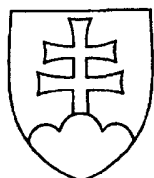


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: 666-99
(22) Dátum podania prihlášky: 18. 11. 1997
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: 6. 7. 2009
Vestník ÚPV SR č.: 7/2009
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 96/14278
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 22. 11. 1996
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: FR
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 14. 2. 2000
Vestník ÚPV SR č.: 02/2000
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: 17. 6. 2009
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/FR97/02073
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO98/22607
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(11) Číslo dokumentu:

286900

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. (2009):

C12N 15/86

C12N 7/01

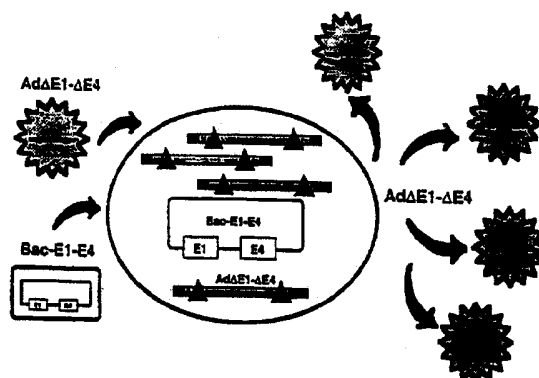
(73) Majiteľ: GENCELL SA, Vitry sur Seine, FR;

(72) Pôvodca: Leblois-Prehaud Hélène, Guyancourt, FR;
Perricaudet Michel, Ecrosnes, FR;
Vigne Emmanuelle, Ivry sur Seine, FR;
Yeh Patrice, Paris, FR;

(74) Zástupca: Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;

(54) Názov: Spôsob prípravy rekombinantných vírusov a rekombinantný vírus

(57) Anotácia:
Opísaný je spôsob prípravy defektných rekombinantných vírusov spočívajúci v tom, že sa do populácie kompetentných buniek zavedie genóm defektného rekombinantného vírusu a bakulovírus obsahujúci všetky alebo niektoré funkcie nutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného vírusu. Ďalej je opísaný rekombinantný bakulovírus na uskutočňovanie tohto spôsobu a tiež výsledný vírus.



Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka spôsobu prípravy rekombinantných vírusov. Týka sa tiež konštruktov potrebných na uskutočnenie takéhoto spôsobu, prípravy buniek a vírusu pripraveného týmto spôsobom. Tieto vírusy sa môžu použiť ako vektory na klonovanie a/alebo expresiu génov *in vitro*, *ex vivo* alebo *in vivo*.

Doterajší stav techniky

Vektory vírusového pôvodu sa široko využívajú na klonovanie, prenos a expresiu génov *in vitro* (na prípravu rekombinantných proteínov, na uskutočňovanie skrínungu a testov, na výskum regulácie génov a podobne), *ex vivo* alebo *in vivo* (na vytváranie zvieracích modelov, na terapeutické použitie). K takýmto vírusom patria najmä adenovírusy, adeno-asociované vírusy (AAV), retrovírusy, herpetické vírusy alebo vírus vakcín.

Vírusová čeľaď *Adenoviridae* je značne rozšírená u cicavcov a vtákov a patrí do nej viac ako sto sérotypov, ktoré sú tvorené dvojvláknovou DNA bez obalu a vytvárajú kapsidu s ikozaedrickou symetriou (Horwitz, In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed. Virology. Third edition ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996: 2149-2171). Okrem toho, že sú bezpečné, majú adenovírusy tiež široký bunkový tropizmus. Na rozdiel od retrovírusov, ktorých životný cyklus závisí od bunkového delenia, môžu infikovať tak aktívne sa deliace bunky, ako aj bunky v pokoji a ich genóm sa udržiava v epizomálnej forme. Navyše môžu byť produkované vo veľmi vysokom titri (10^{11} pfu/ml). Tieto hlavné vlastnosti z nich robia zvlášť výhodný vektor na klonovanie a expresiu heterológnych génov. Skupina C adenovírusov, najmä typy 2 a 5, a tiež psí adenovírus typu CAV-2, ktorého molekulárna biológia je najlepšie známa, sú zdrojom dnes bežne používaných vektorov.

Adenovírus má lineárny genóm s veľkosťou 36 kb, ktorý je na každom konci ukončený invertovanou terminálnou repetíciou (ITR), čo je sekvencia s veľkosťou 103 bp obsahujúca replikačný počiatok, a obsahuje tiež enkapsidačný signál situovaný v blízkosti ľavej ITR (Shenk, Adenoviridae: The viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed. Virology. Third edition ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996: 2111-2148). V priebehu životného cyklu vírusu sa exprimujú tri rodiny génov:

- Bezprostredne skoré gény („immediate-early genes“, E1, E2, E3 a E4), ktoré sa zúčastňujú na regulácii bunkových génov, najmä umožňujú vstup bunky do S fázy bunkového cyklu (E1A) a inhibujú apoptózu (E1B). Podieľajú sa tiež na regulácii skorých alebo neskorých vírusových génov na úrovni transkripcie, zostrihu alebo transportu (E1A, E2A, E4) mRNA (messenger RNA). Hrajú tiež úlohu pri replikácii a pri vzniku imunitnej odpovede.

- Oneskorené skoré gény („delayed-early genes“, pIX a IVa2) sú spojené s reguláciou transkripcie neskorých génov (IVa2) alebo s vytváraním viriónov (pIX).

- Neskoré gény („late genes“, L1 až L5) sa transkribujú zo silného promotora (MLP). Primárny transkript s veľkosťou 28 kb umožňuje vytvárať transkripty zodpovedajúce rôznym štruktúrnym proteínom (jadrový proteín, pentón, hexón) a neštruktúrnym proteínom, ktoré sa podieľajú na vytváraní a zrení vírusových častíc tak, že dochádza k alternatívnemu zostrihu s využitím 5-polyadenylačného miesta.

Adenovírusové vektory sa využili na klonovanie a expresiu génov *in vitro* (Gluzman et al., Cold Spring Harbor, New York 11724, p. 187), na vytvorenie transgénnych zvierat (WO95/22616), na prenos génov do buniek *ex vivo* (WO95/14785); WO95/06120) a na prenos génov do buniek *in vivo* (pozri najmä WO93/19191, WO94/24297, WO94/08026).

Čo sa týka adeno-asociovaných vírusov, AAV, sú to relatívne malé DNA vírusy, ktoré sa integrujú do genómu infikovaných buniek stálym a relatívne lokálne-spezifickým spôsobom. Sú schopné infikovať široké spektrum buniek bez toho, aby nejako ovplyvnili bunkový rast, diferenciáciu a morfológiu. Zdá sa, že sa doteraz u nich neprejavili žiadne patologické účinky na človeka. Genóm AAV bol klonovaný, sekvenovaný a opísaný. Obsahuje asi 4700 bp a na každom konci má úsek invertovanej terminálnej repetície (ITR) s veľkosťou 145 bp, ktorý slúži ako replikačný počiatok pre vírus. Zvyšok genómu je rozdelený do dvoch nevyhnutných častí, ktoré nesú enkapsidačnú funkciu: ľavá časť genómu obsahuje gén rep, ktorý sa zúčastňuje na vírusovej replikácii a expresii vírusových génov a pravá časť genómu obsahuje gén cap, kódujúci proteíny vírusovej kapsidy.

Použitie vektorov odvodených od AAV na prenos génov *in vitro* a *in vivo* už bolo opísané (pozri predovšetkým WO91/18088; WO93/09239; US 4,797,368, US 5,139,941, EP 4488 528).

Retrovírusy sú integratívne vírusy, ktoré selektívne infikujú deliace sa bunky. Predstavujú preto zaujímavé vektory na použitie napríklad pri liečbe rakoviny alebo restenóz. Genóm retrovírusov sa skladá z dvoch LTR, enkapsidačnej sekvencie a troch kódujúcich úsekov (gag, pol a env). Konštrukcia rekombinantných vektorov a ich použitie *in vitro* a *in vivo* už bola podrobne opísaná (pozri napríklad Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP453242, EP 178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, Bio-Technology 3 (1985) 689).

Z vírusov sa už pripravili rôzne konštrukty na použitie ako rekombinantné vektory obsahujúce rôzne požadované gény. V každom z týchto konštruktov sa vírusový genóm modifikoval tak, aby vírus nebol schopný autonómnej replikácie v infikovaných bunkách. Takže doteraz známe konštrukty zodpovedajúce doterajšiemu stavu techniky sú vírusy, ktoré sú defektné v určitej oblasti svojho genómu, ktorá je nevyhnutná na replikáciu. Konkrétne čo sa týka adenovírusov, prvá generácia konštruktov mala deléciu v úseku E1 alebo deletovaný celý úsek E1, ktorý je nevyhnutný na vírusovú replikáciu, a to v mieste, kde bola vložená heterológna sekvencia DNA (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Okrem toho, na zlepšenie vlastností takéhoto vektora sa navrhlo vytvoriť iné delécie alebo modifikácie adenovírusového genómu. Tak sa napríklad vnesla teplotne senzitivná mutácia do mutanta ts125, čo umožnilo inaktivovať DNA väzbový proteín (DBP) s veľkosťou 72 kD (Van der Vliet et al., 1975). Iné vektory obsahujú delécie iných oblastí nevyhnutných na vírusovú replikáciu a/alebo šírenie, a síce oblasti E4. Adenovírusové vektory, ktoré majú odstránené oblasti E1 a E4, majú značne redukovaný transkripčný „šum“, a tiež expresiu vírusových génov. Takéto vektory sú napríklad opísané v patentových prihláškach WO94/28152, WO95/02697, WO96/22378. Boli tiež opísané vektory nesúce modifikácie na úrovni génu IVa2 (WO96/10088). Okrem toho boli tiež opísané (WO94/12649, WO94/28152, WO95/02697) tzv. „minimálne adenovírusy“ alebo „pseudoadenovírusové“ vektory (alternatívne AdΔ), ktoré obsahujú len úseky nevyhnutné v cis na produkciu vírusu (ITR a enkapsidačná sekvencia) a nemajú žiadnu vírusovú kódujúcu sekvenciu, hoci príprava takýchto vektorov je ťažká, ako bude vysvetlené ďalej.

Čo sa týka AAV, opisovaným vektorom všeobecne chýba celá kódujúca oblasť Rep a Cap, ktoré sú nahradené požadovanou nukleovou kyselinou.

V rekombinantných vektoroch odvodených od retrovirusov sú všeobecne odstránené gag, pol a env, buď čiastočne alebo úplne, a sú nahradené heterológnou sekvenciou požadovanej nukleovej kyseliny. Okrem toho rekombinantné retroviry môžu obsahovať modifikácie na úrovni LTR na potlačenie transkripčnej aktivity a na úrovni veľkej enkapsidačnej sekvencie, obsahujúcej časť génu gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639).

Vzhľadom na ich defektný charakter vo vzťahu k replikácii, príprava týchto rôznych rekombinantných vírusov zahŕňa možnosť transkomplementácie funkcií odstránených z genómu. A práve transkomplementácia, zvlášť poskytovanie transkomplementačných funkcií, je zdrojom hlavných ťažkostí pri príprave týchto vírusov.

Vyvinuli sa dva prístupy riešenia tohto problému. Prvý je založený na konštrukcii transkomplementačných línii, čiže v podstate enkapsidačných línii. Druhý prístup je založený na použití pomocného („helper“) adenovírusu alebo pomocného plazmidu.

Skonštruovali sa rôzne enkapsidačné línie rôznych defektných vírusov. Tieto línie sú schopné poskytnúť funkciu, ktorá chýba vírusovému vektoru. Všeobecne tieto línie obsahujú vo svojom genóme integrované úseky odstránené z vírusového genómu (teda napríklad E1, E2 a/alebo E4 pri adenovírusoch, gag, pol a/alebo env pri retrovirusoch a rep a/alebo cap pri AAV).

Jedna línia známa tým, že produkuje defektné adenovírusy, je línia 293, do ktorej sa integrovala časť adenovírusového genómu. Podrobnejšie povedané, línia 293 je línia buniek ľudských embryonálnych obličiek, ktorá obsahuje ľavý koniec (asi 11 až 12 %) genómu adenovírusu sérotypu 5 (Ad5), ktorý obsahuje ľavú ITR, enkapsidačný úsek, úsek E1 vrátane E1a a E1b, úsek kódujúci proteín pIX a časť úseku kódujúceho proteín pIVa2. Táto línia je schopná transkomplementovať rekombinantný adenovírus defektný v úseku E1, ktorému chýba buď celý úsek E1, alebo jeho časť, a produkovať vírus s vysokým titrom. Táto línia je tiež schopná produkovať v permissívnej teplote (32 °C) vírus, obsahujúci navyše teplotne senzitivnú mutáciu E2. Sú opísané aj ďalšie bunkové línie schopné komplementovať E1, založené na ľudských bunkách pľúcneho karcinómu A549 (WO94/28152) alebo ľudských retinoblastoch (Hum. Gen. Ther. (1996) 215). Sú tiež opísané línie schopné komplementovať niekoľko funkcií adenovírusu. Treba uviesť najmä línie komplementujúce úseky E1 a E4 (Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559; Cancer Gen. Ther. (1995) 322; Krougliak et al., Hum. Gen. Ther. 6 (1995) 1575 a línie komplementujúce úseky E1 a E2 (WO94/28152, WO95/02697, WO95/27071).

Sú tiež opísané rôzne línie produkujúce defektné retroviry, všeobecne schopné exprimovať gény gag, pol a env. K takýmto líniam patrí napríklad línia PA317 (US 4,861,719), línia PsiCRIP (WO90/02806), línia GP+envAm-12 (WO89/07150) alebo línia BOSC (WO94/19478) a ďalšie. Na konštrukciu rekombinantných retrovirusov obsahujúcich požadovanú nukleovú kyselinu, je potrebné skonštruovať plazmid obsahujúci najmä LTR, enkapsidačné sekvencie a danú nukleovú kyselinu, a potom použiť tento konštrukt na transfekciu enkapsidačnej línie, ako už bolo opísané, schopnej poskytnúť v trans retrovirusové funkcie chýbajúce plazmidu. Produkované retroviry sa potom purifikujú zvyčajnou technikou.

Použitie línii má určité nevýhody. Tak napríklad je náročné, nákladné a veľmi obmedzujúce konštruovať a overovať takéto línie v priemyselnom meradle. Pritom tieto línie by mali byť zlučiteľné s priemyselným využitím. Okrem toho, tieto línie sotva zabránia produkcii replikujúcich sa kontaminujúcich vírusov (RCA). Navyše tieto línie neumožňujú v súčasnosti komplementovať v miere dostatočnej na priemyselné využitie

vysoko defektné vírusy, ako sú napríklad minimálne adenovírusy opísané skôr. Adenovírusy majú genóm organizovaný do rôznych transkripčných jednotiek, ktoré majú veľmi zložitú časopriestorovú reguláciu. Preto doteraz nebola možná dostatočná transkomplementácia adenovírusov, z ktorých boli odstránené všetky vírusové kódujúce sekvencie tým, že by sa separátne exprimovali všetky transkripčné jednotky buď konštitutívnym, alebo podmieneným spôsobom pomocou bunkovej línie. Takže doteraz sa konštitutívne exprimovali pomocou bunkových línií len malé úseky genómu zodpovedajúce úsekom E1, E4, a pIX, a trom proteínom kódovaným E2 (pol, DBP, p-TP). Zvyšok genómu zodpovedá hlavnej neskorej transkripčnej jednotke (MLTU), ktorá produkuje všetky transkripty pre štruktúrne a neštruktúrne proteíny primárneho transkriptu s veľkosťou 28 kb a aktivuje sa po replikácii genómu. Na vytvorenie minimálneho adenovírusu je transkomplementácia týchto úsekov nevyhnutná.

Druhý prístup spočíva v spoločnej transfekcii (kotransfekcii) defektným vírusovým genómom a konštruktom (plazmidom alebo adenovírusom) poskytujúcim komplementačné funkcie. Všeobecne sa najmä defektné rekombinantné AAV pripravujú v bunkovej línii infikovanej ľudským pomocným vírusom (napríklad adenovírusom) kotransfekciou plazmidom obsahujúcim požadovanú nukleovú sekvenciu ohraničenú dvoma úsekmi invertovanej terminálnej repetície (ITR) z AAV a plazmidom nesúcim AAV komplementačné funkcie (gény rep a cap). Varianty sú opísané v prihláškach WO95/14771; WO95/13365; WO95/13395 alebo WO95/06743. Nevýhoda použitia pomocného adenovírusu spočíva hlavne vo zvýšenom riziku rekombinácie medzi adenovírusovým vektorom a pomocným adenovírusom a tiež v náročnosti oddeliť rekombinant od pomocného vírusu v priebehu produkcie a purifikácie vírusových kmeňov. Nevýhoda použitia pomocného plazmidu, napríklad plazmidu Rep/cap, spočíva v získanom stupni transfekcie, ktorý neumožňuje produkovať vysoké titry vírusu.

Podstata vynálezu

Predložený vynález poskytuje nový systém na produkciu vírusov, ktorý umožňuje prekonať uvedené nevýhody. Systém podľa vynálezu je založený na tom, že na poskytnutie komplementačných funkcií sa používa bakulovírus.

Produkčný systém podľa vynálezu umožňuje zaobísť sa, a to zvlášť výhodným spôsobom, bez použitia zavedených komplementačných línií, vyhnúť sa problémom s RCA a transkomplementovať vysoko defektné genómy. Okrem toho je systém podľa vynálezu použiteľný pre každú bunku schopnú infekcie požadovaným vírusom a bakulovírusom, a teda ponúka veľmi flexibilné použitie.

Prvý predmet vynálezu teda spočíva v spôsobe prípravy defektných rekombinantných vírusov, podľa ktorého sa do populácie kompetentných buniek zavedie genóm defektného rekombinantného vírusu a bakulovírus obsahujúci všetky alebo niektoré funkcie nutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu. Spôsob podľa vynálezu je teda založený na použití bakulovírusu na zaistenie komplementačných funkcií. Existujú rôzne prístupy. Predovšetkým sa môžu použiť kompetentné bunky, ktoré neexprimujú žiadnu transkomplementačnú funkciu defektného rekombinantného genómu. V tomto prípade sa môže použiť buď bakulovírus obsahujúci všetky funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu, alebo niekoľko bakulovírusov, z ktorých každý nesie jednu alebo viac funkcií nevyhnutných na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu. Môže sa tiež použiť populácia kompetentných buniek, ktoré sú už samé schopné transkomplementovať jednu alebo viac funkcií defektného rekombinantného genómu (enkapsidačné línie). V tomto prípade použitý(-é) bakulovírus(-y) zaistia len funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu, ktoré ešte nie sú transkomplementované kompetentnými bunkami.

Ako sa už uviedlo, mnohé výhody systému podľa vynálezu sú významné tak na priemyselnú využiteľnosť (žiadna potreba línií, žiadne kontaminujúce vírusy, RCA a podobne), ako aj na aplikácie (produkcia rekombinantných vírusov nesúcich akýkoľvek typ delécie, najmä vysoko defektných rekombinantných adenovírusov). Navyše, keďže sa bakulovírus nereplikuje v ľudských bunkách, získané vírusové prípravky nie sú kontaminované bakulovírusom. Okrem toho je bakulovírus fylogeneticky od adenovírusov veľmi vzdialený, teda medzi týmito vírusmi nie je žiadne riziko rekombinácie alebo transkomplementácie. Tento systém teda umožňuje produkovať výhodným spôsobom koncentrované kmene defektných vírusov, bez RCA. Systém je najvýhodnejší najmä na produkciu defektných rekombinantných adenovírusov.

Bakulovírusy sú opuzdrené, cirkulárne dvojvláknové DNA vírusy špecifické pre stavovce. Ich prototyp, AcNPV, má genóm s veľkosťou 133 kb. Využíva sa ako vektor na expresiu eukaryotických génov v hmyzích bunkách, začína dvoma silnými promótormi (polyhedrín (Ph) a P10), (King a Possee, The baculovirus expression system. London: Chapman a Hall, 1992). AcNPV je schopný infikovať niektoré cicavčie bunky, ale genóm sa ani transkribuje, ani translatuje. Nedávno Hofman a kol. (PNAS 92 (1992) 10099) ukázali, že hepatocyty sa môžu *in vitro* transdukovať purifikovaným rekombinantným bakulovírusom exprimujúcim gén LacZ. Bunková toxicita nezistila, ani pri násobku infekcie 1000, a účinnosť transfekcie opísaná v tomto

článku je približne 50 % pri MOI 100.

Pôvodca teraz ukázal, že rekombinantnými bakulovírusmi sa dajú infikovať rôzne bunkové typy. Pôvodca konkrétne ukázal, že rekombinantnými bakulovírusmi sa dajú infikovať bunky ľudského pôvodu, ako sú imortalizované embryonálne bunky. Pôvodca tiež ukázal, že sa dá získať veľmi vysoká účinnosť transdukcie (viac ako 80 %). Pôvodca ďalej ukázal, že sa do bakulovírusu dajú zaviesť funkcie na komplementáciu adenovírusu a exprimovať tieto funkcie v populácii buniek. Pôvodca teda poskytol dôkaz, že bakulovírus tvorí inertný vektor, ktorý sa môže výhodne použiť na prenos a expresiu vírusových komplementačných funkcií do cicavčích, najmä ľudských buniek. Ďalšími výhodami systému vynálezu sú najmä:

- (i) veľká klonovacia kapacita, ktorá umožňuje komplementovať celý adenovírusový genóm, a
- (ii) pokročilý rozvoj technológie bakulovírusov.

Bakulovírus nesúci funkcie na komplementáciu vírusu sa v nasledujúcom texte označuje tiež ako pomocný bakulovírus. Môže obsahovať rôzne funkcie na komplementáciu vírusu.

Tak pomocný bakulovírus môže obsahovať úsek E1 adenovírusu. Bakulo-E1 sa môže použiť na produkciu prvej generácie adenovírusov, t. j. adenovírusov defektných v úseku E1 (AdΔE1), bez ohľadu na stav ich E3 (t. j. defektné AdΔE1,ΔE3, či nie). Produkcie prvej generácie defektných rekombinantných adenovírusov (defektných v úseku E1 a prípadne E3), tvoria prvú zvlášť výhodnú aplikáciu spôsobu podľa vynálezu. Ako sa už uviedlo, v literatúre sú opísané rôzne línie, ktoré sú schopné transkomplementácie funkcie E1 (bunky 293, bunky 911, a podobne). Ale medzi úsekom nesúcim transkomplementačné funkcie, ktoré sú integrované do genómu línie, a DNA rekombinantného vírusu, ktorú je žiaduce produkovať, existujú rôzne oblasti homológie. Preto môžu nastať v priebehu produkcie rôzne rekombinácie, vytvárajúce replikatívne vírusové častice, najmä typu E1+ adenovírusov. Môže to byť jediná rekombinantná udalosť nasledovaná zlomom chromozómu, alebo dvojité rekombinácie. Tieto dva typy modifikácie vedú k reintegrácii úseku E1 obsiahnutého v bunkovom genóme do jeho počiatočného lokusu v adenovírusovom genóme. Navyše pri daných vysokých titroch rekombinantného vektora, ktoré produkuje línia 293 (väčšie ako 10^{12}), je pravdepodobnosť, že tieto rekombinantné javy nastanú, vysoká. Skutočne sa pozorovalo, že početné série defektných rekombinantných adenovírusových vektorov prvej generácie boli kontaminované replikatívnymi vírusovými časticami, ktoré tak môžu predstavovať hlavnú nevýhodu na farmaceutické využitie. Výskyt takýchto častíc v terapeutických prípravkoch by skutočne mohol vyvolať *in vivo* nekontrolované rozmnožovanie vírusu a jeho šírenie s rizikom zápalovej reakcie, rekombinácie a podobne. Kontaminované série sa potom nemôžu použiť v humánnej terapii.

Predložený vynález umožňuje prekonať tieto nevýhody. V jednom uskutočnení spôsobu podľa vynálezu sa genóm rekombinantného adenovírusu defektného v úseku E1, prípadne E3, zavedie do kompetentných buniek, tieto bunky sa infikujú, simultánne alebo inak, bakulovírusom obsahujúcim úsek E1, pričom úsek E1 adenovírusu prítomný v bakulovíruse a genóm defektného rekombinantného adenovírusu neobsahujú žiadnu oblasť homológie (prekryvu) schopnú vyvolať rekombináciu. Podľa tohto uskutočnenia sa teda dajú rýchlo produkovať, bez potreby zavedenej línie, kmene prvej generácie rekombinantných adenovírusov bez RCA. Okrem toho, ako je uvedené ďalej, kmene takto vzniknutých rekombinantných adenovírusov bez RCA, sa môžu použiť ako počiatočný materiál na novú produkciu spoločnou infekciou kompetentných buniek bakulovírusom.

Pomocný bakulovírus môže tiež obsahovať úsek E2 adenovírusu, úplný alebo čiastočný, najmä úsek E2 a/alebo E2b. Bakulo-E2b sa môže použiť na produkciu adenovírusov defektných v úseku E2 (Ad-ΔE2) a prípadne v úseku E3 (Ad-ΔE2 a ΔE3) v kompetentných bunkách. Navyše v kompetentných bunkách schopných komplementácie úseku E1 adenovírusu môže bakulo-E2 umožniť produkciu rekombinantných adenovírusov defektných v úsekoch E1 a E2 (Ad-ΔE1 a ΔE2) a prípadne E3 (Ad-ΔE1,ΔE2,ΔE3). Podobne v kompetentných bunkách schopných komplementácie úsekov E1 a E4 adenovírusu (napríklad v bunkách IGRP2) môže bakulo-E2 umožniť produkciu rekombinantných adenovírusov defektných v úsekoch E1, E2 a E4 (Ad-ΔE1,ΔE2,ΔE4) a prípadne E3 (Ad-ΔE1,ΔE2,ΔE3,ΔE4).

Pomocný bakulovírus môže tiež obsahovať úsek E4 (úplný alebo časť) adenovírusu. Bakulo-E4 sa môže použiť na produkciu adenovírusov defektných v úseku E4 (Ad-ΔE4) a prípadne v úseku E3 (Ad-ΔE4,ΔE3) v kompetentných bunkách. Navyše v kompetentných bunkách schopných komplementácie úseku E1 adenovírusu môže bakulo-E4 umožniť produkciu rekombinantných adenovírusov defektných v úsekoch E1 a E4 (Ad-ΔE1,ΔE4) a prípadne E3 (Ad-ΔE1,ΔE4,ΔE3).

Pomocný bakulovírus môže tiež obsahovať úseky E1 a E4 (úplné alebo časti) adenovírusu. Bakulo-E1 a E4 sa môže použiť na to, aby v kompetentných bunkách produkoval adenovírusy defektné v úsekoch E1 a E4 (Ad-ΔE1,ΔE4) a prípadne E3 (Ad-ΔE1,ΔE4,ΔE3), ako je uvedené na obrázku 1. Okrem toho sa na prípravu vírusov defektných v úsekoch E1 a E4 môžu tiež použiť dva pomocné bakulovírusy, jeden úplne alebo čiastočne exprimujúci funkciu E1 a druhý funkciu E4.

Rovnako môže pomocný bakulovírus obsahovať úseky E1, E2 a E4 (úplne alebo časti) a prípadne úseky nesúce neskoré gény (L1 až L5).

Pomocný bakulovírus môže tiež obsahovať úseky AAV Rep a/alebo Cap. Bakulo-Rep/Cap tak umožňuje

komplementovať v línii kompetentných buniek genóm AAV, ktorý postráda akúkoľvek kódujúcu vírusovú sekvenciu (obrázok 5).

Bakulovírus môže tiež obsahovať úseky gag, pol a/alebo env retrovírusu. Bakulo-gag/pol/env tak umožňuje komplementovať v línii kompetentných buniek retrovírusový genóm postrádajúci akúkoľvek kódujúcu vírusovú sekvenciu.

Môže sa použiť aj bakulovírus obsahujúci úseky gag/pol a druhý bakulovírus obsahujúci úsek env.

Všeobecne je výhodné, keď sa genóm defektného rekombinantného vírusu a komplementačné úseky prítomné v bakulovíruse neprekrývajú. To skutočne umožňuje vyhnúť sa rizikám rekombinácie, a tak vzniku RCA. To je zvlášť dôležité na vznik prvej generácie adenovírusov (Ad-ΔE1). V tomto prípade je úsek E1 zavedený do bakulovírusu definovaný tak, že nemá žiadnu spoločnú sekvenciu s rekombinantným genómom. Aby sa tak stalo, je možné napríklad odstrániť z rekombinantného genómu úsek väčší ako komplementačný úsek vložený do bakulovírusu, ako je ukázané v príkladoch. To je výhodné tiež na vznik adenovírusu Ad-ΔE1,ΔE4.

Teda v určitom uskutočnení vynálezu sa genóm defektného rekombinantného vírusu zavedie do kompetentných buniek, tieto bunky sa infikujú, súčasne či inak, bakulovírusom obsahujúcim všetky alebo niektoré funkcie nevyhnutné na komplementáciu defektného genómu, pričom komplementačné funkcie prítomné v bakulovíruse a genóme defektného rekombinantného vírusu neobsahujú žiadnu oblasť homológie schopnú vyvolať rekombináciu. Výhodne je vírusový genóm rekombinantný adenovírusový genóm defektný v úseku E1 a bakulovírus nesie úsek adenovírusu schopný transkomplementácie úseku E1. Podľa iného variantu je vírusový genóm rekombinantný adenovírusový genóm defektný v úsekoch E1 a E4 a bakulovírus nesie dva adenovírusové úseky schopné transkomplementácie uvedených úsekov alebo sa použijú dva bakulovírusy, jeden nesúci úsek adenovírusu schopný transkomplementácie úseku E1 a druhý úsek adenovírusu schopný transkomplementácie úseku E4, bez úseku homológie s defektným adenovírusovým genómom.

Podľa špecifického uskutočnenia vynálezu všetky kódujúce úseky adenovírusu nesie jeden alebo viaceré pomocné bakulovírusy. Podľa iného uskutočnenia sa použije len jeden pomocný bakulovírus obsahujúci všetky kódujúce úseky adenovírusu. Takýto pomocný bakulovírus sa môže teda použiť na transkomplementáciu minimálneho rekombinantného adenovírusu. Takýto bakulovírus môže obsahovať konkrétne celý adenovírusový genóm s výnimkou enkapsidačného úseku a prípadne ITR, ako je ukázané v príkladoch.

30 Príprava komplementačných funkcií

Komplementačné funkcie zavedené do pomocného bakulovírusu môžu pochádzať z vírusov rôznych sérotypov.

Čo sa týka adenovírusov, existujú rôzne sérotypy, ktorých štruktúra a vlastnosti sa líšia, ale ktoré prejavujú porovnateľné genetické usporiadanie. Konkrétne komplementačné funkcie použité na konštrukciu bakulovírusov podľa vynálezu pochádzajú z adenovírusu ľudského alebo zvieracieho pôvodu.

Čo sa týka adenovírusov ľudského pôvodu, môžu sa spomenúť najmä adenovírusy zaradené do skupiny C. Výhodne sa v rámci predloženého vynálezu medzi rôznymi sérotypmi ľudských adenovírusov uprednostňuje použitie adenovírusu typu 2 alebo 5 (Ad2 alebo Ad5). Môžu sa tiež použiť úseky pochádzajúce z adenovírusu typu 7 alebo 12, patriacich do skupín A a B. Medzi rôznymi adenovírusmi zvieracieho pôvodu sa v rámci vynálezu uprednostňuje použitie adenovírusov psieho pôvodu, najmä všetkých kmeňov adenovírusov CAV2 (kmeň manhattan alebo A26/61 (ATCC VR-800). Ďalšie adenovírusy zvieracieho pôvodu sú konkrétne uvedené v prihláške WO94/26914, na ktorú sa týmto odkazuje.

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu pochádza komplementačná funkcia z genómu ľudského adenovírusu skupiny C. Výhodne pochádza z genómu adenovírusu Ad2 alebo Ad5.

Úseky nesúce rôzne komplementačné funkcie sa môžu získať z adenovírusového genómu enzýmovým štiepením odborníkom známymi metódami. Tieto úseky sa môžu voliteľne modifikovať tak, aby sa zmenšila ich veľkosť, alebo aby sa nahradili určité regulačné prvky (promótor, zosilňovač a podobne) heterológnyimi prvkami. Všeobecne sa tieto úseky pripravujú nasledujúcim spôsobom: DNA adenovírusu sa purifikuje centrifugáciou v gradiente chloridu cézneho alebo sa získa *in vitro* z prokaryotického (WO96/25506) alebo eukaryotického (WO95/03400) plazmidu. DNA sa potom štiepi príslušnými reštrikčnými enzýmami a identifikujú a vyberú sa získané fragmenty nesúce požadované komplementačné funkcie. Výber použitých reštrikčných enzýmov závisí od požadovaných reštrikčných funkcií. Výber sa teda riadi reštrikčnými mapami a publikovanými sekvenciami adenovírusových genómov. Tak sa môže izolovať úsek E1 vo forme fragmentov nesúcich všetky čítacie rámce E1A a E1B v smere od promótoru E1A. Úsek E4 sa môže izolovať vo forme fragmentov nesúcich celé čítacie rámce alebo len ich časť, výhodne rámce ORF3 alebo ORF6, alebo ORF6-ORF6/7.

Podobné metódy sa použili na prípravu komplementačných úsekov AAV a rekombinantných retrovírusov. Úseky AAV rep a/alebo cap sa tak môžu získať enzýmovým štiepením z vírusovej DNA izolovanej z rôznych sérotypov AAV. To je výhodne AAV-2. Pri retrovírusoch sa môžu úseky gag, pol a/alebo env získať tiež obvyklými technikami molekulárnej biológie z rôznych retrovírusov, ako sú najmä MoMuLV („Mu-

rine Moloney Leukaemia Virus“, vírus myšej Moloneyovej leukémie, tiež nazývaný MoMLV), MSV („Murine Moloney Sarcoma Virus“, vírus myšieho Moloneyho sarkómu), HaSV („Harvey sarcoma Virus“, vírus Harveyovho sarkómu); SNV („Spleen Necrosis Virus“, vírus nekrózy sleziny), RSV („Rous Sarcoma Virus“, vírus Rousovho sarkómu), alebo Friendov vírus.

Konštrukcia pomocného bakulovírusu

Fragmenty nesúce komplementačné úseky sa potom subklonujú do plazmidového vektora umožňujúceho ich ďalšiu manipuláciu (jemnejšie štiepenie, PCR, pridanie regulačných sekvencií a podobne), napríklad v prokaryotickom alebo eukaryotickom organizme. Získaný konečný fragment kódujúci komplementačnú funkciu(c) sa potom vnesie do pomocného bakulovírusu s použitím zvyčajných techník molekulárnej biológie. Fragment sa špecificky klonuje medzi dve sekvencie homologné k úseku genómu bakulovírusu, a potom sa výsledný fragment alebo plazmid kotransfekuje s genómom bakulovírusu do hmyzích buniek (zvyčajne buniek Sf9 a Sf21 (*Spodoptera frugiperda*), ale tiež buniek Tn-368 a High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (Gibco) (*Trichopulsia*) alebo do akejkoľvek hmyzej bunky permissívnej pre bakulovírusy a schopnej použitia na ich produkciu). Homologickou rekombináciou medzi plazmidom alebo fragmentom a genómom bakulovírusu vzniká požadovaný rekombinantný bakulovírus, ktorý sa môže znovu získať a purifikovať bežnými metódami (pozri najmä King a Possee: *The Baculovirus Expression System*. London: Chapman a Hall, 1992). Na konštrukciu rekombinantných bakulovírusov sú komerčne dostupné rôzne súpravy obsahujúce kyvadlové vektory a môžu sa použiť podľa odporúčania výrobcov. Najmä je možné použiť kyvadlové vektory dodávané spoločnosťou Clontech, vektory pAc (Verne et al., *Bio/Technology*, 6 (1988) 47, Pharmingen, USA), vektory pBlue-Bac (Invitrogen) alebo vektory pBSV (Boehringer). Komplementačné funkcie sa teda môžu vložiť na rôzne miesta bakulovírusu, hlavne do lokusu polyhedrinového génu alebo génu p10. Okrem toho sa môžu použiť rôzne kmene bakulovírusov, ako je konkrétne AcNPV alebo *Bombyx mori* (Maeda et al., *Nature*, 315 (1988) 592). Ďalej sa môže použiť bakulovírus modifikovaný, aby sa zvýšil/zmenil jeho tropizmus. Tropizmus vírusových vektorov sa môže modifikovať modifikáciou ich povrchových proteínov tak, že sa

(i) obmedzí fúzia vírusových proteínov so špecifickým ligandom (ľahký reťazec imunoglobulínu, peptid uvoľňujúci gastrín), alebo

(ii) rozšíri tvorením pseudotypov s heterológny vírusovým glykoproteínom (G vírusu pľuzgierikovej stomatitídy, „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV)), (Liu et al., *J. Virol* 70(4) (1996) 2497; Michael et al., *Gene Ther.* 2 (1995) 660). Nedávno sa dokázalo, že povrchový glykoproteín bakulovírusu (gp64) fúzovaný s gp120 vírusu HIV sa viazal na receptor CD4 (Boublik et al., *Bio/Technology*, 13 (1995) 1079). Táto modifikácia gp64 neovplyvňuje životaschopnosť bakulovírusu v hmyzích bunkách. Podobný konštrukt s G z VSV by umožnil zosilniť tropizmus bakulovírusu k cicavčím bunkám, a teda zvýšiť transdukčnú účinnosť buniek Huh7, ako aj iných bunkových línií.

Pri pomocných vírusoch sú komplementačné funkcie výhodne umiestnené tak, že sú pod kontrolou heterológneho promotora (t. j. iného pôvodu ako bakulovírusového), ktorý je funkčný v kompetentných bunkách. Skutočne sa zdá, že bakulovírusové promotory neumožňujú získať postačujúce hladiny expzie komplementačných funkcií v bunkách iného ako hmyzieho pôvodu, a nie sú preto najvhodnejšie na aplikácie vynálezu. Promotor môže byť predovšetkým doterajší promotor (homologický promotor) komplementačných funkcií vírusu (E1A, E4, E2, MLP promotor adenovírusu, P5 alebo P19 promotory z AAV, LTR promotor z RSV, a podobne). Môže to byť tiež akýkoľvek promotor odlišného pôvodu, ktorý je funkčný v použitých kompetentných bunkách. Na tento účel možno spomenúť napríklad promotory génov exprimovaných v tejto bunke alebo známe bežné promotory, ako je napríklad promotor génu PGK, skorý promotor CMV, promotor génu TK herpesvírusu alebo alternatívne LTR promotor z RSV. Môže to byť tiež regulovaný promotor, ako napríklad promotor vírusu MMTV, promotor odpovedajúci na hormóny, napríklad typu GRE5, alebo promotor regulovaný tetracyklínom. Výhodne to je indukovateľný alebo silný, bežný homologický promotor.

Ďalší predmet predloženého vynálezu sa týka rekombinantného bakulovírusu, ktorý obsahuje vo svojom genóme vloženú nukleovú kyselinu kódujúcu komplementačnú funkciu vírusu umiestnenú pod kontrolu heterológneho promotora. Konkrétnejšie, komplementačná funkcia je proteín nevyhnutný na produkciu uvedeného vírusu, ktorého kódujúci úsek je v defekte vírusovom genóme inaktívny (mutovaný, deletovaný a podobne). Pri adenovírusoch sa komplementačná funkcia vyberá hlavne zo všetkých alebo niektorých funkcií kódovaných úsekmi E1, E2, E4, L1 až L5, pIX a IVa2 adenovírusu, samotných alebo v kombinácii. Pri AAV sú to funkcie kódované úsekmi Rep a/alebo Cap a pri retrovírusoch gag, pol a/alebo env. Nukleová kyselina výhodne zodpovedá úseku vírusového genómu obsahujúcemu úsek kódujúci vybratú komplementačnú funkciu. Je to zvlášť fragment genómu adenovírusu sérotypu Ad2 alebo Ad5, MoMLV alebo AAV-2. Zvlášť výhodne obsahuje nukleová kyselina tiež úsek promotora, ktorý je prirodzene zodpovedný za expresiu vybratej komplementačnej funkcie.

Ako špecifický príklad predloženého vynálezu sa dá uviesť bakulovírus obsahujúci celý alebo časť úseku E1 adenovírusu. Je to hlavne bakulovírus obsahujúci úsek E1a, E1b alebo E1a a E1b. Úsek E1 adenovírusu je lokalizovaný na úrovni nukleotidov 104 (promotor E1a) až 4070 (polyA E1b) z Ad5. Konkrétne je TATA

box promotora E1a lokalizovaný na úrovni nukleotidu 470, ATG kodón E1a na úrovni nukleotidu 560 a stop kodón na úrovni nukleotidu 3511. Ako presný príklad sa môže spomenúť bakulovírus obsahujúci fragment 391 až 3511. Tento pomocný bakulovírus je zvlášť vhodný na produkciu rekombinantných adenovírusov defektných v úseku E1, nesúcich deléciu väčšiu, ako je tento fragment 391 až 3511. Je vhodný hlavne na produkciu prvej generácie adenovírusov bez RCA nesúcich deléciu v úseku E1 pokrývajúcu nukleotidy 383 až 3512 vrátane.

Ďalším špecifickým príkladom vynálezu je bakulovírus, ktorý obsahuje napríklad všetky alebo niektoré úseky E1 a E4 adenovírusu. Úsek E4 adenovírusu sa skladá zo 7 otvorených čítacích rámcov označených ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF3/4, ORF6 a ORF6/7. Zdá sa, že z proteínov kódovaných týmito rôznymi ORF, tie proteíny, ktoré sú tvorené ORF3 a ORF6, umožňujú „replikáciu“ vírusu, a teda transkomplementáciu adenovírusov defektných v úseku alebo dokonca v celom E4. Teda výsledný pomocný bakulovírus podľa vynálezu výhodne obsahuje celý úsek E4 alebo len jeho časť obsahujúcu aspoň rámec ORF3 alebo ORF6. Rôzne časti úseku E4 sa môžu získať enzýmovým štiepením alebo modifikovať odborníkom známymi metódami. Konkrétne čítací rámec ORF6 sa môže izolovať z úseku E4 vo forme fragmentu BglII-PvuI, zodpovedajúcemu nukleotidom 34115 až 33126 z genómu Ad5. Bakulovírus môže tiež obsahovať celé čítacie rámce ORF1-ORF7 (napríklad vo forme fragmentu 32800 až 35826 alebo 32811 až 35614 alebo 32811 až 35640). Je jasné, že ďalšie fragmenty sa môžu určiť na základe publikovaných sekvencií adenovírusových genómov. Použitie bakulovírusov nesúcich redukovanú jednotku úseku E4 je výhodné, lebo umožňuje transkomplementáciu defektného adenovírusového genómu nesúceho väčšiu deléciu úseku E4, teda bez oblasti homológie, a zabráni akejkoľvek možnosti rekombinácie.

Podľa prvého uskutočnenia vynálezu sa nukleová kyselina kódujúca komplementačnú funkciu(e) zavedie do pomocného bakulovírusu vo forme expresnej kazety. Toto uskutočnenie je najjednoduchšie na použitie. Je výhodné hlavne na produkciu rekombinantných adenovírusov defektných v skorých génoch a na produkciu defektných rekombinantných AAV a retrovirusov.

Podľa ďalšieho uskutočnenia sa nukleová kyselina kódujúca komplementačnú funkciu(e) zavedie do pomocného bakulovírusu vo forme vyštiepiateľnej kazety vytvárajúcej replikatívnu molekulu v kompetentnej bunke. Replikácia kazety v bunke umožňuje výhodne zvýšiť počet kópií komplementujúcich génov, a tak zvýšiť produkčné hladiny systému. Toto uskutočnenie je vhodné hlavne na produkciu veľmi vysoko defektných rekombinantných adenovírusov, defektných konkrétne v štruktúrnych génoch. Toto uskutočnenie je zvlášť vhodné na produkciu „minimálnych“ adenovírusov. Kvantita štruktúrneho proteínu je skutočne limitujúcim faktorom produkcie vysokých titulov vysoko defektných adenovírusov (typu minimálneho adenovírusu). Toto uskutočnenie po prvýkrát umožňuje podstatne zvýšiť intracelulárne hladiny transkomplementačných proteínov, najmä štruktúrnych proteínov adenovírusu (kódovaných úsekmi L1 až L5), až na hladiny kompatibilné s transkomplementáciou minimálnych adenovírusov.

Pôvodca teda ukázal, že je možné konštruovať rekombinantné bakulovírusy obsahujúce heterológny úsek, ktorý sa dá v bunke vyštiepiť, výhodne indukateľným a regulovaným spôsobom, aby vznikla cirkulárna a replikatívna molekula (epizomálneho typu).

Excízia (vyštiepenie) sa výhodne uskutočňuje miestne špecifickým rekombinačným mechanizmom a replikácia v bunke je vyvolaná replikačným počiatkom nezávisle od stavu bunkového delenia.

Výhodnejšia sa miestne špecifická rekombinácia použitá v spôsobe podľa vynálezu získa pomocou dvoch špecifických sekvencií, ktoré sú schopné vzájomnej rekombinácie v prítomnosti špecifického proteínu, všeobecne nazývaného rekombináza. Tieto špecifické sekvencie usporiadané v príslušnej orientácii ohraničujú v bakulovíruse sekvencie kódujúce komplementačné funkcie. Predmetom vynálezu je teda tiež rekombinantný bakulovírus obsahujúci vložený do svojho genómu aspoň jeden úsek DNA ohraničený dvoma sekvenciami umožňujúcimi miestne špecifickú rekombináciu a umiestnený v priamej orientácii. Uvedený úsek DNA obsahuje aspoň jeden replikačný počiatok funkčný v kompetentných bunkách a nukleovú kyselinu kódujúcu komplementačnú funkciu vírusu.

Sekvencie umožňujúce rekombináciu, ktoré sa použijú podľa vynálezu, všeobecne obsahujú od 5 do 100 bázových párov, výhodnejšie menej ako 50 bázových párov. Môžu patriť do rôznych štruktúrnych skupín, hlavne do rodiny rekombinázy P1 bakteriofága alebo resolvázy transpozónu.

Z rekombináz patriacich do rodiny integrázy bakteriofága 1 sa môžu uviesť hlavne integráza fágov lambda (Landy et al., Science, 167 (1997) 1147), P22 a F80 (Leon et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 4468), HP1 z *Haemophilus influenzae* (Hauser et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 6859), integráza Cre fága P1, integráza plazmidu pSAM2 (EP 350 341) alebo rekombináza FLP plazmidu 2 μ m z kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*.

Z rekombináz patriacich do rodiny transpozónu Tn3 sa môžu uviesť hlavne resolváza transpozónu Tn3 alebo transpozónov gd, Tn21 a Tn522 (Stark et al., 1992); invertáza Gin bakteriofága mu alebo resolváza plazmidov, ako je fragment par z RP4 (Abert et al., Mol. Microbiol., 12 (1994) 131).

Podľa výhodného uskutočnenia pochádzajú sekvencie umožňujúce miestne špecifickú rekombináciu v rekombinantných bakulovíruchoch podľa predloženého vynálezu z bakteriofága. Výhodnejšie sú to prípá-

cie sekvencie (sekvencie *attP* a *attB*) z bakteriofága alebo odvodenej sekvencie. Tieto sekvencie sú schopné špecifickej rekombinácie so sebou navzájom v prítomnosti rekombinázy nazývanej integráza. Ako špecifické príklady sa môžu uviesť hlavne sekvencie na pripojenie fágov lambda, P22, F80, P1, HP1 z *Haemophilus influenzae* alebo z plazmidu pSAM2 alebo 2 μ m.

Ešte výhodnejšie sú sekvencie umožňujúce miestne-špecifickú rekombináciu, ktoré predstavuje rekombinálny systém fága P1. Fág P1 má rekombinázu nazývanú Cre, ktorá špecificky rozpoznáva nukleotidovú sekvenciu 34 báзовých párov nazývanú miesto loxP (Sternberg et al., J. Mol. Biol. 150 (1981) 467). Táto sekvencia je zložená z dvoch palindromických sekvencií s veľkosťou 13 bp oddelených konzervatívnou sekvenciou s veľkosťou 8 bp. Miestne špecifická rekombinácia sa výhodne získa s použitím sekvencií LoxP alebo odvodených sekvencií a rekombinázy Cre.

Termin odvodená sekvencia zahŕňa sekvencie získané modifikáciou (modifikáciami) uvedených rekombinantných sekvencií, pričom sa zachováva kapacita špecifickej rekombinácie v prítomnosti príslušnej rekombinázy. Môže teda zahŕňať redukované fragmenty týchto sekvencií alebo naopak fragmenty rozšírené pridaním iných sekvencií (reštrikčné miesta a podobne). Môže tiež zahŕňať varianty získané mutáciou (mutáciami), hlavne bodovou mutáciou (bodovými mutáciami).

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu sú preto sekvencie umožňujúce miestne-špecifickú rekombináciu sekvencie LoxP bakteriofága P1 a rekombinácia sa získa v prítomnosti proteínu Cre. Z tohto hľadiska sa môže rekombinácia dosiahnuť tak, že sa kompetentné bunky privedú do priameho kontaktu s rekombinázu Cre alebo expresiou génu kódujúceho rekombinázu Cre v kompetentných bunkách. Výhodne sa rekombináza Cre produkuje v bunke indukciou exprese zodpovedajúceho génu. Gén kódujúci rekombinázu sa výhodne umiestni pod kontrolu indukovateľného promotora alebo sa konštruuje v regulovateľnej forme. Z tohto hľadiska sa dá výhodne použiť fúzia medzi Cre a väzbovou doménou steroidného hormónu (estradiol, progesterón a podobne) umožňujúcou reguláciu aktivity Cre, a teda vyvolanie rekombinácie (Metzger et al., PNAS 92 (1995) 6991). Všeobecnejšie sa expresia rekombinázy môže kontrolovať každým silným promotorom, regulovaným alebo iným. Expresná kazeta sa môže transfekovať do kompetentných buniek alebo integrovať do genómu kompetentných buniek, ako je ukázané v príkladoch.

Tento systém teda umožňuje vytvárať replikatívne molekuly, ktoré produkujú v kompetentných bunkách vysokú úroveň vírusovej, hlavne adenovírusovej, komplementačnej funkcie. Tento typ konštruktu je zvlášť vhodný na komplementáciu vysoko defektných genómov, hlavne adenovírusových genómov defektných v neskorých génoch. Špecifický konštrukt podľa vynálezu predstavuje bakulovírus obsahujúci vložený do svojho genómu aspoň jeden úsek DNA ohraničený dvoma sekvenciami LoxP umiestnenými v priamej orientácii, pričom uvedený úsek DNA obsahuje aspoň jeden replikačný počiatočok funkčný v kompetentných bunkách a jednu nukleovú kyselinu kódujúcu komplementačnú funkciu adenovírusu. Komplementačné funkcie výhodne obsahujú všetky alebo niektoré zo skorých génov prítomných v úsekoch E1, E2 a E4. Ešte výhodnejšie zahŕňajú komplementačné funkcie všetky alebo niektoré zo skorých génov a z neskorých skorých génov. Výhodne umožňujú komplementačné funkcie komplementáciu rekombinantného adenovírusu, ktorému chýba akákoľvek kódujúca vírusová sekvencia. Komplementačné funkcie konkrétne zahŕňajú celý adenovírusový genóm s výnimkou ITR a zbalovacieho úseku. Podľa špecifického variantu komplementačné funkcie zahŕňajú kompletný adenovírusový genóm, ktorému chýba zbalovací úsek (Ad.Psi-). Tento genóm obsahuje hlavne úseky ITR, ktoré slúžia na replikáciu genómu v kompetentných bunkách po excízii.

Aby sa vyvolala replikácia epizomálnej molekuly, obsahuje táto molekula replikačný počiatočok funkčný v použitých kompetentných bunkách. Tento replikačný počiatočok výhodne zahŕňa aktuálne sekvencie ITR adenovírusu, ktoré umožňujú podstatnú amplifikáciu molekuly. Môže to byť tiež iný replikačný počiatočok umožňujúci výhodne viac ako 20-násobnú amplifikáciu vírusovej DNA v kompetentnej bunke. Ako príklad sa môže uviesť počiatočok OriP/EBNA1 vírusu EBV alebo úsek E2 papilomavírusu. Pritom sa rozumie, že sekvencia ITR adenovírusu predstavuje výhodné uskutočnenie.

Na uskutočnenie spôsobu podľa vynálezu sa pomocný bakulovírus (bakulovírusy) všeobecne používa v mnohonásobku infekcie („Multiplicity of Infection“, MOI), čo umožňuje, že sa infikuje veľká populácia buniek bez významného zhoršenia životaschopnosti buniek. Všeobecne je hodnota MOI najlepšie medzi 10 a 1000. MOI zodpovedá počtu vírusových častíc na bunku. Odborník môže MOI ľahko upraviť v závislosti od použitých kompetentných buniek, v podstate na základe dvoch kritérií: infekčná účinnosť a možná toxicita. Výhodne sa používa MOI pomocného bakulovírusu medzi 20 a 500.

Vnesenie vírusového genómu

Ako sa už uviedlo, spôsob podľa vynálezu zahŕňa vnesenie pomocného bakulovírusu a rekombinantného vírusového genómu do kompetentných buniek. Z tohto hľadiska sa môže genóm defektného rekombinantného adenovírusu vnieť do kompetentnej bunky rôznymi spôsobmi.

Predovšetkým môže ísť o purifikovaný defektný rekombinantný adenovírus, výhodne bez RCA. V tomto prípade sa kompetentné bunky infikujú defektným rekombinantným adenovírusom a pomocným bakulovírusom. Infekcia rekombinantným adenovírusom umožňuje zaviesť do kompetentnej bunky zodpovedajúci ge-

nóm, ktorý sa potom amplifikuje a enkapsiduje, aby produkoval kmene vo vysokom titri, a to bez RCA. Toto uskutočnenie je výhodné najmä na tvorbu prvej generácie vírusov (Ad-EA1; Ad-ΔE1, ΔE3). V skutočnosti je ťažké produkovať tieto vírusy vo vysokých titroch bez kontaminácie RCA. Spôsobom podľa vynálezu je teraz možné začať s prvou generáciou defektného rekombinantného adenovírusu a spoločnou infekciou kompetentnej bunky bakulovírusom obsahujúcim úsek E1 získať koncentrované kmene vysokej kvality. Toto uskutočnenie je tiež výhodné na produkciu vírusov defektných v dvoch alebo troch základných úsekoch svojho genómu (hlavne E1, E2, E4). Toto uskutočnenie je všeobecne výhodné, pretože účinnosť infekcie adenovírusom je veľmi vysoká (väčšia ako účinnosť transfekcie DNA) a preto umožňuje vytvoriť koncentrované kmene. V tomto uskutočnení sa rekombinantný adenovírus a rekombinantné bakulovírusy použijú v násobku infekcie (MOI) umožňujúcom infikovať veľkú populáciu buniek bez toho, aby sa významne zhoršila ich životaschopnosť. MOI použitý pre bakulovírus je rovnaký, ako už bolo uvedené (medzi 10 a 1000). Čo sa týka adenovírusov, je výhodné medzi 1 a 1000, výhodnejšie medzi 1 a 500, ešte výhodnejšie medzi 1 a 100. MOI použitý pre adenovírus sa tiež upraví podľa vybraného bunkového typu. Rozsah MOI môže odborník ľahko určiť napríklad s použitím adenovírusu a bakulovírusu obsahujúceho oddelený gén markéru, aby sa stanovila účinnosť infekcie a prípadne akákoľvek kompetícia. Výhodnejšie je MOI adenovírusu menší ako 50, napríklad medzi 1 a 20.

V ďalšom zvlášť výhodnom uskutočnení vynálezu sa genóm defektného rekombinantného adenovírusu vnesie vo forme DNA. V tomto prípade sa genóm zavedie transfekciou, voliteľne v prítomnosti činidla uľahčujúceho transfekciu (lipidy, fosforečnan vápenatý a podobne). Rekombinantný genóm pripravený *in vitro* sa môže zaviesť rôznymi technikami, hlavne napríklad v *E. coli* (WO96/25506) alebo v kvasinke (WO95/03400). Toto uskutočnenie je zvlášť užitočné na vytvorenie prvého radu defektného rekombinantného vírusu bez RCA, ktorý sa môže ďalej použiť na produkciu kmeňov s vysokým titrom podľa predchádzajúceho uskutočnenia.

Genóm defektného rekombinantného adenovírusu sa môže zaviesť tiež s použitím ďalšieho rekombinantného bakulovírusu. Podľa tohto uskutočnenia sa genóm defektného rekombinantného bakulovírusu pripraví *in vitro*, napríklad ako bolo uvedené, a potom sa zavedie do bakulovírusu vo forme kazety schopnej excízie v kompetentnej bunke. Podľa tohto uskutočnenia sa kompetentné bunky privedú do prítomnosti bakulovírusu nesúceho gén defektného rekombinantného adenovírusu a jedného alebo viacerých pomocných bakulovírusov (nesúcich komplementačné funkcie). Toto uskutočnenie je zvlášť výhodné na produkciu vysoko defektných rekombinantných adenovírusov. Na základe tohto systému je skutočne možné vnieť do populácie kompetentných buniek veľké množstvo oboch vysoko defektných rekombinantných genómov a zodpovedajúce komplementačné funkcie.

Vzhľadom na to, spôsob podľa vynálezu teda zahŕňa koinfekciu kompetentných buniek bakulovírusom nesúcim genóm defektného rekombinantného adenovírusu a jedným alebo niekoľkými pomocnými bakulovírusmi nesúcimi komplementačné funkcie. Hodnoty MOI použité v tomto uskutočnení sú tiež medzi 10 a 1000 pre každý použitý bakulovírus.

V doterajšom stave techniky sa pripravili dva typy konštruktov na produkciu minimálnych adenovírusov: (1) transgén (β-galaktosidáza) klonovaný medzi ITR, ohraničený jedným reštrikčným miestom alebo (2) pravá a ľavá ITR klonovaná v priamej orientácii 5' od Otransgénu (Fisher et al., Virology 217 (1996) 11; Kumar-Singh et al., Hum. Mol. Genet. 5 (1996) 913).

Minimálne adenovírusy sa produkovali v bunkách 293 transfekciou linearizovanej (1) alebo cirkulárnej (2) DNA, vírusové proteíny nevyhnutné na replikáciu a na enkapsidáciu minigenómu poskytol v *trans* pomocný vírus (AdΔE1). Minimálne adenovírusy sa správajú ako interferujúce defektné (ID) častice a amplifikujú sa progresívne v priebehu postupných pasáží. Hlavný problém tejto metodológie je separácia dvoch typov vytváraných častíc zodpovedných za kontamináciu kmeňov pomocným vírusom a veľmi nízke titre takto získaných minimálnych adenovírusov (menej ako 10⁹ pfu/ml).

Predložená prihláška vynálezu umožňuje po prvýkrát vytvoriť minimálne adenovírusy s použitím bakulovírusu, ktorý dodá adenovírusový minigenóm, a bakulovírusu, ktorý poskytne všetky transkomplementačné funkcie (komplementujúci genóm).

Rekombinantný adenovírusový genóm sa výhodne vloží do bakulovírusu medzi dve sekvencie umožňujúce miestne špecifickú rekombináciu v bunkách kompetentných pre pomocný bakulovírus, ako už bolo opísané.

Predložená prihláška opisuje hlavne systém na produkciu minimálneho adenovírusu s použitím bakulovírusu na dodanie adenovírusového minigenómu pomocou systému loxP/Cre a bakulovírusu na poskytnutie všetkých transkomplementačných funkcií (komplementujúci genóm), tiež pomocou systému Cre/loxP (pozri obrázky 2 až 4).

Podľa ďalšieho uskutočnenia sa na dodanie komplementačných funkcií použije miestne-špecifický rekombinačný systém odlišný od systému použitého na dodanie genómu rekombinantných adenovírusov. Konkrétne sa na dodanie defektného adenovírusového genómu môže použiť systém LoxP/Cre a na dodanie komplementačnej funkcie(i) systém AttP/AttB.

Spôsob podľa vynálezu tak umožňuje konštruovať adenovírusový vektor zbavený všetkých kódujúcich vírusových sekvencií a obsahujúci len ITR a enkapsidačný signál (minimálne adenovírusy). Tento vektor môže teoreticky pojať až 37 kb exogénnej sekvencie, zatiaľ čo klonovacia kapacita súčasných vektorov nepresahuje 8,5 kb. To teda umožňuje klonovať gény s veľkosťou ako je gén dystrofinu (14 kb) so všetkými ich regulačnými prvkami (promótor, zosilňovač, intróny a podobne) tak, aby sa získala optimálna expresia v cieľovom tkanive. Navyše, neprítomnosť akejkoľvek imunogénnej vírusovej sekvencie by mala zvýšiť trvanie expresie transgénu v pokojovom tkanive.

Genóm AAV alebo defektného retrovírusu sa tiež môže zaviesť vo forme vírusu, genómu alebo plazmidu niektorým z už opísaných spôsobov.

Kompetentné bunky

Spôsob podľa vynálezu sa môže uskutočňovať s rôznym typom buniek. Na účely vynálezu sa pod „kompetentnou bunkou“ chápe bunka permissívna k infekcii bakulovírusom a vírusom, ktorý sa má tvoriť, a umožňujúca produktívny vírusový cyklus tohto vytváraného vírusu. Kapacita infekcie buniek týmito vírusmi sa môže určiť použitím rekombinantných vírusov exprimujúcich markérový gén, ako je gén LacZ *E. coli*. Je to výhodne cicavčia bunka, ešte výhodnejšie bunka ľudského pôvodu. Použité kompetentné bunky môžu byť pokojové bunky alebo aktívne sa deliace bunky, zavedené stabilizované línie alebo primárne kultúry. Sú to výhodne cicavčie bunky zlučiteľné s priemyselným využitím, t. j. bez známeho patogénneho charakteru, schopné kultivácie, a ak je nutné, schopné uchovávaní v patričných podmienkach. Výhodne sa použijú bunky pečene, svalové, fibroblastové, embryonálne, nervové, epitelové (pľúcne) alebo očné (retinálne) bunky. Ako neobmedzujúci príklad možno uviesť bunky 293 alebo akúkoľvek odvodenú bunku obsahujúcu prídavnú komplementačnú funkciu (293E4, 293E2a, a podobne), bunky A549, bunky HuH7, bunky Hep3B, bunky HepG2, bunky ľudského retinoblastómu (HER, 911), bunky HeLa, bunky 3T3 alebo bunky KB.

Na uskutočnenie spôsobu podľa vynálezu sa môže genóm rekombinantného vírusu a bakulovírusu vniešť do populácie kompetentných buniek súčasne alebo časovo oddelene. Výhodne sa bunky privedú do kontaktu tak s rekombinantným genómom, ako i s pomocným bakulovírusom. V prípade systému tvoriaceho replikačívne molekuly *in vivo* sa vnesie tiež rekombinácia alebo sa exprimuje vopred, súčasne alebo postupne.

Produkcia vírusov všeobecne vedie k lýze buniek. Tvorené vírusy sa môžu po bunkovej lýze získavať známymi purifikačnými metódami. Potom sa môžu rôznymi spôsobmi zbraňovať v závislosti od požadovaného použitia. Navyše, aby sa zabránilo riziku kontaminácie vírusového kmeňa možnou prímiesou bakulovírusov, ktoré neprenikli do kompetentných buniek (pomocný bakulovírus alebo bakulovírus poskytujúci rekombinantný vírusový genóm), môžu sa aplikovať nasledujúce techniky:

- adenovírusy sa môžu purifikovať chromatografiou podľa metódy opísanej v prihláške FR96/08164. Táto technika umožňuje separovať adenovírus od akéhokoľvek možného reziduálneho bakulovírusu;
- na kmene purifikovaného adenovírusu sa môžu nechať pôsobiť organické rozpúšťadlá (napríklad éter, chlóroform). V skutočnosti je bakulovírus opuzdrený vírus (má glykoproteínový obal), a preto je veľmi citlivý na akékoľvek organické rozpúšťadlá (ktoré extrahuje lipidy z jeho obalu); na rozdiel od toho adenovírus nie je opuzdrený a rovnaké rozpúšťadlá na neho neúčinkujú;
- akýkoľvek reziduálny bakulovírus a rekombinantný vírus sa môžu separovať podľa hustoty purifikáciou na gradiente CsCl.

Tieto tri metódy sa môžu použiť nezávisle alebo spoločne. Navyše sa môže tiež použiť akákoľvek ďalšia odborníkovi známa metóda.

Použitie vírusov

Takto pripravené vírusy sa môžu použiť na klonovanie, prenos a expresiu génov *in vitro*, *ex vivo* alebo *in vivo*. Také požadované gény sú napríklad gény kódujúce enzýmy, krvné deriváty, hormóny, lymfokíny: interleukíny, interferóny, TNF a podobne (FR 9203120), rastové faktory, neurotransmitery alebo ich prekurzory v systéme enzýmov, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, a podobne, apolipoproteíny: ApoA1, ApoAIV, ApoE, a podobne (WO94/25073), dystrofin alebo minidystrofin (WO 93/06223), nádorové supresorové gény: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, a podobne (WO94/24297), gény kódujúce faktory zapojené do koagulácie: faktory VII, VIII, IX a podobne, samovražedné gény: tymidínkináza, cytozindeamináza a podobne, alebo celý či časť prirodzeného syntetického imunoglobulínu (Fab, ScFv, a podobne, WO94/29446), a podobne. Požadovaný gén môže byť tiež gén alebo „antisense“ (s opačnou orientáciou) sekvencia, ktorých expresia v cieľovej bunke umožňuje riadiť expresiu génov alebo transkripciu bunkových mRNA. Takéto sekvencie sa môžu v cieľovej bunke transkribovať napríklad do RNA komplementárnych k bunkovým mRNA, a tak blokovat' ich transláciu na proteín podľa techniky opísanej v patente EP 140 308. Požadovaný gén môže byť tiež gén kódujúci antigénny peptid, schopný vyvolať imunitnú odpoveď, na produkciu vakcín. Môžu to byť hlavne antigénne peptidy špecifické pre vírus Epstein-Barrovej, vírus HIV, vírus hepatitídy B (EP 185 573), vírus pseudorabies alebo peptidy špecifické pre nádory (EP 259 212). Gén môže byť každá DNA (gDNA, cDNA a podobne) kódujúca požadovaný produkt, potenciálne zahŕňajúca prí-

slušné expresné signály (promótor, terminátor a podobne).

Takéto vírusy sa môžu použiť *in vitro* na tvorbu týchto rekombinantných proteínov. Môžu sa tiež použiť *in vitro* na štúdium mechanizmov pôsobenia týchto proteínov alebo na štúdium regulácie expresie génov alebo aktivity promótorov. Môžu sa použiť aj *in vivo* na vytvorenie zvieracích modelov alebo transgénnych zvierat. Ďalej sa môžu použiť aj na prenos a expresiu génov *in vivo*, u zvierat alebo ľudí, v postupoch génovej alebo bunkovej terapie.

Predložený vynález bude podrobnejšie opísaný a vysvetlený pomocou nasledujúcich príkladov, ktoré treba považovať za ilustračné a neobmedzujúce.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: schematické znázornenie produkcie tretej generácie defektného rekombinantného adenovírusu (defektného vo funkciách E1 a E4) s použitím bakulo-E1, E4.

Obrázky 2 až 4: schematické znázornenie produkcie minimálneho adenovírusu s použitím prvého bakulovírusu na zavedenie neúplného adenovírusového genómu a druhého bakulovírusu na zavedenie komplementárnych funkcií.

Obrázok 5: schematické znázornenie produkcie rekombinantného AAV defektného vo funkcii Rep a Cap s použitím bakulo-Rep/Cap.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Použité bunky

Bunky použité v rámci vynálezu sa môžu získať z akejkoľvek bunkovej línie alebo populácie schopnej infekcie adenovírusom alebo AAV, alebo retrovírusom, alebo bakulovírusom, kompatibilnej s použitím na liečebné účely. Výhodne je to cicavčia, hlavne ľudská bunka. Konkrétne sa môžu spomenúť:

- Bunky línie 293:

Línia 293 je bunková línia ľudských embryonálnych obličiek obsahujúca ľavý koniec (približne 11 - 12 %) genómu adenovírusu sérotypu 5 (Ad5), obsahujúci ľavú ITR, enkapsidačnú oblasť, oblasť E1 vrátane E1a, E2b, oblasť kódujúcu proteín pIX a časť oblasti kódujúcej proteín pIVa2 (Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59, 1977). Táto línia je schopná transkomplementácie rekombinantných adenovírusov defektných v oblasti E1, inými slovami takých, ktorým chýba celá alebo časť oblasti E1, a produkuje kmene vírusov s vysokými titrami.

- Bunky línie A549

Bunky komplementujúce oblasť E1 adenovírusu sa skonštruovali z buniek A549 (Imbler et al., Gene Ther., 75, 1966). Tieto bunky obsahujú reštrikčný fragment oblasti E1, ktorému chýba ľavá ITR, umiestnený pod kontrolu indukovateľného promótoru.

- Bunky línie HER

Bunky ľudskej embryonálnej retiny (HER) sa môžu infikovať adenovírusom (Byrd et al., Oncogene, 2, 477, 1988). Adenovírusové enkapsidačné bunky pripravené z týchto buniek sú opísané napríklad v patentovej prihláške WO94/28152 alebo v článku Fallaux a kol., (Hum. Gene Ther., 215, 1996). Konkrétne sa môže uviesť línia 911 obsahujúca oblasť E1 genómu adenovírusu Ad5, od nukleotidu 79 k nukleotidu 5789, táto oblasť je integrovaná do genómu buniek HER. Táto bunková línia umožňuje produkciu vírusov defektných v oblasti E1.

- Bunky IGRP2

Bunky IGRP2 sú bunky získané z buniek 293 integráciou funkčnej jednotky oblasti E4 pod kontrolu indukovateľného promótoru. Tieto bunky umožňujú produkciu vírusov defektných v oblastiach E1 a E4 (Yeh et al., J. Virol., 70, 1966).

- Bunky VK

Bunky VK (VK2-20 a VK10-9) sú bunky získané z buniek 293 integráciou celej oblasti E4 pod kontrolu indukovateľného promótoru a oblasti kódujúcej proteín pIX. Tieto bunky umožňujú produkciu vírusov defektných v oblastiach E1 a E4 (Krougliak et al., Hum. Gene Ther., 6, 1575, 1995).

- Bunky 293E4

Bunky 293E4 sú bunky získané z buniek 293 integráciou celej oblasti E4. Tieto bunky umožňujú produkciu vírusov defektných v oblastiach E1 a E4 (WO95/02697, Cancer Gene Ther., 322, 1995).

Bunky Sf9 a Sf21 sú bunky embryonálnych *Lepidopter*. Tieto bunky sú sprístupnené v zbierkach (v ATCC pod číslom CRL-1711), spoločne s podmienkami ich kultivácie. Sú tiež komerčne dostupné (Gibco). Pozri tiež Kong a Possee: The baculovirus expression system, London: Chapman a Hall, 1992.

-Ľudské hepatocyty

Bunky HepG2 a Hep3B a HuH7 sú ľudské línie pochádzajúce z karcinómu pečene. Sú sprístupnené v depozitných zbierkach a ich vlastnosti sú opísané napríklad v patentoch US 4 393 133 a 4 393 133.

-Ľudská bunková línia KB

5 Línia KB pochádza z ľudského epidermoidného karcinómu. Línia, ako aj podmienky umožňujúce jej pestovanie, je prístupná v ATCC (číslo CCL17).

-Ľudská bunková línia HeLa

Táto línia pochádza z karcinómu ľudského epitelu. Línia, ako aj podmienky umožňujúce jej pestovanie, je prístupná v ATCC (číslo CCL2).

10 -Bunková línia W162

Sú to bunky Vero obsahujúce oblasť E4 adenovírusu Ad2 integrovanú do svojho genómu. Tieto bunky opísal Weinberg a kol. (PNAS, 80, 5383, 1983).

Príklad 2

15 Infekcia ľudských buniek rekombinantným bakulovírusom

Tento príklad opisuje kapacitu bakulovírusov infikovať bunky ľudského pôvodu.

Ľudské bunky (hlavne 293 alebo ich deriváty) sa infikujú rôznymi riedeniami roztoku rekombinantného bakulovírusu exprimujúceho gén LacZ pod kontrolou RSV LTR. 48 hodín po infekcii sa objavujú modré bunky, čo dokazuje, že tieto bunky sa dajú infikovať bakulovírusom.

20

Príklad 3

Konštrukcia bakulovírusov exprimujúcich oblasť E1 adenovírusu a zodpovedajúceho defektného adenovírusu

3-1. Klonovanie dvoch kaziet na expresiu E1

25 Plazmid AE2 sa získa z klonovania v PCR (Invitrogen) produktu PCR (polymerázová reťazová reakcia) uskutočňovanej na pBRE1 s oligonukleotidmi 5'-TCCTTGCATTTGGGTAACAG-3' a 5'-GCGGCCGC-TCAATCTGTATCTTC-3', tento produkt PCR obsahuje nukleotidy 3198 až 3511 z Ad5, t. j. 3' koniec oblasti E1B. Plazmid pBRE1 obsahuje nukleotidy 1 až 5788 a Ad5 klonované do pBR322 zbaveného zhruba nukleotidov 1300 až 2300.

30 Plazmid AE3 pochádza z klonovania fragmentu NotI-KpnI z AE2, obsahujúceho produkt PCR, do pCDNA3 (Invitrogen) naštípeného s NotI-KpnI. Obsahuje nukleotidy 3198 až 3511 a Ad5 nasledované polyadenylačným miestom BGH.

Plazmid AE4 pochádza z klonovania fragmentu BglII-PvuI z AE3 do pBRE1. AE4 je plazmid obsahujúci nasledujúcu E1 expresnú kazetu:

35 - nukleotidy 1 až 3511 z Ad5, t. j. ľavú ITR, enkapsidačné sekvencie, promótor E1A, gén E1A, promótor E1B, gén E1B

- polyA z hovädzieho rastového hormónu (BGH) získaného z pCDNA3.

40 pBRE1 sa štiepil s BstNI, potom reagoval s T4 DNA polymerázou, aby sa doplnil prečnievajúci 5' koniec, a potom sa štiepil s XbaI. Takto vzniknutý fragment obsahujúci nukleotidy 391 až 1339 z Ad5 sa vložil do pic20H naštípeného so SmaI-XbaI (nemetylované miesto) a vznikol plazmid AE5.

Plazmid AE6 pochádza z klonovania fragmentu EcoRI-SmaI z AE5 do AE4 štiepeného s EcoRI-SmaI. AE6 je plazmid obsahujúci nasledujúcu expresnú kazetu E1:

- nukleotidy 391 až 3511 z Ad5, t. j. „redukovaný“ promótor z E1A, gén E1A, promótor E1B, gén E1B,

- polyA z hovädzieho rastového hormónu (BGH) získaného z pCDNA3.

45

3-2. Klonovanie dvoch kaziet E1 do bakulovírusu

Fragmenty EcoRI-SphI (SphI prečnievajúci 5' koniec sa vopred zatupil opracovaním s T4 DNA polymerázou) z plazmidov AE4 a AE6 sa klonovali do plazmidu pAcSG2 (Pharmlingen) medzi miesta EcoRI a EcoRV. Tak vznikli plazmidy AE14 a AE15. V oboch prípadoch je oblasť E1 zavedená do lokusu polyhedrinového génu (polyhedrinový gén + odstránený polyhedrinový promótor).

50

Plazmidy AE14 a 15 sa spoločne s DNA bakulovírusu BaculoGold pochádzajúceho z kmeňa AcNPV (Pharmlingen) transfekovali (kotrastefkovali) do hmyzích buniek Sf9, aby vznikli dva zodpovedajúce rekombinantné bakulovírusy BacAE14 a BacAE15, nesúce dve kazety na expresiu E1 integrované do lokusu polyhedrinového génu.

55

3-3. Klonovanie rekombinantného adenovírusu nesúceho novú deléciu E1

Plazmid pCO1 (WO96/10088) sa naštípil BstXI, potom sa opracoval s T4 DNA polymerázou, aby sa odstránil prečnievajúci 3'-koniec, a potom sa štiepil RsaI. Takto vzniknutý fragment obsahujúci nukleotidy 3513 až 4607 z Ad5 sa zaviedol do pBS-SK⁺ (Stratagene) linearizovaného s EcoRV, a potom sa štiepil tefacou alkalickou fosfatázou za vzniku plazmidu AE0.

60

Plazmid pMA37 sa získal ligáciou fragmentov:

- EcoRV-NsiI z pXL2756, obsahujúci sacB. pXL2756 má protiselekčný gén SacB bez miest EcoRI a KpnI, gén rezistencie na kanamycín, mnohopočetné klonovacie miesto a replikačný počiatok ColE1,
- NdeI-NsiI z pCO1 (obsahujúci adeno sekvencie),
- SalI (prečnievajúci 5' koniec doplnený T4 DNA polymerázou),
- AseI z pXL2756 (vektor rezistentný na kanamycín).

pMA37 teda obsahuje:

- gén rezistencie na kanamycín
- gén SacB prepožičiavajúci citlivosť na sacharózu baktériám, ktoré ho exprimujú,
- sekvencie 1 až 382 (HinfI) z Ad5 nasledované sekvenciami 3446 až 4415 (NsiI) z Ad5, nie je prítomný žiadny transgén.

Plazmid AE11 sa zostrojil zavedením fragmentu XhoI-NsiI z AEO do pMA37 štiepeného SalI-NsiI. Obsahuje teda:

- gén rezistencie na kanamycín,
- gén SacB prepožičiavajúci citlivosť na sacharózu baktériám, ktoré ho exprimujú,
- sekvencie 1 až 382 (HinfI) z Ad5 nasledované sekvenciami 3513 až 4415 (NsiI) z Ad5, nie je prítomný žiadny transgén.

Z plazmidu AE11 sa potom konštruovali samovražedné kyvadlové vektory (vložením požadovaného transgénu) umožňujúce konštrukciu rekombinantných adenovírusov rekombináciou v *E. coli*. AE11 neobsahuje sekvencie homologické s plazmidom AE6. Plazmidy AE11 a AE4 majú spoločné sekvencie 1 až 382 (HinfI) z Ad5 proti smeru od E1A, ale medzi týmito dvoma plazmidmi nie je žiadna homológia v smere od kazety E1. Tak tu nemôže vzniknúť RCA homologickou rekombináciou medzi adenovírusom nesúcim deléciu E1 existujúcu v AE11 (t. j. 382 až 3515) a bakulovírusmi Bac AE14 alebo BacAE15.

3-4. Konštrukcia prvej generácie rekombinantných adenovírusov

Najskôr sa zvyčajnými technikami pripravil kmeň BacAE14 alebo 15. Ďalej sa kompetentné bunky (napríklad Huh7) transfekovali 5 µg plazmidu pXL2822 štiepeného PacI (plazmid pXL2822 obsahuje celý Ad5 s odstránenou oblasťou E1 (382 až 3446 alebo 382 až 3513) a E3 (28592 až 30470) a nesie kazetu CMV-βGal), a infikovali, súčasne alebo inak, pri MOI 10 až 1000, BacAE14 alebo 15. Po lýze buniek sa zozbieral transfekčný supernatant a použil sa na „čerstvé“ kompetentné bunky vopred alebo súčasne infikované BacAE14 alebo 15 (MOI 10 až 1000), aby sa amplifikoval adenovírus Ad2822, a tak ďalej, pokiaľ sa nezískal kmeň Ad2822. Sledovanie amplifikácie Ad2822 je uľahčené prítomnosťou lacZ v tomto víruse. Pri každej amplifikácii sa teda supernatant pseudotitoval na W162. Genóm vírusu sa analyzoval v priebehu amplifikácií, aby sa kontrolovala jeho integrita. Táto stratégia má tú výhodu, že v takto tvorenom adenovírusovom kmeni nevznikajú RCA. Neprítomnosť kontaminácie sa tiež ešte overuje.

Príklad 4

Konštrukcia bakulovírusu exprimujúceho oblasti E1 a E4 (Bac.E1-E4)

Použitý protokol je nasledujúci: oblasti E1 a E4 sa klonovali v opačnej orientácii k lokusu polyhedrinového (Ph) génu do kyvadlového vektora pBacPAK8 (Clontech, USA) za vzniku pBacE1-E4. Rekombinantný bakulovírus sa potom izoloval pomocou zvyčajných techník kotransfekcií pBacE1-E4 a DNA bakulovírusu BacPAK6 do buniek Sf9 (Kittsa Possee, Biotechniques, 14(5), 810, 1993). Výskyt E1 a E4 v genóme rekombinantných bakulovírusov sa potom kontroloval PCR s použitím infikovaných buniek Sf9. Transkripcia E1 a E4 v bunkách Huh7 infikovaných purifikovaným rekombinantným bakulovírusom sa analyzovala RT-PCR s použitím cytoplazmatických RNA.

Na konštrukciu bakulovírusu E1-E4 sa môžu zaviesť rôzne fragmenty nesúce E1. V tomto príklade sa použili fragmenty, ktoré sú opísané v príklade 3, na konštrukciu bakulovírusu-E1, obsahujúceho oblasti E1 pod kontrolou ich vlastného promotora (redukovaný promotor E1a a promotor E1b). Použité fragmenty E4 sú nasledujúce:

- fragment MaeII-MscI 32720 až 35835 nesúci celú E4,
- fragment BglII-PvuI 34115 až 33126 nesúci rámec ORF6,
- fragment BglII-BglII 34115 až 32490 nesúci rámce ORF6-ORF6/7,
- fragment PvuII-AluI 34801-334329 nesúci rámec ORF3.

Tieto fragmenty sú umiestnené alternatívne pod kontrolu promotora E4 alebo iných promotorov, konkrétne HSV-TK alebo promotora CMV alebo RSV-LTR.

Uvedené pozície sa vzťahujú na sekvenciu divého typu Ad5 adenovírusu, ako je publikovaná a prístupná v banke dát. Aj keď môžu existovať niektoré menšie odchýlky medzi rôznymi adenovírusovými sérotypmi, tieto pozície sú všeobecne prenosné na iné sérotypy, konkrétne na Ad2, Ad7, Ad12 a Ad CAV-2.

4-2. Transkomplementácia AdΔE1ΔE4-LacZ s Bac.E1-E4

Produkcia adenovírusu AdΔE1ΔE4-LacZ sa získala zavedením bakulovírusu E1, E4 pripraveného v príklade 4-1, a adenovírusového genómu defektného v E1 a E4 do kompetentných buniek (pozri obrázok 1). Analyzovali sa optimálne podmienky na produkciu AdΔE1ΔE4-LacZ v kompetentných bunkách transkomplementáciou s purifikovaným Bac.E1-E4. Titer AdΔE1ΔE4 sa určil ako počet transdukčných jednotiek (t.d.u.) β-galaktosidázy v línii W162 a získaná transkomplementačná účinnosť sa porovnala s účinnosťou enkapsidačnej línie IGRP2.

Príklad 5

Konštrukcia bakulovírusu komplementujúceho celý adenovírusový genóm

Aj keď súčasná expresia niekoľkých proteínov, ktoré môžu predstavovať sekvenciu s veľkosťou až 13 kb, jedným vírusom už bola publikovaná (Belyaev a Roy, NAR, 21, 1219, 1993), maximálna klonovacia kapacita nie je dostatočne doložená. Tento príklad teraz ukazuje, že je možné klonovať do bakulovírusu adenovírusový genóm s odstráneným enkapsidačným signálom (Ad.Psi-), ktorý je ohraničený dvoma miestami loxP (loxP-ITR-ITR až E4-loxP). Infekcia kompetentných buniek exprimujúcich rekombinázu Cre indukateľným alebo iným spôsobom (lína Cre alebo Cre-ER, pozri príklad 7) týmto rekombinantným bakulovírusom a aktivácia rekombinázy Cre umožňuje excíziu a cirkularizáciu adenovírusového genómu. Ten je potom schopný transdukcie skorých génov, replikácie a aktivácie neskorých génov, ale neschopný enkapsidácie, a teda slúži ako pomocník na produkciu minimálneho adenovírusu (pozri obrázky 2-4). V tomto systéme je produkcia minimálnych adenovírusov založená na spoločnej infekcii dvoma bakulovírusmi a realizácii dvoch rekombinantných javov medzi dvoma miestami loxP. Tento prístup má tú výhodu, že nevznikajú adenovírusové častice z pomocného vírusu.

Konštrukcia genómu Ad.Psi- sa uskutočnila v *E. coli*. S týmto cieľom sa kompletný genóm adenovírusu Ad5 klonoval do prokaryotického klonovacieho vektora s pripojenými ITR. Sekvencia Psi sa odstránila enzymatickým štiepením a ligáciou alebo miestne cielenou mutagenézou. Na každú stranu adenovírusového genómu sa potom zaviedla sekvencia LoxP v paralelnej orientácii. Výsledný konštrukt (loxP-ITR-ITR, ΔPsi až E4-loxP) sa potom klonoval do kyvadlového vektora umožňujúceho rekombináciu s bakulovírusom podľa stratégie opísanej v príklade 3. Získaný rekombinantný bakulovírus, nazvaný BacAd.Psi-, sa potom izoloval bežnými metódami.

Príklad 6

Konštrukcia bakulovírusu obsahujúceho genóm defektného rekombinantného adenovírusu v odstrániteľnej forme

Tento príklad opisuje konštrukciu bakulovírusu, ktorý umožňuje poskytnúť genóm defektného rekombinantného adenovírusu v kompetentných bunkách. Konkrétnejšie je rekombinantný vírus defektný v celej kódujúcej oblasti a obsahuje len oblasti ITR a Psi (minimálny adenovírus, alebo AdΔ).

6-1. Konštrukcia minigenómu (AdΔ) v *E. coli*

Zostrojil sa plazmid p(loxP-(ITR-ITR-Psi-P.CMV-LacZ-pA)-loxP). S týmto cieľom sa izolovala sekvencia kópie sekvencie ITR adenovírusu enzýmovým štiepením a/alebo sa amplifikovala pomocou PCR, a potom sa klonovala proti smeru sekvencie ITR-Psi obsiahnutej v kyvadlovom vektore z adenovírusu pGY63. Tento vektor pochádza z pCO1 (WO96/10088) a má gén LacZ pod kontrolou skorého promotora cytomegalovírusu (P.CMV) ukončený polyadenylačným signálom vírusu SV40 (pA), klonovaným medzi sekvenciu ITR-Psi a gén kódujúci pIX. Oblasť (ITR-ITR-Psi-P.CMV-LacZ-pA) tohto vektora (zodpovedajúca minimálnemu adenovírusovému genómu) sa potom izolovala enzýmovým štiepením a klonovala medzi miesta LoxP do mnohopočetného klonovacieho miesta plazmidu pBS246 (Gibco) za vzniku plazmidu p(loxP-(ITR-ITR-Psi-P.CMV-LacZ-pA)-loxP). Kapacita produkcie adenovírusových minigenómov z cirkulárnej DNA a ich enkapsidácia sa potom testovala transfekciou tohto plazmidu do línie IGRP2 infikovanej s Ad.ΔE1ΔE4 exprimujúcim rekombinázu Cre (AdCre). Minimálne adenovírusy sa amplifikovali niekoľkými postupnými pasážami supernatantu z transfekcie línie IGRP2. Potom sa purifikovali centrifugáciou v izopyklickom gradiente chloridu cézneho a kvantifikovali pseudotitráciou línie W162. Rozumie sa, že gén LacZ sa môže ľahko nahradiť akoukoľvek požadovanou nukleovou kyselinou zvyčajnými technikami molekulárnej biológie.

6-2. Klonovanie odstrániteľného minigenómu do bakulovírusu

Opísaný konštrukt nesúci minigenóm AdΔ ohraničený dvoma miestami loxP sa klonoval do lokusu P10 bakulovírusu kyvadlového vektora pAcUW1 (Pharmlingen, USA). Bakulovírus Bac.AdΔ sa potom produkoval a izoloval zvyčajnou technikou kotransfekcie do už uvedených buniek Sf9, a vyberal sa podľa svojho fágového fenotypu (biely) po označení s X-Gal. Tento bakulovírus preto nesie vysoko defektný adenovírusový genóm, ohraničený dvoma oblasťami loxP v priamej orientácii.

6-3. Produkcia AdΔ transkomplementáciou s bakulovírusom BacAdPsi⁻

Kompetentné bunky sa súčasne spoločne infikovali (koinfikovali) bakulovírusom BacAdPsi⁻ (opísaným v príklade 5), nesúcim transkomplementačné funkcie celého adenovírusového genómu, a bakulovírusom Bac.AdΔ nesúcim genóm PseudoAdenovírusu (už opísaným). Rekombináza Cre sa zaistila buď pridaním proteínu do kultivačného média, alebo transfekciou buniek plazmidom alebo vírusom (bakulovírusom) exprimujúcim Cre, alebo expresiou kazety trvalo integrovanej do genómu línie (ako je opísané v príklade 7). Minimálny adenovírus sa amplifikoval postupným pasážovaním supernatantu tkanivovej kultúry buniek spoločne infikovaných s BacAd.Psi⁻ a so supernatantom, a potom sa purifikoval a titroval pomocou uvedených techník. Táto technika umožňuje získať AdΔ ako jediný vírus, čo umožňuje jeho izoláciu a purifikáciu bežnými metódami. Okrem toho, získané titre sú zlučiteľné s priemyselným využitím.

Príklad 7

Konštrukcia línie exprimujúcej proteín Cre

Aby sa zvýšila účinnosť rekombinácie medzi miestami loxP v bakulovíruse podľa vynálezu (napríklad Bac.AdΔ and BacAd.Psi⁻) a aby sa kontrolovala expresia Cre, vytvorili sa línie exprimujúce Cre indukovateľným alebo iným spôsobom. V tomto konštrukte sa Cre exprimuje samotný alebo vo forme fúzneho proteínu C-koncového časti s väzbovou doménou estradiolového receptora (ER) (Metzger et al., 1996, už citovaný) pod kontrolou bežného promótoru, výhodne silného indukovateľného promótoru alebo iného. Výhodnejšie promótoru sú promótor pGRE5, promótor metalotionínu, promótor SV40 alebo promótor génu HSV-TK.

Aby sa vytvorili tieto línie Cre, kotransfekovali sa kompetentné bunky dvoma plazmidmi, z ktorých jeden obsahuje expresnú kazetu Cre (Cre alebo Cre-ER) a druhý markér na selekciu (Neo). Vybrali sa rezistentné klony G418, aktivita Cre v týchto klonoch sa testovala transfekciou plazmidu p(P.CMV-loxP-ATG-stop-pA-LoxP-LacZ). Tento plazmid obsahuje gén LacZ inaktívovaný zavedením medzi promótor (P.CMV) a začiatok LacZ, množstvo stopovacích kodónov v troch čítacích rámcoch, signál na termináciu transkripcie a polyadenylačný signál vírusu SV40 ohraničený dvoma miestami loxP. Expresia Cre v klonoch v prítomnosti či neprítomnosti induktora (estradiol) sa potom odhaľovala aktivitou β-galaktosidázy vyvolanou rekombináciou medzi dvoma miestami loxP. Vybralo sa teda niekoľko klonov trvalo exprimujúcich fúzny proteín Cre-ER alebo samotný proteín Cre bez promótorov a špecifikovanej kompetentnej bunky. Tieto klony sa môžu použiť na produkciu vírusov podľa vynálezu.

Kompetentná bunka	Promótor HSV-TK		Promótor SV40		Promótor MMTV		Promótor GRE5	
	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER
293	č. 1	č. 7	č. 13	č. 19	č. 25	č. 31	č. 37	č. 43
IGRP2	č. 2	č. 8	č. 14	č. 20	č. 26	č. 32	č. 38	č. 44
Huf7	č. 3	č. 9	č. 15	č. 21	č. 27	č. 33	č. 39	č. 45
HepG2	č. 4	č. 10	č. 16	č. 22	č. 28	č. 34	č. 40	č. 46
HER	č. 5	č. 11	č. 17	č. 23	č. 29	č. 35	č. 41	č. 47
Vero	č. 6	č. 12	č. 18	č. 24	č. 30	č. 36	č. 42	č. 48

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob prípravy defektných rekombinantných vírusov, vyznačujúci sa tým, že do populácie kompetentných buniek sa vnesie genóm defektného rekombinantného vírusu a bakulovírus obsahujúci všetky alebo niektoré funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu, pričom ostatné funkcie sú poskytnuté kompetentnou bunkou.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že bakulovírus obsahuje všetky funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu.

3. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že bakulovírus obsahuje niektoré funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu, pričom zvyšné funkcie poskytuje kompetentná bunka.

4. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu poskytuje niekoľko bakulovírusov.

5. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že defektný rekombinantný vírus je defektný rekombinantný adenovírus.

6. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že genóm rekombinantného adenovírusu je defektný v jednej alebo niekoľkých funkciách vybraných z E1, E2, E3, E4, L1 až L5, pIX a IVa2, a bakuloví-

rus obsahuje všetky funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu.

7. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že genóm rekombinantného adenovírusu je defektný v jednej alebo niekoľkých funkciách vybratých z E1, E2, E3, E4, L1 až L5, pIX a IVa2, a bakulovírus obsahuje niektoré funkcie nevyhnutné na transkomplementáciu defektného rekombinantného genómu, pričom zvyšné funkcie poskytuje jeden alebo niekoľko bakulovírusov a/alebo kompetentná bunka.

8. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pomocný bakulovírus obsahuje časť alebo celý úsek E1 adenovírusu umožňujúci komplementáciu rekombinantného adenovírusového genómu defektného v úseku E1.

9. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pomocný bakulovírus obsahuje časť alebo celý úsek E2 adenovírusu umožňujúci komplementáciu rekombinantného adenovírusového genómu defektného v úseku E2.

10. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pomocný bakulovírus obsahuje časť alebo celý úsek E4 adenovírusu umožňujúci komplementáciu rekombinantného adenovírusového genómu defektného v úseku E4.

11. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pomocný bakulovírus obsahuje časti alebo celé úseky E1 a E4 adenovírusu umožňujúce komplementáciu rekombinantného adenovírusového genómu defektného v úsekoch E1 a E4.

12. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rekombinantnému adenovírusovému genómu chýba celá vírusová kódujúca oblasť a pomocný bakulovírus obsahuje všetky funkcie umožňujúce jej komplementáciu.

13. Spôsob podľa nároku 12, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že bakulovírus obsahuje celý adenovírusový genóm okrem enkapsidačného signálu a prípadne úsekov ITR.

14. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplementačné funkcie prítomné v bakulovíruse a genóm defektného rekombinantného vírusu neobsahujú úsek homológie, ktorý by bol schopný vyvolať rekombináciu.

15. Spôsob podľa nároku 14, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rekombinantný adenovírusový genóm defektný v úseku E1 a prípadne v E3 sa vnesie do kompetentných buniek, a tieto bunky sa infikujú, súčasne alebo nie, bakulovírusom obsahujúcim úsek E1, pričom adenovírusový úsek E1 prítomný v bakulovíruse a genóm defektného rekombinantného adenovírusu neobsahujú úsek homológie, ktorý by bol schopný vyvolať rekombináciu.

16. Rekombinantný bakulovírus na použitie v spôsobe podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplementačná funkcia je vybratá zo všetkých alebo niektorých funkcií kódovaných adenovírusovými úsekmi E1, E2, E4, L1 až L5, pIX a IVa2, samostatne alebo v kombináciách, a je pod kontrolou heterológneho promotóra.

17. Rekombinantný bakulovírus na použitie v spôsobe podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplementačná funkcia je vybratá zo všetkých alebo niektorých funkcií kódovaných úsekmi Rep a Cap z AAV, samostatne alebo v kombináciách, a je pod kontrolou heterológneho promotóra.

18. Rekombinantný bakulovírus na použitie v spôsobe podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplementačná funkcia je vybratá zo všetkých alebo niektorých funkcií kódovaných úsekmi gag, pol, a env retrovirusov, samostatne alebo v kombináciách, a je pod kontrolou heterológneho promotóra.

19. Bakulovírus podľa nároku 17 alebo 18, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že promotórom je promotórový úsek prirodzene zodpovedajúci za expresiu komplementačných funkcií.

20. Bakulovírus podľa nároku 17 alebo 18, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že promotór je silný bunkový alebo vírusový promotór, regulovaný alebo nie.

21. Bakulovírus podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplementačná funkcia obsahuje úsek E1 adenovírusového genómu alebo len jeho časť, ktorá obsahuje aspoň úsek E1a.

22. Bakulovírus podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že komplementačná funkcia obsahuje úsek E4 adenovírusového genómu alebo len jeho časť, ktorá obsahuje aspoň rámec ORF3 alebo ORF6.

23. Bakulovírus podľa nároku 16, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje všetky kódujúce úseky adenovírusového genómu.

24. Bakulovírus podľa nároku 23, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje úplný adenovírusový genóm, ktorému chýba enkapsidačný úsek.

25. Bakulovírus na použitie v spôsobe podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že je to bakulovírus kmeňa AcNPV.

26. Bakulovírus na použitie v spôsobe podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že nukleová kyselina kódujúca komplementačnú funkciu sa vnesie na úroveň polyhedrinového lokusu alebo lokusu p10.

27. Bakulovírus na použitie v spôsobe podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že nukleová kyselina kódujúca komplementačnú funkciu sa vnesie vo forme kazety, ktorá je schopná vyštiepenia v kompetentných bunkách.

28. Rekombinantný bakulovírus podľa niektorého z nárokov 16 až 18, ktorý obsahuje vložený vo svojom

genóme aspoň jeden úsek DNA obklopený dvoma sekvenciami umožňujúcimi miestne-špecifickú rekombináciu umiestnenými v priamej orientácii, pričom uvedený úsek DNA obsahuje aspoň jeden replikačný počiatok funkčný v kompetentných bunkách a nukleovú kyselinu kódujúcu komplementačnú funkciu vírusu.

29. Bakulovírus podľa nároku 28, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sekvencie umožňujúce miestne-špecifickú rekombináciu sú sekvencie LoxP bakteriofága P1, a rekombinácia sa dosiahne v prítomnosti proteínu Cre.

30. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že defektný rekombinantný genóm sa vnesie do bunky infekciou adenovírusom, ktorý obsahuje uvedený genóm.

31. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že defektný rekombinantný genóm sa vnesie do bunky transfekciou.

32. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že defektný rekombinantný genóm sa vnesie do bunky rekombinantným bakulovírusom, ktorý je odlišný od bakulovírusu nesúceho komplementačné funkcie.

33. Rekombinantný bakulovírus podľa niektorého z nárokov 16 až 27, ktorý obsahuje vložený vo svojom genóme aspoň jeden úsek DNA obklopený dvoma sekvenciami umožňujúcimi miestne-špecifickú rekombináciu umiestnenými v priamej orientácii, pričom uvedený úsek DNA obsahuje aspoň jeden replikačný počiatok funkčný v kompetentných bunkách a defektný adenovírusový genóm.

34. Bakulovírus podľa nároku 33, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že defektný rekombinantný adenovírusový genóm obsahuje nevyhnutne úseky ITR, enkapsidačnú sekvenciu a požadovanú nukleovú kyselinu.

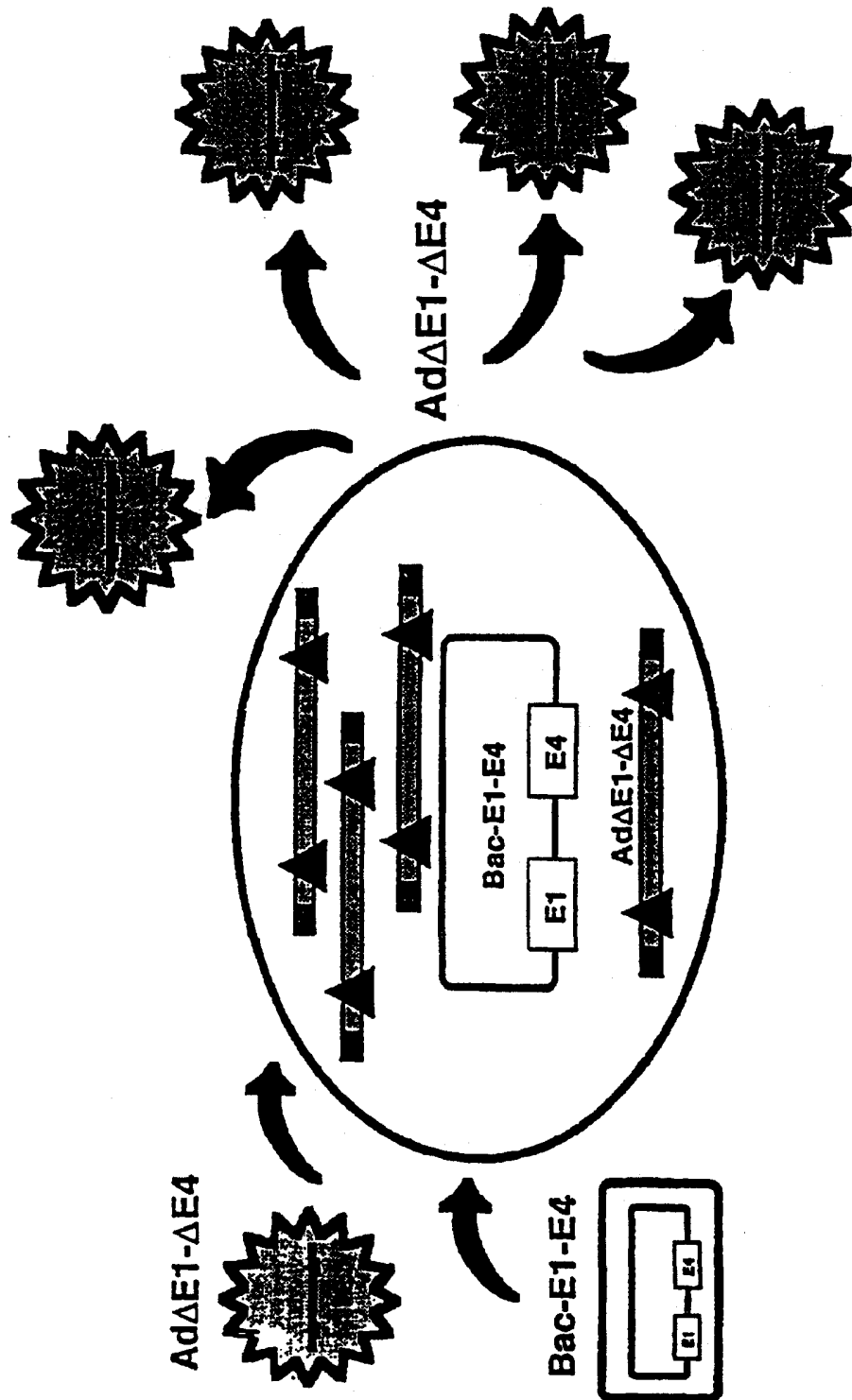
35. Spôsob prípravy defektných rekombinantných adenovírusov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa populácia kompetentných buniek infikuje bakulovírusom podľa nároku 28 a bakulovírusom podľa nároku 33, bunky sa uvedú do prítomnosti rekombinázy umožňujúcej miestne-špecifickú rekombináciu a potom sa získajú produkované adenovírusy.

36. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že populácia kompetentných buniek je populácia buniek pečene alebo svalových buniek, fibroblastov, embryonálnych alebo epitelových buniek, zvlášť pľúcnych, buniek oka, zvlášť retiny, alebo nervových buniek.

37. Spôsob podľa nároku 36, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že populácia kompetentných buniek sa vyberie z buniek 293 alebo akýchkoľvek odvodených buniek, obsahujúcich ďalšie komplementačné funkcie, A549, HuH7, Hep3B, HepG2, HER, 911, HeLa alebo KB.

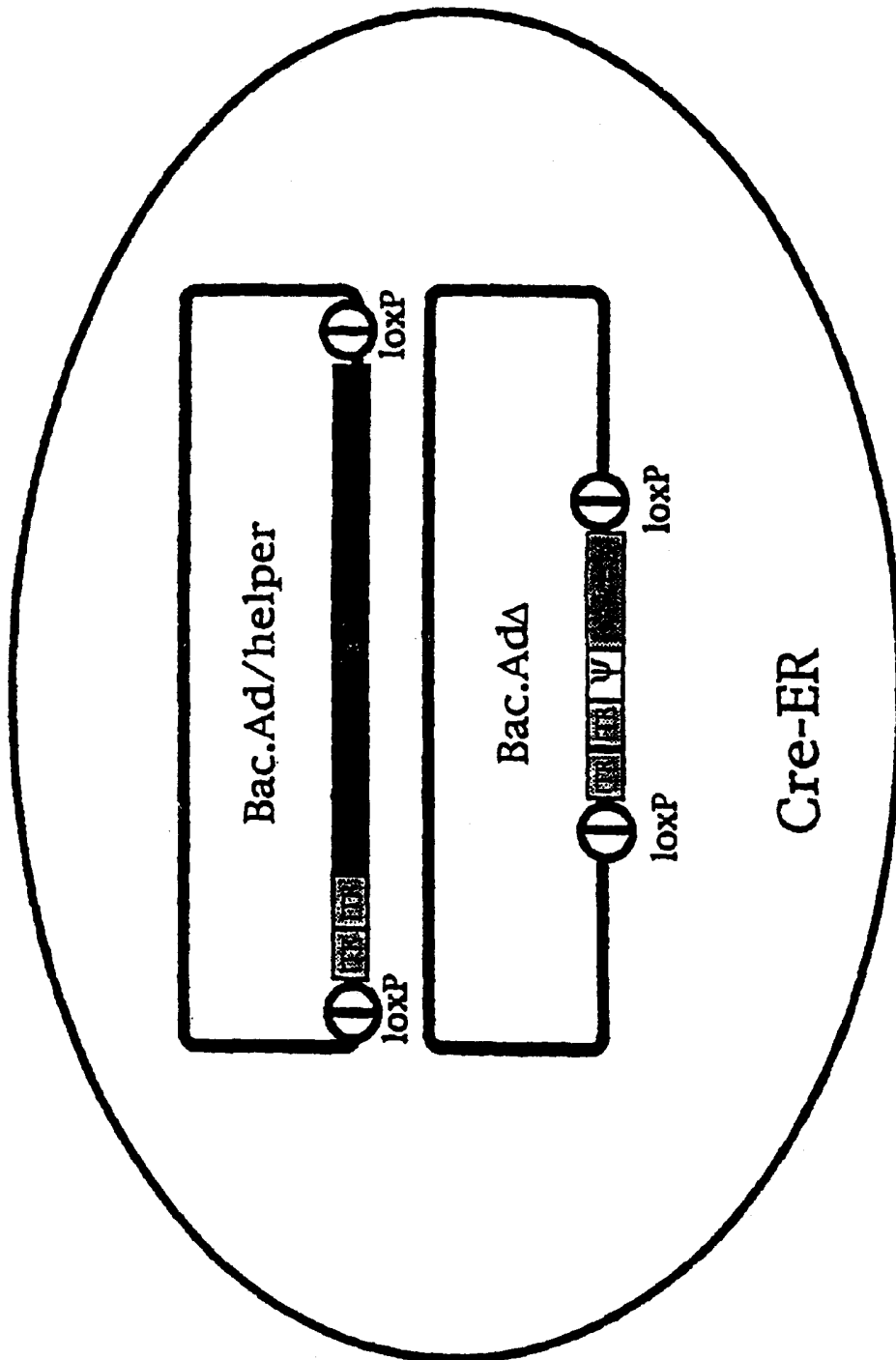
5 výkresov

1/5

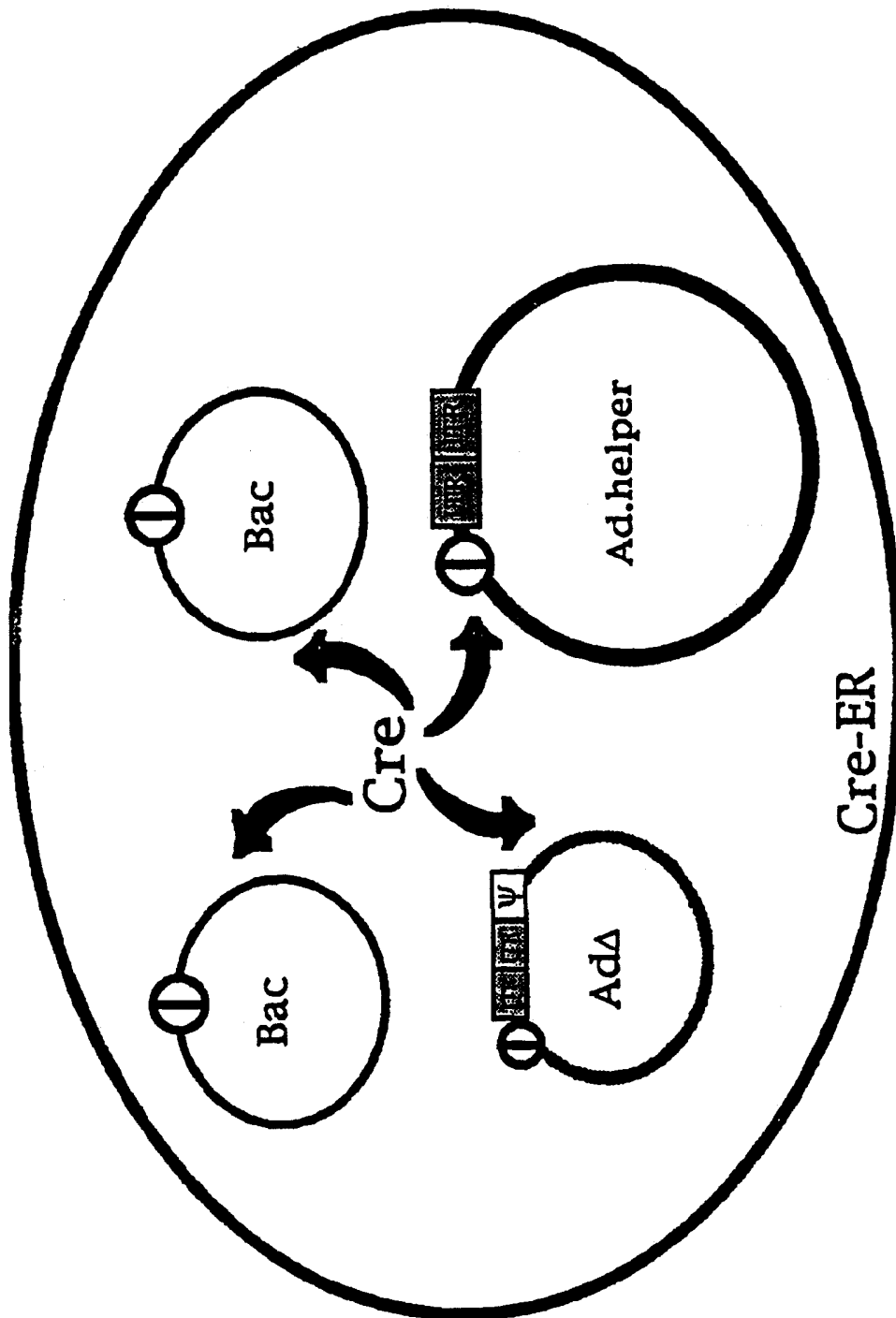


Obr. 1

2/5

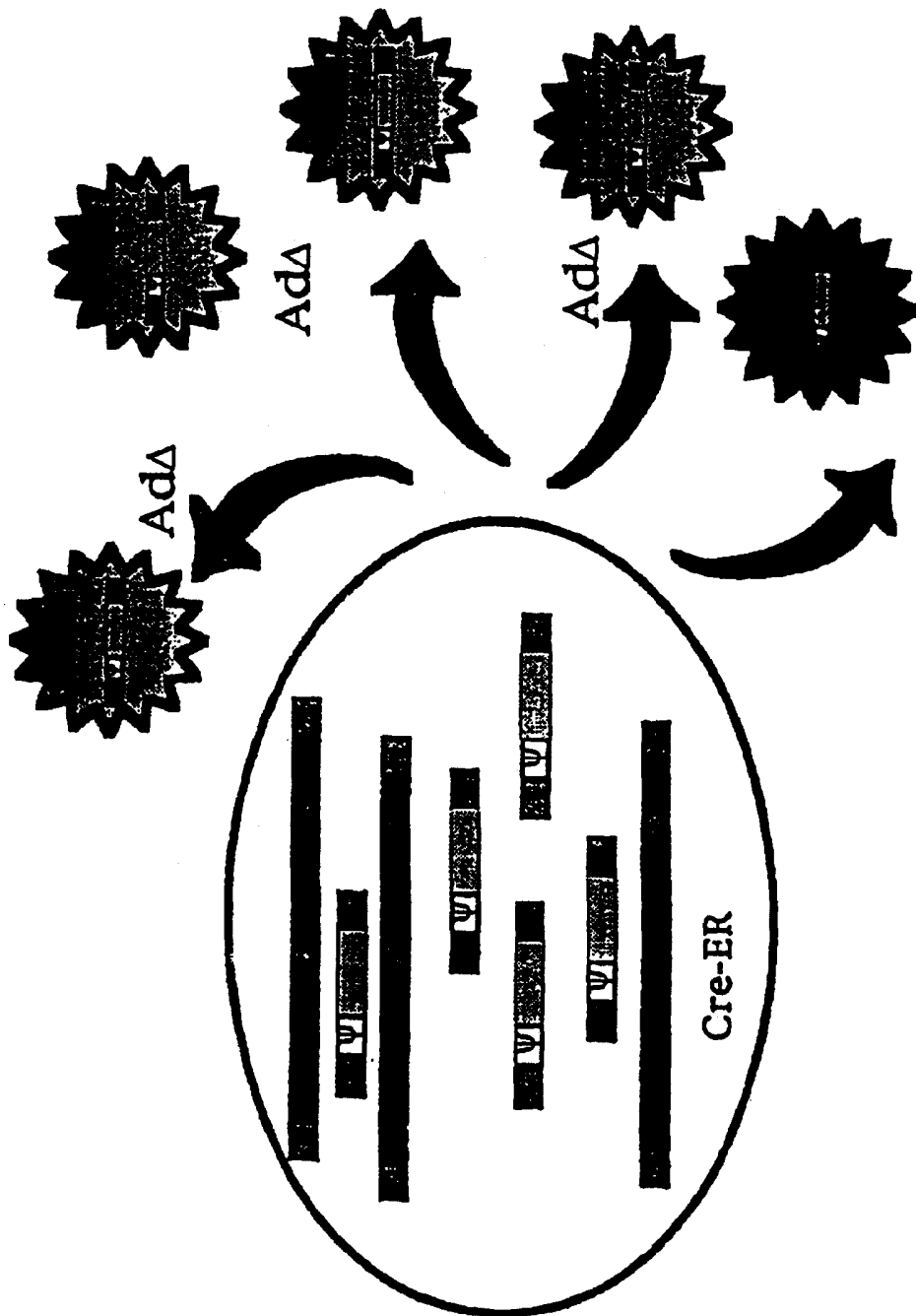


Obr. 2



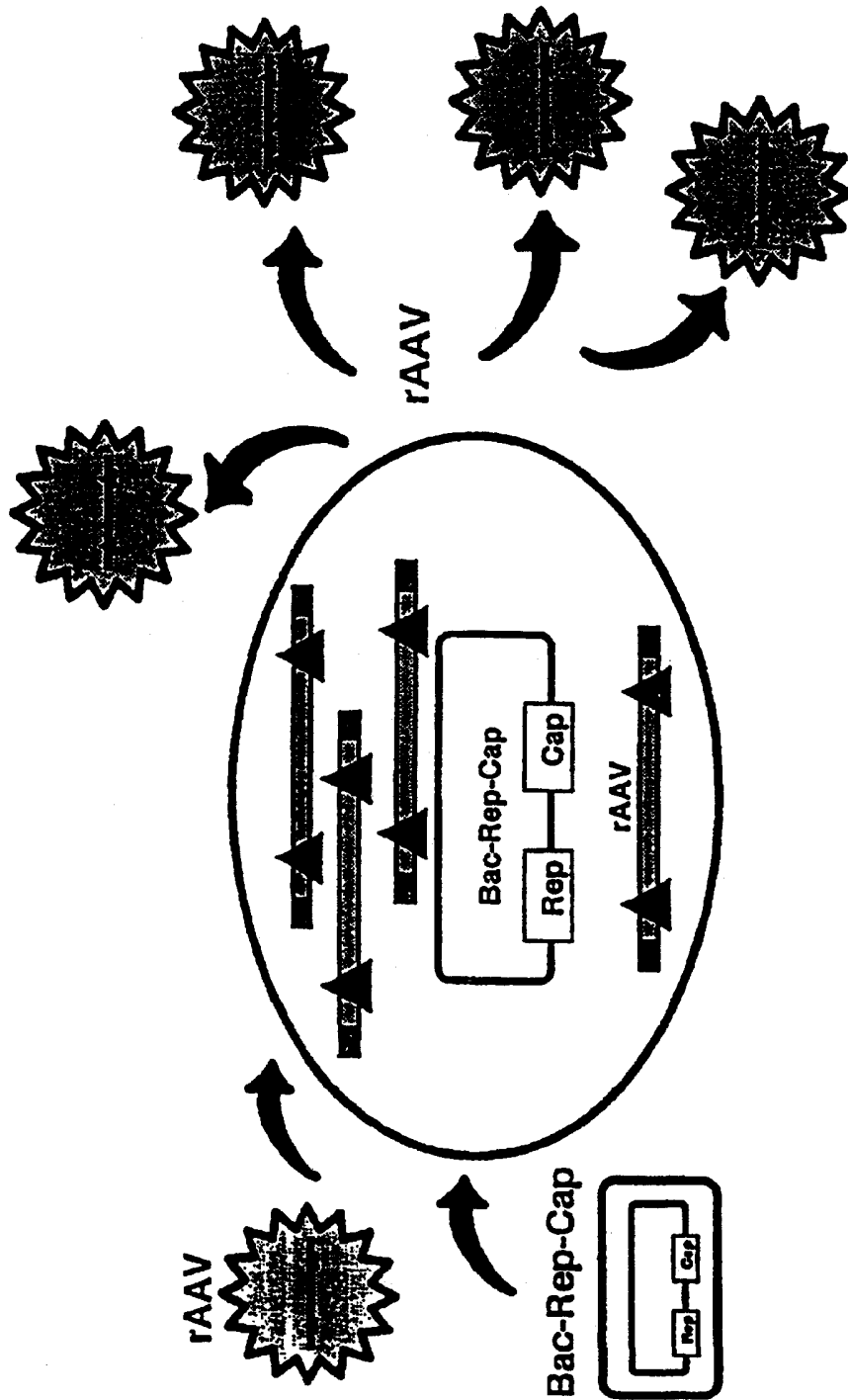
Obr. 3

4/5



Obr. 4

5/5



Obr. 5