(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 935058 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 935058

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/37
C12N 15/19
C12N 15/86
C12N 15/26
A61K 48/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.03.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.11.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.01.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **16.03.1993 PCT/FR1993/000264**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

16.03.1992 FR 9203120 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Centre National De La Recherche,** 15, Quai Anatole France, 75007 Paris, RANSKA, (FR)
2 • **Institut Gustave Roussy,** Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Haddada, Hedi,** Alfortville, RANSKA, (FR)
2 • **Ragot, Thierry,** Meudon, RANSKA, (FR)
3 • **Perricaudet, Michel,** Quarville, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Kasvainten vastaiseen käsittelyyn tarkoitetut defektiiviset rekombinantti-adenovirukset, jotka ilmentävät sytokiineja

För antitumörbehandling avsedda rekombinant-adenovirus som uttrycker cytokiner

Kasvainten vastaiseen käyttöön tarkoitetut defektiiviset rekombinantti-adenovirukset, jotka ilmentävät sytokiineja

Sytokiinit ovat molekyylejä (hormoneja), joita solut tuottavat antigeenistimulaation tai muiden tekijöiden aktivoinnin seurauksena. Ensimmäinen keinotekoisesti tuotettu sytokiini oli interleukiini 1 (IL-1). Se tekee mahdolliseksi T-solujen aktivoinnin, jotka solut puolestaan ryhtyvät tuottamaan kokonaista lymfokiini-ryhmää, joista lymfokiineista jotkut ovat välttämättömiä immuunijärjestelmän sekä virusinfektioiden ja loisperäisten infektioiden vastaisten puolustusjärjestelmien aktivoimiseksi.

Joidenkin vuosien ajan sytokiineja on käytetty syövänvastaisessa immunoterapiassa. Niiden käyttäminen tavanomaiseen tapaan aiheuttaa kuitenkin jonkin verran ongelmia. Esimerkiksi IL-2:lla on melko huomattavia sivuvaikutuksia; se poistuu nopeasti aineenvaihdunnan kautta, niin että joudutaan toistuvasti antamaan suuria annoksia.

Siksi ollaankin etsimässä sellaisia parhaita mahdollisia käyttötapoja, jotka lisäisivät sytokiinien tehoa ja samalla vähentäisivät niiden ei-toivottuja vaikutuksia.

Keksinnön tarkoituksena on siten saada aikaan defektiiviset rekombinantti-adenovirukset, jotka ekspressoivat (ilmentävät) yhtä tai useampaa sytokiinia. Keksintö koskee myös näiden rekombinantti-adenovirusten käyttöä varsinkin kasvainten vastaisten lääkeainekoostumusten muodostamiseksi, erityisesti sellaisten koostumusten muodostamiseksi, jotka injektoidaan suoraan isännän kiinteisiin kasvaimiin.

Tämän keksinnön kohteena ovat defektiiviset rekombinantti-adenovirukset, joille on tunnusomaista, että niissä on ei-replikoituva defektiivinen adenovirusgeeni, johon on insertoitu yksi tai useampi nukleiinihapposekvenssi, joka koodaa yhtä tai useampaa sytokiinia, varsinkin lymfokiinia, yhden tai useamman sellaisen promoottorin säätämänä, jonka ihmisen solujen, erityisesti ihmisen kasvainsolujen tai soluja in-

filtroivien kasvaimien polymeraasit kykenevät tunnistamaan.

Keksintö koskee täsmällisemmin sanottuna rekombinantti-nukleiinihappoja, joita voidaan käyttää tällaisten defektiivisten rekombinantti-adenovirusten tuotantoon.

Tällaiselle rekombinantti-nukleiinihapolle on tunnusomaista, että se käsittää toisaalta defektiivisen adenoviruksen genomisen sekvenssin, jossa ei ole sen replikoitumiselle välttämättömiä sekvenssejä, mutta siinä on kuitenkin ne sekvenssit, jotka tässä geenissä ovat sen geneettisen informaation tuki, joka on välttämätön, jotta vastaava adenovirus voisi tunkeutua tämän infektoimiin soluihin, samoinkuin joukon olennaisia sekvenssejä, jotka ovat välttämättömiä adenoviruksen koteloimiseksi. Rekombinantti-nukleiinihappo käsittää toisaalta insertin, joka koostuu nukleiinihapposekvenssistä, joka koodaa sytokiinia, jolloin tämä insertti on yllä mainitussa genomisessa sekvenssissä läsnäolevan tai sinne ennalta viedyn promoottorin kontrolloima.

Adenovirukset, varsinkin tyyppiä 2 tai 5 olevat adenovirukset, jotka kykenevät infektoimaan ihmisiä (tai ihmisen adenovirukset), tai vielä serotyyppiä 4 ja 7 olevat adenovirukset, pidetään tämän keksinnön kannalta parempina vektoreina, varsinkin kun otetaan huomioon sen vieraan ADN-osan suuren koon, joka on mahdollista viedä viruksen genomiin.

Edullisesti yllä mainittu (yllä mainitut) nukleiinihapposekvenssi-insertti (-insertit), jo(t)ka koodaa(vat) yhtä tai useampaa ennalta määrättyä sytokiinia, sisältyvät adenoviruksen defektiivisen geeniin, jossa ei ole olennaisia, adenoviruksen replikoitumiselle välttämättömiä nukleotidisekvenssejä, ja varsinkin transaktivaattorit E1A ja E1B, ja tarvittaessa adenoviruksen alue E3, tai vielä sen alueet E1 ja E3.

Toisin sanoen keksintö hyödyntää defektiivisten rekombinantti-adenovirusten kykyä panna alulle sellaisten sekvenssi-inserttien ekspressio, jollaisia niissä on sellaisissa soluissa, joihin ne leviävät, vieläpä silloinkin kun ne defektiivi-

sen luonteensa vuoksi eivät replikoidu siellä. Näin ollen keksinnön tarkoituksena on saada erittymään sytokiineja itse käsiteltävän kasvaimen solujen joukossa (varsinaisten kasvainsolujen ja solujen, varsinkin lymfosyyttien, jotka infiltroivat näitä kasvaimia) silloin kun defektiiviset adenovirukset ovat infektoineet nämä, varsinkin silloin kun nämä injektoidaan suoraan kasvaimeen. Tuotetut sytokiinit aktivoivat näin ennen muuta, *in situ*, sytotoksiset solut, jotka infiltroivat kasvaimen ja kasvaimen läheisyydessä olevat.

Mitä tulee defektiivisen rekombinantti-adenoviruksen genomiin insertoitavaan sekvenssiin, niin se voidaan valita kaikista niistä sekvensseistä, jotka ekspressoivat sellaista sytokiinia, joka kykenee vaikuttamaan joko suoraan antitumoraalisesti tai aktivoimalla organismin immunokompetentteja soluja, tai samanaikaisesti molemmilla tavoilla.

Sytokiineista mainittakoon esimerkkeinä: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, alfa-interferoni, gamma-interferoni, "tumor necrosis factor" alfa (TNF α) (tuumorinekroositekijä α).

Samoja rekombinantti-adenoviruksia voidaan käyttää tietyissä sairauksissa, joissa on kyse immuunikadosta, ja tietyissä loisperäisissä ja virusperäisissä sairauksissa (varsinkin gamma- ja alfa-interferonit, ja/tai GM-CSF). Ne annetaan tällöin tavanomaiseen tapaan tai sellaisten mieluiten ihmisen solujen välityksellä, jotka on otettu tilassa, joka mahdollistaa niiden injektoinnin ihmiseen, jolloin nämä solut on etukäteen infektoitu keksinnön mukaisella rekombinantti-adenoviruksella.

Tämän jälkeen tarkastellaan tiettyjen sytokiinien ominaisuuksia.

Interleukiini 1 (IL-1):

Sitä tuotetaan ensisijaisesti aktivoitujen monosyyttien ja makrofagien avulla. Sen molekyylipaino on noin 17 kilodaltonia. Sillä on useita aktiviteetteja, mm:

a) kemoattraktiivinen vaikutus polymorfonukleiinisoluihin ja makrofageihin (1,2),

b) spontaanien sytotoksisten solujen sytotoksisen aktiviteetin lisääntyminen ("Natural Killer" tai Nk)

c) kuumeen aikaansaaminen infektion seurauksena

d) varsinkin T-solujen aktivointi muiden tekijöiden tuottamiseksi.

Interleukiini 2 (IL-2), interleukiini 4 (IL-4) ja interleukiini 5 (IL-5):

Niitä tuotetaan aktivoitujen T-lymfosyyttien avulla. Näiden sytokiinien vaikutus rajoittuu immuunijärjestelmän soluihin; ne käynnistävät näiden monistumisen ja aktivoitumisen: IL-2 ja IL-4 on kokeiltu antitumoraalisessa immunoterapiassa sekä hiirillä että ihmisillä. Hiirillä ne toimivat synergistisesti ja aiheuttavat kasvaimen pienenemisen.

Interleukiini 6 (IL-6):

Sitä tuotetaan lukuisilla solutyypeillä, kuten T-lymfosyyteillä, makrofageilla, fibroblasteilla, jne. Se panee alulle B-lymfosyyttien lopullisen erilaistumisen, jolloin nämä muuttuvat vasta-aineiden tuottajiksi.

"Tumor Necrosis Factor-α" (TNF-α) (tuumorinekroositekijä alfa):

Tätä tekijää tuottavat makrofagit. Sillä on kaksoisvaikutus: suora vaikutus kasvainsoluihin siten, että se aiheuttaa niiden liukenemisen, ja immuunijärjestelmän aktivoituminen.

TNF-α:aa täytyy antaa ihmiselle harkiten, koska lukuisissa soluissa on sen reseptoreja. Tästä on se hyöty, että sen erittettä ei viedä muuten kuin paikallisesti suoraan kasvaimeen, jotta rajoitettaisiin sen ei-haluttuja vaikutuksia isännän

muihin soluihin.

Interleukiini 3 (IL-3), interleukiini 7 (IL-7) ja "Colony Stimulating Factor" (CSF):

Nämä ovat verenmuodostuksen kasvutekijöitä. Niitä tuottavat olennaisesti lymfosyytit, monosyytit ja makrofagit. Ne vaikuttavat verenmuodostuksen tasoilla ts. verisolujen ydinsolujen eriytymisen eri vaiheissa. Lisäksi CSF:llä on erittäin merkittäviä vaikutuksia organismin primaaripuolustustasolla bakteeripuolustuksen suhteen, sillä se houkuttelee makrofagit infektiokohtiin ja lisää niiden fagosytoosikapasiteettia.

Yhdessä IL-2:n ja IL-4:n kanssa GM-CSF osoittautuu olevan merkittävä antitumoraalinen tekijä.

Gamma-interferoni (IFN γ):

Aktivoidut T-solut tuottavat tätä tekijää; sillä on antiviraalisia ominaisuuksia; se estää virusten ja loisten monistumisen ja edistää infektoituneiden solujen ja tiettyjen kasvainsolujen liukenemista.

Alfa-interferoni (IFN α)

T-solujen ja monosyyttien tuottamana sillä on antiviraalinen ja liuottava vaikutus infektoituneisiin soluihin. IFN α on käytetty immunoterapiassa tietyntyyppisiä syöpiä, kuten mesotelioomaa, vastaan.

Keksinnön mukaisissa adenoviruksissa käytettävät, insertoitavat sekvenssit voidaan tietenkin valita muistakin kuin yllä kuvatuista sekvensseistä. Silti nämä esimerkit kuvaavat sitä mahdollisuuksien valikoimaa, joka hoitavalla lääkärillä on, kun hänen on valittava käyttöön sopivin defektiivinen rekombinantti-adenovirus, jolloin on otettava huomioon niiden kasvaimien luonne, joita vastaan taistellaan.

Keksintö koskee myös lääkeainekoostumuksia, jotka käsittävät

yhden tai useampia yllä kuvatun kaltaisia rekombinantti-vektoreita, lääketieteellisesti hyväksyttävän kantoaineiden yhteydessä, varsinkin sellaisia koostumuksia, jotka ovat suoraan injektoitavissa käsiteltäviin kasvaimiin, steriilejä, isotoonisia, tai kuivia koostumuksia, varsinkin kylmäkuivattuja, jotka, tilanteen mukaan, steriloitua vettä tai fysiologista seerumia lisäämällä, tekevät mahdolliseksi suoraan kasvaimiin ruiskutettavien liuosten muodostamisen ja uudelleenmuodostamisen.

Modifioitujen, replikoitumattomien adenovirusten injektoiminen suoraan kasvaimeen antaa toisaalta sen edun, että vältetään rekombinantti-adenovirusten leviäminen yleiseen verenkiertoon. Tämän seurauksena voidaan myös välttää ne sivuvaikutukset, jotka ovat taipuvaisia kohdistumaan ekspressoitujen sytokiinien vaikutuksesta muualle kuin niihin kohtiin, joihin niiden vaikutus halutaan kohdistaa, tässä tapauksessa itse kasvainsoluihin tai soluihin, varsinkin lymfosyytteihin, jotka aiheuttavat niiden infiltraation tai jotka ovat niiden välittömässä läheisyydessä. Mieluiten injektointi tapahtuu ainakin vähintään yhdessä primaarikasvainkohdassa.

Keksintö ei kuitenkaan rajoitu sellaisten rekombinantti-adenovirusten käyttöön suoraan kasvaimissa, jotka sisältävät kyseessä olevan kaltaisia sytokiineja koodaavia sekvenssejä. Kuviteltavissa on mikä tahansa käyttötapa, jolla nämä rekombinantti-adenovirukset pääsevät käsiteltävään kasvaimeen. Erityisesti voidaan turvautua isännän kanssa yhteensopiviin soluihin, esimerkiksi ihmisen fibroblasteihin, jotka mieluiten on annalta otettu itse isännästä.

Keksintö koskee samoin soluviljelmiä, esimerkiksi fibroblasteja viljelmässä, joka on etukäteen infektoitu rekombinanttinukleiinihapoilla, varsinkin yllä mainituilla defektiivisillä adenoviruksilla. Infektoidut solut, jotka on tarpeen vaatiessa heikennetty tai tehty immunologisesti kuolleiksi esimerkiksi säteilyttämällä, auttavat osaltaan hävittämään paikoilleen kiinnittyneitä kasvaimia, kun ne injektoidaan tavanomaiseen tapaan. Injektointi voi tapahtua joko yksinään tai suo-

raan kasvaimeen tapahtuneen injektoinnin lisäksi.

Keksinnön tavoitteena on myös menetelmä yllä kuvattujen rekombinantti-adenovirusten saamiseksi, joka menetelmä käsittää varsinaisen vektorin valmistamisvaiheen jälkeen, joka tapahtuu lisäämällä yksi tai useampi insertoitava nukleiinihappo alkuperäisen defektiivisen adenoviruksen genomiin, vaiheen, jossa muunnetaan (varsinkin ihmisistä tai eläimistä peräisin olevien) ylempien eukaryoottien muunnettavat solulinjat, joissa itsessään on selvästi erottuva nukleotidisekvenssi, joka on sovelias täydentämään sen osan tai ne osat, jotka puuttuvat defektiivisen adenoviruksen genomista ja jota ilman viimeksi mainitun replikoituminen on mahdoton, jolloin mainittu selvästi erottuva sekvenssi sisältyy mieluiten mainitun solulinjan solujen genomiin.

Suositeltavana esimerkkinä näistä solulinjoista mainitaan linja 293, ihmisen munuaisalkiolinja, joka sisältää sen genomiin yhtyneenä, yksitoista ensimmäistä prosenttia tyyppiä 5 (Ad5) olevan adenoviruksen geenin vasemmasta ääripäästä. Nämä voivat siis täydentää defektiivisiä rekombinantti-viruksia, joissa on deletioita tällä alueella. Eräs tällainen saantomenetelmä on kuvattu tarkemmin EP-patenttihakemuksessa 0 185 573, joka on tehty 20.11.1985.

Näiden solulinjojen muuntamisen jälkeen näin monistetut ja tuotetut defektiiviset adenovirukset otetaan talteen solulinjaviljelmästä ja puhdistetaan.

Keksintö selostetaan yksityiskohtaisemmin seuraavassa selityksessä, jossa kuvataan eri mahdollisuuksia konstruoida rekombinantti-vektoriadenovirus, joka sisältää ainakin yhden sekvenssin, joka koodaa yhtä sytokiinia, erityisesti lymfokiinia.

I. MENETELMÄT

a) Solut ja virukset

Ihmisen munuaisalkio-solulinjaa 293, joka on muunnettu Ad-5:llä (Graham et al., 1977), käytetään ADN:n siirtämiseen samoinkuin adenoviruksen (Ad) monistamiseen ja pitoisuuden määritykseen. Itse asiassa solulinja 293 täydentää toimintojen E1A ja E1B geenien toimintoja ja sallii defektiivisten Ad-rekombinanttien replikoitumisen. Rekombinantti-Ad:n muodostamiseen käytetään (Shenk et Williams, 1984) ihmisen Ad5-d1324:ää., jossa on deleetioita alueilla E1 (3,9 - 10,5 m.u.) ja E3 (78.5-84.3 m.u.). Solulinjat 293, Hela et Vero, säilytetään itsenäisellä Eagle-minimi-kasvualustalla, jossa on 10 % vasikan sikiöseerumia.

b) Eri sytokiinien ekspression mahdollistavien plasmidien rakenne

Eukaryoottinen ekspressiovektori pMLP10 on kuvattu (Ballay et al., 1985). Tämän vektorin johdannainen (pMLP18) on konstruoitu insertoimalla sekvenssi, joka sisältää erilaisia uniikkeja leikkauskohtia, adenoviruksen hitaasti kehittyvän, merkittävän promoottorin perään. Nämä kohdat mahdollistavat sellaisten eri geenien kloonaamisen, jotka koodaavat viruspromoottorin kontrolliin valittuja sytokiineja. Uniikkeja leikkauskohtia käsittävän sekvenssin perään sijoitetaan sekvenssi, joka sisältää viruksen SV40 varhaisia antigeenejä koodaavan polyadenylaatiogeenin signaalin. Ad5:n palanen BgIII - HindIII kloonataan sen perään. Tämä kolmen Kpb:n sekvenssi sisältää geenin, joka koodaa proteiinia IX, joka on välttämätön viraaligenomin kapseloitumiselle, kun ollaan yli 97 %:ssa sen normaalikoosta, ja antaa mahdollisuuden yhdistää myöhemmin uudelleen in vivo. Eri sytokiinien geenejä koodaavat sekvenssit eristetään lähtemällä eri vaiheissa saaduista plasmideista. Nämä sekvenssit, jotka on saatu eri restriktioentsyymien avulla tapahtuneen katkaisemisen jälkeen, viedään yllä kuvatun ekspressiovektorin (pMLP-18) alueella, jossa on monta kloonauskohtaa. Näin saadaan erilaisia plasmideja, joita kut-

sutaan pMLP-sytokiineiksi (IL-2, IL-4 jne...) ja joita käytetään rekombinantti-virusten aikaansaamiseen seuraavassa kappaleessa kuvatulla tavalla.

c) ADN:n siirtäminen ja rekombinantti-virusten eristäminen

Defektiiviset Ad-sytokiini-rekombinantti-adenovirukset saadaan yhdistämällä uudelleen in vivo restriktioentsyymillä Cla I ennalta halkaistun viraaligenomin oikea kappale, ja homologinen sekvenssi, joka on yllä kuvattujen pMLP-sytokiiniplasmidien pinnalla. Katkaisun jälkeen puhdistetun viraaligeenifragmentin (2,6 m.u. - 100 m.u.) ja restriktioentsyymillä Cla I tai Pvu I linearisoidun plasmidin seos transfektoidaan soluihin 293 saostamalla kalsiumfosfaattiin (Graham et Van Der Eb, 1973). Ne solujaksot, joilla on sytopaattinen vaikutus, eristetään 10 päivän kuluttua ja virusta monistetaan viljelmässä. Viraali-ADN uutetaan Hirtin menetelmällä (Graham et al.,1977) ja rekombinantti-virukset identifioidaan kartografialla restriktioentsyymien avulla.

Kuviossa 1 on kaaviomainen esitys yhdestä tämäntyyppisestä rakenteesta, joka aloittaa interleukiinia (IL-2, IL-4, jne...) koodaavan insertoidun sekvenssin.

Kuviossa:
- "leaders" tarkoittaa johtavaa kolmiosaista kappaletta
- "del" tarkoittaa "deleetiota"
- Ad d1 324 tarkoittaa adenovirusta, jossa on yllä esitettyjä "deleetioita"

d) Ekspressoitua sytokiinia koodaavien sekvenssien ekspressio

Helan tai Veron solulinjat infektoidaan saaduilla defektiivisillä rekombinantti-adenoviruksilla. Todella transfektoituja soluja voidaan luonnehtia ensisijaisesti niiden kasvualustaan vapautuneen sytokiinin aktiivisuutta havainnoimalla. Kun on kyse IL-II:sta, on havaittu saantoja, jotka voivat nousta 1 - 2 μg:aan interleukiinia 10^6 solussa.

Rekombinantti-Ad-sytokiinilla infektoidut solut erittävät kasvualustaansa erisuuruisia määriä sytokiinia. Tuotettujen sytokiinien jäljittämiseen ja niiden määrän määrittämiseen on olemassa erilaisia menetelmiä.

1) Kvantitatiiviset menetelmät

- ELISA, käytetään spesifisiä vasta-aineita
- RIA (radioimmuunimääritys)
- Western blot

2) Kvalitatiiviset menetelmät (tai biotestit): perustuvat sytokiinien biologisiin ominaisuuksiin

Esimerkiksi:

IL-2: CTL-L2 solujen lisääntymistesti (CTL-L2 solut eivät monistu eivätkä pysy viljelmässä muutoin kuin silloin, kun kasvualustassa on IL-2:sta).

IL-3 ja GM-CSF: TF-1-solujen lisääntymistesti

IL-4: CTL-L2 solujen nopean lisääntymistesti ja tiettyjen solujen, esimerkiksi lymfosyyttien avulla, liukenevien CD23:n induktio.

INF-α: sytotoksisuustesti soluihin L92-9.

Neutralisaatiotesti: Sytokiinien vaikutus voidaan estää inkuboimalla kohteena olevat solut spesifisten vasta-ainesolujen läsnäollessa.

Joitakin tuloksia, jotka on saatu geenin IL-2 (Ad-IL-2) käsittävällä adenovirusvektorilla, on esitetty seuraavaksi.

1) Solut, jotka on infektoitu in vitro Ad-IL-2:lla, erittävät merkittäviä määriä funktionaalista IL-2:sta.

2) Geeniä IL-2 kantavan vektorin suora injektointi eläimeen

jo syntyneisiin kasvaimiin (kasvaimen koko injektointihetkellä on 4-7 mm) aiheuttaa immuunijärjestelmän stimulaation, mikä näkyy kasvaimen koon stabiloitumisena, sitten sen pienenemisenä, kunnes se häviää täydellisesti 40-50 %:ssa tapauksia.

Tulosta voidaan parantaa käsittelemällä kasvaimia niiden kehityksen varhaisemmassa vaiheessa tai käyttämällä samalla kertaa eri vektoreita siten, että yhdistetään Ad-IL-2 Ad-INF:n ja/tai Ad-IL-4:n, Ad-GM-CSF:n, Ad-IL-3:n kanssa. Tämä yhdistelmä määräytyy kasvaintyypin mukaan.

3) Kasvainsolut, jotka on infektoitu in vitro ja injektoitu sitten samanalkuisiin eläimiin tai jopa immuunivajavuustilassa oleviin eläimiin (hiiri Nu/Nu) kadottavat tuumorigeenisen kykynsä (vähintäin 80 % eläimistä hylkii kasvainsoluja; toisin sanoen kasvainsolut eivät kasva enää 80 %:ssa immuunivajavuustilassa olevista eläimistä, joihin on injektoitu näitä soluja).

4) Eläimet, jotka ovat hylkineet ensimmäistä infektoitujen kasvainsolujen injektiota, ovat tulleet erittäin immuuneiksi ja ne on suojattu eri aikoina ja eri kohtiin injektoituja (ei infektoituja) vanhemmista peräisin olevia kasvainsoluja vastaan.

Yhtä aikaa in vitro infektoitujen kasvainsolujen kanssa injektoidut immunisoituneiden eläinten pernasolut kykenevät lisäksi siirtämään kasvaintenvastaisen immuniteetin vastaanottaviin eläimiin.

On selvää, että yllä olevat defektiivisten rekombinantti-adenovirusten rakenteesta annetut kuvaukset eivät millään tavalla ole rajoittavia. Muutkin rakenteet ovat mahdollisia, varsinkin niiden vaihtoehtojen mukaiset, jotka on vielä annettu jäljempänä esimerkin vuoksi.

1) Promoottorien vaihtaminen

Adenovirusten merkittävin, hitaasti kehittyvä promoottori voidaan korvata muilla yleisesti saatavilla promoottoreilla, joiden alkuperä kuitenkin on eksogeeninen, kuten
- promoottorilla, joka on RSV:n (Rousin sarkoomavirus) LTR:ssa (Long Terminal Repeat)
- CMV:n (sytomegaloviruksen) geenin IE promoottorilla
- induktoitavilla promoottoreilla MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) tai metallotioneiini.

Samoin voidaan käyttää promoottoreita, jotka sallivat kasvainsoluihin rajoittuvan, spesifisimmän ekspression, esimerkiksi
- parvoviruksen HI geenireplikaation promoottorin.

Keksintö koskee vielä yllä mainitun tyyppistä rekombinantti-nukleiinihappoa, jolle on tunnusomaista, että adenoviruksen geenisekvenssistä on poistettu sen 5'-pään alue adenoviruksen alueen E1A nopeakasvuisen promoottorin perästä, ja että sytokiinia koodaava sekvenssi on sijoitettu nopeakasvuisen promoottorin kontrollin alle. Tämä rekombinantti-nukleiini-happo voidaan ottaa käyttöön sovelluksissa, jotka on erityisesti mainittu oikeassa suhteessa rekombinantti-ADN:iin, joissa sytokiinia koodaava sekvenssi on sijoitettu adenoviruksen hitaasti kehittyvän, merkittävän promoottorin kontrollin alle.

Ei tämä ole muitaan menetelmää ..... eikä tuloksia

2) Sytokiinien useiden geenien samanaikainen ekspressio

On kuvattu kolmen tyyppisiä rakenteita:
- sytokiinien geenit ovat kahden joko samanlaisen tai erilaisen (MLP ja RSV esimerkiksi) promoottorin kontrolloimia ja sijaitsevat toinen toisensa perässä.
- sytokiinien geenit ovat erotettavissa olevien ja viruksen erotettavissa oleviin aluesiin kloonattujen promoottoreiden kontrolloimia.

Patenttivaatimukset:

1. Adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää adenoviruksen genomisen sekvenssin, jolloin mainittu genominen sekvenssi
(a) on puutteellinen sikäli, että siitä puuttuu viruksen replikoitumiselle välttämättömät sekvenssit, mutta se sisältää ne sekvenssit, jotka ovat välttämättömiä, jotta adenovirus voisi tunkeutua viruksella infektoitaviin soluihin,
(b) käsittää joukon olennaisia sekvenssejä, jotka ovat välttämättömiä mainitun adenoviruksen kapseloimiseksi, ja
(c)käsittää insertin, joka sisältää nukleiinihapposekvenssin, joka koodaa sytokiinia, jolloin tämä insertti on endogeenisen tai heterologisen promoottorin kontrollin alainen; ja
jolloin adenovirusvektorista puuttuu transaktivaattorit E1A ja E1B and adenoviruksen E3-alue.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että sytokiinia koodaava sekvenssi on sijoitettu adenoviruksen E1A-alueen aikaisin aktivoituvan promoottorin kontrollin alaiseksi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että sytokiinia koodaava sekvenssi on sijoitettu adenoviruksen myöhään aktivoituvan promoottorin kontrollin alaiseksi.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että sytokiinia koodaava sekvenssi on sijoitettu heterologisen promoottorin kontrollin alaiseksi.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että heterologinen promoottori on valittu joukosta, johon kuuluu RSV:n (Rousin sarkoomavirus) LTR:ssa

(Long Terminal Repeat) oleva promoottori, CMV:n (sytomegalovirus) IE-geenin promoottori, MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) - promoottori, metallitioniinilla indusoituva promoottori ja parvoviruksen HI rep-geenin promoottori.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että sytokiini on valittu joukosta IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, alfa-interferoni, gamma-inter-feroni, TNF α, CSF ja GM-CSF.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen adenovirusvektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää nukleiinihappoinsertin, joka sisältää sekvenssejä, jotka koodaavat useita sytokiineja, tai että se käsittää erillisiä nukleiinihappoinserttejä, jotka koodaavat eri sytokiineja, jolloin nukleiinihappoinsertit on sijoitettu erillisten promoottorien kontrollin alaiseksi.

8. Defektiivinen adenovirus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaisen sekvenssin.

9. Soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että solut on infektoitu patenttivaatimuksen 1 mukaisella adenovirusvektorilla.

10. Menetelmä adenovirusvektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet:
(1) konstruoidaan jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaiset adenovirusvektorit;
(2) transformoidaan adenovirusvektorilla eukaryoottiset solulinjat, joissa solulinjoissa on erilliset nukleiinihapposekvenssit, jotka kykenevät komplementoimaan alueen tai alueita, jotka puuttuvat defektiivisen adenoviruksen genomista; ja
(3) otetaan talteen mainitut adenovirusvektorit.

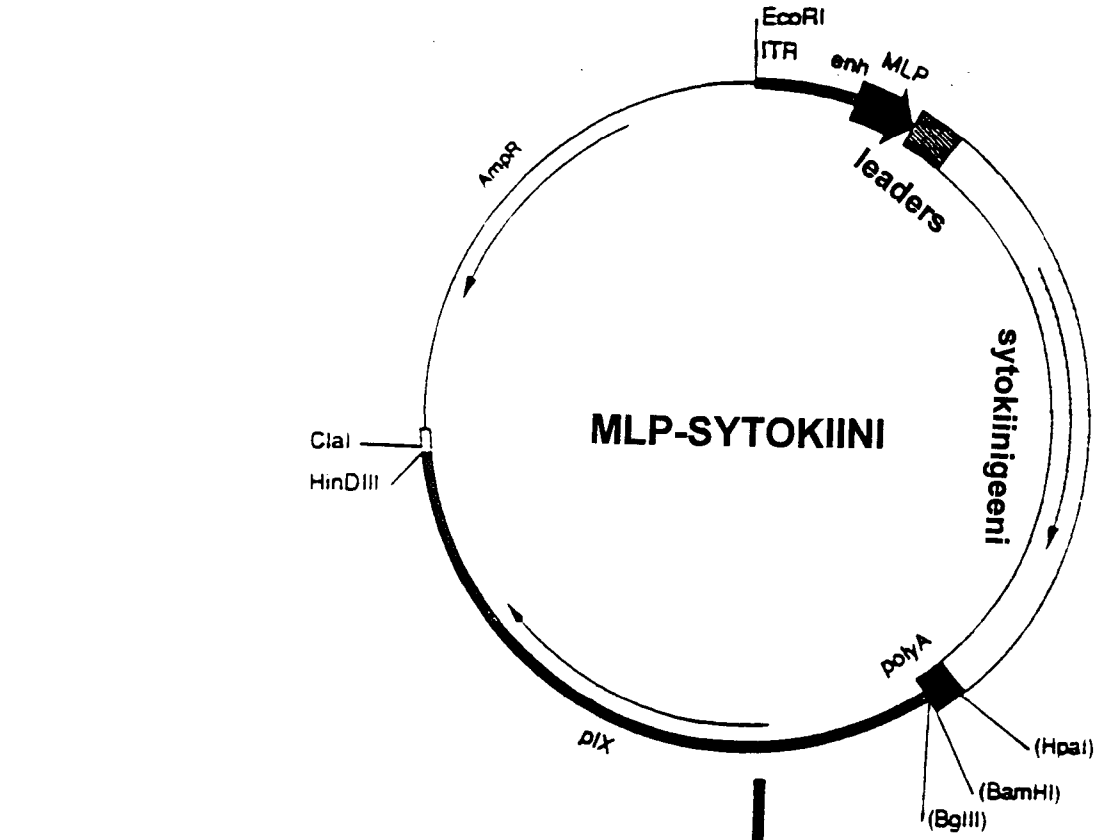
11. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen defektiivisen adenovirusvektorin valmistamiseksi,

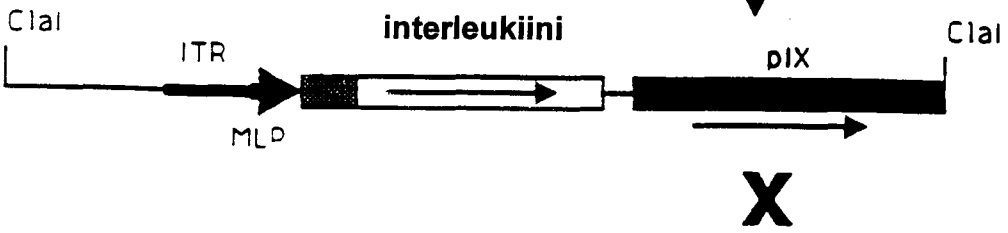
t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää:

(a) poistetaan adenoviruksesta sekvenssit, jotka ovat välttämättömiä replikoitumiselle säilyttäen kuitenkin sellaiset sekvenssit genomissa, jotka ovat välttämättömiä adenoviruksen tunkeutumiseksi viruksella infektoitaviin soluihin sekä myös joukon olennaisia sekvenssejä, jotka ovat välttämättömiä adenoviruksen kapseloimiseksi, ja

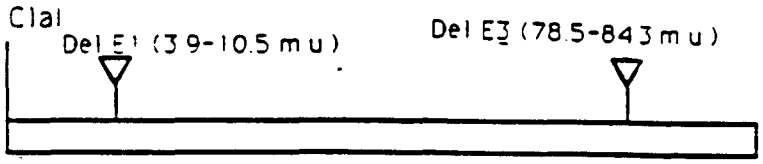
(b) insertoidaan nukleiinihapposekvenssi, joka koodaa vähintään yhtä sytokiinia, jolloin mainittu nukleiinihapposekvenssi on adenoviruksessa olevan promoottorin kontrollin alaisuudessa tai joka on etukäteen insertoitu genomiseen sekvenssiin.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu defektiivinen adenovirusvektori on johdettu ihmisen adenoviruksen tyypin 2 tai tyypin 5 tai serotyypin 4 tai serotyypin 7 adenoviruksista.





X



Ad dl324

Cla I:llä suoritetun digestoinnin jälkeen

in vivo -rekombinaatio

