



Rekombinantný bicistrónový adenovírus vhodný na liečbu dyslipoproteinémií, jeho použitie a farmaceutický prípravok obsahujúci takýto vírus

### Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka nových rekombinantných vírusov, ich prípravy a ich použitia v génovej terapii, na *in vivo* prenos a expresiu požadovaných génov. Presnejšie sa týka rekombinantných vírusov obsahujúcich aspoň dva vložené gény, ktorých expresné produkty sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu. Týka sa tiež kyvadlových plazmidov použiteľných na produkciu adenovírusov podľa vynálezu. Konkrétnejšie sa predkladaný vynález týka defektných rekombinantných adenovírusov a ich použitia na prevenciu alebo liečbu patologických stavov spojených s dyslipoproteinémiami, ktoré sú známe pre svoje vážne následky na kardiovaskulárnej a neurologickej úrovni.

### Doterajší stav techniky

Dyslipoproteinémie sú poruchy metabolizmu lipoproteínov, ktoré zodpovedajú za transport lipidov ako je cholesterol a triglyceridy v krvi a periférnych tekutinách. Ich následkom sú vážne patologické stavy, spojené s hypercholesterolémiou alebo hypertriglyceridémiou, ako je predovšetkým ateroskleróza.

Ateroskleróza je polygénna komplexná choroba, ktorá je z histologického hľadiska definovaná depozitmi (lipidové alebo fibrolipidové pláty) lipidov a ďalších krvných derivátov v stene veľkých artérií (aorta, koronárna artéria, karotídy).

Tieto pláty, ktoré sú z väčšej či menšej miery kalcifikované podľa progresie choroby, sa môžu združiť s léziami a sú spojené s akumuláciou tukových depozitov v artériách, ktoré sa skladajú zásadne z esterov cholesterolu. Tieto pláty sú sprevádzané zhrubnutím arteriálnej steny s hypertrofiou hladkého svalstva, výskytom penových buniek a akumuláciou fibrózneho tkaniva. Ateromatózny plát je umiestnený úplne jasne do reliéfu steny, čím je zodpovedný za zúženie pri vaskulárnych oklúziách spôsobených aterómom, trombózou alebo embóliou, ktoré sa objavujú u najviac postihnutých pacientov.

Následkom hypercholesterolémie teda môžu byť veľmi vážne kardiovaskulárne stavy, ako je infarkt, náhla smrť, zlyhanie srdca, cerebrovaskulárne choroby, a pod..

Je preto mimoriadne dôležité zaistiť dostupnú liečbu, ktorá umožní v určitých patologických situáciách znížiť plazmatickú hladinu cholesterolu alebo dokonca stimulovať eflux cholesterolu (reverzný transport cholesterolu) v periférnych tkanivách, aby sa vyprázdnil bunky, ktoré majú akumulovaný cholesterol a to všetko v súvislosti s vytváraním ateromatózneho plátu. Cholesterol je prenášaný v krvi rôznymi lipoproteínmi, vrátane lipoproteínov s nízkou hustotou ("low density lipoprotein" - LDL) a lipoproteínov s vysokou hustotou ("high density lipoproteins" - HDL. LDL sa syntetizujú v pečeni a umožňujú zásobovanie periférnych tkanív cholesterolom. Na rozdiel od toho HDL vychytávajú cholesterol v periférnych tkanivách a prenášajú ho do pečene, kde sa ukladá a/alebo degraduje.

Medzi najbežnejšie dyslipémie patria tie, ktoré sú charakterizované vysokou hladinou LDL ("low density lipoprotein") cholesterolu a hypoalfalipoproteinémiou. Pre ňu je charakteristická hladina HDL ("high density lipoprotein") cholesterolu menšia ako 0,35 mg/l (35 mg/dl) a predstavuje 40% prípadov dyslipémie (Genest a kol., 1992). Hypoalfalipoproteinémia je pravdepodobne spojená s genetickým deficitom

jedného alebo viacerých proteínov zapojených do syntézy, zrenia a rozpadu HDL častíc a jej dôsledkom je často skorý výskyt kardiovaskulárnych ochorení (Dammerman a kol., 1995). Všeobecne je opačná korelácia medzi incidenciou uvedených ochorení a hladinami HDL častíc (Miller a kol., 1987).

Protektívny účinok HDL proti kardiovaskulárnym chorobám sa dokázal pokusmi s prenosom génov *in vivo* u kmeňov myší s pravdepodobným rozvojom aterosklerotických lézií, u ktorých zvýšenie množstva HDL častíc inhibuje rozvoj týchto lézií (Rubin a kol., 1991; Plump a kol., 1994). Uvažuje sa o tom, že protektívny účinok HDL častíc môže byť spôsobený ich úlohou v reverznom transporte cholesterolu (Reiche a kol., 1989). Reverzný transport je proces, ktorým sa prenáša nadbytočný cholesterol z periférnych tkanív do pečene a tam sa odstráni (obrázok 1). Skladá z radu stupňov zahrňujúcich vychytávanie a esterifikáciu cholesterolu do HDL častíc a tiež jeho prenos do častíc lipoproteínov s nízkou hustotou, ktoré sa potom opäť vychytávajú pečeňou a tento proces takisto zahrňuje účasť celého radu proteínov, ako je CETP, enzýmov vrátane cholesterolacyltransferázy a pečeňovej lipázy (a/alebo ich kofaktorov, ako sú apolipoproteíny AI a AIV).

Zatiaľ čo na znižovanie hladín LDL cholesterolu a triglyceridov existuje účinná liečba založená na hypolipidemických a antihypertenzitívnych liekoch, je liečenie hypoalfalipoproteinémie v súčasnosti iba obmedzene účinné.

Predkladaný vynález sa konkrétne týka liečenia patologických stavov spojených s hypoalfalipoproteínómiou, a to konkrétne génovou terapiou.

Terapeutický prístup navrhovaný v predkladanom vynáleze smeruje k zvýšeniu kinetiky reverzného transportu cholesterolu, aby sa vyvolala regresia aterosklerotických lézií alebo aby sa alternatívne zabránilo ich tvorbe. Tento cieľ sa podľa vynálezu výhodne dosiahne pomocou simultánnej a účinnej expresie aspoň

dvoch proteínov, enzýmov alebo kofaktorov zapojených do reverzného transportu cholesterolu v bunkách, ktoré sa majú liečiť.

Pre vynález je proteín, enzým a/alebo jeden z jeho kofaktorov považovaný za zapojený do reverzného transportu cholesterolu, pokiaľ akákoľvek porucha úrovně jeho bunkovej koncentrácie automaticky ovplyvní reverzný proces cholesterolu.

Ako predstaviteľ takýchto enzýmov sa môže uviesť konkrétne lecitíncholesterolacyltransferáza a pečňová lipáza.

Lecitíncholesterolacyltransferáza (LCAT) je glykoproteín veľký 67 kD, syntetizovaný v pečeni, ktorý katalyzuje prenos acylovej skupiny z lecitínu na cholesterol a tým tvorí lysofosfatidylcholín a estery cholesterolu (Glomset, 1968). Kofaktorom pre tento enzým je apolipoproteín AI, ktorý je viazaný na povrch HDL častíc. Tým, že udržiava koncentračný gradient cholesterolu medzi periférnymi bunkami a HDL, má základnú úlohu v prvom štádiu reverzného transportu cholesterolu.

Ludská pečňová lipáza (HL) je glykoproteín veľký 66 kD s aktivitou triglyceridhydrolázy a fosfolipázy, ktorý je syntetizovaný a secernovaný hepatocytmi. Naviazaný na povrch hepatických buniek sa prostredníctvom proteoglykánov heparínsulfátu zúčastňuje metabolizmu chylomikrónov IDL ("intermediate density lipoproteins" - lipoproteíny so strednou hustotou) a HDL. HL má výraznú afinitu pre veľké HDL častice, ktorých fosfolipidy a triglyceridy štiepi a tým tvorí diskoidné častice HDL, ktoré majú takú vlastnosť, že prijímajú bunkový cholesterol. Deficit HL u človeka je charakterizovaný veľkým množstvom LDL bohatých na triglyceridy, veľké HDL častice a skorým rozvojom aterosklerózy (Hegele a kol., 1993).

Čo sa týka proteínov, pre vynález sú najvýhodnejšie proteín prenášajúci estery cholesterolu (CETP), apolipoproteíny AI a IV alebo jeden z ich variantov.

Proteín prenášajúci estery cholesterolu (CETP) je glykoproteín veľký 74 kD syntetizovaný v tukovom tkanive a pečeni. V plazme je spojený hlavne s HDL. Tu katalyzuje prenos esterov cholesterolu z HDL na lipoproteíny s nízkou hustotou. Tento prenos je nasledovaný prechodom triglyceridov z lipoproteínov s nízkou hustotou na HDL. Nadmerná expresie CETP u transgénnych hypertriglyceridemických myší inhibuje rozvoj aterosklerotických lézií (Hayek a kol., 1995). Tento pokus je v súlade s pozorovaním, že u jedincov deficitných na CETP sa skoro vyvíjajú kardiovaskulárne ochorenia (Zhong a kol., 1996).

Apolipoproteín AI je proteín skladajúci sa z 243 aminokyselín, ktorý sa syntetizuje vo forme pre-propeptidu s 267 zvyškami, ktorý má molekulovú hmotnosť 28000 D. V človeku sa syntetizuje špecificky v pečeni a v čreve a tvorí základný proteín HDL častíc (70% ich hmotnosti proteínov). V plazme je bohato zastúpený (1,0 - 1,2 g/l). Jeho najlepšie biochemicky charakterizovaná aktivita je aktivácia lecitíncholesterolacyltransferázy (LCAT), ale pripisujú sa mu ďalšie mnohé aktivity, konkrétne stimulácia efluxu bunkového cholesterolu. Apolipoproteín AI má hlavnú úlohu v odolnosti k ateroskleróze, spojenú s reverzným transportom cholesterolu. Jeho gén, dlhý 1863 bp, sa klonoval a sekvenoval (Sharpe a kol., *Nucleic Acids Res.*, 12 (9), 3917, 1984). Z proteínových produktov s aktivitou typu apolipoproteínu AI sa môžu uviesť konkrétne prirodzené varianty opísané v doterajšom stave techniky.

Apolipoproteín AIV (apoAIV) je proteín skladajúci sa z 376 aminokyselín, ktorý sa špecificky syntetizuje v čreve vo forme prekurzora s 396 zvyškami. Čo sa týka jeho fyziologickej aktivity, je známe, že môže aktivovať *in vitro* lecitíncholesterolacyltransferázu (LCAT) (Steinmetz a kol., *J. Biol. Chem.*, 260: 2258-2264, 1985) a že môže, ako apolipoproteín AI, interferovať s väzbou HDL častíc na endotelové bunky hovädzej aorty (Savion a kol., *Eur. J. Biochem.* 257: 4171-4178, 1987). Tieto dve aktivity naznačujú, že apoAIV veľmi pravdepodobne pôsobí ako mediátor reverzného

transportu cholesterolu. Gén apoAIV sa klonoval a opísal v doterajšom stave techniky (pozri konkrétne WO92/05253). Z proteínových produktov s aktivitou typu apolipoproteínu AIV sa môžu uviesť konkrétne fragmenty a deriváty opísané v patentovej prihláške FR 92 00806.

### Podstata vynálezu

Predkladaný vynález je, presnejšie povedané, založený na použití rekombinantných vírusov, ktoré umožňujú prenos a expresiu aspoň dvoch nukleových kyselín kódujúcich enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory zapojené do revrezného transportu cholesterolu.

Prihlasovateľ neočakávane dokázal, že je možné účinne zaistiť prenos a expresiu aspoň dvoch nukleových kyselín tým istým rekombinantným vírusom, a to tak, že sa integrujú tieto nukleové kyseliny do uvedeného vírusu vo forme bicistrónovej jednotky. Je jasné, že použitie jedného vírusu namiesto dvoch, má z hľadiska liečby mnohé výhody.

Predovšetkým je výhodnejšie skonštruovať jeden rekombinantný vírus inkorporáciou dvoch génov, ako dva príslušné rekombinantné vírusy.

Podobne z liečebného hľadiska použitie vektora, ako je uvedené v patentových nárokoch, umožňuje znížiť množstvo rekombinantného vírusu nevyhnutného na expresiu uvedených génov na polovicu. To je najviac prospešné konkrétne z hľadiska imunitnej odpovede zvyčajne sa prejavujúcej proti bunkám infikovaným rekombinantnými vírusmi. Následkom tejto imunitnej odpovede je normálne zničenie infikovaných buniek a/alebo závažná zápalová odpoveď. Je jasné, že tieto dva prejavy sú na úrovni trvania expresie terapeutických génov a teda očakávaného liečebného účinku, veľmi škodlivé.

Nakoniec, účinný prenos a vyrovnaná koncentrácia dvoch rozdielnych rekombinantných vírusov je neistý jav, ktorý sa preto musí kontrolovať ďalšími spôsobmi. V prípade použitia rekombinantného vírusu podľa vynálezu sa môžeme výhodne zaobísť bez tohto typu kontroly.

Vírusy podľa predkladaného vynálezu sú výhodne schopné prenosu a účinnej expresie dlhodobo a bez akéhokoľvek cytopatologického pôsobenia, dvoch nukleových kyselín kódujúcich proteíny, enzýmy a/alebo kofaktory zapojené do reverzného transportu cholesterolu.

Prvý predmet vynálezu preto je defektný rekombinantný vírus obsahujúci aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené jedna od druhej sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

Nukleové kyseliny sú výhodne vybraté z génov kódujúcich celú alebo časť lecitíncholesterolacyltransferázy (LCTA), proteínu prenášajúceho Estery cholesterolu (CETP), pečenej lipázy (HP), apolipoproteínov AI a AIV alebo jedného z ich variantov.

Vložené nukleové kyseliny môžu byť fragmenty komplementárnej DNA (cDNA), genómovej DNA (gDNA) alebo hybridné konštrukcie skladajúce sa napríklad z cDNA, do ktorej sa vložil jeden alebo viac intrónov. Môžu to byť syntetické alebo semisyntetické sekvencie. Ako je vyššie uvedené, tieto sekvencie môžu byť gén kódujúci celý alebo časť jedného z enzýmov, proteínov a/alebo kofaktorov zapojených do reverzného transportu cholesterolu, alebo ich varianty. Pre vynález označuje termín variant každého mutanta, fragment, alebo peptid majúci aspoň jednu biologickú vlastnosť uvažovaného

proteínového produktu, a tiež, kde je to vhodné, ich príslušné prirodzené varianty.

Tieto fragmenty a varianty sa môžu získať každou technikou odborníkovi známou a konkrétne genetickými a/alebo chemickými a/alebo enzýmovými modifikáciami. Genetické modifikácie zahŕňujú supresie, delécie, mutácie a pod.

Vložené nukleové kyseliny na účely vynálezu sú výhodne gény kódujúce celé alebo časti zodpovedajúcich ľudských enzýmov, proteínov a/alebo kofaktorov. Výhodnejšie to sú cDNA alebo gDNA.

Každá vložená nukleová kyselina môže tiež obsahovať aktivačné alebo regulačné sekvencie alebo podobne. Okrem toho všeobecne obsahuje v protismere ("upstream") od kódujúcej sekvencie signálnu sekvenciu riadiaceho polypeptidu syntetizovaného v sekrečných dráhach cieľovej bunky. Táto signálna sekvencia môže byť jeho prirodzená signálna sekvencia, ale môže to byť tiež akákoľvek ďalšia funkčná signálna sekvencia alebo umelá signálna sekvencia.

Podľa špecifického uskutočnenia vynálezu obsahujú rekombinantné vírusy podľa vynálezu aspoň jednu nukleovú kyselinu kódujúcu LLCAT. Výhodnejšie druhá vložená nukleová kyselina kóduje HL, CETP alebo ApoAI.

Ako je vyššie jednoznačne uvedené, spoločná expresia (koexpresia) dvoch uvažovaných nukleových kyselín je predbežne zaistená prostredníctvom tvorby jednej RNA, ktorá je potom translatovaná za vzniku dvoch príslušných enzýmov. Z týchto dôvodov rekombinantný vírus zahŕňa okrem dvoch sekvencií nukleových kyselín aspoň jeden transkripčný promótor, polyadenylačné miesto a sekvenciu IRES.

Transkripčný promótor je operatívne spojený s kódujúcimi nukleovými kyselinami tak, že tvorí bicistronovú mRNA a umožňuje expresiu dvoch príslušných enzýmov z uvedenej mRNA.

Podľa výhodného uskutočnenia vynálezu je umiestnený priamo v protismere ("upstream") od prvej nukleovej kyseliny.

Tento transkripčný promótor sa môže vybrať konkrétne zo sekvencií, ktoré sú prirodzene zodpovedné za expresiu uvedených nukleových kyselín, vo vzťahu, ku ktorej je umiestnený v protismere, avšak za predpokladu, že tieto sekvencie sú schopné činnosti v infikovanej bunke. Môžu to byť tiež sekvencie rôzneho pôvodu (zodpovedné za expresiu iných proteínov, alebo dokonca syntetické). Konkrétne to môžu byť sekvencie z eukaryotických alebo vírusových nukleových kyselín alebo odvodené sekvencie, stimulujúce alebo potláčajúce transkripciu génu špecifickým a indukovateľným spôsobom alebo inak. Ako príklad to môžu byť promótorové sekvencie pochádzajúce z genómu bunky, ktorú je potrebné infikovať, alebo z genómu vírusu, predovšetkým promótorov adenovírusových génov MLP a E1A, promótor CMV, RSV-LTR, MT-1 a SV40 a pod. Z eukaryotických promótorov sa tiež môžu uviesť všeobecne sa vyskytujúce promótorov (HPRT, vimentín,  $\alpha$ -aktín, tubulín, a pod.), promótorov pre intermediárne filamenty (dezmin, neurofilamenty, keratín, GFAP a pod.), promótorov terapeutických génov (typu MDR, CFTR, faktor VIII a pod.), tkanivovo špecifické promótorov (pyruvátkináza, villín, promótor pre črevný proteín viažuci mastné kyseliny, promótor pre  $\alpha$ -aktín buniek hladkého svalstva, promótorov špecifické pre pečeň: ApoAI, ApoAII, ľudský albumín a pod.) alebo alternatívne promótorov, ktoré odpovedajú na stimul (receptor steroidných hormónov, receptor kyseliny retinovej a pod.). Okrem toho tieto expresné sekvencie môžu byť modifikované pridaním aktivačných a regulačných sekvencií, a pod.

Čo sa týka sekvencie IRES, pochádza výhodne z pikorna-vírusu. Presnejšie je táto pikorna-vírusová sekvencie IRES odvodená z vírusu encefalomyokarditídy alebo z poliovírusu. Výhodnejšie je fragment odvodený z vírusu encefalomyokarditídy prítomný vo vektore pCITE-2a+ od firmy NOVAGEN.

V záujme ujasnenia bude konštrukcia definovaná transkripčným promótorom, dvoma nukleovými kyselinami, polyadenylačným miestom a sekvenciou IRES, ktorá je medzi dvoma nukleovými kyselinami, ďalej v texte označovaná názvom bicistrónová kazeta.

Vírusy podľa predkladaného vynálezu sú defektné, inými slovami nie sú schopné autonómne sa replikovať v cieľovej bunke. Všeobecne je genóm defektných vírusov použitý v rámci predkladaného vynálezu, a preto neobsahuje aspoň sekvencie nevyhnutné na replikáciu uvedeného vírusu v infikovanej bunke. Tieto oblasti sa môžu buď odstrániť (úplne alebo čiastočne), alebo znefunkčniť, alebo substituovať inými sekvenciami a konkrétne bicistrónovou kazetou definovanou vyššie. Výhodne má defektný vírus viac menej uchované sekvencie svojho genómu, ktoré sú nevyhnutné pre enkapsidáciu vírusových častíc.

Vírus podľa predkladaného vynálezu sa môže odvodiť z adenovírusu, vírusu adenoasociovaného (AAV) alebo z retrovírusu. Podľa výhodného uskutočnenia to je adenovírus.

Existujú rôzne sérotypy adenovírusov, ktorých štruktúra a vlastnosti sa trochu odlišujú. Z týchto sérotypov sú typy 2 alebo 5 ľudských adenovírusov (Ad2 alebo Ad5) alebo adenovírusy zvieracieho pôvodu (pozri prihláška W094/26914) výhodne použité v rámci predkladaného vynálezu. Z adenovírusov zvieracieho pôvodu, ktoré sa môžu použiť v rámci predkladaného vynálezu, sa môžu uviesť adenovírusy pôvodu psieho, hovädzieho, myšacieho (príklad: Mav1, Beard a kol., Virology 75, 81, 1990), ovčieho, prasacieho, vtáčieho alebo alternatívne opičieho (príklad: SAV). Adenovírus zvieracieho pôvodu je výhodne psí adenovírus, výhodnejšie adenovírus CAV2 (napríklad kmeň Manhattan alebo A26/61 (ATCC VR-800)). Výhodne sú v rámci vynálezu použité adenovírusy ľudské alebo psie alebo zmiešaného pôvodu.

Výhodne je v genóme adenovírusu vynálezu aspoň jedna oblasť E1 nefunkčná. Uvažovaný vírusový gén sa môže znefunkčniť

akoukoľvek technikou známou odborníkovi, konkrétne úplnou supresiou, substitúciou, čiastočnou deléciou alebo pridaním jednej alebo viacerých báz k uvažovaným génom. Takéto modifikácie sa môžu získať *in vitro* (na izolovanej DNA) alebo *in situ*, napríklad prostredníctvom techník genetického inžinierstva, alebo alternatívne opracovaním mutagénnyimi činidlami. Ďalšie oblasti sa môžu tiež modifikovať, konkrétne oblasť E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) a L5 (WO95/02697). Podľa výhodného usporiadania obsahuje adenovírus podľa vynálezu aspoň jednu deléciu v oblasti E1 a deléciu v oblasti E3. Vo vírusoch podľa vynálezu výhodne delécia v oblasti E1 siaha od nukleotidov 455 do 3329 adenovírusovej sekvencie Ad5. Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia je bicistronová kazeta vložená na úrovni delécie v oblasti E1.

Predkladaný vynález sa preto špecificky týka defektného rekombinantného adenovírusu charakterizovaného tým, že obsahuje aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a zapojené do reverzného transportu cholesterolu, uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené jedna od druhej sekvenciou vnútorného ribozómového vstupného miesta (IRES).

Ako výhodné rekombinantné adenovírusy podľa vynálezu sa môžu konkrétnejšie uviesť defektné rekombinantné adenovírusy obsahujúce aspoň jednu nukleovú kyselinu kódujúcu LCAT a jednu nukleovú kyselinu kódujúcu buď HL, CATP alebo ApoAI, pričom uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené jedna od druhej sekvencie vnútorným ribozómovým vstupným miestom (IRES).

Ako predstavitel' týchto adenovírusov sa môžu uviesť tie, ktoré sú uvedené na obrázku 2, obsahujúce gény kódujúce LCTA a CETP, a pochádzajúce z homologickej rekombinácie medzi pXL2974 a pXL2822.

Defektné rekombinantné adenovírusy podľa vynálezu sa môžu pripraviť akoukoľvek technikou známou odborníkovi (Levrero a kol., Gene 101, 195, 1991, EP 185 573; Graham, EMBO J., 3, 2917, 1984). Môžu sa pripraviť konkrétne homologickou rekombináciou medzi adenovírusom a plazmidom nesúcim *inter alia* bicistronovú kazetu. Homologická rekombinácia nastáva po spoločnej transfekcii (kotransfekcii) uvedených adenovírusov a plazmidov do príslušnej bunkovej línie. Použitá bunková línia by mala byť výhodne (i) transformovateľná uvedenými prvkami a (ii) zahrňovať sekvencie schopné komplementovať genómové časti defektného adenovírusu, výhodne v integrovanej forme, aby sa zabránilo riziku rekombinácie. Ako príklad línie sa môže uviesť línia 293 ľudských embryonálnych obličiek (Graham a kol., J. Gen. Virol. 36, 59, 1977), ktorá konkrétne obsahuje do svojho genómu integrovanú ľavú časť genómu adenovírusu Ad5 (12%) alebo línie schopné komplementovať funkcie E1 a E4, ako je opísané osobitne v prihláškach č. WO94/26914 a WO95/02697. Ďalej adenovírusy, ktoré sa namnožili, sa získajú späť a purifikujú zvyčajnými technikami molekulovej biológie, ako je to uvedené v príkladoch.

Ale podľa výhodného uskutočnenia vynálezu sú adenovírusy podľa vynálezu pripravené podľa nového postupu opísaného v patentovej prihláške WO96/25506, kde sa používa vo funkcii kyvadlového plazmidu prokaryotický plazmid obsahujúci genóm rekombinantného adenovírusu ohraničený jedným alebo viacerými reštrikčnými miestami nevyskytujúcimi sa v uvedenom genóme. Tento protokol je schematicky uvedený na obrázku 2. Tento postup je mimoriadne výhodný, pretože umožňuje zaobísť sa bez použitia druhej konštrukcie poskytujúcej ďalšiu časť genómu vírusu, s krokom rekombinácie v transkomplementačnej línii.

Druhý predmet predkladaného vynálezu sa presnejšie týka špecifických prokaryotických plazmidov použitých na produkciu adenovírusov podľa vynálezu.

Podľa výhodného uskutočnenia vynálezu tieto prokaryotické plazmidy integrujú bicistronovú kazetu opísanú vyššie.

Presnejšie povedané, predmetom predkladaného vynálezu je tiež prokaryotický plazmid obsahujúci genóm adenovírusu a aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a ktoré sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, pričom tieto dve nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené jedna od druhej sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto, IRES.

Prokaryotické plazmidy podľa vynálezu výhodne obsahujú prvú oblasť umožňujúcu replikáciu v prokaryotických bunkách a druhú oblasť obsahujúcu adenovírusový genóm ohraničený jedným alebo dvoma reštrikčnými miestami nevyskytujúcimi sa v uvedenom genóme, a v ktorej sa vyskytujú aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a ktoré sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, pričom tieto dve nukleové sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené jedna od druhej sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto, IRES.

Čo sa týka definície enzýmov, proteínov a/alebo kofaktorov, ktoré sú rozdielne a ktoré sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, transkripčného promótora, polyadenylačného miesta, sekvencie IRES a tiež toho, čo ovplyvňuje ich organizáciu v uvedenej kazete, odkazuje sa na to, čo sa opísalo vyššie.

Oblasť umožňujúca replikáciu v prokaryotických bunkách, ktorá je použitá v patentovaných plazmidoch, môže byť každý počiatok replikácie, ktorý je funkčný vo vybraných bunkách. Môže to byť počiatok replikácie odvodený z plazmidu zo skupiny inkompatibility P (príklad = pRK290), ktorý umožní replikáciu v kmeňoch *E. coli* *polA*. Všeobecnejšie to môže byť každý počiatok replikácie pochádzajúci z plazmidu, ktorý sa replikuje v

prokaryotických bunkách. Tento plazmid môže byť derivát RK2, pBR322 (Bolivar a kol, 1977), derivát pUC (Vieira a Messing, 1982), alebo iných plazmidov, ktoré pochádzajú z rovnakej skupiny inkompatibility, t.j. napríklad z ColE1 alebo z pMB1. Tieto plazmidy môžu byť okrem toho vybraté z iných skupín inkompatibility replikujúcich sa v *Escherichia coli*. Môžu to byť plazmidy pochádzajúce z plazmidov patriacich k skupinám inkompatibility napríklad A, B, FI, FII, FIII, FIV, H1, H11, I1, I2, J, K, L, N, OF, P, Q, T, U, W, X, Y, Z alebo 9. Môžu sa použiť tiež iné plazmidy, okrem iných plazmidy, ktoré sa nereplikujú v *E. coli*, ale v iných hostiteľoch, ak sú *B. subtilis*, *Streptomyces*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Rhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Enterococcus faecium* alebo *Clostridium*. Výhodne sú použité počiatky replikácie odvodené z plazmidov replikujúcich sa v *E. coli*.

Ako je uvedené vyššie, adenovírusový genóm prítomný v plazmidoch podľa vynálezu je výhodne kompletný alebo funkčný genóm, t.j. nevyžaduje poskytnutie iných oblastí rekombináciou alebo ligáciou na tvorbu vírusových zásobných kmeňov vo vybratých enkapsidačných líniách.

Rekombinantný adenovírusový genóm výhodne obsahuje aspoň sekvencie ITR alebo sekvenciu umožňujúcu enkapsidáciu. Vo výhodnom uskutočnení vynálezu neobsahuje tento použitý adenovírusový genóm celú alebo časť oblasti E1. Použitý adenovírusový genóm výhodne neobsahuje oblasti E1 medzi nukleotidmi 454 až 3328 (fragment PvuII-BglII) alebo 382 až 3446 (fragment HinfII-Sau3A).

Podľa mimoriadne výhodného uskutočnenia použitý adenovírusový genóm neobsahuje celú alebo časť oblasti E3 a/alebo E4. Podľa špecifického uskutočnenia vynálezu to je adenovírusový genóm neobsahujúci oblasti E1 a E3.

Patentové prokaryotické plazmidy presnejšie obsahujú v orientácii 5'-3' aspoň jeden počiatok replikácie funkčný v prokaryotických bunkách, prvú časť adenovírusového genómu obsahujúci vírusové ITR a  $\psi$  sekvencie, transkripčný promótor, prvú nukleovú kyselinu kódujúcu enzým, proteín a/alebo kofaktor zapojený do reverzného transportu cholesterolu, sekvenciu IRES, druhú nukleovú kyselinu kódujúcu druhý enzým, proteín a/alebo kofaktor zapojený do reverzného transportu cholesterolu, polyadenylačné miesto a druhú časť adenovírusového genómu obsahujúci oblasť pIX-IVA2.

Prokaryotické plazmidy podľa vynálezu výhodne obsahujú tiež oblasti umožňujúce selekciu prokaryotických buniek obsahujúcich uvedený plazmid. Táto oblasť sa konkrétne môže skladať z akéhokoľvek génu poskytujúceho rezistenciu na kanamycín (Kan<sup>r</sup>), na ampicilín (Amp<sup>r</sup>), na tetracyklín (tet<sup>r</sup>) alebo na spektinomycín, napríklad, ktoré sa v molekulovej biológii všeobecne používajú (Maniatis a kol., 1989). Selekcia plazmidov sa môže uskutočňovať so sekvenciami nukleových kyselín inými ako sú gény kódujúce markery pre rezistenciu na antibiotiká. Všeobecne to zahŕňa gén, ktorý poskytuje baktérii funkciu, ktorú už nemá (môže sa zhodovať s génom, ktorý sa z chromozómu odstránil alebo inaktivoval), t.j. gén v plazmide obnovujúci túto funkciu. Ako príklad to môže byť gén pre transferovú RNA, ktorý obnovuje defektnú chromozómovú funkciu (Somes a kol., 1991).

Podľa výhodného uskutočnenia vynálezu prokaryotický plazmid obsahuje aspoň jednu nukleovú kyselinu kódujúcu LCAT, druhá nukleová kyselina sa vyberá z kyselín kódujúcich CETP, HL alebo ApoAI.

Ako predstavitelia týchto prokaryotických plazmidov sa môžu uviesť konkrétne plazmidy pXL2974 a pXL3058, uvedené na obrázkoch 4 a 6. Plazmid pXL2974 obsahuje v orientácii 5'-3' počiatok replikácie, gén pre rezistenciu voči spektinomycínu, gén SacB pre senzitivitu voči sacharóze, vírusové ITR a  $\psi$

sekvencie, promótor RSV, dva transgény LCAT a CETP oddelené prostredníctvom IRES, polyadenylačné miesto a vírusové sekvencie pIX a IVA2. Plazmid pXL3058 obsahuje v orientácii 5'-3' počiatok replikácie, gén pre rezistenciu ku kanamycínu, vírusové ITR a  $\psi$  sekvencie, promótor RSV, dva transgény LCAT a intrón+ApoAI oddelené prostredníctvom IRES, polyadenylačné miesto, vírusové sekvencie pIX a IVA2 a gén SacB pre senzitivitu voči sacharóze.

Predkladaný vynález sa tiež týka plazmidových konštrukcií použitých na konštrukciu týchto prokaryotických plazmidov a ktoré tiež obsahujú bicistronovú kazetu definovanú podľa vynálezu.

Prokaryotické plazmidy podľa vynálezu sa môžu konkrétne získať transformáciou počiatočného kyvadlového plazmidu obsahujúceho bicistronovú kazetu definovanú podľa vynálezu, konkrétne obsahujúcu sekvenciu kódujúcu transkripčný promótor operatívne spojený s dvom nukleovými kyselinami kódujúcimi dva enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a ktoré sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, polyadenylačné miesto, sekvenciu IRES umiestnenú medzi uvedenými nukleovými kyselinami.

Ako predstavitelia týchto kyvadlových plazmidov sa môžu uviesť konkrétne plazmidy pXL2970 a pXL2984 opísané na obrázkoch 3 a 5.

Čo sa týka definícií enzýmov zapojených reverzného transportu cholesterolu, transkripčného promótoru a sekvencie IRES a tiež toho, čo ovplyvňuje ich organizáciu v uvedenej kazete, odkazujeme sa na to, čo sa už opísalo vyššie v texte.

Ďalší predmet predkladaného vynálezu sa týka akejkolvek prokaryotickej bunky obsahujúcej prokaryotický plazmid, ako je definované vyššie. Môže to byť konkrétne každá baktéria, pre ktorú existuje vektorový systém, do ktorého sa môže vnieť

rekombinantná DNA. Napríklad sa môžu uviesť *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacter tumefaciens*, *Rhizobium meliloti* alebo baktérie rodu *Streptomyces*. Tieto bunky sa výhodne získajú transformáciou odborníkom známymi technikami.

Predkladaný vynález sa tiež týka použitia rekombinantného vírusu, defektného rekombinantného vírusu alebo konštrukcie kyvadlového plazmidu, ako je definované vyššie, na prípravu farmaceutického prípravku zamýšľaného na liečbu alebo prevenciu patologických stavov spojených s hypoalfalipoproteinémiou, vrátane konkrétne aterosklerózy a/alebo reštenózy.

Predkladaný vynález sa tiež týka farmaceutického prípravku obsahujúceho jeden alebo viac defektných rekombinantných vírusov, vrátane adeovírusov, ako je opísané vyššie. Takéto prípravky sa môžu formulovať na podávanie miestne, perorálne, parenterálne, intranazálne, intravenózne, intramuskulárne, subkutánne alebo intraokulárne a pod.

Prípravok podľa vynálezu výhodne obsahuje farmaceuticky prijateľné nosiče pre prostriedok na injekcie. Môžu to byť konkrétne izotonické sterilné soľné roztoky (hydrogenfosforečnan alebo dihydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý alebo horečnatý a pod., alebo zmesi týchto solí) alebo suché, konkrétne lyofilizované prípravky, ktoré umožnia rekonštitúciu roztokov pre injekcie po pridaní sterilnej vody alebo fyziologického roztoku v závislosti na konkrétnom liečenom prípade.

Dávky vírusov pre injekciu sa môžu upraviť podľa rôznych parametrov, konkrétne podľa použitého spôsobu podávania, príslušného patologického stavu alebo požadovanej dĺžky liečby. Všeobecne sú rekombinantné vírusy podľa vynálezu formulované a podávané vo forme dávok medzi  $10^4$  a  $10^{14}$  pfu/ml. Termín pfu ("plaque forming unit" - jednotka tvoriaca plak) zodpovedá infekčnosti suspenzie viriónov a určuje sa infekciou príslušnej

bunkovej kultúry a meraním, všeobecne po 48 hodinách, počtom plakov infikovaných buniek. Techniky na určovanie titru pfu vírusového roztoku sú v literatúre dobre opísané.

Predkladaný vynález poskytuje nový, veľmi účinný prípravok na liečenie alebo prevenciu patologických stavov spojených s hypoalfalipoproteinémiou, konkrétne v oblasti kardiovaskulárnych stavov, ako je infarkt myokardu, angina pectoris, náhla smrť, zlyhanie srdca, cerebrovaskulárne príhody, ateroskleróza alebo restenóza.

Okrem toho môže byť táto liečba aplikovaná tak na človeka ako ak na akékoľvek zviera, ako sú napr. ovce, hovädzí dobytok, domáce zvieratá (psy, mačky a pod.), kone, ryby a pod.

Predkladaný vynález je podrobenejšie opísaný pomocou nasledujúcich príkladov, ktoré je potrebné považovať ilustratívne a neobmedzujúce.

#### Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: Schematické znázornenie predpokladaného mechanizmu transportu cholesterolu.

Obrázok 2: Znázornenie protokolu produkcie adenovírusov homologickou rekombináciou v *E. coli*.

Obrázok 3: Protokol konštrukcie bicistronového kyvadlového plazmidu pXL2970 obsahujúceho RSV-LCAT-IRES-CETP.

Obrázok 4: Protokol konštrukcie prokaryotického plazmidu pXL2974 obsahujúceho RSV-LCAT-IRES-CETP.

Obrázok 5: Protokol konštrukcie plazmidu pXL2984 obsahujúceho RSV-LCAT-IRES-HL.

Obrázok 6: Znázornenie prokaryotického plazmidu pXL3058 obsahujúceho RSV-ApoAI-IRES-LCAT.

## Príklady uskutočnenia vynálezu

### I. MATERIÁL A METÓDY

#### I-1. MATERIÁL

1) Plazmidy použité na konštrukciu bicistronových rekombinantných adenovírusov LCAT-IRES-CETP, LCAT-IRES-HL a LCAT-IRES-ApoAI sú:

- pSK IRES (dodávaný firmou NOVAGEN)

- pXL2616 LCAT cDNA (Séguret-Macé a kol., Circulation 94 (9), 2177-21841, 1996)

- pCRII (dodávaný firmou INVITROGEN)

2) Celková RNA získaná z hepatocytov a buniek HepG2

3) Bunky 293, bunky ľudskej obličky, obsahujúce gén kódujúci adenovírusový proteín E1 (Graham a kol., 1977)

4) Baktérie *Escherichia coli*: subtyp DH5 $\alpha$  s genotypom EndA1, recA1, hsdR17, supE44, I-, thy-1, gyrA, relA1, lacZ $\Delta$ M15, deoR<sup>+</sup>, F<sup>+</sup>, dam<sup>+</sup>, dcm<sup>+</sup> (Woodcock a kol., 1989)

5) Enzýmy a reštrikčné pufre boli od firmy New England Biolabs.

## METÓDY

## Všeobecné techniky molekulovej biológie

Metódy zvyčajne používané v molekulovej biológii, ako sú preparatívna extrakcia plazmidovej DNA, centrifugácia plazmidovej DNA v gradiente chloridu cézneho, elektroforéza z agarózovom alebo akrylamidovom géle, purifikácia fragmentov DNA elektroelúciou, fenolová alebo fenol-chloroformová extrakcia proteínov, etanolová alebo izopropanolová precipitácia DNA v soľnom médiu, transformácia *E. coli* a pod., sú odborníkom dobre známe a sú v literatúre podrobne opísané (Maniatis T. a kol., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. a kol. (vyd.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).

Plazmidy typu pBR322 a pUC a fágy radu M13 sú komerčného pôvodu (Bethesda Research Laboratories).

Na ligácie sa môžu fragmenty DNA separovať podľa svojej veľkosti elektroforézou v agarózovom alebo akrylamidovom géle, extrahovať fenolom alebo zmesou fenol/chloroform, precipitovať etanolom a potom inkubovať v prítomnosti fágovej T4 DNA ligázy (Biolabs) podľa odporúčenia dodávateľa.

Doplnenie prečnievajúcich 5' koncov sa môže uskutočňovať Klenowovým fragmentom *E. coli* DNA polymerázy I (Biolabs) podľa inštrukcií dodávateľa. Odstránenie prečnievajúcich 3' koncov sa môže uskutočniť v prítomnosti fágovej T4 DNA polymerázy (Biolabs) použitej podľa odporúčenia dodávateľa. Odstránenie prečnievajúcich 5' koncov sa uskutočňuje kontrolovaným odstránením s S1 nukleázou.

Miestne cielená mutagenéza *in vitro* pomocou syntetických oligodeoxynukleotidov sa môže uskutočňovať podľa metódy vyvinuté Taylorom a kol. (Nucleic Acids Res. 13, 8749-8764, 1985) s použitím súpravy dodávanej firmou Amersham.

Enzýmová amplifikácia DNA fragmentov takzvanou technikou PCR (polymerázová reťazová reakcia - "Polymerase-catalyzed Chain Reaction", Saiki R.K. a kol., Science 230, 1350-1354, 1985; Mullis K.B. a Faloona F.A., Meth. Enzym. 155, 335-350, 1987) sa môže uskutočňovať s použitím DNA tepelného cyklovača (Perkin Elmer Cetus) podľa odporúčenia výrobcu.

Verifikácia nukleotidových sekvencií sa môže uskutočňovať metódou vyvinutou Sangerom a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467) s použitím súpravy dodanej firmou Amersham.

## Techniky bunkovej kultúry

### a) Kultivácia buniek

Bunky 293 sa pestovali v živnom médiu Eagle (MEM, Gibco BRL) doplnenom 10% fetálnym telacím sérom (FCS, Gibco BRL) pri 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub>.

### b) Transfekcia kultivovaných buniek

Bunky 293 pestované na miskách s priemerom 100 mm na médiu MEM doplnenom 10% fetálnym telacím sérom sa transfekujú s 1 mg DNA s použitím lipofektaminu (Gibco BRL). O šesť hodín neskôr sa médium odstráni a bunky sa inkubujú v kompletnom médiu (MEM + 10% FCS). Supernatanty pestovaných buniek transfekovaných rekombinantnými plazmidmi RSV LCAT-IRES-CETP, RSV LCAT-IRES-ApoAI a RSV LCAT-IRES-HK a tiež kontrola s  $\beta$ -galaktozidázou a supernatant netransfekovaných buniek sa získali 72 hodín po transfekcii a uskladnili pri 4 °C. Testy sa aktivitu enzýmov LCAT, CETP, ApoAI a HL sa uskutočňovali na 10 až 30 ml frakciách bunkového supernatantu s použitím ľudskej plazmy ako kontroly.

### c) Produkcia a purifikácia rekombinantných adenovírusov

Bicistronová adenovírusová DNA sa získa homologickou rekombináciou v *E. coli*. Potom sa linearizuje s PacI a vírus sa tvorí po transfekcii buniek 293. Bunky 293, t.j. bunky transkomplementujúce proteín E1, sa transfekujú s použitím lipofektaminu s 10 mg linearizovanej adenovírusovej DNA. Potom sa na agare s bunkami 293 v médiu MEM doplnenom s 4% FCS a po inkubácii 8 dní pri 37 °C vyhodnotia plaky obsahujúce rekombinantný vírus a analyzuje sa ich reštrikčný profil.

### d) Infekcia kultivovaných buniek

Infekcia s 0,25, 0,5 a 1 ml supernatantu obsahujúceho bicistronový rekombinantný adenovírus sa uskutočňuje na 12jamkovej doštičke obsahujúcej približne  $4 \times 10^5$  buniek 293. Po inkubácii 72 h v 2 ml MEM doplnenom 2% FCS sa z infikovaných buniek zozbiera supernatant a testovali sa enzýmové aktivity.

### Biochemické overenie výsledkov *in vitro*

#### a) Test aktivity LCAT

Aktivita LCAT sa určuje meraním konverzie voľného  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu na esterifikovaný  $^{14}\text{C}$ -cholesterol s použitím proteolipozómov ako substrátu spôsobom opísaným Chenom a kol., (1982). Proteolipozómy sa pripravujú z fosfatidylcholínu, cholesterolu,  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu a apolipoproteínu AI a inkubujú sa s 20 ml supernatantu transfekčnej kultúry, ktorá sa testuje. Produkty (voľný  $^{14}\text{C}$ -cholesterol) a esterifikovaný  $^{14}\text{C}$ -cholesterol) reakcie sa oddelia chromatografiou na tenkej vrstve a detegujú sa autorádiografiou na prístroji Instant Imager (Packard). Aktivita LCAT je vyjadrená ako percento

esterifikovaného  $^{14}\text{C}$ -cholesterolu na hodinu a na 20 ml testovaného supernatantu.

#### b) Test aktivity CETP

Aktivita CETP sa určuje meraním kapacity tohto enzýmu prenášať estery cholesterolu z HDL častice (donora) na časticu LDL (akceptor). Substráty pre túto reakciu poskytla súprav firmy Wak-Chemie, Medical GmbH. Fluorescencia cholesterol linoleátu nachádzajúceho sa v donorových časticiach je zhasaná v natívnom stave linoleátu a iba v prítomnosti aktívneho CETP, ktorý katalyzuje v prítomnosti aktívneho CETP, ktorý katalyzuje transfer fluorescenčnej molekuly na akceptorovú časticu a táto fluorescencia sa môže detegovať pri 535 nm. Aktivita CETP je vyjadrená ako hodnota intenzity fluorescencie emitovanej pri 535 nm na 30 ml testovaného tkanivového supernatantu a na hodinu.

#### c) Test aktivity HL

Aktivita pečenej lipázy sa stanovuje s použitím syntetického triglyceridového substrátu zo súpravy Progen Biotechnik GmbH. Tento substrát obsahuje fluorescenčnú pyrénovú skupinu, ktorá je v natívnom stave molekuly maskovaná trinitrofenolom a výsledok hydrolýzy trinitrofenolu je emisia fluorescencie pri 400 nm. Množstvo HL (v pmol/l) nachádzajúcej sa v 20 ml supernatantu sa určí meraním intenzity fluorescencie emitovanej pri 400 nm po inkubácii substrátu s testovanou vzorkou a s použitím štandardnej plazmy zo súpravy.

## d) Test apolipoproteínu AI

Aktivita ApoAI sa určuje s použitím monoklonálnej protilátky anti-ApoAI. Doštičky Immulon II (Dynatech) sa potiahnu monoklonálnou protilátkou anti-ApoAI (10 mg/ml v uhličitanovom pufri pH 9,6), cez noc sa inkubujú pri 4 °C a potom sa saturujú s 2% BSA v PBS pH 7,4 jednu hodinu pri 37 °C. Bunkové supernatanty sa potom inkubujú jednu hodinu pri 37 °C, voliteľne inkubáciou jednu hodinu pri 37 °C so zmesou monoklonálnych protilátok anti-ApoAI značných peroxidázou a nariedených 1/5000. Väzba peroxidizovaných protilátok sa nakoniec deteguje inkubáciou s 250 µl TMB (KPL) a odrátaním doštičiek.

## Technika konštrukcie kyvadlových plazmidov

Konštrukcie bicistronových plazmidov sú uvedené detailne na obrázkoch 3 až 5. Získané bicistronové plazmidy sú zároveň kyvadlové plazmidy, pretože obsahujú adenovírusové sekvencie pIX-IVa2 nevyhnutné na rekombináciu s vírusovým genómom. Táto rekombinácia nastáva buď spoločnou transfekciou (kotransfekciou) s naštiepeným genómom pochádzajúcim z vírusovej  $\beta$ -galaktozidázy (konvenčný kyvadlový vektor) alebo dvojitou rekombináciou v *E. coli* (coli kyvadlový vektor).

Zhoda sekvencií rôznych plazmidových štruktúr sa analyzuje ich reštrikčným profilom. Táto analýza umožňuje vybrať rekombinantné klony, ktoré budú slúžiť pre následné klonovanie a tiež na overenie výsledkov klonovania. Reštrikčné enzýmy sú vybrané tak, aby podali čo najkompletnejšiu o celej klonovanej cDNA a počte strategických miest pre klonovanie. Avšak táto kontrola neumožňuje vylúčiť bodové mutácie, ktoré sa môžu objaviť v každom štádiu klonovania. Takéto mutácie sa môžu detegovať iba kompletným sekvenovaním príslušnej cDNA. Konečná kontrola validity získaných konštrukcií sa robí biochemickými

testami enzýmových aktivít LACT, CETP a HL *in vitro*, alebo detekciou prítomnosti ApoAI.

#### Príklad 1

#### Konštrukcie kyvadlových plazmidov LCAT-IRES-CETP

##### 1) Konštrukcia konvenčného kyvadlového vektora pXL2970

Expresný vektor pXL2968 RSV PCAT polyA bGH sa získal na jednej strane štiepením plazmidu pXL2616, obsahujúceho LACT cDNA a na druhej strane plazmidu pXL LPL, pod kontrolou promotora RSV a v protismere od polyadenylačného signálu hovädzieho rastového hormónu, reštrikčnými enzýmami SalI a ClaI a ligáciou výsledných fragmentov s T4 DNA ligázou.

Na získanie vektora sa uskutočnilo:

Každý z plazmidov pXL RSV LPL (2 µg) a pXL2616 (2 µg) sa štiepil s 10 jednotkami (U) ClaI v pufri 4 (20 mM Tris acetát, 10 mM Mg-acetát, 50 mM K-acetát a 1 mM DTT) doplnenom o 100 µg/ml acetylovaného BSA, počas 90 minút pri 37 °C. Pridal sa 100 mM NaCl a 10 U SalI a reakčná zmes sa opäť inkubovala pri 37 °C ďalších 90 minút. Po elektroforetickom rozdelení produktov štiepenia na 0,7% agarózovom géle sa pásy s veľkosťou 6,5 a 1,7 kb, zodpovedajúce pXLRSV a LCAT cDNA, z gélu vyrezali a extrahovali pomocou kitu Qiaquick. Tieto dva pásy sa ligovali so 400 U T4 DNA ligázy po inkubácii cez noc pri 14 °C.

Rekombinantný plazmid pXL2969 IRES-CETP vznikol z plazmidu Bluescript, ktorý má CETP cDNA modifikovanú na jej 5' konci zavedením miesta NcoI s použitím PCR priméru 5' GCCTGATAAC CATGGTGGCT GCCACAG 3' (sekvencia SEQ ID NO.: 1). Plazmid takto modifikovaný sa štiepil s NcoI a SalI a klonoval v smere od adenovírusovej sekvencie IRES nachádzajúcej sa v plazmide

pSKIRES, ktorý sa štiepil rovnakými reštrikčnými enzýmami nasledovným spôsobom:

2,5 µg plazmidu CETP a 2,5 µg plazmidu pSKIRES sa štiepilo s 10 U NcoI 90 minút pri 37 °C v pufrí 3 (50 mM Tris-HCl, 10 MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl a 1 mM DTT) a nasledovalo štiepenie s 10 U Sali 90 minút pri 37 °C. Produkty štiepenia sa rozdelili elektroforeticky a pásy 1,5 kb (CETP cDNA) a 3,5 kb sa extrahovali a ligovali za rovnakých podmienok, aké sú opísané v odseku vyššie.

Aby sa získal plazmid pXL2970, uskutočnil sa nasledovný postup:

4 µg plazmidu pXL2968 sa linearizovalo s 10 U Sali (pufor 3 + BSA 90 minút pri 37 °C). DNA sa potom extrahovala s použitím súpravy Qiaquick a získala sa v 50 µl vody dopredu zahriatej na 50 °C. Kohézne konce vyplývajúce zo štiepenia so Sali sa zatupili inkubáciou s 5 U Klenowovej polymerázy 15 minút pri 25 °C. DNA sa znova extrahovala pomocou súpravy Qiaquick a defosforylovala s 2 U telacej intestinálnej fosfatázy (CIP) 60 minút pri 37 °C. Plazmid pXL2969 (4 µg) sa najskôr štiepil s 5 U SmaI (pufor 4, 90 minút pri 37 °C). Produkty štiepenia dvoch plazmidov sa elektroforeticky rozdelili v 0,7% agarózovom géle a pásy DNA s veľkosťou 8,5 kb (pXL2968) a 2,2 kb (IRES CETP cDNA) sa extrahovali súpravou Qiaquick a ligovali sa so 400 U T4 DNA ligázy (obrázok 3).

Aktivity LCAT a CETP plazmidu pXL 2970 sa testovali v supernatante bunkovej kultúry buniek 293 tri dni po transfekcii.

Aktivita LCAT tohto plazmidu zodpovedá 3,5% esterov cholesterolu tvorených za hodinu a aktivite CETP 120% (tabuľka 1 nižšie). Tieto hodnoty aktivity ukazujú, že plazmid pXL2970 skutočne syntetizuje LACT a CETP, ktoré sú katalyticky aktívne.

## 2) coli kyvadlový plazmid LCAT-IRES-CETP

Pri tejto technológii by mal kyvadlový vektor obsahovať:

- sekvencie ITR ("inverted terminal repeat" - obrátená koncová repetícia) a  $\Psi$  enkapsidačné sekvencie, ktoré sú nevyhnutné pre homologickú rekombináciu v *E. coli*, obklopujúci sekvenciu LCAT-IRES-CETP,

- počiatok replikácie ColE1, ktorý neumožňuje plazmidu replikáciu v kmeni *E. coli* C2110 a teda umožňuje klonalitu rekombinantného plazmidu,

- sebevražedný gén sacharóza B (letálny pre baktérie kultivované na sacharóze) a gén pre rezistenciu voči spektinomycínu, ktorý umožňuje selekciu rekombinantného klonu.

Aby sa vektor získal, bicistronový kyvadlový plazmid pXL2970 RSV LCAT-IRES-CETP sa štiepil s BstEII a SpeI tak, aby sa zaviedli sekvencie ITR a  $\Psi$  adenovírusového genómu a získal sa tak coli kyvadlový plazmid. Sekvencie ITR a  $\Psi$  sa izolovali štiepením plazmidu pXL2794 s BstEII a XbaI. Fragment s tupým koncom obsahujúcim kazetu spektinomycín-sacharóza B získanou štiepením pXL2757 s EcoRV a SmaI sa zaviedol do kyvadlového plazmidu pXL2970 + 2794 linearizovaného s FspI (obrázok 4).

Experimentálne sa postup uskutočňoval podľa nasledovného protokolu:

3  $\mu$ g plazmidu pXL2970 sa štiepilo s 20 U BstEII (pufor 2: 10 mM Tris HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT; 90 minút pri 60 °C) a potom s 10 U SpeI (90 minút pri 37 °C).

Výsledný fragment DNA sa extrahoval súpravou Qiaquick a defosforyloval s 2 U CIP (60 minút pri 37 °C). Plazmid pXL2794 sa štiepil s 20 U BstEII (pufor 2, 90 minút pri 60 °C), potom s 20 U XbaI (9 minút pri 37 °C). Pásky 6,5 kb (pXL2970) a 2,9 kb

(ITR  $\Psi$  a Kan<sup>r</sup> z pXL2794), extrahované po elektroforetickom rozdelení, sa ligovali z použitím T4 DNA ligázy (40 U).

Výsledný plazmid pXL2970+2794 (1,5  $\mu$ g) sa štiepil s 5 U FspI (pufor 4, 60 minút pri 37 °C), extrahoval sa pomocou súpravy Qiaquick a ligoval (T4 DNA ligáza, 400 U) s fragmentom DNA veľkým 3,8 kb extrahovaným z gélu, ktorý obsahuje kazetu sacB-spect<sup>r</sup> pochádzajúcu zo štiepenia plazmidu pXL2757 s 10 U SmaI (pufor 4, 90 minút pri 25 °C), nasledovalo 10 U EcoRV (90 minút pri 37 °C).

Kyvadlový plazmid pXL2974 LCAT-IRES-CETP sa selektoval na médiu so spektinomycínom a na médiu spektinomycín+sacharóza. Výsledky štiepenia s NcoI (6,2 + 3,3 + 2,2 kb), NotI (13,5 kb) a EcoRV (1 + 3 + 9,5 kb) sú v súlade s reštrikčnou mapou uvedeného plazmidu.

Aktivita LCAT plazmidu pXL2974 zodpovedá 2% esterov cholesterolu tvorených za hodinu a aktivite CETP 114% (tabuľka 1). Aktivity LCTA a CETP sa zistili na úrovni coli kyvadlového plazmidu LCAT-IRES-CETP.

Tabuľka 1

	Aktivita LCAT	Aktivita CETP
kyvadlový plazmid LCTA-IRES-CETP	3,5 $\pm$ 0,2 %	120 $\pm$ 2 %
coli kyvadlový plazmid LCAT-IRES.-CETPO	2 $\pm$ 0,2 %	114 $\pm$ 2 %

## Príklad 2

Konštrukcia kyvadlového plazmidu RSV LCAT-IRES-HL

HL cDNA sa klonovala za IRES vo vektore Bluescript a fragment IRES-HL sa potom vložil spôsobom podobným do vektora LCAT-IRES-CETP podľa nasledovného protokolu:

Plazmid pXL2971 (4  $\mu$ g) sa štiepil tak, aby sa odstránilo miesto NcoI so 40 U BglII (pufor 3, 90 minút pri 37 °C) a potom so 40 U SalI 90 minút pri 37 °C. DNA fragment s veľkosťou 2,5 kb (približná hmotnosť 0,5  $\mu$ g) pochádzajúci z týchto štiepení, sa po migrácii a extrakcii z gélu kontrolované štiepil s NcoI (0,1-1 U NcoI/ $\mu$ g DNA) v pufri 4 6é minút pri 37 °C. Produktu štiepenia sa analyzujú delením v 0,7% agarózovom géle a pás s veľkosťou 1,5 kb obsahujúci HL cDNA ABC, získaný s 0,5 U NcoI, sa liguje (T4 DNA ligáza, 400 U) s fragmentom pSK IRES (1,3  $\mu$ g) pochádzajúcim zo štiepenia NcoI a SalI (1 U každého enzýmu, pufor 2, 37 °C).

Konečný vektor je uvedený na obrázku 5. Zodpovedajúci bicistronový kyvadlový plazmid LCAT-IRES-HL sa nazval pXL2984.

Tabuľka 2

	Aktivita LCAT	Aktivita HL
Kyvadlový plazmid LCAT-IRES-HL	1,2 $\pm$ 0,2 %	46 $\pm$ 2 %

### Príklad 3

#### Konštrukcia kyvadlového plazmidu ApoAI-IRES-LCAT

Všeobecný princíp pre túto konštrukciu je rovnaký s predchádzajúcimi. LCAT sa mutoval pomocou PCR, vrátane ďalšieho miesta NcoI, umožňujúceho jeho ligáciu na správne miesto za IRES. Jeho sekvencia sa kompletne skontrolovala. Fragment IRES-LCAT sa potom ligoval za ApoAI. Výsledný vektor je odvodený priamo z coli technológie a nazval sa pXL3058 (obrázok 6). Po

zvyčajnej dvojitej rekombinácii sa výsledný vírusový vektor kontroloval na aktivitu. ApoAI sa detegoval Western prenosom a aktivita LCAT sa vyhodnotila na 1,3% (šum pozadia 0,2%).

ZOZNAM SEKVENCÍÍ

(2) Informácia o sekvencii SEQ ID NO: 1:

(i) charakteristika sekvencie:

(A) dĺžka: 27 bázových párov

(B) typ: nukleotid

(C) typ vlákna: jednoduché

(D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: cDNA

(xi) opis sekvencie SEQ ID NO.: 1:

GCCTGATAAC CATGGTGGCT GCCACAG

27

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Defektný rekombinantný vírus, ktorý obsahuje aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, pričom uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a navzájom oddelené sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).
  
2. Defektný rekombinantný vírus podľa nároku 1, kde nukleové kyseliny sú vybraté z génov kódujúcich celý proteín alebo jeho časť, a to lecitíncholesterolacyltransferázu (LCAT), proteín prenášajúci estery cholesterolu (CETP), pečeneňovú lipázu (HL), apolipoproteíny AI a AIV alebo jeden z ich variantov.
  
3. Defektný rekombinantný vírus podľa nároku 1 alebo 2, kde nukleové kyseliny sú výhodne gény kódujúce celý alebo časť zo zodpovedajúcich ľudských enzýmov, proteínov a/alebo kofaktorov.
  
4. Defektný rekombinantný vírus podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde nukleové kyseliny sú výhodne cDNA alebo gDNA.
  
5. Defektný rekombinantný vírus podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde jedna z nukleových kyselín kóduje LCAT.

6. Defektný rekombinantný vírus podľa nároku 5, kde druhá nukleová kyselina kóduje CETP, HL alebo ApoAI.

7. Defektný rekombinantný vírus podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde transkripčný promótor je výhodne vybraný z promótorov adenovírusových sekvencií nukleových kyselín MLP a E1A a promótorov CMV, RSV-LTR, MT-1 a SV40.

8. Defektný rekombinantný vírus podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, kde sekvencia IRES je odvodená z picorna-vírusov.

9. Defektný rekombinantný vírus podľa nároku 8, kde picorna-vírusová sekvencia IRES je odvodená z vírusu encefalomyokarditídy alebo z poliovírusu.

10. Defektný rekombinantný vírus podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, ktorý postráda aspoň tie úseky svojho genómu, ktoré sú nevyhnutné pre jeho replikáciu v infikovanej bunke.

11. Defektný rekombinantný vírus podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, ktorý je výhodne adenovírus, výhodne ľudský adenovírus typu Ad5 alebo Ad2 alebo adenovírus zvieracieho pôvodu.

12. Defektný rekombinantný adenovírus, ktorý obsahuje aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a sú zapojené do reverzného transportu

cholesterolu, pričom uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené navzájom sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

13. Defektný rekombinantný adenovírus podľa nároku 12, ktorý obsahuje aspoň jedene gén kódujúci LCAT a jeden gén kódujúci HL, pričom uvedené gény sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené navzájom sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

14. Defektný rekombinantný adenovírus podľa nároku 12, ktorý obsahuje aspoň jeden gén kódujúci LCAT a jeden gén kódujúci apoA-I, pričom uvedené gény sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené navzájom sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

15. Defektný rekombinantný adenovírus podľa nároku 12, ktorý obsahuje aspoň jeden gén kódujúci LCAT a jeden gén kódujúci CETP, pričom uvedené gény sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené navzájom sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

16. Defektný rekombinantný adenovírus podľa nároku 15, ktorý je odvodený z homologickej rekombinácie medzi pXL2974 a pXL2822.

17. Defektný rekombinantný adenovírus podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 16, ktorý obsahuje aspoň jednu deléciu v úseku E1 a jednu deléciu v úseku E3.

18. Prokaryotický plazmid, ktorý obsahuje adenovírusový genóm, a aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, pričom uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené navzájom sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

19. Prokaryotický plazmid, ktorý obsahuje prvý úsek umožňujúci replikáciu v prokaryotických bunkách a druhý úsek obsahujúci adenovírusový genóm ohraničený jedným alebo viacerými reštrikčnými miestami, ktoré nie sú prítomné v danom genóme a ktorý obsahuje aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, pričom uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s transkripčným promótorom a oddelené navzájom sekvenciou kódujúcou vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES).

20. Prokaryotický plazmid podľa nároku 18 alebo 19, kde z adenovírusového genómu sú odstránené jeho úseky E1 a E3.

21. Prokaryotický plazmid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 18 až 20, ktorý obsahuje vírusové sekvencie ITR a  $\Psi$ .

22. Prokaryotický plazmid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 18 až 21, kde replikačný počiatok pochádza z bakteriálneho plazmidu vybraného zo skupiny obsahujúcej RK2, pBR322 a pUC.

23. Prokaryotický plazmid, ktorý obsahuje v orientácii 5' - 3' aspoň jeden replikačný počiatok funkčný v prokaryotických bunkách, prvú časť adenovírusového genómu obsahujúcu vírusové sekvencie ITR a  $\Psi$ , transkripčný promótor, prvú nukleovú kyselinu kódujúcu enzým, proteín a/alebo kofaktor, ktoré sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, sekvenciu IRES, druhú nukleovú kyselinu kódujúcu enzým, proteín a/alebo kofaktor, ktoré sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, polyadenylačné miesto a druhú časť adenovírusového genómu obsahujúcu úsek pIX-IVa2.

24. Prokaryotický plazmid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 18 až 23, ktorý navyše obsahuje úsek umožňujúci selekciu prokaryotických buniek obsahujúcich uvedený plazmid.

25. Prokaryotický plazmid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 18 až 24, kde aspoň jedna nukleová kyselina kóduje LCAT a druhá nukleová kyselina je vybratá z nukleových kyselín kódujúcich HL, ApoAI alebo CETP.

26. Prokaryotický plazmid podľa nároku 25, ktorý je plazmid pXL2794 obsahujúci dve nukleové kyseliny kódujúce LCAT a CETP.

27. Prokaryotický plazmid podľa nároku 25, ktorý je plazmid pXL3058 obsahujúci dve nukleové kyseliny kódujúce LCAT a ApoAI.

28. Kyvadlový plazmid, ktorý obsahuje aspoň dve nukleové kyseliny kódujúce enzýmy, proteíny a/alebo kofaktory, ktoré sú rozdielne a sú zapojené do reverzného transportu cholesterolu, pričom uvedené nukleové kyseliny sú operatívne spojené s

transkripčným promótorom, polyadenylačné miesto a sekvenciu kódujúcu vnútorné ribozómové vstupné miesto (IRES) umiestnenú medzi dvoma uvedenými nukleovými kyselinami.

29. Kyvadlový plazmid podľa nároku 28, ktorý je plazmid pXL2984 obsahujúci dve nukleové kyseliny kódujúce HL a LCAT.

30. Kyvadlový plazmid podľa nároku 28, ktorý je plazmid pXL2970 obsahujúci dve nukleové kyseliny kódujúce LCAT a CETP.

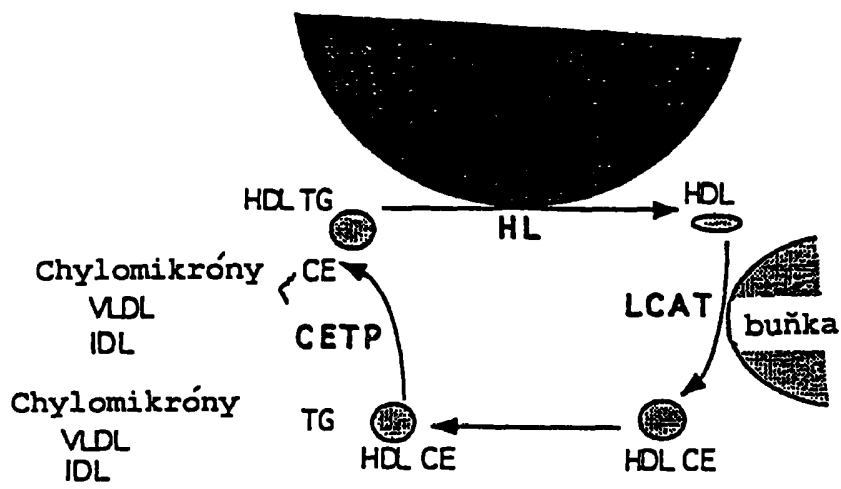
31. Prokaryotická bunka transformovaná prokaryotickým plazmidom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 18 až 27.

32. Použitie defektného rekombinantného vírusu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11, rekombinantného adenovírusu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 17 alebo plazmidu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 28 až 30 na prípravu farmaceutického prípravku určeného na liečenie alebo prevenciu patologických stavov spojených s hypoalfalipoproteinémiou.

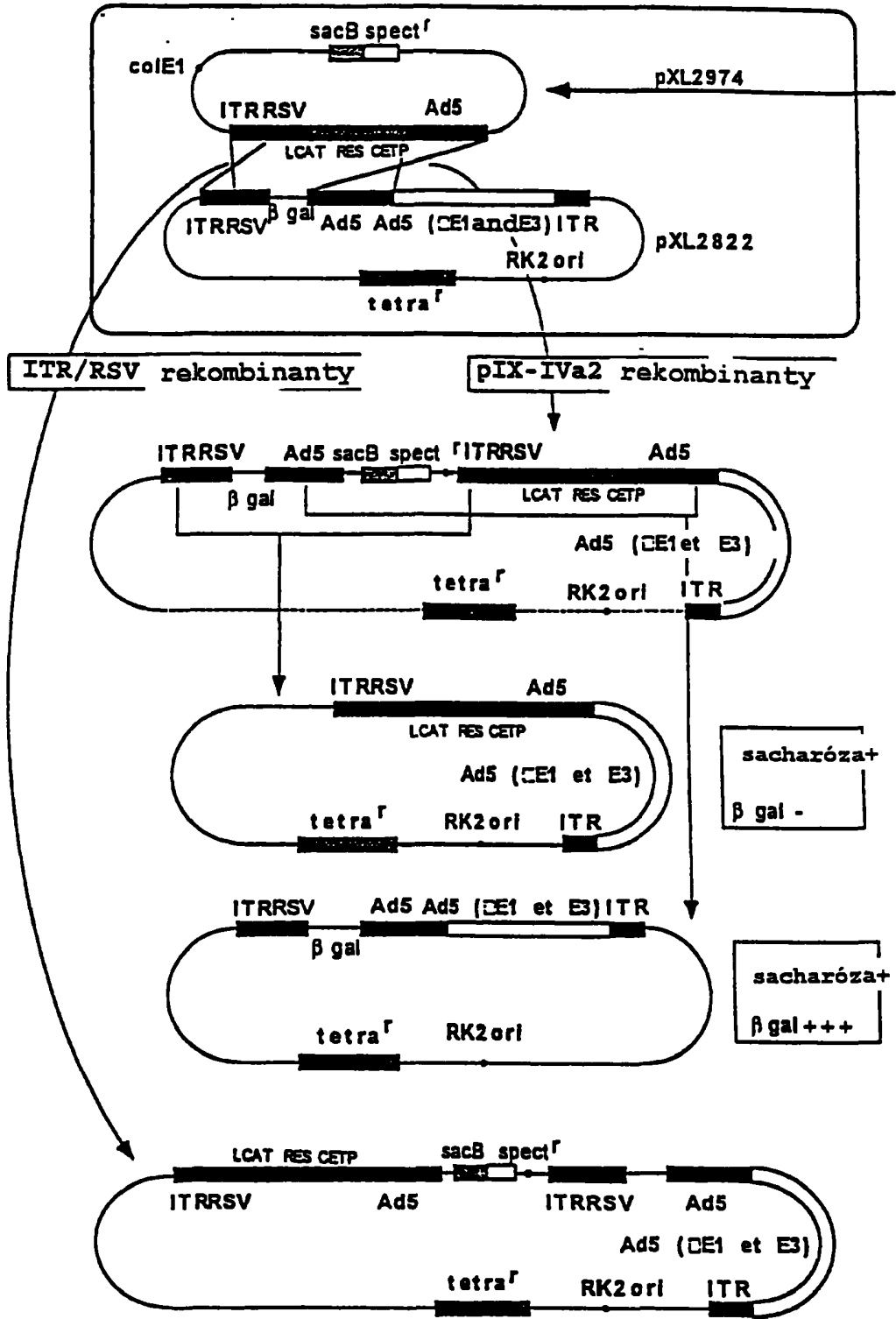
33. Použitie podľa nároku 32 pre prípravu farmaceutického prípravku určeného na liečenie alebo prevenciu aterosklerózy a/alebo restenózy.

34. Farmaceutický prípravok v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje jeden alebo niekoľko defektných rekombinantných vírusov podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11, adenovírus podľa ktoréhokoľvek z nárokov 12 až 17 alebo plazmid podľa ktoréhokoľvek z nárokov 28 až 30.

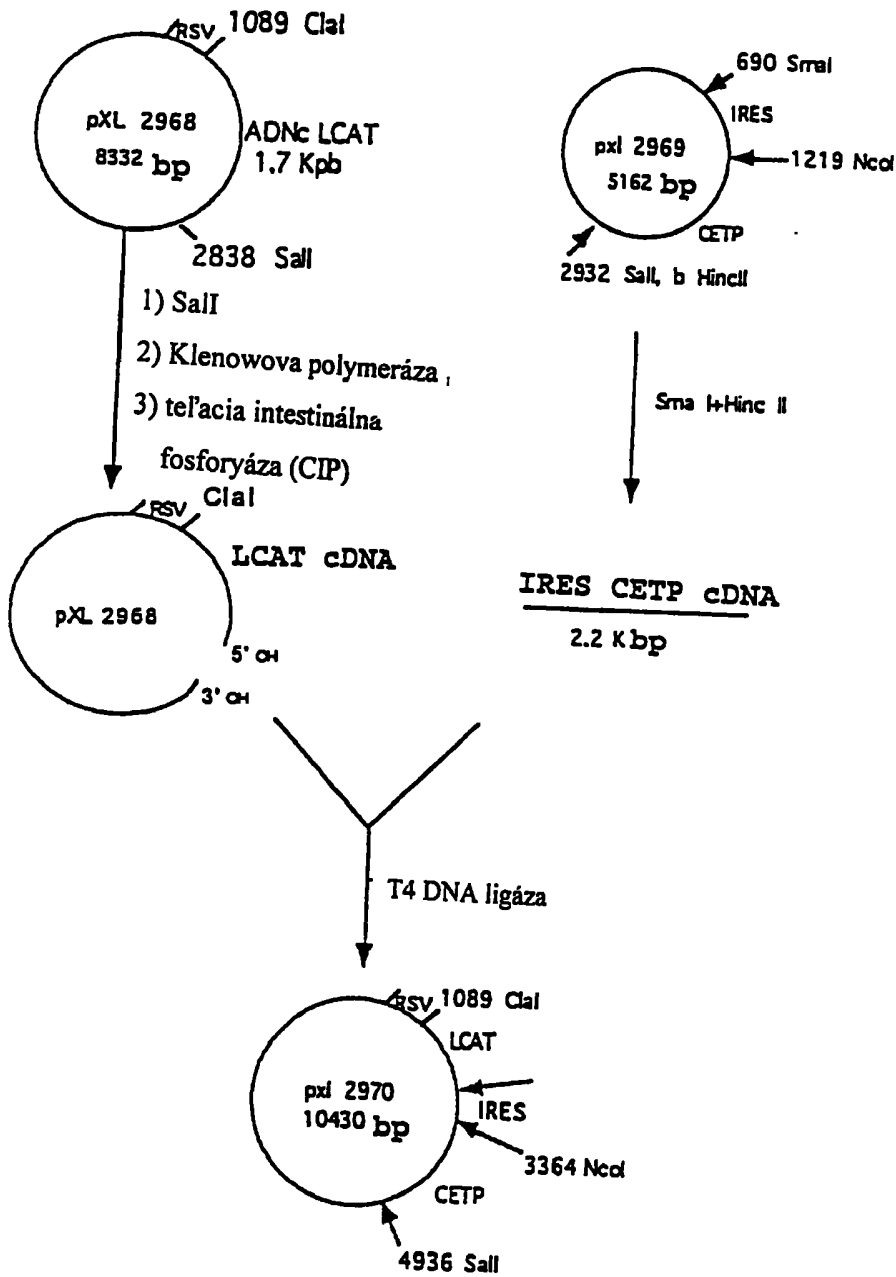
35. Farmaceutický prípravok podľa nároku 34 v y z n a č u j ú-  
c i s a t ý m, že je v injikovateľnej forme a obsahuje  $10^4$  až  
 $10^{14}$  pfu/ml adenovírusu.



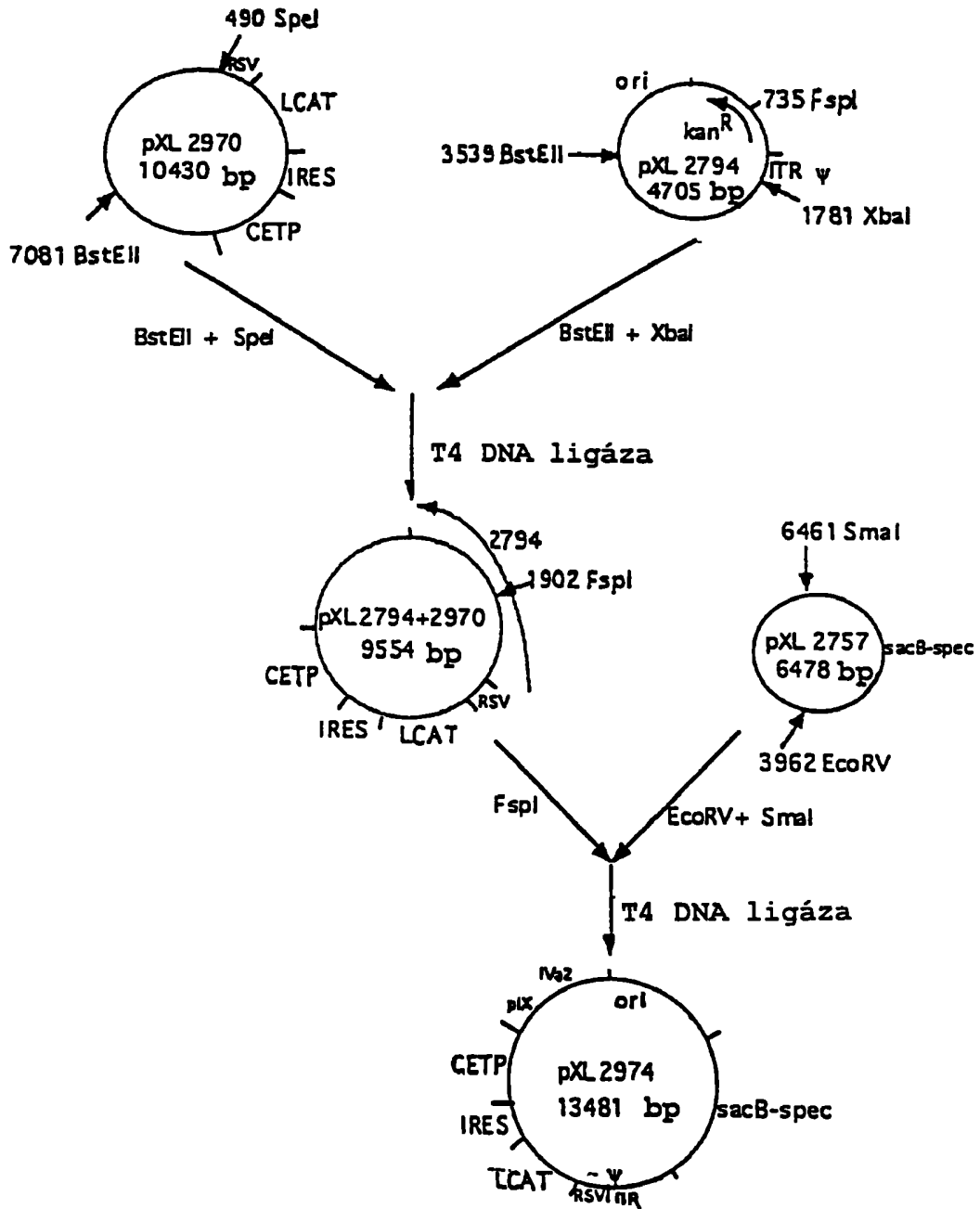
Obr. 1.



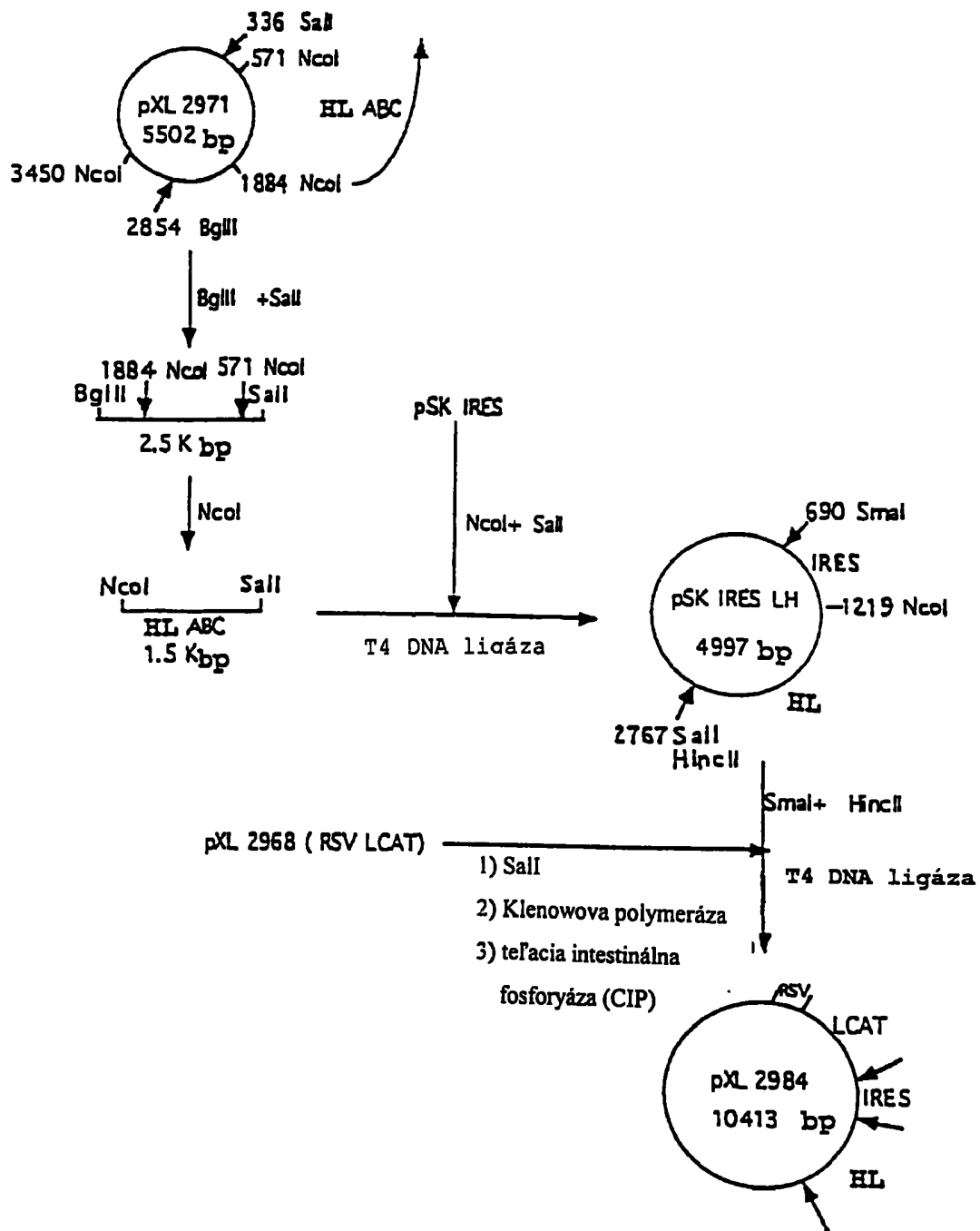
Obr. 2.



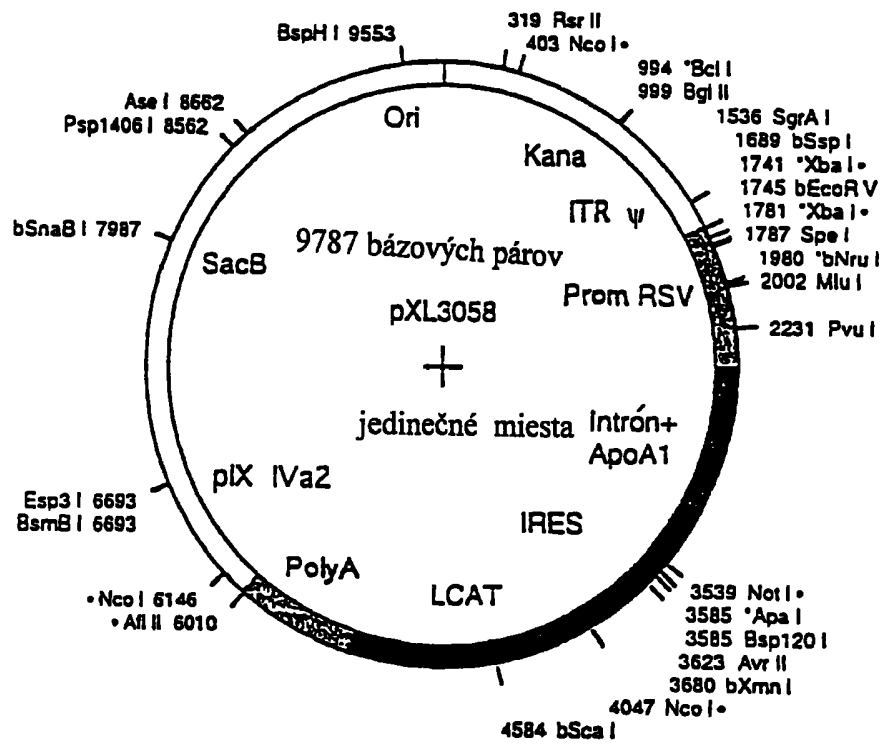
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6