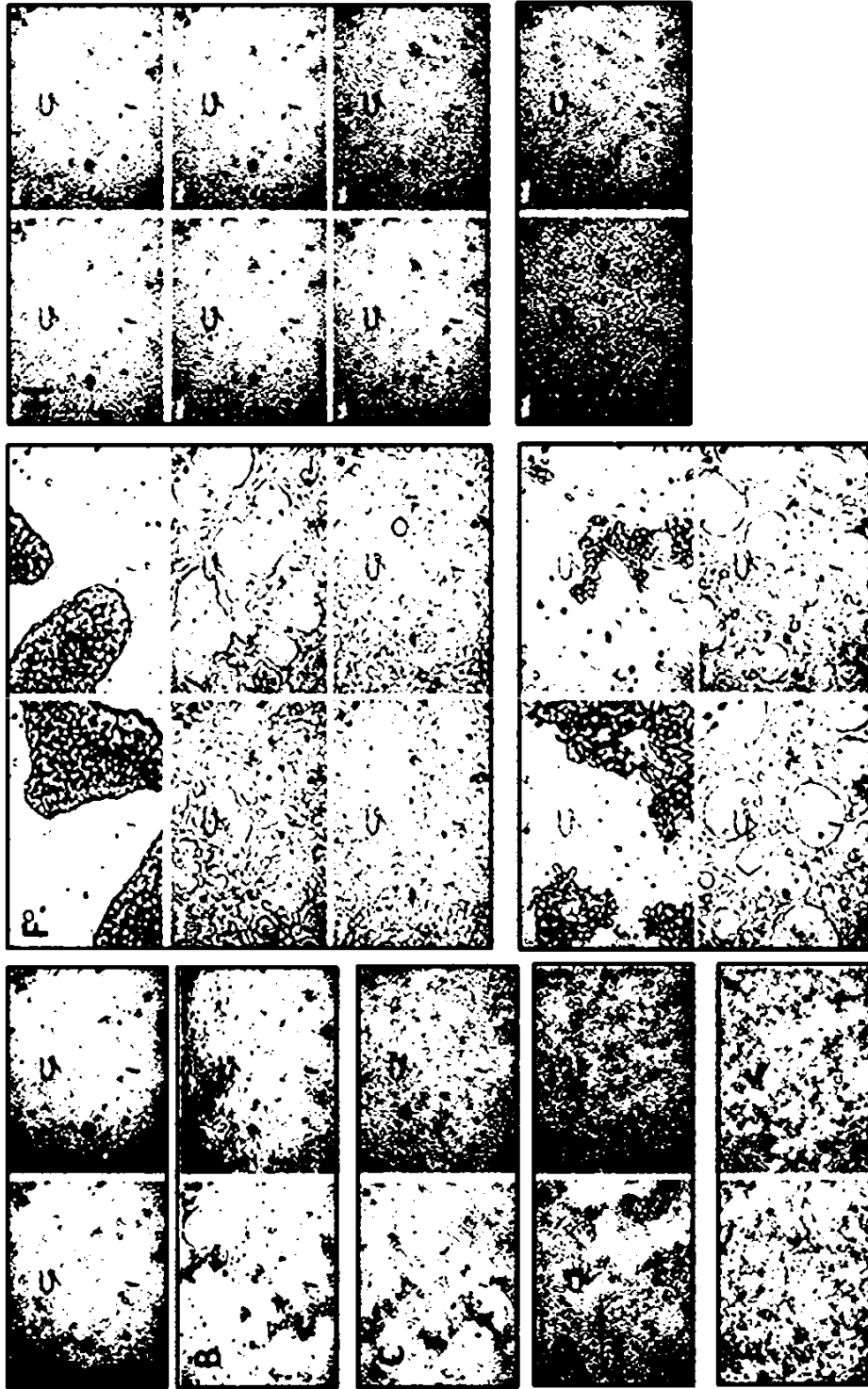
NG- 280 virüs genomunu (SEK ID NO: 68) kodlar. Eklenen transgen kasetlerinin şematikleri, Şekil 54'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı, dizilimi ile teyit edildi.

Örnek 36: shRNA'ları eksprese eden EnAd virüslerinin üretimi

pEnAd2. 4 plazmidi (SEK ID NO: 64), sırasıyla ya bir shRNA'yı GAPDH proteinine veya herhangi bir insan geni ile bir sekansı paylaşmayan bir kontrol shRNA'sını kodlayan kasetlerin doğrudan eklenmesi ile pNG- sh01 ve pNG- sh02 plazmitlerini üretmek üzere kullanılır. PNG- sh01 kaseti bir U6 insan RNA polimeraz III promotörü ve bir 29 nt antisens sekansı, bir döngü sekansı, bir 29nt duyu sekansı ve bir 3' TTTTTT sekansından oluşan bir shRNA sekansı içerir. Eklenen transgen kasetlerinin şematikleri, Şekil 54'te gösterilmektedir. Plazmidlerin yapısı, DNA dizilimi ile teyit edildi.

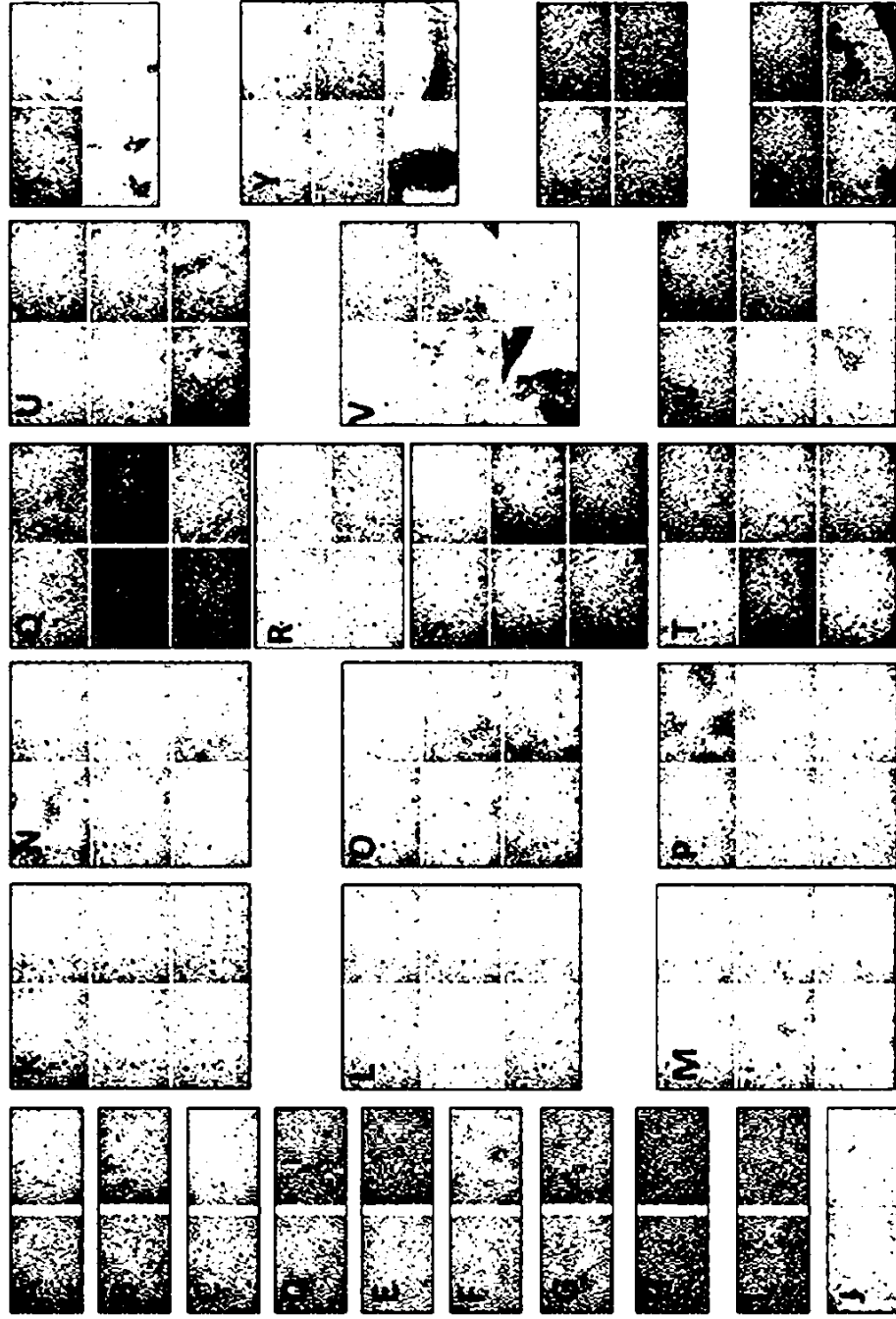
Virüs Üretimi ve karakterizasyonu

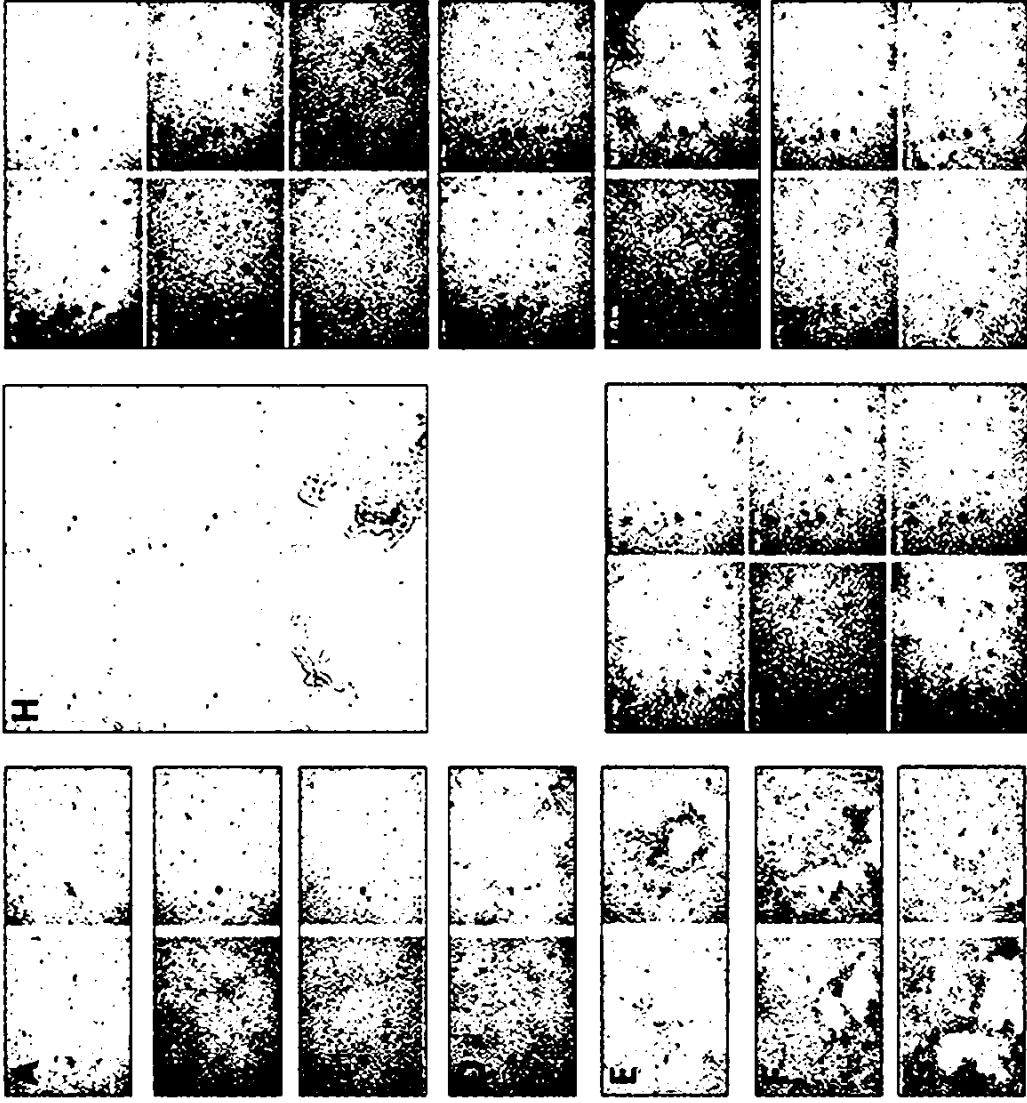
NG- sh01 (SEK ID NO: 66) ve NG- sh02 virüsleri, Örnek 8'de detaylandırılan NG- 135 virüsünü saflaştırmak için kullanılan yöntemlere göre çoğaltılır ve saflaştırılır. İnsan hücre hatlarındaki GAPDH ekspresyonu, NG- sh01 ile tedavi edilmiş hücrelerde azaldı, ancak NG- sh02 ile tedavi edilen hücrelerde azalmadı.



Şekil - 1

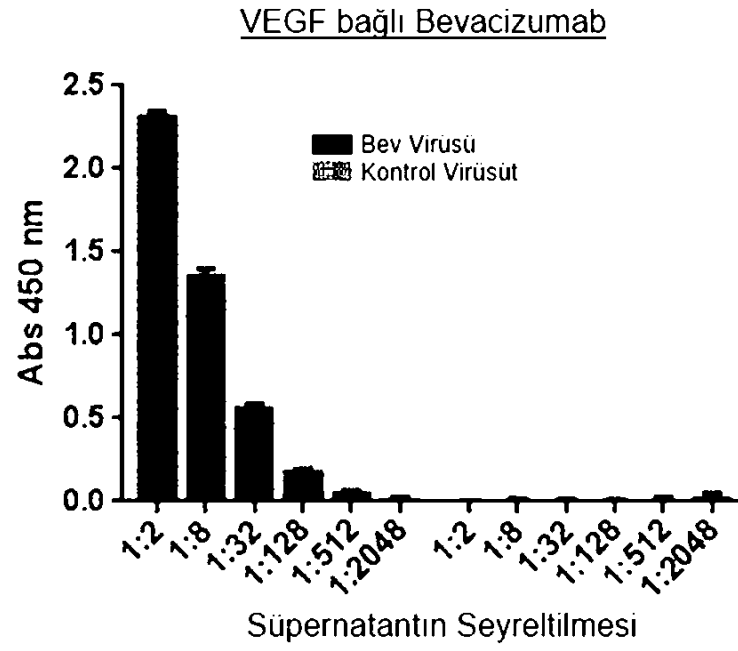
Şekil - 2





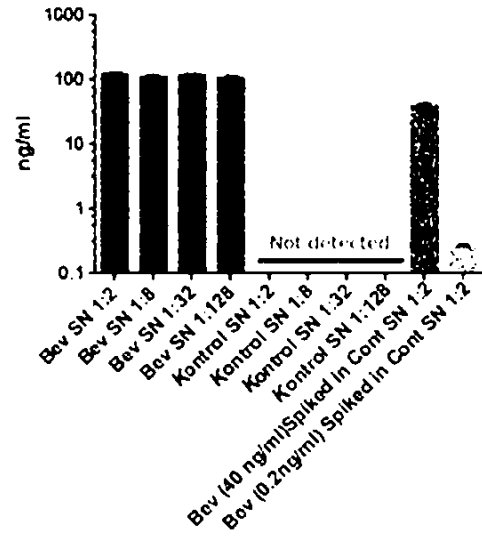
Şekil - 3

Şekil - 4A

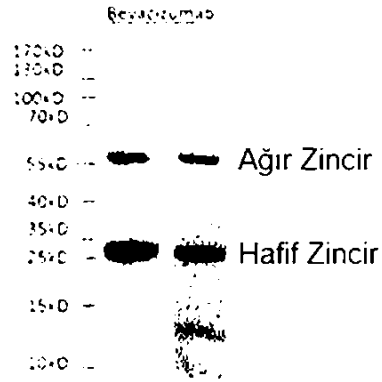


Şekil - 4B

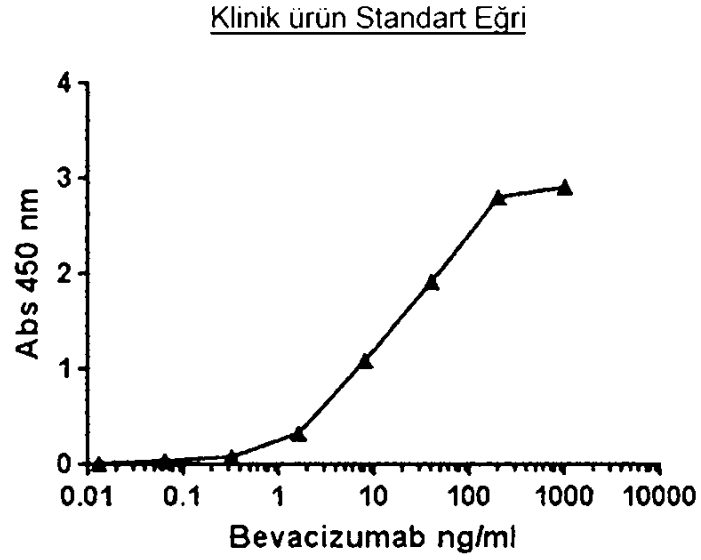
VEGF bağlı Bev (oyuk başına ng/ml)



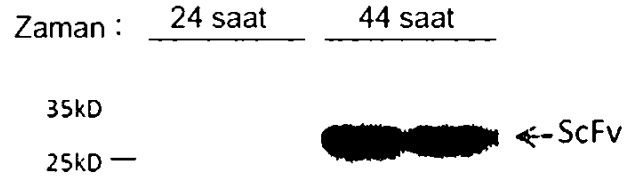
Şekil - 5



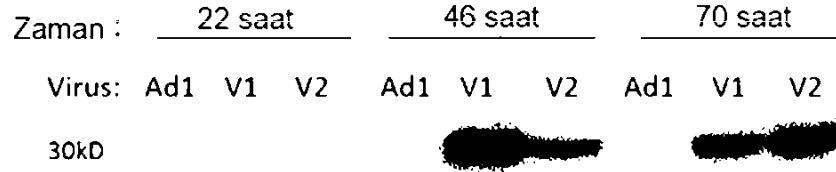
Şekil - 6



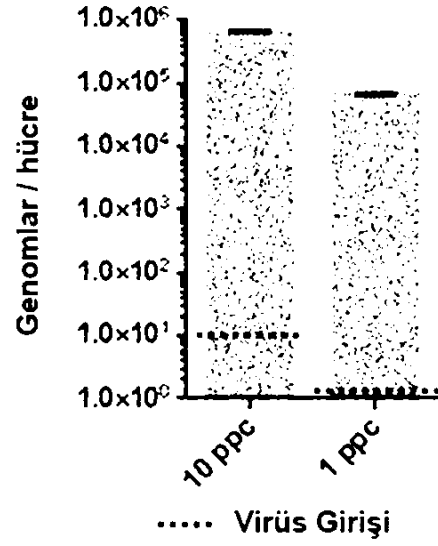
Şekil - 7

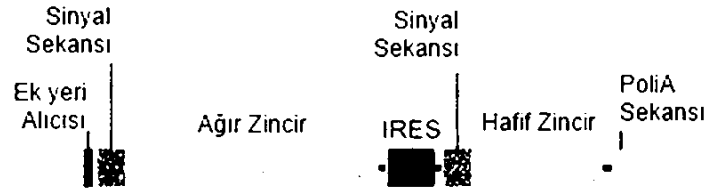
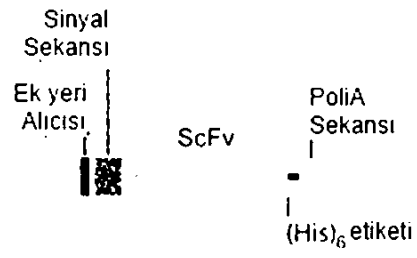
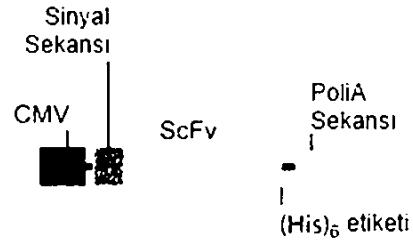


Şekil - 8



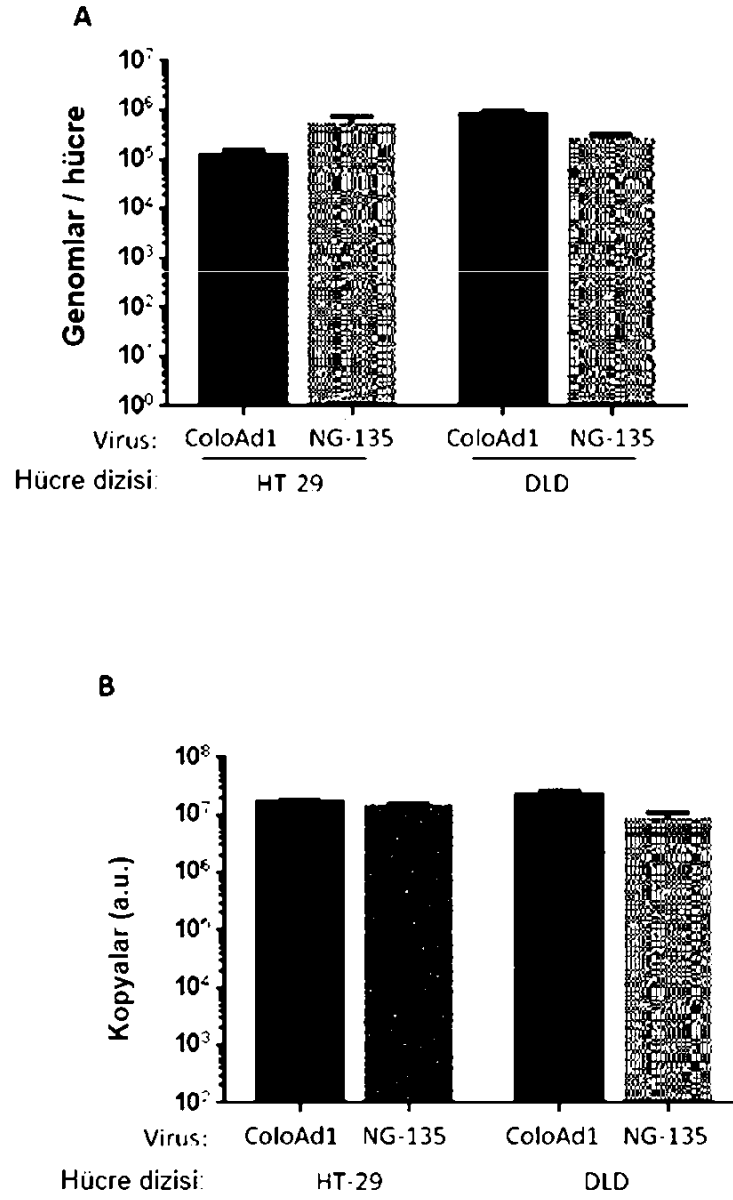
Şekil - 9

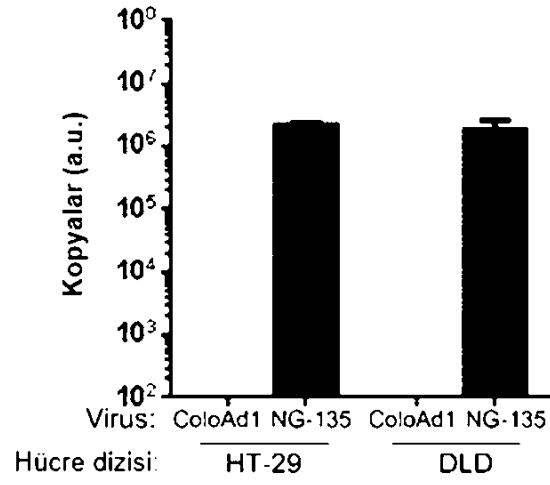
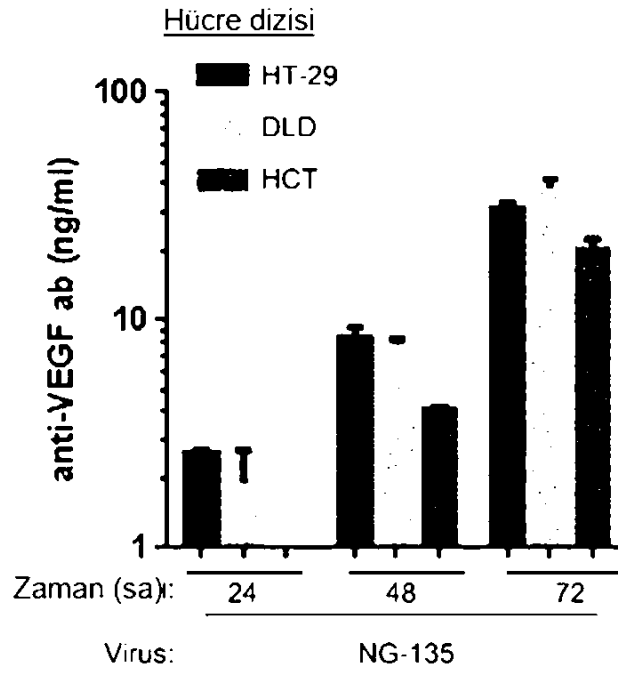


Şekil - 10**A NG-135****B NG-78****C NG-76**

Şekil - 11

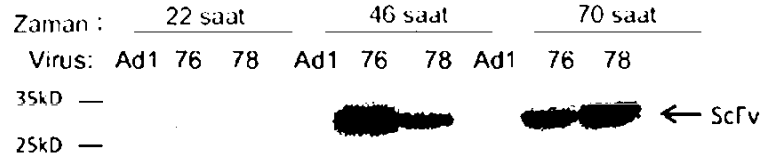
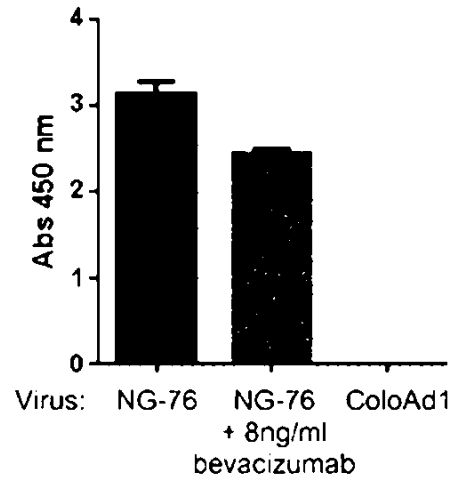
ColoAd1 = FnAd



Şekil - 12 ColoAd1 = EnAd**Şekil - 13**

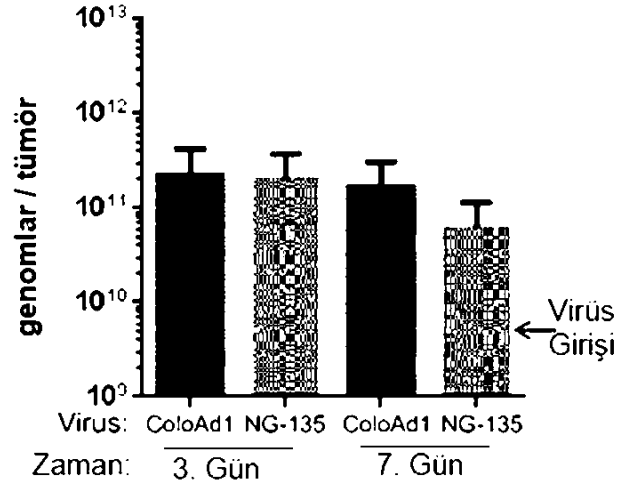
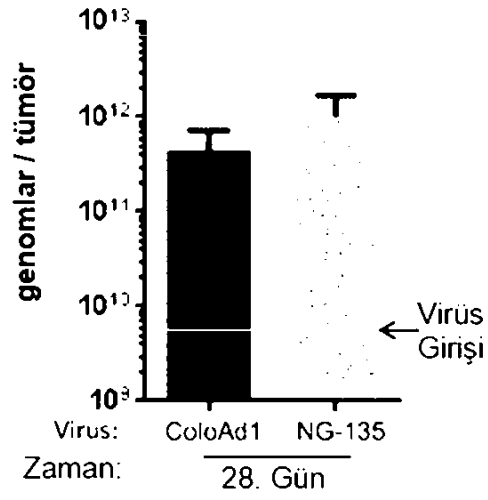
Şekil - 14

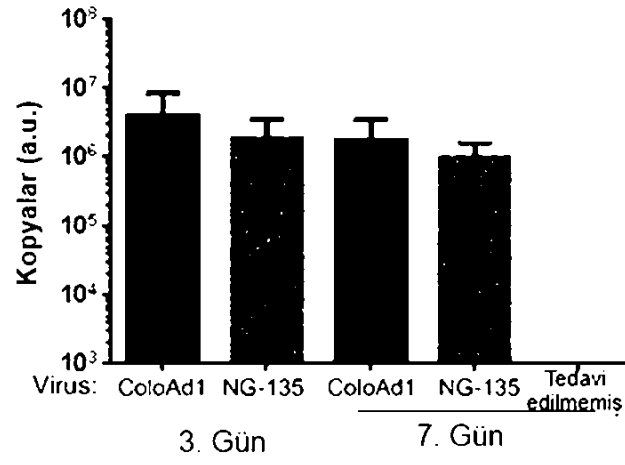
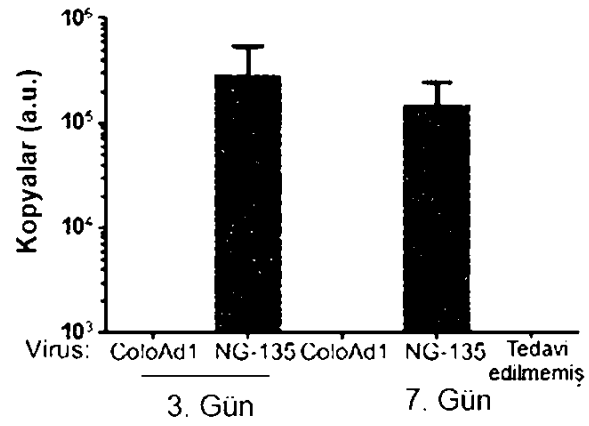
ColoAd1 = EnAd

A**B**

Şekil - 15

ColoAd1 = EnAd

A**B**

Şekil - 16 ColoAd1 = EnAd**A****B**

Şekil - 17 ColoAd1 = EnAd

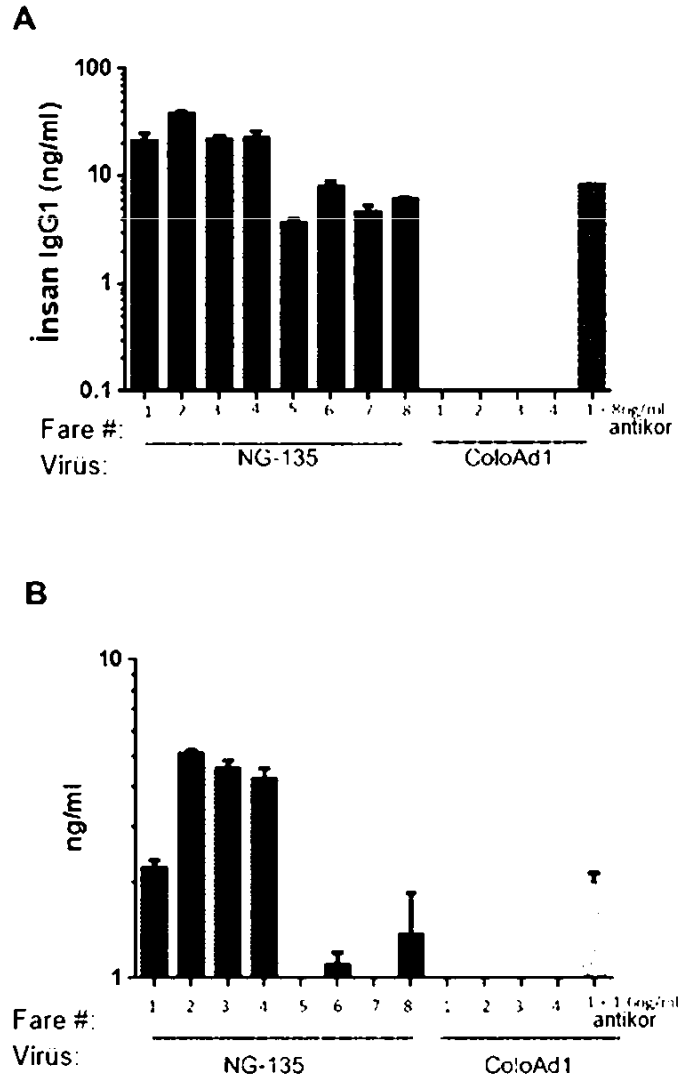
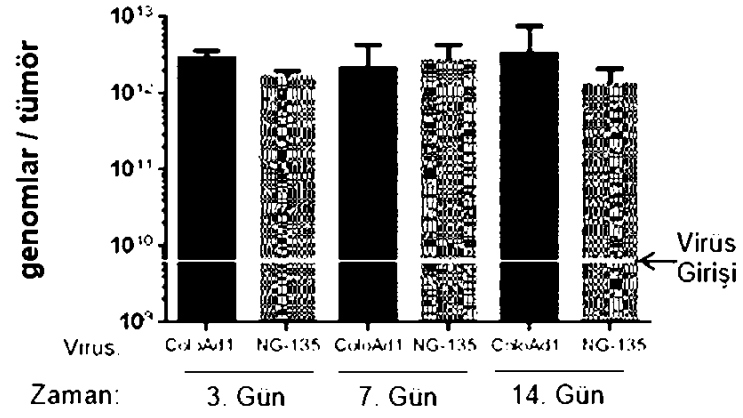
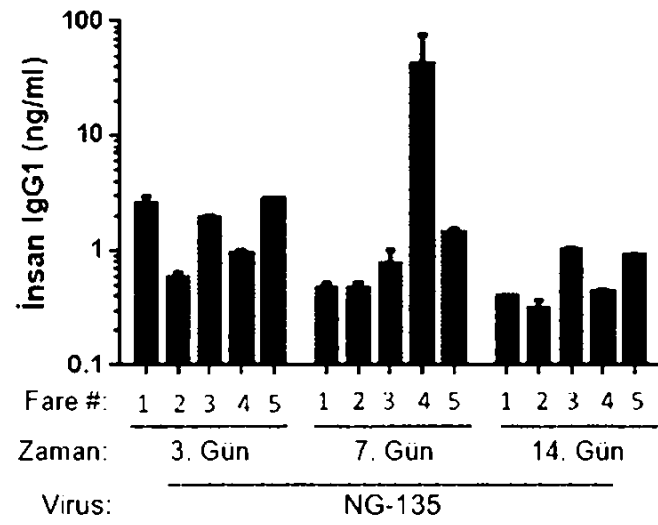


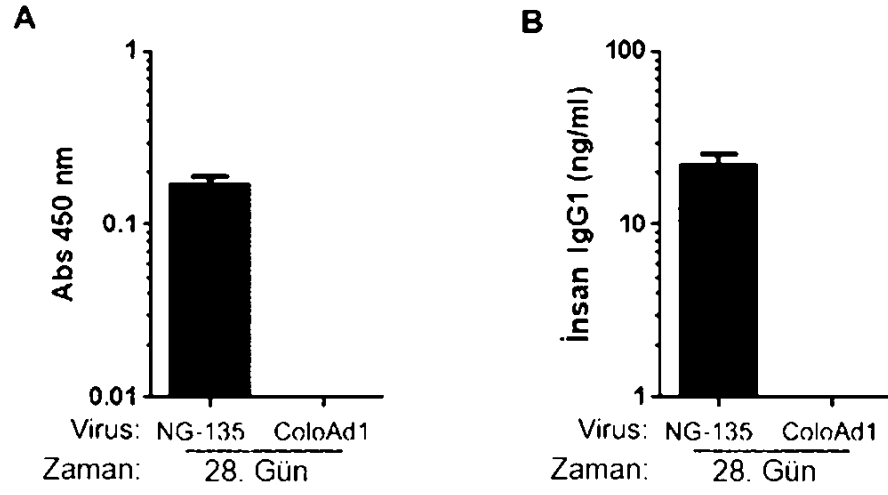
Figure 18 ColoAd1 = EnAd

A



B



Şekil - 19 ColoAd1 = EnAd

Şekil - 20

Egzojen promotörler	CMV		572bp	SEQ ID NO 13
	PGK		505bp	SEQ ID NO 14
	CBA		278bp	SEQ ID NO 15
Ek Yeri Alıcıları	SSA		4bp	SEQ ID NO 16
	SA		14bp	SEQ ID NO 17
	bSA		26bp	SEQ ID NO 18
Dahili Ribozom Giriş Sekansları	FMDV IRES		550bp	SEQ ID NO 19
Poliadenilasyon (PA) sinyal sekansları	SV40 PolyA		220bp	SEQ ID NO 20
Sinyal Peptitleri	HuVH		57bp/19aa	SEQ ID NO 21
	HG3-CL		57bp/19aa	SEQ ID NO 22
Peptit etiketleri	His etiketi		18bp/6aa	SEQ ID NO 23
	V5 etiketi		42bp/14aa	SEQ ID NO 24
Yüksek kendiliğinden bölünme verimli peptitler	P2A		66bp/22aa	SEQ ID NO 25
	T2A		63bp/21aa	SEQ ID NO 26
	E2A		69bp/23aa	SEQ ID NO 27
	F2A		75bp/25aa	SEQ ID NO 28

Şekil - 21

Antikor Değişken Ağır Zincirler	Anti-VEGF	369bp/123aa	SEQ ID NO 29
	Anti-PD-L1	354bp/118aa	SEQ ID NO 30
Antikor Değişken Hafif Zincirler	Anti-VEGF	324bp/108aa	SEQ ID NO 31
	Anti-PD-L1	324bp/108aa	SEQ ID NO 32
Antikor Sabit Ağır Zincirler	hIgG1	990bp/330aa	SEQ ID NO 33
	hIgG1 Değiştirilmiş	990bp/330aa	SEQ ID NO 34
Antikor Sabit Hafif Zincirler	hKappa LC	318bp/106aa	SEQ ID NO 35
Antikor Alanları: ScFv	Anti-VEGF	738bp/246aa	SEQ ID NO 36
	Anti-PD-L1	723bp/241aa	SEQ ID NO 37
Raportör Genler	GFP	717bp/239aa	SEQ ID NO 38
	Lusiferaz	1650bp/550aa	SEQ ID NO 39
Sitokinler	TNF α	624bp/208aa	SEQ ID NO 40
	IFN γ	498bp/166aa	SEQ ID NO 41
	IFN α	564bp/188aa	SEQ ID NO 42
Tümörle ilişkili antijenler	NY ESO 1	324bp/108aa	SEQ ID NO 43
	MUC 1	1255aa	SEQ ID NO 44

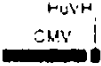
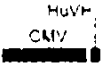
Şekil - 22

Promotör	Kaset Tasarımı			Virus ID
Egzojen	CMV 	GFP	PA	NG-47
	PGK 	GFP	PA	NG-159
	CMV 	Lusiferaz	PA	NG-61
Büyük Geç Promotör (MLP)	bSA 	Lusiferaz	PA	NG-63
	bSA 	GFP	PA	NG-62
	bSA 	GFP		NG-93
	SA 	GFP	PA	NG-108
	SA 	GFP		NG-106
	SSA 	GFP	PA	NG-107
	SSA 	GFP		NG-105
E4	PA	GFP	bSA 	NG-110
		GFP	bSA 	NG-109

Şekil - 23

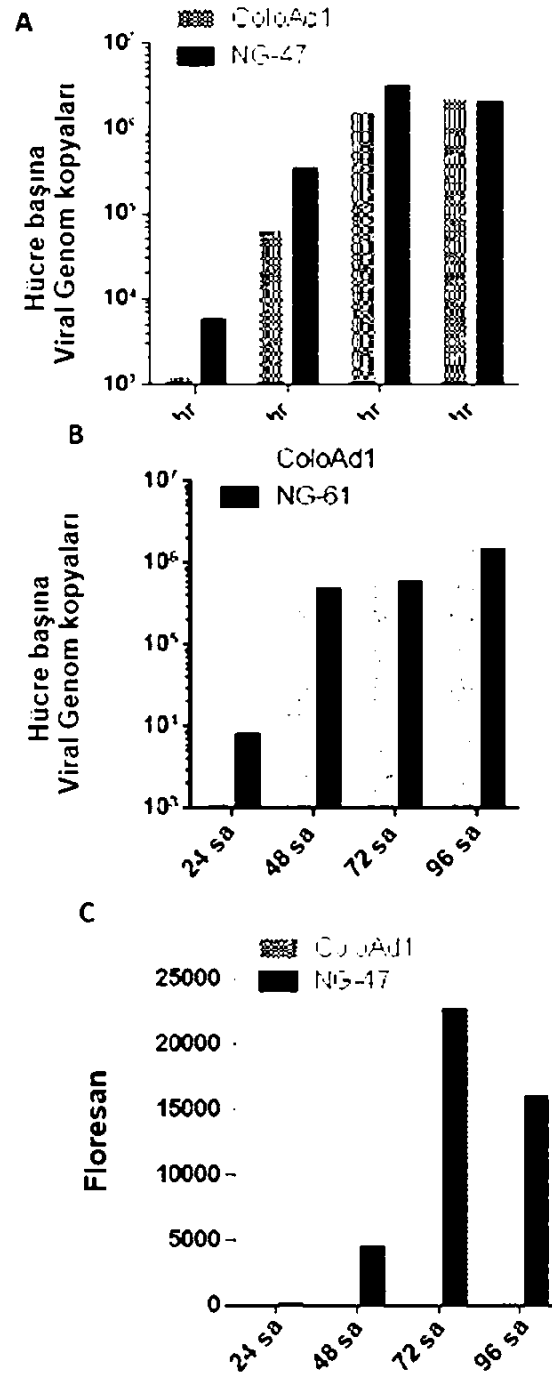
Promotör	Kaset Tasarımı	Virus ID	
Egzojen	CMV IFN γ PA 	NG-95	SEQ ID NO. 49
	CMV IFN α PA 	NG-97	SEQ ID NO. 50
Büyük Geç Promotör (MLP)	bSA IFN γ PA 	NG-92	SEQ ID NO. 51
	bSA IFN α PA 	NG-96	SEQ ID NO. 52
	SSA TNF α PA 	NG-139	SEQ ID NO. 53

Şekil - 24

Promotor	Kaset Tasarımı				Virus ID		
Egzojen					NG-73	SEQ ID NO 8	
					NG-76	SEQ ID NO 7	
Büyük Geç Promotor (MLP)					NG-74	SEQ ID NO 5	
					NG-78	SEQ ID NO 6	
					NG-167	SEQ ID NO 48	
						NG-135	SEQ ID NO 2
						NG-177	SEQ ID NO 46
							

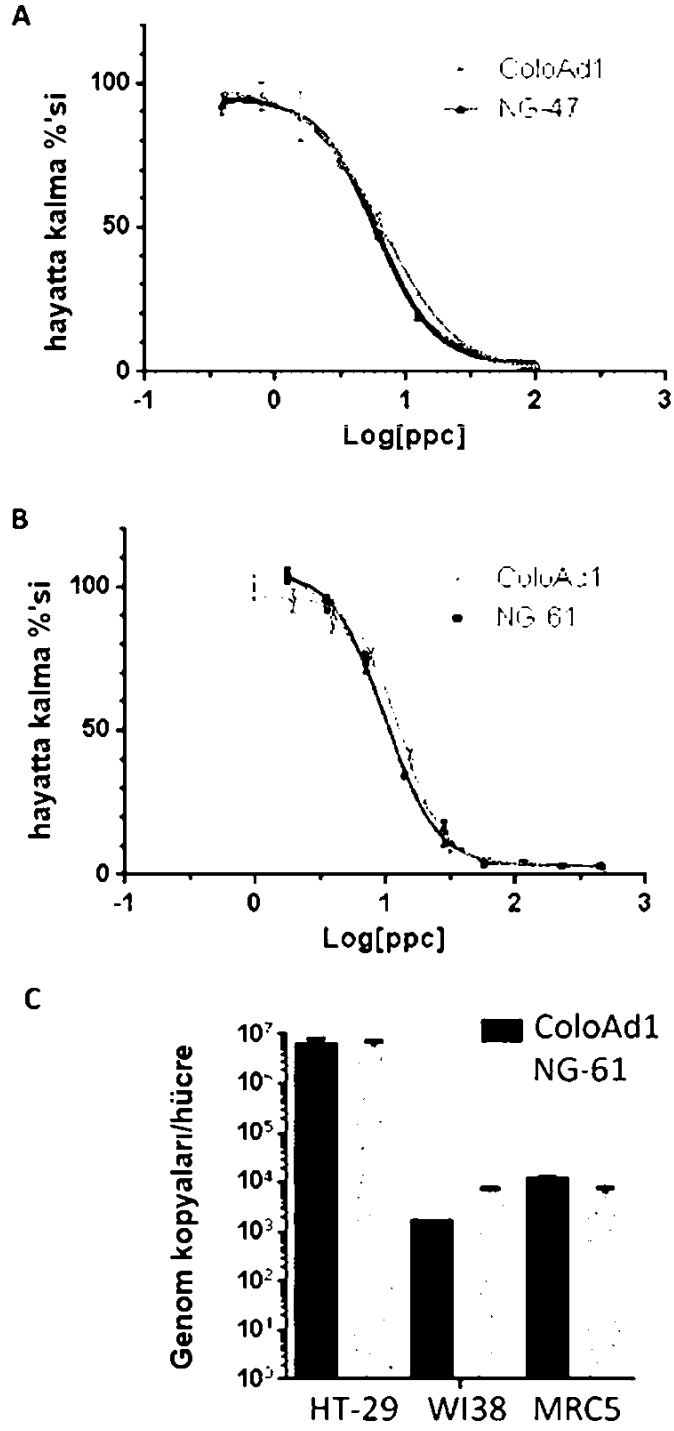
Şekil - 25

ColoAd1 = EnAd

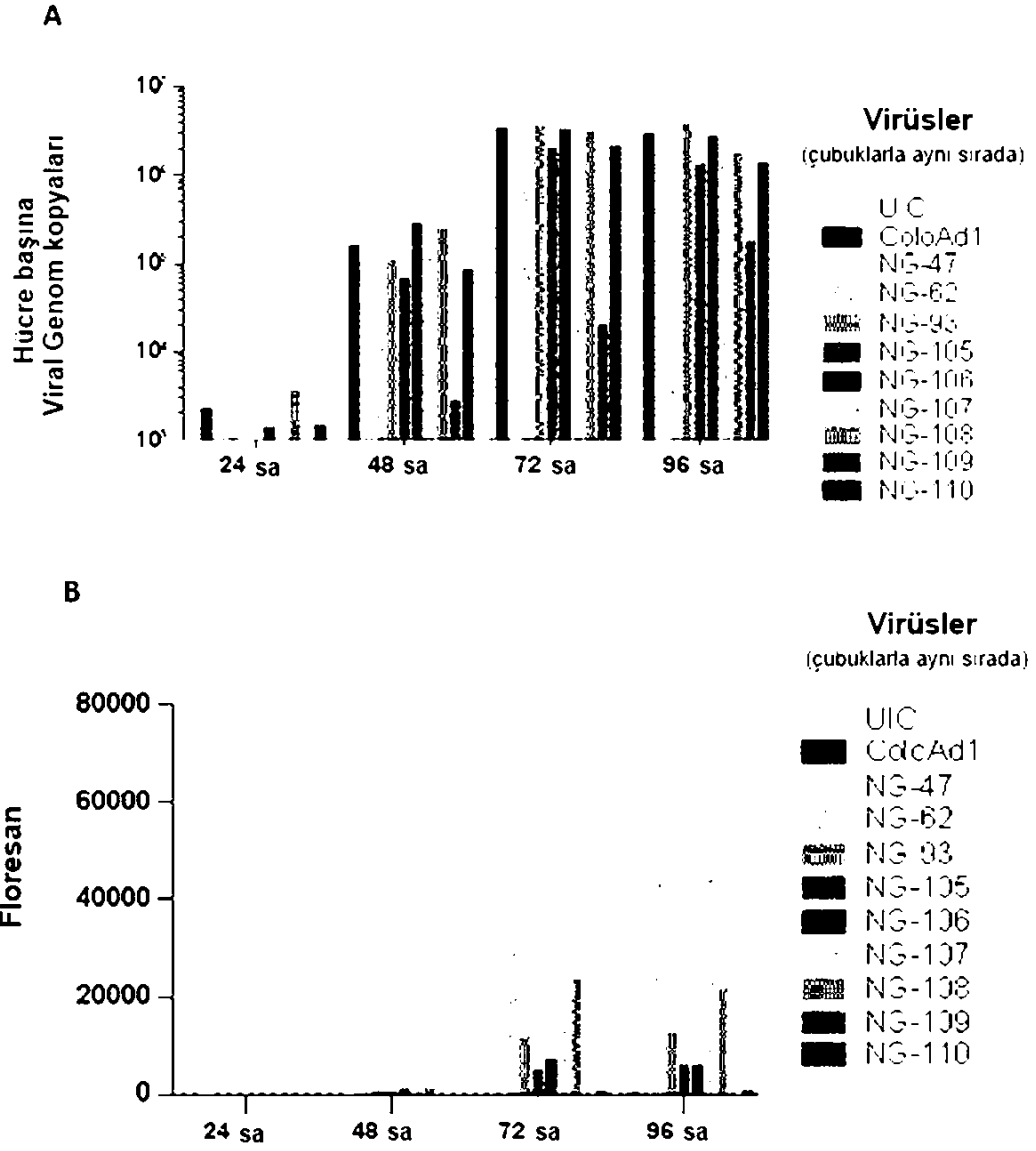


Şekil - 26

ColoAD1 = EnAd

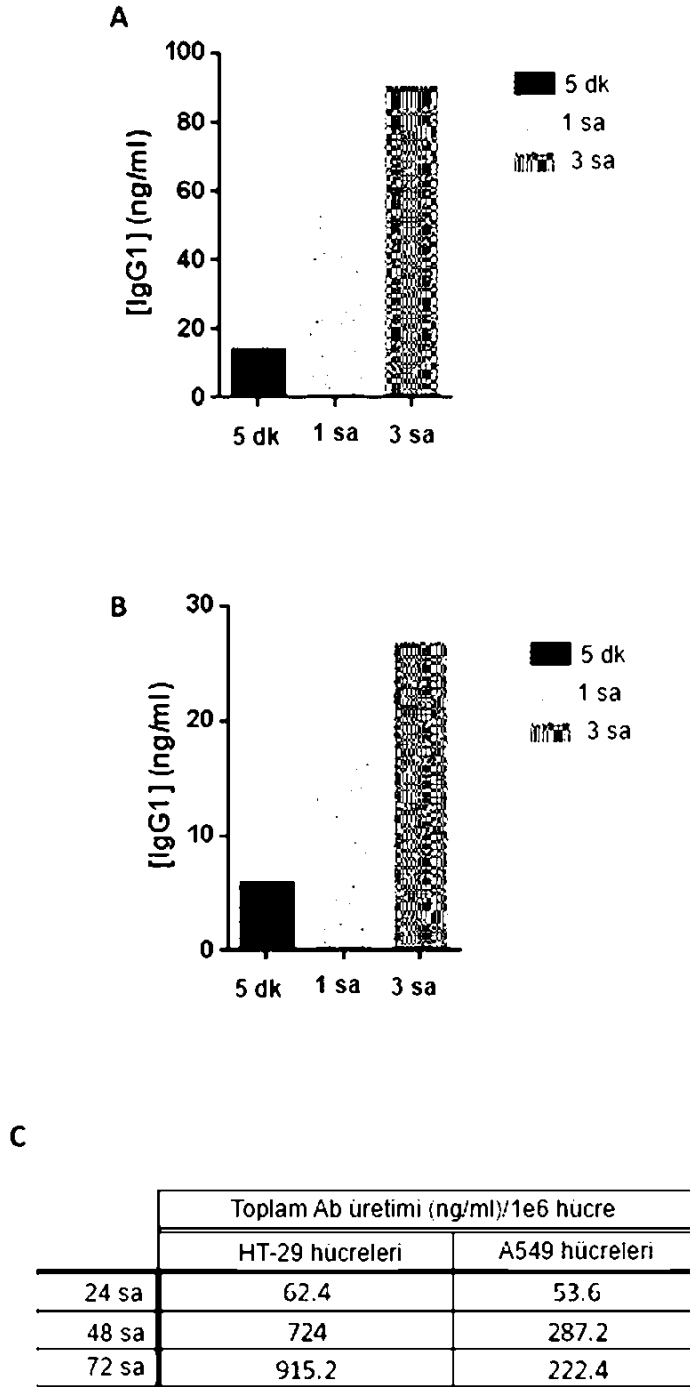


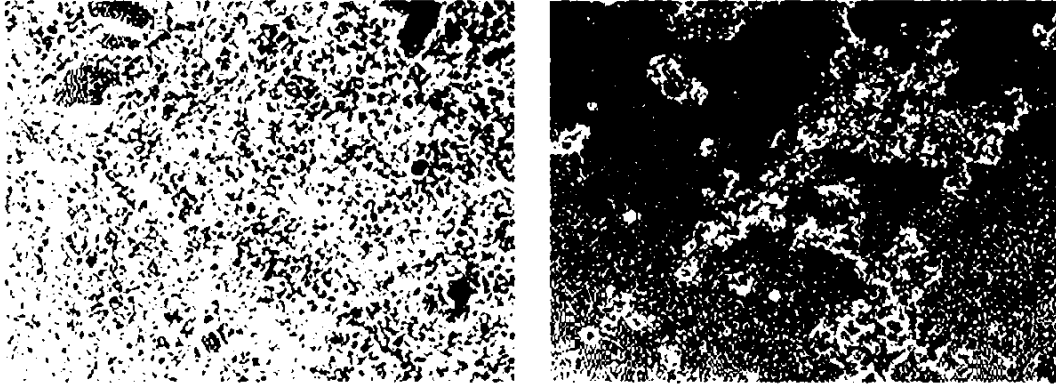
Şekil - 27



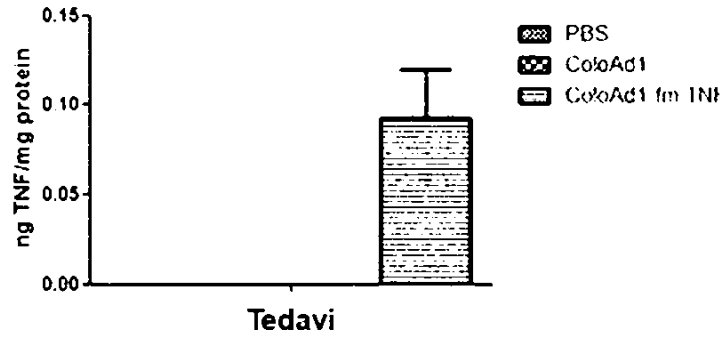
ColoAd1 = FnAd; UIC = enfekte olmamış kontrol

Şekil - 28

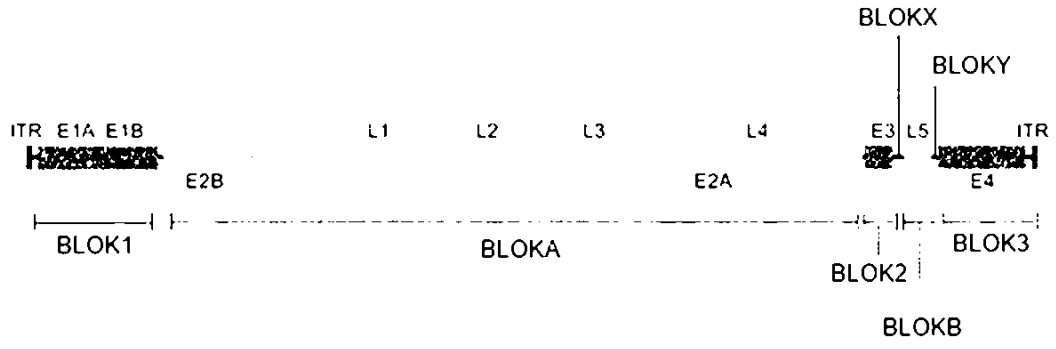


Şekil - 29 ColoAd1 = EnAd**A****B****C**

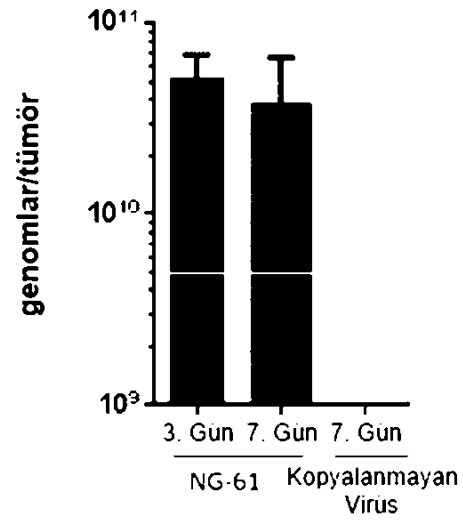
TNF üretimi (ng/ml)	
HT-29 hücreleri	
24 saat	0.233
36 saat	15.7

D

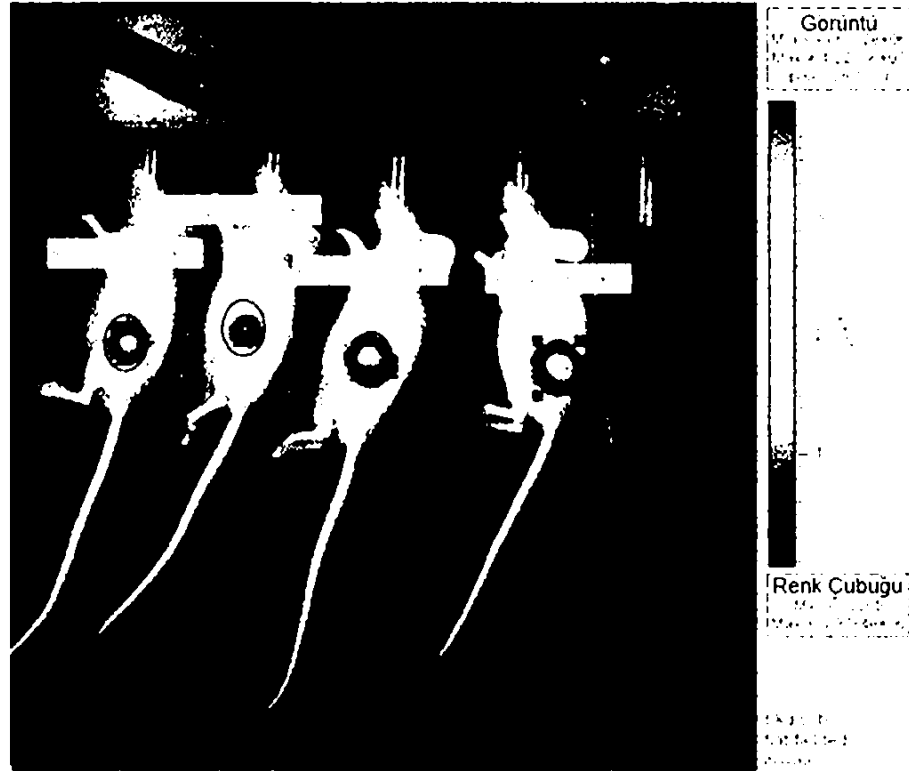
Şekil - 30



Şekil - 31

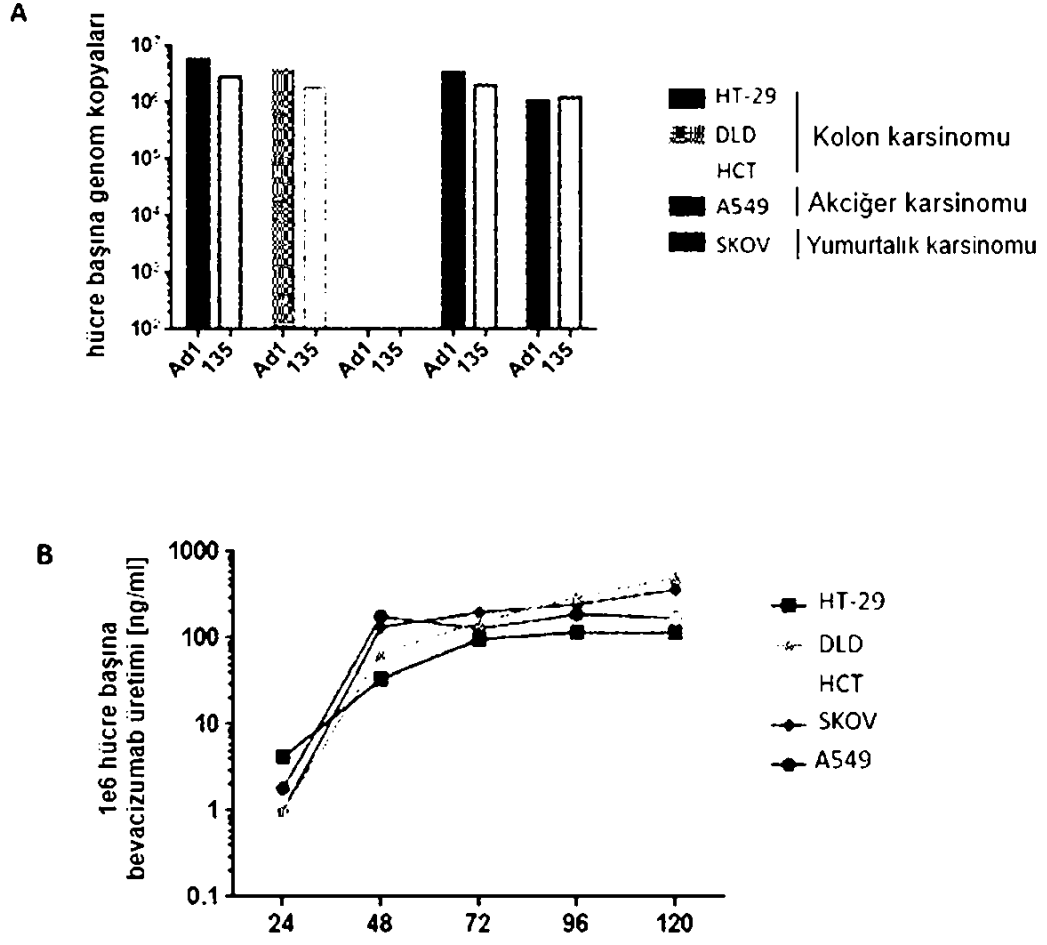


Şekil - 32

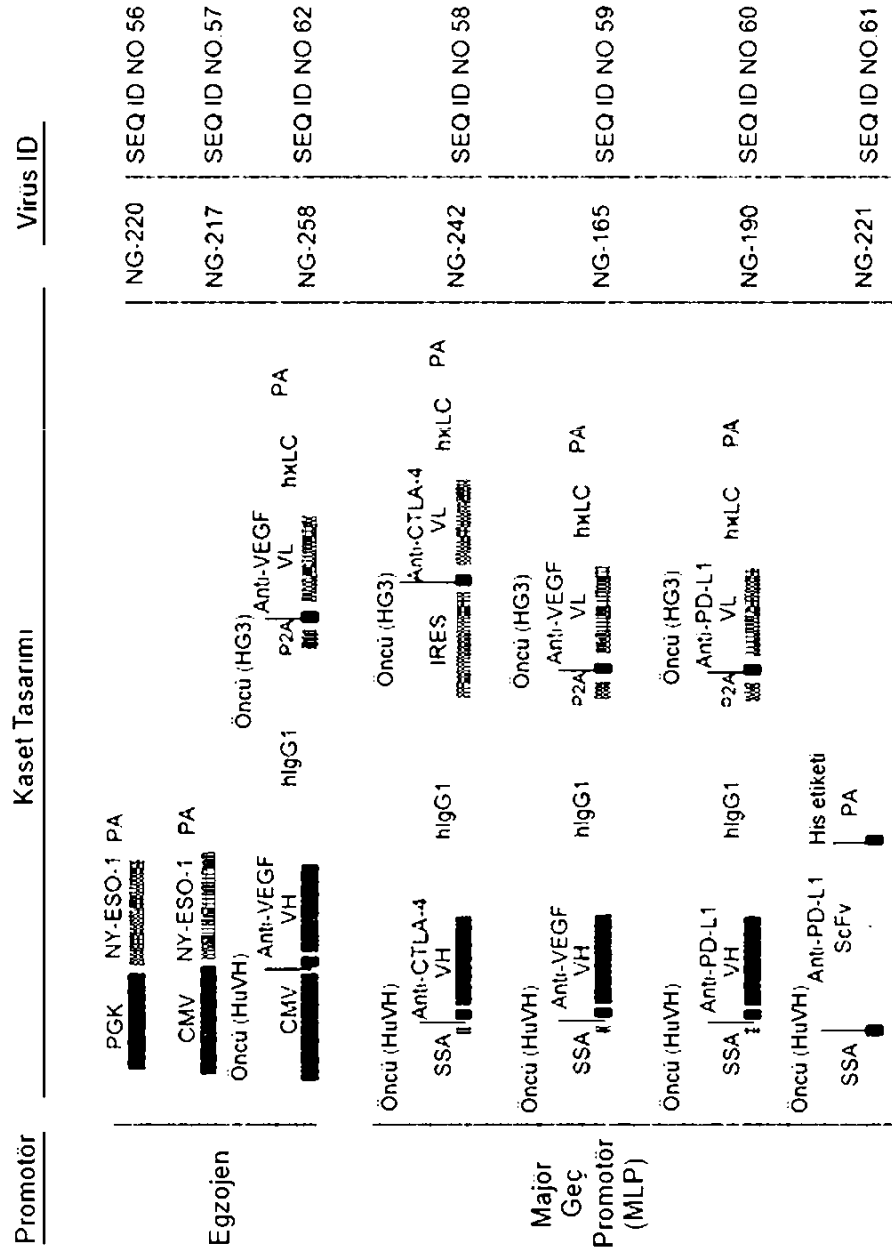


Şekil - 33

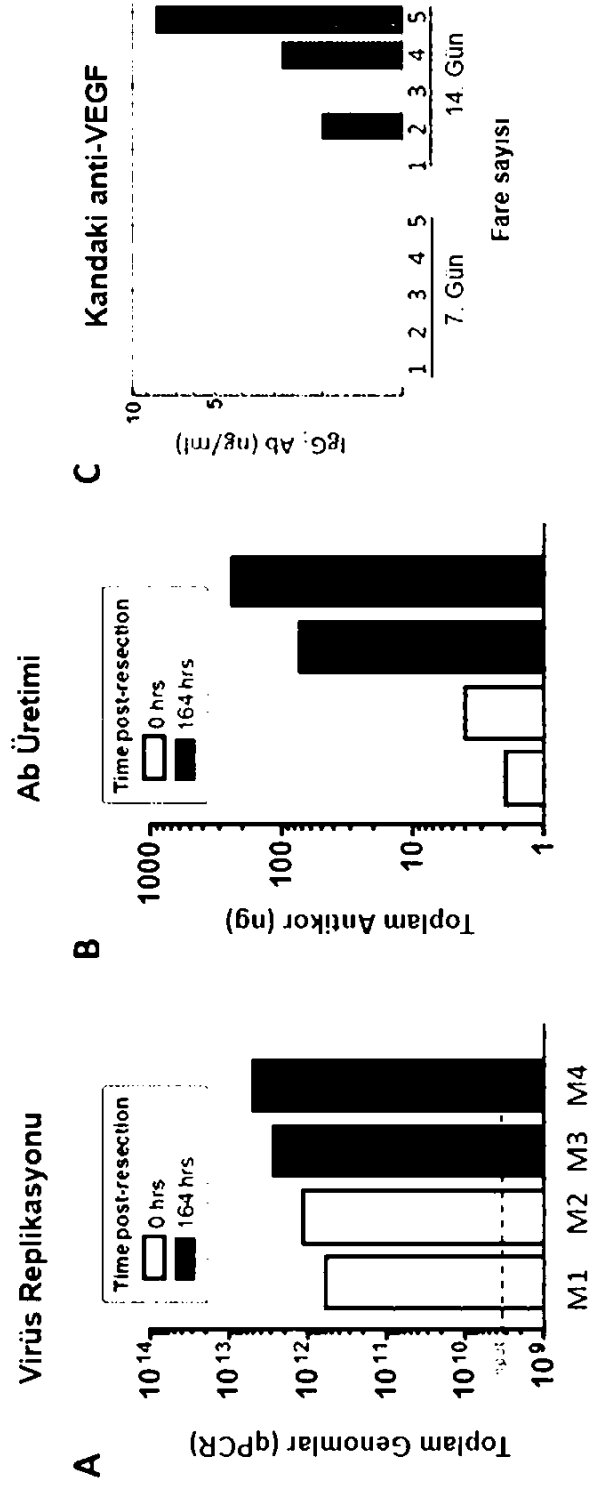
Ad1 = EnAD; 135 = NG-135



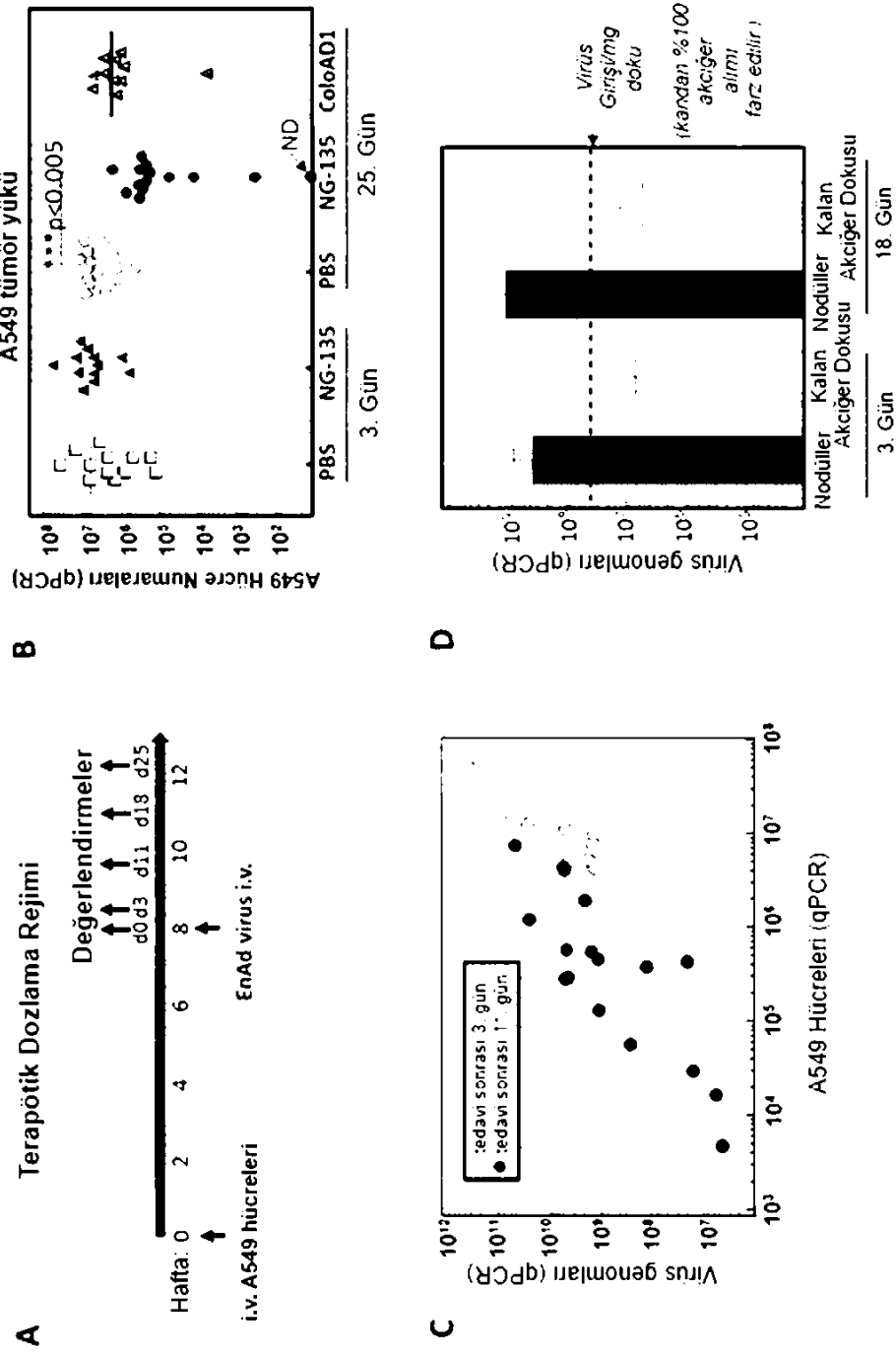
Şekil - 34

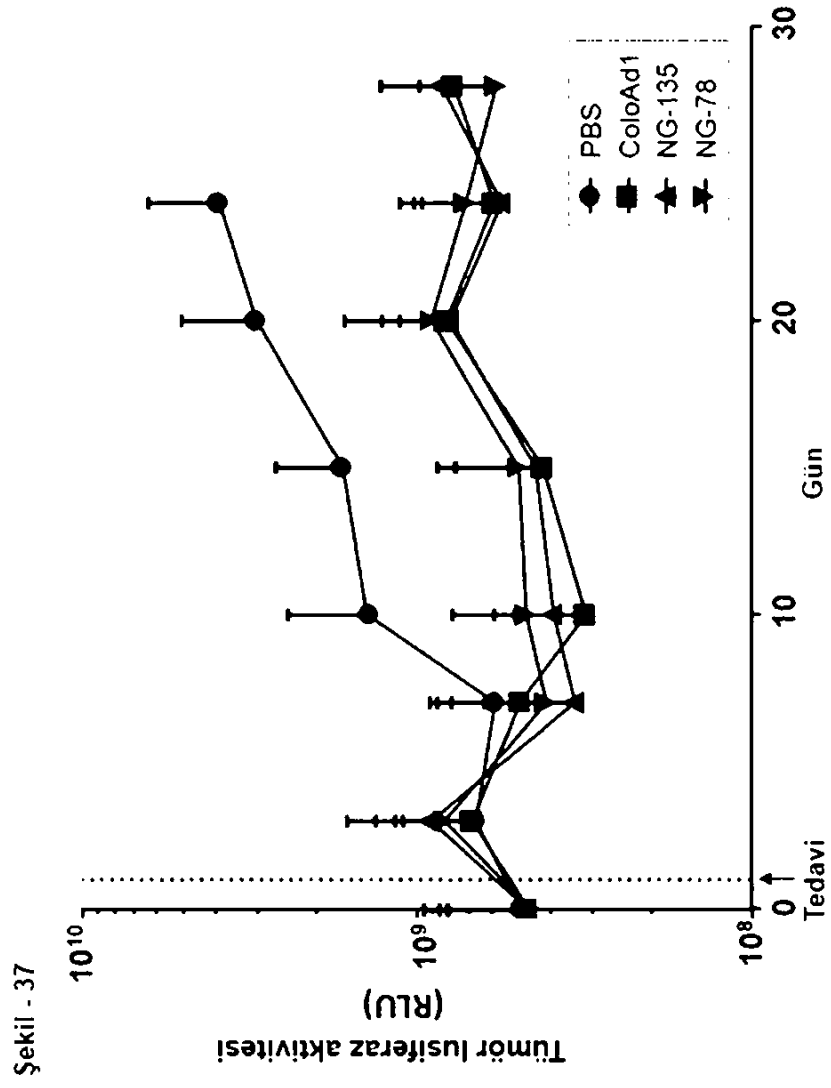


Şekil - 35



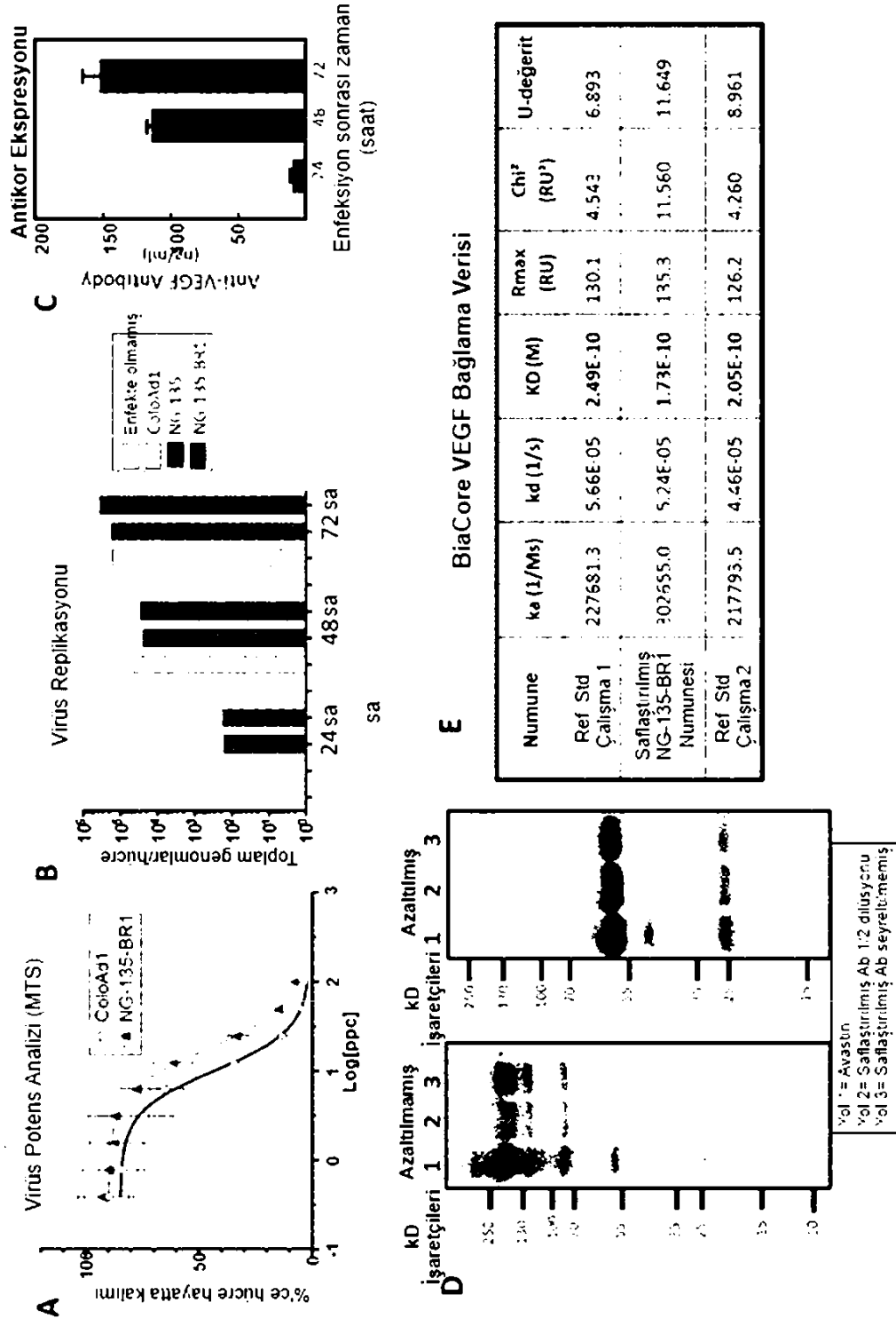
Şekil - 36



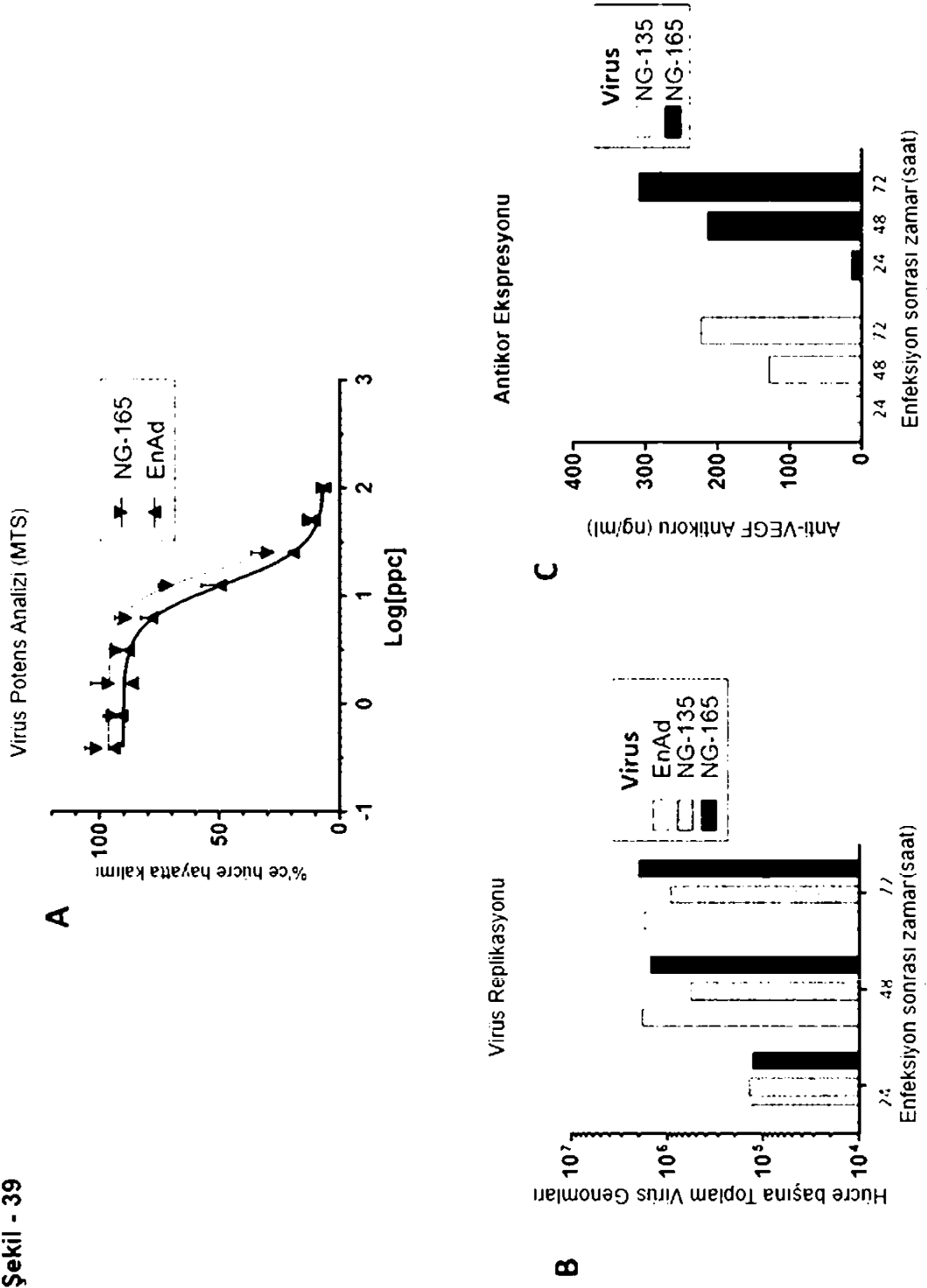


Şekil - 38

ColoAd1 = ErAD

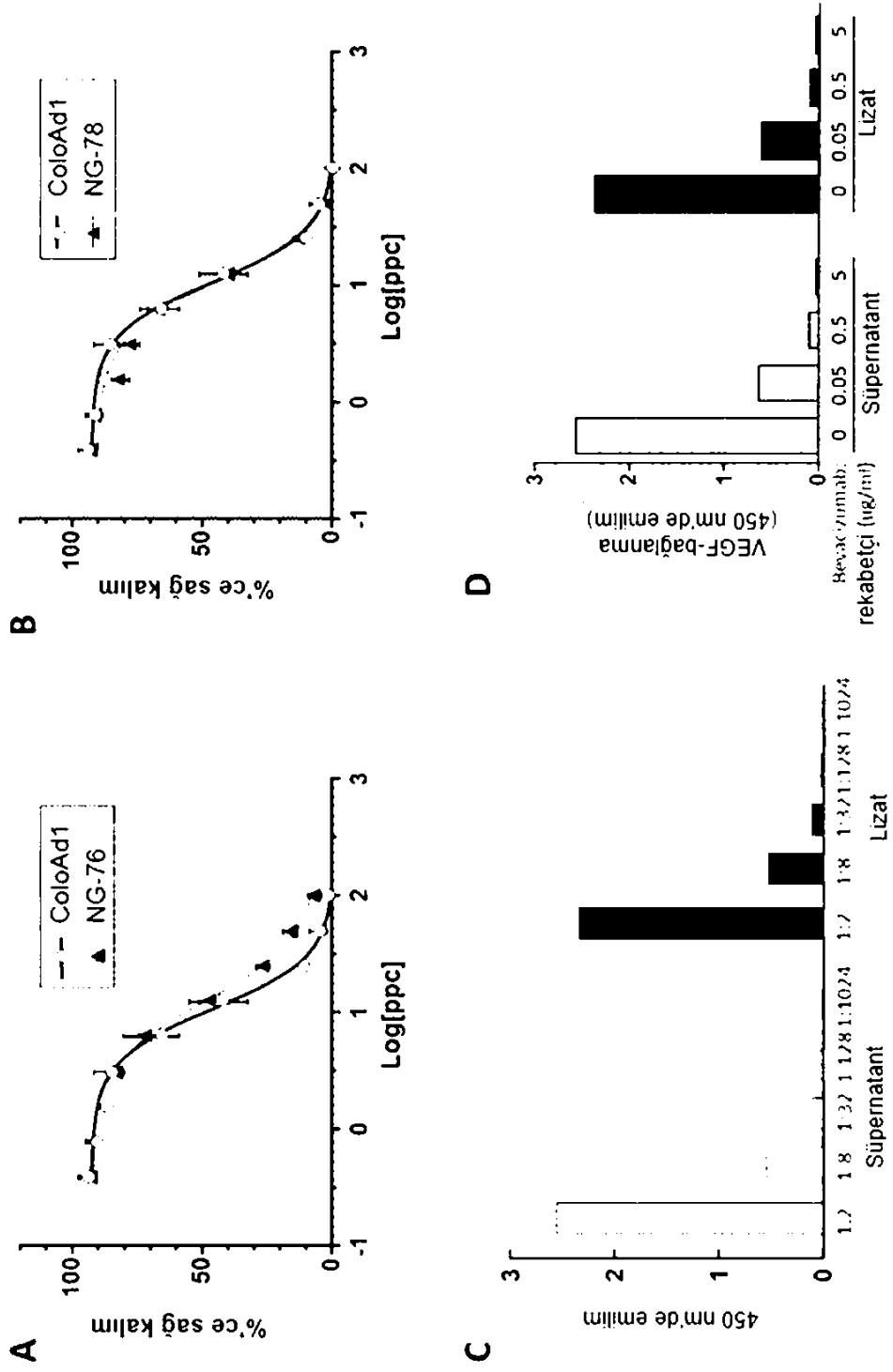


Şekil - 39

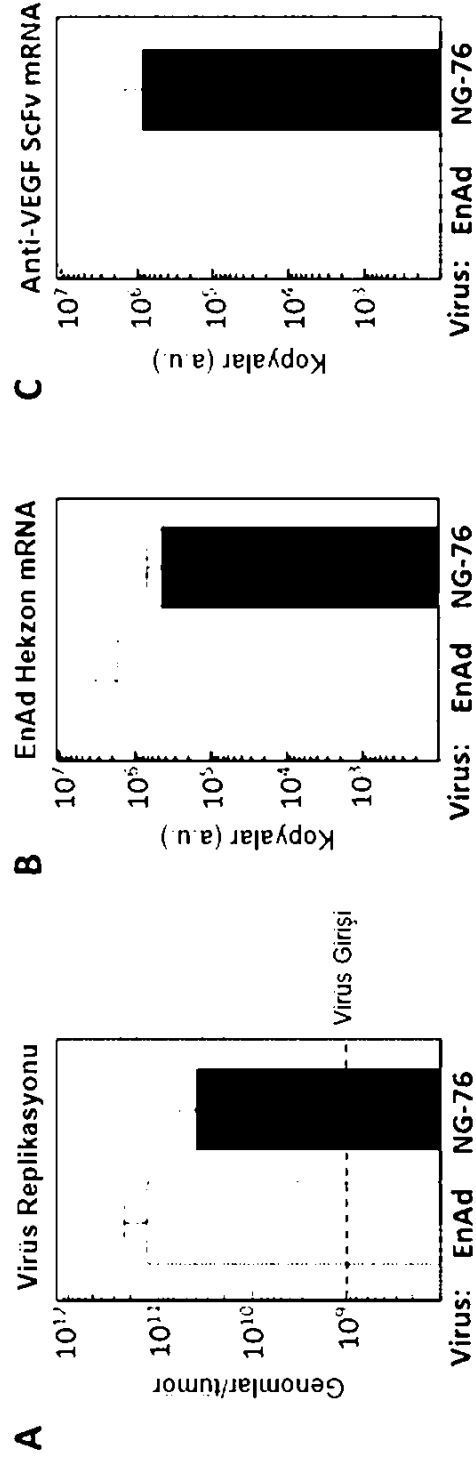


ColoAD1 = EnAd

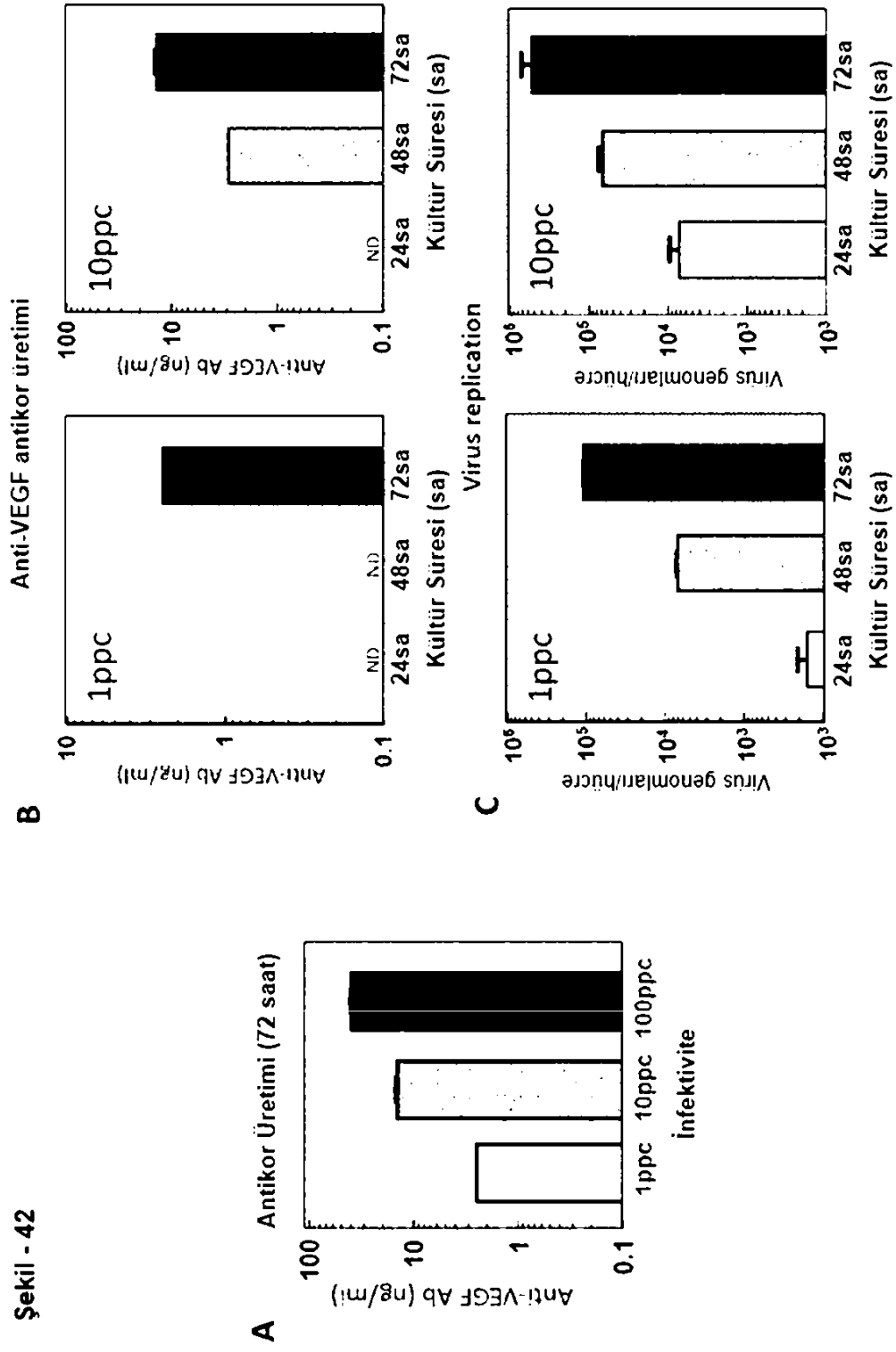
Şekil - 40



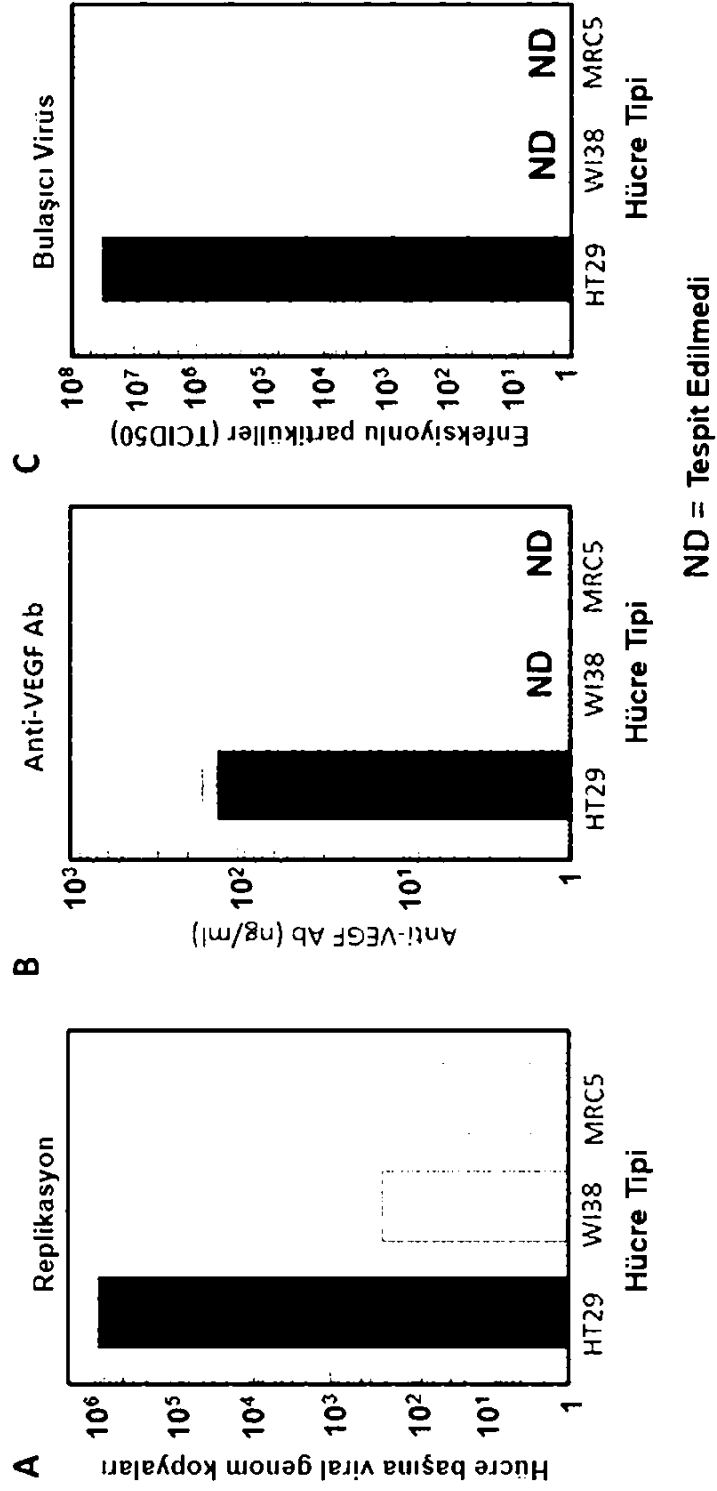
Şekil - 41



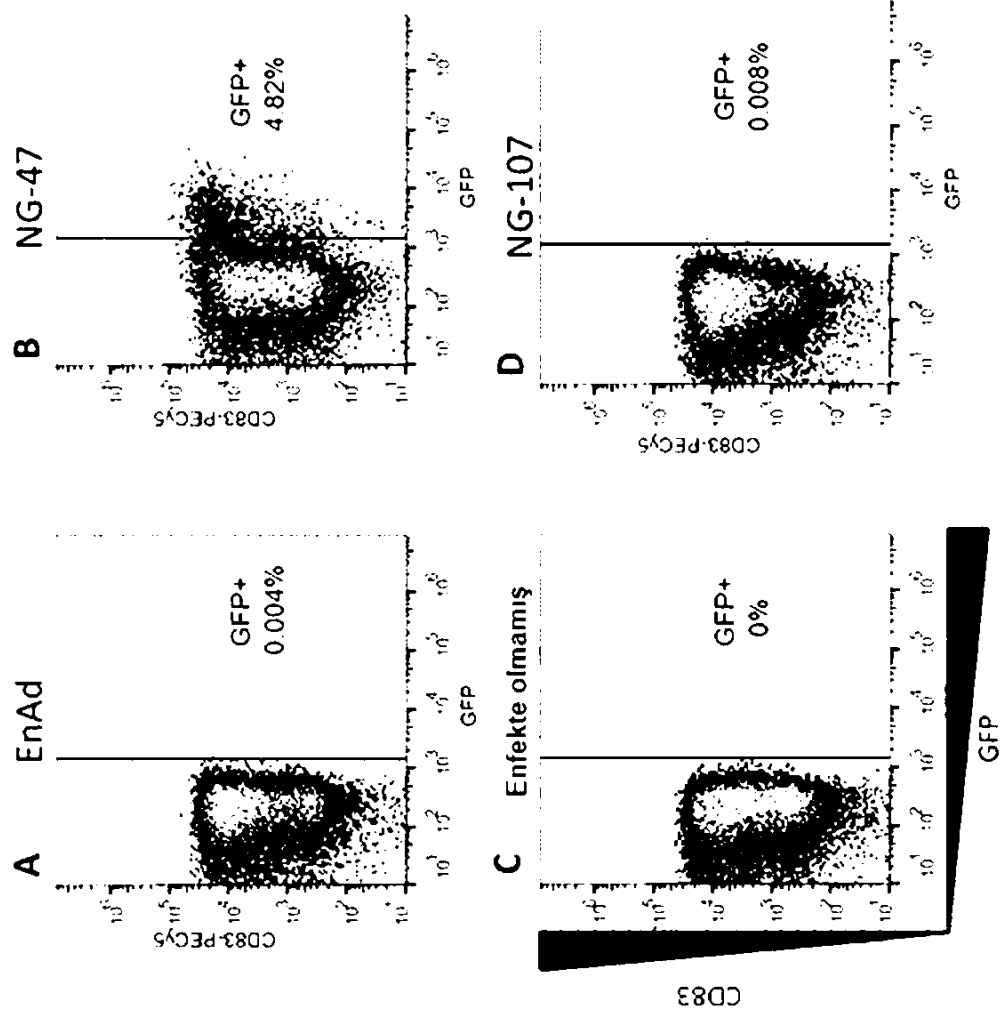
Şekil - 42



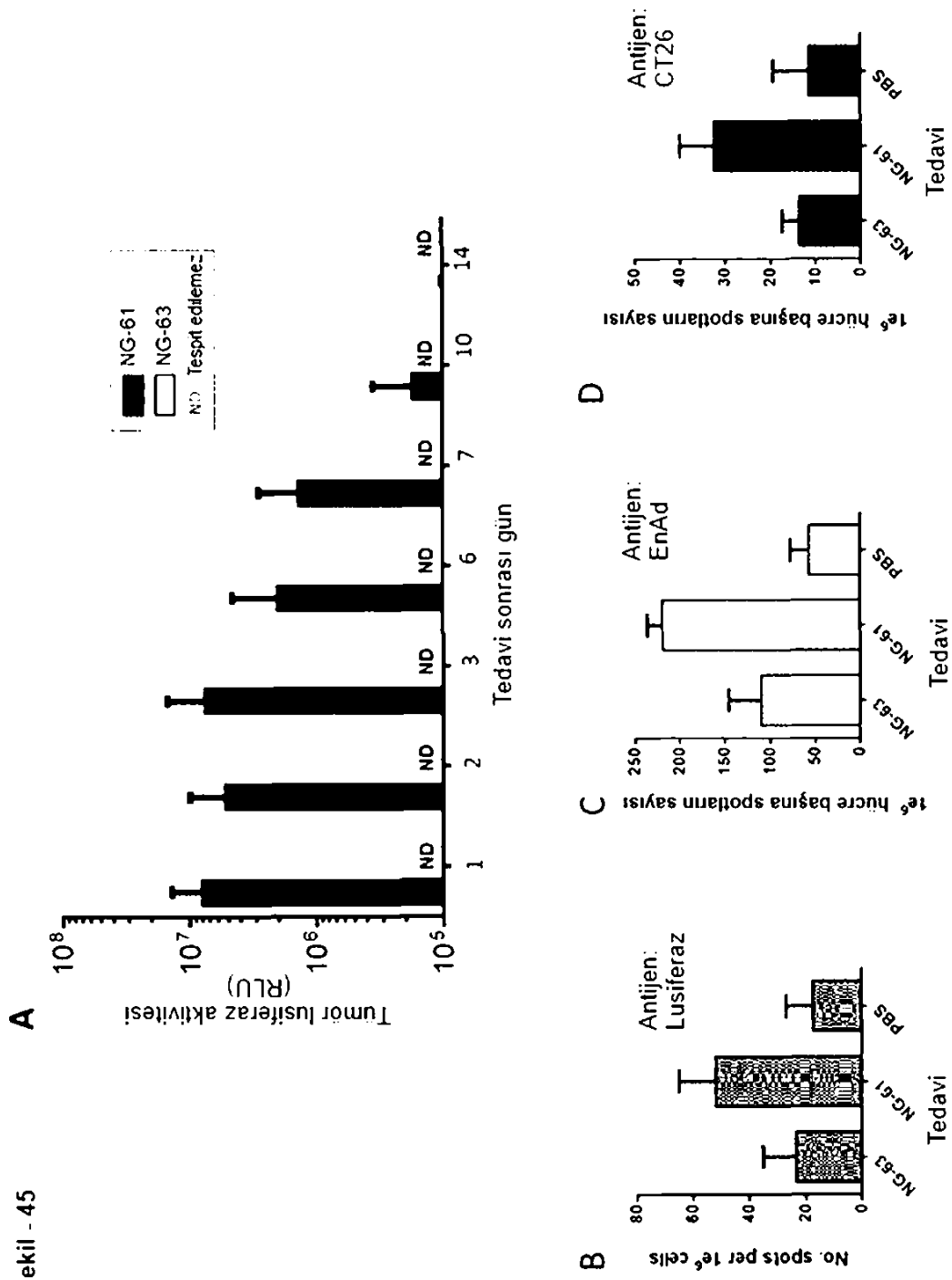
Şekil - 43



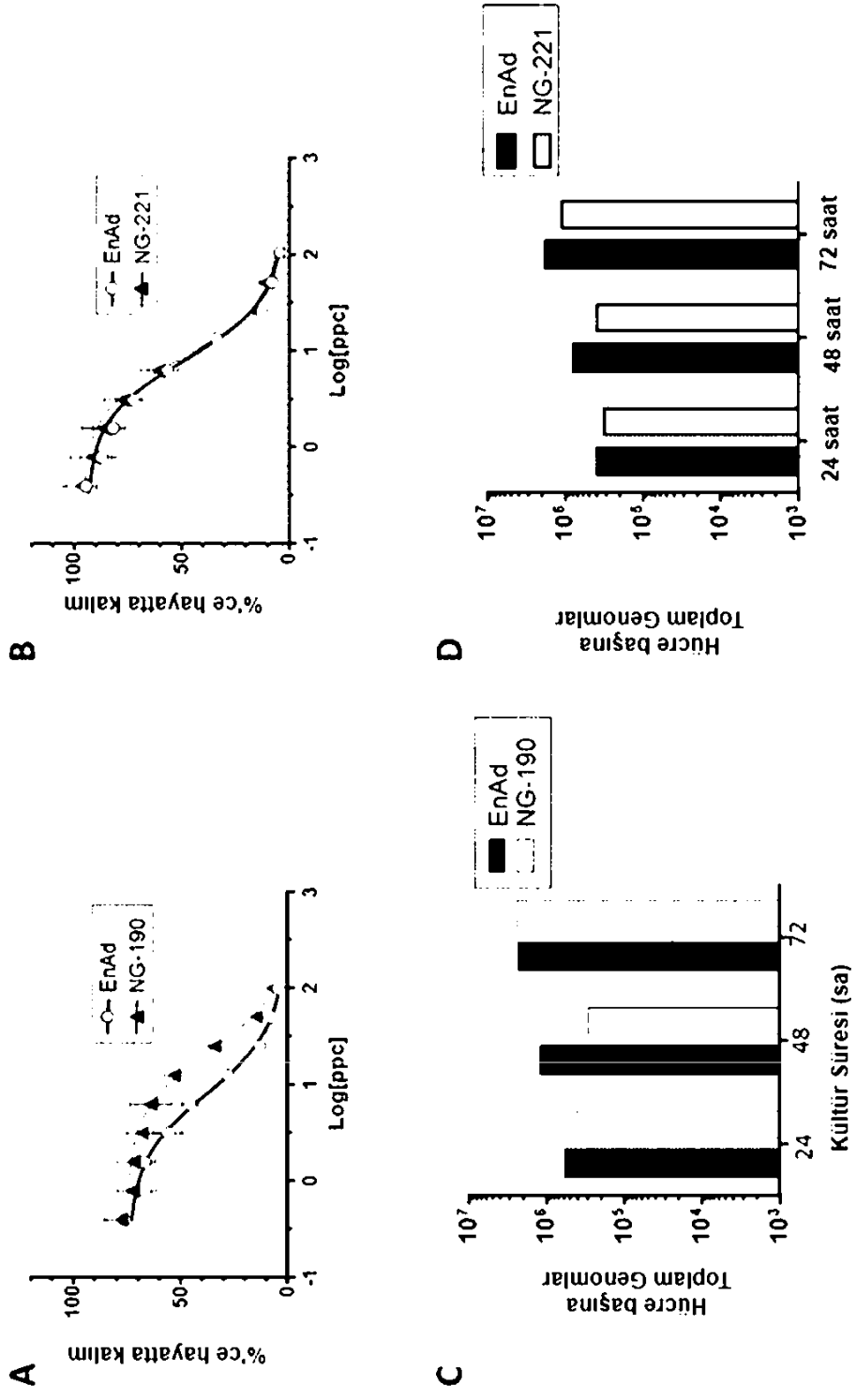
Şekil - 44



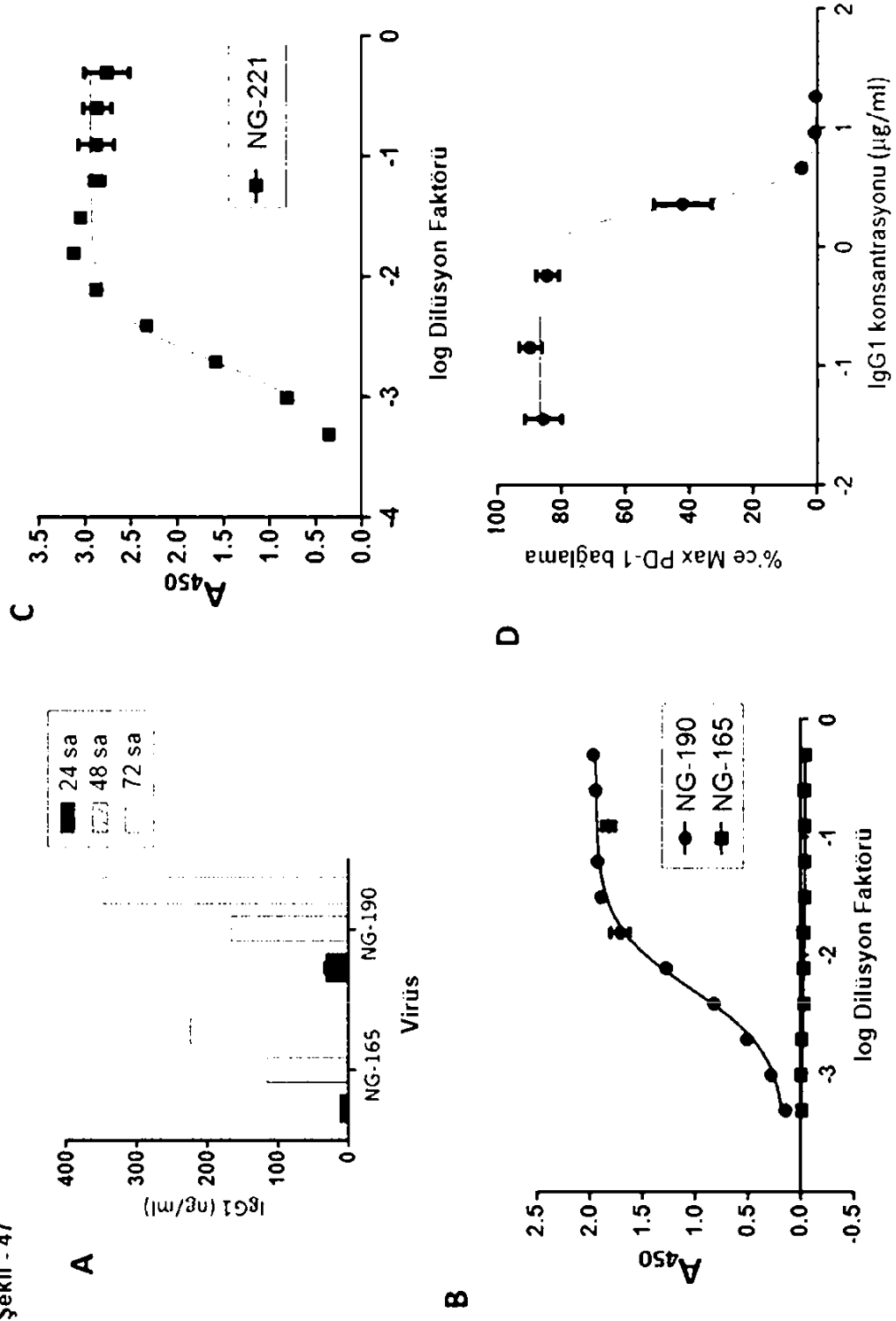
Şekil - 45



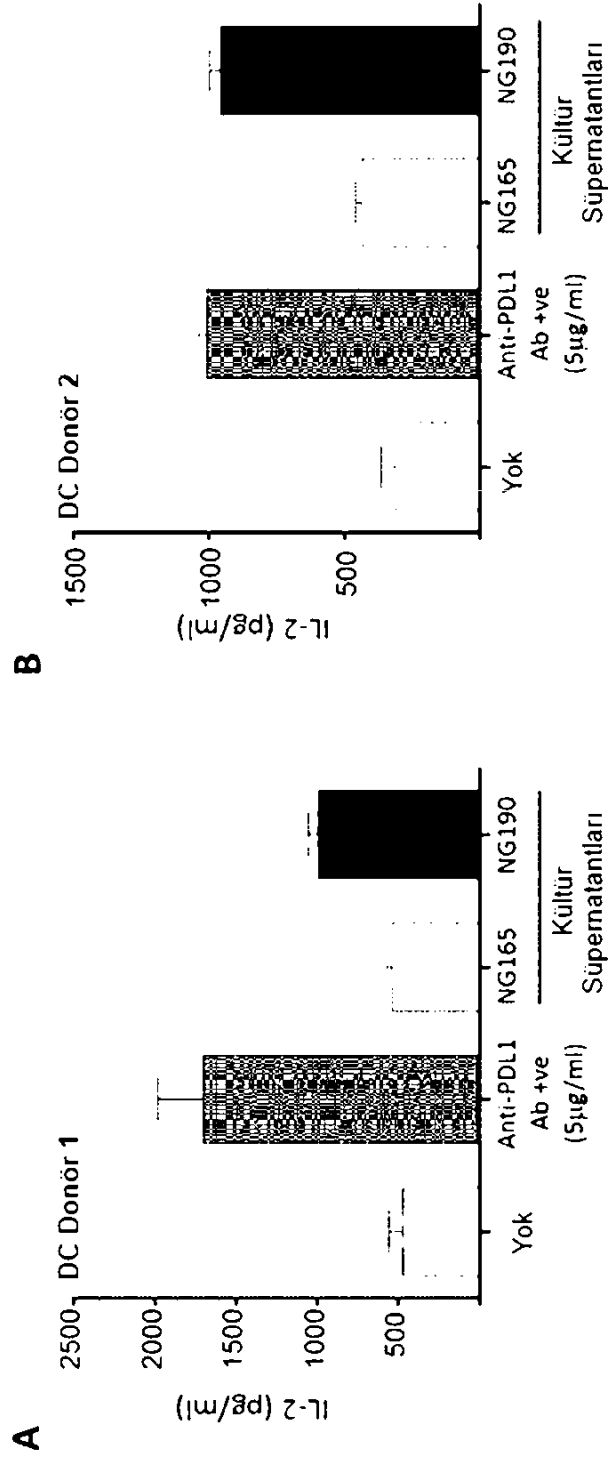
Şekil - 46



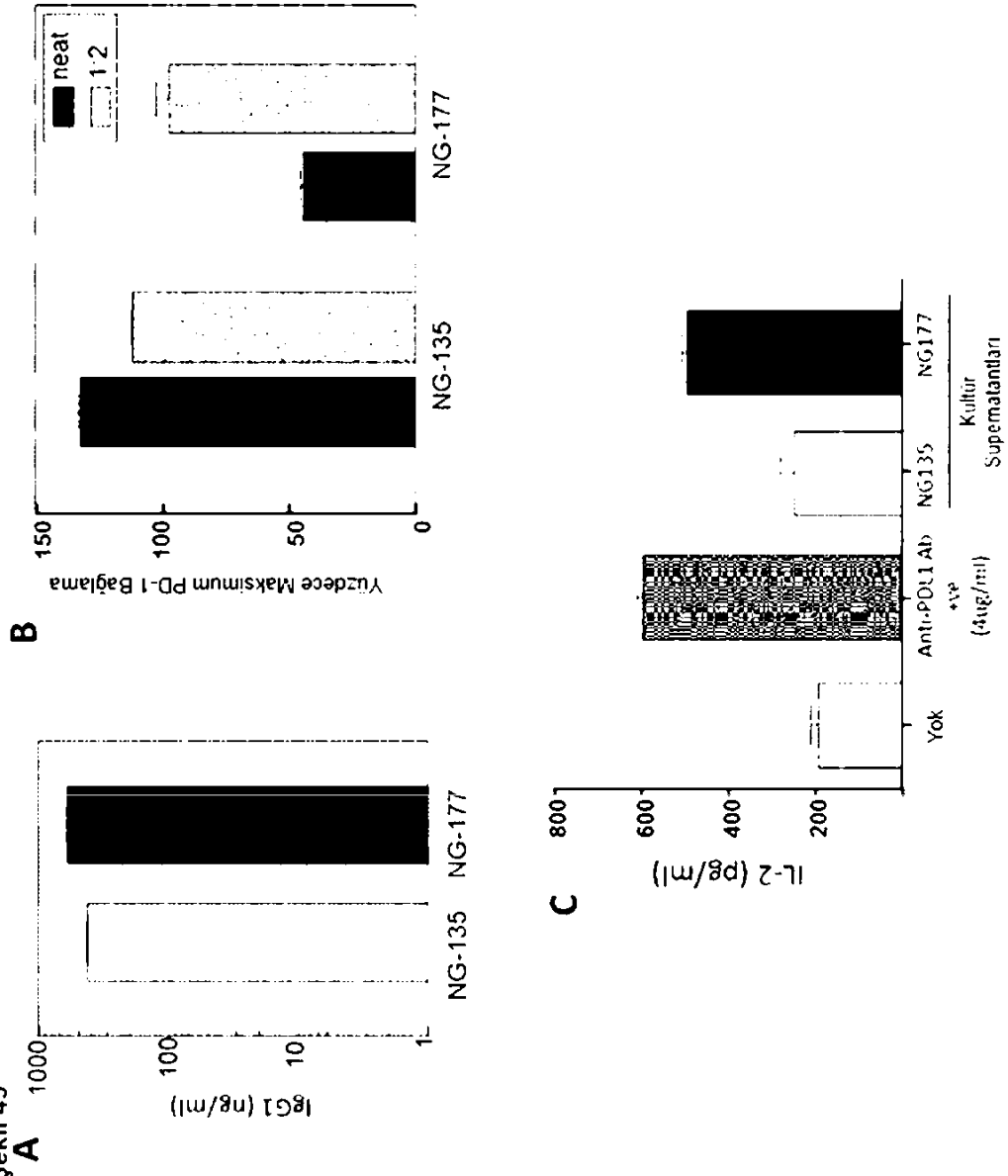
Şekil - 47



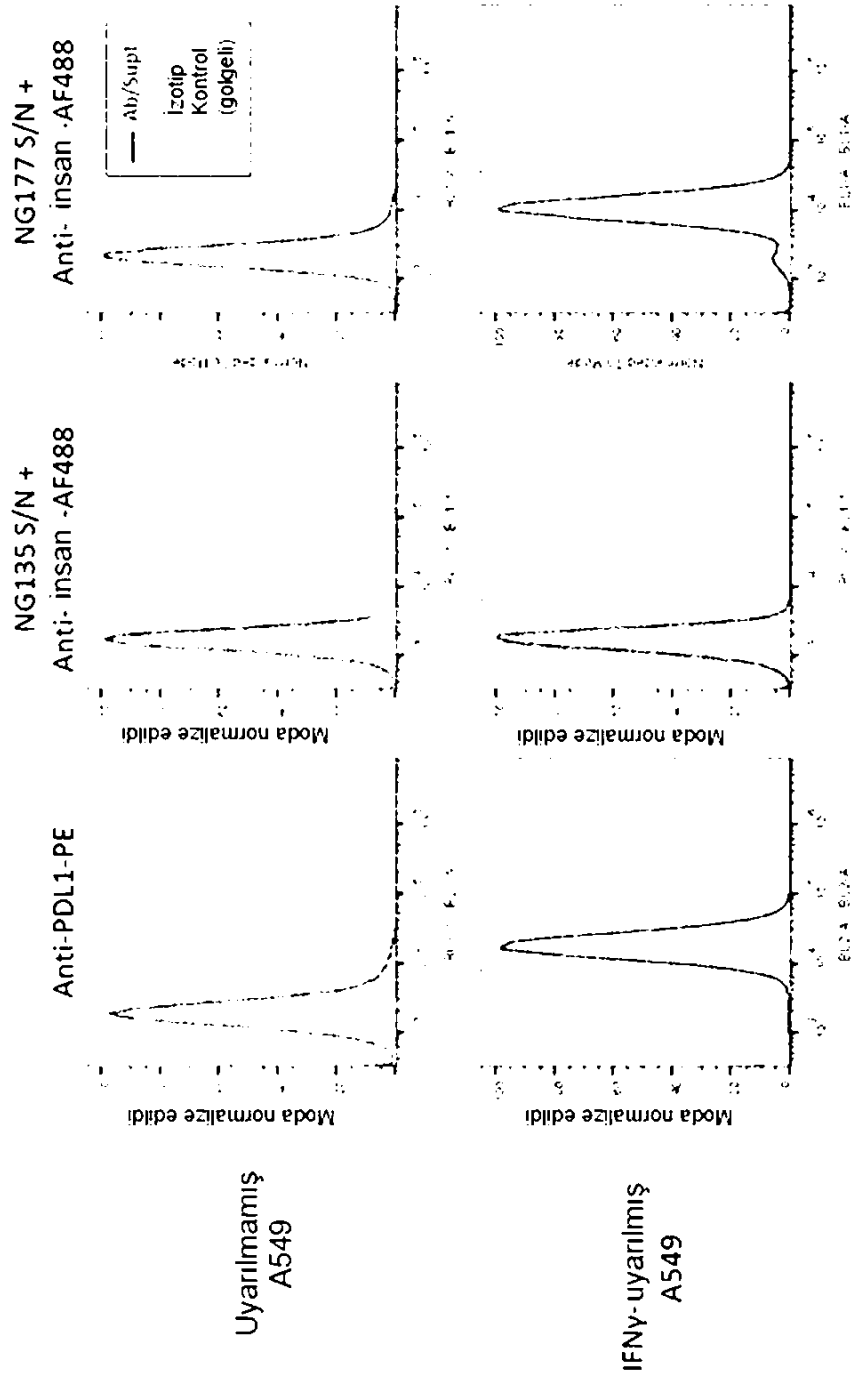
Şekil - 48



Şekil 49

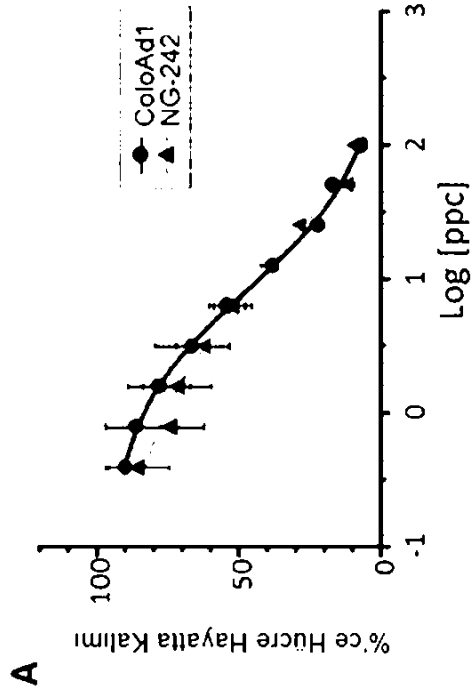
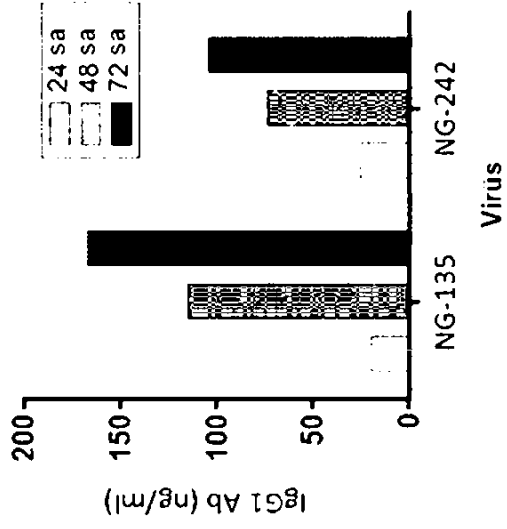
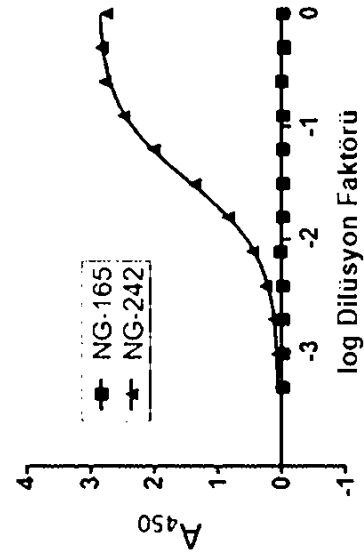
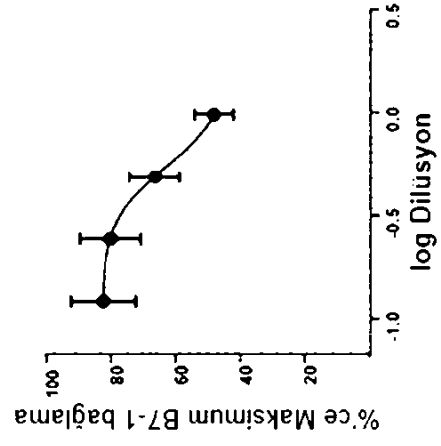


Şekil - 50

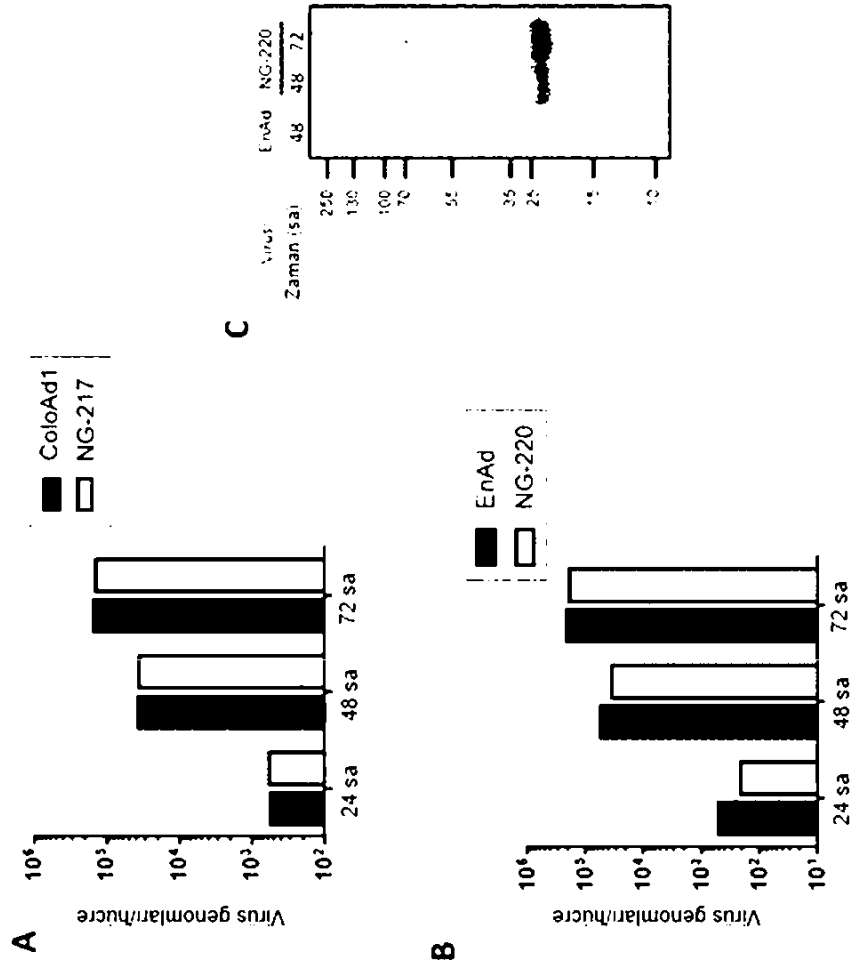


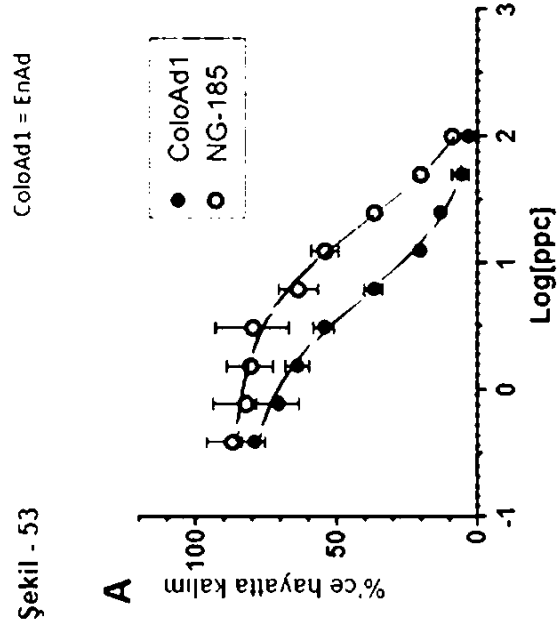
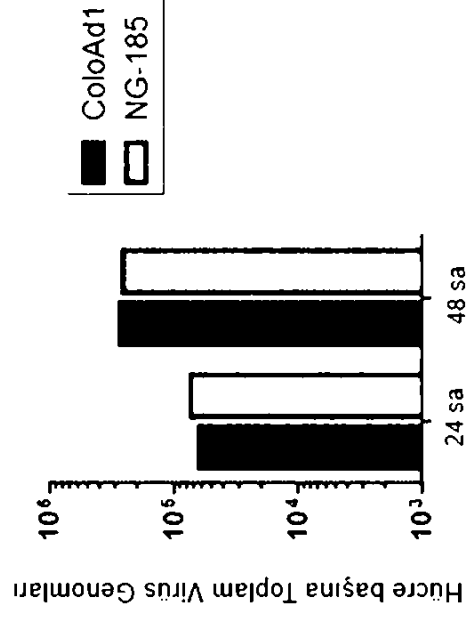
Şekil - 51

ColoAd1 = EnAd

**B****C****D**

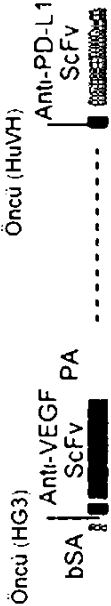
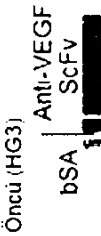
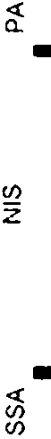
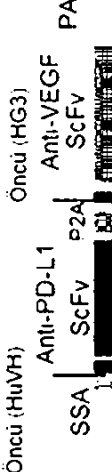
Şekil - 52





Şekil - 53

Şekil - 54

Promotör	Kaset Tasarımı	Virus ID
Egzojen		NG-Sh01 SEQ ID NO.66
Majör Geç Promotör (MLP)		NG-281 SEQ ID NO.73
		NG-257 SEQ ID NO.72
		NG-280 SEQ ID NO.68
		NG-272 SEQ ID NO.69