

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

3050-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27. 03. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.03.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/352**

(33) Země priority: **DK**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 01. 99**

(Věstník č. 1/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/01585**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/35994**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/86
C 12 N 5/10
A 61 K 48/00

(71) Přihlášovatel:

BAVARIAN NORDIC RESEARCH INSTITUTE
A/S, Glostrup, DK;
GSF- FORSCHUNGASZENTRUM FÜR
UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH,
Oberschleissheim, DE;

(72) Původce:

Günzburg Walter, Mödling, AT;
Karle Peter, Nürnberg, DE;
Saller Robert Michael, München, DE;

(74) Zástupce:

Knížek Milan JUDr. CSc., Česká 1108,
Praha 5, 15800;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Cytochrom P450 transdukující retroviro-
vé vektory**

(57) Anotace:

Replikačně-defektivní retrovirový vektor přenašející gen s cytochromem P450 pod transkripční kontrolou specifických regulačních elementů nebo promotorů cílové buňky nebo promotorů indukovatelných rentgenovým zářením.

CZ 3050-98 A3

23.09.98

PV 3010-98

17613

Název Cytochrom P450 transdukuující retrovirové vektory

Oblast techniky

Vynález se týká replikačně-defektivních retrovirových vektorů se zakódovaným genem s cytochromem P450, které jsou schopny změnit neškodné rakovinové prodrogy na cytotoxické metabolity. Dále se vynález týká používání takových retrovirových vektorů na přípravu léčiv na léčbu různých druhů rakoviny nebo ablaci nádorů.

Dosavadní stav techniky

Protirakovinová léčiva, která se používají pro léčbu nádorů, se ve většině případů aplikují systémově a šíří se celým tělem pacienta. Vysoká systémová dávka takového léčiva, která je nutná pro léčbu rakoviny, je spojena s vedlejšími účinky nepříjemnými pro pacienta.

Ve snaze obejít tento problém, používaly se rakovinové prodrogy, které musejí být metabolizovány nebo aktivovány v těle předtím než se stanou cytotoxickými. Žel, lidské nádory, které obsahují příslušné vysoké hladiny aktivujících enzymů, jsou vzácné. Hlavním místem pro aktivaci prodrog jsou játra a, aby se zajistilo, že nádor, který je na vzdáleném místě, dostane dostatečnou dávku aktivovaného léku, množství aktivované prodrogy, která je produkována v játrech, musí být dosti velké, a to zase vede k toxickým vedlejším účinkům pro pacienta.

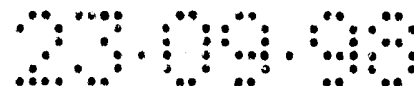
Jednou strategií, kterou by bylo možno tyto problémy vysoké systémové koncentrace aktivovaných léků obejít, by bylo poskytnout prostředky pro aktivaci prodrogy přímo v místě nádoru nebo blízko místa nádoru. Tato strategie by vyžadovala, aby buňky nádoru, nebo buňky v místě nádoru byly geneticky změněné tak, aby produkovaly velká množství enzymů, které jsou třeba pro metabolizaci rakovinových prodrog. Retrovirální vektory se ideálně hodí pro stabilní dodávku genů do buněk, protože retrovirus je schopen integrovat DNA formu svého genomu do genomu hostitelské buňky, a tak všechny dceřinné buňky infikované buňky ponese retrovirový vektor nesoucí terapeutický gen. Další výhodou je,

že většina retrovirů infikuje pouze dělící se buňky, a proto jsou ideálním nosičem dodávky genu pro buňky nádoru.

Bylo již testováno mnoho cytotoxických genů nesených retrovirovými vektory. Tyto geny kódují enzymy, které mohou měnit substance, které jsou farmakodynamicky a toxikologicky inertní i na úrovni vysokých dávek, ale které je možno změnit in vivo na vysoce aktivní metabolity (Connors, T.A. (1995), *Gene Therapy* 2: 702-709).

V chemoterapii rakoviny se zjistilo, že vhodně navržené prodrogy jsou účinné při léčbě zvířecích nádorů s vysokými hladinami aktivujícího enzymu (Connors, T. a Whisson, M. (1966) *Nature* 210: 866-867 a Cobb, L. a kol. (1969), *Biochemical Pharmacology* 18: 1519-1527). Klinické výsledky však zklamaly, protože bylo zjištěno, že lidská rakovina, která obsahuje příslušné vysoké hladiny aktivujícího enzymu, je vzácná (Connors, T. (1986), *Xenobiotica* 16: 975-988). Virově řízená enzymatická terapie prodrogou (VDEPT) a obecnější genově řízená enzymatická terapie prodrogou (GDEPT) spolu souvisejí v tom, že jejich cílem je také zničit buňky nádoru pomocí pro nádor specifickou aktivací prodrogy. V tomto případě je však -genetické zakódování enzymu buď specificky zaměřeno na maligní buňky nebo je řízeno specifickým promotorem.

Až dosud se většina úsilí zaměřeného na terapii prodrogou soustředila na používání lidského viru herpes simplex virus thymidinkinázy (HSV-tk) jako suicidálního genu. I když enzym HSV-tk v kombinaci s prodrogou ganciclovir (GCV) byl doporučován jako dobrý systém pro GDEPT (Culver, K. a kol., (1992), *Science* 256: 1550-1552, Ram, Z. a kol., (1993), *Cancer Research* 53: 83-88 a Chen, S., Shine, H. a kol., (1994), *Proc.Natl.Acad.Sci.* 91: 3054-3057), existuje mnoho teoretických úvah, které by naznačovaly, že to v žádném případě není ta nejlepší kombinace. Zaprvé, je to specifická látka S-fáze bez účinku na klidové buňky. Je tomu tak proto, že GCV monofosfát je krátkodobý a musí být přítomen, když buňky vstupují do S-fáze, aby měl toxický efekt. HSV-tk fosforyluje GCV na monofosfátovou formu (reakce, kterou nemohou uskutečnit savčí enzymy), která je poté fosforylovaná buněčnými enzymy na trifosfátovou formu a začleněna do DNA. Zadruhé, aktivní léčivo je trifosfát a neočekávalo by se, že bude volně difundovat tak, aby způsobil pomocný efekt. Pomocný efekt však byl pozorován jak in vitro, tak in vivo, i když se zdá, že je zapojena metabolická spolupráce a ve druhém případě



může být některý efekt nepřímý a zahrnovat imunitní komponent (Bi, W., Parysek, L. a kol., (1993), Human Gene Therapy 4: 725-731, Vile, R. a Hart, I. (1993), Cancer Research 53: 3860-3864 a Freeman, S., Abboud, C. a kol., (1993), Cancer Research 53: 5274-5283). Jednou nevýhodou je, že pomocný efekt závisí na kontaktu buňka-buňka. Může to být způsobeno přítomností mezerového spojení tvořeného intimním kontaktem mezi transdukovanou a okolními buňkami, což umožňuje přenos fosforylovaného gancicloviru.

Nedávno byly uvedeny zajímavé výsledky s buňkami, které byly transfikovány genem se zakódovaným krysím cytochromem P450 formy 2B1, a pak léčeny cyklofosfamidem (Chen, S., Shine, H. a kol., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3054-3057).

Cílem tohoto vynálezu je poskytnout nové replikačně-defektivní retrovirové vektory přenášející gen se zakódovaným cytochromem P450 pod transkripční kontrolou specifického regulačního elementu nebo promotoru cílové buňky nebo promotorů indukovatelných rentgenovým zářením, které mohou být transfikovány do obalových buněčných linií s cílem produkovat rekombinantní retrovirové částice užitečné pro genovou terapii různých druhů rakoviny.

Tento vynález kromě jiného obsahuje toto, samostatně nebo v kombinaci:

Podstata vynálezu

Replikačně-defektivní retrovirový vektor přenášející gen se zakódovaným cytochromem P450 pod transkripční kontrolou specifického regulačního elementu nebo promotoru cílové buňky nebo promotoru indukovatelného rentgenovým zářením.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, kdy vektor zahrnuje oblast 5'LTR struktury U3-R-U5; jednu nebo více sekvencí zvolených ze kódujících nebo nekódujících sekvencí; a oblasti 3'LTR zahrnující zcela nebo částečně deletovanou oblast U3, kde zmíněná deletovaná oblast U3 je nahrazena polyvazební sekvencí obsahující specifický regulační element nebo promotor cílové buňky nebo promotor indukovatelný rentgenovým zářením, následovaný oblastí R a U5, která je charakterizována tím, že alespoň v jedné ze sekvencí kódování má zakódovaný cytochrom P450.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém je specifický regulační element nebo promotor cílové buňky zvolen z jednoho nebo více elementů skupiny, kterou tvoří WAP, MMTV, specifické regulační elementy a promotory b-laktoglobulinu a kaseinu, specifické regulační elementy a promotory pankreatu včetně regulačních elementů a promotorů karbonatdehydratázy II a b-glukokinázy, specifické regulační elementy a promotory lymfocytů včetně imunoglobulinu a MMTV lymfocytické specifické regulační elementy a promotory a MMTV specifické regulační elementy a promotory propůjčující responsivitu glukokortikoidním hormonům nebo směřující expresi do prsní žlázy.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém jsou uvedené oblasti LTR zvoleny z alespoň jednoho elementu skupiny, kterou tvoří LTR z MLV, MMTV, MSV, SIV, HIV, HTLV, FIV, FeLV, BLV a MPMV.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém je uvedený retrovirový vektor založen na vektoru BAG nebo vektoru pLXSN.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém je uvedený retrovirový vektor připraven pLX2B1, jak je popsáno v příkladu 1.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém je uvedený retrovirový vektor připraven pc3/2B1, jak je popsáno v příkladu 2.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém jsou retrovirové sekvence zapojené do integrace retroviru pozměněny nebo alespoň částečně deletovány.

Replikačně-defektivní retrovirový vektor, jak je uveden výše, ve kterém jsou uvedené regulační elementy nebo promotory regulovatelné jednáním molekul.

Linie obalových buněk transfikovaná replikačně-defektivním retrovirovým vektorem, jak je uveden výše; uvedená linie obalové buňky obsahuje alespoň jedno retrovirové nebo

rekombinantní retrovirové vytvořené zakódování pro proteiny, které je třeba pro obalení uvedeného retrovirového vektoru.

Linie obalové buňky, jak je uvedena výše, kdy tato linie obalové buňky je původem z hlodavce, psa, kočky nebo lidská a je histokompatibilní s lidskou tkání.

Linie obalové buňky, jak je uvedena výše, kdy tato linie obalové buňky je zvolena ze skupiny, kterou tvoří psi-2, psi-Crypt, psi-AM, GP+E-86, PA317 a GP+envAM-12.

Rekombinantní retrovirová částice vyprodukovaná kultivací linie obalové buňky, jak je uvedena výše, ve vhodných podmínkách s nepovinně následující izolací produkované rekombinantní retrovirové částice.

Farmaceutická kompozice obsahující rekombinantní retrovirovou částici, jak je uvedena výše, nebo linii obalové buňky, jak je uvedena výše.

Linie obalové buňky, jak je uvedena výše, zapouzdřená v porézní membráně, která je propustná pro rekombinantní retrovirové částice produkované uvedenou linií obalové buňky.

Linie obalové buňky, jak je uvedena výše, zapouzdřená v komplexu, který tvoří sulfát celulózy a polydimethyldiallylamonium.

Způsob ablace buněk nádoru, který spočívá v podávání subjektu, který to potřebuje, terapeuticky účinného množství rekombinantní retrovirové částice, jak je uvedeno výše, linie obalové buňky, jak je uvedena výše, nebo zapouzdřenou linií obalové buňky, jak je uvedeno výše a buď současně nebo s časovým odstupem, rakovinovou prodrogu, kterou je možno aktivovat cytochromem P450.

Způsob, jak je uveden výše, kdy buňky nádoru jsou buňkami nádoru prsu nebo pankreatického nádoru.

Způsob, jak je uveden výše, kde rekombinantní retrovirová částice, linie obalové buňky nebo zapouzdřená linie obalové buňky je podávána injekcí nebo implantací do nádoru nebo místa nádoru.

Použití rekombinantní retrovirové částice, jak je uvedeno výše, linie obalové buňky, jak je uvedeno výše, nebo zapouzdřené linie obalové buňky, jak je uvedeno výše, pro přípravu farmaceutické kompozice užitečné pro ablaci buněk nádoru.

Retrovirový provirus integrovaný v lidském genomu, nesoucím gen s cytochromem P450 pod transkripční kontrolou specifického regulačního elementu nebo promotoru cílové buňky nebo promotoru indukovatelného rentgenovým zářením;

a lidská buňka obsahující gen s cytochromem P450 pod transkripční kontrolou specifického regulačního elementu nebo promotoru cílové buňky nebo promotoru indukovatelného rentgenovým zářením.

Cytochromy P450 tvoří širokou skupinu monooxygenáz, které katalyzují oxidaci širokého množství substrátů. Produkují je některé bakterie, kvasinky a vyšší organizmy tam, kde hrají úlohu při detoxikaci xenobiotik, v bioaktivačních reakcích a metabolismu různých endogenních sloučenin.

Cytochrom P450 katalyzuje hydroxylaci běžně užívaných rakovinových prodrog cyklofosfamidu (CPA) a ifosfamidu na jejich aktivní toxické formy. Normálně je exprese endogenního genu pacienta s cytochromem P450 omezena na játra, a protitumorové účinky systemicky aplikovaných CPA závisí na následné systemické distribuci toxických metabolitů drog z jater. To vedlo k problémům s toxicitou, protože aktivovaná droga ovlivňuje nejen tumor, ale rovněž ovlivňuje jiné normální tkáně pacienta, jako kostní dřeň a ledviny.

Terapeutický přístup, kde se gen s cytochromem P450 selektivně zavádí přímo do buněk nádoru a je v těchto buňkách příliš exprimovaný, by tento problém obešel. Toxické metabolity produkované z transdukovaných buněk nádoru ovlivňují okolní netransdukované buňky nádoru způsobem závislejícím na gradientu koncentrace. Další

výhodou systému cytochrom P-450/CPA je nedostatek závislosti na replikaci buňky pro cytotoxické účinky na okolní buňky. Je tomu tak proto, že jeden z generovaných aktivních metabolitů působí mezi-řetězcové křížové vazby bez ohledu na fázi buněčného cyklu. Později, během syntézy DNA, je důsledkem těchto mezi-řetězcových křížových vazeb odumření buňky.

Retrovirální vektory jsou nejčastěji používané nosiče transferu genů pro klinické pokusy, které byly dosud provedeny. Většina z těchto pokusů však použila přístup ex vivo, kde byly buňky pacienta izolovány, modifikovány v kultuře, a pak pacientovi znovu zavedeny.

Pro léčbu rakoviny by bylo proveditelné izolovat buňky pacienta (buď tumorové buňky nebo normální buňky), infikovat je in vitro rekombinantní retrovirovou částicí nesoucí gen se zakódovaným cytochromem P450, a pak je vrátit do pacienta v blízkosti tumoru. Tento přístup je však neobyčejně náročný na intenzivní práci, protože každá z pacientových buněk se musí izolovat, kultivovat, transdukovat genovou konstrukcí a úspěšně vrátit bez infekce náhodnými činidly. Náklady a čas, které jsou třeba při takovém přístupu, omezují jeho praktickou užitečnost.

Alternativně by bylo možno použít alogenický přístup, kde jeden druh buněk je infikován rekombinantní retrovirovou částicí nesoucí geneticky zakódovaný P450 a pak jej použít pro léčbu mnoha různých pacientů. Takový přístup je mnohem proveditelnější, za předpokladu, že bude možno překonat problémy imunitního odmítnutí. Většina nádorů však není vhodná pro genovou terapii ex vivo.

Ideálně by geneticky zakódovaný cytochrom P450 měl být zaveden in vivo do buněk nádoru nebo do buněk v blízkosti nádoru.

Dodání genů in vivo přináší množství nových problémů. Zaprvé a především je třeba se zabývat úvahami o bezpečnosti.

Hlavní otázkou při eventuální genové terapii in vivo z hlediska bezpečnosti i z čistě praktického hlediska je zacílení exprese. Je jasné, že terapeutické geny nesené vektory by neměly být exprimovány bez rozlišení do všech tkání a buněk, ale spíše jen do potřebné

cílové buňky. Toto je zvláště důležité, když geny, které mají být přeneseny, jsou takové geny aktivující prodrogu, které jsou určeny pro ablaci specifických buněk nádoru. Ať při ablaci či jinak, necílové buňky by byly zřejmě velice nežádoucí.

Základní náhodná integrace provirové formy retrovirového genomu do genomu infikovaných buněk představuje závažný etický problém, protože taková náhodná integrace může vést k aktivaci protoonkogenů, a tak vést k vývoji nové rakoviny. Většina výzkumných pracovníků by s mizivě malou pravděpodobností souhlasila, že replikačně defektivní retrovirus, jako jsou všechny, které se běžně používají, bude integrován do nebo blízko buněčného genu zapojeného v kontrole buněčné proliferace. Obecně se však také předpokládá, že explozivní expanze populace replikace schopných retrovirů z jediného infekčního případu nakonec zajistí dost integračních případů, aby se taková fenotypická integrace stala velice reálnou možností.

Systémy retrovirových vektorů jsou optimalizovány tak, aby minimalizovaly možnost přítomnosti replikace schopného viru. Je však dobře zdokumentováno, že rekombinační případy mezi komponenty systému retrovirových vektorů může vést k tvorbě potenciálně patogenní replikace schopného viru a bylo vytvořeno mnoho generací vektorových systémů, aby se minimalizovalo toto riziko rekombinace (Salmons, B. a Günzburg, W.H. (1993), Human Gene Therapy 4(2): 129-41.

Systémy retrovirových vektorů tvoří dva komponenty:

1) Retrovirový vektor samotný je modifikovaný retrovirus (vektor plasmid), ve kterém je genové zakódování pro virové proteiny nahrazeno terapeutickými geny. Protože náhrada genového zakódování pro virové proteiny účinně mrzačí virus, musí být zachráněn druhým komponentem v systému, který zajišťuje chybějící virové proteiny pro modifikovaný retrovirus.

Druhým komponentem je:

2) Linie buňky, která produkuje velká množství virových proteinů, avšak chybí jí schopnost produkovat replikace schopný virus. Tato linie buňky je známá jako linie

obalové buňky a tvoří ji linie buňky transfikovaná jedním nebo více plazmidy nesoucími geny, které umožňují zapouzdření modifikovaného retrovirového vektoru.

Pro generování rekombinantní retrovirové částice je retrovirový vektor transfikován do linie obalové buňky. Za těchto podmínek je modifikovaný retrovirový genom včetně vsunutého terapeutického genu transkribován z retrovirového vektoru a zapouzdřen do modifikovaných retrovirových částic. Tyto rekombinantní retrovirové částice se pak použijí na infikování nádorových buněk, během čehož vektorový genom a jakýkoliv cytotoxický gen jsou integrovány do DNA cílové buňky. Buňka infikovaná takovou rekombinantní virovou částicí nemůže vyprodukovat nový vektorový virus, protože v těchto buňkách nejsou přítomny žádné virové proteiny ale DNA vektoru nesoucího terapeutikum je integrována do DNA buňky a nyní může být exprimována v infikované buňce.

Již dříve bylo popsáno mnoho systémů retrovirového vektoru, které by měly umožnit cílení přenášených cytotoxických genů (Salmons, B. a Günzburg, W.H. (1993), *Human Gene Therapy* 4(2): 129-41). Většina z těchto přístupů zahrnuje buď omezení infekčního případu na předem definované typy buněk nebo použití heterologních promotorů pro nasměrování exprese spojených heterologních terapeutických genů do specifických typů nádorových buněk. Používají se takové heterologní promotory, které by měly řídit expresi spojených genů pouze do těch typů buněk, ve kterých je tento promotor normálně aktivní anebo dodatečně kontrolovatelný. Tyto promotory byly dříve vsunuty spolu s terapeutickým genem do těla retrovirových vektorů, na místo genů *gag*, *pol* nebo *env*.

Retrovirová dlouhá koncová perioda (LTR), která lemuje tyto geny, nese retrovirový promotor, který je obecně nespecifický v tom smyslu, že může pohánět expresi v mnoha různých typech buněk (Majors, J. (1990). v "Retroviruses - Strategies of replication (Swanstrom, R. a Vogt, P.K., Eds.): Springer-Verlag, Berlin: 49-92). Byla popsána interference promotorů mezi LTR promotorem a heterologními interními promotory, jako jsou specifické promotory tkáně popsané výše. Kromě toho je známo, že retrovirové LTR obsahují silné posilovače, které mohou nezávisle nebo ve spojení s retrovirovým promotorem ovlivnit expresi buněčných genů blízko místa integrace retroviru. Ukázalo se, že tento mechanismus přispívá k tumorigenicitě u zvířat (van Lohuizen, M. a Berns, A. (1990), *Biochim.Biophys.Acta* 1032: 213-235). Tato dvě pozorování podpořila vývoj

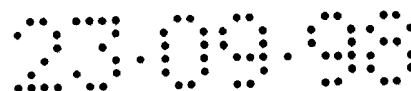
autoinaktivujících vektorů (SIN), ve kterých jsou retrovirové promotory funkčně inaktivovány v cílové buňce (WO 94/29437). Mezi další modifikace těchto vektorů patří vsunutí kazet s promotorovým genem do oblasti LTR pro vytvoření dvojitých kopií vektorů (WO 89/11539). V obou těchto vektorech však jsou heterologní promotory vsunuté do těla vektoru nebo do oblasti LTR přímo spojeny s terapeutickým genem.

Výše popsaný SIN vektor, který nese deletovaný 3'LTR (WO 94/29437), využívá kromě toho heterologní promotor jako promotoru Cytomegalovirus (CMV), místo retrovirového promotoru 5'LTR (U3-volný 5'LTR) pro pohon exprese konstrukce vektoru v linii obalové buňky. Ve 3'LTR je také zahrnut heterologní polyadenylační signál (WO 94/29437).

Cílem tohoto vynálezu je stavba bezpečného retrovirového vektoru, který obsahuje gen s cytochromem P450 jako terapeutický princip. Tento nový vektor nese heterologní konstitutivní, indukovatelný nebo pro tkáň specifický promotor anebo regulační element ve 3'LTR, který se po infekci zdvojí a je translokován do 5'LTR v cílové buňce. V infikované buňce tak zavedený promotor kontroluje expresi genu s cytochromem P450, který je vsunut do těla vektoru. Tento vektor neprochází autoinaktivací - ale místo toho je změna promotoru, kdy vzniká název ProCon vektor pro konverzní vektory promotoru. Principy a výhody systému ProCon jsou podrobněji popsány ve WO 9607748.

Protože výsledkem konverze promotoru není autoinaktivace, retrovirový vektor bude transkripčně aktivní v cílové buňce. Kromě toho oba LTR se budou z větší části skládat ze sekvencí heterologní promotor/posilovač v cílové buňce. To sníží pravděpodobnost toho, aby integrovaný vektor v cílové buňce byl vystaven stejné inaktivaci po dlouhá období, jak bylo popsáno u konvenčních vektorů (Xu, L., Yee, J.K. a kol., (1989), Virology 171: 331-341) a rovněž sníží možnost rekombinace s endogenními retrovirovými sekvencemi a vznik potenciálně patogenního replikace schopného viru, a tak zvýší bezpečnost systému.

Podle vynálezu není 5'LTR konstrukce retrovirového vektoru modifikována a exprese virového vektoru v obalových buňkách je poháněna normálním retrovirovým promotorem U3. Normální retrovirová polyadenylace je povolena a ve 3'LTR nejsou obsaženy žádné heterologní polyadenylační signály. To je důležité pro rozvoj strategií genové terapie in



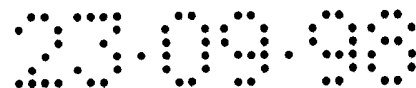
vivo, protože normální fyziologická regulace viru prostřednictvím normálního virového promotoru, a zahrnující eventuálně také normální virovou kontrolu polyadenylace, bude po dlouhá období převažovat *in vivo*, zatímco obalové buňky budou produkovat rekombinantní virus.

Pro dosažení předcházejícího a dalších cílů vynález poskytuje retrovirový vektor, který prochází konverzí promotoru zahrnující region 5'LTR struktury U3-R-U5; jednu nebo více kódovacích sekvencí zvolených ze skupiny genů známých jako geny s cytochromem P450; a oblast 3'LTR obsahující zcela nebo částečně deletovanou oblast U3, kde uvedená deletovaná oblast U3 je nahrazena heterologním promotorem, následovaným R a U5 oblastí.

Uvedený promotor může být konstitutivní jako Cytomegalovirus (CMV), přímý prvotní promotor/posilovač, indukovatelný jako glukokortikoidní hormony (např. promotor MMTV) nebo specifické pro cílovou buňku.

Specifické regulační elementy a promotory pro cílovou buňku jsou voleny z jednoho nebo více elementů jakéhokoliv genu, ale v této konkrétní formě mohou být z promotorů, které zahrnují regulační elementy a promotory karbonátdehydratázy II a beta-glukokinázy, regulační elementy a promotory specifické pro lymfocyty včetně regulačních elementů a promotorů karbonátdehydratázy II a β -glukokinázy, regulační elementy a promotory specifické pro lymfocyty z acidických proteinů syrovátky (WAP), myší virus nádoru prsu (MMTV), regulační elementy a promotory specifické pro β -laktoglobulin a kasein, regulační elementy a promotory specifické pro pankreas včetně lymfocytických regulačních elementů a promotorů specifických pro imunoglobulin a MMTV a promotory a regulační elementy specifické pro MMTV a promotory přenášející responsivitu na glukokortikoidní hormony či směřující expresi do prsní žlázy. Mezi jiné promotory patří například CD4, CD34 a promotory IL2. Uvedené regulační elementy a promotory regulují nejlépe expresi uvedeného retrovirového vektoru.

Zdá se, že oblast promotoru WAP, který je nutný pro zprostředkování specifičnosti prsní žlázy, je restriční fragment 320 bp XhoI/XbaI (-413 až -93) (Kolb, A.F., Günzburg, W.H., Albang, R., Brem, G., Erfle, V., a Salmons, B. (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*



217, 1045-1052). Určité experimenty kromě toho naznačují, že fragment promotoru 0.6 Kb PstI MMTV (Salmons, B., Groner, B., Calberg Baca, C.M., a Ponta, H. (1985), *Virology* 144: 101-114) může hrát úlohu při regulaci specifčnosti exprese prsní žlázy vykazovanou MMTV (Kolb, A.F., Günzburg, W.H., Albang, R., Brem, G., Erfle, V., a Salmons, B. (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1045-1052).

Oblasti LTR se volí alespoň z jednoho elementu skupiny, kterou tvoří LTR viru myší leukémie (MLV), myší virus nádoru prsu (MMTV), myší virus sarkomu (MSV), opičí virus imunodeficiency (SIV), lidský virus imunodeficiency (HIV), lidský virus leukémie T-buňky (HTLV), kočičí virus imunodeficiency (FIV), kočičí virus leukémie (FELV), hovězí virus leukémie (BLV) a virus opice Mason-Pfizer (MPMV).

Retrovirový vektor je s výhodou založen na vektoru LXS_N (Miller, A.D. a Rosman, G.J. (1989), *Biotechniques* 7:980-990), pBAG (Price, J., Turner, D. a kol, (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 156-160) nebo hybridu obou.

Kódovaná sekvence terapeutického genu může být gen s cytochromem P450, ale s výhodou je to krysí cytochrom P450 forma 2B1, kterou definovali Fuji-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., a kol., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2793-2797.

V další konkrétní formě vynálezu je zajištěn systém retrovirového vektoru, který tvoří retrovirový vektor, jak byl popsán výše, jako první komponent a linie obalové buňky obsahující alespoň jednu retrovirovou nebo rekombinantně retrovirovou zakódovanou konstrukci pro proteiny, která je nutná pro zapouzdření uvedeného retrovirového vektoru.

Linie obalové buňky je s výhodou zvolena z elementu skupiny, kterou tvoří Ψ -2, Ψ -Crypt, Ψ -AM, GP+E-86, PA317 a GP+envAM-12, nebo kterákoliv z těchto konstrukcí supertransfikovaná rekombinantem, což umožňuje expresi povrchových proteinů z jiných zapouzdřených virů.

Vynález rovněž zahrnuje mRNA vyplývající z retrovirového vektoru podle vynálezu.

V linii obalové buňky je exprese retrovirového vektoru regulována normálním neselektivním retrovirovým promotorem obsaženým v oblasti U3. Jakmile však vektor vstoupí do cílové buňky, dojde ke konverzi promotoru a gen P450 je exprimován z výběrového promotoru specifického pro tkáň nebo indukovatelného, vsunutého do vektoru ProCon. Nejen že jakýkoliv promotor specifický pro tkáň je možno do systému zahrnout, čímž umožňuje selektivní zacílení širokého množství různých typů buněk, ale kromě toho po konverzi již struktura a vlastnosti retrovirového vektoru nepřipomínají strukturu a vlastnosti viru. To má samozřejmě neobyčejně významné důsledky z hlediska bezpečnosti.

Tyto vektorové systémy budou použity pro generování rekombinantního viru, který je možno použít pro infikování nádorových nebo normálních buněk in vitro nebo in vivo.

Rekombinantní retroviry, které byly purifikovány nebo koncentrovány, je možno uchovat přidáním nejdříve dostatečného množství formulačního pufru do média obsahujícího rekombinantní retrovirus, aby se vytvořila vodná suspenze. Formulační pufr je vodný roztok, který obsahuje sacharid, strukturální aditivum s vysokou molekulovou hmotností a pufrovací komponentu ve vodě. Vodný roztok může také obsahovat jednu nebo více aminokyselin.

Rekombinantní retrovirus je také možno uchovat v purifikované formě. Konkrétněji, před přidáním formulačního pufru může být výše popsán surový rekombinantní retrovirus vyčištěn přes filtr, a poté se zkoncentruje, jako systémem koncentrace s příčným tokem (Filtron Technology Corp., Northborough, MA). V rámci jedné konkrétní formy se přidá DNáza do koncentráту, aby byla digerována exogenní DNA. Výluh se pak diafiltruje, aby se odstranily nadbytečné komponenty média a vytvořil se rekombinantní retrovirus ve vhodnějším pufrovaném roztoku. Diafiltrát se pak vede přes gelovou kolonu Sephadex S-500 a vymývá se purifikovaný rekombinantní retrovirus. K tomuto eluátu se přidá dostatečné množství formulačního pufru, aby bylo dosaženo požadované finální koncentrace konstituentů a aby se rekombinantní retrovirus minimálně zředil a vodná suspenze se pak skladuje, nejlépe při -70°C nebo okamžitě vysušená. Jak bylo uvedeno výše, formulační pufr je vodný roztok, který obsahuje sacharid, strukturální aditivum s vysokou molekulární hmotností a pufrovací komponentu ve vodě. Tento vodný roztok může také obsahovat jednu nebo více aminokyselin.

Surový rekombinantní retrovirus je také možno purifikovat chromatografií v ionexové koloně. Obecně se surový rekombinantní retrovirus čistí přes filtr a filtrát se založí do kolony, která obsahuje vysoce sulfonovanou celulóзовou matici. Rekombinantní retrovirus se vymývá z kolony v purifikované formě při použití vysoce solného pufru. Vysoce solný pufr se pak nahradí vhodnějším pufrem tak, že eluát se vede přes kolonu molekulárního vylučování. Poté se přidá dostatečné množství formulačního pufru, jak je uvedeno výše, do purifikovaného rekombinantního retroviru, a pak se vodná suspenze buď okamžitě vysuší nebo skladuje, nejlépe při -70°C .

Vodnou suspenzi v surové nebo purifikované formě je možno vysušit lyofilizací nebo odpařováním při teplotě místnosti. Konkrétně, lyofilizace zahrnuje kroky ochlazení vodné suspenze pod teplotu skelného přechodu nebo pod teplotu eutektického bodu vodné suspenze a odstranění vody z ochlazené suspenze sublimací, takže se vytvoří lyofilizovaný retrovirus. Když je rekombinantní retrovirus lyofilizován, je stabilní a může být skladován při teplotě 20°C až 25°C , jak je podrobněji uvedeno dále.

Při metodě odpařování se voda odstraní z vodné suspenze při teplotě místnosti odpařováním. Vodu je také možno odstranit rozprašovacím sušením.

Vodné roztoky, které se používají pro formulaci, jak bylo popsáno výše, se skládají ze sacharidu, strukturálního aditiva s vysokou molekulovou hmotností, pufrovacího komponentu a vody. Roztok může také obsahovat jednu nebo více aminokyselin. Kombinace těchto komponentů funguje tak, aby zachovala aktivitu rekombinantního retroviru při zmrazení a lyofilizaci nebo sušení pomocí odpařování.

Strukturální aditivum s vysokou molekulovou hmotností pomáhá zabránit agregaci viru během zmrazování a zajišťuje strukturální podporu v lyofilizovaném nebo sušeném stavu. V kontextu tohoto vynálezu se pokládají strukturální aditiva za strukturální aditiva "s vysokou molekulovou hmotností", jestliže jsou větší, než 5000 m.h. Nejlepším strukturálním aditivem s vysokou molekulární hmotností je lidský sérový albumin. Aminokyseliny, jestliže jsou přítomny, fungují tak, aby dále zachovaly infektivitu viru při ochlazení a rozmrazování vodné suspenze. Kromě toho fungují aminokyseliny tak, aby se

dále zachovala infektivita viru během sublimace ochlazené vodné suspenze a když je v lyofilizovaném stavu.

Pufrovací komponent funguje tak, aby pufroval roztok tím, že zachová relativně konstantní pH. Je možno použít různé pufry v závislosti na požadovaném rozsahu pH, nejlépe mezi 7.0 a 7.8.

Vodné roztoky pro vytvoření rekombinantních retrovirů jsou podrobně popsány ve WO-A2-96121014.

Kromě toho, je lepší, aby vodný roztok obsahoval neutrální sůl, která se používá na úpravu finálně vytvořeného rekombinantního retroviru na příslušnou izoosmotickou koncentraci soli.

Lyofilizované nebo dehydrované retroviry je možno rekonstituovat za použití různých substancí, ale nejlépe se rekonstituuji při použití vody. V určitých případech je možno také použít zředěné slané roztoky, které dovedou finální formulaci k izotonicitě. Kromě toho, může být výhodné použít vodné roztoky obsahující komponenty, o kterých je známo, že podporují aktivity rekonstituovaného retroviru. Mezi takové komponenty patří cytokinázy, jako IL-2, polykationty, jako protaminsulfát nebo jiné komponenty, které podporují transdukční účinnost rekonstituovaného retroviru. Lyofilizovaný nebo dehydrovaný rekombinantní retrovirus může být rekonstituován jakýmkoliv vhodným množstvím vody nebo rekonstitučních činidel, která umožňují podstatnou a raději úplnou solubilizaci lyofilizovaného nebo dehydrovaného vzorku.

Rekombinantní retrovirové částice mohou být podávány do širokého množství míst, včetně například takových míst, jako je orgán nebo místo nádoru. V jiných konkrétních formách může být rekombinantní retrovirus podáván orálně, intravenózně, bukálně/sublingválně, intraperitoneálně nebo podkožně. Denní dávkování závisí na přesném způsobu podávání, formě, v níž se podává, indikaci, proti které je podávání zaměřeno, daném subjektu a tělesné váze daného subjektu, a dále na preferenci a zkušenostech pověřeného lékaře.

Způsoby podávání zde popsané je možno uskutečnit prostě přímým podáním za použití jehly, katetru nebo souvisejícího zařízení. Konkrétně, u určitých konkrétních forem vynálezu, je možno přímo podat jednu nebo více dávek.

V jedné konkrétní formě vynálezu budou obalové buňky uzavřeny v pouzdrech. Pro účinnou léčbu musejí buňky produkující virus přežít dlouhá období v cílovém orgánu po implantaci a virus musí být během těchto období produkován a uvolňován z obalových buněk. Tím by svým účinkem obalové buňky, které produkují virus, představovaly malou továrnu na výrobu viru, umístěnou na místě aplikace. To umožní účinnou dodávku rekombinantního viru *in vivo*. Jinak infikované normální buňky, lidského původu nebo buňky původem z jiných druhů, budou zapouzdřeny a implantovány, a tak vytvoří malou továrnu na konverzi prodrogy, kterou je možno umístit blízko nebo do hmoty nádoru.

Dlouhodobá účinnost tohoto přístupu závisí na (1) ochraně buněk z hostitelského imunitního systému, který by normálně eliminoval buňky produkující virus nebo infikované buňky, zvláště jestliže tyto buňky jsou z různých druhů, jak tomu obvykle je v případě buněk produkujících retrovirový vektor a na (2) přežití buněk *in situ* po dlouhá období, což může vyžadovat vaskularizaci.

Bylo zjištěno, že neustálé produkce vektorového viru z implantovaných obalových buněk je možno dosáhnout příslušným zapouzdřením obalových buněk produkujících virus před implantací, v mikrokapslích s polopropustnými membránami. Kromě toho bylo zjištěno, že taková pouzdra se v hostiteli dobře naroubují, dojde u nich k vaskularizaci a nevyvolávají imunitní nebo zánětlivou reakci hostitele. Tato zjištění, spolu s polopropustností membrány pouzder, umožňuje dlouhodobou dodávku retrovirálního vektoru *in vivo*.

Byla vyvinuta technologie zapouzdření zajišťující zapouzdření obalových buněk produkujících virus a buněk infikovaných virem nebo normálních buněk v materiálu na základě celulózy. Při použití této techniky se zapouzdří až 10^{10} , ale spíše 10^5 - 10^7 buněk v komplexu elektrolytu (např. z alginátu a polylyzinu nebo raději sulfátu celulózy a polydimethyl-diallylamonium chloridu) nebo v jiných pórézních strukturách (jako polyamidy, polysulfony). Výsledná pouzdra mohou mít různý průměr mezi 0,01 a 5 mm, ale s výhodou 0,1 a 1 mm. Je tedy možno vyrobit pouzdra, která budou obsahovat různé

množství buněk. Pouzdro je polopropustné s póry, které jsou dostatečně velké, aby umožňovaly virům nebo molekulám prodrog prostupovat, ale dostatečně malé, aby chránily buňky imunitního systému před přístupováním buněk, čímž významně snižuje imunitní reakci na tyto buňky. Pouzdra a zapouzdrované buňky se kultivují v kulturním médiu normální buňky (jeho povaha závisí na linii zapouzdrované buňky) při standardních podmínkách vlhkosti, teploty a koncentrace CO_2 .

Po vhodné době v kultuře (normálně ne méně než 1 hodinu a ne více než 30 dní), může být buňka obsahující pouzdra chirurgicky implantovaná do různých oblastí buď přímo nebo injekcí za použití injekční stříkačky.

V různé době po implantaci zapouzdrovaných buněk může být hostitel léčen cyklofosfamidem nebo ifosfamidem lokálně nebo systemicky. Buňky infikované virem exprimujícím cytochrom P450 změny tyto prodrogy na aktivní metabolity, které působí alkylaci a příčnou vazbu DNA. Rovněž buňky nesoucí a exprimující gen s cytochromem P450 (jako zapouzdrované infikované buňky nebo zapouzdrované obalové buňky) budou také katalyzátorem této konverze. V jedné konkrétní formě tohoto vynálezu tyto zapouzdrované infikované nebo obalové buňky budou buď pomalu se dělící buňky nebo buňky, které byly ošetřeny mitomycinem C, nízkými dávkami záření nebo jinými prostředky, které zabrání replikaci buněk, a tak zabrání tomu, aby buňky samy byly ovlivněny cytotoxickými účinky prodrog.

Následující příklady budou tento vynález dále ilustrovat. Tyto příklady však v žádném případě nejsou míněny tak, aby omezovaly rozsah tohoto vynálezu, protože zřejmé modifikace budou patrné pro kohokoliv, kdo je zručný v této technice.

Příklad 1

Tento příklad popisuje stavbu retrovirového vektoru exprese pro intratumorální infekci, který obsahuje gen pro krysí cytochrom P450 2B1.

Vektor exprese pLX2B1, znázorněný na obrázku 1, byl konstruován podvázáním fragmentů získaných z plazmidu pLX125 a pSW1 (Kedzie, K.M., Escobar, G.Y., Grimm,



S.W., He, Y.A., Pepperl, D.J., Regan, J.W., Stevens, J.C., a Halpert, J.R. (1991), J. Biol. Chem. 266(33): 2215-2). pLX125 byl připraven, jak je popsáno v PCT/EP96/ 04447).

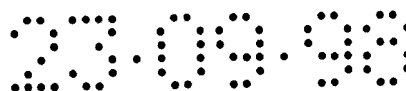
Plazmid pLX125 byl linearizován s HpaI a výsledné tupé konce defosforylovány při použití telecí střevní fosfatázy. DNA byla purifikována separací na 1% gelové agarose, excize a příprava používala protokol Qiaquick (Qiagen). Po precipitaci ethanolem byla DNA znovu suspendována ve vodě.

Klonovací vektor pSW1 byl štěpen pomocí SmaI a HincII, aby vznikly dva fragmenty s tupými konci. Směs výluhu byla separována na 1% gelové agarose. Nejkratší fragment (1,5kb), který obsahoval krysí cytochrom P450 2B1 cDNA (Fuji-Kuriyama, Y., Mizukami, Y. a kol. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2793-2797) byl excidován a elutován za použití protokolu Qiaquick extrakce DNA, ethanolem precipitován a znovu suspendován ve vodě.

7,6 fMol pLX125 a 24 fMol fragmentu SmaI/HindII z pSW1 byly smíchány a podvázány 3 dny při 12°C za použití T4-ligázy (Boehringer). Ligáza byla inaktivována při 65°C po dobu 10 min. a DNA precipitována 10 násobným objemem butanolu. Precipitovaná DNA byla znovu suspendována ve vodě a elektroforována do bakterie DH10B (Gibco). Byly vybrány kolonie resistantní na ampicilin, připravena DNA a zkušebně štěpena se SspBI/SaII, BamHI/SspBI, PvuI a BamHI. Konečný správný plasmid byl označen pLX2B1 (viz Obr.1).

Lipofekce

Jeden den před lipofekcí bylo nasazeno 3×10^6 retrovirových obalových buněk PA317 (Miller, A.D. a Buttimore, C. (1986), Mol. Cell. Biol. 6: 2895-2902) do 10 cm petriho nebo kultivačních misek. V den infekce byly 4 µg pLX2B1 smíchány se 300µl média bez séra. Souběžně bylo 45µl Lipofectaminu (Gibco BRL) smícháno se 300µl média bez séra. Roztok obsahující plasmid byl přidán ke směsi Lipofectaminu a inkubován po dobu 45 min. Po 35 min. byly buňky jednou promyty 6 ml média bez séra. 2,4 média bez séra bylo přidáno ke směsi lipofekce a výsledný 1 ml byl vložen na připravené buňky. Po 5 hodinách byly přidány 3,5 ml Dulbeccova modifikovaného Eagles média s obsahem 20% FCS. Příštího dne byly buňky vystaveny trypsinu a rozředěny v poměru 1:20 a nasazeny na



100 mm miskou. Po 24 hodinách byla média nahrazena médiem obsahujícím analog neomycinu G418. Populace buněk byly izolovány a analyzovány pro expresi cytochromu P450.

Supernatant z těchto populací buněk byl použit pro infikování cílových buněk CK. 1 ml supernatantu obsahujícího virus z 5×10^6 buněk byl přefiltrován přes filtr $0,45 \mu\text{m}$ a přidán do 1×10^6 cílových CK buněk za přítomnosti $8 \mu\text{g/ml}$ polybrenu. Po 4 hodinách byl přidán ml Dulbecco modifikovaného Eagles média s 10% fetálního telecího séra. Příští den byly buňky vystaveny trypsinu, zředěny a o 24 hodin později vloženy do selekčního média obsahujícího dalších $400 \mu\text{g/ml}$ G418. Po 2 týdnech byly izolovány kolonie resistantní na G418 a testovány na aktivitu cytochromu P450. 2×10^4 buněk bylo rozprostřeno na 3 cm miskou a vystaveno koncentraci ifosfamidů měnícího se mezi 0 a 5 mM. Byla pozorována vyšší senzitivita buněk infikovaných retrovirem s cytochromem P450 2B1 ve srovnání s kontrolními, neinfikovanými buňkami.

Zapouzďení

Získané obalové buňky produkující retrovirový vektor jsou zapouzďeny, jak je popsáno v příkladu 2 ve WO 97/01357.

Implantace

Získaná pouzdra jsou zavedena chirurgickým zákrokem "klíčovou dírkou" blízko nebo do transplantovaných nebo spontánních nádorů BALB/c nebo GR myši. Asi šest pouzder o průměru 1 mm je vloženo na každém místě operace. Místo po chirurgickém zákroku je uzavřeno 1 suturou. Myši jsou pak léčeny cyklofosfamidem nebo ifosfamidem lokálně, přímou intratumorální injekcí $100 \mu\text{l}$ 20mg/ml nebo systemickými koncentracemi 130 mg CPA/kg tělesné váhy i.p. a $40\text{--}60 \text{ mg IFO/kg}$ tělesné váhy i.p. po dobu maximálně 10 týdnů. Během této doby se denně monitoruje velikost nádoru a makroskopický vzhled. Myši jsou pak obětovány, tkáň obsahující vsunutá pouzdra a tumor vyjmuta, a připraveny histologické řezy pro světelnou a elektronovou mikroskopii. Tyto řezy jasně ukazují dobré naroubování pouzder, vaskularizaci a žádné důkazy přítomnosti lymfocytů, které by indikovaly buněčnou imunitní reakci. Tyto řezy také nevykazují žádné známky odumření

buněk nebo nekrózy v rámci pouzdra. Naopak tumor vykazoval nekrózu a makroskopicky bylo za testované období jasné zmenšení velikosti.

Příklad 2

Tento příklad popisuje stavbu stabilní buněčné linie, která exprimuje konstitutivně krysí cytochrom P450 2B1.

Vektor exprese pc3/2B1 byl vytvořen podvázáním fragmentů získaných z plasmidu pcDNA3 (Invitrogen) a pSW1 (Kedzie, K.M., Escobar, G.Y., Grimm, S.W., He, Y.A., Pepperl, D.J., Regan, J.W., Stevens, J.C., a Halpert, J.R. (1991), J. Biol. Chem. 266(33): 2215-21).

Plasmid pcDNA3 byl štěpen pomocí XhoI/XbaI a výsledné fragmenty s lepivými konci byly defosforylovány za použití telecí střevní fosfatázy. DNA páteře vektoru byla purifikována separací na 1% gelové agarose, excize a příprava používala protokol Qiaquick (Qiagen). Po precipitaci ethanolem byla DNA znovu suspendována ve vodě.

Klonovací vektor pSW1 byl štěpen pomocí XhoI a XbaI, aby vznikly dva fragmenty. Směs výluhu byla separována na 1% gelové agarose. Nejkratší fragment (1,5kb) obsahující cDNA krysího cytochromu P450 2B1 (Fuji-Kuriyama, Y., Mizukami, Y. a kol., (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2793-2797) byl excidován a elutován za použití Qiaquick protokolu extrakce DNA, precipitován ethanolem a znovu suspendován ve vodě.

8,3 fMol páteře pcDNA3 a 24,8 fMol fragmentu XhoI/XbaI z pSW1 byly smíchány dohromady a podvázány na 1 den při 12°C při použití T4-ligázy (Boehringer). Ligáza byla inaktivovaná při 65°C po dobu 10 min. a DNA precipitovaná butanolem s 10 násobným objemem butanolu. Precipitovaná DNA byla znovu suspendována ve vodě a elektorforována do bakterie DH10B (Gibco). Byly vybrány kolonie resistantní na ampicilin, připravena DNA a zkušebně štěpena pomocí EcoRI, BamHI, EcoRV a XhoI. Finální správný plasmid byl označen pc3/2B1.

Lipofekce

Před dnem transfekce bylo 3×10^6 buněk z kočičí ledviny nasazeno do 100 mm misek. V den transfekce byly 4 μg pc3/2B1 smíchány se 100 μl média bez séra. Zároveň bylo smícháno 15 μl Lipofectaminu se 100 μl média bez séra. Roztok obsahující plasmid byl přidán ke směsi Lipofectaminu a inkubován po dobu 45 min. Po 35 min. byly buňky jednou promyty 2ml média bez séra. 800 μl média bez séra bylo přidáno ke směsi lipofekce a výsledný 1 ml byl dán na připravené buňky. Po 6 hodinách byl přidán 1ml DMEM (Glutamax) s 10% FCS. Příští den se na buňky působilo trypsinem a byly zředěny faktorem deset a nasazeny na 100 mm misku. Po 24 hodinách bylo médium nahrazeno neomycinovým médiem. Po 14 dnech byly izolovány klony resistantní na neomycin a testovány na přítomnost a aktivitu vektoru.

Buňky kočičí ledviny exprimující cytochrom P450 vykazovaly desetinásobně vyšší citlivost na ifosfamid nebo cyklofosfamid ve srovnání s buňkami standardního typu.

Vedlejší účinek bylo možno demonstrovat na normálním typu buněk kočičí ledviny, ale také na buňkách Rin5 derivovaných na pankreatickém nádoru. To bylo ukázáno společnou kultivací klonů buněk kočičí ledviny P450 2B1 buď s neprodukujícími buňkami kočičí ledviny normálního typu nebo buňkami Rin5 derivovanými z krysího pankreatického nádoru a přidáním ifosfamidu. Neprodukující CK a Rin buňky jsou zahubeny toxickými metabolity ifosfamidu, které jsou produkovány a uvolňovány buňkami kočičí ledviny s cytochromem P450 2B1. Titrační studie za použití klonů jedné buňky kočičí ledviny s cytochromem P450 2B1 vykazovaly, že pouhých 0,25mM ifosfamidu má specifické toxické účinky na tyto buňky a výsledkem 1-2 mM je odumření všech buněk. Klony buňky kočičí ledviny s cytochromem P450 2B1 byly vykážány analýzou řetězové reakce polymerázy, která získala genovou konstrukci DNA P450 2B1. Další biochemická analýza klonů za použití enzymatické dealkylace 7-pentoxyresorufinu cytochromem P450 2B1 odhalila, že geneticky modifikované buňky produkují cytochrom P450 2B1.

Pouzdra obsahující tyto buňky byly vyrobeny jak je uvedeno v příkladu 1 a implantovány do myši blízko místa nádoru. Po léčbě cyklofosfamidem nebo ifosfamidem byla hodnocena účinnost léčby, jak je popsáno výše.

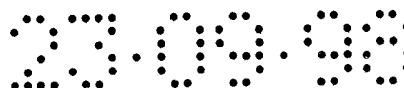
Retrovirový vektor exprese, který obsahuje genově zakódovaný krysí cytochrom P450-2B1, může být také připraven, jak je dále popsáno v příkladě 4.

Příklad 3

Plasmid pLX125 byl nejdříve částečně štěpen restrikním enzymem XhoI, aby vznikl vektor, který je linearizovaný na pozici 3547. Tento lineární plasmid byl dále štěpen restrikním enzymem SspBI, aby se odstranil krátký fragment ve vícevazebném pLX125. V preparativním gelu se ukázalo, že správně odříznutý fragment vektoru je největším pásem. Při použití protokolu Quiaex (Qiagen) byla DNA v tomto pásu elutovaná a purifikovaná z gelu.

Pro získání krysího genu s cytochromem P450 2B1, byly buňky z linie buněk kryšího hepatomu HTC podrobeny lýzi s roztokem D (4M guanidium thiokyanátu, 25mM citrátu sodného pH 7, 0,5% N-natrium-laurylsarkosinu, 0,1M 2-merkptoethanolu) a celková RNA byla extrahována přidáním 1/15 objemu 3M octanu sodného, přidány byly při stejném objemu vody saturovaný fenol a 1/5 objemu chloroform/izoamylalkoholu (49:1) a celá směs silně míchána. Po 15 min. na ledu byl extrakt odstředován 20 min. při 4°C při 10.000g. RNA ve vodné fázi byla precipitována s jedním objemem izopropanolu po dobu 30 min. při -20°C a odstředována při 10.000g při 4°C. Peleta byla promyta v 70% ethanolu a ponechána při teplotě místnosti po dobu 15 min. Po 5 min. odstředování při 4°C a 10.000g byla peleta sušena ve vakuové sušičce a znovu rozpuštěna v 0,5% roztoku SDS.

Extrahovaná RNA byla reverzně transkribována při použití protokolu pro syntézu cDNA (Pharmacia). Výsledná cDNA byla použita jako matrice pro PCR. Primery byly navrženy tak, aby obsahovaly SspBI restrikní místo (podtržené) v levém primeru (5'-AAGCCTGTACTACTGGAGAGCATGCAC-3') a celé místo XhoI (podtržené) v pravém primeru (5'-CGATTACTCGAGACCTGGCTGCCTCA-3'). Oba primery mají dodatečné báze na 5'-konci pro vyšší účinnost štěpení odpovídajícím restrikním enzymem. 1562 bp produkt byl štěpen pomocí XhoI a SspBI, aby se získaly tři fragmenty.



Tento nejdelší fragment (1545 bp), obsahující gen pro cytochrom P450, byl podvázán do XhoI/SspBI štěpeného plasmidu pLX125.

Stabilní linie buněk, která exprimuje krysí cytochrom P450 formu 2B1 konstitutivně, může být také připravena jak je dále popsáno v příkladu 5.

Příklad 4

Pro získání mRNA z krysího cytochromu P450 forma 2B1 byla obětována čtyři týdny stará samice krysy, játra byla vyjmuta a okamžitě zmrazena v kapalném dusíku. Zmrazená játra byla vložena do sterilizovaného filtrovaného GTC-pufu (6M guanidium izothiokyanát, 5mM citrát sodný, 0,1M 2-merkaptoethanol, 0,5% N-natrium-laurylsarkosin) a homogenizovaná při teplotě místnosti. Pro separaci RNA byl extrakt z jater dán na polštář chloridu cesného (5,7M chlorid cesný, 0,1M EDTA) a odstředěn ve sklopném rotoru při 20°C a 32.000 ot/min. přes noc. Po úplném odstranění supernatantu byla peletovaná RNA znovu rozpuštěna v ledově studeném 10mM Tris pH 7,5 a precipitována přes noc při -20°C s 1/15 objemu 3M octanu sodného a 2,5 objemu ethanolu. RNA byla odstředována ke dnu 40 min. při 8000 ot/min. a 4°C a vysušená peleta znovu suspendována ve sterilní vodě.

Extrahovaná RNA byla reverzně transkribovaná za použití protokolu pro syntézu cDNA (Pharmacia). Výsledná cDNA byla použita jako matrice pro následující PCR. Primer byl navržen tak, aby obsahoval restrikční místo EcoRI v levém primeru (5'-CGTGCGGAATTCGGCGGATTCAGCAT-3') a restrikční místo AcoRVI v pravém primeru (5'-ATAACGGATATCACCTGGCTGCCTCA-3'). Oba primery měly dodatečné báze na 5'konci pro vyšší účinnost štěpného enzymu. 1588 bp-amplifikátor byl štěpen s EcoRI a AcoRV, aby se získali tři fragmenty.

Tento nejdelší fragment (1572 bp), obsahující gen pro cytochrom P450 2B1, byl podvázán do EcoRI/EcoRV štěpeného plasmidu pcDNA3 (Innvitrogen).

Příklad 5

Stavba ProCon vektoru obsahujícího gen krysího cytochromu P450 pod transkripční kontrolou WAP promotoru.

Extrahovaná RNA připravená podle příkladu 4 byla reverzně transkribovaná za použití protokolu pro syntézu cDNA (Pharmacia). Výsledná cDNA je použita jako matrice (templát) pro PCR. Primery byly navrženy tak, aby obsahovaly restriční místo BamHI (podtrženo) v levém primeru např.

5'-AAGCCGGATCCCTGGAGAGCATGCAC-3') a BamHI místo (podtrženo) v pravém primeru (např. 5'-CGATTAGGATCCCTGCCTCA-3'). Oba primery mají dodatečné báze na 5'-konci pro vyšší účinnost štěpení odpovídajícím restričním enzymem. 1562 bp produkt je štěpen pomocí BamHI a získaný fragment obsahující gen pro cytochrom P450 je podvázán do BamHI štěpeného plasmidu pWAP6 (viz přihláška PCT č. PCT/EP96/03922).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Cytochrom P450 transdukující retrovirové vektory s pouzdrém, v němž je zapouzdřená buňka produkující cytochrom P450, přičemž uvedené pouzdro obsahuje porézní membránu, která je prostupná pro cytochrom P450 produkovaný uvedenou buňkou.
2. Pouzdro podle nároku 1, vyznačené tím, že se materiál pouzdra sestává z komplexu vytvořeného ze sulfátu celulózy a polydimethyldiallylamonia.
3. Pouzdro podle nároku 1 nebo 2, vyznačené tím, že uvedená buňka produkující cytochrom P450 obsahuje vektor připravený jak je popsáno v Příkladu 2.
4. Pouzdro podle nároku 1 nebo 2, kde buňka produkující cytochrom P450 je linií obalové buňky obsahující retrovirový vektor nesoucí gen s cytochromem P450, uvedená linie obalové buňky má v sobě alespoň jednu konstrukci retroviru nebo rekombinantního retroviru se zakódováním pro proteiny pro zmíněny retrovirový vektor, který má být zapouzdřen.
5. Pouzdro podle nároku 4, kde je retrovirový vektor replikačně-defektivní.
6. Pouzdro podle nároku 4 nebo 5, kde retrovirový vektor obsahuje 5'LTR oblast struktury U3-R-U5; jednu nebo více sekvencí zvolených z kódovacích nebo nekódovacích sekvencí, kde alespoň jedna z kódovacích sekvencí kóduje pro cytochrom P450; a 3'LTR oblast obsahující zcela nebo částečně deletovanou U3 oblast, kde uvedená deletovaná U3 oblast je nahrazena polyvazební sekvencí následovanou R a U5 oblastí.
7. Pouzdro podle kteréhokoliv z nároků 4 až 6, kde gen s cytochromem P450 je pod transkripční kontrolou specifického regulačního elementu nebo promotoru cílové buňky nebo promotoru indukovatelného rentgenovým zářením.

8. Pouzdro podle kteréhokoliv z nároků 4 až 7, kde retrovirový vektor je vektor připravený jak je popsáno v Příkladu 1 nebo 3.
9. Farmaceutický prostředek obsahující pouzdro podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8.
10. Pouzdro podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 8 pro přípravu farmaceutického prostředku k léčbě rakovinového onemocnění nebo jakéhokoliv jiného odpovídajícího onemocnění nebo poruchy.
11. Použití pouzdra podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 pro přípravu farmaceutického prostředku užitečného pro ablaci nádorových buněk
12. Použití pouzdra podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 pro přípravu farmaceutického prostředku k léčbě rakovinového onemocnění nebo jakéhokoliv jiného odpovídajícího onemocnění nebo poruchy zahrnující podávání subjektu, který to potřebuje, terapeuticky účinného množství pouzdra podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 a současně nebo s časovým odstupem, prodrogy, která je aktivována cytochromem P450.
13. Použití podle nároku 12, vyznačené tím, že pouzdro se podává injekcí a/nebo implantací do cílových buněk a/nebo v jejich místě, a prodroga se podává systemicky a/nebo místně.
14. Použití podle nároků 12 až 13, kde cílové buňky jsou buňky nádorů prsu a/nebo pankreatických nádorů.
15. Použití podle kteréhokoliv z nároků 12 až 14, , kde prodrogou je cyklofosfamid a/nebo ifosfamid.