

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-1791**
(22) Přihlášeno: **17.11.1998**
(30) Právo přednosti: **17.11.1997 FR 1997/14383**
(40) Zveřejněno: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)
(47) Uděleno: **20.10.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **26.11.2008**
(Věstník č. 48/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/FR1998/002453**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/025861**

(11) Číslo dokumentu:

299 797

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 96/30534, WO 96/13596, WO 97/00326.

Morgenstern J.P. and Land H.L.: "Advanced mammalian gene transfer: High titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line", Nucleic Acids Res., Vol. 18(12), 3587-3596, 1990.

(73) Majitel patentu:

GENCELL SA, Vitry sur Seine, FR

(72) Puvodce:

Crouzet Joël, Sceaux, FR

Robert Jean-Jacques, Sceaux, FR

Vigne Emmanuelle, Ivry sur Seine, FR

Yeh Patrice, Gif sur Yvette, FR

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Metody snížení výskytu homologních
rekombinací, adenovirové vektory a buňky
obsahující defektní adenovirus**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu snížení výskytu rekombinací mezi nukleovými kyselinami. Týká se také využití této metody při produkci defektních viru, které nejsou kontaminovány replikujícími se částicemi. Rovněž se dále týká nových virových konstruktů.

CZ 299797 B6

Metody snížení výskytu homologních rekombinací, adenovirové vektory a buňky obsahující defektní adenovirus

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu snížení výskytu událostí homologní rekombinace mezi nukleovými kyselinami. Týká se také použití těchto metod ve způsobech pro přípravu nukleových kyselin jako jsou plazmidy nebo virové vektory. Předkládaný vynález se také týká nových virových konstruktů.

Dosavadní stav techniky

15 Rekombinace mezi nukleovými kyselinami je v molekulární biologii dobře známý jev. Rekombinace je molekulární mechanismus, kterým vznikají nové kombinace genetického materiálu, což přispívá k Darwinovské evoluci tím, že poskytuje zdroj materiálu pro přírodní výběr. Genetická rekombinace, která vyžaduje silnou sekvenční homologii mezi zúčastněnými nukleovými kyselinami se obecně označuje jako homologní rekombinace. V průběhu homologní rekombinace dojde k výměně genetické informace mezi dvěma úseky nukleové kyseliny, přičemž tato výměna může být reciproká (pak jde o tzv. „crossing-over“) nebo nerekiproká (pak jde o tzv. konverzi).

V průběhu meioze je homologní rekombinace zodpovědná za změny v uspořádání genetické informace a hraje důležitou roli ve správné segregaci chromozómů. V průběhu mitózy se homologní rekombinace podílí na reparacích DNA. V jejím důsledku může dojít ke změnám uspořádání genomu jako jsou např. delece a duplikace, jestliže se účastní dispergované homologní úseky, nebo také kontrakce nebo expanze, pokud zahrnuje tandemově opakované sekvence (tandemové repetice).

30 Mechanismus, který probíhá homologní rekombinace, byl z části objeven. Tak např. v bakteriích homologní rekombinace začíná krokem, který zahrnuje jednořetězcový konec (Holliday 1964, Meselson 1975). Naproti tomu v eukaryotických organismech většina dosavadních výsledků předpokládá mechanismus dvouřetězcového zlomu (DSB, „double strand break“, Szostak et al., 1983). DSB se vyskytuje na počátku dvou hlavních mechanismů homologní rekombinace, a sice konzervativního, podle kterého všechny nukleové kyseliny účastnící se v rekombinaci jsou přítomné v rekombinačních produktech (Szostak et al.), a druhého nekonzervativního, při kterém dojde ke ztrátě některých sekvencí. V somatických buňkách saveců se většina událostí homologních rekombinací formou DSB odehrává nekonzervativním způsobem (Lin et al., 1990, Jeong-Yu, 1992).

40 S neustálým rozvojem biotechnologií dochází ke stále většímu využívání DNA: pro produkci rekombinantních proteinů, k vytváření transgenních zvířat, pro genovou terapii a pod. V těchto různých oblastech může nekontrolovaná rekombinační událost představovat v některých případech značnou nevýhodu.

45 Tak např. v případě produkce rekombinantního proteinu, rekombinace (rekombinační události) v expresním plazmidu mohou (intramolekulární rekombinace) mohou vést k vystřížení expresní kazety pro transgen a tím ke ztrátě exprese. Rekombinace může být také počátkem vystřížení expresní kazety, která je stabilně integrována v genomu hostitelských produkčních buněk a tak indukovat ztrátu stability.

55 Jiným příkladem nepříznivých účinků spojených s výskytem událostí homologní rekombinace je výskyt homologní rekombinace v průběhu konstrukce a přípravy vektorů, zvláště virových vektorů. Virové vektory (adenoviry, retroviry, adeno-asociované viry, herpetické viry atd.) představují zvláště účinné prostředky pro přenos nukleových kyselin do buněk *in vitro*, *ex vivo* nebo *in vivo*.

Pro konstrukci defektních virových vektorů se úseky, které jsou nezbytné pro replikaci viru divokého typu, obecně řečeno, odstraní z genomu a nahradí se požadovanou nukleovou kyselinou. Aby bylo možné pak tyto viry produkovat a amplifikovat, je třeba komplementovat (tzv. v *trans*) odstraněné funkce (buďto v plazmidu nebo ve formě, která je integrována v genomu produkčních buněk, nebo tzv. pomocným virem helperem). Avšak v některých případech dochází k výskytu událostí homologní rekombinace i mezi defektním virovým genomem a komplementující funkcí, čímž se mohou rekonstituovat replikující se virové částice. Takže vektory získané z adenovirů se obecně množí v komplementačních buněčných liniích (např. linie 293 nebo linie s ní příbuzné), do nichž byla integrována část virového genomu. Konkrétně linie 293 obsahuje levou část (asi 11 až 12 %) genomu adenoviru sérotypu 5 (Ad5), která obsahuje levý úsek ITR, enkapsidační úsek a úsek E1 včetně E1a, E1b a část úseku kódujícího proteiny pIX a IVa2. Tato linie je schopná komplementovat v *trans* rekombinantní adenoviry, které jsou defektní v úseku E1, tj. postrádají celý nebo část úseku E1, který je nezbytný pro replikaci. Avšak existují úseky homologie mezi úsekem adenoviru, který je integrován do genomu buněčné linie a DNA rekombinantního viru, jehož produkce je požadována. Z tohoto důvodu může docházet k různým rekombinačním událostem v průběhu produkce viru, čímž vznikají replikující se virové částice, zejména adenoviry typu E1+. Jak ukazuje obr. 1, může jít o jednoduchou rekombinační událost, po které následuje zlom chromozómu (obr. 1A) nebo dvojitou rekombinací (obr. 1B). Tyto dva typy modifikace vedou k nahrazení levé části rekombinantní DNA, která postrádá funkční úsek E1, odpovídajícím úsekem, který je přítomen v buněčném genomu a který nese funkční kopii úseku E1. Avšak vzhledem k vysokému titru rekombinantních vektorů produkovaných linií 293, pravděpodobnost výskytu takovýchto rekombinantních událostí je velmi vysoká. Skutečně bylo zjištěno, že mnoho várek defektních rekombinantních adenovirových vektorů je kontaminováno replikujícími se virovými částicemi.

Přítomnost replikujících se virových částic představuje značnou nevýhodu při aplikacích přenosu genů *in vitro* nebo *in vivo* (značné riziko množení viru a jeho nekontrolovaného rozšíření).

Stejná problematika existuje při vytváření defektních retrovirů. Konstrukce defektních retrovirů se provádí obecně tak, že se odstraní virové kódující úseky (geny gag, pol a env), které jsou nahrazeny v *trans* produkční buněčnou linií. Zde opět existují pro některé popsané linie překrývající se úseky mezi genomem defektních retrovirů a komplementujícími funkcemi (tj. geny) nesenými produkčními buňkami. Zejména se to týká buněk PA317, Psi2 a dalších. Tudíž v těchto úsecích může docházet k událostem homologní rekombinace, čímž mohou vznikat replikující se virové částice.

Předkládaný vynález se týká způsobu snížení frekvence rekombinací mezi dvěma danými nukleovými kyselinami a tím minimalizace dopadu této události na biologické procesy.

Konkrétněji se předkládaný vynález týká způsobu snížení frekvence homologních rekombinací mezi dvěma danými nukleovými kyselinami nebo dvěma úseky nukleových kyselin.

V dosavadním stavu techniky byly ke snížení výskytu homologní rekombinace užity různé způsoby založené na shodném principu: nahradit nebo odstranit úseky homologie. Určité plazmidy, které dovolují expresi požadovaných genů, nesou úseky, které jsou homologní s genomem hostitelské buňky. Může to být zejména promotorový úsek, markerový gen nebo replikační počátek. Aby se snížilo riziko rekombinace, bylo navrženo nahradit tyto úseky jinými, které nejsou homologní (např. tedy jiným promotorem a pod.). Navíc bylo navrženo, aby se omezilo riziko rekombinace v průběhu produkce virových vektorů, odstranit takové sekvence, které jsou homologní mezi komplementujícími geny a defektním virovým genomem.

Patentová přihláška WO 97/00326 popisuje buněčnou linii pro produkci adenovirů, označenou PER, která obsahuje omezenou část adenovirového genomu nesoucí úsek E1. V této linii jsou okrajové sekvence, které jsou homologní s genomem defektního viru, omezeny, což snižuje možné riziko homologní rekombinace mezi těmito úseky. Podobně v patentové přihlášce

WO 95/11984 je popsána konstrukce rekombinantního adenoviru nesoucího delecí úseku E1, která zasahuje až do části genu pIX. V takovém případě to již není úsek, který je modifikován, ale delecie je nesená defektním genomem viru a je rozšířena. Výsledkem je také snížení rizika výskytu rekombinace, i když úseky homologie zůstávají.

5

Avšak zatímco tyto způsoby umožnily snížit riziko homologní rekombinace mezi buněčným a virovým genomem, a tím riziko, že vzniknou várky viru, který je kontaminován replikujícími se virovými částicemi, neumožňují eliminovat toto riziko úplně a/nebo vyžadují konstrukci a ověření nových buněčných linií, což je velmi pracné. A navíc nahrazení úseků jinými není vždy dostatečné, zejména pokud jde o účinnost.

10

Podstata vynálezu

15

Předkládaný vynález popisuje nový způsob snížení inter- a intramolekulárních homologních rekombinací. Vynález také popisuje použití těchto způsobů k produkci defektních virů, které nejsou kontaminovány replikujícími se virovými částicemi. Vynález dále popisuje nové virové konstrukty, které mohou být amplifikovány v již existujících buněčných liniích, které jsou z hlediska titru neúčinnější, a přitom se značně sníženým rizikem vzniku replikujících se virových částic.

20

Počáteční důležitý krok homologní rekombinace je vzájemné rozpoznání mezi dvěma nukleovými kyselinami (intermolekulární rekombinace) nebo mezi dvěma úseky téže molekuly (intramolekulární rekombinace). Tento krok je výsledkem přímé interakce mezi dvěma homologními úseky.

25

Homologní rekombinace mezi dvěma nukleovými kyselinami je založena na existenci sekvenční identity nebo silné sekvenční homologie mezi dvěma úseky těchto nukleových kyselin a obecně je závislá na dvou faktorech: míře homologie a délce homologního úseku (tj. homologních úseků nesených nukleovou kyselinou nebo dvěma nukleovými kyselinami). Navíc frekvence výskytu homologní rekombinace je ovlivněna některými specifickými úseky nukleových kyselin. Bylo pozorováno, že některé úseky jsou schopny rekombinace s vyšší frekvencí než průměrnou. Bylo zjištěno, že tyto lokalizované variace ve frekvenci mohou být způsobeny specifickými sekvenčními místy jako jsou CHI místa v *E. coli* nebo M26 místa v *S. pombe* (Gangloff et al., 1994).

35

Na rozdíl od strategie využití ve způsobech dle dosavadního stavu techniky, způsoby podle předkládaného vynálezu nejsou založeny na delecí (odstranění) úseků homologie v partnerských molekulách nukleové kyseliny. Způsob podle vynálezu je založen originálním způsobem na modifikaci sekvence alespoň jedné ze dvou partnerských nukleových kyselin potenciálně rekombinujících, a to takové, aby se snížila homologie, která mezi těmito nukleovými kyselinami existuje.

40

První předmět předkládaného vynálezu se týká způsobu redukce frekvence intra- nebo intermolekulární homologní rekombinace mezi nukleovými kyselinami, který spočívá v tom, že je sekvence alespoň jedné z rekombinujících partnerských nukleových kyselin degenerována takovým způsobem, že je snížena homologie s druhým partnerem.

45

V popisu předkládaného vynálezu termín „snížení (redukce) frekvence homologních rekombinací“ mezi nukleovými kyselinami znamená jakékoliv snížení této frekvence vzhledem k frekvenci pozorované s odpovídajícími nemodifikovanými nukleovými kyselinami. Tato redukce se dá snadno měřit konvenčními testy, které jsou odborníkovi známy (zejména testem „marker rescue“ nebo testem generace replikujících se virových částic). Výhodně termín „snížení“ nebo „redukce“ znamená významné snížení ve frekvenci homologní rekombinace, výhodně alespoň řádu jedné logaritmické jednotky.

55

„Intermolekulární homologní rekombinace“ znamená homologní rekombinaci, ke které dochází mezi dvěma různými nukleovými kyselinami (nebo mezi dvěma úseky dvou odlišných nukleových kyselin). „Intramolekulární homologní rekombinace“ znamená homologní rekombinaci mezi dvěma úseky jedné a téže nukleové kyseliny. Partnerské nukleové kyseliny v homologní rekombinaci mohou být extrachromozomální nukleové kyseliny, chromozomální nukleové kyseliny nebo kombinace obou těchto možností (tj. chromozomální a extrachromozomální nukleová kyselina). Extrachromozomální nukleové kyseliny jsou plazmidy, vektory, epizomy, virové genomy a pod.

Způsob podle předkládaného vynálezu je zvláště, vhodný k redukci frekvence intermolekulární homologní rekombinace mezi chromozomální nukleovou kyselinou a extrachromozomální nukleovou kyselinou.

Způsob podle vynálezu obecně obsahuje následující kroky:

- I) identifikaci úseku (úseků) zodpovědných za homologní rekombinaci,
- II) modifikaci tohoto úseku (nebo úseků),
- III) ověření sekvence,
- IV) syntézu modifikované sekvence (nazvané syngen) a
- V) náhradu původní sekvence syngemem.

I) Identifikace úseku zodpovědného za homologní rekombinaci mezi nukleovými kyselinami

Identifikace úseku (úseků) zodpovědného za homologní rekombinaci mezi nukleovými kyselinami se provede známými metodami. Konkrétně, jakmile je pozorována rekombinace, zkoumají se sekvencováním úseky za ni zodpovědné, tj. vyšetří se homologní úseky mezi nukleovými kyselinami (intermolekulární) nebo uvnitř nukleové kyseliny (intramolekulární). Když jsou identifikovány sekvence účastníci se rekombinace, je definován příslušný úsek, obsahující celou nebo část těchto sekvencí, které se pak užijí pro následující krok II, čili modifikaci.

II) Modifikace sekvencí

Obecně se má za to, že homologie musí být velmi vysoká v dostatečně dlouhém úseku, aby docházelo k rekombinačním událostem s dostatečnou frekvencí. Zejména údaje z odborné literatury předpokládají, že úsek úplné homologie velikosti 200 bp je nutný pro výskyt těchto rekombinačních událostí. A skutečně, i když k rekombinacím může docházet i s kratšími úseky, jejich frekvence je mnohem nižší a nepravidelná. Kromě toho, u takových úseků, kde je homologie snížena o 19 % se její frekvence rekombinace snížena faktorem 1000 (Waldman a Liskay, 1987).

Sekvence mohou být modifikovány různými způsoby. Pokud se týká kódující sekvence, lze vnášet modifikace založené na degeneraci genetického kódu. Tímto způsobem se naruší sekvence a tedy sníží homologie, ale expresní produkt zůstane shodný.

Předkládaný vynález tudíž spočívá zejména v modifikaci sekvence takovým způsobem, aby se zabránilo párování mezi dvěma homologními úseky. Modifikace umožňuje snížit délku a míru homologie mezi dvěma požadovanými úseky.

Výhodně je ve způsobu podle vynálezu sekvence nukleové kyseliny degenerována v úseku, který se účastní homologní rekombinace, a sice v poměru 1 pár bází na každých alespoň 20 párů bází. Ještě výhodněji v poměru 1 pár bází na každých alespoň 10 párů bází.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu je sekvence degenerována ve všech pozicích, kde je to možné.

Degenerovanost sekvence podle předkládaného vynálezu se výhodně vytváří jako funkce využití kodonů v buňce nebo organismu, kde se má požadovaná nukleová kyselina užít. V případě virového vektoru, který je produkován v lidské buněčné linii, je zvláště výhodné degenerovat sekvenci tím, že se upřednostní kodony využívané lidskými buňkami, je-li takový výběr možný (viz příklady).

Navíc mohou být vneseny do sekvence nukleové kyseliny další modifikace. Tak v nekódujícím úseku je možné zmenšit velikost některých prvků (expresní regulační sekvence, promotory) nebo modifikovat tyto prvky nebo určité prvky nahradit heterologními úseky.

Podle zvláště výhodného provedení vynálezu je možné, pokud zóna homologie zasahuje několik genů, zmenšit zónu homologie, a sice na jedné straně degenerací sekvencí jednoho nebo několika genů, a na druhé straně modifikací genomové polohy určitých genů přítomných v zóně homologie, tj. uspořádat tyto geny v adenovirovém vektoru a v genomu jinak, než je původní uspořádání. Sekvence genů, jejichž genomová pozice je modifikována, může být také degenerována. Výhodně je degenerována pouze sekvence genu, které nejsou přemístěny.

III) Verifikace sekvence

Verifikace sekvence se provádí metodou zpracování dat, která umožňuje detekovat přítomnost regulačních prvků, sekundárních struktur atd., které jsou náchylné k interferenci s aktivitou syngenu. Další podrobnosti viz příklady.

IV) Syntéza syngenu

Syngen může být syntetizován jakýmkoliv způsobem odborníkovi známým, zejména pomocí zařízení pro syntézu nukleových kyselin (syntetizátoru).

V) Náhrada původní sekvence syngemem

Syngen jakmile je syntetizován, se vnese do nukleové kyseliny jako náhrada za původní sekvenci. Tento krok je také možné provést konvenčními způsoby molekulární biologie, které jsou odborníkovi dobře známy.

Jedna z aplikací způsobu podle předkládaného vynálezu spočívá v tom, že se připraví vektory, zejména virové vektory, zbavené replikačně-kompetentních virových částic (RCV). Z tohoto hlediska se způsob podle vynálezu týká zejména snížení frekvence homologních rekombinací mezi chromozomální nukleovou kyselinou, která kóduje komplementující funkce pro defektní virus a extrachromozomální nukleovou kyselinou obsahující genom uvedeného defektního viru.

Virus je výhodně adenovirus, retrovirus, adenoasociovaný virus (AAV) nebo alternativně herpetický virus. Ještě výhodněji je to adenovirus.

Jedno výhodné provedení předkládaného vynálezu spočívá ve způsobu snížení frekvence homologních rekombinací mezi chromozomální nukleovou kyselinou obsahující úsek E1 adenovirového genomu, spolu s lemuující sekvencí, a extrachromozomální nukleovou kyselinou obsahující genom adenoviru, který je defektní v úseku E1.

Výhodně v tomto konkrétním způsobu degenerovaná sekvence podle předkládaného vynálezu obsahuje gen pIX z genomu adenoviru, který je defektní v úseku E1. Ještě výhodněji degenerovaná sekvence obsahuje geny pIX a IVa2 z genomu adenoviru.

V jiném provedení vynálezu degenerovaná sekvence obsahuje gen pIX genomu adenoviru a sekvence IVa2 je přemístěna ze svého původního lokusu do úseku E4.

Způsob podle vynálezu je zvláště vhodný pro přípravu rekombinantních adenovirů, které jsou defektní v úseku E1, v buněčné linii 293 nebo v buněčné linii z ní odvozené.

5 Jak bylo uvedeno výše, buněčná linie 293 obsahuje ve svém genomu levou část adenovirového genomu, obsahující zejména úsek E1 a lemující („flanking“) sekvence lokalizované po směru transkripce („downstream“) od úseku E1, které nesou zejména gen pIX a část genu IVa2. Je to právě tento úsek lemující sekvence, kde dochází k homologní rekombinaci, která vede ke vzniku replikačně kompetentních adenovirů (RCA). V popisu předkládaného vynálezu „odvozená
10 buněčná linie“ znamená buněčnou linii, která nese úsek E1 adenoviru a lemující úsek, vhodný k tomu, aby došlo k rekombinaci s defektním virem. Může to být kratší úsek, než jaký je přítomen v buňkách linie 293 (omezený např. jen na úsek pIX), nebo delší úsek. Odvozená linie může být taková linie, která byla získána z buněk linie 293 vnesením dalších komplementujících sekvencí (jako je E4).

15 V tomto směru se předkládaný vynález také týká způsobu přípravy defektních rekombinantních adenovirů tím, že se vnese, do buněk linie 293 nebo odvozené linie, genom uvedeného defektního rekombinantního adenoviru, přičemž uvedený genom nese:

- 20 – delecí v úseku E1,
- degenerovanost v genu pIX a/nebo genu IVa2.

Předkládaný vynález se dále týká jakéhokoliv virového vektoru, jehož genom obsahuje alespoň
25 jeden úsek, jehož sekvence je degenerovaná. Může to být zejména retrovirus (nesoucí degenerované sekvence genů gag, pol a/nebo env), AAV (nesoucí degenerované sekvence genů rep a/nebo cap) a také adenovirus.

Výhodně je to adenovirus, jehož genom nese degenerovaný gen pIX. Výhodně degenerovaná
30 sekvence genu pIX je sekvence id. č. 1 nebo sekvence id. č. 4. Výhodněji adenovirus nese modifikaci genomové polohy genu IVa2. Tento gen je výhodně umístěn v úseku E4.

V jiném provedení vynálezu jde o adenovirus, jehož geny pIX a IVa2 jsou degenerované. Výhodně
35 je přirozená sekvence genu pIX nahrazena sekvencí id. č. 1 nebo sekvencí id. č. 4 a degenerovaná sekvence genu IVa2 je sekvence id. č. 2 nebo sekvence id. č. 5. Výhodně je přirozená sekvence genů pIX a IVa2 nahrazena sekvencí id. č. 3.

V jiném provedení vynálezu jde o adenovirus, jehož geny pIX a IVa2 jsou degenerované a který
40 navíc obsahuje modifikace promotorové sekvence genu pIX a/nebo náhradu polyadenylační sekvence těchto genů. Výhodně je to adenovirus obsahující sekvenci id. č. 8.

Kromě toho adenovirus výhodně nese alespoň jednu delecí úseku E1. Výhodněji adenovirus je
45 defektní alespoň v celém nebo části úseku E1 a E3. Může to být také rekombinantní adenovirus, který je částečně nebo úplně defektní v úseku E1 nebo E4, případně také v úseku E3. Navíc to může být adenovirus různých sérotypů. Pokud jde o adenoviry lidského původu, je třeba uvést zejména adenoviry klasifikované jako skupina C.

Z různých sérotypů jsou ještě výhodnější podle předkládaného vynálezu adenoviry typu 2 nebo 5
50 (Ad2 nebo Ad5). Z adenovirů pocházejících z různých zvířat jsou podle předkládaného vynálezu výhodné adenoviry psiho původu, zejména všechny kmeny adenoviru CAV2 (kmen Manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800)). Jiné adenoviry zvířecího původu jsou uvedeny v patentové přihlášce WO 94/26914, která je zde zahrnuta formou odkazu. Strategie pro konstrukci adenovirů, a také místa, která lze užít pro vnesení požadovaných genů do těchto vektoru, byla již podrobně popsána ve stavu techniky, zejména v patentových dokumentech WO 95/02697, WO 96/10088,
55 WO 96/13596 nebo WO 96/22378.

Podle zvláště výhodného provedení předkládaného vynálezu je v rekombinantních adenovirech úsek E1 inaktivován delecí fragmentu PvuII–BglII zahrnujícího úsek od nukleotidu 454 do nukleotidu 3328 v sekvenci adenoviru Ad5. Tato sekvence byla publikována v odborné literatuře a je dostupná také v databázi (konkrétně Genbank č. M73260). V jiném výhodném provedení je úsek E1 inaktivován delecí fragmentu HinflI–Sau3A, který zahrnuje úsek od nukleotidu 382 do nukleotidu 3446.

Výhodně rekombinantní adenovirus podle předkládaného vynálezu obsahuje navíc heterologní sekvence nukleových kyselin, jejichž přenos a/nebo exprese v buňkách, orgánech nebo organismech je požadována.

Heterologní sekvence DNA může zejména obsahovat jeden nebo několik terapeutických genů a/nebo jeden nebo několik genů kódujících antigenní peptidy.

Terapeutické geny, které lze takto přenášet, jsou geny, jejichž transkripce a případně i translace v cílové buňce vytváří produkt, který má terapeutický účinek.

Mohou to být zejména geny kódující proteinové produkty, které mají terapeutický účinek. Takže proteinový produkt takto kódovaný může být protein, peptid, aminokyselina apod. Tento proteinový produkt je homologní vzhledem k cílové buňce (tj. je to produkt, který je normálně exprimován v cílové buňce, pokud tato buňka není v patologickém stavu). V takovém případě exprese proteinu umožňuje např. nahradit nedostatečnou expresi v buňce nebo nahradit expresi proteinu, který je inaktivní nebo slabě aktivní z důvodů modifikace, a nebo alternativně dovoluje nadměrně exprimovat uvedený protein. Terapeutické geny mohou také kódovat mutantní buněčný protein, který má zvětšenou stabilitu, modifikovanou aktivitu a pod. Proteinový produkt může být také heterologní vzhledem k cílové buňce. V takovém případě může exprimovaný protein např. komplementovat (doplňovat) nebo poskytovat aktivitu, která je v buňce nedostatečná, což umožní buňce bojovat proti patologickému stavu.

Jako příklady terapeutických produktů vhodných podle vynálezu lze zmínit zejména enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny: interleukiny, interferony, TNF atd. (viz FR 9203120), růstové faktory, nervové přenašeče nebo jejich prekurzory nebo syntetické enzymy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, VEGF, aFGF, bFGF, NT3, NT5 a pod., apolipoproteiny: ApoA1, ApoAIV, ApoE atd (viz FR 93 05125), dystrofin nebo myodistrofin (FR 9111947), tumorové supresorové geny: p53, Rb, Rap1A, DCC, k- rev, atd. (viz FR 93 04745), geny kódující faktory účastnící se koagulace: faktory VII, VIII, IX atd., geny kódující protein GAX, tzv. „samovražděné“ geny, thymidinkinázu, cytosindeaminázu atd., geny kódující jednořetězcové (scFv) protilátky.

Terapeutické geny mohou být také geny nebo „anti-sense“ sekvence (sekvence s orientací proti smyslu transkripce), jejichž exprese v hostitelské buňce umožní kontrolovat expresi genů nebo transkripci různých druhů buněčných mRNA. Takové sekvence se např.: mohou transkribovat v hostitelské buňce do RNA, která je komplementární k buněčné mRNA a tak mohou blokovat jejich translaci do proteinu, způsobem popsáným v evropském patentu EP 140 308.

Jak bylo již uvedeno výše, heterologní sekvence DNA mohou také obsahovat jeden nebo několik genů kódujících antigenní peptid, který je schopen vyvolávat imunitní reakci u člověka. V tomto konkrétním provedení vynález dovoluje produkci vakcín, které umožňují imunizovat člověka, zejména proti mikroorganismům nebo virům. Mohou to být zejména antigenní peptidy specifické pro virus Epstein-Barrové, HIV, virus hepatitidy B (viz EP 185 573), virus pseudorabies a nebo alternativně mohou být specifické pro nádory (EP 259 212).

Obecně heterologní sekvence nukleové kyseliny obsahují také promotorový úsek pro funkční transkripci v infikované cílové buňce. Může to být promotorový úsek, který je v přirozených pod-

mínkách zodpovědný za expresi genu, za předpokladu, že tento úsek je schopen funkce v infikované buňce. Mohou to být také úseky různého původu (které jsou zodpovědné za expresi jiných proteinů nebo dokonce syntetické). Zejména to jsou promotorové sekvence pocházející z eukaryotických nebo virových genů. Např. to mohou být promotorové sekvence pocházející z genomu buňky, která má být infikována. Podobně to mohou být promotorové sekvence pocházející z genomu virů, včetně užitých adenovirů. Jako příklady lze uvést promotory genů z E1A, MLP, CMV, RSV apod.

Kromě toho tyto promotorové úseky mohou být modifikovány připojením sekvencí pro aktivaci nebo regulaci, nebo které dovoluují tkáňově–specifickou nebo tkáňově–převládající expresi. Navíc pokud heterologní nukleová kyselina neobsahuje promotorové sekvence, může být vložena do genomu defektního viru po směru transkripce („downstream“) od takové sekvence.

Navíc heterologní sekvence nukleové kyseliny může obsahovat, zejména proti směru transkripce („upstream“) od terapeutického genu, signální sekvenci, která nasměruje syntetizovaný terapeutický produkt do sekretorické dráhy cílové buňky. Tato signální sekvence je buďto přirozená signální sekvence terapeutického produktu, ale také to může být jakákoliv jiná funkční signální sekvence nebo umělá signální sekvence.

Ve zvláště výhodném provedení vektory podle předkládaného vynálezu ještě navíc obsahují funkční gen E3 pod kontrolou heterologního promotoru. Výhodněji vektory obsahují úsek genu E3, který umožňuje expresi genu gp19K. Tento protein ve skutečnosti zabráňuje tomu, aby se adenovirový vektor stal předmětem imunitní reakce, která by i) omezila jeho účinky a ii) mohla mít škodlivé vedlejší účinky.

Tyto rekombinantní vektory se mohou užít k přenosu nukleových kyselin do buněk *in vitro*, *ex vivo* nebo *in vivo*.

Předkládaný vynález se také týká jakéhokoliv farmaceutického přípravku obsahujícího jeden nebo několik rekombinantních adenovirů podle vynálezu. Farmaceutické přípravky podle vynálezu mohou být formulovány z hlediska způsobu podávání pro podávání topické, perorální, parenterální, intranazální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární, transdermální a pod.

Výhodně farmaceutické přípravky podle vynálezu obsahují farmaceuticky přijatelná vehikula vhodná pro injekční přípravky. Příkladem jsou zejména izotonické, sterilní solné roztoky (dihydrogenfosforečnan a hydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý a pod. nebo směsi těchto solí) nebo jde výhodně o suché přípravky, zejména lyofilizované, které po přidání sterilní vody nebo fyziologického roztoku, v závislosti na případě, umožní vytvořit injikovatelný roztok.

Dávky viru použité pro injekci se upraví v závislosti na mnoha parametrech, zejména v závislosti na způsobu podávání, patologickém stavu, genu, který má být exprimován nebo alternativně v závislosti na požadované délce léčení. Obecně je rekombinantní adenovirus podle předkládaného vynálezu formulován a podáván v dávkách 10^4 až 10^{14} pfu/ml a výhodně 10^4 až 10^{10} pfu/ml. Termín „pfu“ (tj. „plaque forming unit“, jednotka tvořící plak) odpovídá infekčnosti (infekční síle) roztoku viru a stanovuje se infikováním odpovídající buněčné kultury a pak měřením, obecně po 5 dnech, počtu plaků infikovaných buněk. Způsoby stanovení pfu titru virového roztoku jsou popsány v odborné literatuře a jsou odborníkovi známy.

Předkládaný vynález bude dále podrobněji popsán a vysvětlen v následujících příkladech, které jsou však pouze ilustrativní a vynález nijak neomezují, a připojených obrázcích.

Popis obrázků

Obr. 1: Rekombinační události mezi adenovirem a buňkou linie 293.

5 Obr. 2: Schéma struktury syngenu.

Obr. 3: Restrikční mapa plazmidu pJJ105.

Obr. 4: Restrikční mapa plazmidu pJJ110.

10

Obr. 5: Restrikční mapa plazmidu pJJ206.

Obr. 6: Konstrukce defektního viru nesoucího syngen jako náhradu za původní úsek.

15 Obr. 7: Struktura a restrikční mapa oligonukleotidů Oligosyngen I a Oligosyngen II.

Obr. 8: Přirozená nukleotidová sekvence a degenerovaná sekvence genu pIX (sekvence id. č. 1) a odpovídající aminokyselinová sekvence.

20 Obr. 9: Přirozená nukleotidová sekvence a degenerovaná sekvence genu IVa2 (sekvence id. č. 2) a odpovídající aminokyselinová sekvence.

Obr. 10: Nukleotidová sekvence syngenu č. 1 (sekvence id. č. 3).

25 Obr. 11: Schematické znázornění homologií mezi genomem buňky 293 a rekombinantními vektory Ad5. Vektor Ad5p53 má souvislý úsek sekvenční homologie 898 nukleotidů s genomem buněk 293 „downstream“ od úseku E1. Vnesení bodových mutací snižší maximální délku úseku souvislé homologie 92 nukleotidů v případě syngenu č. 1 (AV1.7 #1 CMV p53) a 29 nukleotidů v případě syngenu č. 2 (AV 1.7 #2 CMV lacZ).

30

Obr. 12: RCA detekce vektorů ad5p53 a AV 1.7 #1 CMV pS3 po 7 po sobě následujících amplifikacích v buňkách linie 293.

Obecné metody molekulární biologie použité ve vynálezu

35

Metody běžně užívané v molekulární biologii jako je preparativní extrakce plazmidové DNA, centrifugace plazmidové DNA v gradientu chloridu cezného, elektroforéza na agarovém nebo polyakrylamidovém gelu, purifikace fragmentů DNA elektroelucí, extrakce proteinů fenolem nebo fenol/chloroformem, precipitace DNA v solném médiu etanolem nebo izopropanolem, transformace bakteriálních buněk *E. coli* atd. jsou odborníkovi dobře známy a jsou podrobně popsány v odborné literatuře (Maniatis, T. et al. „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982, Ausubel, F. M. et al. (eds.), „Current. Protocols in Molecular Biology“, John Wiley and Sons, New York, 1987).

40

45 Plazmidy pIC-20R (Invitrogen) a pBS (Stratagen) pocházejí z komerčního zdroje.

Pro účely ligace byly fragmenty DNA separovány na základě jejich velikosti elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, extrahovány fenolem nebo směsí fenol/chloroform, precipitovány etanolem a pak inkubovány v přítomnosti DNA ligázy z řádu T4 (Biolabs) podle doporučení výrobce.

50

Zaplnění přechýlujících 5'-konců bylo provedeno Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I z *E. coli* (Biolabs) podle doporučení výrobce. Odstranění přechýlujících 3'-konců bylo provedeno v přítomnosti DNA polymerázy řádu T4 (Biolabs) podle doporučení výrobce. Odstranění přechýlujících 5'-konců bylo provedeno řízeným ošetřením nukleázou S1.

55

Místně-cílená mutageneze *in vitro* syntetickými oligonukleotidy se prováděla způsobem, který vyvinuli Taylor et al. (Nucleic Acids Res. 13, 1985, 8 749–8 764) pomocí soupravy od firmy Amersham.

Enzymatická amplifikace fragmentů DNA tzv. technikou PCR (polymerázovou řetězovou reakcí, viz Saiki, R. K. et al., Science 230, 1985, 1350–13 564, Mullis, K. B., Faloona, F. A., Meth. Enzym, 155, 1987, 335–350) se prováděla pomocí teplotního cyklovače firmy Perkin Elmer Cetus podle instrukcí výrobce.

Verifikace nukleotidové sekvence se prováděla metodou podle Sangera et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1977, 5463–5467) užitím soupravy od firmy Amersham.

Buněčné linie použité ve vynálezu

Byla užita linie 293 lidských embryonálních ledvin (Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 1977, 59). Buňky této linie obsahují zejména levou část genomu lidského adenoviru Ad5 (12 %) integrovanou do svého genomu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad I

Homologní rekombinace adenoviru

První pozorování, že genom adenoviru podléhá genetické rekombinaci, bylo popsáno již před více než 25 lety ((Williams a Ustacelibi, 1971). Avšak mechanismus těchto rekombinačních událostí je dosud relativně neznámý. Bylo navrhováno, že rekombinace a replikace mohou být těsně spojeny, a jisté údaje podporují takový model rekombinace, kdy replikace vede ke vzniku specifického substrátu, který je nutný pro častý výskyt rekombinačních událostí, který je pozorován při infekci adenovirem. Jedna z důležitých otázek, na kterou je třeba znát odpověď je, jestli se virové nebo buněčné proteiny podílejí na vytváření rekombinačních meziproductů a na jejich přetvoření ve výsledné produkty rekombinace. Z tohoto hlediska zatím nebylo prokázáno, že by se některý z testovaných virových genů E1b, E4, E1a a E3 (Epstein 1991, Weinberg et al., 1986, Young 1995) podílel na rekombinačních událostech. Podobně nebylo prokázáno, že by se rekombinace účastnily buněčné proteiny. Nakonec byly navrženy dva modely rekombinace virového genomu, oba předpovídající vznik heteroduplexů (Ahern et al., 1991, Young, 1995).

Úseky zodpovědné za homologní rekombinaci mezi defektním genomem a buněčnou linií byly lokalizovány zejména v genech pIX a IVa2 adenovirového genomu. Struktura tohoto úseku, jak je přítomen v defektním genomu, je znázorněna na obr. 2.

Byly provedeny modifikace sekvence adenovirového genomu, která se účastní rekombinace s buněčným genomem. Konkrétněji řečeno, přirozená sekvence genů pIX a IVa2 byla modifikována vnesením „umlčených“ mutací, které umožnily snížit míru homologie s přirozenou sekvencí, aniž by došlo k ovlivnění struktury expresních produktů těchto genů.

Získaná sekvence, nazvaná syngen, byla užita k nahrazení odpovídající přirozené sekvence adenoviru při konstrukci defektního vektoru.

1. Identifikace úseků zodpovědných za rekombinaci

Mapovací studie ukázaly, že úsek adenovirového genomu přítomný v genomu buněk 293 odpovídá levé části adenovirového genomu a představuje přibližně 12 % tohoto genomu, tj. asi 4300 bp (Aiello et al., 1979, Spector et al., 1983). Původcem byly provedeny další mapovací experimenty pomocí PCR a bylo ukázáno, že pozice 4420 je také přítomna v genomu buněk 293. Pozice 4420 byla vybrána pro následující experimenty jako pravá hranice zóny homologie a tudíž pravá hranice syngenu. Z technických důvodů při klonování modifikovaný fragment zasahuje až do pozice 4445, kam bylo vneseno klonovací místo.

Levý konec syngenu byl vybrán tak, že leží uvnitř regulačního prvku pro expresi genu pIX, konkrétně v poloze -56 genu pIX. Skutečně bylo ukázáno, že promotor genu pIX může být redukován na úsek velikosti 56 nukleotidů. Aktivita tohoto úseku, který obsahuje vazebné místo SP1 a TATA box je srovnatelná s aktivitou fragmentu s 250 nukleotidy (Babiss et al., 1991, Matsui et al., 1989).

Zóna homologie tak byla stanovena v rozsahu od pozice 3520 do pozice 4445 genomu defektního viru (viz obr. 2).

2. Příprava modifikovaných sekvencí

Tabulka využití kodonů v genomu adenoviru Ad5 byla připravena původcem a byla využita ke stanovení optimálního využití kodonů pro expresi virových proteinů. Tato tabulka byla získána kombinací údajů získaných analýzou 10 proteinů z adenoviru: pIX, hexon, pIII, PVII, 52-55k, pPol, pTP, DBP, 23K a 19k (viz tabulka). Získané výsledky pak byly porovnány s tabulkou získanou analýzou 1 952 genů přítomných v databázi Genbank pomocí programu GCG.

Pořadí preferencí užití kodonů pak bylo stanoveno pro využití k modifikaci sekvence kodonů genů pIX a IVa2:

Když kodon užitý v přirozené sekvenci není preferovaný kodon, je užit v syngenu.

– Když kodon užitý v přirozené sekvenci je preferovaný kodon, je to pak druhý preferovaný kodon, který je užit.

– V jistých případech, např. pro vnesení restrikčních míst, užije se třetí preferovaný kodon, zejména tehdy, je-li frekvence jeho užití dostatečně blízká frekvenci užití druhého preferovaného kodonu.

V následující tabulce je ukázána frekvence využití kodonů u člověka a v adenoviru (ADV5) a pořadí preferencí u člověka (sloupec A) a pořadí preferencí adenoviru (sloupec B) a výsledný výběr pro syntézu syngenu (sloupec C).

Tabulka 1: Frekvence užití kodonů

			ADV5		Člověk		A	H	C
F	TTT	Phe	2.3	54.2%	1.5	43.0%	1	2	-
F	TTC		1.9	45.8%	2.1	57.0%	2	1	-
L	TTA	Leu	0.1	1.4%	0.6	6.0%	6	6	6
L	TTG		1.2	14.2%	1.1	12.0%	4	4	4
L	CTT	Leu	1.3	15.6%	1.1	12.0%	3	3	3
L	CTC		1.7	20.5%	1.9	20.0%	2	2	2
L	CTA		1.1	12.6%	0.6	7.0%	5	5	5
L	CTG		3	35.6%	4	43.0%	1	1	1
I	ATT	Ile	1.3	34.6%	1.5	35.0%	2	2	2
I	ATC		1.6	43.9%	2.3	52.0%	1	1	1
I	ATA		0.8	21.6%	0.7	14.0%	3	3	3
M	ATG	Met	2.6	100.0%	2.2	100.0%			
V	GTT	Val	0.9	13.1%	1	17.0%	3	3	3
V	GTC		1.4	22.2%	1.5	25.0%	2	2	2
V	GTA		0.8	12.5%	0.6	10.0%	4	4	4
V	GTG		3.3	52.5%	2.9	48.0%	1	1	1
Y	TAT	Tyr	0.8	21.6%	1.2	41.7%	2	2	2

Y	TAC		3	78.4%	1.7	59.3%	1	1	1
*	TAA	end			0.1	23.8%			
*	TAG				0.1	16.7%			
H	CAT	His	0.5	21.3%	1.4	59.3%	2	1	-
H	CAC		1.7	78.7%	1	40.7%	1	2	-
Q	CAA	Gln	1.1	27.4%	1.2	26.7%	2	2	2
Q	CAG		3	72.6%	3.3	73.3%	1	1	1
N	AAT	Asn	1.2	24.5%	1.6	43.5%	2	2	2
N	AAC		3.6	75.5%	2.1	56.5%	1	1	1
K	AAA	Lys	1.4	35.2%	2.2	39.8%	2	2	2
K	AAG		2.5	64.8%	3.4	60.2%	1	1	1
D	GAT	Asp	1.6	29.2%	2.1	44.2%	2	2	2
D	GAC		3.9	70.8%	2.7	55.8%	1	1	1
E	GAA	Glu	2.4	37.0%	2.8	41.5%	2	2	2
E	GAG		4.1	63.0%	3.9	58.5%	1	1	1
S	TCT	Ser	0.8	11.7%	1.4	18.0%	4	3	3
S	TCC		1.7	25.9%	1.7	23.2%	2	2	2
S	TCA		0.6	9.6%	1.1	14.7%	5	4	4
S	TCG		0.9	13.6%	0.4	5.9%	3	6	5
P	CCT	Pro	1.2	18.4%	1.8	29.0%	4	2	2
P	CCC		2.7	39.9%	2.1	33.0%	1	1	1
P	CCA		1.3	18.7%	1.7	27.0%	3	3	3

P	CCG		1.5	23.0%	0.1	11.0%	2	4	4
T	ACT	Thr	1.1	17.7%	1.3	23.0%	2	3	2
T	ACC		3.3	55.0%	2.2	38.0%	1	1	1
T	ACA		0.8	12.8%	1.5	27.0%	4	2	4
T	ACG		0.9	14.5%	0.1	12.0%	3	4	3
A	GCT	Ala	1.2	13.7%	2	28.0%	3	2	2
A	GCC		4	45.7%	2.8	40.0%	1	1	1
A	GCA		1.1	12.6%	1.6	22.0%	4	3	3
A	GCG		2.4	27.9%	0.7	10.0%	2	4	4
C	Cys	TGT	0.3	21.5%	1	41.8%	2	2	2
C		TGC	1.1	78.5%	1.4	58.2%	1	1	1
*	end	TGA			0.3	61.9%			
W	Trp	TGG	1.3	100.0%	1.5	100.0%			
R	Arg	CGT	0.8	10.4%	0.5	9.3%	3	6	6
R		CGC	4.1	52.4%	1.1	19.4%	1	3	1
R		CGA	0.6	7.0%	0.6	10.0%	5	5	5
R		CGG	1.1	13.9%	1	18.6%	2	4	2
S	Ser	AGT	0.4	6.6%	1	13.6%	6	5	6
S		AGC	2.1	32.6%	1.9	24.7%	1	1	1
R	Arg	AGA	0.5	6.2%	1.2	21.0%	6	2	4
R		AGG	0.8	10.2%	1.2	21.7%	4	1	3

G	Gly	GGT	1	17.7%	1.4	18.3%	4	4	4
G		GGC	2.4	41.3%	2.5	33.2%	1	1	1
G		GGA	1.3	21.5%	1.9	25.7%	2	2	2
G		GGG	1.1	19.4%	1.7	22.8%	3	3	3

Do prvního příkladu specifického syngenu (syngen č. 1) byly vneseny následující modifikace:

- 5 – V promotoru pIX: sekvence byla redukována jak nejvíce to bylo možné: zbylý fragment obsahoval pouze 56 nukleotidů místo 135 nukleotidů původního vektoru. Další modifikaci lze provést vnesením modifikace 9 nukleotidů umístěných mezi vazebným místem SP1 a TATA boxem.

10 V genu pIX: všechny pozice, kde to bylo možné, byly degenerovány, a sice podle pravidel uvedených výše, aniž by došlo ke změně výsledné aminokyselinové sekvence (sekvence i. č. 1). Srovnání přirozené sekvence a degenerované sekvence, stejně jako srovnání struktury expresního produktu těchto sekvencí, jsou uvedeny na obr. 8. Při použití jiné strategie je pouze 1 pozice z 10 degenerována, při použití ještě další strategie pouze jedna pozice z 20 je degenerována.

- 15 – Ve vmezeřeném úseku mezi pIX a IVa2: sekvence tohoto úseku velikosti 59 nukleotidů nebyla v tomto příkladu modifikována.

20 V genu IVa2: kódující sekvence genu IVa2 byla degenerována podle pravidel uvedených výše, každá 20. bp, aniž by byla modifikována aminokyselinová sekvence (sekvence i. č. 2). Přirozená sekvence a degenerovaná sekvence, stejně jako srovnání struktury expresního produktu těchto sekvencí jsou uvedeny na obr. 9. Při použití jiné strategie je pouze 1 pozice z 10 degenerována, aniž by ještě došlo k modifikaci aminokyselinové sekvence.

25 Struktura syngenu č. 1 je schematicky popsána na obr. 2. Sekvence syngenu č. 1 je znázorněna na obr. 10 a je zde uvedena jako sekvence id. č. 3.

Dalším příkladem syngenu je zde uvedený syngen č. 2, ve kterém:

- 30 – Sekvence promotoru genu pIX byla nahrazena modifikovanou sekvencí uvedenou zde jako sekvence id. č. 6.

- Sekvence genu pIX byla nahrazena sekvencí podle sekvence id. č. 4 bez modifikace aminokyselinové sekvence.

- 35 – Sekvence IVa2 byla nahrazena sekvencí podle sekvence id. č. 5 bez modifikace aminokyselinové sekvence.

- 40 – Polyadenylační úsek byl nahrazen úsekem, který nese stejné funkce v adenoviru typu 7 (Ad7), adenoviru skupiny B, který byl užit jako vektor pro přenos genu (Abrahamsen et al., 1997, J. Virol. 71, 8 946–8 951). Tato sekvence je zde uvedena jako sekvence i. č. 7.

Celá modifikovaná sekvence nazvaná syngen č. 2 je zde uvedena jako sekvence id. č. 8.

3. Verifikace sekvence syngenu

Základní charakteristiky přirozené a syngenní sekvence byly ověřeny analýzou zpracování dat. Cílem této verifikace bylo vyšetřit možnou přítomnost specifických struktur v syngenu, a sice zejména:

- donorových nebo akceptorových sestřihových míst (programy SpliceView a/nebo SpliceNet)
- polyadenylačních míst (program HepolyA)
- potenciálních míst pro vazbu transkripčních faktorů (program Transfac)
- úseků schopných vytvářet specifickou sekundární strukturu jako jsou např. přímé repetice, vlásenky (program Sigscan, BNL) včetně odpovídajících RNA (skládání RNA)
- konsenzních míst jako jsou CIII nebo M26.

Když byly takové sekvence identifikovány, odpovídající báze byly případně nahrazeny podle strategie definované v bodu 2 výše.

4. Konstrukce defektních virů nesoucích syngen č. 1 jako náhradu za odpovídající přirozený úsek

1. Výchozí materiál:

- Syngen č. 1 (sekvence id. č. 3)
- Oligonukleotidy Syngen I a Syngen II odpovídající 5'-konci a 3'-konci, v uvedeném pořadí, syngenu č. 1 uvedené na obr. 7
- Plazmid pJJ105 (viz obr. 3)
- Plazmid pJJ110 (viz obr. 4)
- Plazmid pIC-20R (Invitrogen)

Plazmid pSyngen: syngen klonovaný do pBS (Stratagene)

2. Konstrukce defektního virového genomu

Strategie konstrukce je znázorněna na obr. 6.

Plazmid pJJ110 byl naštěpen XbaI a výsledné fragmenty velikosti 4,8 a 5,0 kb byly ligovány tak, že vytvořily plazmid pJJ201. Plazmid pJJ201 byl pak štěpen BstEII a XmaI, doplněny konce a byl ligován, čímž vznikl plazmid pJJ202. Místa BstEII a XmaI zůstala zachována.

PCR amplifikační produkt odpovídající fragmentu 1 genu IVa2 (FgtI pro IVa2, obr. 6) byl vytvořen pomocí oligonukleotidů Syngen I a Syngen II a plazmidu pJJ105 jako templátu.

Sekvence oligonukleotidu Syngen I (sekvence i. č. 9):

AACTGCCAGGCCGGCCACTAGTCGCGATGTTCCCAGCCATATCCC

Sekvence oligonukleotidu Syngen II (sekvence i. č. 10):

CCGCTCGAGGTGACCGCTAGCCATTATGGACGAATGC

5 Amplifikovaný fragment byl vložen do míst aSmaI vektoru pIC-20R a vytvořil se tak pJJ203. Souvislý fragment genu IVa2 z plazmidu pJJ105 (fragment 2, označený Fgt2 IVa2 na obr. 6) byl vystřižen pomocí NsiI/BstEII a pak vložen do odpovídajících míst pJJ203, čímž vznikl pJJ204. Syngen byl pak naštěpen FseI/NruI (obr. 6) a vložen mezi odpovídající místa v pJJ204 a tak vznikl pJJ205.

10 Úplný fragment (syngen č. 1-FgtI+2 IVa2) v pJJ205 byl štěpen Sse8387I/BstEII a vložen do odpovídajících míst v pJJ202 a vznikl tak pJJ206 (obr. 5).

15 Tento fragment pak byl využit k přípravě prokaryotického plazmidu, který obsahuje modifikovaný adenovirový genom (defektní v E1 a případně v E3) obsahující syngen č. 1, a sice způsobem podle Crouzet et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1414–1419, 1997). Získaný plazmid byl pak transfekován do buněk linie 293, aby produkoval odpovídající virus.

20 Byl proveden experiment ke srovnání kapacity výskytu RCA (replikačně kompetentních adenoviru) v průběhu množení viru v buňkách 293 u dvou virů, AV1.7 č.1 CMVp53 a Ad5CMVp53.

Vektor (AV1.7 č. 1 CMVp53) vybavený sekvencí id. č. 3 (syngen č. 1) a expresní kazetou p53 (CMV p53 polyASV40) byl zkonstruován podle publikace Crouzet et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1414–1419, 1997).

25 Ad5CMVp53 obsahuje úsek pIX–IVa2 z Ad5 (nemodifikovaný). Expresní kazeta p53 je izogenní pro oba viry. Oba viry, AV1.7 č. 1 CMVp53 a Ad5CMVp53, mají podobnou produktivitu v buňkách 293. 2 x 5 plaků bylo amplifikováno během 7 po sobě jdoucích pasáží. Po ukončení této amplifikace bylo 2 x 5 vzorků ze 7. pasáže analyzováno, testem na detekci RCA. Testovací experimenty byly provedeny ve třech opakováních. Výsledky jsou uvedeny na obr. 12.

30 Test pro detekci RCA je kvantitativní způsob, který umožňuje spočítat plaký, jejichž počet odpovídá počtu RCA v dávce testovaného vzorku. Daná dávka viru ve vzorku (obvykle 3×10^{10} vp) se užije k infekci buněčného „trávníku“ buněk, které nemají komplementaci *in trans* (tj. které neexprimují E1, v daném případě byly užity buňky A549) na který se nanese vrstva agaru. Po 14 dnech se pozoruje vytváření plaků v „trávníku“, pokud počáteční infekční dávka obsahovala RCA.

40 Výsledky testu na detekci RCA ve třech opakováních byly:

0 RCA pro AV1.7 #1 CMVp53 a 6 RCA pro Ad5CMVp53. Tento výsledek byl statisticky významný, pokud se užila statistická srovnávací metoda zahrnující podmíněnou pravděpodobnost pozorování. Statisticky významné zlepšení bylo pozorováno u vektoru AV1.7 #1 CMVp53, ve smyslu snížení výskytu RCA v průběhu množení viru v buňkách 293 u tohoto viru ve srovnání s konvenčním virem. Tyto výsledky ukázaly, že přítomnost syngenu neovlivnila titry produkovaného viru a že várky viru obsahujícího syngen č. 1 byly bez kontaminací RCA.

5. Funkčnost defektních virů nesoucích syngen č. 2 jako náhradu za odpovídající přirozený úsek

50 Obdobně byl konstruován podobný vektor se syngemem č. 2 vybavený ještě expresní kazetou lacZ (CMV–LacZ): AV1.7 #2 CMVlacZ. Produktivita tohoto vektoru byla srovnána s vektorem nesoucím kazetu LacZ (RSV LacZ), jehož úseky pIX a IVa2 nebyly modifikovány (sekvence divokého typu Ad5): AV1.ORSVlacZ. Produktivita těchto dvou vektorů AV1.7 #2 CMVlacZ

a AV1.ORSVlacZ byla paralelně testována na buňkách 293. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	AV1.7 #2 CMVlacZ	AV1.ORSVlacZ
titr zásob. roztoku 1 (vp/ml)	$1,12 \times 10^{-11}$	$1,5 \times 10^{-11}$
titr zásob. roztoku 2 (vp/ml)	$1,52 \times 10^{-11}$	$1,82 \times 10^{-11}$
produktivita (vp/buňka) testovaná na roztoku 2	10133	12133
produktivita (tdu/buňka) testovaná na roztoku 2	203	207

5 Tyto výsledky ukazují, že syngen č. 2 mající homologii více redukovanou než syngen č. 1 a obsahující, kromě umlčených mutací v genu pIX a IVa2, také modifikace nekódujících úseků (tj. promotoru, genu pIX a překrývajících se polyadenylačních sekvencí pIX a IVa2), pokud je vložen jako náhrada za sekvence divokého typu do adenoviru typu 5 se ukazuje jako životaschopný a poskytující vysokou produktivitu.

10 6. Konstrukce defektních virů, kde je pouze přirozená sekvence genu pIX nahrazena degenerovanou sekvencí id. č. 1 a část homologního úseku, která odpovídá genu IVa2, je přesunuta do úseku E4

15 V jiném provedení vynálezu byla pouze sekvence genu pIX nahrazena degenerovanou sekvencí id. č. 1 a část homologního úseku, která odpovídá genu IVa2, byla přesunuta do úseku E4. Klonování genu IVa2 bylo popsáno v patentové přihlášce WO 96/10088, která je zde zahrnuta formou odkazu.

20 Nejdříve byl zkonstruován plazmid pIE11, který obsahuje 3 úseky uvedené níže klonované do plazmidu colE1, který nese geny KanR a SacB:

– PCR produkt amplifikovaný z Ad5 pomocí oligonukleotidových primerů:

25 5'-atcgatcgATAACAGTCAGCCTTACC-3' a

5'-agctgaattcCATCATCAATAATATACC-3',

30 přičemž tento produkt obsahuje pravý úsek ITR a promotor E4 až po ATG z orf1, ale ne včetně (nukleotidy 35525 až 35937)

– cDNA genu IVa2, která je popsána v patentové přihlášce WO 9610088

– fragment XcmI-EcoRV z Ad5, který obsahuje sekvence potřebné pro sestřih orf6 E4 a kódující sekvence orf6 až po místo EcoRV.

35 cDNA IVa2 v plazmidu pIE11 předchází nadbytečný ATG. Toto místo bylo zrušeno v plazmidu pIE11 místně-cílenou mutagenézí pomocí soupravy „Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit“ firmy Clontech. Byl tak vytvořen plazmid pIE12, kde bylo toto ATG místo odstraněno.

40 Plazmid pIE12c odvozený z plazmidu pIE12 obsahuje genom adenoviru 5 modifikovaný následujícím způsobem: gen IVa2 byl přesunut ze svého přirozeného lokusu do úseku E4, nahradily se orf1 až orf4 z E4 ve prospěch IVa2 cDNA, odstranil se E3, vložila se kazeta RSV-lacZ místo E1. Plazmid pIE12c byl získán rekombinací plazmidu pXL2788βGal popsaného v patentové přihlášce

ce WO 96/10088, pomocí techniky popsané v Crouzet et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1414–1419, 1997, které jsou zahrnuty formou odkazu).

5 Po enzymatickém štěpení *PacI* byl plazmid pIE12c transfekován do buněk 293 a získaný virus byl namnožen. Byl pozorován restriční profil viru AdIE12, který byl očekáván.

10 Analýzy provedené na várkách produkovaného viru ukázaly, že přítomnost degenerované sekvence genu *pIX* na místě přirozené sekvence a přesun genu *IVa2* do úseku *E4* neovlivnily titry produkovaného viru a že várky viru neobsahovaly kontaminace RCA, když byly testovány v podmínkách popsaných v předchozím příkladu.

Seznam citované literatury

- Ahern et al. (1991) PNAS 88: 105
- 15 Aiello et al. (1979) Virol. 94: 460
- Babiss and Vales (1991) J. Virol. 65: 598
- Epstein (1991) J. Virol. 65: 4475
- Gangloff et al. (1994) Experientia 50: 261
- Holliday (1964) Genet. Res. 5: 282–304
- 20 Jeong-Yu and Carroll (1992) Mol. Cell. Biol. 12(1): 112–9
- Lin et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10(1): 103–12
- Matsui (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 4265
- Meselson M., Radding C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 358–361
- Spector (1983) Virol. 130: 533
- 25 Szostak et al. (1983) Cell 33: 25–35
- Waldman and Liskay (1987) PNAS 84(15) 5 340–4
- Weinberg (1986) J. Virol. 57: 833
- Williams and Ustacelibi (1971) J. Gen. Virol. 13: 345
- Young (1995) Current Topics in Microbiol. And Immunol. 199: 89

30

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

35 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 424 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- 40 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

45

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 1..424

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

ATG TCC ACG AAT TCC TTT GAC GGC TCC ATC GTC TCC AGC TAC CTG ACC	48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
1 5 10 15	
ACC CGG ATG CCT CCC TGG GCT GGC GTC CGC CAA AAC GTC ATG GGA AGC	96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser	
20 25 30	
TCC ATC GAC GGC AGG CCT GTG CTC CCT GCC AAT AGC ACC ACT CTG ACT	144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr	
35 40 45	
TAT GAA ACT GTC AGC GGC ACC CCA CTG GAA ACC GCC GCA AGC GCT GCA	192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala	
50 55 60	
GCC AGC GCT GCC GGC GCT ACT GCT CGG GGC ATC CTC ACC GAT TTC GCC	240
Ala Ser Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala	
65 70 75 80	
TTT CTC TCC CCT CTG GCC TCC AGC GCT GCC AGC CGC AGC TCT GCT CGG	288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg	
85 90 95	
GAC GAT AAA CTG ACC GCC CTG CTG GCT CAG CTG GAC AGC CTG ACT AGG	336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg	
100 105 110	
GAG CTG AAC GTG GTG AGC CAA CAA CTC CTG GAC CTC CGG CAA CAA GTG	384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val	
115 120 125	
AGC GCT CTC AAA GCC TCT AGC CCA CCT AAC GCC GTT TAA A	424
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val *	
130 135 140	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

10

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 357 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

15

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

20

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 1..354

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

ATC GCG AAC CTA AAA ATA CAG TCC AAG ATG CAT CTG ATA TCC CCA CGT	48
Ile Ala Asn Leu Lys Ile Gln Ser Lys Met His Leu Ile Ser Pro Arg	
1 5 10 15	
ATG CAC CCC TCC CAG CTT AAC CGC TTC GTA AAC ACT TAC ACC AAG GGA	96
Met His Pro Ser Gln Leu Asn Arg Phe Val Asn Thr Tyr Thr Lys Gly	
20 25 30	
CTG CCC CTG GCA ATC AGC CTG CTA CTG AAA GAC ATT TTC AGG CAC CAC	144
Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe Arg His His	
35 40 45	
GCC CAG CGG TCC TGC TAC GAC TGG ATT ATC TAC AAC ACC ACT CCG CAG	192
Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr Thr Pro Gln	
50 55 60	
CAT GAA GGT CTC CAG TGG TGC TAC CTC CAT CCC AGA GAC GGG CTT ATG	240
His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp Gly Leu Met	
65 70 75 80	
CCT ATG TAT CTG AAC ATC CAG AGC CAC CTT TAC CAC GTC CTC GAA AAA	288
Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val Leu Glu Lys	
85 90 95	
ATA CAC AGG ACC CTG AAC GAC CGA GAC CGC TGG TCT CGG GCC TAC CGC	336
Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg Ala Tyr Arg	
100 105 110	
GCG CGG AAA ACC CCT AAA TAA	357
Ala Arg Lys Thr Pro Lys	
115	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

10

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 941 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

15

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

20

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

25

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: exon

(B) POZICE: 1..941

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

```

GGCGGGCCGT CGACTGTGTG GGCSTGGCTT AAGGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTGGGGG 60
TCTTATGTAG TTTTGTATCT GTTTTGACAGC AGCGGCGGCG GCCATGTCCA CGAATTCCTT 120
TGACGGGTCC ATCSTGTCCA GCTACCTGAC CAGCGGGATG CCTCCCTGGG CTGGCGTCCG 180
CCAAAACGTC ATGGGAAGCT CCATCGACGG CAGGCCTGTG CTCCTTGCCA ATAGCACCAC 240
TCTGACTTAT GAAACTGTCA GCGGCACCCC ACTGGAAACC GCGGCAAGCG CTGCAGCCAG 300
CGCTGCGGCG GCTACTGCTC GGGGCATGCT CACCGATTTC GCCTTTCTCT CCCCCTGTGG 360
CTCCAGCGCT GCCAGCCGCA GCTCTGCTCG GGACGATAAA CTGACCGCCC TGCTGGCTCA 420
GCTGGACACC CTGACTAGGG AGCTGAACST GGTGAGCCAA CAACTCCTGG ACCTCCGGCA 480
ACAAGTGAGC GCTTCAAAG CCTCTAGCCC ACCTAACGCC GTTTAAACA TAAATAAAA 540
ACCAGACTCT GTTTGGATTG GGATCAAGCA AGTGTCTTGC TGCTTTTAT TAGGAGTTT 600
CCSCGCGCGG TAGGCCCGAG ACCAGCGGTC TCGGTGCTC AGSGTCTCT GTATTTTTTC 660
GAGGACGTGG TAAAGGTGGC TCTGGATGTT CAGATACATA GGCATAAGCC CGTCTCTGG 720
ATGGAGGTAG CACCACTGGA GAGCTTCATG CTGCGGAGTG GTGTTGTAGA TAATCCAGTC 780
GTAGCAGGAC CGCTGGGCGT GGTGCCIGAA AATGTCTTTC ACTAGCAGCT TGATTGCCAG 840
GGGCACTCC TTGGTGTAAG TGTTTACGAA GCGGTTAAGC TGGGAGGGGT GCATACGTGG 900
GGATATGAGA TGCATCTTGG ACTGTATTCT TAGGTTGCGG A 941

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCII S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

10

- (A) DÉLKA: 423 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

15

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

20

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..423

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

ACG AGC ACG AAT TCG TTT GAC GGA AGC ATC GTC AGC TCA TAC TTG ACC	48
Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
1 5 10 15	
ACG CGC ATG CCT CCC TGG GCC GGG GTG CGC CAG AAT GTC ATG GGC TCC	96
Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser	
20 25 30	
AGC ATT GAC GGT CGC CCT GTC CTG CCT GCA AAC TCT ACC ACT TTG ACC	144
Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr	
35 40 45	
TAC GAA ACC GTG TCT GGC ACG CCG TTG GAA ACT GCA GCA TCC GCC GCC	192
Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala	
50 55 60	
GCT AGC GCC GCT GCA GGT ACC GCC CGC GGC ATC GTG ACT GAT TTT GCT	240
Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala	
65 70 75 80	
TTT CTG AGC CCG CTT GCC AGC AGT GCA GCC TCC CGT TCA TCT GCC CGC	288
Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg	
85 90 95	
GAT GAC AAA TTG ACG GCT CTT CTG GCT CAG CTG GAT TCT TTG ACT CGG	336
Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg	
100 105 110	
GAA CTT AAC GTC GTT TCT CAG CAA CTG TTG GAC CTG CGC CAG CAA GTT	384
Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val	
115 120 125	
TCT GCC CTC AAG GCT TCT TCC CCT CCC AAT GCC GTT TAA	423
Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val *	
130 135 140	

5 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 10 (A) DÉLKA: 141 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselinová
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

Met	Ser	Thr	Asn	Ser	Phe	Asp	Gly	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr
1				5					10					15	
Thr	Arg	Met	Pro	Pro	Trp	Ala	Gly	Val	Arg	Gln	Asn	Val	Met	Gly	Ser
			20					25					30		
Ser	Ile	Asp	Gly	Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Ala	Asn	Ser	Thr	Thr	Leu	Thr
		35					40					45			
Tyr	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Leu	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala
	50					55					60				
Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Arg	Gly	Ile	Val	Thr	Asp	Phe	Ala
	65				70					75					80
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Arg
				85					90					95	
Asp	Asp	Lys	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Asp	Ser	Leu	Thr	Arg
			100					105					110		
Glu	Leu	Asn	Val	Val	Ser	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Gln	Val
		115					120					125			
Ser	Ala	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Asn	Ala	Val	*			
	130					135					140				

5

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 10 (A) DÉLKA: 270 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

15 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

20

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
 (B) POZICE: 1..270

25

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

ACC AAG GGC CTG CCC CTC GCA ATC AGC TTG CTA CTC AAA GAC ATT TTT	48
Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe	
1 5 10 15	
AGG CAT CAC GCC CAG CGC TCC TGT TAC GAC TGG ATC ATC TAC AAT ACC	96
Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr	
20 25 30	
ACC CCG CAG CAT GAA GCC CTC CAG TGG TGC TAC CTG CAC CCC AGA GAC	144
Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp	
35 40 45	
GGG CTG ATG CCC ATG TAT CTG AAT ATC CAG AGT CAC CTT TAT CAC GTC	192
Gly Leu Met Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val	
50 55 60	
CTG GAA AAA ATA CAT AGG ACC CTC AAC GAC CGA GAT CGC TGG TCC CGG	240
Leu Glu Lys Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg	
65 70 75 80	
GCC TAT CGC GCG CGC AAA ACC CCT AAA TAA	270
Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys *	
85 90	

5 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 10 (A) DÉLKA: 90 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselinová
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

15 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

Thr Lys Gly Leu Pro Leu Ala Ile Ser Leu Leu Leu Lys Asp Ile Phe	
1 5 10 15	
Arg His His Ala Gln Arg Ser Cys Tyr Asp Trp Ile Ile Tyr Asn Thr	
20 25 30	
Thr Pro Gln His Glu Ala Leu Gln Trp Cys Tyr Leu His Pro Arg Asp	
35 40 45	
Gly Leu Met Pro Met Tyr Leu Asn Ile Gln Ser His Leu Tyr His Val	
50 55 60	
Leu Glu Lys Ile His Arg Thr Leu Asn Asp Arg Asp Arg Trp Ser Arg	
65 70 75 80	
Ala Tyr Arg Ala Arg Lys Thr Pro Lys *	
85 90	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DĚLKA: 103 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

15

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: –
 (B) POZICE: 1..103

20

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

```
GGCCGGCCGT CGACTGTGTG GGCSTGGCAT AAGGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTCGSGG 60
TCTCATCTAG TCTGTATCT GATTGCGAGT AGCCGCCGCC ACC 103
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

25

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DĚLKA: 52 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 30 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

35

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

40

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: –
 (B) POZICE: 1..52

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

```
ACATCTCAAA TCAATAAATA AAGAAATACT TGTATAAAA ACAAAATGAAT GT 52
```

45

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 847 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: –
 (B) POZICE: 1..847

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

```

GGCCGGCCGT CGACTGTGTG GGGGTGGCAT AAGGTGGGA AAGAATATAT AAGGTGGGG 60
TCTCATCTAG TCTGTATCT GATTTCAGT AGCCGCCGCC ACCATGAGCA CGAATTCGTT 120
TGACGGGAAGC ATGCTCAGCT CATACTTGAC CACGCGCATG CCTCCCTGGG CCGGGGTGG 180
CCAGAATGTC ATGGGCTCCA GCATTGACGG TCGCCCTGTC CTGCCTGCAA ACTCTACCAC 240
TTTGACCTAC GAAACCGTGT CTGGCAGGCC GTTGSAAACT GCAGCATCCG CCGCCGCTAG 300
CGCCGCTGCA GCTACCGCCC GCGGATCGT GACTGATTTT GCTTTTCTGA GCCCGCTGTC 360
CAGCAGTGCA GCCTCCGCTT CATCTGCCCG CGATGACAAA TTGACGSGTC TTCTGGCTCA 420
GCTGGATCTT TTGACTCGGG AACTTAACGT CGTTTCTCAG CAACTGTTGG ACCTGGCCCA 480
GCAAGTTTCT CCGCTCAAGG CTCTTCCCC TCCCAATGCC GTTTAAAGAT CTCAAAATCAA 540
TAATATAAGA AATACTTGTT ATAAAAACAA ATGAATGTTT ATTTAGGGGT TTTGGCGCCG 600
CGATAGGCCG GGCACCAGCG ATCTCGGTCG TTGAGCGTCC TATGTATTTT TTCCAGGACG 660
TGATAAAGGT GACTCTGGAT ATTCAGATAC ATGGGCATCA GCCCGTCTCT GGGGTGCAGG 720
TAGCACCACT GCAGGCGCTC ATGCTGCGGG GTGGIATTGT AGATGATCCA GTCGTAACAG 780
GAGCGCTGGG CGTGATGCCT AAAAATGTCT TTGAGTAGCA AGCTGATTGC GAGGGGCAAG 840
CCCTTGG 847

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 44 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

15

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: –
 (B) POZICE: 1..44

20

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

AACTGCAGGCCGGCCACTAGTCGCGATGTTCCCAGCCATATCCC

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

25

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 37 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 30 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

35 (iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

40

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: –
 (B) POZICE: 1..37

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

45

CCGCTCGAGGTGACCGCTAGCCATTATGGACGAATGC

PATENTOVÉ NÁROKY

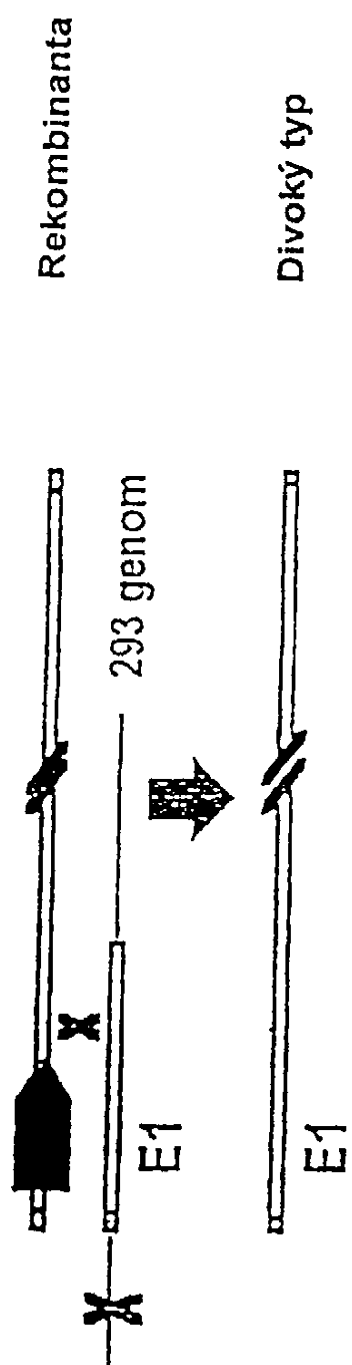
1. Způsob snížení frekvence intra- nebo intermolekulárních homologních rekombinací mezi
5 buněčnou chromozomální nukleovou kyselinou obsahující úsek E1 adenovirového genomu spolu
s lemujícím úsekem a extrachromozomální nukleovou kyselinou obsahující genom adenoviru,
který je defektní v úseku E1, **vyznačující se tím**, že způsob zahrnuje krok, kdy se do
buňky obsahující uvedenou chromozomální nukleovou kyselinu vnese uvedená extrachromozo-
mální nukleová kyselina, přičemž sekvence alespoň jedné ze dvou nukleových kyselin je kódující
10 sekvence a je degenerovaná.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že sekvence je degenerovaná
v poměru alespoň 1 pár bází z každých 20 párů bází.
- 15 3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že sekvence je degenerovaná
v poměru alespoň 1 pár bází z každých 10 párů bází.
4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že sekvence je degenerovaná ve
všech možných pozicích.
- 20 5. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že degenerace je vytvořena jako
funkce využití kodonů v komplementující buňce.
6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že sekvence genomu adenoviru,
25 který je defektní v úseku E1, je degenerovaná v genu pIX.
7. Způsob podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že sekvence genomu adenoviru,
který je defektní v úseku E1, je navíc degenerovaná v genu IVa2.
- 30 8. Způsob přípravy defektních rekombinantních adenovirů vncsením genomu defektního
rekombinantního adenoviru do buňky z buněčné linie 293 nebo buňky z ní pocházející, **vy-
značující se tím**, že tento genom nese:
-- delecí úseku E1
35 -- degeneraci genu pIX a/nebo IVa2.
9. Defektní rekombinantní adenovirus, jehož genom obsahuje alespoň jeden úsek, jehož sek-
vence je degenerována, přičemž degenerací je snížena frekvence intermolekulárních homolog-
ních rekombinací s chromozomální nukleovou kyselinou kódující adenovirové komplementující
40 funkce, přičemž tato sekvence je degenerována tak, že je snížena homologie s druhým partnerem
(partnery).
10. Adenovirus podle nároku 9, ve kterém je degenerovaný kódující úsek a degenerovaný úsek
obsahuje gen pIX.
- 45 11. Adenovirus podle nároku 10, kde degenerovaná sekvence obsahující gen pIX je sekven-
ce id. č. 1.
12. Adenovirus podle nároku 10 nebo 11, ve kterém je navíc gen IVa2 přítomen v genomové
50 pozici odlišné od původní pozice.
13. Adenovirus podle nároku 12, kde gen pIX je umístěn v úseku E4.
14. Adenovirus podle nároku 9, kde degenerovaný úsek obsahuje geny pIX a IVa2.

15. Adenovirus podle nároku 14, kde degenerovaný úsek je sekvence id. č. 3.
16. Adenovirus podle kteréhokoliv z nároků 9 až 15, který obsahuje delecí úseku E1.
17. Adenovirus podle nároku 10 nebo 11, kde degenerovaná sekvence genu pIX je sekven-
ce id. č. 1.
18. Buňka z buněčné linie 293 nebo buňka z ní pocházející, která obsahuje adenovirus defektní
v E1 úseku, kde sekvence buněčné chromozomální nukleové kyseliny obsahující úsek E1 adeno-
virového genomu spolu s lemujícím úsekem, nebo sekvence extrachromozomální nukleové kyse-
liny obsahující genom adenoviru, je kódující sekvence a je degenerovaná.

16 výkresů

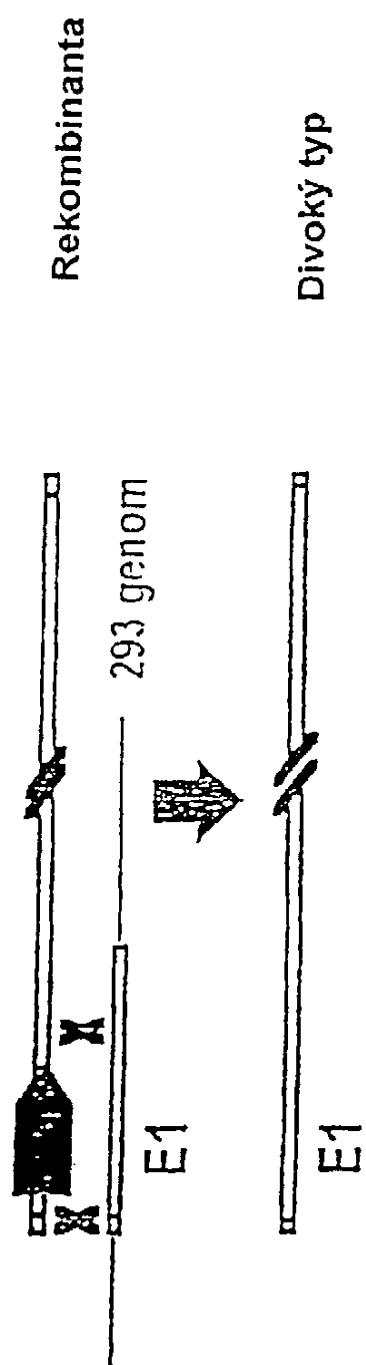
Jednoduchá rekombinace a zlom chromozomu

1A



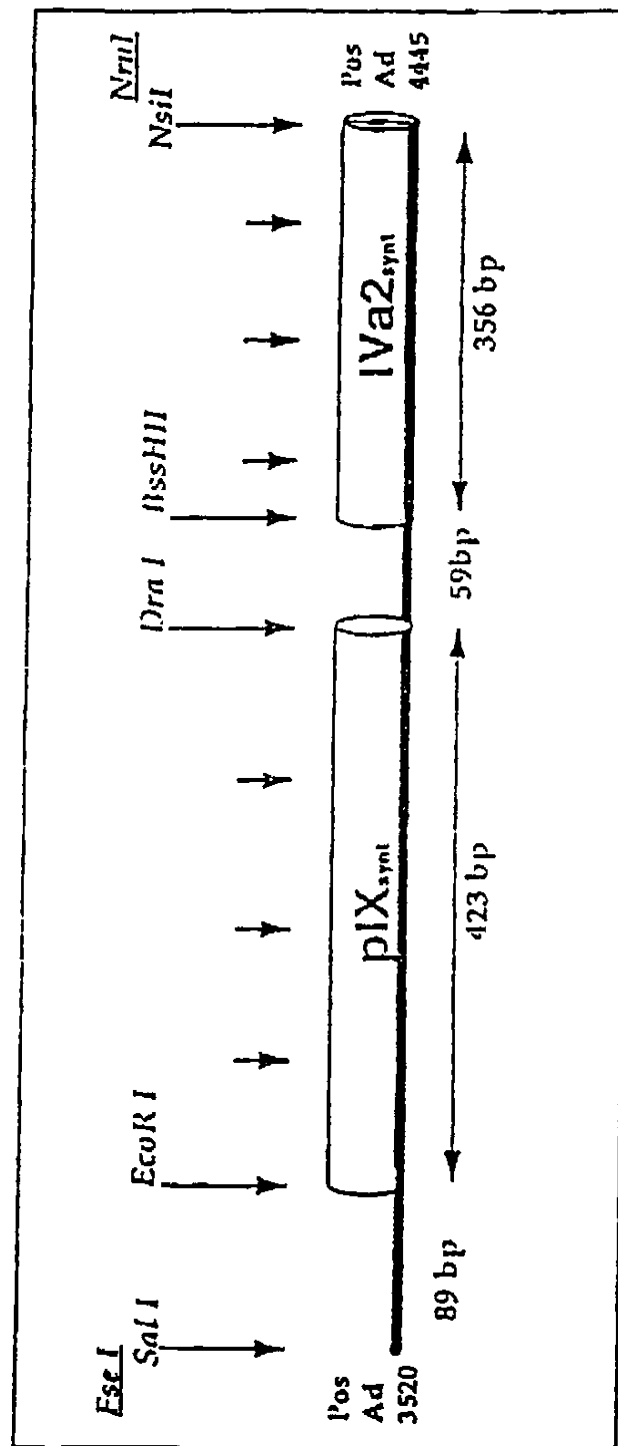
Dvojitá rekombinace

1B

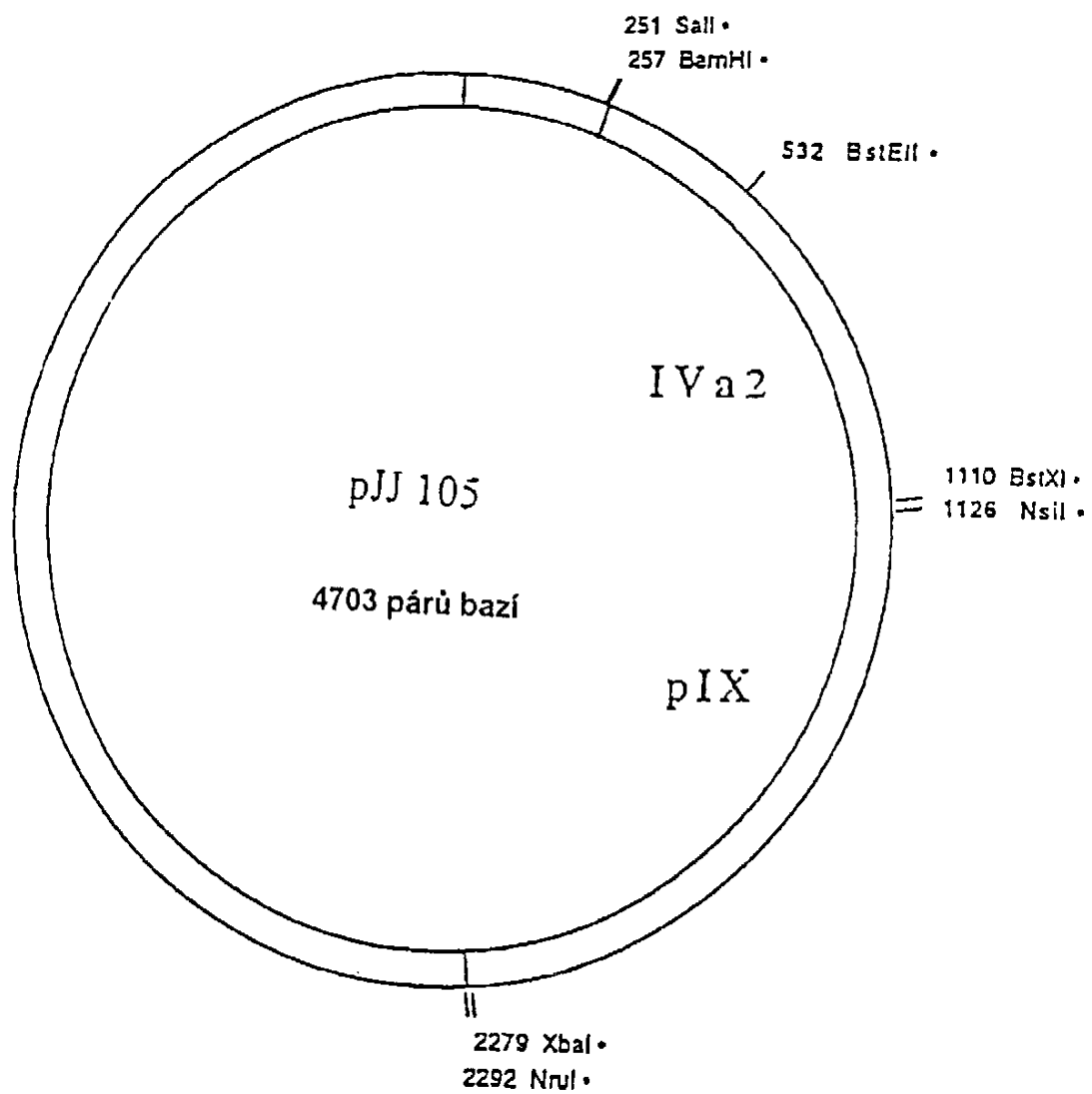


Obr. 1

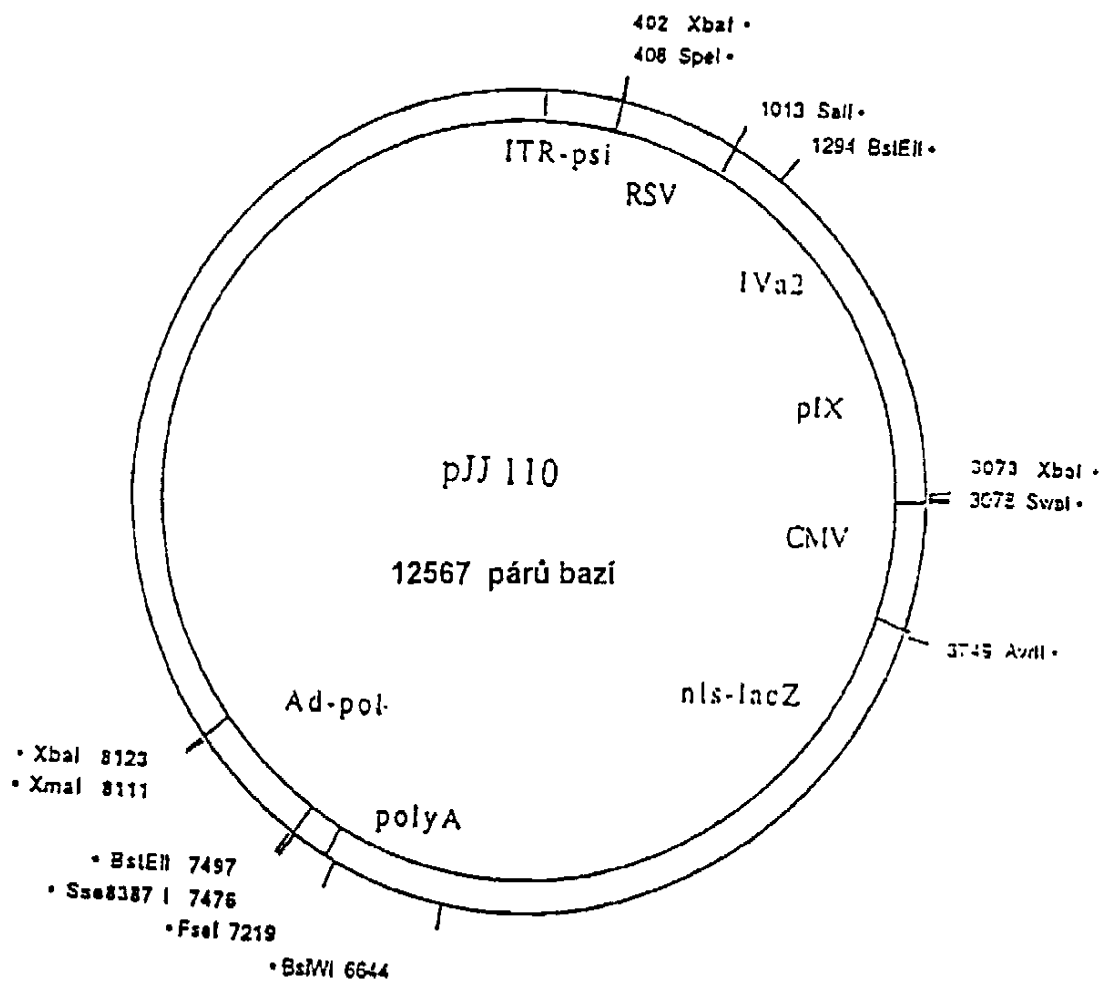
SYNGEN



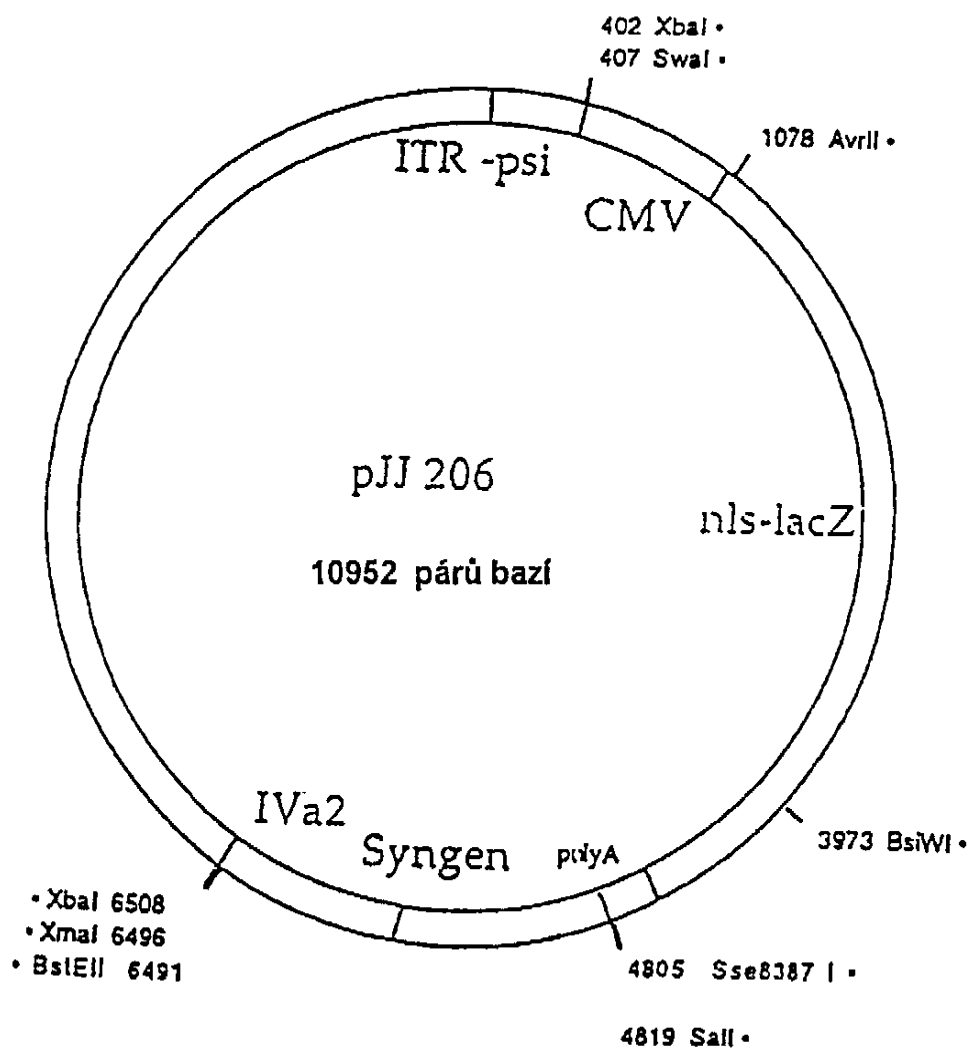
Obr. 2



Obr. 3

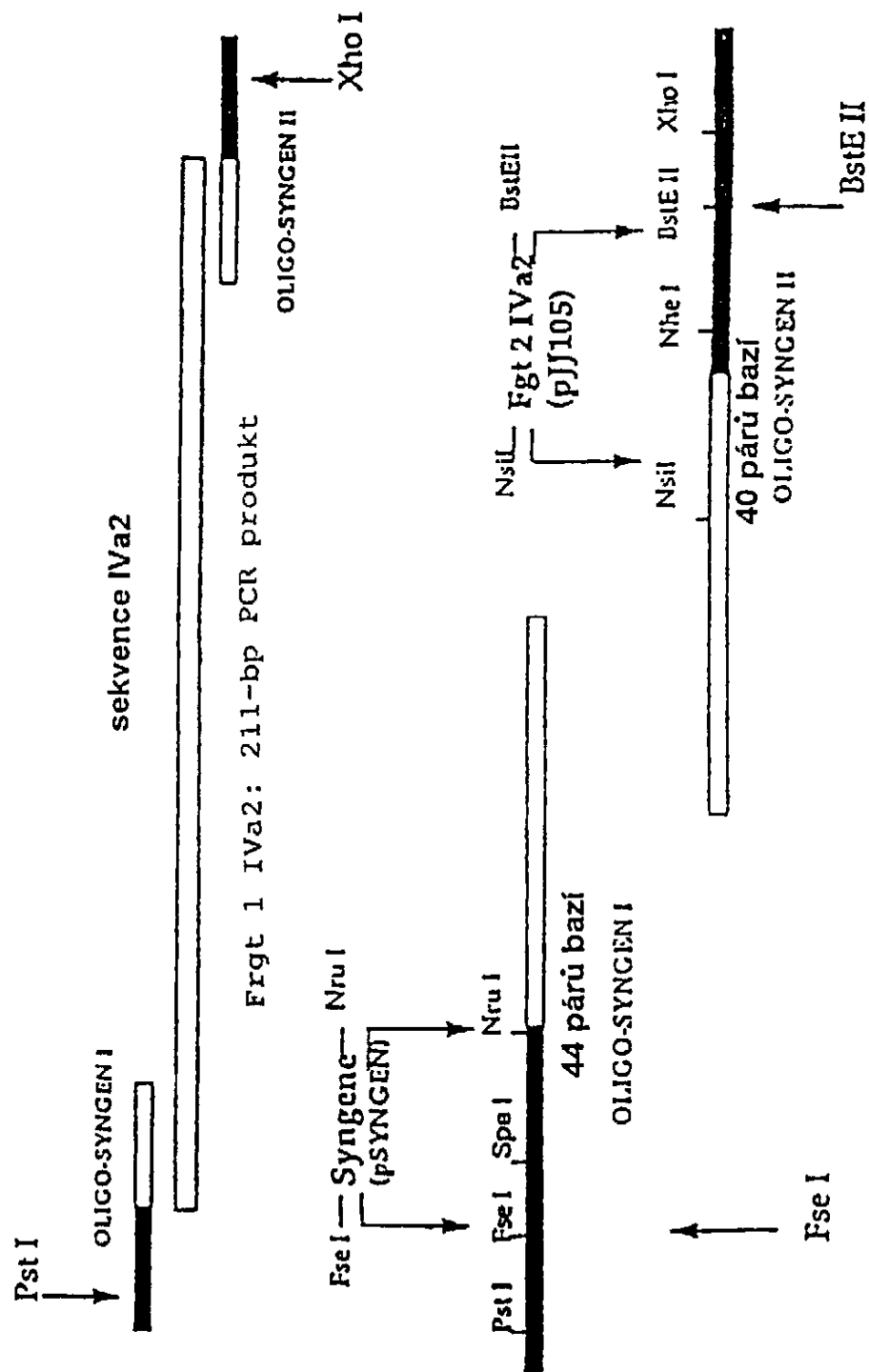


Obr. 4



Obr. 5

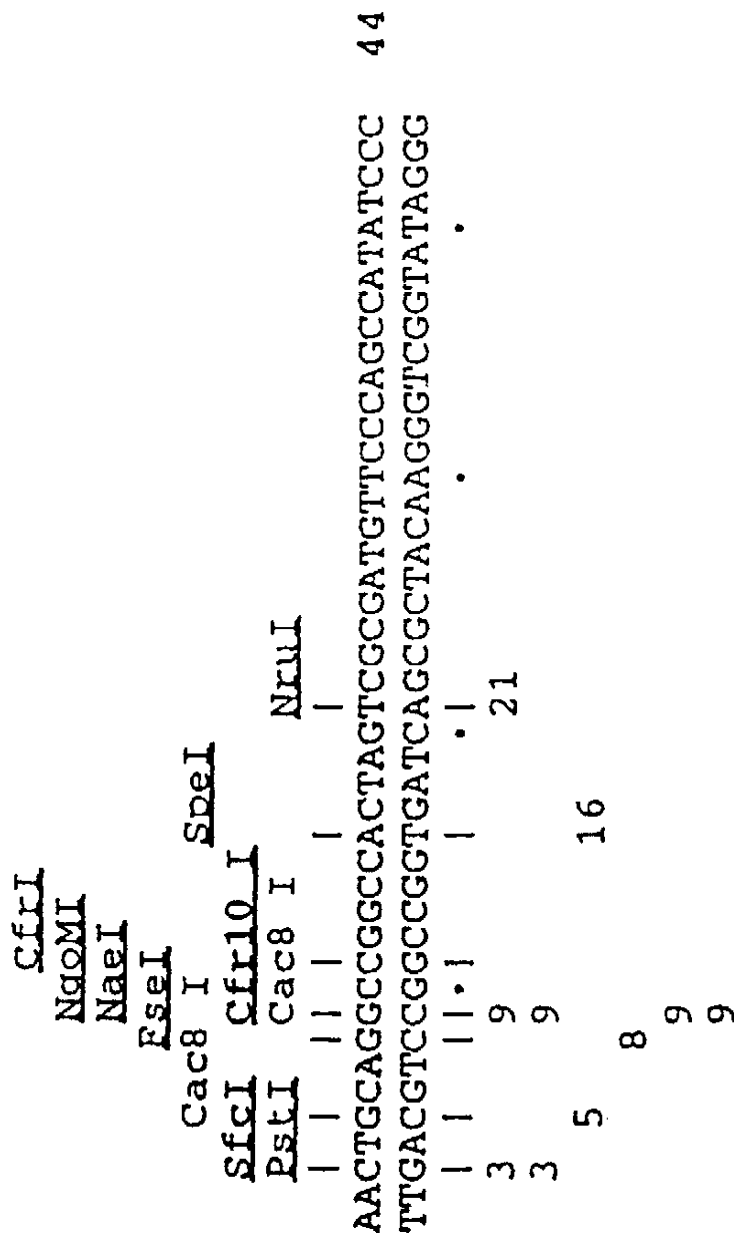
Strategie klonování



Obr. 6

OLIGO-SYNGEN I -> Restrikční mapa

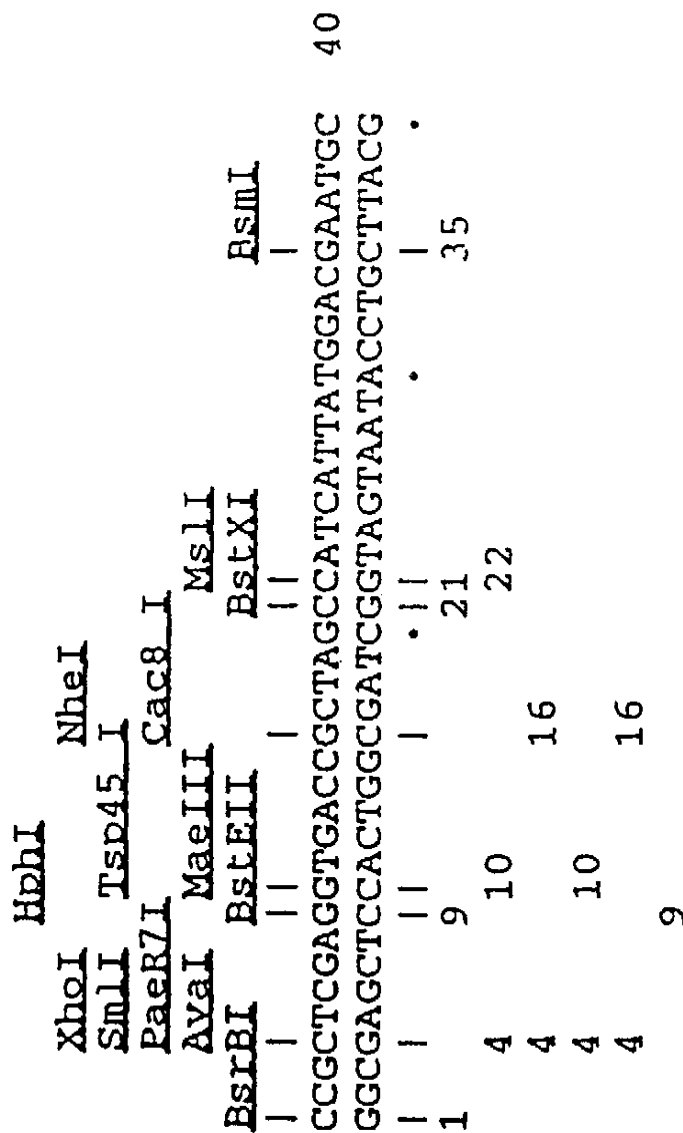
Sekvence DNA 44 b.p. AACTGCAGGCGG ... CAGCCATATCCC lineární



Obr. 7A

OLIGO-SYNGEN II -> Restrikční mapa

Sekvence DNA 40 b.p. CCGCTCGAGGTG ... ATGGACGAATGC lineární



Obr. 7B

Degenerace v plX

1/1

ATG TCC ACG AAT TCC TTT GAC GGC TCC ATC
 ATG AGC ACC AAC TCG TTT GAT GGA AGC ATT
 Met ser thr asn ser phe asp gly ser ile

31/11

GTC TCC AGC TAC CTG ACC ACC CGG ATG CCT
 GTG AGC TCA TAT TTG ACA ACG CGC ATG CCC
 val ser ser tyr leu thr thr arg met pro

61/21

CCC TGG GCT GGC GTC CGC CAA AAC GTC ATG
 CCA TGG GCC GGG GTG CGT CAG AAT GTG ATG
 pro trp ala gly val arg gln asn val met

91/31

GGA AGC TCC ATC GAC GGC AGG CCT GTG CTC
 GGC TCC AGC ATT GAT GGT CGC CCC GTC CTG
 gly ser ser ile asp gly arg pro val leu

121/41

CCT GCC AAT AGC ACC ACT CTG ACT TAT GAA
 CCC GCA AAC TCT ACT ACC TTG ACC TAC GAG
 pro ala asn ser thr thr leu thr tyr glu

151/51

ACT GTC AGC GGC ACC CCA CTG GAA ACC GCC
 ACC GTG TCT GGA ACG CCG TTG GAG ACT GCA
 thr val ser gly thr pro leu glu thr ala

181/61

GCA AGC GCT GCA GCC AGC GCT GCC GCC GCT
 GCC TCC GCC GCC GCT TCA GCC GCT GCA GCC
 ala ser ala ala ala ser ala ala ala ala

Obr. 8A

211/71

ACT GCT CGG GGC ATC GTC ACC GAT TTC GCC
 ACC GCC CGC GGG ATT GTG ACT GAC TTT GCT
 thr ala arg gly ile val thr asp phe ala

241/81

TTT CTC TCC CCT CTG GCC TCC AGC GCT GCC
 TTC CTG AGC CCG CTT GCA AGC AGT GCA GCT
 phe leu ser pro leu ala ser ser ala ala

271/91

AGC CGC AGC TCT GCT CGG GAC GAT AAA CTG
 TCC CGT TCA TCC GCC CGC GAT GAC AAG TTG
 ser arg ser ser ala arg asp asp lys leu

301/101

ACC GCC CTG CTG GCT CAG CTG GAC AGC CTG
 ACG GCT CTT TTG GCA CAA TTG GAT TCT TTG
 thr ala leu leu ala gln leu asp ser leu

331/111

ACT AGG GAG CTG AAC GTG GTG AGC CAA CAA
 ACC CGG GAA CTT AAT GTC GTT TCT CAG CAG
 thr arg glu leu asn val val ser gln gln

361/121

CTC CTG GAC CTC CGG CAA CAA GTG AGC GCT
 CTG TTG GAT CTG CGC CAG CAG GTT TCT GCC
 leu leu asp leu arg gln gln val ser ala

391/131

CTC AAA GCC TCT AGC CCA CCT AAC GCC GTT
 CTG AAG GCT TCC TCC CCT CCC AAT GCG GTT
 leu lys ala ser ser pro pro asn ala val

421/141

TAA

TAA

Obr. 8B

Degenerace v IVa2

1/1

TC GCG AAC CTA AAA ATA CAG TCC AAG ATG
 TA GCC AAC CTA AAA ATA CAG TCC AAG ATG
 ile ala asn leu lys ile gln ser lys met

31/11

CAT CTG ATA TCC CCA CGT ATG CAC CCC TCC
 CAT CTC ATA TCC CCA CGT ATG CAC CCA TCC
 his leu ile ser pro arg met his pro ser

61/21

CAG CTT AAC CGC TTC GTA AAC ACT TAC ACC
 CAG CTT AAC CGC TTT GTA AAC ACT TAC ACC
 gln leu asn arg phe val asn thr tyr thr

91/31

AAG GGA CTG CCC CTG GCA ATC AGC CTG CTA
 AAG GGC CTG CCC CTG GCA ATC AGC TTG CTA
 lys gly leu pro leu ala ile ser leu leu

121/41

CTG AAA GAC ATT TTC AGG CAC CAC GCC CAG
 CTG AAA GAC ATT TTT AGG CAC CAC GCC CAG
 leu lys asp ile phe arg his his ala gln

151/51

CGG TCC TGC TAC GAC TGG ATT ATC TAC AAC
 CGC TCC TGC TAC GAC TGG ATC ATC TAC AAC
 arg ser cys tyr asp trp ile ile tyr asn

181/61

ACC ACT CCG CAG CAT GAA GCT CTC CAG TGG
 ACC ACC CCG CAG CAT GAA GCT CTG CAG TGG
 thr thr pro gln his glu ala leu gln trp

Obr. 9A

211/71

TGC TAC CTC CAT CCC AGA GAC GGG CTT ATG
 TGC TAC CTC CAC CCC AGA GAC GGG CTT ATG
 cys tyr leu his pro arg asp gly leu met

241/81

CCT ATG TAT CTG AAC ATC CAG AGC CAC CTT
 CCC ATG TAT CTG AAC ATC CAG AGT CAC CTT
 pro met tyr leu asn ile gln ser his leu

271/91

TAC CAC GTC CTC GAA AAA ATA CAC AGG ACC
 TAC CAC GTC CTG GAA AAA ATA CAC AGG ACC
 tyr his val leu glu lys ile his arg thr

301/101

CTG AAC GAC CGA GAC CGC TGG TCT CGG GCC
 CTC AAC GAC CGA GAC CGC TGG TCC CGG GCC
 leu asn asp arg asp arg trp ser arg ala

331/111

TAC CGC GCG CGG AAA ACC CCT AAA TAA
 TAC CGC GCG CGC AAA ACC CCT AAA TAA
 tyr arg ala arg lys thr pro lys OCH

Obr. 9B

SYNGEN

```

Pse I   Sal I           Afl II
|       |               |
GGCCGGCCGTCGACTGTGTGGCGTGGCTTAAAGCGTGGCAAGAAATATATAAGCTGGGGGTCTTATGTAGTTTGTATCT 80
                                     +1 |
                                     V V
                                     ^

EcoR I
|
GTTTTCAGCAGCCCGCCGCCGCAATGATCCACGAATTCTTTGACGGCTCCATCGTCTCCAGCTACCTGACCAACCCGGATG 160

Hga I
|
CCTCCCTGGGCTGGCGTCCGCCAAACGTCATGGGAGCTCCATCGACGGCAGGCGCTGTGCTCCCTGCCAATAGCAACCAC 240

Pst I
|
pIX TCTGACTTATGAAACTGTCAAGCGGCACCCCACTGGGAAACCGCCCGCAAGCGCTGCCAGCCAGCGCTGCCCGCGCTACTGCTC 320

Hae I
|
GGGGCATCGTCACCGATTTTCGCCCTTTCTCTCCCGCTCTGCGCTCCAGCGCTGCCAGCCGCGAGCTCTGCTCGGGAGCATAAA 400

Bgl I
|
CTGACCGCCCTGCTGGCTCAGCTGGACAGCCCTGACTAGGGAGCTGACGCTGGTGGTGGCAACTCCTGGACCTCCGGCA 480

```

Obr. 10A

Dra I

ACAAGTGAGCGCTCTCAAAAGCCCTCTAGCCACCTAACGCCGTTTATACATATAAAACCAGACTCTGTGTTGATTT 560

BssH II

GGATTAAGCAAGTGCTCTTGGCTGCTCTTATATAGGAGTTTTCCCGCGCGGTAGGCCCGAGACCAGCGGTCTCGGTCGTTT 640

PpuM I

AGGGTCCTGTGTATTTTTTCGAGGACGTCGCTAAAGGTGGCTCTGGATGTTTCAGATACATAGGCCTCTCTGGG 720

Sty I

ATGGAGGTAGCACCACTGGAGAGCTTCATGCTGCCGAGTGGTGTGTAGATAATCCAGTCGTAGCAGGACCGCTGGGCGT 800

IVa2

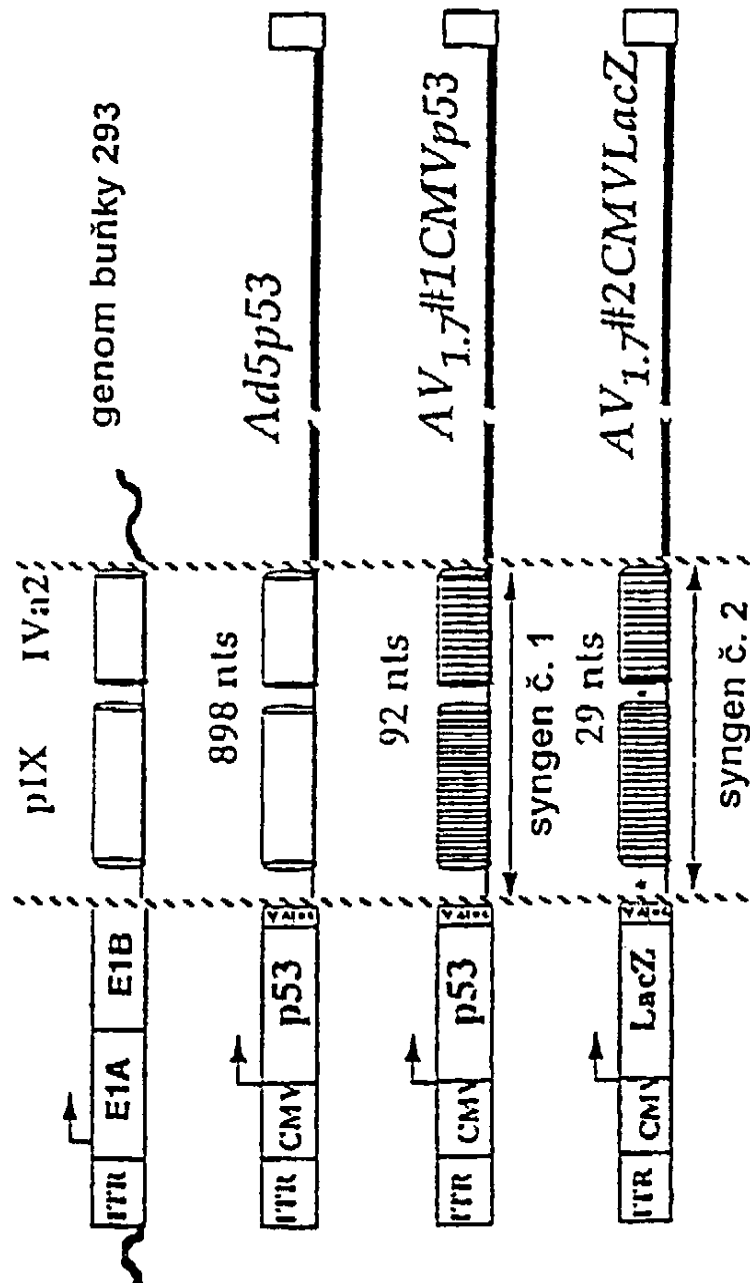
GGTGCCCTGAAAAATGCTCTTTCAGTAGCAGGCTGATTGCCAGGGGCGAGTCCCTTGGTGTAAGTGTTTACGAAGCGGTTAAGC 880

Nsi I

Nru I

TGGGAGGGGTGCATACGTGGGGATATGAGATGCATCTTGGACTGTATTTTATAGGTTCCCGA 941

Obr. 10B



Obr. 11

Obr. 12

Detekce RCA po 7 bezprostředně po sobě jdoucích amplifikacích 5 různých plaků pocházejících z vektorů ad5p53 a AV1.7p53

- Výsledky testu k detekci RCA ve vzorcích z amplifikace č. 7. Všechny pokusy byly opakovány třikrát.

	ad5CMVP53				x	AV1.7CMVP53			
Exp 1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Exp 2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Exp 3	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Testované částice	4.5E+11					4.5E+11			
Počet RCA	G*					0			

- Statistická analýza: Studie podmíněné pravděpodobnosti pozorování
*: výsledky jsou odlišné, $p < 5\%$
interval spolehlivosti = 98,5 %