

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

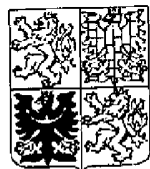
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2581-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12. 02. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.02.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9501662**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 11. 97**
(Věstník č. 11/97)

(86) PCT číslo: **PCT/FR96/00218**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/25177**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 48/00

// C 12 N 15/86

(71) Přihlášovatel:

RHONE-POULENC RORER S. A., Anthony,
FR;

(72) Původce:

Bach Jean-Francois, Paris, FR;
Chatenoud Lucienne, Puteaux, FR;
Haddada Hedi, Alfortville, FR;
Lee Martin, Paris, FR;
Perricaudet Michel, Ecrosnes, FR;
Webb Michelle, Paris, FR;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Léková kombinace vhodná pro transfekci
a expresi exogenů in vivo**

(57) Anotace:

Vynález se týká lékové kombinace alespoň jednoho rekombinantního adenoviru, jehož genom obsahuje první rekombinantní DNA obsahující terapeutický gen a druhou rekombinantní DNA obsahující imunoprotekční gen pro následné, přerušované nebo/a časově nebo/a ex-vivo.

CZ 2581-97 A3

Léková kombinace vhodná pro transfekci a expresi exogenů in vivo

Oblast techniky

č.j.	6 5 0 4 7 6
Došlo	15. VIII 97
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

Vynález se týká oblasti genové terapie a zejména použití adenovirů pro expresi zainteresovaného terapeutického genu. Vynález se zejména týká nového způsobu léčení patologických stavů genetického původu založeného na kombinovaném použití dvou typů terapeutických činidel.

Dosavadní stav techniky

Genová terapie spočívá v korekci nedostatečnosti nebo anomálie (mutace, aberantní exprese, atd.) zavedením genetické informace do buňky nebo orgánu vykazujících uvedenou nedostatečnost nebo anomálii. Tato genetická informace může být zavedena buď in vitro nebo ex vivo do buňky extrahované z orgánu, přičemž modifikovaná buňka je potom znovu zavedena do organismu, anebo přímo in vivo do příslušné tkáně. V tomto druhém případě existují různé fyzikální transfekční techniky, mezi které patří také použití viru ve funkci vektoru. V tomto ohledu byly testovány různé viry za účelem stanovení jejich schopnosti infikovat některé buněčné populace. Jedná se zejména o retroviry (RSV, HMS, MMS, atd.), vir HSV, adeno-přidružené viry a adenoviry.

Z těchto virů zejména adenoviry mají některé zajímavé vlastnosti pro použití v genové terapii. Mají dosti široké hostitelské spektrum, jsou schopné infikovat kviescentní buňky a neintegrují se do genomu infikované buňky. Adenoviry jsou viry s lineární dvouřetězcovou DNA velikosti asi 36 kb. Jejich genom obsahuje zejména obrácenou repetiční sekvenci (ITR) na jejich konci, enkapsidační sekvenci, rané geny a pozdní geny (viz obr.1). Hlavní rané geny jsou geny E1 (E1a a E1b), E2, E3 a E4. Hlavními pozdními geny jsou geny L1 až L5.

Vzhledem k výše uvedeným vlastnostem adenovirů, byly tyto viry již použity pro přenos genů. Za tímto účelem byly připraveny různé vektory odvozené od adenovirů zahrnující různé geny (beta-gal, OTC, alfa-1AT, cytokiny, atd.). V každé z těchto konstrukcí byl adenovir modifikován takovým způsobem, aby byl neschopný replikace v infikované buňce. Takto jsou konstrukcemi popsány v rámci dosavadního stavu techniky adenoviry s delecemi oblastí E1 (E1a nebo/a E1b) a případně oblasti E3, přičemž v úrovni těchto delecí je vložena sekvence heterologní DNA (Levrero a kol., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury a kol., Gene 50 (1986) 161).

Nicméně jak je tomu u všech známých virů, indukuje podání divokého adenoviru (Poutes a kol., J.Virol.65 (1991)1450) nebo defektního rekombinantního viru neschopného replikace (Yang a kol., PNAS(1994)4407) výraznou imunitní odezvu.

Hlavní zásadou imunitního systému je integrita individua neboli vlastní integrita. Podle této zásady imunitního systému dochází k eliminaci infekčních činitelů a k odmítání implantovaných roubov a nádorů, aniž by se při tom tyto mocné obranné mechanismy organismu obrátily proti vlastnímu organismu a indukovaly v něm autoimunitní nemoci. Tento stav neodezvy na vlastní antigeny, v rámci které jsou eliminovány pouze cizí antigeny, je definován jako stav fyziologické tolerance. Za účelem eliminace cizích činitelů rozvíjí imunitní systém dva typy mechanismů. V rámci prvního z těchto mechanismů produkuje pomocí lymfocytů B specifické protilátky, přičemž se v tomto případě hovoří o humorální imunitě. Tyto protilátky vážají antigen a buď ho inaktivují nebo ho vyloučí z organismu. Druhý obranný mechanismus se týká buněčné imunity a využívá lymfocyty T a z těchto cytotoxické lymfocyty nesoucí specifický receptor uvažovaného antigenu. Rozpoznání antigenu receptorem T vyžaduje, aby tento byl exprimován v kombinaci s proteiny kódovanými geny hlavního histokompatibilitního komplexu (CMH) třídy I a třídy II.

V důsledku toho tato imunitní odezva rozvinutá proti

infikovaným buňkám představuje hlavní překážku při použití virálních vektorů v genové terapii, poněvadž 1) indukujíce destrukci infikovaných buněk omezuje dobu exprese terapeutického genu a tudíž i terapeutický účinek, 2) indukuje paralelně výraznou zánětovou odezvu a 3) způsobuje rychlou eliminaci infikovaných buněk po opakovaných injekcích. Je samozřejmé, že rozsah této imunitní odezvy vůči infikovaným buňkám se mění podle charakteru organu podstoupivšího injekci a v závislosti na použitém způsobu podání. Takto je exprese beta-galaktosidázy kódovaná rekombinantním adenovirem dodaným do svalů imunokompetentních myší snížena na minimální úroveň 40 dnů po injekci (Kass.Eisler a kol., PNAS 90 (1993)11498). Stejně tak je exprese genů transfekovaných adenovirem do jícna významně snížena v průběhu 10 dnů následujících po injekci (Yang a kol. 1994, Immunity 1 433-442) a exprese faktoru IX přeneseného adenovirem do hepatocytů hemofilních psů vymizí 100 dnů po injekci (Kay a kol., PNAS 91(1994)2353).

V rámci perspektivního využití vektorů odvozených od adenovirů v genovém inženýrství se jeví jako nezbytné regulovat imunitní odezvu rozvinutou proti buňkám infikovaným uvedenými adenoviry.

Z výše uvedeného vyplývá, že uvedení v činnost imunitního systému vyžaduje především rozpoznání tímto imunitním systémem prvků, které jsou organismu cizí (nevlastní nebo vlastní avšak modifikované), jakými jsou vektory odvozené od adenovirů, které musí být v normálním čase zničeny. V průběhu posledních let byly vyvinuty imunointervenční strategie, jejichž cílem bylo vytvořit "permisivní" imunitní prostředí, tj. indukovat stav tolerance vůči předem definovaným cizím antigenům.

A přesně v této úrovni působí vynález. Vynález směřuje k zábránění rychlé eliminaci adenovirů z infikovaných buněk a tedy k prodloužení exprese in vivo terapeutického genu, které tyto buňky nesou.

V nedávné době přihlašovatel prokázal, že ko-exprese některých genů do infikovaných buněk je schopná indukovat imunoprotekční účinek a způsobit tak, že vektory nebo/a infikované buňky unikají působení imunitního systému. Jsou zejména používány adenoviry, ve kterých je exprese zainteresovaného terapeutického genu kopulována s expresí imunoprotekčního genu (FR n° 9412346). Může se zejména jednat o gen, jehož produkt působí na činnost hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) nebo na účinnost cytokinů a umožňuje tak výrazně snížit nebo dokonce potlačit jakoukoliv imunitní odezvu vůči uvedenému vektoru nebo vůči infikovaným buňkám. Takto dochází k alespoň částečné inhibici exprese proteinů MHC nebo prezentace antigenů, což má za následek výhodu spočívající ve značném omezení imunitní reakce na přítomnost vektoru nebo infikovaných buněk a tedy v prodloužení terapeutického účinku.

Podstata vynálezu

Přihlašovatel neočekávatelně prokázal, že je možné výrazně prodloužit terapeutický účinek vektoru tím, že se k němu přidruží imunosupresor. Přitom eliminace uvažovaného vektoru nebo/a destrukce infikovaných buněk imunitním systémem je zpožděna o dobu, která je výrazně delší než doba zpoždění, kterou by bylo možné očekávat při součtu imunoprotekčních účinků uvedeného vektoru a imunosupresoru. Výhodně léková kombinace podle vynálezu indukuje "pseudo-nečinnost" imunitního systému, která je příznivá pro dlouhodobou expresi terapeutického genu.

Ve smyslu tohoto vynálezu je imunosupresorem každá sloučenina, která je schopna inhibovat částečně nebo úplně alespoň jednu imunitní signalizační cestu. Obecně se imunosupresory používají obvykle při transplantacích za účelem předcházení odmítnutí cizorodých rouků a při léčení některých autoimunitních chorob. Klasicky používanými látkami jsou buď chemické imunosupresory, jakými jsou kortikosteroidy, azathioprin, cyklosporin, FK506, nebo biologické imunosupresory, jakými jsou

polyklonální nebo monoklonální protilátky. První kategorie imunosupresorů a z této zejména cyklosporin a FK506 inhibují významnou měrou produkci cytokinů, jako například produkci interleukinu 2, které hrají podstatnou úlohu při diferenciaci a proliferaci lymfocytických buněk. Bohužel účinnost tohoto typu imunosupresoru vyžaduje permanentní podávání, které je při více nebo méně dlouhé době aplikace v rozporu s jejich toxicitou. Takto je azathiopropin potenciálně myelotoxický, zatímco cyklosporin je nefrotoxický a může kromě toho způsobit hypertenzi nebo neurologické poruchy.

Pokud jde o protilátky, jedná se o protilátky řízené proti lymfoidním buňkám imunitního systému. První protilátkou použitou jako imunosupresor byla anti-CD3 řízená proti lymfocytům T. Jejím cílem je jeden z polypeptidových řetězců molekuly CD3, který tvoří receptor pro antigen buněk T. Z toho vyplývá funkční inaktivace buněk T CD3+ rozpoznaných protilátkou. V případě problematiky, která je zde předmětem zájmu, by podání imunosupresoru tohoto typu společně s podáním rekombinantního adenoviru obsahujícího terapeutický gen bylo schopné blokovat imunitní reakci hostitele vůči virálnímu vektoru nebo/a vůči jeho produktům exprimovaným na povrchu infikovaných buněk. Na stejném principu lze využít protilátky anti-CD4, anti-CD2, anti-CD8, anti-CD28, anti-B7, anti-ICAM-1 a anti-LFA-1.

Přihlašovatel nyní vyvinul nový způsob obzvláště účinného a výrazného zpoždění nebo dokonce inhibice reakce imunitního systému, při kterém nedochází k problémům toxicity.

Přesněji definováno, vynález je odvozen od prokázání obzvláště výrazného synergického účinku spojeného s kombinovaným použitím rekombinantního adenoviru, ve kterém je exprese zainteresovaného terapeutického genu kopulována s expresí imunoprotekčního genu, který byl popsán výše, a alespoň jednoho imunosupresního činidla.

První předmět vynálezu se tedy týká lékové kombinace

alespoň jednoho imunosupresního činidla a alespoň jednoho rekombinantního adenoviru, jehož genom obsahuje první rekombinantní DNA obsahující terapeutický gen a druhou rekombinantní DNA obsahující imunoprotekční gen, pro následné, přerušované nebo/a časově současné použití vhodné pro exogenovou transfekci in vivo nebo/a ex-vivo.

Jak již bylo uvedeno výše, spočívá vynález zejména na prokázání synergického účinku mezi aktivitou imunosupresního činidla a účinkem imunoprotekčního genu exprimovaného na expresi terapeutického genu.

Toto kombinované použití umožňuje výrazně prodloužený terapeutický účinek a výhodně vyžaduje významně snížené dávky zejména imunosupresního činidla.

Jak to bude uvedeno dále, mohou být obě složky kombinovaného ošetření použity následně, přerušovaně nebo/a časově současně. Výhodně se imunosupresní činidlo injikuje před a po injekci adenoviru. Podle této formy provedení vynálezu může být podání imunosupresního činidla provedeno v časovém odstupu a výhodně může být pravidelně obnovováno. V tomto specifickém případě jsou obě složky kondicionovány odděleně. V případě současného podání mohou být obě složky smíšeny bezprostředně před společným podáním nebo mohou být naopak podány současně avšak odděleně. Zejména mohou být způsoby podání obou činidel odlišné.

V rámci vynálezu lze jako imunosupresní činidlo použít každou sloučeninu, která je schopna inhibovat částečně nebo úplně alespoň jednu imunitní signalizační cestu. Toto činidlo může být zejména zvoleno z látek, jakými jsou cyklosporin, FK506, azathioprin, kortikosteroidy a každá mono- nebo polyklonální protilátka. Jedná se výhodně o protilátky schopné inaktivovat imunní molekuly nebo vyvolat destrukci imunních buněk nesoucí tyto molekuly. Jako protilátku lze zejména po-

užít protilátky anti-CD4, anti-CD3, anti-CD2, anti-CD8, anti-CD28, anti-B7, anti-ICAM-1, anti-LFAA-1. Může se rovněž jednat o hybridní molekuly, jakými jsou CTLA4Ig, fuzní protein mezi molekulou CTLA-4 (homolog k CD28) a imunoglobulinem. Místo G1Fc této molekuly vázané s molekulou B7 se ukazuje schopným inhibovat aktivaci buněk T (D.J. Lenschow, Science, 257, 789, 1992). Je samozřejmé, že rozsah vynálezu není nikterak omezen na výše uvedené imunosupresory. Tyto imunosupresory mohou být použity v izolované formě nebo v kombinaci.

Pokud jde o rekombinantní DNA přítomné v genomu adenoviru použitého v rámci vynálezu, jedná se o fragmenty DNA obsahující uvažovaný gen (terapeutický nebo imunoprotekční) a případně signály umožňující jeho expresi konstruované in vitro a potom vložené do genomu adenoviru. Rekombinantními DNA použitými v rámci vynálezu mohou být komplementární DNA (DNAC), genomové DNA (DNAg) nebo hybridní konstrukce sestávající například z DNAC, do které by byly vloženy jeden nebo několik intro-nů. Může se rovněž jednat o syntetické sekvence nebo semisyntetické sekvence. Tyto DNA mohou být lidského, zvířecího, rostlinného, bakteriálního, virálního a jiného původu. Výhodně se používají DNAC nebo DNAg.

Jako terapeutický gen použitelný pro konstrukci vektorů podle vynálezu lze uvést gen kódující produkt mající terapeutický účinek. Takto kódovaným produktem může být protein, peptid, RNA a podobně.

Pokud jde o proteinový produkt, může jít o produkt homologní vůči cílové buňce (tj. produkt, který je v cílové buňce normálně exprimován v případě, že tato buňka nevykazuje žádnou patologii). V tomto případě, umožňuje exprese proteinu například léčit nedostatečnou expresi v buňce nebo expresi neaktivního nebo slabě aktivního proteinu způsobenou nějakou modifikací, a nebo ještě nadměrnou expresi uvedeného proteinu. Terapeutický gen může takto kódovat buněčný protein mající zvýšenou stabilitu, modifikovanou účinnost a podobně.

Proteinový produkt může být rovněž heterologní vůči cílové buňce. V tomto případě může exprimovaný protein například doplňovat nebo nahrazovat některou deficitní aktivitu v buňce, čímž činí buňku schopnou bojovat proti uvažované patologii nebo u ní stimuluje imunitní odezvu.

Jako terapeutické proteinové produkty ve smyslu vynálezu lze uvést zejména enzymy, krevní deriváty, hormony, interleukiny, interferony, TNF, atd. (FR 9203120), růstové faktory, neurotransmitory nebo jejich prekurzory nebo syntézní enzymy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofin, atd., apoliproteiny: ApoAI, ApoAIV, ApoE, atd. (FR 93 05125), dystrofin nebo minidystrofin (FR 9111947), protein CFTR sdružený s mukoviscidosou, protinádorové supresní geny: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, atd. (FR 93 04745), geny kódující faktory implikované při koagulační: faktory VII, VIII, IX, geny zasahující do reparace DNA a podobně.

Jak již bylo uvedeno výše, může být terapeutickým genem rovněž antimediatorový gen nebo antimediatorová sekvence, jejichž exprese v cílové buňce umožňuje regulovat expresi genu nebo transkripci buněčných RNAM. Takové sekvence mohou být například přepsány v cílové buňce na RNA komplementární k buněčným RNAM a blokovat tak jejich translaci na protein technikou popsanou v patentu EP 140 308. Antimediatory rovněž obsahují sekvence kódující ribozomy, které jsou schopné selektivně rozkládat cílové RNA (EP 321 201).

Terapeutické geny mohou být lidského zvířecího, rostlinného, bakteriálního, virálního a jiného původu. Tyto geny mohou být získány libovolnou známou technikou a zejména vytríděním bank, chemickou syntézou nebo také smíšenými metodami zahrnujícími chemickou nebo enzymatickou modifikaci sekvencí získaných vytríděním bank.

Imunosupresní gen použitý v rámci vynálezu může být roz-

ličného typu. Jak již bylo vysvětleno výše, jedná se o gen, jehož produkt působí na aktivitu hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) nebo na aktivitu cytokinů. Výhodně se jedná o gen, jehož produkt inhibuje alespoň částečně expresi proteinů komplexu MHC nebo antigenovou prezentaci. Jako výhodné příklady lze uvést některé geny obsažené v oblasti E3 adenoviru, gen ICP47 viru herpes nebo gen UL18 cytomegaloviru.

Oblast E3 genomu adenoviru obsahuje různé čtecí fáze, které alternativním svíjením poskytují různé proteiny. Z těchto proteinů je protein Gp19k (nebo(E3-19k) transmembránovým glykosylovaným proteinem lokalizovaným v membráně endoplasmového retikula (RE). Tento protein obsahuje luminální doménu vázající molekuly komplexu MHC-I a C-terminální cytoplasmový konec schopný vázat mikrotubuly (nebo tubulin), které působí při zakotvení proteinu gp19k v membráně RE. Protein Gp19k je takto schopný zabránit expresi molekul MHC-I na povrchu buněk interakcí a sekvestrací v úrovni RE. Nicméně v nepřítomnosti virální replikace je protein gp19k slabě exprimován adenoviry. Jinak je exprese gp19k rovněž přizpůsobena k realizaci svíjení. Zavedení do vektoru podle vynálezu rekombinantní DNA obsahující sekvenci (výhodně DNAC) kódující gp19k umožňuje regulovat a optimalizovat expresi uvedeného proteinu. Zejména použití konstitutivních promotorů a suprese ostatních čtecích fází umožňuje silně zvýšit expresi uvedeného proteinu a vymanit se ze závislosti na virální replikaci a přítomnosti indukčních prvků. To umožňuje obzvláště výhodným způsobem značně snížit lyzi za použití CTL infikovaných buněk a takto zvýšit a prodloužit in vivo produkci terapeutického genu.

Další proteiny kódované oblastí E3 genomu adenoviru, jakými jsou proteiny 10,4k a 14,5k, mají některé zajímavé vlastnosti s ohledem na jejich zavedení do vektorů podle vynálezu.

Gen ICP47 viru herpes simplex tvoří další imunoprotekční gen, který je obzvláště zajímavý pro použití ve smyslu

vynálezu. Buňky infikované virem herpes simplex vykazují odolnost proti lyzi indukované pomocí CTL. Bylo prokázáno, že tato rezistence může být poskytnuta genem ICP47, který je schopen omezit expresi molekul MHC-I na povrchu buněk. Inkorporace genu ICP47 do rekombinantní DNA podle vynálezu umožňuje rovněž rekombinantním virům podle vynálezu uniknout imunitnímu systému.

Gen UL18 cytomegaloviru tvoří další výhodný příklad imunoprotekčního genu podle vynálezu. Produkt genu UL18 je schopný vázat beta2-mikroglobulin (Browne a kol., Nature 347(1990) 770). beta2-Mikroglobulin je jedním z řetězců molekul MHC-I. Zabudování genu UL18 do rekombinantní DNA podle vynálezu také umožňuje snížit počet funkčních buněk beta2-mikroglobulinu v buňkách infikovaných viry podle vynálezu a tedy snížit schopnosti těchto buněk produkovat kompletní a funkční molekuly MHC-I. Tento typ konstrukce tedy umožňuje chránit infikované buňky před lyzí způsobenou CTL.

Jak již bylo uvedeno výše, je imunoprotekčním genem použitým v rámci vynálezu při jiném výhodném způsobu provedení gen, jehož produkt inhibuje aktivitu nebo signalizační cesty cytokinů. Cytokiny tvoří skupinu vylučovaných proteinů, které působí jako signalizační molekuly imunitního systému. Mohou přitahovat imunitní buňky, aktivovat je, indukovat jejich proliferaci a dokonce působit přímo na infikované buňky tak, že je zabíjejí.

Jako příklady genů, jejich produkt působí na aktivitu nebo signalizační cesty cytokinů lze uvést geny zasahující do syntézy cytokinů nebo jejichž produkt je schopen sekvestrovat cytokiny, antagonizovat jejich aktivitu nebo interferovat s intercelulárními signalizačními cestami. Jako výhodné příklady takových genů lze uvést zejména gen BCRF1 viru Epsteinova a Barrové, geny crmA a CRMB viru cowpox, geny B15R a E18R viru kravských neštovic, gen US28 cytomegaloviru a geny E3.14,7, E3-10,4 a E3-14,5 adenoviru.

Gen B15R viru kravských neštovic kóduje rozpustný protein schopný vázat interleukin-1beta (sekretovaná forma interleukinu-1) a takto bránit tomuto cytokinu vázat se na jeho buněčné receptory. Interleukin-1 je ve skutečnosti jeden z prvních cytokinů produkovaných v odezvu na antigenovou agresi a hraje velmi důležitou úlohu při signalizaci imunitního systému na počátku infekce. Možnost zabudovat gen B15R do vektoru podle vynálezu výhodně umožňuje redukovat aktivitu IL-1beta zejména při aktivaci imunitních buněk a tím způsobem lokálně chránit infikované buňky virem podle vynálezu proti výrazné imunitní odezvě. Rovněž mohou být použity homologní geny genu B15R, jakým je například gen viru cowpox.

Stejným způsobem gen B18R viru kravských neštovic kóduje protein homologní s receptorem interleukinu-6. Tento gen nebo každý funkční homologní gen je rovněž použitelný ve vektorech podle vynálezu pro inhibici vazby interleukinu-6 na jeho buněčný receptor a takto pro lokální snížení imunitní odezvy.

Stejným způsobem může být použit i gen crmB viru cowpox. Tento gen kóduje ve skutečnosti sekretovaný protein schopný vázat TNF a konkurovat receptorům TNF na povrchu buněk. Tento gen tudíž umožňuje ve virech podle vynálezu lokálně snižovat koncentraci aktivního činidla TNF schopného ničit infikované buňky. Rovněž mohou být použity i jiné geny kódující proteiny schopné vázat TNF a inhibovat alespoň částečně jeho vazbu na jeho receptory.

Gen crmA viru cowpox kóduje protein mající inhibiční aktivitu proteáz typu serpinu, který je schopný inhibovat syntézu interleukinu-1beta. Tento gen může být tedy použit pro lokální snížení koncentrace interleukinu-1 a takto pro omezení rozvinutí imunitní a zánětové odezvy.

Gen BCRF1 viru Epsteinova a Barrova kóduje analog interleukinu 10. Produktem tohoto genu je cytokin schopný omezit imunitní odezvu a změnit její specifickou mechanismem indukce proliferace lymfocytů B.

Gen US28 cytomegaloviru kóduje protein homologní s receptorem zánětového proteinu makrofagů 1alfa (MIP-1-alfa). Tento protein je tedy schopen působit jako konkureční činidlo receptorů MIP a inhibovat tak lokálně aktivitu uvedeného zánětového proteinu.

Produkt genů E3-14,7, E3-10,4 a E3-14,5 adenoviru je schopen blokovat přenos intercelulárního signálů mediovaných některými cytokiny. Když se cytokiny váží na jejich receptor na povrchu infikované buňky, dojde k přenosu signálu do jádra indukujícího buněčnou smrt nebo zastavení proteinyvé syntézy. To je zejména případ nekrotického faktoru nádorů. Inkorporace genů E3-14,7, E3-10,4 nebo/a E3-14,5 do rekombinantní DNA podle vynálezu za účelem jejich konstituční nebo regulované exprese umožňuje blokovat intracelulární signalizaci indukovanou faktorem TNF a takto chránit buňky infikované rekombinantními viry podle vynálezu před toxickými účinky uvedeného cytokinu.

Lokální a přechodná inhibice může být obzvláště výhodná. Takové inhibice může být dosaženo zejména volbou specifických expresních signálů (například cytokin-dependentní promotory), jak to bude popsáno dále.

Je samozřejmé, že mohou být použity i další homologní geny nebo geny mající obdobné funkční vlastnosti pro konstrukci vektorů podle vynálezu. Takové různé geny mohou být získány každou o sobě známou technikou a zejména vytríděním bank, chemickou syntézou nebo také smíšenými metodami zahrnujícími chemickou nebo enzymatickou modifikaci sekvencí získaných vytríděním bank. Kromě toho mohou být takové geny použity samostatně nebo v kombinaci anebo v kombinacích.

Vložení uvažovaných genů ve formě rekombinantních DNA podle vynálezu nabízí větší pružnost při konstrukci adenovirů a umožňuje lepší regulaci uvedených expresních genů.

Takto mohou být rekombinantní DNA (a tedy oba zájme-

resované geny) zabudované do adenovirálních vektorů podle vynálezu sestaveny a uspořádány různými způsoby.

Mohou být nejdříve vloženy do stejného místa genomu adenoviru nebo do různých zvolených míst tohoto genomu. Rekombinantní DNA mohou být zejména vloženy alespoň částečně v úrovni oblastí E1, E3 nebo/a E4 genomu adenoviru tak, že nahrazují nebo doplňují virální sekvence.

Výhodně se rekombinantní DNA vloží alespoň částečně v úrovni oblastí E1, E3 nebo E4 genomu adenoviru. V případě, že se vloží na dvě různá místa, potom se upřednostňuje v rámci vynálezu použití oblastí E1 a E3 nebo E1 a E4. Příklady ve skutečnosti ukazují, že tato organizace umožňuje zvýšenou expresi obou genů, aniž by přitom docházelo k interferenci mezi těmito geny. Výhodně se rekombinantní DNA vloží tak, že nahrazují virální sekvence.

Tyto rekombinantní DNA mohou potom každá obsahovat transkripční promotor, přičemž tyto promotory mohou být stejné nebo odlišné. Tato konfigurace umožňuje dosáhnout vyšší expresní hladiny a nabízí lepší regulaci exprese genů. V tomto případě mohou být oba geny vloženy ve stejné orientaci nebo v opačných orientacích.

Rekombinantní DNA mohou rovněž tvořit jednotnou transkripční entitu. V této konfiguraci jsou obě rekombinantní DNA přilehlé a uloženy takovým způsobem, že oba geny jsou pod kontrolou jediného promotoru a poskytují jedinou premediátorovou RNA. Toto uspořádání je výhodné poněvadž umožňuje použití jediného transkripčního promotoru.

Konečně použití rekombinantních DNA podle vynálezu umožňuje použití transkripčních promotorů odlišného charakteru a zejména silných nebo slabých promotorů, regulovaných nebo konstitučních promotorů, tkáňově specifických nebo ubikvitárních promotorů a podobně.

Volba expresních signálů a respektivní poloha rekombi-

nantních DND je obzvláště důležitá pro dosažení zvýšené exprese terapeutického genu a výrazného imunoprotekčního účinku.

V rámci obzvláště výhodného způsobu provedení vynálezu se používá defektní adenovir obsahující první rekombinantní DNA obsahující terapeutický gen a druhou rekombinantní DNA obsahující imunoprotekční gen, přičemž obě rekombinantní DNA jsou vloženy v úrovni oblasti E1.

V rámci jiného obzvláště výhodného způsobu provedení vynálezu se používá defektní adenovir obsahující první rekombinantní DNA obsahující terapeutický gen vložený v úrovni oblasti E1 a druhou rekombinantní DNA obsahující imunoprotekční gen vložený v oblasti E3.

Jak již bylo uvedeno výše, jsou adenoviry podle vynálezu defektními viry, což znamená, že jsou neschopné replikovat se autonomním způsobem v cílové buňce. Obecně je tedy genom defektního adenoviru podle vynálezu zbaven alespoň sekvencí nezbytných pro replikaci uvedeného viru v infikované buňce. Tyto oblasti mohou být buď odstraněny (zcela nebo částečně) nebo mohou být učiněny nefunkčními anebo mohou být nahrazeny jinými sekvencemi a zejména terapeutickými geny. Defektní charakter adenovirů podle vynálezu je důležitým faktorem, poněvadž zajišťuje nerozšiřování se vektorů podle vynálezu po podání.

V rámci výhodné formy provedení vynálezu obsahují adenoviry podle vynálezu sekvence ITR a sekvenci umožňující enkapsidaci a mají delecí celku nebo části genu E1.

Sekvence obrácené repetice (ITR) tvoří počátek replikace adenoviru. Tyto sekvence jsou lokalizované na koncích 3' a 5' virálního genomu (viz obr.1), odkud mohou být snadno izolovány klasickými technikami molekulární biologie, které jsou pro technika v daném oboru dobře známými technikami. Nukleotidová sekvence sekvencí ITR lidských adenovirů (zejména

sérotypů Ad2 a Ad5) je popsána v literatuře a to stejně jako psích adenovirů (zejména CAV1 a CAV2). Pokud jde například o adenovir Ad5, odpovídá levá sekvence ITR oblasti obsahující nukleotidy 1 až 103 uvedeného genomu.

Enkapsidační sekvence (také označovaná jako sekvence Psi) je nezbytná pro enkapsidaci virální DNA. Tato oblast musí být přítomna k tomu, aby umožnila přípravu defektních rekombinantních adenovirů podle vynálezu. Enkapsidační sekvence je lokalizována v genomu adenovirů mezi levou ITR (5') a genem E1 (viz obr.1). Tato sekvence může být izolována nebo uměle syntetizována klasickými technikami molekulární biologie. Nukleotidová sekvence enkapsidační sekvence lidských adenovirů (zejména sérotypů Ad2 a Ad5) je popsána v literatuře, stejně jako enkapsidační sekvence psích adenovirů (zejména CAV1 a CAV2). Pokud jde o adenovir Ad5, odpovídá enkapsidační sekvence oblasti obsahující nukleotidy 194 až 358 genomu.

Výhodněji obsahují adenoviry podle vynálezu sekvence ITR a sekvenci umožňující enkapsidaci a mají delecí celku nebo části genů E1 a E4.

V rámci výhodné formy provedení vynálezu je genom adenovirů podle vynálezu zbaven delecemi celku nebo části genů E1, E3 a E4 a výhodně také celku nebo části genů E1, E3, E5 a E4.

Adenoviry podle vynálezu mohou být připraveny z adenovirů různých původů. Ve skutečnosti existují různé typy adenovirů, jejichž struktura a vlastnosti se poněkud mění, avšak které mají srovnatelnou genetickou organizaci. Takto mohou být instrukce popsané v přihlášce vynálezu odborníkem snadno použity pro libovolný typ adenovirů.

Adenoviry podle vynálezu mohou být lidského, zvířecího nebo smíšeného (lidského a zvířecího) původu.

Pokud jde o adenoviry lidského původu, dává se přednost použití adenovirů zařazených do skupiny C. Z různých sérotypů

lidských adenovirů se v rámci vynálezu přednostně používají adenoviry typu 2 nebo 5 (Ad 2 nebo Ad 5).

Jak již bylo uvedeno výše, mohou být adenoviry podle vynálezu rovněž zvířecího původu nebo mohou obsahovat sekven-
ce pocházející z adenovirů zvířecího původu. Přihlašovatel
ve skutečnosti prokázal, že adenoviry zvířecího původu jsou
schopné infikovat s vysokou účinností lidské buňky a že jsou
neschopné propagovat se v lidských buňkách, ve kterých byly
testovány (viz přihláška FR 93 05954). Přihlašovatel také
prokázal, že adenoviry zvířecího původu nejsou nikterak
transkomplementovány adenoviry lidského původu, což eliminu-
je jakékoliv rekombinační a propagační riziko in vivo v pří-
tomnosti lidského adenoviru, které by jinak mohlo vést k tvor-
bě infekčních částic. Použití adenoviru nebo oblasti adenovi-
ru zvířecího původu je tedy obzvláště výhodné vzhledem k to-
mu, že je tak ještě dále sníženo riziko spojené s použitím
viru jako vektoru v genové terapii.

Adenoviry zvířecího původu použitelnými v rámci vyná-
lezu mohou být adenoviry psího, bovinního, murinního (napří-
klad: Mav1, Beard a kol., Virology 75 (1990)81), ovčího, pra-
sečího, ptačího nebo také opičího původu (příklad: SAV). Z
ptačích adenovirů lze zejména uvést sérotypy 1 až 10 dostupné
v ATCC, jako například kmeny Phelps (ATCC VR-432), Fontes
(ATCC VR-280), P7-A (ACTT VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828),
J2-A(ATCC VR-829), T8-A(ATCC VR-830), K-11(ATCC VR-921), nebo
také kmeny ATCC VR-831 až 835. Z bovinních adenovirů lze po-
užít různé známé sérotypy, a zejména sérotypy dostupné v ATCC
(typy 1 až 8) pod odkazy ATCC VR-313, 314, 639-649, 768 a 769.
Rovněž je možné uvést murinní adenoviry FL (ATCC VR-550) a E20380
(ATCC VR-528), ovčí adenovir typu 5 (ATCC VR-1343) nebo typu
6 (ATCC VR-1340), prasečí adenovir 5359) nebo opičí adenoviry
a to zejména adenoviry uvedené v ATCC pod čísla VR-591-594,
941-943, 195-203, a podobně.

Z adenovirů zvířecího původu se v rámci vynálezu výhod-

ně používají adenoviry nebo oblasti adenovirů psího původu a zejména všechny kmeny adenovirů CAV2 /kmen manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-80)/. Psí adenoviry jsou předmětem četných strukturních studií. V rámci dosavadního stavu techniky (Spibey a kol., J.Gen.Virol. 70(1989)165) byly takto popsány úplné restriční mapy adenovirů CAV1 a CAV2 a rovněž byly klonovány a sekvencovány geny E1a a E3, jakož i sekvence ITR (viz zejména Spibey a kol., Virus Res. 14(1989)241; Linné, Virus Res. 23(1992)119, WO91/11525).

Defektní rekombinantní adenoviry podle vynálezu mohou být připraveny různými způsoby.

První z těchto způsobů spočívá v transfekci defektního rekombinantního viru připraveného in vitro (buď ligací nebo ve formě plasmidu) do kompetentní buněčné řady, tj. do řady nesoucí v trans všechny funkce nezbytné ke komplementaci defektního viru. Tyto funkce jsou výhodně integrované do genomu buňky, což umožňuje vyvarovat se rekombinačním rizikům a poskytuje buněčné řadě zvýšenou stabilitu.

Druhý přístup spočívá v ko-transfekci do příslušné buněčné řady DNA defektního rekombinantního viru připraveného in vitro (buď ligací nebo ve formě plasmidu) a DNA viru helper. Podle této metody není nezbytné mít k dispozici kompetentní buněčnou řadu schopnou komplementovat všechny defektní funkce rekombinantního adenoviru. Část těchto funkcí je ve skutečnosti komplementována virem helper. Tento vir helper musí být sám o sobě defektní a buněčná řada nese v trans funkce nezbytné k jeho komplementaci. Z buněčných řad použitelných výhodně v rámci vynálezu při tomto druhém přístupu lze zejména uvést lidskou embryonální renální řadu 293, buňky KB, buňky Hela, MDCK, GHK, a podobně (viz příklady).

Potom se multiplikované vektory rekuperují, purifikují a amplifikují klasickými technikami molekulární biologie.

Podle variantního provedení je možné připravit in vitro

a to buď ligací nebo ve formě plasmidu DNA defektního rekombinantního viru nesoucí příslušné delece a obě rekombinantní DNA. Jak již bylo uvedeno výše, mají vektory podle vynálezu deleci celku nebo části některých virálních genů, zejména genů E1, E3, E4 nebo/a L5. Tato delece může odpovídat jakémukoliv typu potlačení působícímu na uvažovaný gen. Zejména se může jednat o potlačení celku nebo části kódující oblasti uvedeného genu nebo/a celku nebo části promoční oblasti transkripce uvedeného genu. Uvedená suprese se obecně provede na DNA defektního rekombinantního viru, například digescí pomocí restričních enzymů a potom ligací technikami molekulární biologie, jakož i technikami popsány v příkladech. Rekombinantní DNA mohou být potom vloženy do této DNA enzymatickým štěpením a potom ligací v úrovni selekovaných oblastí a ve zvolené orientaci.

Takto získaná DNA, která tedy nese příslušné delece a obě rekombinantní DNA, umožňuje přímo generovat defektní rekombinantní adenovir nesoucí uvedenou delece a rekombinantní DNA. Tato první varianta je obzvláště vhodná pro realizaci rekombinantních adenovirů, ve kterých jsou geny uspořádány ve formě jediné transkripční jednotky anebo pod kontrolou oddělených promotorů, které jsou však vloženy do stejného místa genomu.

Rovněž je možné připravit rekombinantní vir ve dvou etapách, umožňujících následné zavedení obou rekombinantních DNA. Takto se DNA prvního rekombinantního viru nesoucího příslušné delece (nebo část uvedených delecí) a jednu z rekombinantních DNA konstruuje ligací nebo ve formě plasmidu. Tato DNA se potom použije pro generování prvního rekombinantního viru nesoucího uvedenou delece a jednu rekombinantní DNA. DNA tohoto prvního viru se potom izoluje a ko-transfekuje s druhým plasmidem nebo DNA druhého defektního rekombinantního viru nesoucího druhou rekombinantní DNA, příslušné delece (část nepřítomná na prvním viru) a oblast umožňující homologní rekombinaci. Tato druhá etapa takto generuje defektní rekombinantní vir nesoucí obě rekombinantní DNA. Tato varianta přípra-

vy je obzvláště vhodná pro přípravu rekombinantních virů ne-
soucích obě rekombinantní DNA vložené do dvou různých oblas-
tí genomu adenoviru.

Obě činidla podle vynálezu, tj. imunosupresor a rekombi-
nantní adenovir mohou být formulovány tak, aby získané formu-
lace byly vhodné pro topické, perorální, parenterální, intra-
nazální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraoku-
lární, transdermální a další podání.

Výhodně farmaceutická formulace nebo farmaceutické for-
mulace obsahují farmaceuticky přijatelné nosiče vhodné pro
injikovatelnou formulaci. Může se zejména jednat o roztoky
solí (dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný,
chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý nebo chlorid
hořečnatý a podobně, nebo směsi těchto solí) mající sterilní
a izotonický charakter nebo o suché kompozice, zejména lyofi-
lizované kompozice, které po přidání sterilní vody nebo fyzio-
logického roztoku poskytují rekonstituované injikovatelné te-
kutiny.

Dávky imunosupresoru a adenoviru použité pro injekci
mohou být závislé na různých faktorech, zejména na použitém
způsobu podání, na léčené patologii, na genu, který má být
exprimován nebo také na požadované době léčení.

Obecně se rekombinantní adenoviry podle vynálezu formu-
lují a podávají ve formě dávek obsahujících mezi 10^4 a 10^{14}
pfu/ml, výhodně mezi 10^6 a 10^{10} pfu/ml. Výraz pfu ("plaque
forming unit") odpovídá infekční potenci uvažovaného roztoku
a je stanoven infikováním příslušné buněčné kultury a stano-
vením, obvykle po 5 dnech, počtu pláží infikovaných buněk.
Techniky stanovení koncentrace pfu virálního roztoku jsou vel-
mi dobře zdokumentované v literatuře. Pokud jde o imunosupre-
sory, mění se jejich dávky a injekční podání podle jejich cha-
rakteru. Nastavení obou těchto parametrů je ve schopnostech
odborníka v daném oboru.

Léková kombinace podle vynálezu může být použita pro léčení nebo prevenci četných patologických stavů. Podle terapeutického genu vloženého do jeho adenoviru může být uvedená kombinace použita pro léčení nebo prevenci genetických chorob (dysstrfie, muskoviscidóza, atd.), neurodegenerativních chorob (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, ALS, atd.), hyperproliferativních patologií (rakoviny, restenóza, atd.), patologií spojených s poruchami koagulace nebo dyslipoproteinemiemi, patologií spojených s virálními infekcemi (hepatitidy, AIDS, atd.), a dalších patologických stavů.

Předmětem vynálezu je rovněž každý způsob terapeutického ošetření, při kterém se použije nárokovaná léková kombinace.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí konkrétních příkladů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezuji rozsah vynálezu, který je jednoznačně definován formulací patentových nároků.

Stručný popis obrázků

Na připojených výkresech

- obr.1 znázorňuje genetickou organizaci adenoviru Ad5. Úplná sekvence adenoviru Ad5 je k dispozici na základě údajů zjištěných sekvencováním a umožňuje odborníkovi selektovat nebo vytvořit každé restriktivní místo a takto izolovat libovolnou oblast genomu.
- Obr.2 znázorňuje restriktivní kartu adenoviru CAV2, kmen Manhattan (podle Spibey a kol., kterýžto odkaz již byl uveden výše).
- Obr.3 znázorňuje vektor pAD5-gp19k-beta-gal a
- obr.4 znázorňuje konstrukci adenoviru Ad-gp19k-beta-gal,deltaE1,deltaE3..

Metody klasicky používané v molekulární biologii, jako preprativní extrakce plasmidové DNA, odstředění plasmidové DNA v gradientu chloridu cesného, elektroforéza na agarosovém nebo akrylamidovém gelu, purifikace fragmentů DNA elektroelucí, extrakce proteinu fenolem nebo soustavou tvořenou směsí fenolu a chloroformu, precipitace DNA v solném prostředí ethanolem nebo isopropanolem, transformace do *Escherichia coli*, atd., jsou o sobě známé a hojně popsány v literatuře /Maniatis T. a kol., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. a kol. (ed.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, 1987/.

Plasmidy typu pBR322, pUC a fagy série M13 jsou komerčně dostupné (Bethesda Research Laboratories).

Za účelem ligace mohou být fragmenty DNA separovány podle velikosti elektroforézou na agarosovém nebo akrylamidovém gelu, extrahovány fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu, precipitovány ethanolem a potom inkubovány v přítomnosti DNA ligázy fagu T4 (Biolabs) podle doporučení dodavatele.

Naplnění proeminentních konců 5' může být provedeno Klenowovým fragmentem z DNA polymerázy I od *E. coli* (Biolabs) podle specifikací dodavatele. Destrukce proeminentních konců 3' se provádí v přítomnosti DNA polymerázy fagu T4 (Biolabs) použité podle doporučení výrobce. Destrukce proeminentních konců 5' se provede šetrným ošetřením nukleázou S1.

Řízená mutageneze in vitro syntetickými oligodeoxynukleotidy může být provedena metodou vyvinutou Taylor-em a kol. /Nucleic Acids Res. 13(1985)8749-8764/ za použití soupravy distribuované firmou Amersham.

Enzymatická amplifikace fragmentu DNA technikou nazývanou PCR /Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. a kol., Science 230(1985)1350-1354; Mullis K.B. a Fallona F.

A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350/ může být provedena za použití činidla "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) podle specifikací výrobce.

Ověření nukleotidových sekvencí může být provedeno metodou vyvinutou Sanger-em a kol. /Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467/ za použití soupravy distribuované firmou Amersham.

Použité buněčné řady

V následujících příkladech se použijí nebo mohou být použity následující buněčné řady:

- lidská embryonální renální řada 239 (Graham a kol., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Tato řada obsahuje zejména ve formě integrované ve svém genomu levou část genomu lidského adenoviru Ad5 (12 %).

- Lidská buněčná řada KB: pocházející z lidského epidermálního karcinomu. Tato buněčná řada je dostupná v ATCC (referenční číslo: CCL17), stejně jako podmínky umožňující její kultivaci.

- Lidská buněčná řada Hela: pochází z karcinomu lidského epitelu. Tato řada je dostupná v ATCC (referenční číslo: CCL2), stejně jako podmínky umožňující její kultivaci.

- Psí buněčná řada MDCK: podmínky kultivace buněk MDCK byly popsány zejména Macatney-em a kol., Science 44 (1988) 9.

- Buněčná řada gm DBP6 (Brough a kol., Virology 190 (1992) 624). Tato buněčná řada je tvořena buňkami Hela nesoucími gen E2 adenoviru pod kontrolou LTR z MMTV.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce defektních rekombinantních adenovirů obsahujících terapeutický gen (gen LacZ z E.coli) pod kontrolou promotoru LTR od RSV a gen gp19k pod kontrolou promotoru LTR od RSV, přičemž oba geny jsou vloženy v úrovni oblasti E1.

Tyto adenoviry byly konstruovány homologní rekombinací mezi plasmidem nesoucím levou část adenoviru Ad5, obě rekombinantní DNA a oblast adenoviru Ad5 (odpovídající proteinu IX) a DNA defektního adenoviru nesoucího různé delece

1. Konstrukce vektoru pAD5-gp19k-beta-gal (obr.3)

1.1. Konstrukce plasmidu pGEM-gp19k

Plasmid pAD5-gp19k-beta-gal obsahuje sekvenci DNA kódující protein gp19k adenoviru. Tento plasmid byl konstruován následujícím způsobem. Byl izolován fragment XbaI genomu divokého adenoviru Ad5 obsahujícího oblast E3 a tento byl klonován do odpovídajícího místa plasmidu pGEM (Promega) za účelem generování plasmidu pGEM-E3. Fragment HinfI obsahující kódující sekvenci proteinu gp19k (nukleotidy 28628 až 29634 divokého adenoviru Ad5) byl potom izolován z plasmidu pGEM-E3. Konce tohoto fragmentu se uvolní působením Klenowova fragmentu DNA polymerázy od E.coli (viz obecné techniky molekulární biologie), načež se získaný fragment klonuje do místa SmaI plasmidu pGEMzf+ (Promega).

Získaný plasmid byl označen jako pGEM-gp19k (obr.3).

1.2. Konstrukce vektoru pAD5-gp19k-beta-gal.

Tento příklad popisuje konstrukci plasmidu obsahujícího jednu nebo obě rekombinantní DNA obsahující jejich vlastní promotor, levou část genomu adenoviru a suplementární část (protein pIX) umožňující homologní rekombinaci. Tento vektor byl konstruován z plasmidu pAd.RSVbetaGal následujícím způsobem.

Plasmid pAd.RSVbetaGal obsahuje v orientaci 5' směrem k 3':

- fragment PvuII odpovídající levému konci adenoviru Ad5 obsahující: sekvenci ITR, počátek replikace, enkapsidační signály a amplifikátor,
- gen kódující beta-galaktosidázu pod kontrolou promotoru RSV (vir Rousova sarkomu),
- druhý fragment genomu adenoviru Ad5, který umožňuje homologní rekombinaci mezi plasmidem pAd.RSVbetaGal a adenovirem d1324. Plasmid pAd.RSVbetaGal byl popsán Stratford-Perricaudet-em a kol. (J.Clin.Invest. 90(1992)626).

Plasmid pAd.RSVbetaGal byl nejdříve digеровán enzymy EagI a ClaI. Tato digesce generuje první fragment nesoucí zejména levou část adenoviru Ad5 a promotor LTR viru RSV. Paralelně se vyřízne enzymy EagI a XbaI plasmid pAdRSVbetaGal. To poskytne druhý typ fragmentu nesoucího zejména promotor LTR viru RSV, gen LacZ a fragment genomu adenoviru Ad5, který umožní homologní rekombinaci. Fragmenty ClaI-EagI a EagI-XbaI se potom ligují v přítomnosti fragmentu XbaI-ClaI plasmidu pGEM-gp19k (příklad 1.1) nesoucího kódující sekvenci gp19k (viz obr.3). Takto získaný vektor označený jako pAD5-gp19k-beta-Gal tedy obsahuje:

- fragment PvUII odpovídající levému konci adenoviru Ad5 obsahujícímu : sekvenci ITR, počátek replikace, enkapsidační signály a amplifikátor E1A,
- sekvenci kódující gp19k pod kontrolou promotoru viru RSV (vir Rousova sarkomu),
- gen kódující beta-galaktosidázu pod kontrolou promotoru viru RSV (vir Rousova sarkomu) a
- druhý fragment genomu adenoviru Ad5, který umožňuje homologní rekombinaci.

2. Konstrukce rekombinantních adenovirů

2.1. Konstrukce rekombinantního adenoviru s delecí v oblasti E1, nesoucího obě rekombinantní DNA vložené ve stejné orientaci v úrovni oblasti E1

Vektor pAD5-gp19k-beta-gal byl linearizován a kotransfekován s deficitním adenovirálním vektorem v genu E1 do buněk helper (řada 293) přinášejících v trans funkce kódované oblastmi E1 (E1A a E1B) adenoviru.

Přesněji definováno, adenovir Ad-gp19k-beta-gal,delta E1 se získá homologní rekombinací in vivo mezi adenovirem Ad-RSVbeta-gal (viz Stratford-Perricaudet, kterýžto odkaz byl citován výše) a vektorem pAD5-gp19k-beta-gal podle následujícího protokolu: plasmid pAD5-gp19k-beta-gal linearizovaný pomocí XmnI a adenovir Ad-RSVbeta-gal linearizovaný enzymem ClaI se kotransfekují do buněčné řady 293 v přítomnosti fosforečnanu vápenatého za účelem umožnění homologní rekombinace. Takto generované rekombinantní adenoviry se potom selekují purifikací na desce. Po izolaci se DNA rekombinantního adenoviru amplifikuje v buněčné řadě 293, což vede k supernatantu nad kultivačním prostředím obsahujícím nepurifikovaný rekombinantní defektní adenovir mající koncentraci asi 10^{10} pfu/ml.

Virální částice se obecně purifikují odstředěním na gradientu chloridu cesného o sobě známou technikou (viz zejména Graham a kol., Virology 52(1973)456). Adenovir Ad-gp19k-beta-gal,deltaE1 může být přechováván při teplotě -80°C ve 20% glycerolu.

2.2. Konstrukce rekombinantního adenoviru s delecemi v oblastech E1 a E3, nesoucího obě rekombinantní DNA vložené ve stejné orientaci v úrovni oblasti E1 (obr.4).

Vektor pAD5-gp19k-beta-gal se linearizuje a kotransfekuje adenovirálním vektorem deficitním v genech E1 a E3 do bu-

něk helper (řada 293) přinášejících v trans funkce kódované oblastmi E1 (E1A a E1B) adenoviru.

Přesněji definováno, adenovir Ad-gp19k-beta-gal,delta E1,delta E3 se získá homologní rekombinací in vivo mezi mutantním adenovirem Ad-d11324 (Thimmappaya a kol., Cell 31 (1982) 543) a vektorem pAD5-gp19k-beta-gal podle následujícího protokolu: plasmid pAD5-gp19k-beta-gal a adenovir Ad-d11324 linearizovaný enzymem ClaI se kotransfekují do buněčné řady 293 v přítomnosti fosforečnanu vápenatého za účelem umožnění homologní rekombinace. Rekombinantní adenoviry, které byly takto získány se potom selekují purifikací na desce. Po izolaci se rekombinantní adenovir amplifikuje v buněčné řadě 293, což vede k supernatantu nad kultivačním prostředím obsahujícímu nepurifikovaný rekombinantní defektní adenovir mající koncentraci asi 10^{10} pfu/ml.

Virální částice se obecně purifikují odstředěním v gradientu chloridu cesného o sobě známou technikou (viz zejména Graham a kol., Virology 52(1973)456). Genom rekombinantního adenoviru byl potom ověřen analýzou southern blot. Adenovir Ad-gp19k-beta-gal,deltaE1,deltaE3 může být přechováván při teplotě -80°C ve 20% glycerolu.

Příklad 2

Prokázání imunoprotekční aktivity lékové kombinace podle vynálezu

60 dospělých myších samic DBA/2 se náhodně rozdělí do šesti skupin po deseti myších a tyto myši se ošetří podle následujícího injekčního protokolu:

-skupina 1a:

dostane intraokulární injekci $10\mu\text{g}$ monoklonálních protilátek anti-CD3 ve dnech -2, -1, 1, -2, 3, 4 a -5 a v den 0 dostane intravenózní injekci $4 \cdot 10^9$ pfu viru Ad-RSVbeta-gal (viz

Stratford-Perricaudet a kol, viz výše),

-skupina 1b:

je ošetřena stejným způsobem jako skupina 1a za použití koncentrace viru $4 \cdot 10^9$ pfu viru Ad-gp 19k-beta-gal (obr.4),

-skupina 2a:

dostane intraperitoneální injekci 250 μ g monoklonálních protilátek anti-CD4 ve dnech -2, -1, 1, 4 a 7 a v den 0 dostane intravenózní injekci $4 \cdot 10^9$ pfu viru Ad-RSVbeta-gal,

-skupina 2b:

je ošetřena stejným způsobem jako skupina 2a za použití virální koncentrace $4 \cdot 10^9$ pfu viru Adgp19k-beta-gal,

-skupina 3a:

dostane intravenózní injekci $4 \cdot 10^9$ pfu Ad-beta-gal bez současného podání imunosupresoru a

-skupina 3b:

dostane intravenózní injekci $4 \cdot 10^9$ pfu Ad-gp19k-beta-gal bez současného podání imunosupresoru.

V různých časech byly vždy dvě zvířata z každé skupiny utracena za účelem odběru jater a sleziny.

2.1. Imunofluorescentní analýza rozdělení hlavních subpopulací lymfocytů (CD3+, CD4+ a CD8+) uvnitř splénocytů odebraných v den 15 po injekci

Suspenze izolovaných buněk se připraví z odebraných slezin. Vzorek těchto buněk se analyzuje imunofluorescenčně pomocí specifických protilátek pro každou lymfocytovou subpopulaci. Odečítání fluořescentních buněk bylo provedeno za po-

užití cytofluorometru (FACS Schan-Becton Dickinson). Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce I.

Tabulka I

	Skupina 3a Ad-βgal		Skupina 3b Ad-βgal- gp19k		Skupina 1a anti CD3/ Ad-βgal		Skupina 2a anti CD4/ Ad-βgal	
	% buněk exprimujících beta-gal na povrchu buněk							
CD3	20,4	17,5	20,6	21	5,4	6,1	12	10,3
CD4	13,4	12,6	15,3	16,8	4,4	5,1	2,7	4,1
CD8	5,5	5,5	6,1	6	20,2	23	7,9	6,7

Z tabulky je zřejmý jednoznačný úbytek buněk CD3+, CD4+ a CD8+ u zvířat ošetřených protilátkou anti-CD3 a selektivní úbytek buněk CD4+ u zvířat ošetřených protilátkou anti-CD4.

2.2. Analýza cytotoxické kapacity splenocytů odebraných v den 32 po injekci a stimulovaných in vitro vůči histokompatibilním cílům exprimujícím beta-gal

Druhý vzorek splenocytů izolovaných z ošetřených zvířat byl kultivován in vitro po dobu 4 dnů v přítomnosti buněk P815 exprimujících na jejich povrchu beta-galaktosidázu. Po ukončení kultivace se vyhodnotí cytotoxická aktivita splenocytů vůči cílovému P815-beta-gal značenému radioaktivním izotopem Cr⁵¹. Cytotoxická aktivita vyjádřená procentickou cytolyzou byla stanovena konvenčním způsobem v přítomnosti různých poměrů efektivních buněk a cílových buněk. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce II.

Tabulka II

Skupina	2b	3A
Ošetření	Anti-CD4/ Ad-βgal-gp19k	AD-βgal
Poměr efektivních a cílových buněk	Cytolýza (%)	
80/1	4 2	13 14
40/1	2 1	13 9
20/1	1 1	5 9
10/1	0 0	2 5
5/1	0 1	1 2

Splenocyty, odebrané zvířatům, která byla ošetřena protilátkou CD4, tj. zvířatům skupiny 2b, vykazují jednoznačnou neutralizaci jejich cytotoxické kapacity.

2.3. Expresa aktivity beta-galaktosidázy v játrech po 15 a 32 dnech

Játra se rozdělí na úseky a vybarví X-gal za účelem zviditelnění (vyvíjení) aktivity beta-galaktosidázy a eosinem za účelem zviditelnění histologie řezu. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce III

Tabulka III

	Počet buněk exprimujících βgal	
	15	32
Skupina 2a: (anti-CD4/ Ad-βgal)	1	1
Skupina 2b: (anti-CD4/ Ad gp19k- βgal)	250	50
Skupina 3a: (Ad-βgal)	3	0
Skupina 3b: (Ad gp19k-βgal)	25	0

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že injekce protilátky anti-CD4 sdružená s injekcí Adgp19k-beta-gal indukuje výrazně prolongovanou expresi uvažovaného genu. Takto je možné pozorovat 30 dnů po injekcích v případě skupiny 2b významnou beta-galaktosidázovou aktivitu. Toto prodloužení, které může být interpretováno jako důsledek jevu tolerance indukovaného podle vynálezu, je výrazně větší, než je prodloužení, které by bylo možné očekávat v případě jednoduchého součtu účinků imunosupresoru anti-CD4 a rekombinantního adenoviru Ad gp19k -beta-gal.

Navíc nebyla po 30 dnech v případě skupiny 2b pozorována žádná zánětová reakce.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Léková kombinace alespoň jednoho imunosupresního činidla a alespoň jednoho rekombinantního adenoviru, jehož genom obsahuje první rekombinantní DNA obsahující terapeutický gen a druhou rekombinantní DNA obsahující imunoprotekční gen pro následné, přerušované nebo/a časově současné použití vhodné pro exogenovou transfekci in vivo nebo/a ex-vivo.

2. Léková kombinace podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že imunosupresní činidlo se výhodně zvolí z množiny zahrnující cyklosporin, FK506, azathioprin, kortikosteroidy a monoklonální a polyklonální protilátky.

3. Léková kombinace podle nároku 2, v y z n a č e n á t í m , že se jedná o protilátky schopné inaktivovat imunní molekuly nebo vyvolat destrukci buněk nesoucích tyto molekuly.

4. Léková kombinace podle nároku 3, v y z n a č e n á t í m , že protilátka se zvolí z množiny zahrnující anti-CD4, anti-CD2, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD28, anti-B7, anti-ICAM-1, anti-LFA-1 a CTLA4Ig.

5. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že terapeutický gen kóduje terapeutický protein.

6. Léková kombinace podle některého z nároků 1 až 4, v y z n a č e n á t í m , že terapeutický gen kóduje terapeutickou RNA.

7. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že imunoprotekčním genem je gen, jehož produkt působí na aktivitu hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) nebo na aktivitu cytokinů.

8. Léková kombinace podle nároku 7, v y z n a č e n á t í m , že imunoprotekčním genem je gen, jehož produkt inhibuje alespoň částečně expresi proteinů komplexu MHC nebo antigenovou prezentaci.

9. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že imunoprotekční gen je zvolen z množiny zahrnující gen gp19k adenoviru, gen ICP47 viru herpes a gen UL18 cytomegaloviru.

10. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA genomu adenoviru tvoří jedinou transkripční entitu.

11. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA obsahují každá svůj transkripční promotor, přičemž tyto promotory jsou buď identické nebo odlišné.

12. Léková kombinace podle nároku 11, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA jsou vloženy ve stejné orientaci.

13. Léková kombinace podle nároku 11, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA jsou vloženy v opačné orientaci.

14. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA jsou vloženy do stejného místa genomu adenoviru, výhodně v úrovni oblastí E1, E3 nebo E4.

15. Léková kombinace podle nároku 14, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA jsou vloženy v úrovni oblasti E1.

16. Léková kombinace podle některého z nároků 1 až 13, v y z n a č e n á t í m , že obě rekombinantní DNA jsou vloženy do různých míst genomu adenoviru.

17. Léková kombinace podle nároku 16, v y z n a č e n á t í m , že jedna z rekombinantních DNA je vložena v úrovni oblasti E1 a druhá rekombinantní DNA je vložena v úrovni oblasti E3 nebo E4.

18. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že adenovirem je defektní rekombinantní adenovir obsahující sekvence ITR a sekvenci umožňující enkapsidaci, a nesoucí delecí celku nebo části genů E1 a E4.

19. Léková kombinace podle nároku 18, v y z n a č e n á t í m , že se jedná o adenovir obsahující sekvence ITR a sekvenci umožňující enkapsidaci, a nesoucí delecí celku nebo části genů E1, E3 a E4.

20. Léková kombinace podle některé z nároků 1 až 19, v y z n a č e n ý t í m , že se jedná o adenovir, jehož genom je delecí zbaven celku nebo části genů E1, E3, E5 a E4.

21. Léková kombinace podle některého z předcházejících ná-

roků, v y z n a č e n ý t í m , že rekombinantní adenovir je lidského, zvířecího nebo smíšeného původu.

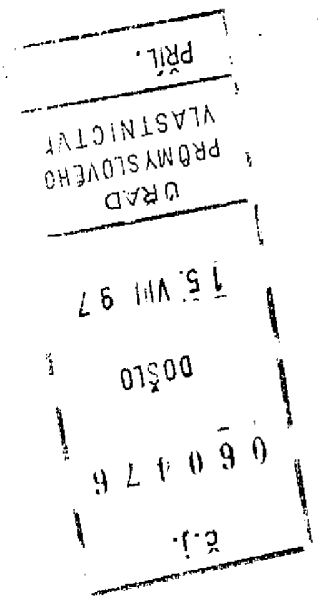
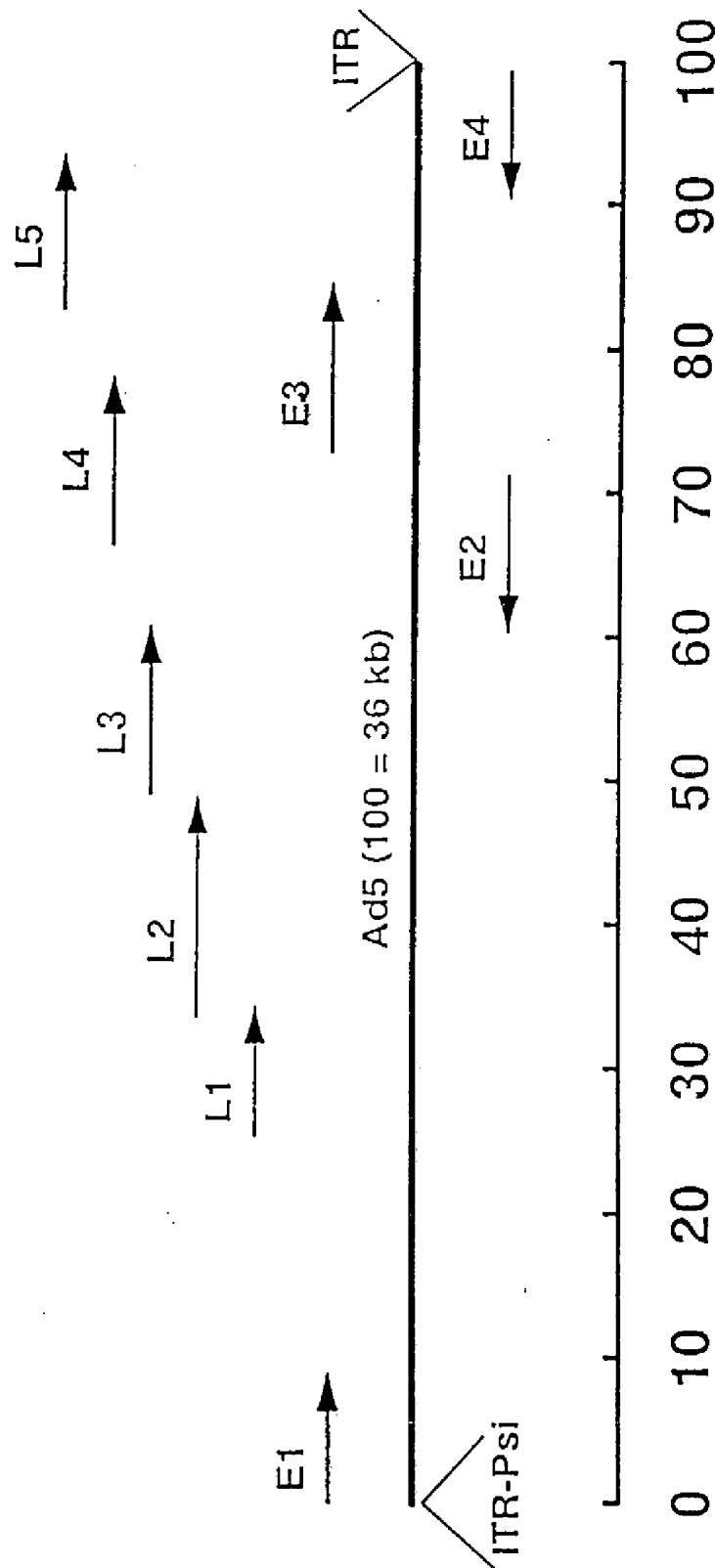
22. Léková kombinace podle nároku 21, v y z n a č e n á t í m , že rekombinantní adenoviry lidského původu jsou zvoleny z adenovirů zařazených do skupiny C, výhodně z rekombinantních adenovirů typu 2 nebo 5 (Ad 2 nebo Ad 5).

23. Léková kombinace podle nároku 22, v y z n a č e n á t í m , že adenoviry zvířecího původu jsou zvoleny z množiny zahrnující psí, bovinní, murinní, ovčí, prasečí, ptačí a opičí adenoviry.

24. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že imunosupresní činidlo je injikováno před a po injekci adenoviru.

25. Léková kombinace podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že imunosupresní činidlo a rekombinantní adenovir se injikují současně.

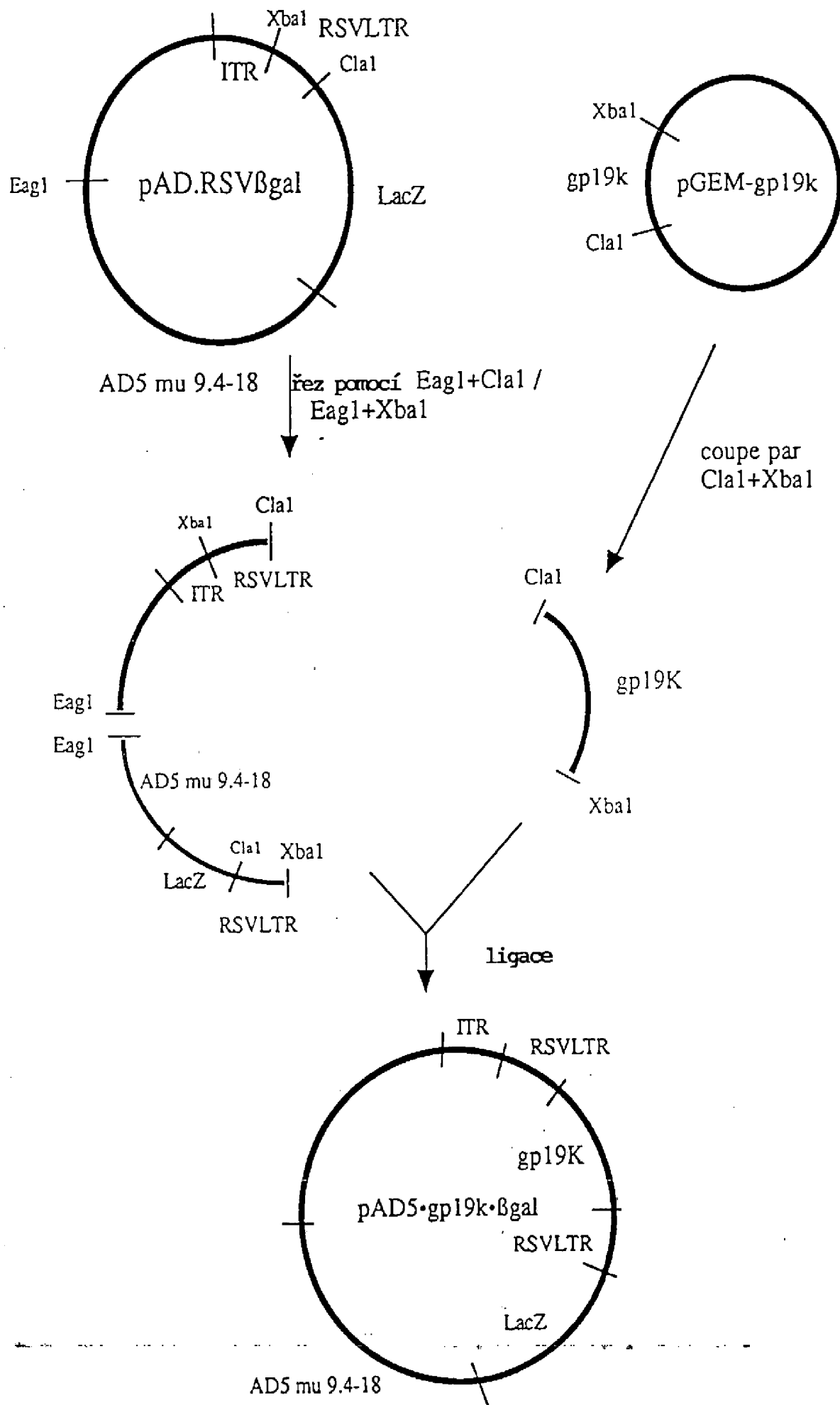
Zastupuje :

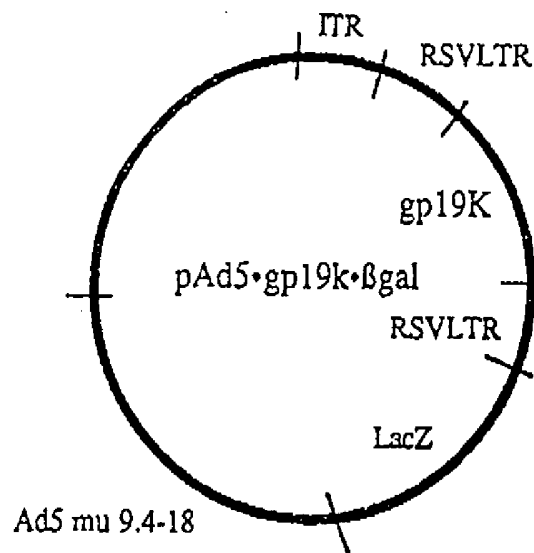


C JK A G E I F B D H Pst I

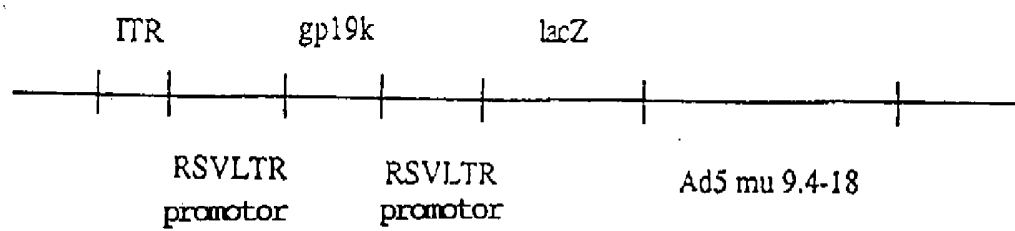
A B Sal I

I C E F GH A B D J Sma I





linearizace



rekombinace

génom dl324

Ad-gp19K-lacZ

