

P 9904219

Közzététel
Póldag

67879 BE
A2

K I V O N A T

Eljárás és készítmények interferon- α -nukleinsavak bevitelére és expressziójára

A találmány tárgya eljárás alfa-interferon-polipeptid biztosítására egy páciens számára, amelynek során a páciens kérdéses szövetébe olyan vektort visznek be, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsav szegmenst tartalmaz, amely nukleinsav szegmens működőképesen kapcsolódik a kérdéses szövetre specifikus promóterhez, és ezáltal a polipeptidet a kérdéses szövetben expresszálják.

Az eljárásban alfa-interferon mennyiségét megnövelik egy páciens kérdéses szövetében, amellyel alfa-interferonra reszponzív rákot, hepatitiszt és más olyan állapotot kezelnek, amelyben az IFN- α szövetekben való mennyiségének növelése előnyös.

A találmány tárgya egy további vonatkozásában a fenti vektort tartalmazó készítmény.

Illenzo' ábra: $\emptyset$

Farkas, habok

P9904219

Közzététel

példát

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

67879185

72

Eljárás és készítmények α -interferon-nukleinsavak bevitelére és expressziójára

A humán alfa-interferonok (IFN- α) legalább 24 alfajból álló fehérjecsaládot alkotnak [Zoon, K. C., Interferon 9, 1 (1987), Gresser, I. szerk., Academic Press, NY]. Az alfa-interferont eredetileg olyan ágensként írták le, amely képes antivirális állapotot indukálni sejtekben, de jelenleg pleiotróp limfokinként ismeretes, amely hatással van az immunrendszer sok funkciójára [Openakker et al., Experimentia 45, 513 (1989)].

Az IFN- α -t széles körben alkalmazzák terápiás célokra, például hajsejt-leukémia, Kaposi-féle szarkóma, vesesejt-karcinóma, non-Hodgkin-limfóma, T-sejtes leukémia, többszörös és krónikus mielogén leukémia, malignus melanóma, hólyagsejt-karcinóma, vastagbél-karcinóma (5-FU-val), condyloma acuminata, rhinovírus és hepatitisz-B-vírus (HBV) eredményeképpen előforduló krónikus, vírusos hepatitisz különböző formái, hepatitisz-C-vírus (HCV), non-A-non-B-vírus (NANB) vagy hepatitisz- δ -vírus (HDV) fertőzése esetén [Pestka, "AIDA Research & Human Retroviruses" 8 (5), 776-786 (1992)]. Az IFN- α -ról azt is kimutatták, hogy nagymértékben hatékony megakario-citopoesis ellen és mieloproliferatív rendellenességben szenvedő páciensek esetén trombocitózis szabályzásában [Talpaz et al., Annals Int. Med. 99, 789-792 (1983); Gisslinger et al., Lancet i, 634-637 (1989); Ganser et al., Blood 70, 1173-1179 (1987)].

A génterápiás technikák rendelkeznek azzal a lehetőséggel, hogy úgy korlátozzák egy géntermék, például az interferon hatását egy kísérleti alanyban, hogy a terápiás hatású gén expresz-

szióját a kérdéses szövetben befolyásolják. Azonban, általában a génterápia legnagyobb kihívása a kérdéses szövet megcélzása. Interferon génekkel való megcélzást például a WO 93/15609. számú szabadalmi iratban közölnek, amely szerint interferon géneket juttatnak célba vaszkuláris szövetbe úgy, hogy érfalsérülés területeire beadnak ilyen géneket katéter-rendszer alkalmazásával. Egy másik példa szerint elődrogot (prodrogot) enzimatikusan átalakítani képes fehérjét kódoló adenovirális vektort ("öngyilkos gén") és citokint kódoló gént adnak be közvetlenül szilárd tumorba.

Kérdéses szövetek terápiás hatású génekkel való megcélzására szolgáló más eljárások három általános típusa: a transzdukciós megcélzás, a pozíciós megcélzás és a transzkripció megcélzás [összefoglaló irodalomként lásd például Miller et al., FASEB J. 9, 190-199 (1995)]. A transzdukciós megcélzás specifikus sejtekbe való szelektív bejutást jelent, melyet elsődlegesen egy receptor-ligandum kiválasztásával érünk el. A genomba való pozíciós megcélzás kívánt lókuszbba való integrációt jelent, például a kromatin aktív régióiba, vagy homológ rekombináción keresztül egy endogén nukleotid-szekvenciával, például egy célgénnel. A transzkripció megcélzás szelektív expressziót jelent, melyet olyan transzkripció promóter beépítésével érünk el, amely a génexpresszió nagymértékben specifikus szabályzását teszi lehetővé a kérdéses sejtekben.

Szövetspecifikus promóter például a kreatin-kináz-promóter, amelyet disztrofin cDNS expressziójának vezérlésére alkalmaznak izom- és szívszövetben [Cox et al., Nature 364, 725-729 (1993)];

és immunoglobulin nehéz vagy könnyű láncának promótereit "öngyilkos gének" expressziójára B-sejtekben [Maxwell et al., Cancer Res. 51, 4299-4304 (1991)]. Endotél sejtspecifikus szabályzórégiót is jellemeztek [Jahroudi et al., Mol. Cell. Biol. 14, 999-1008 (1994)]. Előállítottak olyan amfotróf retrovirális vektorokat, amelyek herpes simplex vírusból származó, timidin-kinázgént hordoztak albumin- vagy alfa-fetoprotein-promóterek vezérlése alatt [Huber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8039-8043 (1991)], máj-sejtvonal és hepatóma sejtek megcélzására, sorrendben. Ilyen szövetspecifikus promótereket lehet alkalmazni retrovirális vektorokban [Hartzoglou et al., J. Biol. Chem. 265, 17285-17293 (1990)] és adenovírus-vektorokban [Friedman et al., Mol. Cell. Biol. 6, 3791-3797 (1986)] és még megtartották szövetspecifitásukat.

Tehát van igény alfa-interferon expressziójának megcélzására rák, hepatitisz és más, alfa-interferont alkalmazó terápiával megközelíthető állapotok kezelésében. A találmány szerinti megoldás ezt az igényt elégíti ki, és túlmutat ezen.

A találmány tárgya egyik vonatkozásában eljárás alfa-interferon-polipeptid biztosítására egy páciens számára, amelynek során a páciens kérdéses szövetébe olyan vektort viszünk be, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsav szegmenst tartalmaz, amely nukleinsav szegmens működőképesen kapcsolódik a kérdéses szövetre specifikus promóterhez, és amely eljárásban a polipeptidet a kérdéses szövetben expresszáljuk.

A találmány tárgya másik vonatkozásában eljárás alfa-interferon mennyiségének megnövelésére egy páciens kérdéses szö-

vetében, amelynek során a páciens kérdéses szövetébe olyan vektort viszünk be, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsav szegmenst tartalmaz, amely nukleinsav szegmens működőképesen kapcsolódik a kérdéses szövetre specifikus promóterhez, és amely eljárásban az alfa-interferon-polipeptidet a páciens kérdéses szövetében expresszáljuk.

A találmány tárgya másik vonatkozásában eljárás alfa-interferonra reszponzív rák kezelésére, amelynek során a rákos szövetbe olyan vektort viszünk be, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsav szegmenst tartalmaz, amely nukleinsav szegmens működőképesen kapcsolódik a szövetre specifikus promóterhez, és amely eljárásban az alfa-interferon-polipeptidet a szövetben expresszáljuk.

A találmány tárgya másik vonatkozásában eljárás hepatitisz kezelésére, amelynek során a páciens májába olyan vektort viszünk be, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsav szegmenst tartalmaz, amely nukleinsav szegmens működőképesen kapcsolódik a májsejtekre specifikus promóterhez, és amely eljárásban az alfa-interferon-polipeptidet a páciens májában expresszáljuk.

A találmány tárgya egy további vonatkozásában készítmény, amely olyan vektort tartalmaz, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsav szegmenst tartalmaz, amely nukleinsav szegmens működőképesen kapcsolódik a kérdéses szövetre specifikus promóterhez.

Az 1. ábrán látható grafikon az alfa-interferon humán prosztatarák-sejtekre kifejtett antiproliferatív hatását mutatja

be.

A 2. ábrán látható grafikon luciferáz-aktivitást ábrázol, mint májspecifikus gének promótereit által vezérelt luciferáz-expresszió mértékét.

A találmány tárgyát képezik eljárások IFN- α szövetspecifikus expressziójára szövetspecifikus promóterek alkalmazásával. Az IFN- α kifejezésen a leírásban az alfa-interferon valamennyi alosztályát, azoknak deléciós, inszerciós vagy szubsztitúciós variánsait, biológiailag aktív fragmentumait és allélformáit értjük. A "biológiailag aktív" kifejezésen a leírásban bármilyen antivirális vagy antiproliferatív aktivitást értünk, szakember által ismert módszerekkel mérve [lásd például Openakker et al., mint fent; Mossman, J. Immunol. Methods 65, 55 (1983)]. Rekombináns alfa-interferonokat már számos kutatócsoport klónozott és expresszált *E. coli*-ban [például Weissmann et al., Science 209, 1343-1347 (1980); Goeddel et al., Nature 290, 20-26 (1981); Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227-260 (1985)]. Az alfa-interferon előnyösen alfa-2a-interferon vagy alfa-2b-interferon (lásd például WO 91/18927. számú szabadalmi iratot), bár bármilyen alfa-interferon alkalmazható.

Az IFN- α -polipeptidet kódoló nukleinsav lehet DNS vagy RNS. A "kódoló nukleinsavszekvencia" kifejezés jelentése egy olyan nukleinsav, amely specifikus fehérje vagy peptid expresszióját vezérli. A nukleinsavszekvencia egyaránt lehet DNS-szálból álló szekvencia, amely RNS-re átíródik, és RNS-szekvencia, amely fehérjére transzlálódik. A nukleinsavszekvenciák lehetnek teljes hosszúságú nukleinsavszekvenciák, valamint a teljes hosszúságú

fehérjéből származó, nem teljes hosszúságú szekvenciák. Továbbá érthető, hogy a szekvencia a natív szekvencia degenerált kódontjait vagy olyan szekvenciákat tartalmaz, amelyeket egy specifikus gazdasejtben kódonpreferencia biztosítása céljából vihetünk be.

A "vektor" kifejezésen virális expressziós rendszereket, autonóm replikációra képes, cirkuláris DNS-t (plazmidokat), és expressziós valamint nem-expressziós plazmidokat egyaránt értünk. Ha egy rekombináns mikroorganizmust vagy sejttenyészetet egy "expressziós vektor" gazdaszervezeteként írunk le, akkor ezen extrakromoszómális cirkuláris DNS-t és a gazdaszervezet kromoszómájába (kromoszómáiba) beépült DNS-t egyaránt értünk. Ha egy vektort fenntartunk egy gazdasejtben, akkor a vektort a sejtek stabilan replikálhatják a mitózis alatt autonóm struktúráként, vagy beépíthetik a gazdaszervezet genomjába. Egy vektor több genetikai elemet tartalmaz, helyzetre és sorrendre tekintettel elhelyezve, azaz működőképesen kapcsolódva más szükséges elemmel úgy, hogy a vektorban az IFN- α -t kódoló nukleinsav átíródhasson, és ha szükséges, transzlálódhasson transzfektált sejtekben.

A "gén" kifejezésen a leírásban egy polipeptidet kódoló nukleinsav-szekvenciát értünk. Ez a definíció magában foglal olyan különböző szekvencia-polimorfizmusokat, mutációkat és/vagy szekvencia-variánsokat, amelyekben az ilyen változások nem befolyásolják a géntermék funkcióját. A "gén" kifejezésbe nemcsak kódoló szekvenciák tartoznak, hanem szabályzó régiók is, például promóterek, enhancerek és terminációs régiók. A kifejezésbe tar-



tozik továbbá valamennyi intron és más DNS-szekvencia, amely a "splicing" során kikerül a mRNS-transzkriptumból, olyan variánsokkal együtt, amelyek alternatív "splicing" során keletkeznek.

A "plazmid" kifejezés autonóm, cirkuláris DNS-molekulát jelent, amely egy sejtben replikálódni képes, és expressziós és nem-expressziós típusú lehet. Ha egy rekombináns mikroorganizmust vagy sejttenyészetet egy "expressziós plazmid" gazdaszervezeteként írunk le, akkor ezen extrakromoszómális cirkuláris DNS-molekulát és a gazdaszervezet kromoszómájába (kromoszómaiba) beépült DNS-t egyaránt értünk. Ha egy plazmidot fenntartunk egy gazdasejtben, akkor a plazmidot a sejtek stabilan replikálhatják a mitózis alatt autonóm struktúraként, vagy beépíthetik a gazdaszervezet genomjába.

A "rekombináns fehérje" vagy "rekombinánsan termelt fehérje" olyan peptidet vagy fehérjét jelent, amelyet olyan nem-natív sejtek alkalmazásával állítunk elő, amelyek nem rendelkeznek a fehérjét expresszálni képes DNS endogén kópiájával. A sejtek azért termelik a fehérjét, mert genetikailag meg lettek változtatva a megfelelő nukleinsavszekvencia bevitelével. A rekombináns fehérje nem található asszociálva a fehérjét termelő sejtrel normálisan asszociált fehérjékkel vagy más szubcelluláris komponensekkel. A "fehérje" és "polipeptid" kifejezések felcserélhető fogalmak.

Az IFN- α -t általában expressziós vektorban állítjuk elő, amely a következő elemeket tartalmazza egymást követően, megfelelő távolságban kapcsolva funkcionális expresszió céljából: szövetspecifikus promóter, transzkripciós iniciációs hely, 3' -

végi nemtranszlálódó régió, 5'-végi mRNS vezetőszekvencia, alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsavszekvencia és poliadenilációs szignál. Enhancer-szekvenciákat és más, expressziót és/vagy szekréciót elősegítő szekvenciákat is tartalmazhat egy expressziós vektor. További géneket is tartalmazhat, például olyanokat, amelyek drogrezisztenciát kódolnak a rekombináns vektor jelenlétére való szelekciót vagy szűrést lehetővé téve. Ilyen további gének lehetnek például neomicin-rezisztenciát, multidrogrrezisztenciát, timidin-kinázt, béta-galaktozidázt, dihidrofolát-reduktázt (DHFR) és klóramfenikol-acetil-transzferázt kódoló gének.

A találmány szerinti megoldásban, egy adott, kérdéses szövet IFN- α -val való megcélzásánál olyan promótert és/vagy más expressziós elemeket alkalmazunk, amelyek a kérdéses szövetben előnyösen alkalmazhatók. Ismert szövetspecifikus promóterek például kreatin-kináz-promóter, amelyet disztrofin cDNS expressziójának vezérlésére alkalmaznak izom- és szívszövetben [Cox et al., Nature 364, 725-729 (1993)]; immunoglobulin nehéz vagy könnyű láncának promóterei B-sejtekben való expresszió céljára [Maxwell et al., Cancer Res. 51, 4299-4304 (1991)]; albumin- vagy alfa-fetoprotein-promóterek máj-sejtvonal és hepatóma sejtek megcélzására, sorrendben.

Szövetspecifikus expressziós elemek májra, például HMG-CoA-reduktáz-promóter [Luskey, Mol. Cell. Biol. 7 (5), 1881-1893 (1987)]; szterol 1. szabályzóelem [SRE-1; Smith et al., J. Biol. Chem. 265 (4), 2306-2310 (1990)]; foszfoenol-piruvát-karboxi-kináz (PEPCK) promótere [Eisenberger et al., Mol. Cell Biol. 12



(3), 1396-1403 (1992)]; humán C-reaktív fehérje (CRP) promótere [Li et al., J. Biol. Chem. 265 (7), 4136-4142 (1990)]; humán glükokináz-promóter [Tanizawa et al., Mol. Endocrinology 6 (7), 1070-81 (1992)]; koleszterin-7-alfa-hidroxiláz (CYP-7) promótere [Lee et al., J. Biol. Chem. 269 (20), 14681-9 (1994)]; béta-galaktozidáz alfa-2,6-szialiltranszferáz-promóter [Svensson et al., J. Biol. Chem. 265 (34), 20863-8 (1990)]; inzulinszerű növekedési faktort kötő fehérje (IGFBP-1) promótere [Babajko et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 196 (1), 480-6 (1993)]; aldoláz-B-promóter [Bingle et al., Biochem. J. 294 (Pt2), 473-9 (1993)]; humán transferrin promótere [Mendelzon et al., Nucl. Acids Res. 18 (19), 5717-21 (1990)]; I. típusú kollagén promótere [Houglum et al., J. Clin. Invest. 94 (2), 808-14 (1994)] .

Szövetspecifikus expressziós elemek prosztatára, például prosztatából származó savas foszfatáz (PAP) promótere [Banas et al., Biochim. Biophys. Acta 1217 (2), 188-94 (1994)]; prosztatából származó szekréciós fehérje 94 (PSP 94) promótere [Nolet et al., Biochim. Biophys. Acta 1098 (2), 247-9 (1991)]; prosztata-specifikus antigénkomplex promótere [Casper et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 47 (1-6), 127-35 (1993)]; humán glanduláris kallikrein-gén promótere (hgt-1) [Lilja et al., World J. Urology 11 (4), 188-91 (1993)] .

Szövetspecifikus expressziós elemek gyomorszövetre, például a humán H^+/K^+ -ATPáz alfa-alegységének promótere [Tanura et al., FEBS Letters 298 (2-3), 137-41 (1992)] .

Szövetspecifikus expressziós elemek hasnyálmirigyre, példá-



ul hasnyálmiriggyel asszociált fehérje promótere (PAP) [Dusetti et al., J. Biol. Chem. 268 (19), 14470-5 (1993)]; elasztáz-1 transzkripció enhanszere [Kruse et al., Genes and Development 7 (5), 774-86 (1993)]; hasnyálmirigy-specifikus amiláz és elasztáz enhanszer promótere [Wu et al., Mol. Cell. Biol. 11 (9), 4423-30 (1991); Keller et al., Genes & Dev. 4 (8), 1316-21 (1990)]; hasnyálmirigyből származó koleszterin-észteráz-gén promótere [Fontaine et al., Biochemistry 30 (28), 7008-14 (1991)].

Szövetspecifikus expressziós elemek méhnyálkahártyára, például uteroglobin-promóter [Helftenbein et al., Annal. NY Acad. Sci. 622, 69-79 (1991)].

Szövetspecifikus expressziós elemek mellékvese-sejtekre, például koleszterin-oldalláncot hasító (SCC) enzim promótere [Rice et al., J. Biol. Chem. 265, 11713-20 (1990)].

Szövetspecifikus expressziós elemek az általános idegrendszerre, például gamma-enoláz (neuronspecifikus enoláz, NSE) promótere [Forss-Petter et al., Neuron 5 (2), 187-97 (1990)].

Szövetspecifikus expressziós elemek az agyra, például a neurofilamentum nehéz láncának (NF-H) promótere [Schwartz et al., J. Biol. Chem. 269 (18), 13444-50 (1994)].

Szövetspecifikus expressziós elemek limfocitákra, például humán CGL-1/granzim-B-promóter [Hanson et al., J. Biol. Chem. 266 (36), 24433-8 (1991)]; terminális dezoxi-transzferáz (TdT), lambda-5, VpreB és lck (limfocitaspecifikus tirozin-protein-kináz p56lck) promótere [Lo et al., Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5229-43 (1991)]; humán CD2-promóter és 3'-végi transzkripció enhanszere [Lake et al., EMBO J. 9 (10), 3129-36 (1990)] és hu-



mán NK és T-sejt-specifikus aktiváció (NKG5) promóter [Houchins et al., Immunogenetics 37 (2), 102-7 (1993)].

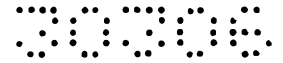
Szövetspecifikus expressziós elemek vastagbélre, például pp60c-src tirozin-kináz-promóter [Talamonti et al., J. Clin. Invest. 91 (1), 53-60 (1993)]; szervspecifikus neoantigének (OSNs), mw 40 kDa (p40) promóter [Ilantzis et al., Microbiol. Immunol. 37 (2), 119-28 (1993)]; vastagbélre specifikus antigén-P promótere [Sharkey et al., Cancer 73 (3 supp.), 864-77 (1994)].

Szövetspecifikus expressziós elemek mellsejtekre, például humán alfa-laktalbumin-promóter [Thean et al., British J. Cancer 61 (5), 773-5 (1990)].

Az expresszió specifikitásának elősegítésére szolgáló más elemek lehetnek egy kérdéses szövetben, például szekréciós vezetőszekvenciák, enhanszerek, nukleáris lokalizációs szignálok, endozmolitikus peptidek stb. Ezek az elemek előnyösen abból a kérdéses szövetből származnak, ahol a specifikitást elősegítik.

A találmány szerinti nukleinsavszekvenciák nukleinsav-manipulálására szolgáló technika például polipeptideket kódoló nukleinsavszekvenciák szubklónozása expressziós vektorokba, próbák jelölése, DNS-hibridizáció és hasonló, melyek általános leírását lásd Sambrook és munkatársai, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (2. kiadás), 1-3. kötet, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989), amely a kitanítás részét képezi. Erre a kézikönyvre a továbbiakban "Sambrook és munkatársai" címmel hivatkozunk.

Ha egy kérdéses szekvenciát kódoló DNS-t izoláltunk és



klónoztunk, sokféle rekombinánsan előállított sejtben expresszálhatjuk a kódolt fehérjét. Várható, hogy szakember számos expressziós rendszert ismer, amely DNS által kódolt fehérjét expresszál. Nem kíséreljük meg részletesen ismertetni a különböző ismert módszereket, amelyek fehérjék expressziójára szolgálnak prokariótákban vagy eukariótákban.

Röviden összefoglalva, egy kérdéses szekvenciát kódoló, természetes vagy szintetikus nukleinsavak expresszióját tipikusan úgy érjük el, hogy a DNS-t vagy cDNS-t működőképesen egy promóterhez kapcsoljuk (amely konstitutív vagy indukálható), azt követően expressziós vektorba visszük. A vektorok replikációra és integrációra alkalmasak lehetnek prokariótákban vagy eukariótákban. Tipikus expressziós vektorok tartalmaznak transzkripció és transzláció terminátorokat, iniciációs szekvenciákat és promótereket, amelyek alkalmasak a kérdéses polinukleotid-szekvencia expressziójára. A klónozott gén nagymértékű expressziójának céljából kívánatos expressziós plazmidokat előállítani, amelyek minimálisan egy erős promótert a transzkripció vezérlésére, egy riboszóma-kötőhelyet a transzlációs iniciáláshoz és egy transzkripció/transzláció terminátort tartalmaznak. Az expressziós vektorok tartalmazhatnak nem specifikus expressziós kazettákat, amelyek legalább egy független terminátor-szekvenciát, a plazmid replikációját mind eukariótákban, mind prokariótákban lehetővé tevő szekvenciákat (azaz ingázó vektorokat), valamint mind prokarióta, mind eukarióta rendszerekben alkalmazható szelekciós markereket is. Lásd "Sambrook és munkatársai" könyvét.

A találmány szerinti konstrukciókat bejuttathatjuk a kérdéses szövetbe in vivo vagy ex vivo, sokféle módszer alkalmazásával. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint a vektornak a sejtekbe juttatására szolgáló eljárás lehet mikroinjekció, kalcium-foszfátos kicsapás, liposzóma-fúzió vagy biolisztikus módszer. A találmány további előnyös megvalósítási módjai szerint a DNS-t közvetlenül veszi fel a kérdéses szövet. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint a konstrukciókat virális vektorrendszerbe csomagoljuk a sejtekbe juttatás elősegítése céljából.

A találmány szerinti megoldásban használható virális vektorrendszer például adenovírus, herpeszvírus, adeno-asszociált vírus, egérből származó "perc"-vírus (MVM), HIV, sindbis-vírus és retrovírusok, például Rous-szarkóma-vírus és MoMLV. A találmány szerinti konstrukciókat tipikusan ilyen vektorokba inszertáljuk, hogy lehetővé tegyük az interferont expresszáló konstrukció csomagolását tipikusan virális DNS-el kísérve, egy érzékeny gazdasejt fertőzését és az interferon- α -gén expresszióját. Különösen előnyös vektor Wills és munkatársai által leírt [Hum. Gene Therapy 5, 1079-1088 (1994)] adenovírus-vektor.

A találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti rekombináns IFN- α -konstrukciókat sejtreceptor-ligandumhoz konjugáljuk a felvétel elősegítése céljából (például burkolt ciszternák invaginációja és az endoszóma internalizációja), egy DNS-kötőcsoporton keresztül [Wu et al., J. Biol. Chem. 263, 14621-14624 (1988); WO 92/06180. számú szabadalmi irat]. Például a találmány szerinti DNS-konstrukciókat



polilizin-csoporton keresztül kapcsolhatjuk aszialo-oromukocidhoz, amely hepatociták aszialo-glikoprotein-receptorainak liganduma.

Ehhez hasonlóan, a találmány szerinti konstrukciók csomagolására alkalmazott vírusburkokat módosíthatjuk receptorligandumok vagy receptorra specifikus antitest hozzáadásával, lehetővé téve receptor-közvetített endocitózist specifikus sejtekbe (például WO 93/20221, WO 93/14188; WO 94/06923 számú szabadalmi iratok). A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti DNS-konstrukciókat vírusfehérjékhez, például adenovírus-partikulumokhoz kapcsoljuk az endocitózis elősegítése céljából [Curiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8850-8854 (1991)]. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint, a találmány szerinti molekuláris konjugátumok tartalmazhatnak mikrotubulus inhibitorokat (WO/9406922); influenzavírusból származó hemagglutininint mimetizáló szintetikus peptideket [Plank et al., J. Biol. Chem. 269, 12918-12924 (1994)]; és nukleáris lokalizációs szignálokat, például SV40-T-antigént (WO 93/19768. számú szabadalmi irat).

A „kezelés” kifejezésen a leírásban alfa-interferont kódoló nukleinsav bevitelét értjük egy páciensbe abból a célból, hogy a kérdéses szövetet, különösen egy vagy több sejtjében bizonyos patológiával rendelkező szövetet kitegyük az alfa-interferon hatásának. Tehát például a leírásban „rákos” szövetnek hívjuk azt, amelyben egy vagy több sejtet rákosnak, malignusnak, tumorosnak, rákot megelőző állapotban lévőnek, transzformáltnak, vagy adenómának vagy karcinómának minősítünk, vagy ha ezeknek az állapo-



toknak bármilyen más, szakember által ismert szinonimájával rendelkezik.

„Nem rákos” sejten értjük a technika állása szerint azokat, amelyek kizárhatók a rákos sejt vagy ráksejt definícióból, ide tartoznak normál sejtek és olyan sejtek, amelyek bizonyos patológiás tulajdonságokat mutatnak, például vírus, baktérium, parazita vagy más mikroorganizmus általi fertőzöttséget, öröklött állapottal sújtott sejtek, amely nem teszi azokat annyira optimálissá, mint a normál vagy vad típusú megfelelőiket, feltételezhetően valamilyen nem fertőző, beteg állapottal, például cukorbetegséggel sújtott sejtek és olyan sejtek, amelyek túléltek bármilyen ilyen stresszt stb.

Bármilyen állapot kezelése vagy terápiája, amelyre az IFN- α beadása jótékony hatással lehet, kezdődhet az állapot diagnosztizálása előtt vagy bármikor az állapot diagnosztizálása után. Tehát például, ha egy páciens esetén gyanítható, hogy rákot megelőző állapotban van, vagy valamilyen típusú rák kifejlődésének fokozott a valószínűsége, kezelhető a találmány szerinti készítményekkel. Ehhez hasonlóan, egy patogén, például hepatitisz-B vírus hatásának kitett személyt kezelhetünk a találmány szerinti készítményekkel, mielőtt a hepatitiszt diagnosztizáltuk volna. Továbbá kezelhetjük a HBV feltételezett hordozóit vagy olyan pácienseket, akik nagy valószínűséggel vírushordozók lehetnek, miután a betegség szimptomáinak nagy része igazoltan megjelent.

A találmány szerinti konstrukciók hasznosak különféle rákos megbetegedések, hepatitisz és más olyan állapotok terápiájában, amelyekben az IFN- α beadása az IFN- α szövetekben való mennyisé-

gének növelése céljából előnyös, például fekélyes vastagbélgyulladás, rhinovírus-fertőzés, condyloma acuminata, laryngeal papillomitis; HIV-fertőzés, fibrózis, fokozott IL-4- és IgE-termelés miatt bekövetkezett allergiás betegségek és granulomás rendellenességek, például Crohn-féle betegség esetén. Noha bármilyen olyan szövet megcélozható, amelyre valamilyen szövetspecifikus expressziós elemet, például promotert lehet azonosítani, különleges jelentősége van az IFN- α szövetspecifikus beadásának rákos szövetekbe az IFN- α mennyiségének megnövelése céljából, például humán prosztatákarcinómába és hepatómaszövetekbe. Továbbá a találmány szerinti konstrukciókat olyan, patológiás állapotokban lévő szövetekben lehet alkalmazni az IFN- α mennyiségének növelésére, amelyekben nem-rákos sejtek interferon-termelése hiányos, azaz kevesebb interferont termelnek, mint az egészséges sejtek, például krónikus hepatitisz-B-vírust hordozókban [Nouri-Aria et al., Hepatology 14 (6), 1308-1311 (1991)]. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint a rekombináns konstrukciókkal a szomszédos szöveteket vagy sejteket célozzuk meg az alfa-interferon lokális koncentrációjának növelése céljából a kérdéses sejtpopulációban.

A találmány szerinti készítményeket szakember által ismert módszerekkel hozzuk olyan beadásra szánt formára, amely emlísenek, előnyösen embernek való beadásra elfogadható. A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint a találmány szerinti készítményeket beadhatjuk közvetlenül szövetbe injekcióval vagy a kérdéses szövetet ellátó véredénybe. A találmány további előnyös megvalósítási módjai szerint a találmány szerinti készítmé-



nyeket „lokoregionálisan” adjuk be, azaz intravezikálisan, sérülésbe és/vagy topikálisan. A találmány más előnyös megvalósítási módjai szerint a találmány szerinti készítményeket szisztémásan adjuk be injekcióval, inhalálással, kúpban, transzdermális célba juttatással stb. A találmány további előnyös megvalósítási módjai szerint a készítményeket katéteren keresztül vagy olyan eszközzel adjuk be, amely lehetővé tesz nehezen hozzáférhető szövetek, például belső szervek elérését. A találmány szerinti készítményeket beadhatjuk nagyobb készletet tartalmazó eszköz alkalmazásával, implantátumokban vagy kapszulázott formákban is, amelyek lehetővé teszik a készítmények lassú vagy visszatartott felszabadulását.

A találmány tárgyát képezik beadásra szánt készítmények, amelyek oldat formában tartalmazzák a találmány szerinti készítményeket, feloldva vagy szuszpendálva elfogadható hordozóban, előnyösen vizes hordozóban. Sokféle vizes hordozó alkalmazható, például víz, pufferezt víz, 0,8%-os nátrium-klorid-oldat, 0,3%-os glicin, hialuronsav és hasonlóak. Ezeket a készítményeket sterilizálhatjuk szokásos, jól ismert sterilizálási technikák alkalmazásával, vagy sterilre szűrhetjük azokat. Az így kapott vizes oldatokat felhasználás céljára csomagolhatjuk, úgy ahogy vannak, vagy liofilizálhatjuk, a liofilizált preparátumot beadás előtt egy steril oldattal fel kell oldani. A készítmények tartalmazhatnak gyógyászatilag elfogadható segédanyagokat, amelyek a fiziológiás körülmények megközelítéséhez szükségesek, például pH-t szabályzó és pufferező ágenseket, ionerősséget szabályzó ágenseket, nedvesítő ágenseket és hasonlókat, például nátrium-

acetátot, nátrium-laktátot, nátrium-kloridot, kálium-kloridot, kalcium-kloridot, szorbit-monolaurátot, trietanolamin-oleátot stb.

A találmány szerinti készítmények koncentrációja a gyógyszerformákban széles határok között változhat, azaz kevesebb, mint 0,1%-tól, rendszerint legalább körülbelül 2%, egészen 20-50%-ig, vagy még több (tömeg%), és elsősorban a folyadék térfogata, viszkozitása stb. alapján választjuk ki, a kiválasztott konkrét beadási móddal összhangban.

A találmány szerinti készítményeket beadhatjuk liposzómákkal is. Liposzómák lehetnek emulziók, habok, micellák, oldhatatlan egyrétegű anyagok, folyadékkristályok, foszfolipid-diszperziók, lamelláris rétegek és hasonlóak. Ezekben a preparátumokban a találmány szerinti, célba juttatandó készítmények egy liposzóma részét képezik, egymagukban vagy olyan molekulával együtt, amely a kívánt célhoz képes kötődni, például antitesttel, vagy más terápiás vagy immunogén készítményekkel. A találmány szerinti, kívánt készítménnyel így megtöltött vagy azzal kapcsolt liposzómákat szisztémásan juttatjuk célba, vagy a kérdéses szövethez irányíthatjuk, ahol a liposzómák azután továbbítják a kiválasztott terápiás/immunogén peptidkészítményt.

A találmány szerint alkalmazott liposzómákat standard vezikulum-formáló lipidekből állítjuk elő, amelyek általában semleges vagy negatívan töltött foszfolipideket és egy szterint, például koleszterint tartalmaznak. A lipidek kiválasztásánál általában figyelembe vesszük például a liposzóma méretét, savra való érzékenységét és a liposzómák stabilitását a véráramban. Sokféle

módszer áll rendelkezésre liposzómák előállítására, leírásukat lásd például Szoka és munkatársai, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 (1980), USP 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 és 5.019.369. számú szabadalmi iratokat, melyek a kitanítás részét képezik.

A találmány szerinti készítményt tartalmazó liposzóma-szuszpenziót beadhatjuk intravénásan, lokálisan, topikálisan stb. olyan dózisban, amely változhat, többek között, a beadás módjától, a találmány szerinti, célba juttatandó készítménytől és a kezelendő betegség állapotától.

Szilárd készítményekben nem-toxikus szilárd hordozót alkalmazhatunk, például gyógyszerészeti tisztaságú mannitot, laktózt, keményítőt, magnézium-sztearátot, nátrium-szacharint, talkumot, cellulózt, glükózt, szacharózt, magnézium-karbonátot és hasonlókat. Orális beadás céljára gyógyászatilag elfogadható nem-toxikus készítményt úgy állítunk elő, hogy bármelyik normálisan alkalmazott segédanyagot, például a fentebb felsorolt hordozók valamelyikét beépítjük, és általában 10-95% hatóanyagot, amely egy vagy több találmány szerinti készítmény, és előnyösebben 25-75% koncentrációban.

Aeroszol útján történő beadáshoz a találmány szerinti készítményeket előnyösen a véglegesen felhasználandó formára hozzuk felületaktív anyaggal és hajtóanyaggal. A találmány szerinti készítmények tipikus százalékos aránya 0,01%-20% (tömeg%), előnyösen 1%-10%. A felületaktív anyagnak természetesen nem szabad toxikusnak lenni, és előnyösen oldhatónak kell lennie a hajtóanyagban. Ilyen ágensek lehetnek például 6-22 szénatomos zsírsavak észterei vagy parciális észterei, például kapronsav,

oktánsav, laurilsav, palmitinsav, sztearinsav, linolsav, lino-
lénsav, oleszterinsav vagy olajsav egy alifás polihidroxi-alko-
hollal vagy ciklikus anhidridjével. Kevert észterek, például ke-
vert vagy természetes gliceridek is alkalmazhatók. A felületak-
tív anyag mennyisége 0,1%-20%-a (tömeg%) a készítménynek, elő-
nyösen 0,25-5%-a. A készítmény kiegyensúlyozása szokásos módon a
hajtóanyaggal történik. Kívánt esetben hordozót is tartalmazhat,
például intranazális célba juttatás esetén lecitint.

A találmány szerinti készítményeket beadhatjuk továbbá
készlet-típusú rendszerben, kapszulázott formában, vagy implan-
tátumokban, amely technikák szakember által jól ismertek. Ehhez
hasonlóan, a konstrukciók célba juttathatók egy pumpán keresztül
a kérdéses szövethez.

A találmány néhány előnyös megvalósítási módja szerint, a
találmány szerinti készítmények beadhatók ex vivo a páciensből
kivett sejtekbe vagy szövetekbe, azután azok visszajuttathatók a
páciensbe. Génterápiás konstrukciók ex vivo beadását lásd példá-
ul az alábbi közleményekben: Artega és munkatársai, Cancer
Research 56 (5), 1098-1103 (1996); Nolta és munkatársai, Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 93 (6), 2414-9 (1996); Koc és munkatársai,
Seminars in Oncology 23 (1), 46-65 (1996); Raper és munkatársai,
Annals of Surgery 223 (2), 116-26 (1996); Dalesandro és munka-
társai, J. Thorac. Cardi. Surg. 11 (2), 416-22 (1996); és
Makarov és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1), 402-6
(1996).

Az alábbi példákkal a találmány szerinti megoldást kívánjuk
szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettek-

re korlátoznánk.

1. példa

Alfa-interferon hatása prosztatarák-sejtek proliferációjára

Három különböző prosztatacarcinóma-sejtet, LNCaP-t (androgénfüggő, ATCC #CRL 1740), PC-3-sejteket (androgén-független, ATCC #CRL 1435) és DU-145-t (androgén-független, ATCC #HTB 81) vizsgálunk. A sejteket 5 különböző interferon- $\alpha 2b$ -koncentrációban (Schering-Plough) (10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 IU/ml) növesztjük 72 óra hosszáig a következő tápközegekben: PC-3-at 7% magzati marhaszérummal kiegészített Ham-féle „F12 K” tápközegekben (GIBCO BRL); DU-145-t 10% magzati borjúszérummal kiegészített DMEM-tápközegekben (GIBCO BRL); LNCaP-t 5% magzati marhaszérummal kiegészített „RPMI 1640”-ben tenyésztünk.

Az interferon antiproliferatív hatásait MTT vizsgálati eljárással mérjük [Mossman, J. Immunol. Methods 65, 55 (1983)]. PC-3- és DU-145-sejtek következetes érzékenységet mutattak növekvő interferon-koncentrációkkal, és telítést értek el 10^4 IU/ml-nél. Az androgén-érzékeny LNCaP-sejtek nem adtak választ IFN-re. A két androgén-független sejttípus közül a PC-3 tűnt érzékenyebbnek a DU-145-sejtekhez képest. Ezeket az adatokat az 1. ábrán összegezzük. A besatírozott oszlopok a PC-3-sejtvonalat jelentik (androgén-független); a keresztben pontozott oszlopok jelentik a DU-145-sejtvonalat (androgén-független); a ferdén vonalkázott oszlopok jelentik az LNCaP-t (androgén-függő).

2. példa

Expressziós kazetta előállítás

Expressziós vektort állítunk elő, amely az alfa-2b-interferon (IFN- α 2b) teljes cDNS-szekvenciájával és az IFN- α 2b teljes szignálszekvenciájával rendelkezik [Sreuli et al., Science 209, 1343-1347 (1980); Goeddel et al., Nature 290, 20-26 (1981); Henco et al., J. Mol. Biol. 185, 227-260 (1985)], egy körülbelül 600 bp méretű, prosztataspecifikus antigén-génből (PSA) származó alappromóter vezérlete alatt, az IFN α szövetspecifikus expressziója céljából prosztatakarcinóma-sejtekben. Alapvetően, az 5'-végén feltételezett szignál-vezetőszekvenciával rendelkező, teljes hosszúságú IFN- α 2b-cDNS-t klónoztuk a CMV-promótertől 5'-irányban a PCDNA3-jelű emlős expressziós vektorba (Invitrogen), a CMV-promótertől szintézisirányban lévő HindII/EcoRI-poliklonozó helyre, így előállítottuk a DIFN-plazmidot. A PSA-promótert tartalmazó PSA-gén 5'-végi szegélyező szekvenciáját [BBRC 161, 1151-1159 (1989); Genbank #M27274] inszertáltuk a vektorba, helyettesítve a CMV-promótert, így előállítottuk a PSADIFN-plazmidot.

3. példa

Alappromóterek klónozása májspecifikus gének számára

Négy humán májra specifikus génből, albuminból (HAL), 1-antitripszinből (HAT), alfa-fetoproteinekből (AFP) és hidroximetilglutaril-CoA-reduktázból (HMG) származó, alappromótereket is tartalmazó 5'-végi szegélyező szekvenciákat szubklónozzunk ATCC 65731, ATCC 61597, ATCC 65735 és ATCC 59567 törzsekből, sorrend-

ben, pCRScript-vektorba, melyeket interferon-gén célba juttatására és annak szövetspecifikus expressziójára alkalmazunk máj-sejtekben [Luskey, Mol. Cell. Biol. 7 (5), 1881-1893 (1987); Minghetti et al., J. Biol. Chem. 261 (15), 6747-6757 (1986); Long et al., Biochemistry 23, 4828-4837 (1984); Gibbs, Biochemistry 26, 1332-1343 (1987)].

A pCRScript-vektorban lévő, májspecifikus enzimek fenti génjeinek 5'-végi szegélyező szekvenciáit tartalmazó inszertek restriktációs enzimés térképezése után az inszerteket a luciferáz-géntől szintézisiránnyal szemben, a pGL3-riporterplazmidba (Promega) visszük a pCRScript-vektorból. Kínai hörcsög petefészkéből származó (CHO-K1, ATCC # CCL-61), humán hepatóma (HepG2, ATCC #NB 8065) és humán hepatóma (Hep3B ATCC # HB 8064) sejteket transzfektálunk elektroporáció alkalmazásával ezzel a négy konstrukcióval, valamint kontroll pGLC-plazmiddal (PROMEGA Corp.). A pGLC-plazmid luciferáz-gént tartalmaz SV40-promóter és SV40-enhanszer vezérlete alatt.

A négy májspecifikus promóterszekvencia által a transzfektált sejtekben vezérelt luciferáz-expressziót összehasonlítjuk a pGLC-kontrollplazmiddal és a pGL3-vektorral. Az adatokat a 2. ábrán foglaljuk össze (HAL eredményeit nem mutatjuk be). A DNS-konstrukciókkal transzfektált három sejttípus rendelkezett a bemutatott szembetűnő tulajdonságokkal. A besatírozott oszlopok megfelelnek humán hepatóma HepG2-sejteknek; a keresztben pontozott oszlopok megfelelnek kínai hörcsögből származó petefészek-sejteknek (CHO); a ferdén vonalkázott oszlopok megfelelnek humán hepatóma Hep3B-sejteknek (Hep3B). pGLB egy negatív kontrollplaz-

mid; pGLC egy pozitív kontrollplazmid; HAT jelenti a humán α 1-antitripszin-promótert; HMG jelenti a humán-hidroxi-metil-glutaril-CoA-reduktáz-promótert; AFP jelenti a humán α -fetoprotein-promótert. A négy szövetspecifikus promóter közül a humán α 1-antitripszin (HAT) promótere tűnik a legjobbnak májspecifikus expresszióra ilyen körülmények között.

A HAT-promóter által vezérelt expressziót tovább optimalizáljuk olyan expressziós vektor előállításával, amely májspecifikus enhanszert, például humán α -fetoprotein-enhanszert [Watanabe et al., J. Biol. Chem. 262 (10), 4812-4818 (1987), Genebank # J02693], humán albumin-enhanszert [Hayashi et al., J. Biol. Chem. 267 (21), 14580-14585 (1992), Genebank # M92816], humán α 1-mikroglobulin/bikunin-enhanszert [Rouet et al., J. Biol. Chem. 267 (29), 20765-20773 (1992), Genebank # X67082] vagy hepatitisz-B-enhanszert [Valenzuela et al., "Animal Virus Genetics", szerk. B. Biels et al., 57-70. old., Academic Press, N.Y. (1981); Galibert et al., Nature 281, 646-650 (1979)] tartalmaz.

Bár a találmány fenti részletes leírása szemléltetéssel és példákkal együtt a világos megértést szolgálja, nyilvánvaló, hogy bizonyos változtatásokat és módosításokat lehet tenni a szabadalmi igénypontokban közölt igényelt oltalmi körben.

Az idézett hivatkozások teljes egészükben a kitanítás részét képezik.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Alfa-interferon-polipeptid expressziójára szolgáló rekombináns vektor, amely alfa-interferon-polipeptidet kódoló nukleinsavszekvenciát tartalmaz egy emlős sejtben funkcionális promóterhez működőképesen kapcsolva.

2. Az 1. igénypont szerinti vektor, amely egy vírusvektor.

3. Az 1. igénypont szerinti vektor, amely egy plazmid.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti vektor, amely adeno-viridiae nemzetségből származó vírusvektor.

5. A 4. igénypont szerinti vektor, amely promóterként szövetspecifikus promótert tartalmaz.

6. Az 5. igénypont szerinti vektor, amely szövetspecifikus promóterként májspecifikus promótert tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti vektor, amely alfa-interferon-polipeptidként alfa-2b-interferont kódoló nukleinsavszekvenciát tartalmaz.

8. Gyógyszerforma, amely hatóanyagként 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vektort tartalmaz egy vagy több gyógyászatilag elfogadható hordozóval, hígítószerrel vagy segédanyaggal.

9. Eljárás gyógyszerforma előállítására, *azzal jellemezve*, hogy összekeverünk 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vektort egy vagy több gyógyászatilag elfogadható hordozóval, hígítószerrel vagy segédanyaggal.

10. Eljárás alfa-interferon-polipeptid intracelluláris mennyiségének növelésére egy kérdéses szövetben, *azzal jellemezve*, hogy a kérdéses szövetet alfa-interferon-polipeptidet kódoló,

az illető szövetben funkcionális expressziós szabályzó szekvenciához működőképesen kapcsolódó nukleotidszekvenciát tartalmazó érintkeztetjük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy májsejtet tartalmazó szövetben növeljük meg az alfa-interferon-polipeptid mennyiségét.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rákos májsejtet tartalmazó szövetben növeljük meg az alfa-interferon-polipeptid mennyiségét, és májspecifikus promótert tartalmazó vektorral érintkeztetjük a kérdéses szövetet.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy adenovírus-vektorral érintkeztetjük a kérdéses szövetet.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy alfa-interferon-polipeptidként alfa-2b-interferon-polipeptid intracelluláris mennyiségét növeljük meg.

26 oldal kérés

2 oldal rajz

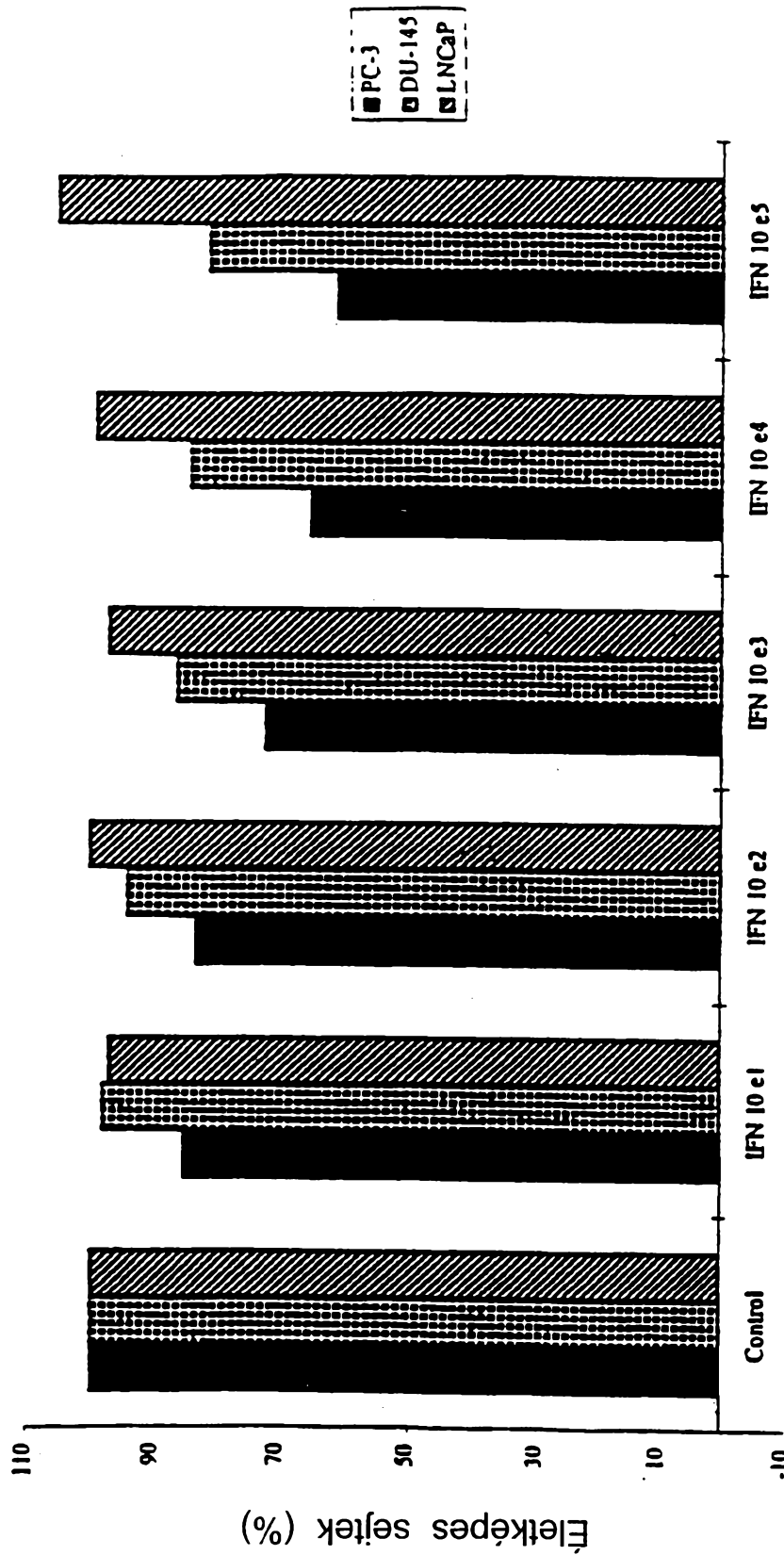
28 oldal

György László

A meghatalmazott:

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-34-950, Fax: 34-24-323

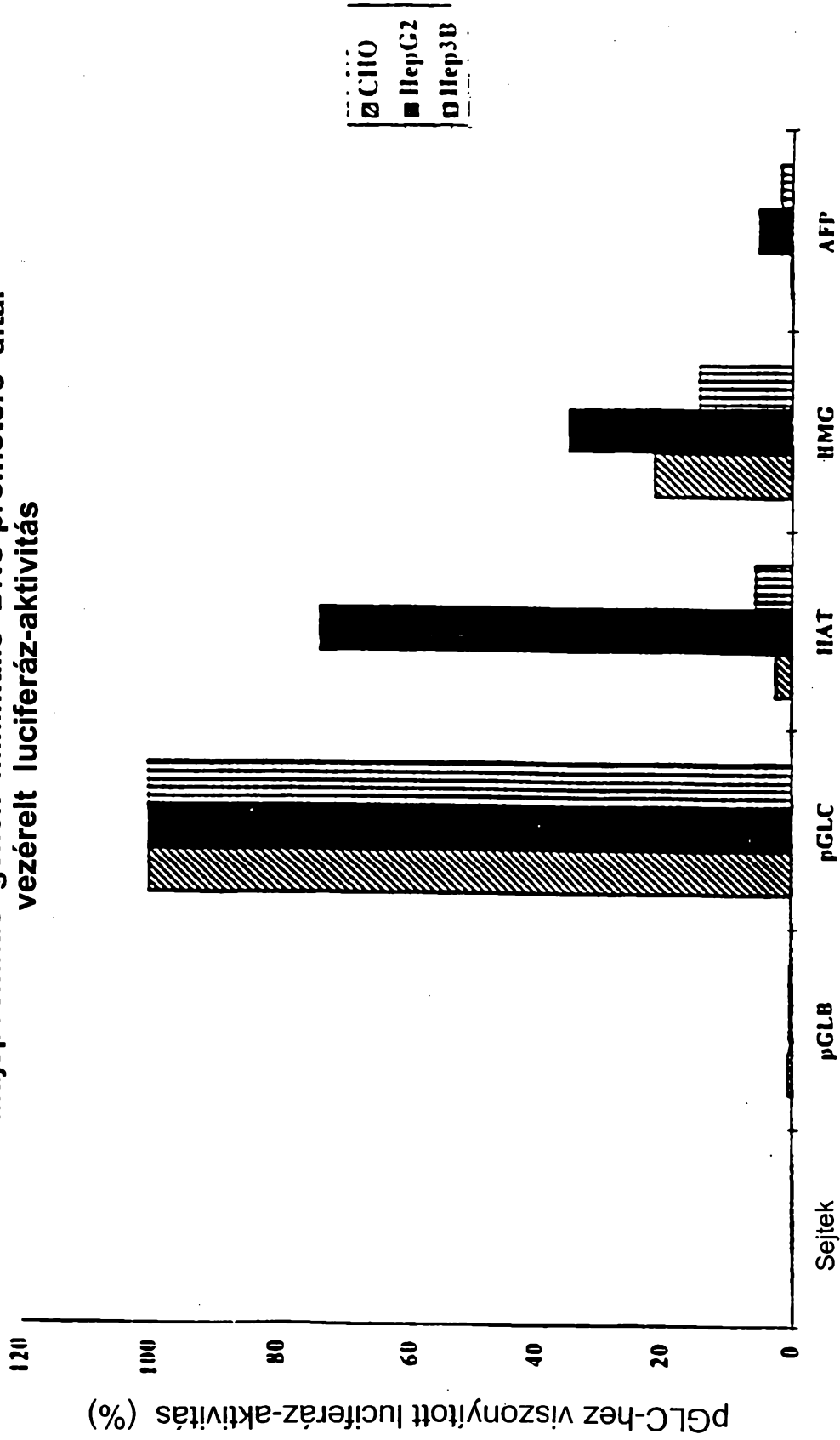
Alfa-interferon hatása humán prosztatarák-sejtekre
(MTT vizsgálati eljárás)



Kezelt csoportok

1. ÁBRA

Májspecifikus gének minimális DNS-promotere által
vezérelt luciferáz-aktivitás



2. ÁBRA