

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.05.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.06.2001 12.07.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/300131 2001/304843**
(33) Země priority: **US US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 4/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/015239**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/000283**

(21) Číslo dokumentu:

2003-3438

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 39/295

(71) Přihlašovatel:

THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND
BIOLOGY, Philadelphia, PA, US
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA, Philadelphia, PA, US

(72) Původce:

Ertl Hildegund C. J., Vilanova, PA, US
Wilson James M., Gladwyne, PA, US

(74) Zástupce:

Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1,
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsoby pro indukování cytotoxické imunitní
reakce a přípravky rekombinantního opičího
adenoviru použitelné v těchto způsobech**

(57) Anotace:

Řešení popisuje způsob indukování CD8+ T lymfocytární reakce na vybranou molekulu pomocí podání molekuly prostřednictvím rekombinantního opičího adenoviru. Rovněž popisuje způsoby pro indukování produkce interferonu- α a interferonu- β pomocí podání rekombinantního opičího adenoviru jedinci. Způsoby a prostředky jsou vhodné zejména pro profylaxi a léčbu infekcí virem lidské imunodeficiency a lidským papilloma virem a též pro protinádorovou terapii.

CZ 2003 - 3438 A3

Způsoby pro indukování cytotoxické imunitní reakce a přípravky rekombinantního opičího adenoviru použitelné v těchto způsobech

Oblast vynálezu

Předkládaný vynález popisuje způsob pro indukování CD8+ T reakce proti vybrané molekule tím, že se dodá molekula pomocí rekombinantního opičího adenoviru. Vynález také poskytuje způsoby pro indukování interferonu- α a interferonu- β u jedince pomocí podání rekombinantního opičího adenoviru jedinci. Způsoby a prostředky podle předkládaného vynálezu jsou vhodné pro profylaxi a léčbu infekcí virem lidské imunodeficiencie a lidským papilloma virem, a též v protinádorové terapii.

Dosavadní stav techniky

Rekombinantní adenoviry lidského serotypu 5 byly testovány jako nosiče ve vakcínách pro různé antigeny z virů, parazitů nebo nádorových buněk. Výsledky byly povzbudivé, protože rekombinantní adenoviry s deletovaným E1 vyvolávaly imunitní reakce k produktům transgenů. Adenovirus lidského serotypu 5 (Ad5) je všudypřítomným nepatogenním virem, který infikuje většinu lidí během prvního roku jejich života. Předkladatelé vynálezu zjistili, že pre-existující imunita k běžným lidským serotypům redukuje účinnost adenovirové rekombinantní vakcíny na bázi homologního serotypu viru. V některých případech může být tato redukce účinnosti překonána podáním vyšších dávek rekombinantního lidského adenoviru. Nicméně, tyto vyšší dávky mohou být asociované s dalšími nežádoucími vedlejšími účinky.

Existuje tedy potřeba prostředků použitelných pro indukci imunitní reakce na vybranou molekulu, které by neměly nedostatky spojené se současnými způsoby podání.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje způsob pro přednostní indukci cytotoxické imunitní reakce na heterologní molekulu, při kterém je molekula podána hostiteli pomocí rekombinantního opičího adenoviru. Předkladatelé vynálezu neočekávaně zjistili, že rekombinantní opičí adenoviry, použité podle předkládaného vynálezu, prezentují imunogen způsobem, který indukuje významně silnější CD8+ T-lymfocytární reakci, než když je imunogen dodán srovnatelným lidským virem typu 5. Dále předkladatelé vynálezu zjistili, že rekombinantní šimpanzí adenoviry indukují přibližně 5-krát vyšší hladiny interferonu- α a interferonu- β než lidské adenoviry.

V jednom aspektu tedy předkládaný vynález poskytuje způsob přednostního indukování CD8+ T-lymfocytární reakce na heterologní molekulu u jedince, při kterém je jedinci podán rekombinantní opičí adenovirus nesoucí molekulu. Ve výhodném provedení je rekombinantním opičím adenovirem rekombinantní šimpanzí adenovirus.

V jiném aspektu vynález poskytuje způsob indukce produkce interferonu- α a/nebo interferonu- β u jedince, při kterém je jedinci podán rekombinantní opičí adenovirus.

V ještě dalším aspektu vynález poskytuje imunogenní prostředek použitelný pro indukci CD8+ T-lymfocytární reakce proti viru lidské imunodeficiency. Prostředek obsahuje rekombinantní opičí adenovirus obsahující optimalizovanou

sekvenci nukleové kyseliny kódující modifikovaný gag protein viru lidské imunodeficiency-1 a fyziologicky kompatibilní nosič.

V ještě jiném aspektu vynález poskytuje způsob pro indukci CD8+ T-lymfocytární reakce proti viru lidské imunodeficiency u savců, při kterém je savcům podán imunogenní prostředek podle předkládaného vynálezu.

V ještě dalším aspektu vynález poskytuje způsob indukování CD8+ T-lymfocytární reakce proti lidskému papilloma viru, při kterém je savci podán rekombinantní opičí adenovirus kódující imunogenní protein z lidského papilloma viru.

Další výhody předkládaného vynálezu budou zřejmé z následujícího podrobného popisu vynálezu.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 shrnuje genetickou organizaci genomu šimpanzího adenoviru C68. Na obr. 1A je genem C68 šimpanzího adenoviru schématicky znázorněn horním rámečkem. Invertované terminální repetitivní sekvence jsou černě a časné regiony jsou šedě. Šipky nad rámečkem ukazují směr exprese časných genů. Čára pod boxem představuje rozdělení genomu na 100 mapových jednotek. Šipky dole ukazují pět pozdních genových regionů a proteinů kódovaných v každém regionu. Čísla pod rámečkem nebo šipky ukazují start (promotor nebo iniciační kodon) a konec (kanonický PolyA signál) pro každý region. * označuje E2A pozdní promotor. Obr. 1B ilustruje PstI klony; Obr. 1C ilustruje BamHI klony. Obr. 1D ilustruje HindIII klony. Pro části 1B-1D ukazují nestínované regiony, že fragment byl klonovaný do plasmidového vektoru, jak je

vedeno v tabulce 1, zatímco stínované regiony ukazují, že restriční fragment nebyl klonovaný. Pro každou část je pod rámečkem uvedeno jméno fragmentu, alfabeticky s tím, že A je největší fragment, a velikost fragmentu, a konce fragmentů jsou označeny pod rámečkem.

Obr. 2 ukazuje srovnání několika sekvencí hexonových proteinů. Odvozené aminokyselinové sekvence vysoce podobných lidských adenovirových hexonů byly srovnávány s šimpanzím adenovirem za použití CLUSTAL X. Serotypy a podskupiny jsou uvedeny na levém okraji a po nich je uvedeno číslo zbytku. Číslice označují pozici aminokyseliny vzhledem ke startu translace. Aminokyseliny jsou označené s ohledem na C86, aby byly zvýrazněny podobnosti sekvence (šedě) a identity sekvence (černě). Zespoda je označeno sedm hypervariabilních regionů se smyčkovými doménami DE1 a FG1 a tyto odpovídají následujícím Ad2 sekvencím v seřazení: HVR1, 137-188; HVR2, 194-204; HVR3, 222-229; HVR4, 258-271; HVR5, 278-294; HVR6, 316-327; a HVR7, 433-465. GenBank přírůstková číslo pro sekvence jsou následující: AAD03657 (Ad4), S37216 (Ad16), S39298 (Ad3), AAD03663 (Ad7) a NP040525 (Ad2).

Podrobný popis předkládaného vynálezu

Při srovnání imunogenity rekombinantních adenovirů lidského kmene 5 a šimpanzího adenoviru kmene 68, které oba exprimují zkrácené sekvence gag, bylo prokázáno, že šimpanzí adenovirus je účinnější. Podobné výsledky byly pozorovány pro rekombinantní šimpanzí adenoviry exprimující zelený fluorescentní protein a glykoprotein viru vztekliny. Tato vyšší účinnost rekombinantní šimpanzího adenoviru není s největší pravděpodobností vázána na vyšší expresi transgenu, protože pokusy byly provedeny jak s Ad, tak s šimpanzími rekombinanty nesoucími podobné expresní kazety,

ve kterých je transgen řízen časným cytomegalovirovým promotorem. Zde uvedená data také naznačují, že je nepravděpodobné, aby byly rozdíly v důsledku tropismu, protože jak šimpanzí, tak Ad5 virus využívá stejný buněčný receptor. Místo toho výsledky ukazují, že rekombinant šimpanzí adenovirus, použitý způsobem podle předkládaného vynálezu, má neočekávaně vyšší účinnost v adjuvanci než lidský adenovirus. Tato lepší adjuvantní účinnost má výrazný vliv na velikost a kinetiku imunitní reakce specifické pro transgen, která je indukována šimpanzím adenovirem.

Výhodné je, že tato vyšší účinnost umožňuje použití nižších dávek šimpanzího adenoviru, než jsou dávky, které by byly nutné pro lidský adenovirový transportní systém. Dále předkladatelé vynálezu zjistili, že rekombinantní šimpanzí adenoviry indukují přibližně 5-krát vyšší koncentrace interferonu- α a interferonu- β než lidské adenoviry.

Dále bylo zjištěno, že rekombinantní šimpanzí adenoviry mají přibližně stejný vliv na dendritické buňky jako lidský adenovirus typu 5. Tento vliv, stejně jako neočekávaná účinnost opičích adenovirů, poskytuje významné výhody v indukci cytotoxické imunitní reakce na vybraný antigen a v léčbě stavů, u kterých je žádoucí zvýšená indukce interferonu- α a/nebo interferonu- β .

I. Rekombinantní opičí adenovirus

A. Zdroje

Různé sekvence šimpanzího adenoviru jsou dostupné z American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, a z jiných zdrojů. Požadovanými šimpanzími kmeny jsou Pan 5 [ATCC VR-591], Pan

6 [ATCC VR-592] a Pan 7 [ATCC VR-593]. Nejvhodnějšími jsou šimpanzí adenovirové kmeny Bertha nebo C1 [ATCC přírůstkové č. VR-20] a šimpanzí adenovirus kmene Pan 9 nebo CV68 [ATCC VR-594]. Virus CV68 je pro zjednodušení označován v předkládaném vynálezu jako "C68". Viry byly původně izolovány ze stolice [C1, Rowe et al, Proc. Soc. Exp. Med., 91:260 (1956)] nebo z mesenterálních mízních uzlin [C68, Basnight et al, Am.J. Epidemiol., 94:166 (1971)] infikovaných šimpanzů. Sekvence těchto kmenů a lokalizace adenovirových genů E1a, E1b, E2a, E2b, E3, E4, L1, L2, L3, L4 a L5 jsou uvedeny v US Patentu 6,083,716, který je zde uveden jako odkaz. Volitelně mohou být non-šimpanzí opičí adenovirové sekvence použity při přípravě rekombinantních vektorů podle předkládaného vynálezu. Takové non-šimpanzí adenoviry zahrnují ty, které jsou získány z pavíáních adenovirových kmenů [např., ATCC VR275], adenovirových kmenů izolovaných od makaků rhesus [např., ATCC VR-209, ATCC VR-275, ATCC VR-353, ATCC VR-355], a adenovirových kmenů izolovaných z afrických makaků [např., ATCC VR-541; ATCC VR-941; ATCC VR-942; ATCC VR-943].

Rekombinantní šimpanzí (nebo jiné opičí) adenoviry podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat adenovirové sekvence získané z jednoho nebo více opičích adenovirových kmenů. Tyto sekvence mohou být získané z přirozených zdrojů, mohou být produkovány rekombinantně, synteticky nebo jinými chemickými metodami nebo technikami genetického inženýrství.

B. Rekombinantní opičí adenoviry

Rekombinantní opičí adenoviry použitelné v předkládaném vynálezu jsou virové částice, které se skládají z rekombinantních opičích adenovirových sekvencí nesoucích heterologní molekulu a/nebo kapsidové proteiny opičího

adenoviru. Tyto opičí adenoviry, a zejména šimpanzí C68 a C1 sekvence, jsou také vhodné pro přípravu hybridních vektorů s jinými opičími nebo neopičími adenoviry, a při přípravě pseudotypovaných rekombinantních virů, tj. rekombinantních virů s adenovirovým vektorem nesoucím heterologní molekulu, která je sbalena v heterologním kapsidovém proteinu opičího původu.

1. Rekombinantní opičí adenovirus

Minimálně rekombinantní opičí adenovirus použitelný v předkládaném vynálezu obsahuje cis-elementy opičího adenoviru nutné pro replikaci a enkapsidaci viru, kde tyto cis-elementy obklopují heterologní gen. To znamená, že vektor obsahuje cis-působící 5' invertované terminální repetitivní (ITR) sekvence adenovirů, které účinkují jako sekvence rozpoznávající počátek replikace), přirozené 5' balící domény/zesilovače transkripce (které obsahují sekvence nutné pro balení lineárních Ad genomů a zesilovací prvky pro E1 promotor), heterologní molekulu, a 5' ITR sekvenci. Viz, například, techniky pro přípravu "minimálního" lidského Ad vektoru v US Patentu 6,203,975, který je zde uveden jako odkaz, a které mohou být snadno upraveny pro rekombinantní opičí adenovirus.

Volitelně rekombinantní opičí adenoviry použitelné v předkládaném vynálezu obsahují více než minimální opičí adenovirovou sekvenci definovanou výše. Tyto další Ad vektory mohou být charakterizovány jako vektory mající modifikace, které destruuují schopnost adenoviru exprimovat jeden nebo více vybraných genových produktů. Výraz "funkční delece" je zde použit pro popsání takových modifikací. Takové "funkční delece" mají typicky formu delece celého genu nebo části genu viru. Nicméně, takové funkční delece

mohou mít také formu mutace spočívající v posunu čtecího rámce. Odborníkům v oboru budou jasné i další modifikace, které mohou být použity pro dosažení funkčních delecí.

V konkrétním požadovaném provedení jsou opičí adenoviry defektní v replikaci v důsledku absence schopnosti exprimovat adenovirové E1a a E1b, tj. tyto viry jsou funkčně deletované v E1a a E1b. Tyto rekombinantní opičí adenoviry mohou také nést funkční delece v jiných genech.

Například může být adenovirový opožděný časný gen E3 eliminován ze sekvence opičího adenoviru, která tvoří část rekombinantního viru. Funkce E3 není nutná pro produkci rekombinantních adenovirových částic. Tak není nutné nahrazovat funkci tohoto genového produktu pro sbalení rekombinantního opičího adenoviru použitelného v předkládaném vynálezu.

Rekombinantní opičí adenoviry mohou být také konstruovány tak, že mají funkční delece v E4 genu, ačkoliv může být žádoucí zachovat funkci E4 ORF6. Ještě jiný vektor použitelný v předkládaném vynálezu obsahuje deleci v opožděném časném genu E2a. Delece může být také provedena v jakémkoliv z pozdních genů L1 až L5 genomu opičího adenoviru. Delece ve vmezeřených genech IX a IVa₂ mohou být také užitečné pro některé účely. Jiné delece mohou být provedeny v dalších strukturálních i nestrukturálních genech. Výše uvedené delece mohou být použity samostatně, tj. adenovirové sekvence podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat delece pouze v E1. Alternativně mohou být delece v celých genech nebo v jejich částech, účinné pro destrukci jejich biologické aktivity, použity v jakékoliv kombinaci. Například, v jednom příkladném vektoru mohou mít adenovirové sekvence delece v E1 genu a v E4 genu, nebo v E1, E2a a E3

genech, nebo v E1 a E3 genech, nebo v E1, E2a a E4 genech, s nebo bez delece E3, a tak dále. Takové delece mohou být použity v kombinaci s dalšími mutacemi, jako jsou teplotně-senzitivní mutace, pro dosažení požadovaného výsledku.

Transgen může být insertován do jakéhokoliv deletovaného regionu opičího adenoviru. Alternativně může být transgen insertován do existujícího genového regionu za účelem narušení funkce tohoto regionu, pokud je to žádoucí.

Bez ohledu na to, zda rekombinantní opičí adenovirus obsahuje pouze minimální Ad sekvenci nebo celý Ad genom pouze s funkčními delecemi v E1 a/nebo E3 regionech, obsahuje rekombinantní virus opičí adenovirovou kapsidu. Alternativně mohou být ve způsobech podle předkládaného vynálezu použity rekombinantní pseudotypované adenoviry. Takové pseudotypované adenoviry využívají kapsidové proteiny opičího adenoviru, ve kterých je sbalena molekula nukleové kyseliny nesoucí heterologní sekvence opičího adenoviru, nebo sekvence z jiného než opičího adenoviru. Tyto rekombinantní opičí adenoviry podle předkládaného vynálezu mohou být produkovány způsoby, které jsou známe odborníkům v oboru.

C. Produkce rekombinantních virových částic

Způsoby pro produkci rekombinantních opičích adenovirů využívají techniky, které jsou dobře známe odborníkům v oboru, např. techniky popsané v US Patentu 6,083,716. Při konstrukci rekombinantních opičích adenovirů pro transport heterologní molekuly do jedince (např. člověka, psa, kočky nebo jiného savce) může být sekvence adenovirové nukleové kyseliny použitá ve vektorech získána z různých opičích zdrojů.

Vektor obsahující sekvenční opiciho (např., šimpanziho) adenoviru, kterým chybí opici adenovirové sekvenční nutné pro produkci infekčních rekombinantních virových částic, mohou být použity společně s pomocným virem nebo vektorem. Pomocný virus poskytuje základní genové produkty nutné pro infektivitu a propagaci opiciho adenoviru. Když je jedna nebo více delecí provedena v genech opiciho adenoviru v jinak funkčním virovém vektoru, tak mohou být deletované genové produkty doplněny v procesu produkce virového vektoru propagací vektoru ve vybraných balících buňkách.

Tyto funkce mohou být poskytnuty v permanentně transformované buněčné linii, která poskytuje jednu nebo všechny funkce adenoviru, které jsou nutné pro balení, například jakoukoliv z E1a, E1b, E2a, E4 ORF6, VA RNA, které chybí ve vektoru. Pokud je to nutné nebo vhodné, mohou být balící buňkou poskytnuty další adenovirové funkce, pomocí transfekce nebo infekce konstruktem obsahujícím tyto funkce. Volitelně může být adenovirová funkce vybrána tak, aby umožňovala balení virového vektoru nesoucího minigen do heterologního opiciho adenovirového kapsidového proteinu. Vhodné metody pro "pseudotypování" za použití opiciho (např., C68) kapsidového proteinu budou jasné na základě skutečností známých v oboru týkajících se pseudotypování lidského adenoviru. Viz, např., US Patent 6,203,975.

Sestavení vybraných DNA sekvencí adenoviru a transgenu a dalších vektorových elementů do různých plasmidů a přenosových vektorů, a použití plasmidů a vektorů pro produkci rekombinantních virových částic, se provede za použití běžných technik. Mezi takové techniky patří běžné techniky klonování cDNA, které jsou popsány v učebnicích [Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd

Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)], použití překrývajících se oligonukleotidových sekvencí adenovirových genomů, polymerasové řetězové reakce, jakékoliv techniky, které vedou k zisku požadované nukleotidové sekvence. Použijí se standardní techniky transfekce a ko-transfekce, např. CaPO_4 srážení. Mezi další běžně používané techniky patří homologní rekombinace virových genomů, plakování virů v agarové krycí vrstvě, způsoby měření generování signálu a podobně.

Například, po konstrukci a sestavení požadovaného člunkového vektoru obsahujícího transgen se člunkový vektor transfektuje in vitro do hostitelské buňky pro balení. Hostitelská buňka má nebo jí je dodána jakákoliv chybějící adenovirová funkce. Homologní rekombinace probíhá mezi pomocnou a vektorovou sekvencí, což umožňuje replikování sekvence adenovirus-transgen ve vektoru a její sbalení do virionových kapsid, což vede ke vzniku rekombinantních adenovirových částic.

Předkladatelé vynálezu zjistili, že E1 proteiny lidského adenoviru transkomplementují E1-defektní opičí adenovirus a tím umožňují jeho balení do opičích adenovirových částic. Nicméně, vzhledem k nízkému stupni homologie mezi lidským Ad E1 a sekvencí obklopující deletovanou opičí Ad E1 sekvencí, existuje minimální riziko, že bude opičí Ad E1 homologně rekombinovat za produkce replikace-kompetentního opičího adenoviru.

Rekombinantní opičí adenovirové částice produkované tímto způsobem mohou být izolovány a přečištěny za použití jakékoliv metody známé v oboru.

II. Heterologní molekuly pro transport do hostitele

A. Imunogeny

Heterologní molekula nesená na opičím adenoviru pro transport do hostitelské buňky může být jakákoliv substance, včetně například polypeptidu, proteinu, enzymu, karbohydrátu, chemické skupiny nebo molekuly nukleové kyseliny, kterou může být oligonukleotid, RNA, DNA a/nebo RNA/DNA hybrid. V jednom výhodném provedení je molekulou nesenou na opičím adenoviru transgen. Transgen a molekula nukleové kyseliny obsahují sekvenci nukleové kyseliny, heterologní k adenovirové sekvenci, která kóduje protein, peptid, polypeptid, enzym nebo jiný požadovaný produkt a regulační sekvenci řídící transkripci a/nebo translaci kódovaného produktu v hostitelské buňce, a která umožňuje expresi kódovaného produktu v hostitelské buňce nebo jedinci. Složení transgenu závisí na požadovaném použití opičího adenoviru.

Například, jeden typ transgenu obsahuje reporterovou nebo markerovou sekvenci, která po expresi produkuje detekovatelný signál. Nicméně, nejdůležitější jsou genové produkty a jiné molekuly, proti kterým je indukována protilátková nebo - ještě lépe - buněčná imunitní reakce.

Tyto imunogenní genové produkty a molekuly mohou být z různých patogenních organismů, včetně virů, bakterií, hub nebo parazitů, které infikují člověka a jiné obratlovce, nebo mohou být z nádorových buněk. Imunogen může obsahovat peptidy nebo polypeptidy odvozené z proteinů. V některých případech obsahuje prostředek více než jeden imunogen. Požadované imunogenní prostředky obsahující tyto genové produkty a jiné molekuly zahrnují ty, které jsou určeny pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění způsobených viry, jako je

virus lidské imunodeficiencie, virus opičí imunodeficiencie, respiračně syncytiální virus, virus parainfluenzy typu 1-3, chřipkový virus (např., viry chřipky A a B), Herpes simplex virus, lidský cytomegalovirus, viry hepatitidy (včetně viru hepatitidy A, hepatitidy B a viru hepatitidy C), lidský papillomavirus, poliovirus, rotaviry, caliciviruses, virus spalniček, planých neštovic, zarděnek, adenovirus, virus vztekliny, virus psinky, virus dobytčího moru, coronavirus, parvovirus, viry infekční rhinotracheitidy, virus kočičí leukemie, virus kočičí infekční peritonitidy, virus ptačí infekční bursitidy, Newcastle virus, virus Marekovi nemoci, virus prasečího respiračního a reprodukčního syndromu, virus koňské arteritidy a různé encephalitické viry.

Další imunogeny jsou určeny pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění způsobených například bakteriemi, jako je *Haemophilus influenzae* (typovatelný a netypovatelný), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* a *Mycoplasma gallisepticum*.

Další imunogeny jsou určeny pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění způsobených například houbami, jako je

Aspergillus, Blastomyces, Candida, Coccidioides, Cryptococcus a Histoplasma.

Další imunogeny jsou určeny pro prevenci a/nebo léčbu onemocnění způsobených například parazity, jako je Leishmania major, Ascaris, Trichuris, Giardia, Schistosoma, Cryptosporidium, Trichomonas, Toxoplasma gondii a Pneumocystis carinii.

Mezi další výhodné imunogeny patří imunogeny určené pro vyvolání terapeutického nebo profylaktického protinádorového účinku u obratlovců, a mezi takové patří nádorové antigeny nebo antigeny asociované s nádory, jako je například prostatický specifický antigen, karcinoembryonální antigen, MUC-1, Her2, CA-125 a MAGE-3.

Příklady uvedené dále specificky ilustrují výhody způsobů a prostředků podle předkládaného vynálezu využívajících rekombinantní opičí adenovirový vektor, ze kterého je exprimován imunogenní peptid vztekliny (glykoprotein G nebo modifikovaný gag protein viru lidské imunodeficiency-1. Jiné výhodné provedení využívá opičí adenovirus nesoucí imunogenní peptid z lidského papilloma viru. Nicméně, vynález není omezen na tyto imunogeny.

B. Regulační prvky

Transgen nebo jiná sekvence nukleové kyseliny, která vyžaduje transkripci, translaci a/nebo expresi pro získání požadovaného genového produktu v buňkách a hostitelích, může obsahovat vhodné sekvence, které jsou operabilně navázané na kódující sekvenci pro navození exprese kódovaného produktu. Termín "operativně navázaná" sekvence označuje jak sekvence řídící expresi, které navazují na požadovanou sekvenci

nukleové kyseliny, tak sekvence řídící expresi, které působí v trans nebo v určité vzdálenosti od dané sekvence nukleové kyseliny.

Mezi sekvence řídící expresi patří vhodné transkripční iniciační, terminační, promotorové a zesilovací sekvence; účinné signály pro zpracování mRNA, jako jsou sestřihové a polyadenylační signály; sekvence, které stabilizují cytoplasmatickou mRNA; sekvence, které zesilují účinnost translace (tj. Kozakovi konvenční sekvence); sekvence, které zvyšují stabilitu proteinu; a pokud je to žádoucí, tak sekvence, které zvyšují sekreci proteinu. V oboru je známo mnoho sekvencí řídících expresi - přirozených, konvenčních, indukovatelných a/nebo tkáňově specifických - a tyto sekvence mohou být použity pro řízení exprese genu, v závislosti na požadovaném typu exprese. Pro eukaryotické buňky obsahují sekvence řídící expresi typicky promotor, zesilovač transkripce, například z imunoglobulinového genu, SV40, cytomegaloviru, atd, a polyadenylační sekvence, které mohou obsahovat sestřihová donorová a akceptorová místa. Polyadenylační (polyA) sekvence je obvykle insertována po sekvenci transgenu a před 3' adenovirovou ITR sekvencí. V jednom provedení je vybrána polyA hovězího růstového hormonu. Opičí adenovirus podle předkládaného vynálezu může také obsahovat intron, výhodně umístěný mezi sekvencí promotoru/zesilovače transkripce a transgenem. Jednou možnou intronovou sekvencí je sekvence z SV-40, a je zde označována jako SV-40 T intronová sekvence. Jiný element, který může být také použit ve vektoru, je interní místo pro vstup ribosomu (IRES). IRES sekvence je použita pro produkci více než jednoho polypeptidu z jediného genového transkriptu. IRES sekvence může být použita pro produkci proteinu, který obsahuje více než jeden polypeptidový řetězec. Výběr těchto a dalších běžných vektorových elementů je snadný a je

k dispozici mnoho takových sekvencí (viz, např., Sambrook et al, a odkazy zde citované, například na stranách 3.18-3.26 a 16.17-16.27; a Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1989).

V jednom provedení může být žádoucí vysoká úroveň konstitutivní exprese. Příklady takových konstitutivních promotorů jsou, například, LTR promotor (volitelně s RSV zesilovačem transkripce) viru Rousova sarkomu, cytomegalovirový (CMV) promotor (volitelně s CMV zesilovačem transkripce) (viz, např., Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)), SV40 promotor, dihydrofolat-reduktasový promotor, β -aktinový promotor, fosfoglycerol-kinasový (PGK) promotor, a EF1 α promotor (Invitrogen). Indukovatelné promotory, regulované exogenně dodanými sloučeninami, jsou také použitelné a zahrnují zinkem-indukovatelný ovčí metallothioninový (MY) promotor, dexamethasonem (Dex)-indukovatelný promotor viru myších mamárních nádorů (MMTV), T7 polymerasový promotorový systém (WO 98/10088); promotor pro svlékání hmyzu (No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351(1996)), tetracyklinem-reprimovatelný systém (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992)), tetracyklinem-indukovatelný systém (Gossen et al, Science, 268:1766-1769 (1995), viz též Uarvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), RU486-indukovatelný systém (Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) a Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)) a rapamycinem indukovatelný systém (Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Dalším typem indukovatelných promotorů, které mohou být použity v tomto kontextu, jsou ty, které jsou regulované specifickým fyziologickým stavem, jako je například teplota, akutní fáze, konkrétní diferenciační stadium buňky nebo replikace buňky.

V jiném provedení se použije přirozený promotor pro transgen. Přirozený promotor může být výhodný tehdy, když má požadovaná exprese transgenu napodobovat přirozenou expresi. Přirozený promotor může být použit tehdy, když musí být exprese transgenu regulována okamžitě nebo vývojově, nebo ve specifické tkáni, nebo v reakci na specifické transkripční stimuly. V jiném provedení mohou být pro napodobení přirozené exprese použity jiné přirozené elementy řídící expresi, jako jsou zesilovače transkripce, polyadenylační místa nebo Kozakovi konvenční sekvence.

Jiným provedením transgenu je transgen operativně navázaný na tkáňově-specifický promotor. Například, pokud je žádoucí exprese v kosterním svalu, může být použit promotor aktivní ve svalech. Sem patří promotory z genů kodujících skeletový α -aktin, myosinový lehký řetězec 2A, dystrofin, svalovou kreatinin kinasu, stejně jako syntetické svalové promotory s aktivitami vyššími než mají přirozené promotory (viz Li et al, Nat. Biotech., 17:241-245 (1999)). Příklady promotorů, které jsou tkáňově specifické, jsou známy pro játra (albumin, Miyatake et al. J. Virol., 71:5124-32 (1997); promotor jádra viru hepatitidy B, Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996); α -fetoprotein (AFP), Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), kostní osteokalcin (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); kostní sialoprotein (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), lymfocyty (CD2, Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998); imunoglobulinový těžký řetězec; T-lymfocytární receptor a řetězec), neuronální produkty, jako je promotor neuron-specifické enolasy (NSE) (Andersen et al. Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), gen pro lehký řetězec neurofilament (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), a gen pro neuron-

specifický vgf (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)), a další.

Je jasné, že ne všechny sekvence řídící expresi účinkují stejně dobře v expresi všech transgenů podle předkládaného vynálezu. Nicméně, odborník v oboru může provést výběr mezi takovými sekvencemi řídícími expresi bez toho, že by se odchýlil od rozsahu předkládaného vynálezu. Vhodné promotorové sekvence/zesilovače transkripce mohou být vybrány odborníkem v oboru podle návodu uvedeného v předkládaném vynálezu. Takový výběr je rutinní záležitostí a není omezen na určité molekuly nebo konstrukty. Například je možné vybrat jednu nebo více sekvencí řídících expresi, které mohou být operativně navázané na požadovanou kódující sekvenci, a tyto sekvence mohou být insertovány do transgenu, minigenu a přenosového viru podle předkládaného vynálezu. Za použití jedné z metod pro balení opičího adenoviru uvedených v předkládaném vynálezu, nebo jak jsou známe v oboru, je možné infikovat vhodné buňky in vitro nebo in vivo. Počet kopií minigenu v buňce může být sledován Southernovou hybridizací nebo kvantitativní PCR. Úroveň exprese RNA může být sledována Northernovou hybridizací nebo kvantitativní RT-PCR. Úroveň exprese může být sledována Westernovou hybridizací, imunohistochemicky, ELISA, RIA, nebo testováním biologické aktivity genových produktů. Tak je možné snadno testovat to, zda je konkrétní sekvence řídící expresi vhodná pro specifický produkt kódovaný transgenem, a podle toho vybrat vhodnou sekvenci řídící expresi. Alternativně, když přenášená molekula nevyžaduje expresi, například se jedná o karbohydrát, polypeptid, peptid, atd., tak sekvence řídící expresi nemusí tvořit součást rekombinantního opičího adenoviru nebo jiné molekuly.

III. Příprava viru pro podání

Rekombinantní opičí adenoviry, výhodně suspendované ve fyziologicky kompatibilním nosiči, mohou být podány člověku nebo jinému subjektu. Vhodné nosiče může vybrat odborník v oboru podle indikace, pro kterou je přenosový virus určen. Například je jedním vhodným nosičem salinický roztok, který může být formulován s různými pufrovacími roztoky (např. fosfátem pufrovaný salinický roztok). Dalšími nosiči jsou sterilní salinický roztok, laktosa, sacharosa, fosforečnan vápenatý, želatina, dextran, agar, pektin, podzemnicový olej, sezamový olej a voda. Výběr nosiče nijak neomezuje předkládaný vynález.

Volitelně mohou prostředky podle předkládaného vynálezu obsahovat kromě rekombinantního opičího adenoviru a nosiče další běžné farmaceutické přísady, jako jsou konzervační činidla, chemické stabilizátory, nebo - pro vakcíny - adjuvans. Mezi vhodná konzervační činidla patří chlorobutanol, kalium-sorbát, kyselina sorbová, oxid siřičitý, propylgallát, parabeny, ethyl-vanillin, glycerin, fenol a parachlorofenol. Mezi vhodná chemická stabilizační činidla patří želatina a albumin. Mezi vhodná adjuvans patří, mimo jiné, imunostimulační komplexy (ISCOMS), LPS analogy, včetně 3-O-deacylovaného monofosforyl lipidu A (Ribí Immunochem Research, Inc.; Hamilton, MY), minerální olej a voda, hydroxid hlinitý, Amphigen, Avirdine, L121/skvalen, muramyl-peptidy a saponiny, jako je Quil A.

IV. Podání rekombinantních virů pro léčbu a/nebo profylaxi

Rekombinantní, replikace defektní adenoviry, jsou podány ve "farmaceuticky účinném množství", což znamená, že je podáno takové množství rekombinantního adenoviru, které je

při daném způsobu podání účinné v transfekci požadovaných buněk a vede k dostatečné úrovni exprese daného genu, která indukuje terapeutickou nebo vakcinační imunitní reakci, např., vede k dosažení měřitelné hladiny protektivní imunity.

Mezi běžné a farmaceuticky přijatelné způsoby podání patří například intranasální, intramuskulární, intratracheální, podkožní, intradermální, rektální, orální a jiné slizniční a parenterální způsoby podání. Termín slizniční podání označuje podání přes sliznice, například inhalačně, orálně, intranasálně, vaginálně nebo rektálně. Způsoby podání mohou být kombinovány, pokud je to potřebné, nebo mohou být upraveny podle imunogenu nebo onemocnění. Například při profylaxi vztekliny je výhodné podkožní, intratracheální, intranasální a orální způsob podání. Způsob podání primárně závisí na vlastnostech léčeného onemocnění.

Dávky nebo účinná množství rekombinantního replikace-defektního Ad viru závisí primárně na faktorech, jako jsou podmínky, vybraný gen, věk, hmotnost a zdravotní stav živočicha, a mohou být proto pro různé živočichy různé.

Dávky virového vektoru závisí primárně na faktorech, jako jsou typ léčeného onemocnění, vybraný gen, věk, hmotnost a zdravotní stav léčeného pacienta, a mohou být proto pro různé jedince (včetně člověka) různé. Neočekávaná účinnost rekombinantního opičího (např., šimpanzího) adenoviru podle předkládaného vynálezu umožňuje použití významně nižších dávek rekombinantního šimpanzího adenoviru pro dosažení dávky dostatečné pro indukci požadovaného imunogenního účinku (např. indukci předem určené hladiny CD8⁺ T-lymfocytů). Účinnou dávkou rekombinantního opičího adenoviru může být například dávky 10^4 pfu a 10^6 pfu

šimpanzího adenoviru. Nicméně, mohou být použity i vyšší dávky, například v závislosti na způsobu podání. Virový vektor může být podán v dávce, například, od přibližně 100 μ l do přibližně 100 ml, lépe od přibližně 1 ml do přibližně 10 ml, nosného roztoku, který obsahuje koncentrace v rozmezí od přibližně 1×10^4 jednotek vytvářejících plaky (pfu) od přibližně 1×10^{13} pfu viru/ml, a přibližně 1×10^9 až přibližně 1×10^{11} pfu/ml viru, pro dospělého o hmotnosti 80 kg. Výhodná dávka je přibližně 50 ml salinického roztoku s koncentrací 2×10^{10} pfu/ml. Výhodná dávka je přibližně 1 až 10 ml nosiče (například salinického roztoku) s výše uvedenou koncentrací. Terapeutické koncentrace, nebo hladiny imunity, vybraného genu mohou být sledovány, aby se určila potřeba dosycovacích imunizací. Podle stavu CD8+ T-lymfocytární reakce, nebo případně titrů protilátek, mohou být žádoucí další imunizace. Volitelně mohou být rekombinantní opičí adenoviry podávány za použití režimu primární-dosycovací imunizace. V oboru byly popsány různé takové režimy a ty mohou být použity. Jedna vhodná metoda je popsána ve WO 00/11140, publikované 2.3.2000, která je zde uvedena jako odkaz.

V jednom výhodném provedení předkládaný vynález poskytuje způsob pro přednostní indukování CD8+ T-lymfocytární reakce na virus lidské imunodeficiency u jedince pomocí podání rekombinantního opičího adenoviru obsahujícího modifikovaný gag protein. Modifikovaný gag protein ilustrovaný v následujících příkladech byl optimalizovaný, například způsobem popsaným v US Patentu 5,972,596. Kódující a proteinová sekvence jsou uvedeny v SEQ ID NO:6 a SEQ ID NO:7. Viz též G. Meyers et al., Eds., Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 1991). Nicméně, v oboru jsou známy různé metody pro

zlepšení exprese gag proteinu nebo jakéhokoliv jiného imunogenu nebo antigenu a tyto mohou být použity, příkladem je humanizace HIV-1 gag kodonové sekvence, odstranění HIV-1 gag sestřihového místa, inserce další vedoucí sekvence před gag sekvenci HIV-1, inserce Kozakovi sekvence před gag sekvenci HIV-1. Volba metody pro optimalizaci není nijakým omezením předkládaného vynálezu. Alternativně může být způsob podle předkládaného vynálezu použit pro podání rekombinantního opičího adenoviru nesoucího HIV obalový protein nebo HIV pol. Jedním vhodným HIV obalovým proteinem je HIV glykoprotein 120, jehož sekvence jsou dostupné z GenBank. Nicméně, mohou být použity i jiné vhodné virové obalové proteiny. Sekvence pro HIV-1 pol je známá, stejně jako různé modifikované pol sekvence. Viz, například, US Patent 5,972,596 a R. Scheider et al, J. Virol, 71(7):4892-4903 (July 1997).

V jiném výhodném provedení předkládaný vynález poskytuje způsob pro přednostní indukování CD8+ T-lymfocytární reakce na proteiny asociované s nádory specifické pro určitou malignitu pomocí podání rekombinantního opičího adenoviru obsahujícího protein asociovaný s nádory jedinci. Mezi takové proteiny patří buněčné onkogeny, jako je mutovaný ras nebo p53.

V jiném výhodném provedení předkládaný vynález poskytuje způsob pro přednostní indukování CD8+ T-lymfocytární reakce na proteiny asociované s nádory specifické pro určitou malignitu pomocí podání rekombinantního opičího adenoviru obsahujícího protein asociovaný s nádory jedinci.

Ještě další výhodné provedení zahrnuje podání rekombinantního opičího adenoviru obsahujícího protein odvozený z lidského papilloma viru za účelem prevence a

léčby a profylaxe onemocnění způsobených tímto virem. Protein může být vybrán ze skupiny zahrnující E6, E7 a/nebo L1 (Seeclorf, K. et al, J. Virol., 145:181-185 (1985)). Když je onemocněním infekce respiračně syncytiálním virem, tak je protein vybrán ze skupiny zahrnující glyko- (G) protein a fúzní (F) protein, pro které jsou sekvence dostupné od GenBank.

Následující příklady jsou uvedeny pro ilustrování předkládaného vynálezu a nijak neomezují jeho rozsah. Odborníkům v oboru bude jasné, že ačkoliv jsou popsány specifické podmínky a reakční činidla, existují různé další modifikace, které spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Příprava vektoru na bázi šimpanzího adenoviru C68 s deletovaným E1

Replikace-defektní verze C68 se izolovala pro použití v genovém přenosu. Použila se klasická strategie pro přípravu rekombinantního viru s deletovaným E1, za použití homologní rekombinace v buněčné linii exprimující E1. Prvním krokem bylo vytvoření plasmidu obsahujícího m.u. 0 až 1.3 a potom se přidal minigen exprimující zesílený zelený fluorescentní protein (GFP) z CMV promotoru a C68 sekvenci od 9 do 16.7 m.u. Tento linearizovaný plasmid se kotransfetoval do E1 exprimující buněčné linie s SSpI-tráveným C68 plasmidem (SspI štěpí v 3.6 m.u. a ponechává 4644 bp pro homologní rekombinaci). Experimenty se nejprve provedly s 293 buňkami nesoucími E1 z lidského Ad5 s nadějí, že toto bude dostatečné pro transkomplementaci. Vznikly plaky, které představovaly požadované rekombinanty. Vzniklý vektor se označil C68-CMV-GFP.

Strategie pro generování rekombinantů se modifikovala tak, aby umožnila účinnou a rychlou izolaci rekombinantů. Nejprve se DNA pro alkalickou fosfatasa v prvotním přenosovém vektoru nahradila prokaryotickým GFP genem řízeným prokaryotickým promotorem z lacZ. Toto umožnilo účinný skrínig bakteriálních transformací při pokusu o inkorporaci požadované eukaryotické RNA pol II transkripční jednotky do přenosového vektoru. Vzniklé transformace mohou být testovány na expresi GFP; bílé kolonie jsou rekombinantní, zatímco zelené kolonie jsou reziduální původní plasmidy.

Selekce mezi bílými a zelenými koloniemi se použila pro testování produktů kotransfekce pro izolování lidských Ad5 rekombinantů (A.R. Davis et al, Gene Thera., 5:1148-1152 (1998)); tento postup se adaptoval na C68 systém. Prvotní přenosový vektor byl upraven tak, aby obsahoval prodlouženou 3' sekvenci od 9 do 26 MU. Tento vektor byl kotransfektován s virovou DNA z původního C68-CMV-GFP izolátu, který byl restrikně tráven Xba I, který štěpí v MU 16.5 a ponechává přesah 9,5 Kb pro homologní rekombinaci. Vzniklé plaky se prohlížely pod mikroskopem s fázovým kontrastem za účelem vyhledání nefluoreskujících izolátů, které představují požadované rekombinanty. Toto značně zjednodušilo skrínig ve srovnání se standardními metodami založenými na struktuře nebo expresi transgenu.

A. Přenosový plasmid

Pro konstrukci plasmidového přenosového vektoru pro přípravu rekombinantního C68 viru se plasmid pSP72 (Promega, Madison, WI) modifikoval trávením Bgl II a potom doplněním konců Klenow enzymem (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)

a ligací se syntetickým 12 bp Pac I linkerem (New England Biolabs, Beverly, MA) za zisku pSP72-Pac. 456 bp Pac I/SnaB I fragment velikosti mapové jednotky (m.u. nebo MU) 0-1,3 C68 genomu se izoloval z pNEB-BamE plasmidu obsahujícího BamHI E fragment C68 genomu a klonoval se do Pac I a EcoR V zpracovaného pSP72-Pac za zisku pSP-C68-MU 0-1,3. Minigenová kazeta skládající se z cytomegalovirového časného promotoru řídícího lacZ s SV40 poly A signálem se separovala z pCMVβ (Clontech, Palo Alto, CA) jako 4,5 kb EcoRI/SalI fragment a ligovala se do pSP-C68-MU 0-1,3 restriktivně tráveného stejnou sadou enzymů, za zisku pSP-C68-MU 0-1,3-CMVlacZ.

V prvním kroku izolace 9-16,7 MU regionu C68 se pGEM-3Z (Promega, Madison, MI) a pBS-C68-BamF dvakrát trávily BamHI a Sph I enzymy. Potom se 293 bp fragment z pBS-C68-BamF ligoval se pGEM-3Z skeletem za zisku pGEM-C68-MU 9-9,8. 2,4 kb fragment obsahující C68 MU 9,8-16,7 se získal z pBS-C68 BamRB klonu po trávení XbaI, doplnění v reakci s následným zpracováním BamHI a klonoval se do BamHI/SmaI dvojité tráveného pGEM-C68-MU 9-9,8 za zisku pGEM-C68-MU 9-16,7. C68 9-16,7 m.u. region se izoloval z pGEM-C68-MU 9-16,7 trávením EcoRI, doplněním na koncích Klenow enzymem (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), ligací se syntetickým 12 bp HindIII linkerem (NEB) a potom trávením HindIII. Tento 2,7 kb fragment v rozsahu C68 MU 9-16,7 se klonoval do HindIII místa pSP-C68-MU 0-1,3-CMVlacZ za zisku konečného přenosového plasmidu pC68-CMV-LacZ. Dále se 820 bp cDNA fragment pro alkalickou fosfatase (AP) izoloval z pAdCMVALP (K. J. Fisher, et al., J. Virol., 70:520-532 (1996)) a zaměnil se za lacZ v Not I místech pC68-CMV-lacZ, za zisku pC68-CMV-AP.

B. Konstrukce rekombinantního viru

Pro přípravu rekombinantního C68-CMVEGFP vektoru s deletovaným E1 se nejprve připravil pC6S-CMV-EGFP přenosový plasmid, pomocí nahrazení lacZ transgenů v pCG8-CMV-lacZ genem pro zesílený zelený fluorescentní protein (EGFP). Nahrazení se provedlo následujícím způsobem. Další NotI restriční místo se vložilo na 5' konec EGFP kódující sekvenční v pEGFP-1 (Clontech, Palo Alto, CA) pomocí BamHI trávení, doplnění v reakci a ligace s 8 bp syntetickým NotI linkerem (NEB). Po restričním trávení obou konstruktů NotI se EGFP sekvenční izolovala z modifikovaného pEGFP-1 a použila se pro nahrazení lacZ genu v pC68-CMV-lacZ. pC68-CMVEGFP konstrukt (3 µg) se kotransfektoval se Ssp I-trávenou C68 genomovou DNA (1 µg) do 293 buněk za účelem homologní rekombinace, jak byla popsána dříve (G. Gao, et al, J. Virol, 70:8934-8943 (1996)). Zelené plaky vizualizované fluorescentní mikroskopií se izolovaly pro dvě kola přečištění plaků, expanzi a přečištění CsCl gradientovou sedimentací (G. Gao, et al, výše).

Ve snaze o použití běžného procesu selekce bílých/zelených plaků (A. R. Davis, et al., Gene Thera., 5:1148-1152 (1998)) pro konstrukci rekombinantních C68 vektorů se 7,2 kb fragment v rozsahu 9 až 36 MU izoloval z pBSC68-BamB plasmidu reakcí s AgeI a BsiwI restričními endonukleasami a klonoval se do Asp718 a AgeI míst pC68-CMV-AP přenosového plasmidu, což vedlo k získání nového plasmidu označeného jako pC68CMV-AP-MU36. Další modifikace se provedla pro odstranění 26 až 36 m.u. z pC68CMV-AP-MU36 pomocí trávení Eco47III a NruI. Nový přenosový plasmid označený jako pC68CMV-AP-MU26 měl kratší region pro homologní rekombinaci (tj., 16,7-26 MU) 3' k minigenu. Pro přípravu rekombinantního C68 vektoru se alkalická fosfatasa (AP) nahradila požadovaným genem. Vzniklý pC68CMV-Nugene-

MU26 konstrukt se ko-transfektovat s Xba I (16,5 MU) restriktivně trávenou C68-CMVGFP virovou DNA do 293 buněk a potom se buňky překryly agarem. Plaky rekombinantního viru (bílé) se generovaly homologní rekombinací v regionu 16,7-26 MU, který je společný pro pC6SCMV-Nugene konstrukt a C68 virový skelet; rekombinanty, které tvořily bílé plaky, se odlišovaly od zelených plaků neštěpeného C68-CMVGFP viru.

Selekce podle bílých/zelených plaků se také použila v procesu klonování požadovaného genu do pC68 přenosového plasmidu. AP gen v pC68CMV-AP-MU36 a pC68CMV-AP-MU26 se nahradil kazetou prokaryotického GFP genu řízeného lacZ promotorem izolovaným z pGFPMU31 (Clontech, Palo Alto, CA). Tak bílé kolonie bakteriálních transformantů obsahovaly rekombinantní plasmid. Tento proces selekce bílých/zelených plaků pro bakteriální kolonie eliminuje potřebu přípravy a charakterizace velkého počtu minipřípravků DNA a tak dále zvyšuje účinnost konstrukce rekombinantních C68 vektorů.

Příklad 2 - Exprese antigenu (Gag sekrece) v TK buňkách infikovaných vakcinačními konstrukty opičího adenoviru

Adenovirové rekombinanty šimpanzího kmene 68 (Adchimp68) a lidského kmene 5 (Adhu5) nesoucí nukleotidovou sekvenci modifikované verze zkrácené formy gag genu HIV-1 clade B se připravily již popsáním způsobem (v příkladu 1 a Z.Q. Xiang, et al, Virol. 219, 200 (1996)). Transkripty strukturálních proteinů HIV-1, včetně gag, obsahují geneticky nestabilní elementy, které vyžadují přítomnost rev proteinu pro jaderný export a účinnou expresi v cytoplasmě (S. Schwartz et al., J Virol 66, 7176 (1992); S.Schwartz, et al, J Virol 66, 150-159 (1992); G. Nasioulas et al., J. Virol 68, 2986 (1994)). Adenoviry působí na základě jaderné transkripce a proto

vyžadují rev pro expresi HIV-1 proteinů. Pro překonání závislosti na Rev se sekvence s modifikovanými kodony, ze které byly elementy s genetickou nestabilitou odstraněny místně cílenou mutagenesí (R. Schneider et al., J Virol 71, 4892 (1997); S. Schwartz et al., J Virol 66, 7176 (1992); S. Schwartz, et al., J Virol 66, 150 (1992)), insertovala do adenovirového vektoru. Vložený gen kodoval zkrácený p37gag protein (p17 a p24 regiony). Zkrácený gag protein netvořil virové částice a byl částečně secernován do supernatantu transfektovaných lidských buněk (R. Schneider et al., J Virol 71, 4892 (1997)). Mutované gag konstrukty se použily pro vakcinační experimenty a způsobovaly indukci buněčné a protilátkové imunitní reakce u myši a u primátů (J.T. Qiu et al., J Virol 73, 9145, (1999)).

Adchimp68 a Adhu5 rekombinanty se generovaly a propagovaly na 293 buňkách transfektovaných E1 adenoviru lidského kmene 5. Předkladatelé vynálezu zjistili, že tento heterologní E1 je vhodný pro komplementování Adchimp68 rekombinantních virů s deletovaným E1, za snížení rizika rekombinace a reverze na replikace-kompetentní přirozený virus.

Přítomnost gag proteinu v supernatantu TK kultur se analyzovala westernovou hybridizací za použití myších monoklonálních protilátek k gag. TK buňky (1×10^6) se infikovaly po dobu 48 hodin Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 virem (10 pfu na buňku). Další TK⁻ buňky se infikovaly Adhu5 nebo Adchimp68 konstruktem exprimujícím glykoprotein viru vztekliny. Proteiny v supernatantech kultur se separovaly na 12% denaturujícím polyakrylamidovém gelu a přenesly se elektrohybridizací na PVDF membránu. Skvrna se barvila monoklonální protilátkou 183-H12-SC k HIV-1 p24 (B. Chelsebro, et al. J. Virol. 66: 6547 (1992)).

Dva adenovirové rekombinantní klony (Adhu5gag37, Adchimp68gag37) nesoucí tuto modifikovanou sekvenci gag exprimovaly transgen ve srovnatelných koncentracích, jak bylo zjištěno analýzou westernovým přenosem. Protein očekávané velikosti (37 kDa), který se vázal na monoklonální protilátku proti gag HIV-1, byl detekován v supernatantech TK buněk infikovaných 10 jednotkami vytvářejícími plaky (pfu) každého rekombinantu s adenovirovým gag. Kontrolní buňky infikované Ahu5 nebo Adchimp68 rekombinanty exprimujícími glykoprotein viru vztekliny (Adhu5rab.gp a Adchimp68.gp) neprodukovaly tento protein.

Příklad 3 - Indukce $CD8^+$ T-lymfocytární reakce na gag u savců pomocí opičího adenoviru

Následující pokus ukazuje, že splenocyty myši, kterým byl injekčně intramuskulárně (i.m.) aplikován Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 rekombinantní virus, reagovaly na imunodominantní epitop (B. Doe and C.M. Walker, AIDS 10, 793 (1996)) gag proteinu uvolňováním cytokinu, tj. interferonu (IFN)- γ , stejně jako lýzou cílových buněk.

A. Test uvolňování cytokinů

Skupiny 3 Balb/c myši se imunizovaly i.m. 2×10^5 , 2×10^6 nebo 2×10^7 pfu Adchimp68gag37 viru, 2×10^6 pfu Adhu5L1 viru (H.C.J. Ertl, et al., J. Virol, 63:2885 (1989)), 2×10^6 pfu Adhu5gag37 viru nebo 2×10^7 pfu VVgag viru. Splenocyty se o deset dnů později testovaly na $CD8^+$ T-lymfocytární reakci. Pro testování produkce cytokinu (IFN- γ) se splenocyty (1×10^6 /vzorek) kultivovaly po dobu 5 hodin při 37°C s $3 \mu\text{g/ml}$ AMQMILKETI peptidu (SEQ ID NO:1), který obsahuje imunodominantní $CD8^+$ T-lymfocytární epitop pro H-2^d haplotyp, a s $1 \mu\text{g/ml}$ Brefeldinu A (GolgiPlug, PharMingen, San Diego,

CA), v 96-jamkové kultivační plotně s kulatým dnem v Dulbecco modifikovaném Eagle mediu (DMEM) doplněném 2% fetálním hovězím sérem (FBS) a 10^{-6} M 2-merkaptoethanolu. Buňky se promyly PBS a inkubovaly se po dobu 30 minut při 4 °C s FITC značenou protilátkou k myším CD8. Buňky se promyly a permeabilizovaly se v 1X Cytofix/Cytoperm (PharMingen) po dobu 20 minut při 4 °C. Buňky se třikrát promyly v Perm/Wash (PharMingen) a inkubovaly se po dobu 30 minut při 4 °C s PE značenou protilátkou k myšimu IFN- γ . Po promytí se buňky vyšetřovaly dvoubarevnou průtokovou cytometrií a analyzovaly se za použití WinMDi softwaru. Číslo v pravém horním rohu ukazuje procento CD8⁺ buněk barvících se pozitivně na IFN- γ vzhledem k celkovému počtu CD8⁺ buněk.

Sedm až deset dní po jediné imunizaci produkovala měřitelná frakce celé populace sleziných CD8⁺ T-lymfocytů IFN- γ v reakci na gag peptid. Primární splenocyty byly testované bez další in vitro expanze lyzovaných H-2 kompatibilních cílových buněk předem ošetřených gag peptidem. Gag-specifická aktivita CD8⁺ T-lymfocytů byla vyšší po imunizaci Adchimp68 konstruktem, kdy bylo dosaženo 16-19% CD8⁺ T-lymfocytů specifických pro gag z celé populace sleziných CD8⁺ T-lymfocytů. Reakce byla závislá na dávce Adchimp68gag37 vir, kdy dávky pouze 2×10^5 pfu viru stále vyvolávaly frekvence okolo 10%. Adhu5gag37 rekombinanty indukovaly optimální frekvence 9% při 2×10^6 pfu. Tyto frekvence nebyly významněji vyšší při vyšší dávce této vakcíny (data nejsou uvedena). Rekombinantní virus vakcinie exprimující kompletní gag (VVgag, označený jako vDK1 v S. Chacarabarti et al., Mol. Cell. Biol. 5, 3403 (1985)), stimuloval významně nižší frekvence CD8⁺ T-lymfocytů podle intracelulárního barvení na cytokiny.

B. Lýza cílových T-lymfocytů.

Splenocyty od myší imunizovaných o deset dnů dříve jednou dávkou adenovirových rekombinantů (jak je popsáno v oddíle A) nebo dvěmi dávkami VVgag rekombinantů, kdy první dávka byla aplikována i.m. a druhá o 2 týdny později intraperitoneální injekcí, byly testovány v 5-hodinovém testu uvolňování ^{51}Cr s různými poměry efektorových a cílových buněk na 1×10^4 P815 buňkách, které byly ošetřeny během 16-24 hodin při teplotě místnosti buď peptidem pro gag (plné čtverečky) nebo kontrolním peptidem 31D (X) odděleným ze sekvence nukleoproteinu viru vztekliny (H.C.J. Ertl et al., J. Virol. 63 : 2885 (1989)). Dvě imunizace VVgag vakcínou byly nutné pro indukci detekovatelné T-lymfocyty zprostředkované gag-specifické primární cytolyzy.

C. Kinetiky CD8^+ T-lymfocytární reakce na gag

Skupiny 4 Balb/c myší se imunizovaly 5×10^6 pfu Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 virů. Splenocyty se odebraly o 6-12 dnů později a testovaly se na produkci IFN- γ a na lýzu cílových buněk, jak bylo popsáno výše. Kinetiky CD8^+ T-lymfocytární reakce na gag vyvolané dvěma adenovirovými rekombinanty byly odlišné. Odpověď na gag u Adhu5gag37 viru vrcholila o 2-4 dny dříve než CD8^+ T-lymfocytární reakce na Adchimp68gag37 rekombinanty.

Příklad 4 - Exfekt předchozí expozice lidskému adenoviru na opičí adenovirovou vakcínu

Pro výzkum vlivu předchozí expozice běžnému lidskému kmenu 5 adenoviru se myší imunizovaly jednou dávkou Adhu5 rekombinantu exprimujícího irelevantní antigen (lidský

papilloma virus L1). O dva týdny později se myši vakcinovaly buď Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 vakcínou.

Přesněji, myši se imunizovaly i.m. 10^8 pfu Adhu5L1 vakcíny. O dva týdny později se Adhu5-imunním, stejně jako naivním myším injekčně podalo 2×10^6 nebo 2×10^7 pfu Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 rekombinantů (4-5 myši na skupinu). Další skupiny Adhu5L1 imunních nebo naivních myši se imunizovaly 2×10^6 pfu Adhu5gag31 nebo Adchimp68gag37 viru. O devět dnů později se myším intraperitoneálně podalo 10^6 pfu rekombinantního viru vakcinie exprimujícího kompletní gag. Myši se utratily za 5 dnů po injekci viru vakcinie.

Myši předem imunní k Adhu5 viru neodpovídaly na gag po vakcinaci Adhu5gag37 vakcínou. Tyto myši vykazovaly frekvence $CD8^+$ gag-specifických T-lymfocytů podobnou jako kontrolní myši a v souladu s tím jejich splenocyty nelyzovaly gag exprimující cílové T-lymfocyty. Naopak, $CD8^+$ T-lymfocytární reakce na gag byla pouze mírně snížena u Adhu5-imunních myši vakcinovaných Adchimp68gag37 konstruktem. Frekvence $CD8^+$ T-lymfocytů namířených proti gag byla redukována o pouze 30% a cytolytická aktivita splenocytů byla snížena o 50% při různých poměrech efektorových a cílových buněk.

Tak oba adenovirové rekombinanty indukují frekvence $CD8^+$ T-lymfocytů specifických pro gag, které jsou lepší než frekvence popisované pro předešlé vakcíny, jako jsou vakcíny využívající holé DNA nebo poxvirových rekombinantů (S.Schwartz, et al., J Viral 66, 150-159 (1992)). Frekvence byly také vyšší než frekvence pozorované u chronicky infikovaných jedinců (D.H. Barouch et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 97, 4192 (2000); T.U. Vogel et al. J. Immunol. 164, 4968 (2000); P.A. Goepfert et al. J. Virol. 74, 10249

(2000); C.R. Rinaldo Jr. et al. AIDS Res. & Hum. Retr., 14:1423 (1998)). Tyto výsledky ukazují na potenciál adenovirových rekombinantních vakcín.

Příklad 5 - Efekt primární imunizace a dosycovací imunizace antigenem na CD8⁺ T-lymfocyty

Primární splenocyty z buněk naivních nebo Adhu5-imunních myší imunizovaných 2×10^7 pfu Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 viru se srovnávaly se splenocyty od naivních nebo Adhu5 imunních myší vakcinovaných 2×10^6 pfu Adhu5gag37 nebo Adchimp68gag37 viru a potom dosycených 10^6 pfu VVgag viru. Splenocyty se analyzovaly o 5 dnů později na CD8 a intracelulární IFN- γ . Tyto testy se provedly v podstatě způsobem popsaným výše, s tou výjimkou, že se neprovedla žádná kultivace in vitro pro lýzu P815 buněk ošetřených gag peptidem nebo kontrolním peptidem 31D v 5 hodinovém testu uvolňování ⁵¹Cr.

Primární nebo dosycovací imunizace heterologním vakcinačním konstruktem, VVgag rekombinantem, selhala v obnovení CD8 T-lymfocytární reakce na gag present Adhu5 rekombinantní vakcínou. Ačkoliv Adhu5 vakcinovaná zvířata dosycená Adhu5gagp37 a VVgag měla až 7,1% splenických CD8⁺ T-lymfocytů produkujících IFN- γ v reakci na gaggm, byly tyto CD8⁺ T-lymfocyty zcela bez cytolytické aktivity proti cílovým T-lymfocytům prezentujícím gag. Tyto výsledky naznačují, že preexpozice antigenům nosiče vakcíny nemají pouze kvantitativní, ale též kvalitativní vliv na CD8⁺ T-lymfocytární reakci na produkt transgenu adenovirového rekombinantu. CD8⁺ T-lymfocytární reakce na gag u Adhu5 imunních myší vakcinovaných Adchimp68gag37 vykazovala efekt dosycovací dávky po VVgag imunizaci podobný efektu pozorovanému u naivních myší.

Frekvence $CD8^+$ T-lymfocytů specifických pro gag, stejně jako lýza primárních cílových buněk, může být dále zvýšena (není uvedeno) další primární imunizací nebo dosycením heterologním vakcinačním nosičem, jako je VVgag rekombinant. Po i.m. primární imunizaci adenovirovými rekombinanty následované o 9 dnů později i.p. dosycovací imunizací VVgag, tvořily $CD8^+$ gag-specifické T-lymfocyty analyzované za 5 dnů po primární imunizaci 40% celé splenické populace $CD8^+$ T-lymfocytů.

Pre-existující imunita k Adhu5 výrazně snižuje účinnost Adhu5gag37 vakcíny, ale pouze mírně snižuje $CD8^+$ T-lymfocytární reakci na Adchimp68gag37 virus. Již dříve bylo popsáno, že myši imunizované k Adhu5 viru mají redukovanou B-lymfocytární odpověď na vakcinaci Adhu5 vakcínou proti viru vztekliny. Vyšší dávky vakcíny nebo použití DNA vakcíny exprimující stejný antigen viru vztekliny mohou překonat škodlivý vliv preexistující expozice Adhu5 viru (Z.Q. Xiang, et al., J. Immunol. 162, 6716 (1999)).

Naopak, $CD8^+$ T-lymfocytární reakce na gag prezentovaný Adhu5 rekombinantní vakcínou byla zrušena u Adhu5 imunních myši a mohla být pouze částečně obnovena dalšími imunizacemi heterologní vakcínou proti gag. Toto může ukazovat na indukci $CD8^+$ T-lymfocytů citlivějších na cirkulující virus-neutralizační protilátky, ve srovnání se stimulací B-lymfocytů.

Příklad 6 - Produkce rekombinantních adenovirů obsahujících glykoprotein viru vztekliny

Adenoviry lidských serotypů 2, 4, 5, 7, 12 a šimpanzího serotypu 68 se propagovaly a titrovaly na lidských 293

buňkách. Rekombinantní adenoviry na bázi lidského serotypu 5 exprimující glykoprotein ERA serotypu viru vztekliny nebo L1 protein lidského papilloma viru (HPV)-16 byly popsány dříve (Z.Q. Xiang, et al, Virology 219: 220-227 (1996); D. W. Kowalczyk, et al, (2001) Vaccine regimen for prevention of sexually transmitted infections with human papillomavirus type 16, Vaccine). Byl vyvinut expresní systém na bázi adenovirů šimpanzího serotypu 68, jak je popsáno v příkladu 1.

Adenoviry se propagovaly na E1 (z lidského serotypu 5)-transfektovaných 293 buňkách (F. L. Graham, et. al., J. Gen. Virol. 36: 59-74 (1977)). Viry se získávaly lyofilizací buněk. Pro některé pokusy se virus přečistil CsCl gradientovým přečištěním. Pro jiné pokusy se použil přečištěný supernatant infikovaných buněk nekrotizovaných třenmi koly lyofilizace. Viry se titrovaly na 293 buňkách pro stanovení jednotek tvořících plaky (pfu).

Adenovirový rekombinant šimpanzího 68 serotypu exprimující glykoprotein viru vztekliny, označený jako Adchimp68rab.gp, se připravil ve 293 buňkách transfektovaných E1 adenoviru lidského serotypu 5, jak je podrobně popsáno v tomto příkladu. Virové klony se nejprve testovaly nepřímou imunofluorescencí za použití monoklonální protilátky 509-6 namířené proti konformace-dependentnímu epitopu glykoproteinu viru vztekliny. Po selekci stabilního adenovirového subklonu se exprese kompletního glykoproteinu viru vztekliny v Ad.chimp68rab.gp viru v infikovaných TK buňkách potvrdila imunoprecipitací, jak je popsáno v následujícím příkladu.

Příklad 7 - Exprese produktu transgenu adenovirovými rekombinanty.

Tento příklad ukazuje, že Adhu5 virus dosahuje znatelně vyšších hodnot exprese glykoproteinu viru vztekliny v TK⁻ buňkách ve srovnání s Adchimp68 konstruktem. Koncentrace transkriptu pro tento transgen kopírovaly expresi proteinu, což naznačuje, že rozdíl nesouvisel s post-translační modifikací. TK-buňky jsou CAR pozitivní a stupeň transdukce virovými serotypy by proto měl být srovnatelný.

Pro tyto pokusy se savčí buňky, tj. fetální ledvinné křeččí buňky (BHK)-21, El-transfektované 293 buňky a TK buňky, propagovaly v Dulbecco modifikovaném Eagle mediu (DMEM) doplněném glutaminem, Na-pyruvátem, non-esenciálními aminokyselinami, HEPES pufrem, antibiotiky a 10% fetálním hovězím sérem (FBS).

A. Imunoprecipitace

TK⁻ buňky (10^6 na vzorek) se infikovaly 5 pfu na buňku adenovirových rekombinantů exprimujících glykoprotein viru vztekliny nebo kontrolními konstrukty exprimujícími nepříbuzný virový antigen. Po 48 hodinách se buňky promyly dvakrát sterilním fosfátem pufrovaným salinickým roztokem (PBS) a potom se inkubovaly po dobu 90 minut v bezsérovém mediu před přidáním 20 μ l ³⁵S-značeného cysteinu a methioninu (Promix, NEN, Boston, MA). Po 4 hodinové inkubaci se buňky promyly PBS a potom se ošetřily během 20 minut 1 ml inhibitorů proteasy obsahujících RIPA pufr. Buňky a buněčná drť se odstranily z jamek, krátce se promísily a odstředily se během 2 minut při 12000 rpm. Supernatant se inkuboval po dobu 90 minut při 4 °C s 15 μ l/ml ascitické kapaliny obsahující 509-6 monoklonální protilátku ke glykoproteinu viru vztekliny. Protein Sepharose G se přidala v dávce 75 μ l na vzorek a inkubovala se při 4°C za mírného mísení po dobu

30 minut. Vzorky se peletovaly odstředěním a promyly se 4-krát RIPA pufrem. Pelety se resuspendovaly v 80 μ l zaváděcího pufru a provedl se var po dobu 4 minut. Vzorky (20 μ l) se potom separovaly na 12% SDS-polyakrylamidovém (PAGE) gelu a srovnávaly se se standardy molekulové hmotnosti. Gely se sušily na filtračních papírech, které se exponovaly po dobu 48 hodin na Kodak Scientific Imaging Film (X-Omat Blue XB-1).

Adchimp68rab.gp rekombinant exprimoval protein předpokládané velikosti, který se vázal na 509-6 protilátku. Sraženina z TK-buněk infikovaných Adhu5rab.gp virem vykazovala proužek identické velikosti, který nebyl přítomen v lyzátech z buněk infikovaných adenovirovými rekombinanty exprimujícími produkt nepříbuzného transgenu. Exprese glykoproteinu viru vztekliny byla výraznější v buňkách infikovaných Adhu5rab.gp konstruktem. Odlišnosti v expresi transgenu mohou být důsledkem post-translačních dějů, jako jsou rozdíly ve vychytávání viru, rychlosti transkripce nebo stability transkriptu. Alternativně, translační nebo post-translační odlišnosti, jako jsou různé modifikace vedlejšího řetězce, mohou vést ke kvantitativním odlišnostem v serologicky detekovatelném proteinu.

Pro další odlišení mezi těmito dvěma možnostmi se celková RNA izolovala z TK buněk infikovaných jedním z adenovirových rekombinantů. Reversně transkribovaná mRNA glykoproteinu viru vztekliny a "housekeeping" genu se amplifikovala real-time PCR provedeným způsobem popsáním v oddíle B.

B. Real time reversní transkripční polymerasová řetězová reakce (PCR)

Konfluentní monovrstvy TK⁻ buněk se infikovaly ve dvojích vzorcích 10 pfu jednoho z adenovirových rekombinantů. Buňky se izolovaly o 24 hodin později a RNA se extrahovala TRI činidlem podle návodu výrobce (Mol. Res. Center, Cincinnati, OH). RNA se zpracovala DNAsou bez RNasy, přečistila se fenolovou extrakcí a upravila se na 50 ng RNA na vzorek. RNA se reverzně transkribovala a amplifikovala se pomocí Light Cycler-RNA amplifikačního kitu SYBR green (Roche, Mannheim, Germany; Z. He, et al, Virology 270: 146-1617 (2000)) za použití primerů pro glykoprotein viru vztekliny (SEQ ID NO:2: 5' AA GCA TTT CCG CCC AAC AC; SEQ ID NO:3: 3' GGT TAG TGO AGC AGT AGO TAG A) a "housekeeping" gen glutaraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH) (SEQ ID NO:4: 5' GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG ATT T; SEQ ID NO:5: 3' AAT GCC AAA GTT GTC ATG GAT GAC C).

Data v tabulce 1 uvádějí výsledky. Uvedená data jsou průměrné hodnoty pro dvojí měření $\pm$ SD.

Tabulka 1

Zdroj RNA	Relativní kvalita transkriptu		
	GAPDH	Rab.gp	Poměr (GAPDH/rab.gp)
TK ⁻ , Adhu5rab.gp	3,2 $\pm$ 0,2	3494 $\pm$ 18	1082
TK ⁻ , Adchimp68rab.gp	0,52 $\pm$ 0,01111	64 $\pm$ 6	64

Jak ukazují tato data, vykazují transgenové transkripty upravené na transkripty housekeeping genu kvantitativní rozdíly srovnatelné s rozdíly pozorovanými pro serologicky detekovatelný protein.

V datech neuvedených v tomto příkladu se další dva Adchimp68 rekombinanty exprimující zelený fluorescentní

protein a zkrácený gag protein viru lidské imunodeficiencie 1 s modifikovanými kodony srovnávaly s Adhu5 rekombinanty exprimujícími stejné transgenové produkty a prokázala se ekvivalentní exprese proteinu v TK buňkách. Z tohoto výsledku lze usoudit, že redukovaná exprese glykoproteinu viru vztekliny Adchimp68 virem není důsledkem vychytávání viru ani rychlosti transkripce, a oba konstrukty jsou regulovány stejnými kontrolními elementy.

Příklad 8 - Imunizace myši za použití antigenu viru Vztekliny

Protilátková reakce specifická k viru vztekliny na Ad.chimp68rab.gp virus se srovnávala s reakcí na Adhu5rab.gp virus u inbredních a outbredních kmenů myši. Myším se injikovaly sériová ředění rekombinantů podaných s.c. nebo i.n. Sérum se odebíralo o 14 dnů později a testovalo se na protilátky proti glykoproteinu viru vztekliny ELISA a testem na neutralizaci viru. Adenovirové rekombinanty exprimující nepříbuzný transgen, tj. gag HIV-1 (popsané ve výše uvedených příkladech) se použily jako kontroly. Tyto rekombinanty selhaly v indukci protilátkové reakce k viru vztekliny detekovatelné jedním z těchto testů. Podrobnější popis tohoto pokusu a výsledků je uveden dále.

Samice C3H/He a C57B1/6 myši staré 6-8 týdnů se zakoupily od Jackson Laboratory, Bar Harbor Maine. Outbrední ICR myši se zakoupily od Charles River (Wilmington, MA).

Myším se injekčně podaly různé dávky adenovirových rekombinantů, které se aplikovaly ve 100 μ l salinického roztoku podkožně (s.c.) nebo v 50 μ l intranasálně (i.n.). Myši se infikovaly virem vztekliny kmene CVS-11 podaným v dávce 10 průměrných letálních dávek (LD₅₀) intracerebrálně

(i.c.). Virus vztekliny Evelyn Rokitniki-Abelseth (ERA) a Challenge Virus Standard (CVS)-11 se propagovaly na BHK-21 buňkách. ERA virus se přečistil přes sacharosový gradient, inaktivoval se ošeteřním betapropionolaktonem a upravil se na koncentraci proteinu 0,1 mg/ml. CVS-11 virus se titroval na BHK-21 buňkách a pomocí intracerebrální injekce dospělým ICR myším (Z.Q. Xiang, Z.Q. & H.C. Ertl, J. Virol. Meth. 47:103-16 (1994)). Po infekci se myši kontrolovaly každých 24-43 hodin po dobu nejméně 21 dnů. Myši se utratily poté, co se vyvinula paralýza zadních tlapek, která ukazuje na terminální stadium encephalitidy způsobené virem vztekliny.

Serologická analýza zahrnovala enzymově vázaný imunoadsorbentní test (ELISA), isotypový profil protilátek a test na neutralizaci viru.

A. ELISA

Myším se odebírala krev v různých intervalech po imunizaci punkcí retroorbitální žíly. Připravila se séra a ta se testovala na protilátky proti viru vztekliny na plotnách potažených 0,1 µg/jamku inaktivovaného viru vztekliny. Séra se testovala na protilátky k adenoviru na plotnách potažených 0,1 µg/jamku přečištěným E1-deletovaným adenovirovým rekombinantem s GFP lidského serotypu 5 nebo šimpanzího serotypu 68. ELISA se provedly v podstatě způsobem popsáným dříve (Z. Q. Xiang, et al., Virology 219, 220-227 (1996)). Plotny se potáhly přes noc. Potom se plotny blokovaly po dobu 24 hodin PBS obsahujícím 3% hovězí sérový albumin (BSA). Po promytí se séra naředěná v PBS-3% BSA přidala na dobu 60 minut. Po promytí se na jednu hodinu na ledu přidalo ředění 1:100 kozí anti-myší Ig protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou (Cappel). Po promytí se

na 20-30 minut při teplotě místnosti přidal substrát.
Optická densita se odečítala při 405 nm.

B. Isotypy protilátek

Isotypy protilátek k viru vztekliny se stanovily na ELISA plotnách potažených ERA virem za použití Calbiochem Hybridoma Subisotyping (La Jolla, CA) kitu s určitými drobnými dříve popsányi modifikacemi (Xiang, Virol, 1996, citováno výše).

Izotypový profil protilátek se lišil při s.c. imunizaci, ale byl srovnatelný při i.n. aplikaci dvou adenovirových vakcín. Oba rekombinanty, po podání jakýmkoliv způsobem, indukovaly IgG2a protilátky k antigenu viru vztekliny.

Oba rekombinanty po i.n. imunizaci a Adhu5rab.gp vakcína po s.c. podání indukovaly výraznou IgG1 odpověď, což ukazuje na aktivaci Th2 buněk, která chybí v reakci na Ad.chimp68rab.gp konstrukt podaný s.c.

C. Neutralizační protilátky

Séra se testovala na neutralizační protilátky k viru vztekliny kmene CVS-11, který je antigenně blízce příbuzný ERA kmenu (Z. Q. Xiang, et al, Virology. 214: 398-404 (1996)). WHO referenční sérum se použilo pro srovnání. Titry se uvedly v mezinárodních jednotkách.

Adchimp68rab.gp virus podaný s.c. indukoval slabší B-lymfocytární reakci na transgenní produkt ve srovnání s Adhu5rab.gp konstruktem. Rozdíly ve velikosti protilátkové reakce, které byly pozorovány ve všech testovaných bodech, závisely na kmenu myši a was less pronounced byly menší u

outbredních ICR než u inbredních C3H/He myši. Naopak, při i.n. imunizaci indukovaly obě vakcíny srovnatelné titry protilátek, jak bylo stanoveno ELISA a testy na neutralizaci viru.

Zvýrazněná Th1 reakce na Adchimp68rab.gp rekombinanty po s.c. imunizaci kontrastující s Th1/Th2 reakcí po injekci Adhu5rab.gp svědčí pro odlišnosti v adjuvanticitě. Po aplikaci do dýchacích cest přirozený způsob infekce pro Adhu5 virus a patrně též pro Adchimp68 rekombinantní viry indukuje protilátkové titry k transgenovému produktu, které jsou srovnatelné ve velikosti a izotypovém profilu. Toto naznačuje, že předpokládané rozdíly v tropismu a/nebo adjuvanticitě jsou závislé na tkáních, tj. chybí nebo jsou méně výrazné v dýchacích cestách ve srovnání s podkožím.

Příklad 9 - Přednostní indukce cytotoxické T-lymfocytární reakce při použití rekombinantního šimpanzího adenoviru

Vakcínou indukovaná ochrana proti viru vztekliny koreluje s protilátkami neutralizujícími virus (VNAs, F. L. Graham, et. al., J. Gen. Virol. 36, 59-74 (1977)). Pokusy s proteinem vztekliny se zaměřily na toto rameno imunitního systému. Ve všech pokusech se myši imunizovaly Adchimp68rab.gp virem a - paralelně - dříve popsáním Adrab.gp virem na bázi lidského serotypu 5. V této přihlášce je tento rekombinant označován jako Adhu5rab.gp virus.

Oba adenovirové rekombinanty indukovaly ochranu proti infekci virem vztekliny. C3H/He myši imunizované 5×10^6 pfu jednoho z adenovirových rekombinantů podaných s.c. zůstávaly bez známek nemoci, když byly za 3 měsíce infikovány 10 průměrnými letálními dávkami (LD_{50}) viru vztekliny kmene CVS. Tento virus vztekliny je antigenně blízce příbuzný ERA

kmeni, ale u hlodavců je virulentnější. Při nižší dávce vakcíny (5×10^5 pfu) poskytoval Adhu5rab.gp virus stále ještě kompletní ochranu, zatímco malé procento myši imunizovaných Adchimp68rab.gp skonalo na infekci. Další redukce dávky vakcíny vedla ke ztrátě účinnosti Adchimp68rab.gp vakcíny. Po i.n. imunizaci poskytovaly obě vakcíny kompletní ochranu, když byly podány v dávce 5×10^5 pfu. Při nižší dávce 5×10^4 pfu se u 50% myši vakcinovaných Adhu5rab.gp vakcínou rozvinulo progresivní onemocnění, zatímco myši vakcinované stejnou dávkou Adchimp68rab.gp rekombinantů byly chráněné. U všech myši imunizovaných adenovirovými rekombinanty jakéhokoliv serotypu exprimujícími nepřibuzný antigen nebo 5×10^3 pfu jednoho z adenovirových rekombinantů pro glykoprotein viru vztekliny se rozvinula fatální encephalitida způsobená virem vztekliny.

Příklad 10 - Efekt pre-existující imunity k různým serotypům lidských adenovirů na protilátkovou reakci na virus vztekliny

Pro testování toho, zda předcházející infekce jakýmkoliv z běžných serotypů lidského adenoviru (např. lidskými serotypy 2, 4, 5, 7 a 12) bude inhibovat protilátkovou reakci na Adchimp68rab.gp vakcínou se skupiny C3H/He myši imunizovaly 4×10^8 pfu replikace-kompetentními adenoviry lidského serotypu 2, 4, 5, 7 nebo 12 nebo šimpanzího serotypu 68 (kde poslední serotyp má deletovaný E1). O dva týdny později se myši vakcinovaly s.c. buď Adhu5rab.gp nebo Adchimp68rab.gp virem. Adhu5rab.gp rekombinant se použil v dávce 2×10^5 pfu na myš, Adchimp68rab.gp rekombinant, který při podání s.c. v této dávce indukuje pouze marginální protilátkovou reakci u C3H/He myši, se injikoval v dávce 2×10^7 pfu na myš. Sérum se odebíralo o dva týdny později a testovalo se na protilátky ke glykoproteinu viru vztekliny

ELISA. Reakce specifická pro virus vztekliny na Adhu5rab.gp byla u naivních myší o něco lepší než reakce na Adchimp68 virus. Reakce na Adhu5rab.gp virus byla u Adhu5 pre-imunních myší zcela inhibována. Určitá redukce byla také pozorována u myší preimuních k adenoviru lidského serotypu 4, 2, 7 a 12. Reakce nebyla ovlivněna u myší, které byly předem infikované Adchimp68 virem. Reakce na Adchimp68rab.gp virus byla výrazně inhibována u myší, které byly pre-imunní k homolognímu viru. Myši, které se dříve setkaly s adenovirem lidského serotypu 2 vykazovaly mírnou redukci protilátkové reakce na antigen viru vztekliny prezentovaný Adchimp68 vakcínou. Myši očkované jakýmkoliv jiným serotypem lidského adenoviru měly titry protilátek k viru vztekliny po vakcinaci Adchinip68rab.gp virem, které byly buď podobné velikosti, nebo vyšší než u myší, které byly naivní před vakcinací. Konkrétně, u myší pre-imunních k Adhu5 viru se vyvinuly vyšší titry protilátek při vakcinaci Adchimp68rab.gp konstruktem, což může odrážet přítomnost T-helper lymfocytů, které podporují reakci B-lymfocytů na produkt transgenu.

Pro další stanovení toho, zda stejné dávky Adchimp68rab.gp vakcíny indukují lepší titry protilátek ve srovnání s Adhu5rab.gp virem u myší preimunních na Adhu5 virus se provedl pokus s titrací vakcíny. Skupiny C3H/He myší se imunizovaly s.c. 4×10^8 pfu adenovirového rekombinantu s deletovaným E1 k L1 antigenu HPV-16. Myši se vakcinovaly o 2 týdny později buď Adhu5rab.gp nebo Adchimp68rab.gp virem podaným s.c. v různých dávkách. Myším se odebrala krev o dva týdny později a titry sérových protilátek k viru vztekliny se stanovily ELISA (není uvedeno) a testem na neutralizaci viru. Ani jeden test neukázal významnější redukci protilátkové reakce na Adcbimp68rab.gp konstrukt u Adhu5-imunních myší. Závažnost

snížení titrů protilátek k viru vztekliny prezentovaný Adhu5 konstruktem u myši preimunních k homolognímu viru závisela na dávce vakcíny. Protilátková reakce na nižší dávky vakcíny byla ovlivněna více než reakce na vyšší dávky vakcíny. VNA titry byly sníženy významně více než ELISA titry. Titry VNA při nejvyšší dávce vakcíny byly poloviční u myši preimunních k Adhu5 viru, zatímco při dvoou nižších dávkách vakcíny byly titry sníženy více než 20-krát. Při jakékoliv testované dávce indukoval Adchimp68rab.gp rekombinant vyšší VNA titry k vzteklině u Adhu5 preimunních myši než jsou titry dosažené při stejné dávce Adhu5rab.gp vakcíny. Škodlivý efekt pre-existující imunity k Adhu5 na účinnost Adhu5 vakcíny byl dále prokázán v pokusu s ochranou před infekcí. Naivní myši imunizované 2×10^5 pfu Adhu5rab.gp nebo Adchimp68rab.gp viru byly plně chráněné před infekcí CVS-11 virem. Většina (65%) Adhu5 pre-imunních myši imunizovaných touto dávkou Adhu5rab.gp vakcíny podlehl infekci virem vztekliny, zatímco myši vakcinované stejnou dávkou Adchimp68rab.gp viru zůstaly ochráněné. Dávka Adhu5rab.gp viru zvýšená na 2×10^6 pfu na myš obnovila účinnost vakcíny.

Protilátková odpověď na produkt transgenu exprimovaný Adchimp68 rekombinanty nebyla ovlivněna pre-existující imunitou k běžným lidským serotypům adenovirů, která inhibuje odpověď na odpovídající rekombinantní lidský serotyp 5. Po preimunizaci replikace-kompetentními viry byla imunitní reakce na Adhu5rab.gp vakcínu eliminována u Adhu5 pre-imunních myši a snížena u myši pre-imunních k jiným lidským serotypům adenoviru, jako je serotyp 2 a 4. Odpověď na Adchimp68 rekombinan byla, jak se předpokládalo, inhibována u myši pre-imunních k homolognímu viru. Toto nemá klinický význam, protože Adchimp68 virus necirkuluje v lidské populaci a běžné lidské serotypy nemají společné neutralizační epitopy s Adchimp6S virem.

Pre-infekce replikace-defektním Adhu5 virem také redukuje protilátkovou odpověď na glykoprotein viru vztekliny prezentovaný Adhu5 rekombinanty, ačkoliv tento vliv není tak významný jako u myši dříve infikovaných replikace-kompetentním virem. Sérum od myši pre-imunních k replikace-defektnímu Adhu5 viru měla snížené, ale snadno detekovatelné koncentrace protilátek k viru vztekliny po imunizaci Adhu5rab.gp vakcínou. Zvýšené dávky Adhu5rab.gp Konstruktů mohou částečně překonat vliv pre-existující imunity. Vakcínou indukovaná ochrana proti viru vztekliny vyžaduje VNA, které nejsou indukovány tak účinně u pre-imunních myši Adhu5 vakcínou, zejména při použití nižších dávek. U Adhu5 pre-imunních myši byla VNA reakce na Adchimp68rab.gp konstrukt lepší při všech testovaných dávkách než na Adhu5 vakcínu, což více než kompenzuje o něco nižší účinnost této vakcíny při s.c. imunizaci.

Adchimp68 rekombinanty tak jsou atraktivními alternativními nosiči pro vakcíny pro použití u člověka. Jak je zde uvedeno, jsou účinné i při použití dávek 2×10^5 pfu při neinvazivních způsobech podání, jako je aplikace do horních cest dýchacích. Slizniční imunizace i.n. aplikací má další výhodu v tom, že usnadňuje indukci odpovědi slizničního imunitního systému, která je odlišná od reakce centrálního imunitního systému indukované injekčně podávanými vakcínami, i když je s centrální reakcí spojená.

Příklad 11 - Zdroj šimpanzího C68 viru a jeho replikace

Následující příklady 11 až 5 dále charakterizují šimpanzí C68. Je třeba si uvědomit, že odborník v oboru tyto informace může snadno použít ke konstrukci nových rekombinantních šimpanzích adenovirových konstruktů.

Zdroj C68 viru byl získán z ATCC (Rockville, MD) a virus se propagoval na 293 buňkách (ATCC) kultivovaných v DMEM (Sigma, St. Louis, MO) doplněném 10% fetálním telecím sérem (FCS; Sigma nebo Hyklon, Logan, UT) a 1% Penicillinem-Streptomycinem (Sigma). Infekce 293 buněk se provedla v DMEM doplněném 2% FCS během prvních 24 hodin, a potom se přidalo FCS na konečnou koncentraci 10%. Infikované buňky se odebraly tehdy, když 100% buněk vykazovalo virem-indukovaný cytopatický efekt (CPE), buňky se odebraly a koncentrovaly se odstředěním. Buněčné pelety se resuspendovaly v 10 mM Tris (pH 8,0) a lyzovaly se 3 cykly zmrazení a rozmrazení. Přípravky viru se získaly po 2 cyklech ultraodstředění na densitních gradientech chloridu cesia a zásoba viru se naředila na 1×10^{12} částic/ml v 10 mM Tris/100 mM NaCl/50% glycerol a uskladnila se při teplotě -70°C .

Příklad 12- Klonování a sekvenování virové genomové DNA

Genomová DNA se izolovala z přečištěných virových přípravků za použití standardních metod a trávila se panelem 16 restrikčních enzymů podle návodu výrobce. Pokud není uvedeno jinak, byly všechny restrikční a modifikační enzymy získány od Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN. Genomová DNA se trávila BamHI, PstI, Sall, HindIII nebo XbaI a fragmenty se subklonovaly do plasmidů (K.L. Berkner and P.A. Sharp, Nucl. Acids Res., 11:6003-20 (1983)). Po deproteinaci se syntetické 10 bp Pad linkery (New England Biolabs, Beverly, MA) dvojité trávily PacI a BamHI nebo PstI.

PstI, BamHI a HindIII klony získané ze C68 jsou zobrazeny na obr. 1, oddílech C, D a E, v příslušném pořadí. Fragmenty v šrafovaných boxech nebyly klonované, ale sekvence celého genomu byla určena pomocí sekvenování překrývajících se

klonů a přímo virové DNA (nešrafované rámečky). Klonované fragmenty jsou popsány v tabulce 2.

Tabulka 2: C68 plasmidové klony a velikost insertů

Název konstruktů	Velikost insertu (bp)	5' konec fragmentu	3' konec fragmentu	5' mapová jednotka	3' mapová jednotka
Pst-I fragmenty					
C68-Pst-A	6768	24784	31551	67.9%	86.4%
pBS:C68-Pst-B	6713	4838	11550	13.2%	31.6%
pBS:C68-Pst-C	5228	14811	20038	40.6%	54.9%
pBS:C68-Pst-D	2739	12072	14810	33.1%	40.6%
pBS:C68-Pst-E	2647	20039	22685	54.9%	32.1%
pBS:C68-Pst-F	1951	32046	33996	87.8%	93.1%
pNEB:C68-Pst-G	1874	1	1874	0.0%	5.1%
pBS:C68-Pst-H	1690	23094	24783	63.2%	67.9%
pBS:C68-Pst-I	1343	33997	35339	93.1%	96.8%
pNEB:C68-Pst-J	1180	35340	36519	96.8%	100.0%
pBS:C68-Pst-K	1111	2763	3873	7.6%	10.6%
pBS:C68-Pst-L	964	3874	4837	10.6%	13.2%
pBS:C68-Pst-M	888	1875	2762	5.1%	7.6%
pBS:C68-Pst-N	408	22686	23093	62.1%	63.2%
C68-Pst-O	380	31666	32045	86.7%	87.7%
pBS:C68-Pst-P	285	11551	11835	31.6%	32.4%
C68-Pst-Q	236	11836	12071	32.4%	33.1%
pBS:C68-Pst-R	114	31552	31665	86.4%	86.7%
BamHI fragmenty					
C68-Bam-A	16684	19836	36519	54.3%	100.0%
pBS:C68-Bam-B	8858	3582	12439	9.8%	34.1%
pBS:C68-Bam-C	4410	12440	16849	34.1%	46.1%
pBS:C68-Bam-D	2986	16850	19835	46.1%	54.3%
pNEB:C68-Bam-E	2041	1	2041	0.0%	5.6%
pBS:C68-Bam-F	1540	2042	3581	5.6%	9.8%
HindIII fragmenty					
pBR:C68-Hind-B	9150	23471	32620	64.3%	89.3%

pBS = pBluescript SK+ klon

pNEB = pNEB 193 klon

pBR = pBR322 klon

bez předpony = neklonovaný fragment

Šimpanzí adenovirus, C68, byl získán z ATCC a byl propagován v lidských 293 buňkách. Virová genomová DNA se izolovala z přečištěných virionů za použití zavedených postupů (A. R. Davis, et al., Gene Thera., 5:1148-1152 (1998)) a trávila se panelem restričních enzymů; data byla v souladu s předchozími pokusy (data nejsou uvedena) (G. R. Kitchingman, Gene, 20:205-210 (1982); Q. Li a G. Wadell, Arch Virol. 101:65-77 (1998); R. Wigand, et al., Intervirology. 30:1-9 (1989)). Restriční fragmenty pokrývající celý genom C68 se subklonovaly do plasmidů. Schématické znázornění C68 genomu je uvedeno na obr. 1A a Pst-I, BamHI a HindIII fragmenty, které byly klonovány do plasmidových vektorů, jsou uvedeny v nešrafovaných rámečcích, na obr. 1B, 1C a 1D, v příslušném pořadí. Klonované fragmenty, velikost fragmentů a genomová pozice jsou také uvedeny v tabulce 2. Oba plasmidové klony a genomová DNA se použily jako templáty pro sekvenování. Genom se sekvenoval nejprve procházením v obou směrech a každá base byla průměrem čtyřech reakcí.

C68 genom má délku 36521 bp [viz US Patent 6,083,716]. Předběžné srovnání s GenBank sekvencemi ukázalo různý stupeň podobnosti s dalšími lidskými a zvířecími adenoviry v celé délce virového genomu. V C68 genomu byly nalezeny regiony s homologií ke všem dříve popsáným adenovirovým genetickým jednotkám, časné regiony 1-4 a hlavní pozdní geny (Obr. 1A). DNA homologie mezi C68 a lidskými adenoviry, které byly kompletně sekvenovány, Ad2 (NC001405), AdS (NC001405), Ad12 (NC001460), Ad17 (NC002067) a Ad40 (NC01464), se použila pro seřazení klonů. Určily se otevřené čtecí rámce (ORF) a identifikovaly se geny na základě homologie s jinými lidskými adenoviry. Všechny hlavní adenovirové časné a pozdní geny jsou přítomné v C68. Invertované terminální repetitivní sekvence (ITR=s) mají délku 130 bp.

Příklad 13 - Analýza C68 sekvence

Kompletní nukleotidové sekvence všech členů Mastadenovirové čeledi dostupné z GenBank, včetně izolátů z různých druhů, se testovaly na identitu s C68. Ad4 minigenom se sestavil z následující GenBank sekvence: Levostranný ITR (J01964); E1A region (M14918); DNA pol a pTP (X74508, 74672); VA RNA-I, II (U10682); 52, 55K (U52535); pVII (U70921); hexon (X84646); endoproteasa (M16692); DNA-vazebný protein (M12407); fiber (X76547); pravostranný ITR (J01965). Ad7 kompozitní genom se vytvořil z dat pro následující sekvence: Mu 3-21 (X03000); VA RNA-I, II, pTP & 52, 55K (U52574); penton (AD001675); pVI, hexon a endoproteasa (AF065065); DNA-vazebný protein (K02530); E3 a fiber region (AFI 04384); pravostranný ITR (V00037).

Seřazení aminokyselinové sekvence se provedlo za použití Clustal X, editované s Jalview (<http://www.ebi.ac.uk/~michele/jalview/>), a analýza se provedla za použití Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Veřejně dostupné sekvence hexonových proteinů od všech lidských adenovirových serotypů se nejprve seřadily pro to, aby se identifikovala sada vykazující nejvyšší homologii s C68.

Nukleotidová sekvence a předpokládaná aminokyselinová sekvence všech významných otevřených čtecích rámců v C68 genomu se srovnávaly se známými DNA a proteinovými sekvencemi. Nukleotidová sekvence C68 se srovnávala se sekvencí Ad 2, 4, 5, 7, 12, 17 a 40. V souladu s předešlou restriční analýzou (Kitchingman, viz výše; Li and Wadell, viz výše) je C68 nejvíce podobný lidskému Ad4 (podskupina E).

E1A region C68 se rozkládá od TATA boxu v nt 480 do poly A adičního místa v nt 1521, konvenční sestřihová donorová a akceptorová místa jsou v analogických pozicích jako místa lidského Ad, a 28.2K a 24.8K proteiny mají podobnou velikost jako proteiny lidského Ad. ORF pro nejmenší E1A protein C68 kóduje 101 zbytků, oproti přibližně 60 aminokyselinám pro jiné adenoviry. U C68 je TTA kodon ve zbytku 60, kde mají ostatní adenoviry často TGA stop kodon. Prvních 60 zbytků C68 E1A 100R proteinu má 85% identitu s Ad4 homologem.

C68 genom kóduje čtyři E1B proteiny, 20.5K, 54.7K, 10.1K a 18.5K, stejně jako pIX. Všech pět C68 kodovaných proteinů má podobnou velikost jako E1B a pIX proteiny jiných adenovirů. Ad4 homolog E1B 21K proteinu je tvořen pouze 142 aminokyselinami, zatímco C68 má 186 zbytků a další lidské adenoviry mají 163-178 zbytků. C68 a Ad4 proteiny vykazují 95% identitu s prvními 134 aminokyselinami, potom podobnost končí a Ad4 protein končí ve 142 aminokyselině.

C68 genom kóduje homolog E2A 55K DNA vazebného proteinu a Iva2 maturačního proteinu, stejně jako E2B terminální protein a DNA polymerasu. Všechny proteiny E2 regionu mají podobnou velikost jako jejich protějšky u lidského Ad, a E2B proteiny jsou zejména dobře konzervovány. C68 E2B 123.6K DNA polymerasa má předpokládanou velikost 1124 zbytků, Ad4 má předpokládanou velikost 1193, ačkoliv jiné lidské adenoviry mají menší polymerasy. Zbytky 1-71 Ad4 polymerasy nemají žádnou podobnost s jakoukoliv jinou Ad polymerasou, a je možné, že tento protein ve skutečnosti začíná na vnitřním ATG kodonu. V aminokyselinách 72-1193 mají Ad4 a C68 polymerasy 96% aminokyselinovou identitu.

Dosud sekvenované E3 regiony lidského adenoviry vykazují významnou variabilitu sekvence a kódovací kapacity. Ad40 obsahuje pět genů E3 regionu, Ad12 šest, C68 a AdS sedm, Ad38 osm a Ad3, stejně jako Ad7 (podskupina B lidského adenoviru) mají devět domnělých genů E3 regionu. Ad4 E3 region nebyl dosud sekvenován. Ve srovnání s E3 regionem Ad35 byly v C68 genomu identifikovány všech 7 homologů E3 genu (C. F. Basler and M.S. Horwitz, J Virology, 215:165-177 (1996)).

C68 E4 region má 6 ORF a každý je homologní s proteiny v lidském Ad5, 12 a 40 E4 regionech. E4 nomenklatura je zmatená, protože ORF2 homology C68, Ad12 a Ad40, mají přibližně 130 zbytků, zatímco v Ad5 jsou dva ORF kódující proteiny o 64 a 67 zbytcích s homologií, v příslušném pořadí, s amino a karboxy konci větších ORF2 proteinů. ORF5 byl v naší nomenklatuře vynechán, protože 5. ORF v E4 regionu je homologní s rozsáhle studovaným ORF6 proteinem lidského Ad5.

Hlavní pozdní promotor a trojdílná vedoucí sekvence C68 genomu byly lokalizované. ORF s potenciálem ke kódování 15 hlavních pozdních proteinů byly lokalizované. Všechny C68 pozdní proteiny mají podobnou velikost jako jejich protějšky v lidském Ad. Procento aminokyselinové identity mezi šimpanzími a lidskými Ad pozdními proteiny se značně lišilo. C68 fiber protein má předpokládaně 90% aminokyselinovou identitu s Ad4 proteinem, ale mnohem menší podobnost s fiber proteiny jiných lidských Ad. CAR vazebné místo v kulovitém zakončení fiber proteinu je přítomné v C68.

Příklad 14- Test na protilátky neutralizující virus

Několik pokusů bylo provedeno pro stanovení toho, zda existuje zkřížená reaktivita mezi typově specifickým antisérem C68 a lidským adenovirem. Neutralizační aktivita séra se testovala následujícím způsobem. Panely séra od normálních jedinců (N=50), makaků rhesus (N=52) a šimpanzů (N=20) se hodnotily na neutralizační protilátky k vektorům na bázi Ad5 a C68 za použití 293 buněk jako indikátorové buněčné linie. Séra odebraná od jednotlivých lidí, makaků rhesus nebo šimpanzů se inaktivovala při 56°C na dobu 30 minut. Sériová ředění každého vzorku (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 v 100 µl DMEM obsahujícím 10% FCS) se přidala do stejných množství H5.010CMVEGFP (1000 PFU/jamku) nebo C68CMVEGFP viru a provedla se inkubace při 4 °C po dobu 2 hodin. 150 µl směsi se přeneslo na 2 x 10² 293 buněk v 96 - jamkové plotně s plochým dnem. Kontrolní jamky se infikovaly stejnou dávkou viru (bez přidání séra). Vzorky se inkubovaly při 37°C v 5% CO₂ po dobu 48 hodin a vyšetřovaly se ve fluorescentním mikroskopu. Ředění vzorků, která vykazovala >50% redukci ložisek zelené fluorescence ve srovnání s infikovanými kontrolami se považovala za pozitivní na neutralizační protilátky.

Jak se předpokládalo, přibližně 35% normálních lidí mělo neutralizační protilátky k Ad5, což je frekvence mnohem vyšší než frekvence pozorovaná v sérech makaků rhesus a šimpanzů. Neutralizační protilátky k C68 byly pozorovány u 80% šimpanzů a pouze u 2% normálních lidí nebo makaků rhesus. Titry neutralizačních protilátek u jiných než cílových druhů byly obecně nízké.

Pro další hodnocení zkřížené reaktivity C68 s lidskými adenovirovými vektory se myši imunizovaly 2 x 10⁷ plaky

tvořících jednotek (pfu) Ad 2, 4, 5, 7 a 12, stejně jako C68. Sérum se odebralo o dva týdny později a testovalo se na protilátky, které neutralizují Ad5 nebo C68 vektory. Neutralizační protilátky k Ad5 vektoru byly detekovány pouze u zvířat imunizovaných Ad5. Důležité je to, že jedinými zvířaty s neutralizačními protilátkami k C68 vektoru byla ta zvířata, která byla imunizovaná C68 vektorem; žádné testované lidské serotypy, včetně Ad4, negenerovaly u myši protilátky, které by neutralizovaly C68 in vitro.

Pro použití C68 vektoru u člověka je důležitá absence neutralizačních protilátek v lidské populaci. V naší studii vyšetření 50 normálních lidí nedetekovalo žádné významné neutralizační protilátky ($>1:10$) při použití stejného testu, který detekoval neutralizační protilátky u $>50\%$ šimpanzů. Dále, sérum od myši imunizovaných více serotypy lidského Ad, včetně Ad4, neneutralizovalo infekci C68.

V jiném pokusu se skupiny 10-12 ICR myši vakcinovaly různými dávkami Adhu5rab.gp nebo AdC68rab.gp vakcíny podanými podkožně (s.c.), intranasálně (i.n.) nebo orálně (per os). Myším se odebrala krev o 21 dnů později a určily se titry protilátek neutralizujících virus (VNA) v mezinárodních jednotkách. Myši se za 4 týdny po vakcinaci infikovaly 10 průměrnými letálními dávkami CVS-24 viru, které se aplikovaly přímo do centrálního nervového systému.

Dávka vakcíny	Titry VNA (% přežití po infekci)			
	5×10^7	5×10^6	5×10^5	5×10^4
Adhu5rab.gp, s.c.	972 (100)	324 (100)	108 (100)	12 (100)
AdC68rab.gp, s.c.	240 (100)	36 (100)	12 (30)	8 (80)
Adhu5rab.gp, i.n.	nt	162 (100)	162 (100)	18 (50)
AdC68rab.gp, i.n.	nt	54 (100)	162 (100)	18 (50)
	2×10^7	2×10^6	2×10^5	2×10^4
Adhu5rab.gp, per os	108 (100)	54 (88)	18 (80)	4 (30)
AdC68rab.gp, per os	108 (100)	36 (78)	12 (55)	0,2 (0)

Tato data ukazují, že AdC68 konstrukt neočekávaně indukuje lepší protektivní protilátkovou odpověď při nižší intranasální dávce než lidský typ 5.

Příklad 15 - Strukturální analýza hexonových proteinů

Absence neutralizačních protilátek mezi C68 a lidskými serotypy nás donutila opatrněji hodnotit strukturální odlišnosti v regionech hexonu, o kterých se předpokládá, že nesou typově specifické epitopy. Předešlé pokusy naznačily, že tyto epitopy jsou lokalizované v 7 hypervariabilních regionech hexonu, které určily Crawford-Miksza a Schnurr (J. Virol, 70:1836-1844 (1996)). Srovnání aminokyselinových sekvencí hexonových proteinů mezi C68 a několika lidskými adenoviry je uvedeno na obr. 2. Dále, C68 je významně odlišný ve významných regionech těchto hypervariabilních sekvencí. Přesnější modelování trojrozměrné struktury hexonu C68 se provedlo pro mapování jedinečné sekvence. Modely

struktury hexonu z C68 a Ad4 se připravily na základě rentgenové krystalové struktury hexonů pro Ad2 a Ad5.

Rentgenové krystalové struktury Ad5 hexonu (Protein Data Bank identifikační označení 1RUX) (J. J. Rux a R. M. Burnett, Mol. Ther. 1:18-30 (2000)), a struktury Ad2 hexonu (F. K. Athappilly, et al, J. Mol. Biol., 242: 430-455 (1994)), byly dále upraveny tak, aby se získaly současné modely hexonů (Rux a Burnett, bude publikováno jinde). Modely homologních C68 a Ad4 hexonů byly nejprve produkovány za použití Swiss-Pdb Viewer protein-modelovacího prostředí (N. Guez and M.C. Peitsch, Electrophoresis, 18:2714-2723 (1997)). Tento automatizovaný postup se použil pro seřazení aminokyselinových sekvencí C68 a Ad4 hexonů s krystalovou strukturou Ad2 a Ad5 hexonů. Seřazení sekvencí se použilo pro dosazení modelové sekvence do známých molekulárních struktur. Pozice zbytků ve vedlejších řetězcích nenalezené ve známých strukturách se vybraly z knihovny protomerů vedlejších řetězců. Tyto počáteční molekulové modely se potom manuálně upravily tak, aby se zlepšilo automatické seřazení, pomocí přesunu mezer do exponovaných variabilních regionů a optimalizací sbalení vedlejších řetězců. Pozice externích smyček nepozorovaných v Ad2 a Ad5 templátových strukturách se buď vybraly z knihovny známých smyček, nebo se upravily manuálně. Konformace každého modelu byla dále upravena minimalizací energie za použití programu pro molekulární mechaniku CHARMM (B. R. Brooks, et al, J. Comp. Chem., 4:187-217 (1983)). Struktury těchto C68 a Ad4 hexonových modelů se potom porovnaly a vypočetlo se nové seřazení sekvence. Odlišnosti mezi dvěma strukturálně seřazenými sekvencemi se použily pro barevné zobrazení modelů homologie. Grafické znázornění připravené v Swiss-PdbViewer programu se exportovalo a převedlo se do

Persistence of Vision Ray Tracer programu (POV-Ray 2000, Version 3,1g).

Ačkoliv je celková C68 sekvence velmi podobná sekvenci Ad4 hexonu, jsou odlišnosti mezi těmito dvěma sekvencemi primárně přítomné v DE1 a FG1 smyčkách a tyto smyčky obsahují všech sedm hypervariabilních regionů. DE1, FG1 a FG2 smyčky, každá z jiné podjednotky, intimně asociují a tvoří věžovitou doménu na vrcholu trimerické molekuly. Hexonová věž tvoří značnou část zevního povrchu virionu a vytváří místa pro navázání protilátek. Strany a baze hexonů jsou v kontaktu s kapsidou a tak jsou tyto regiony chráněny před vazbou protilátky a jejich sekvence jsou konzervovány. Naopak, sekvence C68 a Ad4 jsou dosti odlišné od v různých hexonových věžích. Toto vysvětluje, proč nejsou protilátky proti těmto virům zkříženě reaktivní.

Všechny publikace citované v této přihlášce a seznam sekvencí jsou zde uvedeny jako odkazy. Ačkoliv byl vynález popsán na konkrétních provedeních, je jasné, že existují modifikace uvedených provedení, které spadají do rozsahu předkládaného vynálezu, jak je definován v připojených patentových nárocích.

Seznam sekvencí

<110> The Wistar Institute of Anatomy and Biology
The Trustees of The University of Pennsylvania
Ertl, Hildegund C.J.
Wilson, James M.

<120> Způsoby pro indukování cytotoxické imunitní reakce a přípravky rekombinantního
opičního adenoviru použitelné v těchto způsobech

<130> WST104A/UPNN2628A

<150> US 60/300,131

<151> 2001-06-22

<150> US 60/304,843

<151> 2001-07-12

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificiální sekvence

<220>
<223> Syntetický peptid nesoucí imunodominantní CD8+ T-lymfocytární epitop pro H-2d
haplotyp

<400> 1

Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> 5' primer pro glykoprotein viru vztekliny

<400> 2

aagcattttcc gcccaacac

19

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificiální sekvence

<220>

<223> 3' primer pro glykoprotein viru vztekliny

<400> 3
ggtagtgga gcagtaggta ga 22

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificiální sekvence

<220>
<223> 5' primer pro glutaraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasu (GAPDH)

<400> 4
ggtgaaggtc ggtgtgaacg gattt 25

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificiální sekvence

<220>
<223> 3' primer pro GAPDH

<400> 5
aatgccaag ttgtcatgga tgacc 25

<210> 6
<211> 7228
<212> DNA
<213> Artificiální sekvence

<220>
<223> Modifikovaná HIV-1 gag sekvence

<220>
<221> CDS
<222> (729)..(1820)
<223>

<400> 6
tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgaccttttg atggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatogagc tttctacaag ggactttccg 360
ctgggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420

gctacatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc tctgggttaga ccagatctga 480
 gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccaactgctta agcctcaata aagcttgcc 540
 tgagtgtca aagtagtggtg tgcccgctctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600
 agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
 cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcgtcg 720
 acagagag atg ggt gcg aga gcg tca gta tta agc ggg gga gaa tta gat 770
 Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp
 1 5 10
 cga tgg gaa aaa att cgg tta agg cca ggg gga aag aag aag tac aag 818
 Arg Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys
 15 20 25 30
 cta aag cac atc gta tgg gca agc agg gag cta gaa cga ttc gca gtt 866
 Leu Lys His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val
 35 40 45
 aat cct ggc ctg tta gaa aca tca gaa ggc tgt aga caa ata ctg gga 914
 Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly
 50 55 60
 cag cta caa cca tcc ctt cag aca gga tca gag gag ctt cga tca cta 962
 Gln Leu Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu
 65 70 75
 tac aac aca gta gca acc ctc tat tgt gtg cac cag cgg atc gag atc 1010
 Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile
 80 85 90
 aag gac acc aag gaa gct tta gac aag ata gag gaa gag caa aac aag 1058
 Lys Asp Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys
 95 100 105 110
 tcc aag aag aag gcc cag cag gca gca gct gac aca gga cac agc aat 1106
 Ser Lys Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn
 115 120 125
 cag gtc agc caa aat tac cct ata gtg cag aac atc cag ggg caa atg 1154
 Gln Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met
 130 135 140
 gta cat cag gcc ata tca cct aga act tta aat gca tgg gta aaa gta 1202
 Val His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val
 145 150 155
 gta gaa gag aag gct ttc agc cca gaa gtg ata ccc atg ttt tca gca 1250
 Val Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala
 160 165 170
 tta tca gaa gga gcc acc cca cag gac ctg aac acg atg ttg aac acc 1298
 Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr

175	180	185	190	
gtg ggg gga cat caa gca gcc atg caa atg tta aaa gag acc atc aat				1346
Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn				
195		200	205	
gag gaa gct gca gaa tgg gat aga gtg cat cca gtg cat gca ggg cct				1394
Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro				
210		215	220	
att gca cca ggc cag atg aga gaa cca agg gga agt gac ata gca gga				1442
Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly				
225		230	235	
act act agt acc ctt cag gaa caa ata gga tgg atg aca aat aat cca				1490
Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro				
240		245	250	
cct atc cca gta gga gag atc tac aag agg tgg ata atc ctg gga ttg				1538
Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu				
255		260	265	270
aac aag atc gtg agg atg tat agc cct acc agc att ctg gac ata aga				1586
Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg				
275		280	285	
caa gga cca aag gaa ccc ttt aga gac tat gta gac cgg ttc tat aaa				1634
Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys				
290		295	300	
act cta aga gct gag caa gct tca cag gag gta aaa aat tgg atg aca				1682
Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr				
305		310	315	
gaa acc ttg ttg gtc caa aat gcg aac cca gat tgt aag acc atc ctg				1730
Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu				
320		325	330	
aag gct ctc ggc cca gcg gct aca cta gaa gaa atg atg aca gca tgt				1778
Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Met Met Thr Ala Cys				
335		340	345	350
cag gga gta gga gga ccc ggc cat aag gca aga gtt ttg tag				1820
Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu				
355		360		
ggatccacta gttctagact cgaggggggg cccggtacct ttaagaccaa tgacttacaa				1880
ggcagctgta gatcttagcc acttttttaa agaaaagggg ggactggaag ggctaattca				1940
ctoccaaaga agacaagata tccttgatct gtggatctac cacacacaag gctacttccc				2000
tgattggcag aactacacac cagggccagg ggtcagatat ccaactgacct ttggatgggtg				2060
ctacaagcta gtaccagttg agccagataa ggtagaagag gccataaag gagagaacac				2120
cagcttggtta caccctgtga gcctgcatgg aatggatgac cctgagagag aagtgttaga				2180

gtggaggttt gacagccgcc tagcatttca tcacgtggcc cgagagctgc atccggagta 2240
 cttcaagaac tgctgacatc gagcttgcta caagggactt tccgctgggg actttccagg 2300
 gaggcgtggc ctgggcggga ctggggagtg gcgagccctc agatgctgca tataagcagc 2360
 tgctttttgc ctgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg 2420
 gctaactagg gaaccactg ctttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag 2480
 tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagacc ttttagtcag 2540
 tgtggaaaat ctctagcacc ccccaggagg tagaggttgc agtgagccaa gatcgcgcca 2600
 ctgcattcca gcctgggcaa gaaaacaaga ctgtctaaaa taataataat aagttaaggg 2660
 tattaaatat atttatacat ggaggtcata aaaatatata tatttgggct gggcgagtg 2720
 gctcacacct gcgcccggcc ctttgggagg ccgaggcagg tggatcacct gagtttggga 2780
 gttccagacc agcctgacca acatggagaa accccttctc tgtgtatttt tagtagattt 2840
 tattttatgt gtattttatt cacagytatt tctggaaaac tgaaactggt tttcctctac 2900
 tctgatacca caagaatcat cagcacagag gaagacttct gtgatcaaat gtggtgggag 2960
 agggaggttt tcaccagcac atgagcagtc agttctgccg cagactcggc ggggtgcctt 3020
 cggttcagtt ccaacaccgc ctgcctggag agaggtcaga ccacaggggtg agggctcagt 3080
 cccaagaca taaacacca agacataaac acccaacagg tccacccgc ctgctgcccc 3140
 ggcagagccg attcaccaag acgggaatta ggatagagaa agagtaagtc acacagagcc 3200
 ggctgtgagg gagaacggag ttctattatg actcaaatca gtctcccaa gcattcgggg 3260
 atcagagttt ttaaggataa cttagtgtgt agggggccag tgagttggag atgaaagcgt 3320
 agggagtcga aggtgtcctt ttgcgccgag tcagttcctg ggtggggggc acaagatcgg 3380
 atgagccagt ttatcaatcc gggggtgcca gctgatccat ggagtgcagg gtctgcaaaa 3440
 tatctcaagc actgattgat cttagggttt acaatagtga tgttaccca ggaacaattt 3500
 ggggaaggtc agaattctgt agcctgtagc tgcattgactc cttaaaccata atttcttttt 3560
 tgtttttttt tttttatttt tgagacaggg tctcactctg tcacctaggc tggagtgcag 3620
 tggtgcaatc acagctcact gcagcccta gagcgccgc caccgcggtg gagtccaat 3680
 togcctata gtgagtcgta ttacaattca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg 3740
 gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgcagctgg 3800
 cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag cctgaatggc 3860

gaatggcgcg aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa 3920
 atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggaacaa tcccttataa atcaaaagaa 3980
 tagaccgaga taggggtgag tggtgttcca gtttgaaca agagtccact attaaagaac 4040
 gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa 4100
 ccatcacctt aatcaagttt tttggggtcg aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct 4160
 aaaggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 4220
 ggaagaaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cagcgtgcgc 4280
 gtaaccacca caccgccgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtccca ggtggcactt 4340
 ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt 4400
 atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta 4460
 tgagtattca acatttccgt gtgcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttccctg 4520
 tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac 4580
 gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt tttcgccccg 4640
 aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc 4700
 gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg 4760
 ttgagtactc accagtcaca gaaaagcacc ttacggatgg catgacagta agagaattat 4820
 gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg 4880
 gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg 4940
 atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaacga cgagcgtgac accacgatgc 5000
 ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt 5060
 cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct 5120
 cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc 5180
 gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca 5240
 cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag atagggtgcct 5300
 cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt 5360
 taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga 5420
 ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca 5480
 aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac 5540
 caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 5600

taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtect tctagtgtag ccgtagttag	5660
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac	5720
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	5780
taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa cggggggttc gtgcacacag cccagcttgg	5840
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc	5900
ttcccgagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg acaggagagc	5960
gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc	6020
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa	6080
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt	6140
tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg	6200
ataccgctcg ccgagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggag	6260
agcgcccaat acgcaaaccg cctctcccg cgcgttgcc gattcattaa tgagctggc	6320
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	6380
tcactcatta ggcacccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	6440
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagctcg	6500
gaattaaccc tcactaaagg gaacaaaagc tgctgcaggg tccctaactg ccaagcccca	6560
cagtgtgccc tgaggctgcc ccttccttct agcggctgcc cccactcggc tttgctttcc	6620
ctagtttcag ttacttgct tcagccaagg tctgaaacta ggtgcgcaca gagcggtaag	6680
actgcgagag aaagagacca gctttacagg gggtttatca cagtgcaccc tgacagtcgt	6740
cagcctcaca gggggtttat cacattgcac cctgacagtc gtcagcctca cagggggttt	6800
atcacagtgc acccttaca tcattccatt tgattcaca ttttttagt ctctactgtg	6860
cctaacttgt aagttaaatt tgatcagagg tgtgttccca gaggggaaaa cagtatatac	6920
agggttcagt actatcgcat ttcaggcctc cacctgggtc ttggaatgtg tccccgagg	6980
ggtgatgact acctcagttg gatctccaca ggtcacagt acacaagata accaagacac	7040
ctcccaaggc taccacaatg ggccgcctc cactgcaca tggccggagg aactgccatg	7100
toggaggtgc aagcacacct gcgcatcaga gtccttggtg tggaggagg gaccagcgca	7160
gcttcagcc atccacctga tgaacagaac ctagggaaag cccagttct acttacacca	7220
ggaaaggc	7228

<210> 7
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Artificiální sekvence
 <220>
 <223> Modifikovaná HIV-1 gag sekvence
 <400> 7

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
 50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
 65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
 85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
 100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
 115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
 130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
 145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
 165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
 180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu
355 360

<210> 8

<211> 311

<212> PRT

<213> Šimpanzi typ adenoviru

<400> 8

Asn Thr Cys Gln Trp Thr Tyr Lys Ala Asp Gly Glu Thr Ala Thr Glu
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Thr Tyr Gly Asn Ala Pro Val Gln Gly Ile Asn Ile Thr
20 25 30

Lys Asp Gly Ile Gln Leu Gly Thr Asp Thr Asp Asp Gln Pro Ile Tyr
35 40 45

Ala Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu Pro Gln Val Gly Asp Ala Glu Trp
50 55 60

His Asp Ile Thr Gly Thr Asp Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Pro Asp Thr Lys Met Lys Pro Cys Tyr Gly Ser Phe Ala Lys Pro Thr
85 90 95

Asn Lys Glu Gly Gly Gln Ala Asn Val Lys Thr Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Lys Glu Tyr Asp Ile Asp Met Ala Phe Phe Asp Asn Arg Ser Ala Ala
115 120 125

Ala Ala Gly Leu Ala Pro Glu Ile Val Leu Tyr Thr Glu Asn Val Asp
130 135 140

Leu Glu Thr Pro Asp Thr His Ile Val Tyr Lys Ala Gly Thr Asp Asp
145 150 155 160

Ser Ser Ser Ser Ile Asn Leu Gly Gln Gln Ala Met Pro Asn Arg Pro
165 170 175

Val Tyr Ile Gly Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn
180 185 190

Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn
195 200 205

Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu
210 215 220

Leu Leu Asp Ser Leu Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn
225 230 235 240

Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His

245

250

255

Gly Val Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Asp Ala Val
260 265 270

Gly Arg Thr Asp Thr Tyr Gln Gly Ile Lys Ala Asn Gly Thr Asp Gln
275 280 285

Thr Thr Trp Thr Lys Asp Asp Ser Val Asn Asp Ala Asn Glu Ile Gly
290 295 300

Lys Gly Asn Pro Phe Ala Met
305 310

<210> 9

<211> 314

<212> PRT

<213> Lidský adenovirus typu 4

<400> 9

Asn Thr Cys Gln Trp Lys Asp Ser Asp Ser Lys Met His Thr Phe Gly
1 5 10 15

Ala Ala Ala Met Pro Gly Val Thr Gly Lys Lys Ile Glu Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Pro Ile Arg Ile Asp Ser Thr Ser Gly Thr Asp Thr Val Ile Tyr
35 40 45

Ala Asp Lys Thr Phe Gln Pro Glu Pro Gln Val Gly Asn Asp Ser Trp
50 55 60

Val Asp Thr Asn Gly Ala Glu Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Thr Thr Lys Met Asn Pro Cys Tyr Gly Ser Phe Ala Lys Pro Thr
85 90 95

Asn Lys Glu Gly Gly Gln Ala Asn Leu Lys Asp Ser Glu Pro Ala Ala
100 105 110

Thr Thr Pro Asn Tyr Asp Ile Asp Leu Ala Phe Phe Asp Ser Lys Thr
115 120 125

Ile Val Ala Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Val Met Tyr Thr Glu Asn Val
130 135 140

Asp Leu Gln Thr Pro Asp Thr His Ile Val Tyr Lys Pro Gly Thr Glu
145 150 155 160

Asp Thr Ser Ser Glu Ser Asn Leu Gly Gln Gln Ala Met Pro Asp Arg
165 170 175

Pro Asn Tyr Ile Gly Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr
180 185 190

Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu
195 200 205

Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln
210 215 220

Leu Leu Leu Asp Ser Leu Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp
225 230 235 240

Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn
245 250 255

His Gly Val Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Asn Gly
260 265 270

Val Gly Leu Thr Asp Thr Tyr Gln Gly Val Lys Val Lys Thr Asp Ala
275 280 285

Gly Ser Glu Lys Trp Asp Lys Asp Asp Thr Thr Val Ser Asn Ala Asn
290 295 300

Glu Ile His Val Gly Asn Pro Phe Ala Met
305 310

<210> 10

<211> 318

<212> PRT

<213> Lidský adenovirus typu 16

<400> 10

Asn Thr Cys Gln Trp Lys Asp Ser Asp Ser Lys Met His Thr Phe Gly

1 5 10 15

Val Ala Ala Met Pro Gly Val Thr Gly Lys Lys Ile Glu Ala Asp Gly
20 25 30

Leu Pro Ile Gly Ile Asp Ser Thr Ser Gly Thr Asp Thr Val Ile Tyr
35 40 45

Ala Asp Lys Thr Phe Gln Pro Glu Pro Gln Val Gly Asn Ala Ser Trp
50 55 60

Val Asp Ala Asn Gly Thr Glu Glu Lys Tyr Gly Gly Arg Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Thr Thr Lys Met Lys Pro Cys Tyr Gly Ser Phe Ala Lys Pro Thr
85 90 95

Asn Lys Glu Gly Gly Gln Ala Asn Leu Lys Asp Ser Glu Thr Ala Ala
100 105 110

Thr Thr Pro Asn Tyr Asp Ile Asp Leu Ala Phe Phe Asp Asn Lys Asn
115 120 125

Ile Ala Ala Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Val Met Tyr Thr Glu Asn Val
130 135 140

Asp Leu Gln Thr Pro Asp Thr His Ile Val Tyr Lys Pro Gly Thr Glu
145 150 155 160

Asp Thr Ser Ser Glu Ser Asn Leu Gly Gln Gln Ala Met Pro Asn Arg
165 170 175

Pro Asn Tyr Ile Gly Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr
180 185 190

Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu
195 200 205

Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln
210 215 220

Leu Leu Leu Asp Ser Leu Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp
225 230 235 240

Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn
245 250 255

His Gly Val Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Asn Gly
260 265 270

Val Gly Phe Thr Asp Thr Tyr Gln Gly Val Lys Val Lys Thr Asp Ala
275 280 285

Val Ala Gly Thr Ser Gly Thr Gln Trp Asp Lys Asp Asp Thr Thr Val
290 295 300

Ser Thr Ala Asn Glu Ile His Gly Gly Asn Pro Phe Ala Met
305 310 315

<210> 11
<211> 323
<212> PRT
<213> Lidský adenovirus typu 3

<400> 11

Asn Thr Ser Gln Trp Ile Val Thr Thr Asn Gly Asp Asn Ala Val Thr
1 5 10 15

Thr Thr Thr Asn Thr Phe Gly Ile Ala Ser Met Lys Gly Gly Asn Ile
20 25 30

Thr Lys Glu Gly Leu Gln Ile Gly Lys Asp Ile Thr Thr Thr Glu Gly
35 40 45

Glu Glu Lys Pro Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu Pro Gln
50 55 60

Val Gly Glu Glu Ser Trp Thr Asp Thr Asp Gly Thr Asn Glu Lys Phe
65 70 75 80

Gly Gly Arg Ala Leu Lys Pro Ala Thr Asn Met Lys Pro Cys Tyr Gly
85 90 95

Ser Phe Ala Arg Pro Thr Asn Ile Lys Gly Gly Gln Ala Lys Asn Arg
100 105 110

Lys Val Lys Pro Thr Thr Glu Gly Gly Val Glu Thr Glu Glu Pro Asp
115 120 125

Ile Asp Met Glu Phe Phe Asp Gly Arg Asp Ala Val Ala Gly Ala Leu
130 135 140

Ala Pro Glu Ile Val Leu Tyr Thr Glu Asn Val Asn Leu Glu Thr Pro
145 150 155 160

Asp Ser His Val Val Tyr Lys Pro Glu Thr Ser Asn Asn Ser His Ala
165 170 175

Asn Leu Gly Gln Gln Ala Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Gly Phe
180 185 190

Arg Asp Asn Phe Val Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met
195 200 205

Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu
210 215 220

Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Leu
225 230 235 240

Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser
245 250 255

Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Ile Glu Asp Glu
260 265 270

Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Asn Gly Ile Gly Pro Gly His Thr
275 280 285

Tyr Gln Gly Ile Lys Lys Val Lys Thr Asp Asp Thr Asn Gly Trp Glu
290 295 300

Lys Asp Ala Asn Val Ala Pro Ala Asn Glu Ile Thr Ile Gly Asn Asn
305 310 315 320

Leu Ala Met

<211> 315
 <212> PRT
 <213> Lidský adenovirus typu 7
 <400> 12

Asn Thr Ser Gln Trp Ile Val Thr Ala Gly Glu Glu Arg Ala Val Thr
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Asn Thr Phe Gly Ile Ala Ser Met Lys Gly Asp Asn Ile
 20 25 30

Thr Lys Glu Gly Leu Glu Ile Gly Lys Asp Ile Thr Ala Asp Asn Lys
 35 40 45

Pro Ile Tyr Ala Asp Lys Thr Tyr Gln Pro Glu Pro Gln Val Gly Glu
 50 55 60

Glu Ser Trp Thr Asp Thr Asp Gly Thr Asn Glu Lys Phe Gly Gly Arg
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Pro Ala Thr Lys Met Lys Pro Cys Tyr Gly Ser Phe Ala
 85 90 95

Arg Pro Thr Asn Ile Lys Gly Gly Gln Ala Lys Asn Arg Lys Val Lys
 100 105 110

Pro Thr Glu Gly Asp Val Glu Thr Glu Glu Pro Asp Ile Asp Met Glu
 115 120 125

Phe Phe Asp Gly Arg Glu Ala Ala Asp Ala Phe Ser Pro Glu Ile Val
 130 135 140

Leu Tyr Thr Glu Asn Val Asn Leu Glu Thr Pro Asp Ser His Val Val
 145 150 155 160

Tyr Lys Pro Gly Thr Ser Asp Asp Asn Ser His Ala Asn Leu Gly Gln
 165 170 175

Gln Ala Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile Gly Phe Arg Asp Asn Phe
 180 185 190

Val Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly Asn Met Gly Val Leu Ala
 195 200 205

Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val Asp Leu Gln Asp Arg Asn
210 215 220

Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Leu Gly Asp Arg Thr
225 230 235 240

Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val Asp Ser Tyr Asp Pro Asp
245 250 255

Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Ile Glu Asp Glu Leu Pro Asn Tyr
260 265 270

Cys Phe Pro Leu Asp Gly Ile Gly Pro Ala Lys Thr Tyr Gln Gly Ile
275 280 285

Lys Ser Lys Asp Asn Gly Trp Glu Lys Asp Asp Asn Val Ser Lys Ser
290 295 300

Asn Glu Ile Ala Ile Gly Asn Asn Gln Ala Met
305 310 315

<210> 13
<211> 345
<212> PRT
<213> Lidský adenovirus typu 2

<400> 13

Asn Ser Cys Glu Trp Glu Gln Thr Glu Asp Ser Gly Arg Ala Val Ala
1 5 10 15

Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu
20 25 30

Gln Asn Ala Arg Asp Gln Ala Thr Lys Lys Thr His Val Tyr Ala Gln
35 40 45

Ala Pro Leu Ser Gly Glu Thr Leu Thr Lys Ser Gly Leu Gln Ile Gly
50 55 60

Ser Lys Asn Ala Glu Thr Gln Ala Lys Pro Val Tyr Ala Asp Pro Ser
65 70 75 80

Tyr Gln Pro Glu Pro Gln Ile Gly Glu Ser Gln Trp Asn Glu Ala Asp

85

90

95

Ala Asn Ala Ala Gly Gly Arg Val Leu Lys Lys Thr Thr Pro Met Lys
 100 105 110

Pro Tyr Gly Ser Tyr Ala Arg Pro Thr Asn Pro Phe Gly Gly Gln Ser
 115 120 125

Val Leu Val Pro Asp Glu Lys Gly Val Pro Leu Pro Lys Val Asp Leu
 130 135 140

Gln Phe Phe Ser Asn Thr Thr Ser Leu Asn Asp Arg Gln Gly Asn Ala
 145 150 155 160

Thr Lys Pro Lys Val Val Leu Tyr Ser Glu Asp Val Asn Met Glu Thr
 165 170 175

Pro Asp Thr His Leu Ser Tyr Lys Pro Gly Lys Gly Asp Glu Asn Ser
 180 185 190

Lys Ala Met Leu Gly Gln Gln Ser Met Pro Asn Arg Pro Asn Tyr Ile
 195 200 205

Ala Phe Arg Asp Asn Phe Ile Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Thr Gly
 210 215 220

Asn Met Gly Val Leu Ala Gly Gln Ala Ser Gln Leu Asn Ala Val Val
 225 230 235 240

Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp
 245 250 255

Ser Ile Gly Asp Arg Thr Arg Tyr Phe Ser Met Trp Asn Gln Ala Val
 260 265 270

Asp Ser Tyr Asp Pro Asp Val Arg Ile Ile Glu Asn His Gly Thr Glu
 275 280 285

Asp Glu Leu Pro Asn Tyr Cys Phe Pro Leu Gly Gly Ile Gly Val Thr
 290 295 300

Asp Thr Tyr Gln Ala Ile Lys Ala Asn Gly Asn Gly Ser Gly Asp Asn
 305 310 315 320

16.01.04

WO 03/000283

77

PCT/US02/15239

Gly Asp Thr Thr Trp Thr Lys Asp Glu Thr Phe Ala Thr Arg Asn Glu
325 330 335

Ile Gly Val Gly Asn Asn Phe Ala Met
340 345

P a t e n t o v é n á r o k y

1245

1. Použití rekombinantního adenoviru v přípravě léčiva pro indukování T-lymfocytární reakce na imunogen u jedince, kde uvedený rekombinantní opičí adenovirus přednostně indukuje CD8+ T-lymfocytární reakci na imunogen, když je podán podkožně, a dále kde uvedený rekombinantní adenovirus obsahuje molekulu nukleové kyseliny kódující imunogen pod kontrolou regulační sekvence, která řídí expresi imunogenu u jedince.

2. Použití rekombinantního adenoviru v přípravě léčiva pro indukování protilátkové odpovědi na imunogen u jedince, kde uvedený rekombinantní opičí adenovirus přednostně indukuje protilátkovou odpověď na antigen, když je v nízkých dávkách aplikován na sliznici, a kde uvedený rekombinantní adenovirus obsahuje molekulu nukleové kyseliny kódující imunogen pod kontrolou regulační sekvence, která řídí expresi imunogenu u jedince.

3. Způsob pro přednostní indukování CD8+ T-lymfocytární reakce na imunogen u jedince v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje krok aplikování rekombinantního opičího adenoviru obsahujícího molekulu nukleové kyseliny kódující imunogen pod kontrolou regulační sekvence, která řídí expresi imunogenu u jedince, uvedenému jedinci.

4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený rekombinantní opičí adenovirus je aplikován podkožně.

5. Způsob podle nároku 3 nebo nároku 4 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený rekombinantní opičí adenovirus je podán v nízké dávce.

6. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 3 až 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený rekombinantní opičí adenovirus je podán v účinné dávce, která je mezi 10^4 pfu a 10^6 pfu.

7. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 3 až 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený rekombinantní opičí adenovirus je rekombinantní C68 šimpanzí adenovirus.

8. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 3 až 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že imunogen je vybrán ze skupiny zahrnující peptid, polypeptid nebo protein odvozený z patogenního viru vybraného ze skupiny zahrnující virus lidské imunodeficiency-1, lidský papilloma virus a virus vztekliny.

9. Imunogenní kompozice použitelná pro indukci cytolytické imunitní reakce proti viru lidské imunodeficiency v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje (a) rekombinantní opičí adenovirus obsahující optimalizovanou sekvenci nukleové kyseliny kódující modifikovaný gag protein viru lidské imunodeficiency-1 a (b) fyziologicky kompatibilní nosič.

10. Způsob pro indukování CD8+ T-lymfocytární odpovědi na virus lidské imunodeficiency u savců v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání kompozice podle nároku 9 uvedeným savcům.

11. Použití imunogenní kompozice podle nároku 9 v přípravě léčiva pro indukování CD8+ T-lymfocytární reakce proti viru lidské imunodeficiency u savců.
12. Způsob pro indukování CD8+ T-lymfocytární reakce proti lidskému papilloma viru u savců v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání rekombinantního opičího adenoviru kódujícího imunogenní protein odvozený od lidského papilloma viru uvedenému savci.
13. Použití rekombinantního opičího adenoviru kódujícího imunogenní protein odvozený od lidského papilloma viru při přípravě léčiva pro indukci CD8+ T-lymfocytární reakce proti lidskému papilloma viru u savců.
14. Použití rekombinantního opičího adenoviru kódujícího imunogenní protein odvozený od viru vztekliny při přípravě léčiva pro indukování neutralizační protilátkové reakce proti viru vztekliny u savců.
15. Vakcína proti viru lidské imunodeficiency v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní opičí replikace-defektní adenovirus obsahující antigen viru lidské imunodeficiency-1 (HIV-1).
16. Vakcína podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigen je vybrán ze skupiny zahrnující obalový, pol nebo gag region HIV-1.
17. Vakcína podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigenem je přirozený antigen, ze kterého byly odstraněny elementy genetické nestability.

18. Vakcína podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že antigenem je HIV-1 gag cDNA obsahující sekvenci SEQ ID NO:6.

19. Vakcína podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že rekombinantním adenovirem je šimpanzí adenovirus s deletovaným E1 získaný ze šimpanzího kmene 68.

20. Vakcína proti vzteklině v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní opičí replikace-defektní adenovirus obsahující sekvenci nukleové kyseliny kódující antigen viru vztekliny pod kontrolou regulační sekvence, která řídí expresi antigenu viru vztekliny.

21. Způsob pro indukování CD8+ T-lymfocytární reakce a chránění zvířete před virem lidské imunodeficiencie v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podání vakcíny podle nároku 15 uvedenému zvířeti.

22. Replikace defektní opičí adenovirový vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje, v kapsidě opičího adenoviru, cis-elementy opičího adenoviru a heterologní gen operativně navázaný na sekvence řídící expresi, kde kapsida opičího adenoviru je odvozena z šimpanzího adenoviru vybraného ze skupiny zahrnující Pan 5, Pan 6 a Pan 7.

23. Replikace defektní opičí adenovirový vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje, v kapsidě opičího adenoviru, cis-elementy opičího adenoviru a heterologní gen operativně navázaný na sekvence řídící expresi, kde kapsida opičího adenoviru je odvozena z šimpanzího adenoviru vybraného ze skupiny zahrnující paviání adenovirus ATCC – VR 275, kmeny makaka rhesus, ATCC

— VR 209, ATCC — VR 275, ATCC VR 353, ATCC VR 355, a kmeny afrického makaka ATCC VR -541, ATCC VR 941, ATCC VR 942 a ATCC 943.

24. Opičí adenovirový vektor podle nároku 22 nebo nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je replikace-defektní v důsledku absence schopnosti exprimovat adenovirové E1a a E1b.

25. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v něm eliminován oddálený časný gen E3.

26. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že má funkční delecí v E4 genu.

27. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje delecí v oddáleném časném genu E2a.

28. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 27 v y z n a č u j í c í s e t í m, že má delecí v jakémkoliv z pozdních genů L1 až L5 genomu opičího adenoviru.

29. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že heterologní gen je určen k prevenci a léčbě onemocnění způsobeného virem vybraným ze skupiny zahrnující virus lidské imunodeficiencie, virus opičí imunodeficiencie, respiračně-syncytiální virus, virus parainfluenzy typu 1-3, chřipkový virus, herpes simplex virus, lidský cytomegalovirus, viry hepatitidy, lidský papillomavirus, poliovirus, rotavirus, caliciviry,

virus spalniček, virus zarděnek, virus příušnic, adenovirus, virus vztekliny, virus psinky, virus dobytčího moru, coronavirus, parvovirus, viry infekční rhinotracheitidy, virus kočičí leukemie, virus kočičí infekční peritonitidy, virus ptačí infekční bursitidy, virus Newcastle nemoci, virus Marekovi nemoci, virus prasečího respiračního a reprodukčního syndromu, virus koňské arteritidy a viry encephalitidy.

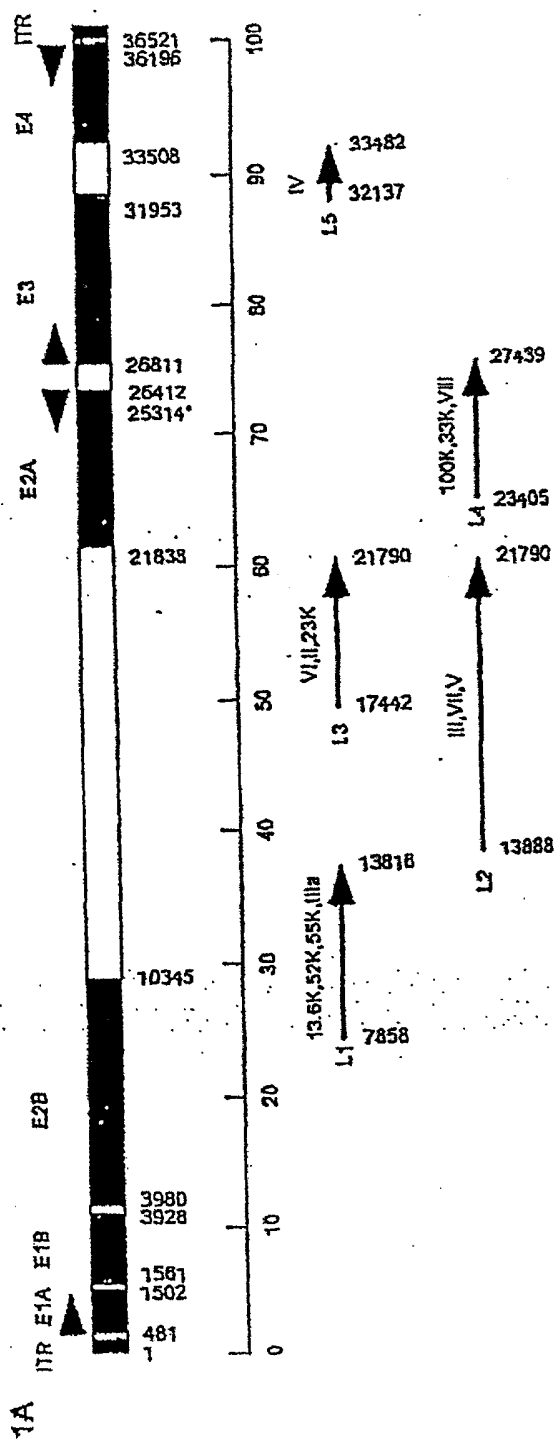
30. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že heterologní gen je určen k prevenci a léčbě onemocnění způsobeného bakterií vybrané ze skupiny zahrnující *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare complex*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* a *Mycoplasma gallisepticum*.

31. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že heterologní gen je určen k prevenci a léčbě onemocnění způsobeného houbou vybranou ze skupiny zahrnující *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* a *Histoplasma*.

32. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že heterologní gen je určen k prevenci a léčbě onemocnění způsobeného parazitem vybraným ze skupiny zahrnující *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* a *Pneumocystis carinii*.

33. Opičí adenovirový vektor podle jakéhokoliv z nároků 22 až 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, že heterologní gen je určen k vyvolání protinádorové reakce za použití nádorového antigenu nebo antigenu asociovaného s nádory vybraného ze skupiny zahrnující prostatický specifický antigen, karcino-embryonální antigen, MUC-1, Her2, CA-125 a MAGE-3.

34. Způsob přípravy vektoru podle jakéhokoliv z nároků 22 až 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje sestavení heterologního genu a ITR sekvence cis elementu opičího adenoviru.



Fragment
velikost fragmentu
PstI klony

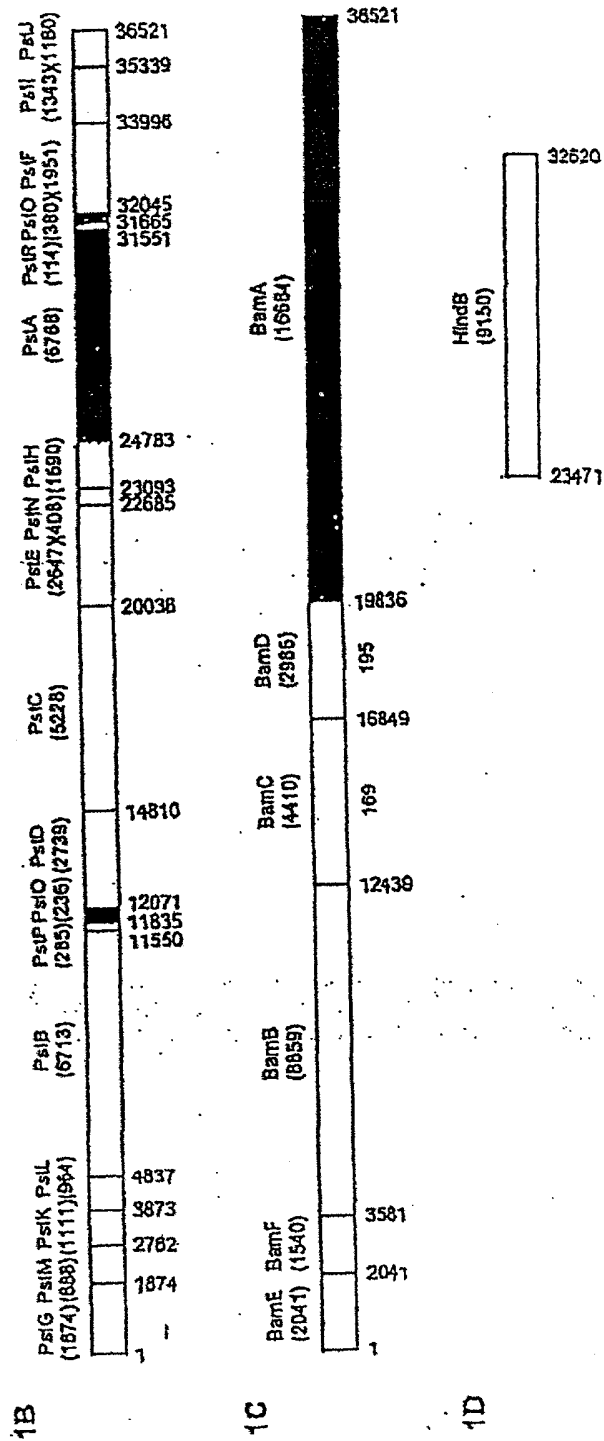
— hranice fragmentů

- Fragment
- velikost fragmentu
- BamHI klony

— hranice fragmentů

- Fragment
- velikost fragmentu
- HindIII klony

- branice fragmentu



Obr. 1

	C68	- E	NTCQWYKADGETA-TT-	KTYTVGNAPVQGIN	--ITKKDEIQLGTD--TT--DDQPI
	A _{d4}	- E	NTCQM--K-DS-	KMHTTGAAA-PG	TGKKIEADGP-RIDSTS-GTDTVI
	A _{d16}	- F	NTCQM--K-DS-	KMHTGVAA-PG	TGKKIEADGP-GIDSTS-GTDTVI
	A _{d3}	- B	NTSQWLVTXGENAVT	TTTTGLAS-KCGN	--ITTKGGOKGDITTECTAKPI
	A _{d7}	- B	NTSQWLVTAGEBRAVT	TTTTGLAS-KGDN	--ITTKGGOKGDIT--ABDKPI
	A _{d2}	- C	NCSWEQTSDSGRAVAE	EEEEEEEQNARDQATKTTHVV	OAPISET--ITKSCOGCDNAETQA--KP

C68	-	E	177	YADKTV	OPEPQV	GDAEW	HDITG	DEKYG	GRALKP	DTKMK	PCYGS	FAKPTN	KEGQA	N	VK	--TG	GTG	--TT	KEV	VDID	MAF	
Ad4	-	E	177	YADKT	OPEPQV	DSW	DTNCA	EKYG	GRALKD	TKMNP	PCYGS	FAKPTN	KEGQA	N	K	-D	EP	--AT	TEN	VDID	MAF	
Ad16	-	E	177	YADKT	OPEPQV	ASW	DANGT	EKYG	GRALKD	TKMKP	PCYGS	FAKPTN	KEGQA	N	K	-D	ET	--AT	TEN	VDID	MAF	
Ad3	-	B	183	YADKTV	OPEPQV	ESW	TDGTH	EK	GRALKP	ATNNK	PCYGS	FAKPTN	IKGGQA	N	K	RVK	PT	TEG	GVET	EE	PDIDMEF	
Ad7	-	B	181	YADKTV	OPEPQV	ESW	TDGTH	EK	GRALKP	ATNNK	PCYGS	FAKPTN	IKGGQA	N	K	RVK	P	TEG	GVET	EE	PDIDMEF	
Ad2	-	C	205	YADF	OPEPQ	G	SWN	AD	--AA	GGRV	LKKT	TEMK	PCYGS	FAKPTN	P	FGG	--V	VPD	EKGV	--PL	PKD	QOF

C68	-	E	251	FDNRSAA	AA	GLA	PE	IV	LT	ENV	DL	ET	PD	TH	LV	VK	AG	CT	DD	SS	SS	ST	NI	LQ	QA	MP	NP	RV	YI	GF	RD	NF	IG	LM	VY	NS	TG	NN				
Ad4	-	E	253	RDS	II	V	NY	DP	IV	LT	ENV	DL	ET	PD	TH	LV	VK	AG	CT	DD	SS	SS	ST	NI	LQ	QA	MP	NP	RV	YI	GF	RD	NF	IG	LM	VY	NS	TG	NN			
Ad16	-	E	253	FDN	NI	A	NY	DP	IV	LT	ENV	DL	ET	PD	TH	LV	VK	AG	CT	DD	SS	SS	ST	NI	LQ	QA	MP	NP	RV	YI	GF	RD	NF	IG	LM	VY	NS	TG	NN			
Ad3	-	B	259	FD	GR	DA	V	A	GL	PE	IV	LT	ENV	DL	ET	PD	TH	LV	VK	AG	CT	DD	SS	SS	ST	NI	LQ	QA	MP	NP	RV	YI	GF	RD	NF	IG	LM	VY	NS	TG	NN	
Ad7	-	B	130	FD	GR	EA	A	AD	F	PE	IV	LT	ENV	DL	ET	PD	TH	LV	VK	AG	CT	DD	SS	SS	ST	NI	LQ	QA	MP	NP	RV	YI	GF	RD	NF	IG	LM	VY	NS	TG	NN	
Ad2	-	C	277	RS	NT	L	ND	RQ	N	TK	PK	V	IN	SE	EV	LT	PD	TH	LV	VK	AG	CT	DD	SS	SS	ST	NI	LQ	QA	MP	NP	RV	YI	GF	RD	NF	IG	LM	VY	NS	TG	NN

C68	- E	327	GVL	Q	A	S	Q	L	N	A	V	D	L	Q	D	R	N	T	E	S	Y	Q	L	L	D	S	L	G	D	R	T	R	Y	F	S	M	N	Q	A	V	D	S	Y	D	P	V	R	I	E	N	H	G	V	E	D	E	L	P	N	Y	C	F	E	L	D	A	V	G	R	T	D
A44	- E	328	GVL	Q	A	S	Q	L	N	A	V	D	L	Q	D	R	N	T	E	S	Y	Q	L	L	D	S	L	G	D	R	T	R	Y	F	S	M	N	Q	A	V	D	S	Y	D	P	V	R	I	E	N	H	G	V	E	D	E	L	P	N	Y	C	F	E	L	D						
Ad16	- E	328	GVL	Q	A	S	Q	L	N	A	V	D	L	Q	D	R	N	T	E	S	Y	Q	L	L	D	S	L	G	D	R	T	R	Y	F	S	M	N	Q	A	V	D	S	Y	D	P	V	R	I	E	N	H	G	V	E	D	E	L	P	N	Y	C	F	E	L							
Ad3	- B	338	GVL	Q	A	S	Q	L	N	A	V	D	L	Q	D	R	N	T	E	S	Y	Q	L	L	D	S	L	G	D	R	T	R	Y	F	S	M	N	Q	A	V	D	S	Y	D	P	V	R	I	E	N	H	G	V	E	D	E	L	P	N	Y	C	F	E								
Ad7	- B	334	GVL	Q	A	S	Q	L	N	A	V	D	L	Q	D	R	N	T	E	S	Y	Q	L	L	D	S	L	G	D	R	T	R	Y	F	S	M	N	Q	A	V	D	S	Y	D	P	V	R	I	E	N	H	G	V	E	D	E	L	P	N	Y	C										
Ad2	- C	357	GVL	Q	A	S	Q	L	N	A	V	D	L	Q	D	R	N	T	E	S	Y	Q	L	L	D	S	L	G	D	R	T	R	Y	F	S	M	N	Q	A	V	D	S	Y	D	P	V	R	I	E	N	H	G	V	E	D	E	L	P	N	Y	C										

C68 - E	407	VQGIKANG	-----T-----	DOUWTKDSDS	VNDANEI	CKGNPFAM
Ad4 - E	408	YQGKVKT	TD--AG-S---	---KWDKDD---	TVSANEI	HVGNPFAM
Ad16 - E	408	YQGKVKT	DAVAGTSG	---TQWDKDD---	TVSTANEI	HGNGPFAM
Ad3 - B	418	YQGIKVK	TD-----	---DTNGWEKDN---	VAPANEI	TIIGNLAM
Ad7 - B	414	YQGIKVK	-----	---D-NGWEKDDN---	VSKANEI	IGNQAM
Ad2 - C	437	YQITKANG	SGS-GDNGD	---TTTWTKDPT---	PATREI	GVGNPFAM