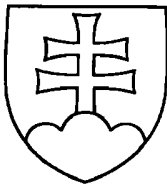


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA  
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 16.10.97  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/733 815  
(32) Dátum priority: 18.10.96  
(33) Krajina priority: US  
(40) Dátum zverejnenia: 16.05.2000  
(86) Číslo PCT: PCT/US97/17928, 16.10.97

(21) Číslo dokumentu:

**506-99**

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7:

C 12N 15/21  
A 61K 48/00

- (71) Prihlasovateľ: CANJI, INC., San Diego, CA, US;  
(72) Pôvodca vynálezu: Nagabhusan Tattanahalli L., Parsippany, NJ, US;  
Saha Deba P., Nutley, NJ, US;  
(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsoby a kompozície na zavedenie a expresiu nukleových kyselín interferónu  $\alpha$**

- (57) Anotácia:  
Spôsoby a kompozície na tkanivovo špecifickú expresiu interferónu a na účely terapie. Kompozícia zahŕňa vektor obsahujúci segment kyseliny kódujúcej polypeptid interferónu  $\alpha$ , ktorý je spojený s promótorom špecifickým pre vybrané tkanivo.

Spôsoby a kompozície na zavedenie a expresiu nukleových kyselín interferónu- $\alpha$

### Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobov a kompozícií pre tkaninovo špecifickú expresiu interferónu- $\alpha$  na účely terapie.

### Doterajší stav techniky

Ľudské interferóny- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) patria do rodiny proteínov, ktorá zahŕňa aspoň 24 subdruhov (Zoon, K. C., Interferón 9: 1 1987, Gresser, I., ed., Academic Press, NY). Interferóny- $\alpha$  sa všeobecne popisujú ako činidlá schopné indukovať v bunkách antivírusový stav, v súčasnosti sú známe ako pleiotrofné lymfokinázy, ktoré ovplyvňujú množstvo funkcií imunitného systému (Openakker et al., Experimentia 45: 513 (1989)).

IFN- $\alpha$  sa používa v širokom rozsahu na terapeutické účely, napríklad pri liečení leukémie vlasových buniek, Kaposiho sarkómu, karcinómu renálnych buniek, lymfómu iného ako Hodgkinovho, leukémie T-buniek, viacnásobnej a chronickej myelogennej leukémie, maligného melanómu, karcinómu buniek močového mechúra, karcinómu hrubého čreva s 5-FU), kondylomu acuminata, rinovírusovej infekcie a rôznych foriem chronickej vírusovej hepatitídy B, ktorá sa objavuje ako výsledok infekcie vírusom hepatitídy B (HBV), vírusom hepatitídy C (HCV), NANB ani vírusu hepatitídy A ani B) alebo vírusu hepatitídy  $\delta$  (HDV) (Festka AIDA Research and Human Retroviruses 8 (5): 776-786 (1992)). Tiež sa zistilo, že IFN- $\alpha$  je vysoko účinný proti megakaryocytopoéze a pri kontrole trombocytózy u pacientov s myeloproliferatívnymi stavmi (Talpez et al., Annals Int. Med. 99: 789-792 (1983), Gisslinger et al., Lancet i: 634-637 1989., Ganser et al., Blood 70: 1173-1179 (1987)).

Spôsoby génovej terapie majú potenciál vystaviť subjekt génovému produktu, ako je interferón, prostredníctvom cielenej

expresie terapeutického génu v tkanive. Vo všeobecnom prípade schopnosť cielene zaviesť gén do vybraného tkaniva je jedným z hlavných vymožeností génovej terapie. Ako príklad cieleného zavádzania génov interferónu, patentová prihláška WIPO č. WO 93.15609 popisuje zavedenie génov interferónu do vaskulárneho tkaniva. Takéto gény sa do oblastí poškodených stien ciev zavádzajú za použitia katetárneho systému. V inom prípade adenovírusový vektor kódujúci proteín schopný enzymaticky premeniť pro-liek, „samovražedný gén“ a gén kódujúci cytokinín sa aplikuje priamo do pevného nádoru.

Iné spôsoby cieleenia terapeutických génov do tkanív zahŕňujú tri základné kategórie transdukčného cieleenia, pozičného cieleenia a transkripčného cieleenia (popisuje sa napríklad v publikácii Miller et al., FASEB J. 9: 190-199 1995). Transdukčné cieleenie sa vzťahuje na selektívny vstup do špecifických buniek, ktoré sa dosiahne selekciou receptorového ligandu. Pozičné cieleenie v genóme sa vzťahuje na integráciu do požadovaného lokusu, ako sú aktívne oblasti chromatinu, alebo homológne rekombinácie s endogénnou nukleotidovou sekvenciou, ako je cieľový gén. Transkripčné cieleenie sa vzťahuje na selektívnu expresiu, ktorá sa dosiahne začlenením transkripčných promótorov s vysoko špecifickou reguláciou génovej expresie, ktoré úplne vyhovujú vybraným bunkám.

Príklady tkanivovo špecifických promótorov zahŕňujú promótor kinázy kreatínu, ktorá sa používa na priamu expresiu cDNA dystrofínu vo svaloch a v kardiálnom tkanive (Cox et al., Nature 364: 725-729 (1993)), a promótorový ľahkého a ťažkého reťazca imunoglobínu na expresiu samovražedných génov v B bunkách (Maxwell et al., Cancer Res. 51: 4299-4304 (1991)). Tiež sa charakterizovala endoteliálna bunkovo špecifická regulačná oblasť (Jahroudi et al., Mol. Cell. Biol. 14: 999-1006 (1994)). Amfotrofné retrovírusové vektory sa skonštruovali tak, že nesú gén kinázy tymidínu vírusu herpes simplex riadený buď promótorom albumínu alebo alfa-fetoproteínu (Huber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 8039-8043 (1991)) za účelom

cielenia črevných buniek a buniek hepatómu. Takito tkanivoví špecifickí promótoři sa môžu použiť v retrovirusových vektoroch (Hartzoglu et al., J. Biol. Chem. 265: 17285-17293 (1990)) a v adenovirusových vektoroch (Friedman et al., Mol. Cell. Biol. 6: 3791-3797 (1986)), pričom stále uchovávajú svoju tkanivovú špecificitu.

Z toho vyplýva, že cielená expresia alfa-interferónu je nutná pri liečbe rakoviny, hepatitídy a iných stavov citlivých na terapiu alfa-interferónom.

#### Podstata vynálezu

Vynález popisuje spôsob aplikácie polypeptidu interferónu-alfa pacientovi, ktorý zahrňuje zavedenie vektoru do tkaniva pacienta, pričom uvedený vektor obsahuje segment nukleovej kyseliny kódujúcej polypeptid interferónu-alfa, ktorý je operatívne spojený s promótorom vykazujúcim špecificitu k požadovanému tkanivu, v ktorej sa polypeptid exprimuje.

Vynález ďalej popisuje spôsob zvýšenia množstva interferónu-alfa vo vybraných tkanivách pacienta, ktorý zahrňuje zavedenie vektoru obsahujúceho segment nukleovej kyseliny kódujúcej polypeptid interferónu-alfa do vybraného tkaniva, pričom segment nukleovej kyseliny je operabilne spojený s promótorom, ktorý vykazuje špecificitu k vybranému tkanivu, kde sa polypeptid interferónu-alfa exprimuje.

Vynález ďalej popisuje spôsob liečby zhubného bujnenia reagujúci na interferón-alfa, ktorý zahrňuje aplikáciu vektoru obsahujúceho segment nukleovej kyseliny kódujúci polypeptid interferónu-alfa do karcinogénneho tkaniva, pričom segment nukleovej kyseliny je operatívne spojený s promótorom, ktorý vykazuje špecificitu k vybranému tkanivu, kde sa polypeptid interferónu-alfa exprimuje.

Ďalej vynález popisuje spôsob liečby hepatitídy, ktorý zahrňuje aplikáciu vektoru obsahujúceho segment nukleovej kyseliny kódujúci polypeptid interferónu-alfa do črevných

buniek pacienta, pričom segment nukleovej kyseliny je operatívne spojený s promótorom špecifickým pre črevné bunky, kde sa polypeptid interferónu-alfa exprimuje.

Vynález ďalej popisuje kompozíciu zahrňujúcu vektor obsahujúci segment nukleovej kyseliny kódujúcej polypeptid interferónu-alfa, pričom segment nukleovej kyseliny je operatívne spojený s promótorom špecifickým pre vybrané tkanivo.

Vynález popisuje spôsoby tkanivovej špecifickej expresie IFN- $\alpha$  za použitia tkanivovo špecifických promótorov. Termín IFN- $\alpha$  zahrňuje všetky podtriedy interferónu-alfa, delécie, inzercie alebo ich substitučné varianty, biologicky aktívne fragmenty a alelické formy. Termín „biologicky aktívne“ znamená ľubovoľnú antivírusovú alebo antiproliferačnú aktivitu meranú spôsobom dobre známym v odbore (popisuje sa napríklad v publikácii Openakker et al., uvedené ďalej v texte, Mossman, J. Immunol. Methods 65: 55 (1983). Rekombinantné interferóny-alfa sa klonovali a exprimovali v baktériách *E. coli* (popisuje sa napríklad v publikáciách Weissmann et al., Science 209: 1343-1349 (1980), Sreuli et al., Science 209: 1343-1347 (1980), Goeddel et al., Nature 290: 20-26 (1981), Henco et al., J.-Mol. Biol. 185: 227-260 (1985)). Uprednostňuje sa, aby interferénom-alfa bol interferón-alfa 2a alebo 2b (popisuje sa napríklad v publikácii WO 91/18927), aj keď interferón-alfa sa môže tiež použiť.

Nukleové kyseliny kódujúce polypeptid interferónu- $\alpha$  sú DNA alebo RNA. Termín „nukleová kyselina kódujúca“ znamená nukleovú kyselinu, ktorá riadi expresiu špecifického proteínu alebo peptidu. Sekvencie nukleovej kyseliny zahrňujú ako reťazec sekvencie DNA, ktorý sa prepisuje na RNA, tak aj sekvenciu RNA, ktorá sa prekladá na proteín. Sekvencie nukleovej kyseliny zahrňujú sekvencie nukleových kyselín v plnej dĺžke, tak aj časti sekvencií, ktoré sa získali z proteínu v plnej dĺžke. Rozumie sa, že sekvencia zahrňuje degeneratívne kodóny natívnej sekvencie alebo sekvencií, ktoré

môžu byť zavedené tak, aby vznikol kodón, ktorý preferuje špecifická hostiteľská bunka.

Termín „vektor“ znamená vírusové expresívne systémy, autonómne samostatne sa replikujúce kruhovou DNA (plazmidy) a zahŕňa ako expresívne tak neexpresívne plazmidy. V prípade, že rekombinantný mikroorganizmus alebo bunková kultúra sa popisuje ako hostiteľ „expresívneho vektoru“, môže obsahovať ako extrachromozomálnu kruhovú DNA, ktorá je začlenená do chromozómu(ov) hostiteľa. V prípade, že vektor je držaný hostiteľskou bunkou, znamená to, že vektor sa môže buď stabilne replikovať v bunkách počas mitózy, ako autonómna štruktúra, alebo je inkorporovaný v hostiteľskom genóme. Vektor obsahuje viac genetických elementov pozične a sekvenčne orientovaných, čo znamená operatívne spojených s inými nevyhnutnými elementmi tak, že sa v transfekovaných bunkách môže nukleová kyselina vo vektore kódujúcu IFN- $\alpha$  prepísať a keď je treba, tak aj preložiť.

Termín „gén“ popisuje sekvenciu nukleovej kyseliny, ktorá kóduje polypeptid. Táto definícia zahŕňa rôzne sekvenčné polymorfizmy, mutácie a/alebo variácie sekvencií, kde uvedené zmeny neovplyvňujú funkciu génového produktu. Termín „gén“ zahŕňa nielen kódujúcu sekvenciu, ale tiež regulačné oblasti, ako sú promótor, zosilňovače a terminačné oblasti. Termín ďalej zahŕňa všetky intróny a iné sekvencie DNA upravené strihom z transkriptu mRNA spolu s variantmi, ktoré vznikli na základe alternatívnych miest zostrihu.

Termín „plazmid“ znamená autonómnu molekulu kruhovej DNA, ktorá je schopná sa replikovať v bunke a zahŕňa ako typ expresívny tak aj typ, ktorý nie je expresívny. V prípade, že sa rekombinantný mikroorganizmus alebo bunková kultúra popisuje ako hostiteľ „expresívneho plazmidu“, to znamená, že zahŕňa ako extrachromozálne kruhové molekuly DNA tak aj DNA, ktorá je začlenená do hostiteľského chromozómu(ov). V prípade, že plazmid je obsiahnutý v hostiteľskej bunke, znamená to, že sa plazmid v bunkách buď stabilne replikuje počas fázy mitózy ako autonómna štruktúra, alebo sa začlenil do hostiteľského genómu.

Termín „rekombinantný proteín“ alebo „rekombinantne produkovaný proteín“ znamená peptid alebo proteín produkovaný za použitia neprírodných buniek, ktoré nemajú endogénnu kópiu DNA schopnú exprimovať proteín. Bunky produkujú proteín, pretože sa zavedením sekvencie vhodnej nukleovej kyseliny geneticky zmenili. Nezistilo sa, že rekombinantný proteín je asociovaný s proteínmi a so sub-bunkovými komponentmi, ktoré sú v normálnom prípade spojené s bunkami produkujúcimi proteín. Termín „proteín“ a „polypeptid“ sú tu zameniteľné.

Vc všeobecnom prípade sa IFN- $\alpha$  produkuje v expresívnom vektore, ktorý obsahuje nasledujúce elementy postupne spojené vo vzdialenosti vhodnej pre funkčnú expresiu: tkanivovo špecifický promótor, iniciačné miesto pre transkripciu, 3' neprekladanú oblasť, vedúcu sekvenciu 5' mRNA, sekvencia nukleovej kyseliny kódujúca polypeptid interferónu-alfa a polyadenylačný signál. V expresívnom vektore sa môžu vyskytovať i zosilňovacie sekvencie a iné sekvencie, ktoré vedú k expresii a/alebo k sekrécii. Za účelom selekcie alebo testovania prítomnosti rekombinantného vektora sa do vektora pridávajú gény, ktoré kódujú rezistenciu na lieky. Takéto prídavné gény zahŕňujú napríklad gény kódujúce rezistenciu na neomycín, rezistenciu na viacej liekov, kinázu tymidínu, beta-galaktosidázu, reduktázu dihydrofolátu (DHFR) a acetyltransferázu chloramfenikolu.

Vynález popisuje cielené zavedenie IFN- $\alpha$  do určitého vybraného tkaniva, ktoré sa uskutočnilo použitím promótora a/alebo iného expresívneho elementu, ktoré sa s výhodou používajú vo vybranom tkanive. Príklady známych tkanivovo špecifických promótorov zahŕňujú promótor kinázy kreatínu, ktorý sa používa pri riadení expresie cDNA dystrofínu vo svaloch a kardiálnom tkanive (Cox et al., Nature 364: 725-729 (1993)), promótor ťažkého a ľahkého reťazca imunoglobínu na expresiu génov v B-bunkách, promótor albumínu alebo alfa-fetoproteínu, ktoré sú vhodné pre bunky čriev a bunky hepatómu. Príklady tkanivovo špecifických expresívnych elementov vhodné pre črevné bunky sú napríklad promótor HMG-CoA reduktázy HMG-

CoA (Luskey, Mol. Cell. Biol. 7(5):1881-1893 (1987), sterolový regulačný element 1 (SRE-1, Smith et al., J. Biol. Chem. 265 (4): 2306-2310 (1990), promótor karboxykináza fosfoenolpyruvátu (PEPCK, Eisenberger et al., Mol. Cell Biol. 12(3):1396-1403 (1992), promótor ľudského C-reaktívneho proteínu (CRP) (Li et al., J. Biol. Chem. 265 (7): 4136-4142 (1990)), ľudský glukokinázový promótor (Tanizawa et al., Mol. Endocrinology 6(7): 1070-81 (1992), promótor 7-alfa-hydroxylázy (CYP-7) cholesterolu (Lee et al., J. Biol. Chem. 269 (20): 14681-9 (1994), promótor beta-galaktosidázovej alfa-2,6-sialyltransferázy (Svensson et al., J. Biol. Chem. 265(34): 20863-3 (1990), promótor proteínu viažuci rastový faktor podobný inzulínu (IGFBP-1) (Babajko et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 196(1): 480-6 (1993), promótor aldolázy B (Bingle et al., Biochem. J. 294 (Pt2):473-9 (1993), promótor ľudského transferínu (Mendelzon et al., Nucleic Acids Res. 18 (19): 5717-21 (1990), promótor kolagénu typ I (Houlglum et al., J. Clin. Invest. 94(2): 808-14 (1994)).

Príklady tkaninovo špecifických expresívnych elementov prostatických buniek zahrňujú napríklad promótor fosfatázy kyseliny prostatickej (PAP) (Banas et al., Biochem. Biophys. Acta. 1217 (2): 188-94, promótor prostatického sekrečného proteínu 94 (PSP 94) (Nolet et al., Biochim. Biophys. Acta 1098 (2): 247-9 (1991)), promótor komplexu špecifického antigénu prostaty (Casper et al., J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 47 (1-6): 127-35 (1993)), promótor ľudského glandulárneho kalikreinového génu (hgt-1) (Lilja et al., World J. Urology 11(4): 188-91 (1993).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov pre gastrické tkanivo zahrňujú napríklad promótor alfa-podjednotky H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPázy (Tanura et al., FEBS Letters 298: (2-3): 137-41 (1992)).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov pre pankreas zahrňujú napríklad promótor proteínu spojený s pankreatitídou (PAP) (Dusetti et al., J. Biol. Chem. 268 (19): 14470-5 (1993)), zosilňovač transkripcie elastázy 1

(Kruse et al., *Genes and Development* 7(5):774-86 (1993)),  
 promótor zosilňovača špecifickej amylázy a elastázy špecifickej  
 pre pankreas (Wu et al. *Mol. Cell. Biol.* 11(9):4423-30 (1991)),  
 Keller et al., *Genes and Dev.* 4(8): 1316-21 (1990)), promótor  
 génu pankreatickej esterázy cholesterolu (Fontaine et al.,  
*Biochemistry* 30(28):7008-14 (1991)).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov  
 pre endometrium zahrňujú napríklad promótor uteroglobínu  
 (Halfenbein et al., *Annal. NY Acad. Sci.* 622: 69-79 (1991)).  
 Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov pre  
 adrenalínové bunky zahrňujú promótor štiepenia bočného reťazca  
 cholesterolu (SCC) (Rice et al., *J. Biol. Chem.* 265: 11713-20  
 (1990)).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov  
 pre nervový systém zahrňujú napríklad promótor gamma-gamma  
 enolázy (neurón-špecifická enoláza, NSE) (Forss-Petter et al.,  
*Neurón* 5(2):187-97 (1990)).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov  
 pre mozog zahrňuje napríklad promótor ťažkého reťazca  
 neurovlákna (NF-H) (Schwartz et al., *J. Biol. Chem.* 269(18):  
 13444-50 (1994)).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov  
 pre lymfocyty zahrňujú napríklad promótor Iudského CGL-  
 1/granzýmu B (Hanson et al., *J. Biol. Chem.* 266 (36): 24433-8  
 (1991)), promótor terminačnej deoxytransferázy (TdT), lambda 5,  
 VpreB a lck kináza tyrozínu špecifická pre lymfocyty p56lck)  
 promótor (Lo et al., *Mol. Cell. Biol.* 11(10): 5229-43 (1991)),  
 promótor Iudského CD2 a jeho zosilňovač 3' transkripcie (Lake  
 et al., *EMBO J.* 9(10): 3129-36 (1990)) a špecifický aktivačný  
 promótor Iudských NK a T buniek (NKG5) (Houchins et al.,  
*Immunogenetics* 37(2):102-7 (1993)).

Príklady tkaninových špecifických expresívnych elementov  
 pre hrubé črevo zahrňujú napríklad promótor pp60c-src kinázy  
 tyrozínu (Talamonti et al., *J. Clin. Invest.* 91 (1): 53-60  
 (1993)), promótor orgánovo špecifických antigénov (OSN),  
 molekulová hmotnosť 40 000 (p40) (Ilantzis et al., *Microbiol.*

Immunol. 37(2): 119-28 (1993)), promótor antigénu P špecifického pre hrubé črevo (Sharkey et al., Cancer 73(3 supp.): 864-77 (1994)).

Príklady tkanivových špecifických expresívnych elementov pre bunky prsnej žľazy zahrňujú napríklad promótor alfa-laktalalbumínu (Thean et al., British J. Cancer. 61 (5): 773-5 (1990)).

Iné elementy, ktoré umožňujú špecifitu expresie vo vybranom tkanive zahrňujú sekvenciu vedúcu k sekrécii, zosilňovače, signály jadrovej lokalizácie, endosmolytické peptidy atď. Tieto elementy sa získavajú z vybraného tkaniva, čo umožňuje ich špecifitu. Spôsoby manipulácie sekvencií nukleových kyselín podľa vynálezu, ako je sub-klonovanie sekvencií nukleových kyselín kódujúcich polypeptidy do expresívnych vektorov, značenia sond, hybridizácie DNA a podobne sa podrobne popisujú v publikácii Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989). Ak sa izolovala DNA kódujúca vybranú sekvenciu a klonovala sa, môžu sa exprimovať kódované proteíny v rôznych rekombinantných bunkách. Očakávalo sa, že v odbore je známa rada expresívnych systémov, ktoré sú dostupné na expresiu kódujúcu DNA. Tu sa používa množstvo známych metód vhodných na expresiu proteínov v prokaryotoch alebo eukaryotoch.

Expresia prirodzených alebo syntetických nukleových kyselín kódujúcich vybranú sekvenciu sa v typickom prípade dosiahne operatívnym spojením DNA alebo cDNA s promótorom (ktorý je buď konštitutívny alebo indukovateľný), potom nasleduje začlenenie do expresívneho vektoru. Vektory môžu byť vhodné na replikáciu a integráciu buď v prokaryotoch alebo eukaryotoch. Typické expresívne vektory obsahujú transkripčné a translačné terminátory, iniciačné sekvencie a promótory použiteľné na reguláciu expresie vybranej polynukleotidovej sekvencie. Aby sa získala silná expresia klonovaného génu je nutné konštruovať expresívne plazmidy, ktoré obsahujú minimálne silný promótor pre riadenie transkripcie, ribozómové väzbové miesto za účelom translácie a terminátor

transkripcie/translácie. Expresívne vektory môžu tiež obsahovať generované expresívne kazety, ktoré obsahujú aspoň jednu nezávislú terminačnú sekvenciu, sekvencia umožňujúca replikáciu plazmidu ako v prokaryotoch tak v eukaryotoch, to znamená pendujúce vektory a selekčné markéry pre prokaryotné a eukaryotné systémy (Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989)).

Konštrukcie podľa vynálezu sa môžu zaviesť do vybraného tkaniva in vivo alebo ex vivo pomocou rôznych spôsobov. V niektorých uskutočneniach vynálezu sa vektor zavedie do buniek spôsobom, ako je mikroinjekcia, precipitácia fosforečnanom vápenatým, fúziou s lipozómami alebo prostredníctvom biologickej balistiky. V inom uskutočnení vynálezu sa DNA priamo zavádza do vybraného tkaniva. V iných uskutočneniach sa konštrukcia zabalí do vírusového vektorového systému, ktorý umožní jej zavedenie do buniek.

Vírusové vektorové systémy podľa vynálezu zahrňujú adenovírusy, herpesvírusy, adeno-asociované vírusy, myší minútový vírus (MVM), HIV, sindbis vírus a retrovírusy, ako je vírus Rousovho sarkómu a MoMLV. V typickom prípade konštrukcie podľa vynálezu sa začleňujú do takých vektorov, aby umožnili balenie konštrukcie exprimujúcej interferón, väčšinou je sprevádzaná vírusovou DNA, dochádza k infekcii citlivých hostiteľských buniek a k expresii génu interferónu- $\alpha$ . Zvlášť výhodným vektorom je adenovírusový vektor, ktorý sa popisuje v publikácii Wills et al., Hum. Gene Therapy 5: 1079-1088 (1994).

V inom uskutočnení vynálezu rekombinantné konštrukcie IFN- $\alpha$  podľa vynálezu sú spojené s ligandom bunkového receptora, čo umožňuje príjem (napríklad invaginácia potiahnutých častíc a internalizácia endozómu) prostredníctvom častíc spojených s DNA (Wu et al., J. Biol. Chem. 263: 14621-14624 (1988), WO 92/06180). Konštrukcia DNA podľa vynálezu môže byť napríklad spojená prostredníctvom polylyzínov k azialo-oromukocídu, ktorý je ligandom pre azialoglykoproteínový receptor hepatocytov.

Virusové obaly používané pri balení konštrukcií podľa vynálezu sa môžu modifikovať pridaním receptorových ligandov alebo protilátok špecifických pre receptor, aby mohlo dôjsť k endocytóze do špecifických buniek sprostredkovanou receptorom (popisuje sa napríklad v publikácii WO 93/20221, WO 93/14188, WO 94/06923). V niektorých uskutočneniach vynálezu DNA konštrukcie podľa vynálezu sú spojené s vírusovými proteínmi, ako sú adenovírusové častice, aby sa umožnila endocytóza (Curiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 8850-8854 (1991)). V inom uskutočnení vynálezu molekulové konjugáty podľa vynálezu môžu zahŕňať mikrotubulárne inhibítory (popisuje sa v publikácii WO/9406922), syntetické peptidy, ktoré napodobňujú hemagglutínín vírusu chrípky (popisuje sa v publikácii Plank et al., J. Biol. Chem. 269: 12918-12924 (1994)), a nukleárne lokalizačné signály ako je antigén SV40 T (popisuje sa v publikácii WO 93/19768).

Termín „liečba“ znamená zavedenie nukleovej kyseliny kódujúcej alfa-interferón do pacienta za účelom expozície zvoleného tkaniva, zvlášť tkaniva, kde jedna alebo viac buniek vykazuje patologické zmeny, alfa-interferónu. Termín tkanivo „zhubného bujnenia“ znamená tkanivo, v ktorom jedna alebo viac buniek sa klasifikujú ako bunky zhubného bujnenia, maligné, nádorové, pre-rakovinové, transformované alebo ako adenóm alebo karcinóm alebo sa označujú iným synonymom bežne používaným v spojení s týmto stavom.

„Nerakovinová“ bunka tu znamená bunku, ktorá sa vymyká definícii rakovinová bunka a zahrňuje normálne bunky a bunky vykazujúce niektoré patologické rysy, ako je napríklad infekcia vírusom, baktériou, parazitom alebo iným organizmom, bunky ovplyvnené dedičnou záťažou, to znamená, že nie sú v takom optimálnom stave, ako je tomu v normálnom prípade, alebo ich protiklad divokého typu, bunky ovplyvnené neinfekčným ochorením, ako je napríklad diabetes, a bunky, ktoré prežili ľubovoľný z týchto uvedených stresov atď..

Liečba ľubovoľného stavu, ktorý sa zlepšil po aplikácii IFN- $\alpha$ , môže začať kedykoľvek pred diagnózou stavu alebo

keďkoľvek po nej. Tak napríklad pacientovi, u ktorého existuje podozrenie, že má pre-rakovinové lézie alebo dispozíciu na vývoj niektorého typu zhubného bujnenia, sa môžu aplikovať kompozície podľa vynálezu. Podobne osoba, ktorá prišla do kontaktu s patogénom, ako je napríklad vírus hepatitídy B, sa môže liečiť kompozíciami podľa vynálezu ešte predtým, ako sa hepatitída diagnostikuje. Navyše ľudia, ktorí sú podozrelí, že sú nosiči HBV, alebo pacienti, ktorí by sa nimi mohli s veľkou pravdepodobnosťou stať, sa môžu liečiť potom, čo sa zlepšia najťažšie symptómy ochorenia.

Konštrukcie podľa vynálezu sa môžu použiť pri terapii rôznych druhov zhubného bujnenia, hepatitídy a iných stavov, kde je výhodné zvýšenie množstva IFN- $\alpha$ . Medzi tieto ochorenia patria napríklad vredová kolitída, rinovírusové infekcie, fibróza, alergické ochorenia spôsobené prebytkom IL-4 a produkciou IgE a granulomatózne ochorenia, ako je Crohnova choroba. Aj keď sa gén môže cielene zaviesť do ľubovoľného tkaniva, pre ktorý existuje tkanivovo špecifický expresívny element, ako je promótor, zvláštna pozornosť sa venuje tkanivovo špecifickej aplikácii IFN- $\alpha$  za účelom zvýšenia množstva IFN- $\alpha$  v tkanive zhubného bujnenia, ako je karcinóm ľudskej prostaty a tkanivo hepatómu. Konštrukcie podľa vynálezu sa môžu ďalej použiť na zvýšenie množstva IFN- $\alpha$  v tkanivách, ktoré vykazujú patologické zmeny a ich nerakovinové bunky sú deficitné v produkcii interferónu, to znamená, že produkujú menej interferónu ako zdravé bunky, ako je tomu napríklad pri nosičoch vírusu hepatitídy B (Nouri-Aria et al., *Hepatology* 14(6): 1308-1311 (1991)). V niektorých uskutočneniach podľa vynálezu rekombinantné konštrukcie sa cielene zavádzajú do vedľajšieho tkaniva alebo do buniek, aby vzrástla lokálna koncentrácia interferónu-alfa vo vybranej populácii buniek.

Kompozície podľa vynálezu sa budú pripravovať pre aplikáciu, ktorá je prijateľná pre cicavcov, preferuje sa človek. V niektorých príkladoch vynálezu sa kompozície podľa vynálezu môžu aplikovať injekciou do tkaniva alebo do krvných ciev, ktoré zásobujú vybrané tkanivo. V inom príklade vynálezu

sa kompozície podľa vynálezu aplikujú lokálne, to znamená intravezikálne, do lézií a/alebo povrchovo. V inom uskutočnení vynálezu sa kompozícia podľa vynálezu aplikuje systematicky injekciou, inhaláciou, transdermálnym zavedením atď. V ďalšom uskutočnení vynálezu sa kompozície aplikujú katétrom alebo iným zariadením, ktorý umožní prístup kompozície do vybraného tkaniva, ako je napríklad vnútorný orgán. Kompozície podľa vynálezu sa tiež môžu aplikovať v podobe depotných nástrojov, implantátov alebo vo forme kapsúl, ktoré umožňujú pomalé alebo trvalé uvoľňovanie kompozícií.

Vynález popisuje kompozície, ktoré obsahujú roztok kompozícií podľa vynálezu rozpustený alebo suspendovaný v prijateľnom nosiči, s výhodou ide o vodný nosič. Môže sa použiť množstvo vodných nosičov, ako je voda, pufrovaná voda, 0,5 % fyziologický roztok, 0,3 % glycín, kyselina hyalurónová a podobné. Tieto kompozície sa môžu sterilizovať bežnými spôsobmi alebo sa môžu sterilizovať filtráciou. Výsledné vodné roztoky sa môžu baliť tak ako sú, alebo sa môžu lyofilizovať.

Lyofilizované roztoky sa tesne pred aplikáciou zmiešajú so sterilným roztokom. Kompozície môžu obsahovať farmaceuticky prijateľné auxiliárne substancie, ktoré sú nutné vzhľadom k fyziologickému stavu. Sú to činidlá na úpravu pH a pufrovacie činidlá, činidlá na úpravu tonusu, zmáčacie činidlá a podobne. Sú to napríklad acetát sodný, laktát sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, sorbitan monolaurát, trietanolaminoleát, atď.

Koncentrácia kompozícií podľa vynálezu vo farmaceutických formuláciách výrazne kolíše, to znamená, že môže byť menšia ako približne 0,1 %, obyčajne dosahuje aspoň okolo 2 %, až do hodnoty 20 až 50 % alebo viac (hmotnostné percentá). Kompozície sa pre určitý mód aplikácie vyberajú primárne na základe objemov kvapalín, viskozity atď.

Kompozície podľa vynálezu sa môžu aplikovať prostredníctvom lipozómov. Lipozómy zahrňujú emulziu, penu, micely, nerozpustné monovrstvy, kvapalné kryštály, fosfolipidové disperzie, lamelárne vrstvy a podobne. Do týchto

prípravkov sa kompozícia podľa vynálezu zaviedla ako súčasť lipozómov, samostatne alebo v spojení s molekulou, ktorá sa viaže na vybraný cieľ, ako sú protilátky alebo iné terapeutické alebo imunogénne kompozície. Lipozómy, ktoré sú buď naplnené alebo pokryté požadovanou kompozíciou podľa vynálezu sa môžu vnášať do organizmu systematicky alebo priamo do vybraného tkaniva, kam lipozómy donesú vybranú terapeutickú/imunogénnu peptidovú kompozíciu.

Lipozómy vhodné na použitie podľa vynálezu vznikajú zo štandardných lipidov, ktoré vo všeobecnom prípade zahŕňujú neutrálne alebo negatívne nabité fosfolipidy a sterol, ako je cholesterol. Výber lipidov sprevádza zvažovanie napríklad veľkosti lipozómov, citlivosť a stabilita voči kyselinám v krvnom riečišti. Lipozómy sa môžu pripravovať množstvom spôsobov, ako sa popisuje napríklad v publikácii Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), U.S. Patent Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028 a 5,019,369.

Lipozómová suspenzia obsahujúca kompozíciu podľa vynálezu sa môže aplikovať intravenózne, lokálne, povrchovo atď. v dávke, ktorá závisí od spôsobu aplikácie, spôsobu zavedenia kompozície a štádia ochorenia, ktoré sa lieči.

V prípade pevných kompozícií sa môžu použiť bežné netoxické pevné nosiče, ktoré zahŕňujú napríklad manitol, laktózu, škrob, stearát horečnatý, sacharín sodíka, celulózu, glukózu, uhličitan horečnatý a podobné. V prípade orálnej aplikácie sa farmaceuticky prijateľné netoxické kompozície tvoria zmiešaním ľubovoľného normálne používaného excipientu, akc sú nosiče vymenované hore v texte, a väčšinou 10 až 95 % aktívnej látky. Výhodné je zmiešať jednu alebo viac kompozícií podľa vynálezu a uprednostňuje sa koncentrácia 25 až 75 %.

V prípade aplikácie vo forme aerosolu sa kompozícia doplní povrchovo aktívnym činidlom a urýchľovačom. V typickom prípade percentuálne zastúpenie kompozície podľa vynálezu je 0,01 až 20 % (hmotnostné percentá), uprednostňuje sa 1 až 10 %. Povrchovo aktívne činidlo nesmie byť samozrejme toxické a uprednostňuje sa jeho rozpustnosť v urýchľovači. Zástupcovia takýchto

činiel sú estery mastných kyselín, ktoré obsahujú 6 až 22 atómov uhlíka, ako sú estery kyseliny kaprónovej, oktánovej, laurylovej, palmitovej, stearovej, linoelovej, olesterovej a olejovej s alifatickým polyhydrickým alkoholom alebo jeho cyklickým anhydridom. Môžu sa použiť zmiešané estery, ako sú zmiešané alebo prirodzené glyceridy. Povrchovo aktívne činidlo môže tvoriť 0,1 až 20 % (váhové percentá) kompozície, uprednostňuje sa koncentrácia 0,25 až 5 %. Kompozíciu vyrovnáva obyčajne urýchľovač. Ak je to nutné, môže sa tiež zahrnúť nosič, napríklad lecitín pre prípad intranazálnej aplikácie.

Konštrukcie podľa vynálezu sa môžu ďalej zavádzať depotným systémom, vo forme kapsúl alebo ako implantát metódami, ktoré sú dobre známe v odbore. Podobne sa môžu konštrukcie zavádzať priamo do vybraného tkaniva pomocou pumpy.

V niektorých uskutočneniach vynálezu sa kompozície podľa vynálezu aplikujú ex vivo do buniek alebo do tkaniva vybratých z pacienta, potom sa toto tkanivo do pacienta vráti. Príklady aplikácie konštrukcií ex vivo pri génovej terapii, sa popisujú v publikáciách Arteaga et al., Cancer Research 56(5): 1098-1103 (1996), Nolta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (6): 2414-9 (1996), Koc et al., Seminar in Oncology 23 (1) : 46-65 (1996), Raper et al., Annals of Surgery 223 (2): 116-26 (1996), Dalesandro et al., J. Thorac. Cardi. Surg. 11(2) : 416-22 (1996), and Makarov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1): 402-6 (1996).

#### Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obrázku č. 1 je graf znázorňujúci antiproliferačné účinky interferónu-alfa na bunky zhubného bujnenia ľudskej prostaty.

Na obrázku č. 2 je graf znázorňujúci aktivitu luciferázy ako merania expresie luciferázy riadenej promótorami génov špecifických pre pečeň.

## Príklady uskutočnenia vynálezu

### Príklad 1

Účinnok interferónu-alfa na proliferáciu buniek karcinómu prostaty

Študovali sa tri rozdielne druhy buniek karcinómu prostaty. Sú to LNCaP (závislé od androgénu, ATCC #CRL 1740), bunky PC-3 (nezávislé od androgénu, ATCC #HTB 81). Bunky sa kultivovali v piatich odlišných koncentráciách interferónu- $\alpha$ 2b ( $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  IU/ml) (Schering-Plough) po dobu 72 hodín v nasledujúcom médiu: bunky PC-3 sa kultivovali v Ham F12 K médiu (GIBCO BRL) doplnenom 7 % fetálnym bovinným sérom, bunky DU-145 sa kultivovali v DMEM (GIBCO BRL) doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom, bunky LNCaP sa kultivovali v RPMI 1640 (GIBCO BRL) doplnenom 5 % fetálnym bovinným sérom.

Antiproliferačné účinky interferónu sa stanovili testom MTT (popisuje sa v publikácii Mossman, J. Immunol. Methods 65: 55 (1983)). Bunky PC-3 a DU-145 vykazujú konzistentnú citlivosť ku zvyšujúcej sa koncentrácii interferónu, ktorá sa vyrovnala pri koncentrácii  $10^4$  IU/ml. Bunky LNCaP citlivé na androgén nevykazujú žiadnu odozvu na IFN. Bunky PC-3 sú citlivejšie proti interferónu ako bunky DU-145. Údaje sú zhrnuté na obrázku č. 1. Plné stĺpce reprezentujú bunkovú líniu PC-3 (nezávislú od androgénu), čiarkované stĺpce reprezentujú bunkovú líniu DU-145 (nezávislú od androgénu), diagonálne čiarkované stĺpce reprezentujú bunky LNCaP (závislé od androgénu).

### Príklad 2

Konštrukcia expresívnych kaziet

Za cieľom expresie IFN- $\alpha$  v bunkách karcinómu prostaty sa skonštruoval expresívny vektor, ktorý obsahuje celú sekvenciu cDNA interferónu-alfa 2b (IFN- $\alpha$ 2b) a celú signálnu sekvenciu pre IFN- $\alpha$ 2b (Sreuli et al., Science 209: 1343-1347 (1980),

Goeddel et al., Nature 290: 20-26 (1981), Henco et al., J. Mol. Biol. 185: 227-260 (1985)), ktoré sú riadené bazálnym promótorom s veľkosťou približne 600 bp pre gén antigénu, ktorý je špecifický pre prostatu (PSA). CDNA IFN- $\alpha$ 2b v celej dĺžke obsahujúci putatívnu signálnu vedúcu sekvenciu na 5' konci sa klonoval do polyklonovacieho miesta HindII a EcoRI downstream CMV promótoru cicavčieho expresívneho vektora PCDNA3 (Invitrogén) za vzniku plazmidu DIFN. Sekvencie lemujúce 5'-koniec génu PSA obsahujúce promótor PSA (BBRC 161: 1151-1159 (1989), Genebank #M27274) sa začlenil do vektoru, nahradil tak promótor CMV za vzniku plazmidu PSADIFN.

### Príklad 3

Klonovanie bazálnych promótorov pre pečňové špecifické gény

5' lemujúce sekvencie zahrňujú bazálne promótory zo štyroch špecifických génov ľudskej pečene, albumín (HAL),  $\alpha$ 1-antitrypsín (HAT), alfa-fetoproteín (AFP) a hydroxy-metylglutaryl-CoA reduktázu (HMG), sa subklonovali z ATCC 65731, ATCC 61597, ATCC 65735 a ATCC 59567 do vektoru pCRScript za cieľom použitia pri zavedení génu interferónu a jeho tkanivovo špecifickú expresiu v hepatických bunkách (Luskey, Mol. Cell. Biol. 7(5): 1881-1893 (1987), Minghetti et al., J. Biol. Chem. 261 (15): 6747-6757 (1986), Long et al., Biochemistry 23: 4828-4837 (1984), Gibbs, Biochemistry 26: 1332-1343 (1987)).

Inzerty sa mapovali pomocou reštrikčných enzýmov vo vektore pCRScript, ktorý obsahuje 5'-lemujúce sekvencie hore uvedených génov, ktoré kódujú pečňové špecifické enzýmy. Potom sa inzerty umiestnili z vektoru pCRScript do upstream pozície génu luciferázy do reportného plazmidu pGL3. Bunky z vaječníkov čínskych škrečkov (CHO-K1, ATCC # CCL-61), bunky ľudskeho hepatómu (HepG2, ATCC #NB 8065) a (Hep3B ATCC # HB 8064) sa transfekovali elektroporáciou uvedenými štyrmi konštrukciami a kontrolným plazmidom pGLC (PROMEGA Ccrp.). pGLC obsahuje gén luciferázy riadený promótorom SV40 a zosilňovač SV40.

Expresia luciferázy štyrmi pre pečeň špecifickými promótorovými sekvenciami v transfekovaných bunkách sa porovnávala s kontrolným plazmidom pGLC a vektorom pGL3. Údaje sú zhrnuté na obrázku č. 2 (výsledky s HAL nie sú uvedené). Tri typy buniek sa transfekovali konštrukciami DNA, ktoré vykazujú charakteristické rysy. Plné stĺpce reprezentujú bunky ľudského hepatómu HepG2, čiarkované stĺpce reprezentujú bunky vaječníkov čínskych škrečkov (CHO), diagonálne čiarkované stĺpce reprezentujú bunky ľudského hepatómu Hep3B (Hep3B). pGLB je plazmid slúžiaci ako negatívna kontrola, pGLC je plazmid slúžiaci ako pozitívna kontrola, HAT je promótor ľudského  $\alpha$ -antitrypsínu, HMG označuje promótor ľudského hydroxy-metylglutaryl-CoA reductázy, AFP je promótor ľudského  $\alpha$ -fetoproteínu. Z uvedených štyroch tkanivovo špecifických promótorov sa zdá byť najlepším kandidátom na expresiu v pečeni za uvedených podmienok promótor  $\alpha$ -antitrypsínu (HAT).

Expresia riadená promótorom HAT sa môže ďalej optimalizovať konštrukciou expresívneho vektoru so sekvenciou zosilňovača špecifického pre pečeň, ako je zosilňovač ľudského  $\alpha$ -fetoproteínu (Watanabe, et al., J. Biol. Chem. 262 (10): 4812-4818 (1987), Genebank # J02693), zosilňovač ľudského albumínu (Hayashi et al., J. Biol. Chem. 267 (21): 14580-14585 (1992), GeneBank # M92816), zosilňovač ľudského  $\alpha$ -1-mikroglobulínu/bikunin (Rouet et al., J. Biol. Chem. 267 (29): 20765-20773 (1992), GeneBank # X67032) alebo zosilňovač hepatitídy B (Valenzuela et al., Animal Virus Genetics ed. B. Biels et al., p.p. 57-70, Academic Press, N.Y. (1981), Galibert et al., Nature 281: 646-650 (1979)).

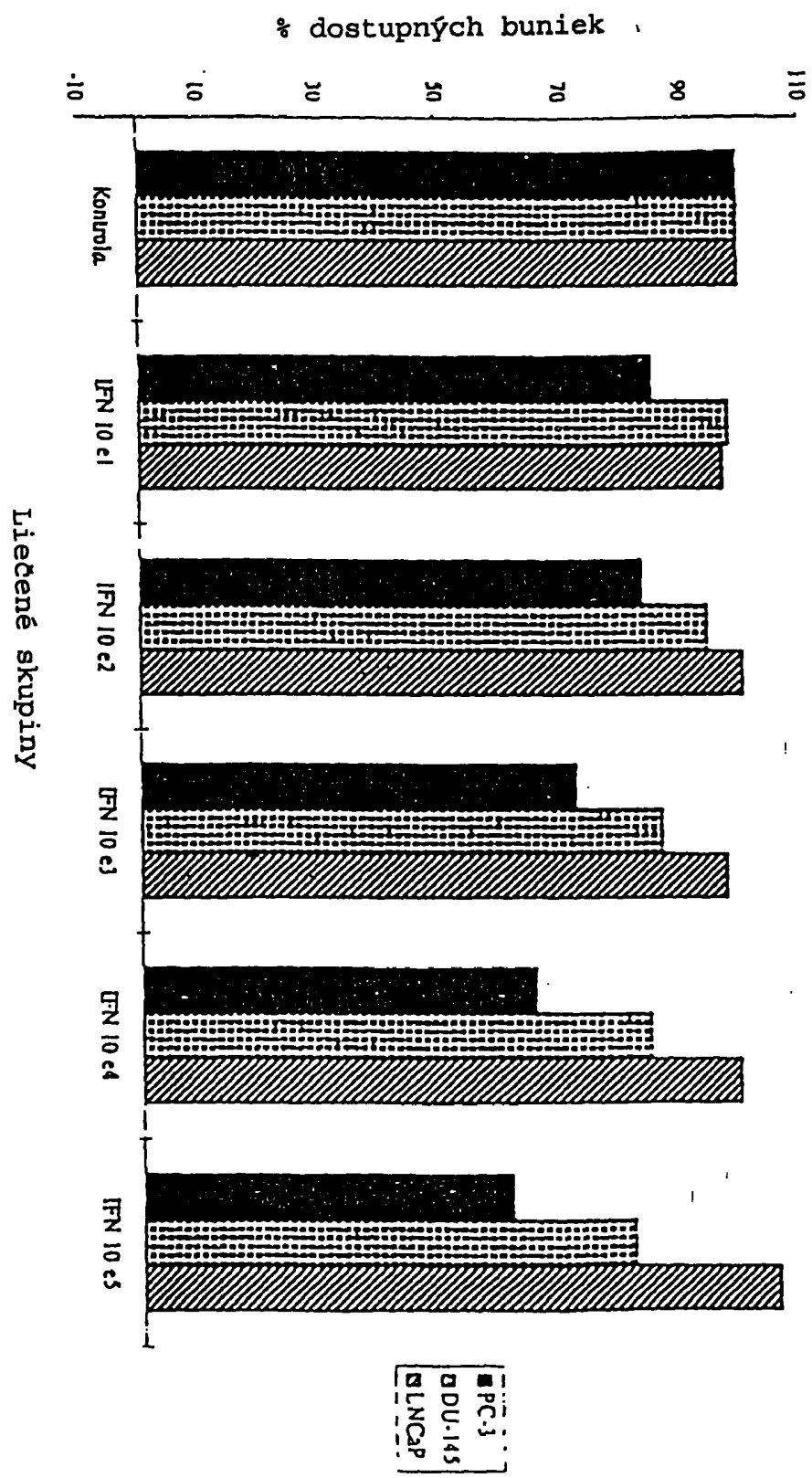
## P A T E N T O V É    N Á R O K Y

1. Kompozícia, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že zahrňuje vektor obsahujúci segment nukleovej kyseliny kódujúcej polypeptid interferónu- $\alpha$ , ktorý je operatívne spojený s promótorom, ktorý je špecifický pre vybrané tkanivo.
2. Kompozícia podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že vektor je vírusový vektor.
3. Kompozícia podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že vírusovým vektorom je adenovírus.
4. Kompozícia podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že promótor je špecifický pre pečeň.
5. Kompozícia podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že promótor je špecifický pre prostatu.
6. Kompozícia podľa nároku 4 alebo 5, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že ďalej obsahuje sekvenciu vedúcu k sekrécii interferónu-alfa operatívne spojenú s nukleovou kyselinou kódujúcou polypeptid interferónu-alfa.
7. Farmaceutická zmes, v y z n a č u j ú c a    s a    t ý m, že obsahuje kompozíciu podľa ľubovoľného nároku 1 až 6.
8. Spôsob vybavenia tkaniva polypeptidom interferónu-alfa, v y z n a č u j ú c i    s a    t ý m, že zahrňuje zavedenie vektoru, ktorý obsahuje segment nukleovej kyseliny kódujúcej polypeptid interferónu-alfa do vybraného tkaniva, pričom segment uvedenej nukleovej kyseliny je operatívne spojený s promótorom, ktorý je špecifický pre vybrané

tkanivo, kde sa v pacientovi polypeptid interferónu-alfa exprimuje.

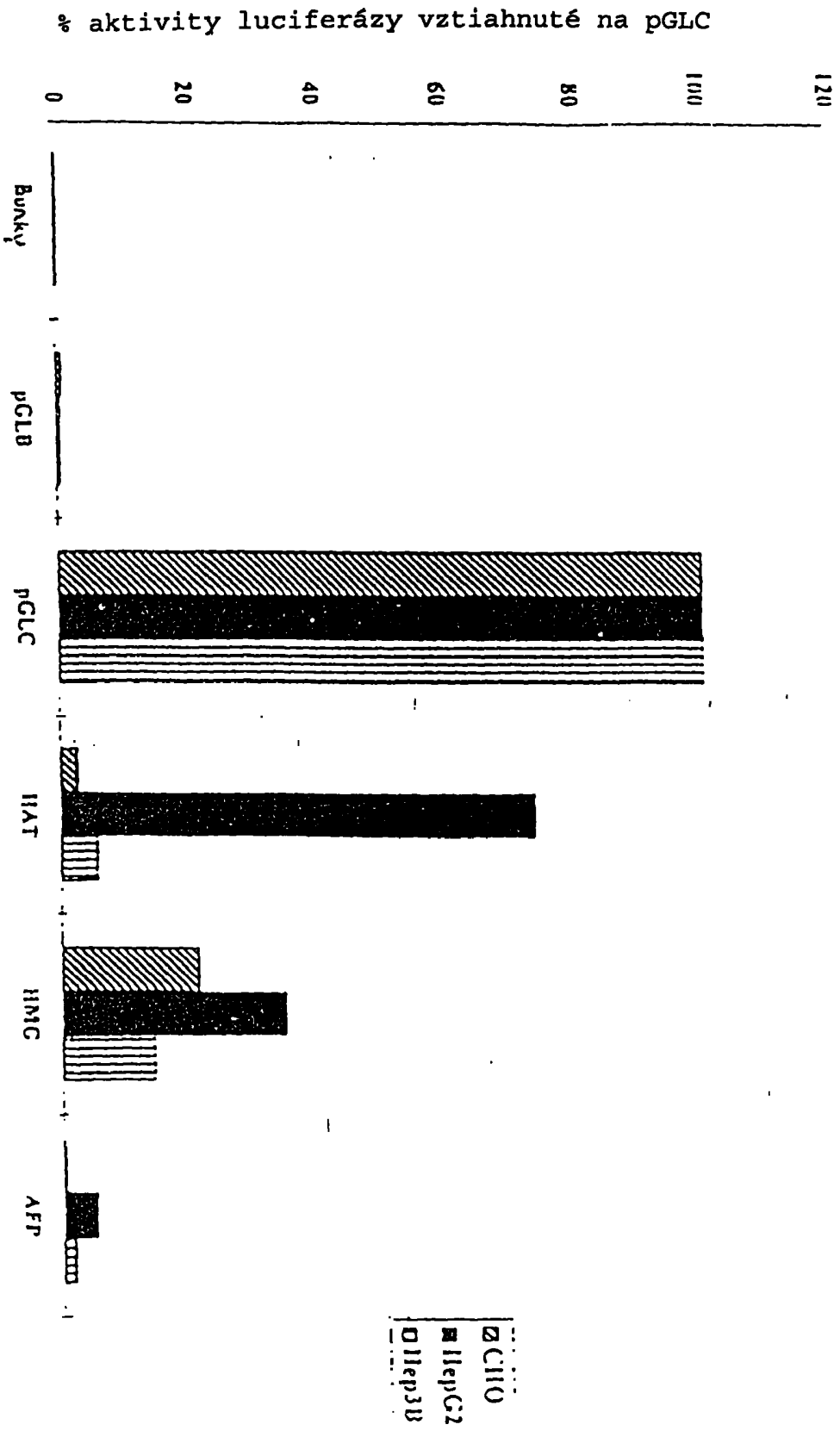
9. Spôsob podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že interferón-alfa je interferón-alfa 2b.
10. Spôsob podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že vírusovým vektorom je adenovírusový vektor.
11. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že promótor je špecifický pre pečeň.
12. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že promótor je špecifický pre prostatu.
13. Spôsob podľa nároku 11 alebo 12, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že segment nukleovej kyseliny kódujúcej interferón-alfa je operatívne spojený s nukleotidovou kyselinou kódujúcou sekvenciou vedúcu k sekrécii interferónu-alfa.

Účinnok interferónu-alfa na rakovinové bunky ľudskej prostaty  
(test MTT)



Obr. 1

Aktivita luciferázy riadená minimálnym DNA promótorom pre gény špecifické pre pečeň



Obr. 2