

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

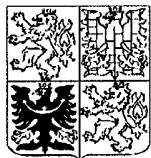
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3088-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **31.03.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9504234**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/04493**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/30385**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 H 21/00
C 12 N 15/00

(71) Přihlášovatel:

CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY,
Cleveland, OH, US;

(72) Původce:

Branellec Didier, La Varenne-Saint Hilaire,
FR;

Walsh Kenneth, Carlisle, MA, US;

Isner Jeffrey M., Weston, MA, US;

Denefle Patrice, Saint-Maur, FR;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273,
Praha 4, 14021;

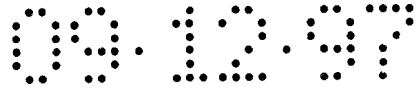
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Virové vektory a jejich použití pro léčení
hyperproflerativních nemocí, zejména
restenozy**

(57) Anotace:

Poškozené rekombinantní viry, které obsahují
přínejmenším jeden vložený gen kodující celý
nebo část GAX proteinu nebo variantu tohoto
proteinu, a jejich terapeutického použití, ze-
jména pro léčení postangioplastické resteno-
zy.

CZ 3088-97 A3



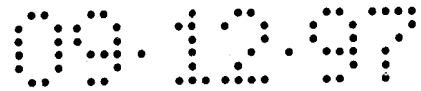
Virové vektory a jejich použití pro léčení hyperproliferativních nemocí, zejména restenozy

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nové, zvláště účinné, metody léčení patologií spojených s hyperproliferativními onemocněními prostředky genové terapie. Způsob podle předkládaného vynálezu sestává, konkrétněji, ve specifickém blokování proliferace buněk vaskulárního hladkého svalstva (vascular smooth-muscle cells - VSMC) pomocí *in vivo* přenosu genu *gax*. Způsob podle předkládaného vynálezu je velmi účinně upraven pro léčení postangioplastických restenos pomocí přeexprimování *gax* genu ve vaskulární stěně. Podle předkládaného vynálezu lze *gax* gen přenášet pomocí virových vektorů. Tyto vektory jsou s výhodou adenovirové vektory.

Dosavadní stav techniky

Byly izolovány různé geny, které jsou spojeny s blokováním buněčného oddělení. Tím dojde k tomu, že *gas* (růst-blokování specifický: *gas* 1 až 6) a *gadd* (růst-blokování a vyvolatelný DNA poškozením: *gadd34*, *gadd45* a *gadd153*) geny jsou silně exprimovány ve kviscentních buňkách, to znamená v buňkách, které jsou blokovány v G0 fázi buněčného cyklu (Schneider a kol., Cell 1988, 54: 787-793; Del Sat a kol., Cell 1992, 12: 3514-3521; Cowled a kol., Exp. Cell. Res. 1994, 211: 197-202; Brancolini a Schneider, J. Cell. Biol. 1994, 124: 743-756; Zhan a kol., Mol. Cell. Biol. 1993, 13: 4242-4250; Jackman a kol., Cancer Res. 54: 5656-5662, 1994). V souladu s těmito zjištěními o genové expresi, mikroinjekce *gas-1* proteinu blokuje syntézu DNA (Del Sat a kol., Cell, 1992, 70: 595-607). Naopak přidání růstového faktoru jako je PDGF (platelet-derived growth factor - růstový faktor odvozený z



destiček) nebo fetální telecí sérum snižuje expresi těchto genu u *in vitro* modelů (Coccia a kol. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12: 3514-3521). O této specifitě exprese ve vztahu k stavu proliferace buňky se také jeví, že má svůj protějšek *in vivo*. Takto je gen *gas-1* silně exprimován v děloze u myši po vyjmutí vaječnicků (Ferrero a Cairo, *Cell. Biol. Int.* 1993, 17, 857-862). U téhož zvířecího modelu vedlo léčení estrogény k buněčné proliferaci, která je umístěna v děloze, a projevuje se zvýšením exprese proto-onkogenu *c-myc* a snížením exprese genu *gas-1*. Podobně u hepatitického modelu proliferace/regenerace je exprese genu *gas-6* silně omezena po dobu čtyř hodin po částečné heptatektomii, tj. v době přenosu z G0 na G1; tato exprese se vrátí k normálu, pravděpodobně jakmile bylo jednou iniciováno dělení hepatocytů (Ferrero a kol, *J. Cell. Physiol.* 1994, 158: 263-269).

Podstata vynálezu

Předkladatel vynálezu se zajímal o nový gen, tj. gen *gax* (růst-blokování specifický homeobox) a prokázal, že tento gen má vlastnosti, které jsou zejména výhodné pro použití v genové terapii hyperproliferativních nemocí, zejména restenozy. *Gax* gen byl původně zjištěn v cDNA knihovně připravené z krysí aorty. Kóduje protein o 303 aminokyselinách. Jeho sekvence byla charakterizována a jeho cDNA byla klonována (Gorski a kol. *Mol. Cell. Biol.* 1993, 6, 3722-3733). *Gax* gen má určité vlastnosti, které jsou podobné těm u genů *gas* a *gadd*, protože se také zdá, že reguluje přenos G0/G1 v buněčném cyklu. Stejným způsobem je hladina *gax* mRNA snížena u krysích VSMC desetkrát po dvou hodinách po vystavení PDGF (Gorski a kol. *Mol. Cell. Biol.* 1993, 6, 3722-3733). Exprese *gax* genu je proto potlačena během VSMC mitogenní odpovědi.

Jednou z výhod způsobu podle předkládaného vynálezu je principiálně specifita exprese *gax* genu. Takto, u dospělých



krys, je gax gen hlavně exprimován v kardiovaskulárním (aorta a srdce) systému. Na druhou stranu při demonstrování přítomnosti gax mRNA v játrech, mozku, žaludku nebo kosterních svalech selhal northern blott. Post-angioplastická restenose je lokalizovaná hyperproliferativní nemoc, která se rozvíjí po nechirurgické intervenci v oblasti atherosklerotické skvrny. Díky tomu vede léčení atherosklerotických lézí angioplastií často (až 50 % případů v určité studii) k restenose, po které následuje mechanické poškození arteriální stěny. Klíčovou událostí tohoto mechanismu je proliferace a migrace buněk vaskulárního hladkého svalstva (VSMC) z tunica media směrem do tunica intima, zejména z důvodu nepřítomnosti chránění a/nebo zpětné vazby endotheliálních buněk v tunica intima. Schopnost selektivně exprimovat antiproliferativní gen podle předkládaného vynálezu ve VSMC buňkách je velmi podstatnou výhodou.

Další výhodou způsobu podle předkládaného vynálezu je skutečnost, že gax gen patří do skupiny homeotických genů. Tyto geny kódují transkripční faktory, které obsahují sekvence (nebo homeodomény), které rozpoznávají konkrétní oblasti DNA (nebo homeoboxu) (review: Gehring a kol. Cell, 78: 211-223, 1994). Homeodoména krysího gax proteinu je obsažena mezi aminokyselinami 185 a 245. Zajímavé je, že homeotické geny, které byly do současné doby identifikovány jsou zahrnuty v kontrole buněčné proliferace/růstu během embryogeneze, a tak posilují terapeutický potenciál způsobu podle předkládaného vynálezu (review: Lawrence a Morata Cell 78: 181-198, 1994; Krumlauf, Cell 78: 191-201, 1994).

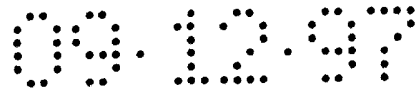
Předkládaný vynález se tak týká poškozeného rekombinantního viru, který obsahuje přinejmenším jeden vložený gen kódující celý nebo část GAX proteinu nebo variantu tohoto proteinu. Vynález se také týká použití takových virů pro léčení hyperproliferativních patologií.



Ve virech podle předkládaného vynálezu může být vložený gen fragmentem komplementární DNA (cDNA) nebo genomické DNA (gDNA) nebo hybridní konstrukt sestávající, například, z cDNA, do které byl vložen jeden nebo více intronů. Gen také obsahuje syntetické nebo polosyntetické sekvence. Jak již bylo uvedeno, gen může být gen kódující celý nebo část GAX proteinu nebo to může být variant tohoto proteinu. V předkládaném vynálezu označuje pojem variant jakýkoliv mutant, fragment nebo peptid, který má přinejmenším jednu biologickou vlastnost GAX, stejně jako jakýkoliv homolog GAX, který byl získán z jiných zdrojů. Tyto fragmenty a varianty lze získat jakoukoliv technikou známou odborníkům, zejména genetickými a/nebo chemickými a/nebo enzymatickými modifikacemi nebo hybridizací nebo expresním klonováním, umožňující, aby byly varianty vybrány podle jejich biologické aktivity. Genetické modifikace zahrnují supresi, delecii, mutaci atd.

V předkládaném vynálezu je vložený gen, s výhodou, gen kódující celý nebo část krysího GAX proteinu nebo jeho lidského homologu. Ještě výhodněji se jedná o cDNA nebo gDNA.

Obecně vložený gen také obsahuje sekvence, které umožňují, aby byl exprimován v infikovaných buňkách. Tyto sekvence mohou být sekvencemi, které jsou přirozeně odpovědné za expresi daného genu, pokud jsou tyto sekvence schopné funkce v infikované buňce. Sekvence také mohou být různého původu (odpovědné za expresi různých proteinů nebo dokonce syntetických proteinů). Zejména to mohou být sekvence eukaryotních nebo virových genů nebo odvozené sekvence, které stimulují nebo potlačují transkripci genu specifickým nebo nespecifickým způsobem a vyvolatelným nebo nevyvolatelným způsobem. Jako příklad se může jednat o promotorovou sekvenci, která je odvozena z genomu buňky, kterou je žádoucí infikovat nebo z genu viru, zejména promotorů adenovirové E1A a MLP genu, CMV nebo LTR-RSV promotoru atd. Eukaryotní promotory, které lze také uvést, jsou všudypřítomné promotory (HPRT,



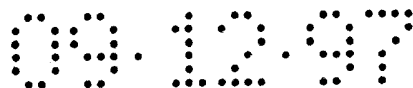
vimentin, aktin, tubulin, atd.), promotory přechodného vlákna (desmin, neurofilamenty, keratin, GFAP, atd.), promotory terapeutického genu (typ MDR, CFTR, faktor VIII, atd.) tkáň-specifické promotory (aktin promotor v buňkách hladkých svalů), promotory, které jsou, s výhodou aktivovány v dělicích se buňkách, nebo jiné promotory, které reagují na stimuly (receptory steroidního hormonu, receptory retinové kyseliny, atd.) Navíc, tyto expresní sekvence lze modifikovat přidáním aktivujících sekvencí, regulačních sekvencí, atd. Jinak, pokud vložený gen neobsahuje jakékoli exprimované sekvence, lze jej vložit do genomu poškozeného viru v protisměru takové sekvence.

Navíc, vložený gen obecně zahrnuje, ve směru kódující sekvence, signální sekvenci, která má směruje syntetizovaný polypeptid do vylučovacích cest cílové buňky. I když tato signální sekvence může být přirozená GAX signální sekvence, může to také být jiná funkční signální sekvence (například genu pro thymidin kinasu) nebo umělá signální sekvence.

Viry podle předkládaného vynálezu jsou poškozené viry, a proto nejsou schopné autonomní replikace v cílové buňce. Obecně, gen defektních virů, které se používají podle předkládaného vynálezu neobsahuje přinejmenším sekvence, které jsou nutné pro replikaci daného viru v infikované buňce. Tyto oblasti lze buď vyjmout (celé nebo část), vyřadit z funkce nebo je lze nahradit jinými sekvencemi, zejména vloženým genem. S výhodou si poškozený virus uchovává sekvence svého genomu, které jsou nezbytné pro zakapsidování virových částic.

Virus podle předkládaného vynálezu je odvozen od adenoviru, adenosouvisejícího viru (AAV) nebo od retroviru. Podle jednoho preferovaného provedení je virus adenovirus.

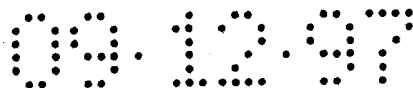
Existují různé serotypy adenovirů, jejichž struktura a vlastnosti se poněkud liší. Z těchto serotypů jsou podle předkládaného vynálezu k použití preferovány typ 2 nebo typ 5 lidského adenoviru (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenoviry zvířecího



původu (viz přihláška W094/26914). Adenoviry zvířecího původu, které lze použít podle předkládaného vynálezu jsou adenoviry psí, hovězí (Mavl, Beard a kol., Virology 75 (1990) 81), vepřové, z paviánů nebo jiných opic (SAV). S výhodou je adenovirus zvířecího původu psí adenovirus, ještě výhodněji CAV2 adenovirus [Manhattan nebo A26/61 kmen (ATCC VR-800), například]. S výhodou se podle předkládaného vynálezu používají adenoviry lidské, psí nebo směs obou.

S výhodou zahrnují poškozené viry podle předkládaného vynálezu ITR, kapsidační sekvenci a nukleovou kyselinu. Ještě zajímavější je v genomu adenoviru podle předkládaného vynálezu, že přinejmenším oblast E1 je nefunkční. Virový gen lze upravit tak, že je nefunkční, jakoukoliv technikou známou odborníkům, zejména úplným odstraněním, nahrazením, částečnou delecí nebo přidáním jedné nebo více bází k uvažovanému genu (genům). Takových úprav lze dosáhnout *in vitro* (na izolované DNA) nebo *in situ*, například použitím technik genetické manipulace nebo působením mutagenních činidel. Další oblasti lze také modifikovat, zejména oblast E3 (W095/02697), oblast E2 (W094/28938), oblast E4 (W094/28152, W094/12649 a W095/02697) a oblast L5 (W095/02697). Podle preferovaného provedení obsahuje adenovirus podle předkládaného vynálezu delecí oblastí E1 a E4. Podle dalšího preferovaného provedení obsahuje delecí v oblasti E1, do které byla vložena oblast E4 a sekvence kódující GAX (srov. FR94 13355). Ve virech podle předkládaného vynálezu delece v oblasti E1 sahá přes nukleotidy 455 až 3329 v sekvenci Ad5 adenoviru.

Poškozené rekombinantní adenoviry podle předkládaného vynálezu lze připravit jakoukoliv technikou známou odborníkům (Levrero a kol., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Zejména se připravují homologní rekombinací mezi adenovirem a plasmidem, který nese, kromě jiného, požadovanou sekvenci DNA. Homologní rekombinace je vyvolána po kotransfekci daného adenoviru a plasmidu do vhodné

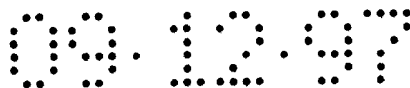


buněčné linie. Použitá buněčná linie by měla, s výhodou (i) být transformovatelná uvedenými prvky a (ii) obsahovat sekvence, které jsou komplementární k části genomu poškozeného adenoviru, s výhodou v integrované formě, aby se zabránilo riziku rekombinace. Příklady buněčných linií je buněčná linie 293 lidské embryonální ledviny (Graham a kol., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), která obsahuje, zejména, integrovanou do svého genomu, levorukou část genomu Ad5 adenoviru (12 %) nebo buněčné linie, které jsou komplementární k funkcím E1 a E4 jak bylo popsáno, zejména, v přihláškách č. WO94/26914 a WO95(02697).

Následně jsou rozmnožené adenoviry získány a čištěny standardními molekulárně biologickými technikami jak je ilustrováno v příkladech.

Adenosouvisající viry (AAV) jsou DNA viry relativně menší velikosti, které se integrují, stabilně a místně specifickým způsobem, do genomu infikovaných buněk. Jsou schopné infikovat širokou škálu buněk aniž by ovlivnily buněčný růst, morfologii nebo diferenciaci. Navíc, se zdá, že nejsou zahrnuty do lidských patologií. Genom AAV byl klonován sekvenován a charakterizován. Zahrnuje přibližně 4700 bází a obsahuje oblast převráceného terminálního opakování (inverted terminal repeat - ITR) o délce přibližně 145 bází na každém konci, která slouží jako výchozí bod replikace viru. Zbytek genomu je rozdělen do dvou nezbytných oblastí, které nesou kapsidační funkce: levoruká část genomu, která obsahuje rep gen zahrnutý v replikaci viru a expresi virového genu; a pravorukou část genomu, která obsahuje cap gen kódující kapsidový protein viru.

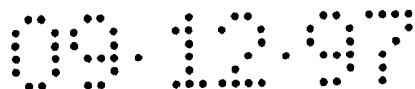
Použití vektorů odvozených od AAV pro přenos genů *in vitro* a *in vivo* bylo popsáno v literatuře (viz, zejména, WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Tyto přihlášky popisují různé konstrukty odvozené od AAV, ve kterých jsou rep a/nebo cap geny odstraněny a nahrazeny



požadovaným genem, a použití těchto konstruktů pro přenos požadovaného genu *in vitro* (do kultivovaných buněk) nebo *in vivo* (přímo do organismu). Poškozené rekombinantní AAV podle předkládaného vynálezu lze připravit kotransfekcí plasmidu obsahujícího požadovanou nukleokyselinovou sekvenci, která je obklopena dvěma AAV oblastmi převráceného terminálního opakování (ITR) a plasmidu nesoucího AAV kapsidační geny (rep a cap geny), do buněčné linie, která je infikována lidským pomocným virem (například adenovirus). AAV rekombinanty, které tak byly vyrobeny, byly čištěny standardními technikami. Vynález proto také popisuje AAV odvozený rekombinantní virus jehož genom obsahuje sekvenci kódující GAX, která je obklopena AAV ITR. Vynález se také týká plasmidu obsahujícího sekvenci kódující GAX, která je obklopena dvěma ITR z AAV. Takový plasmid lze použít tak jak je pro přenos GAX sekvence s plasmidem, tam kde je to vhodné, který je zahrnut do liposomálního vektoru (pseudovirus).

Konstrukce rekombinantních retrovirových vektorů byla rozsáhle zpracována v literatuře: viz, zejména EP 453242, EP 178220, Bernstein a kol, Gent. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, atd. Zejména jsou retroviry integrační viry, které infikují dělicí se buňky. Retrovirový genom zahrnuje hlavně dvě LTR, kapsidační sekvenci a tři kódující oblasti (gag, pol a env). U rekombinantních vektorů odvozených od retroviru jsou geny gag, pol a env obecně odstraněny, celé nebo částečně a nahrazeny požadovanou heterologní nukleokyselinovou sekvencí. Tyto vektory lze konstruovat z různých typů retrovirů jako jsou, zejména, MoMuLV ("murine Moloney leukaemia virus" také označovaný jako MoMLV), MSV ("murine Moloney sarcoma virus"), HaSV ("Harvey sarcoma virus"), SNV ("spleen necrosis virus"), RSV ("Rous sarcoma virus") nebo jiný přátelský virus.

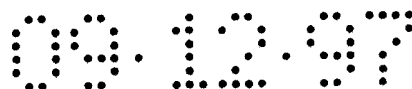
Obecně, aby byly zkonstruovány rekombinantní retroviry obsahující sekvenci kódující GAX podle předkládaného vynálezu,



je konstruován plasmid, který obsahuje, zejména, LTR, kapsidační sekvenci a kódující sekvenci, která je pak použita pro transfekci toho, co je nazýváno enkapsidační buněčná linie, která je schopna doplňovat retrovirové funkce, které chybí u plasmidu. Obecně jsou enkapsidační buněčné linie schopné exprimovat geny gag, pol a env. Takové enkapsidační buněčné linie byly popsány v dosavadním stavu techniky, zejména buněčná linie PA317 (US 4,861,719), buněčná linie PsiCRIP (WO 90/02806) a buněčná linie GP+envAm-12 (WO 89/07150). Navíc, rekombinantní retroviry mohou obsahovat modifikace v LTR pro potlačení transkripční aktivity stejně jako enkapsidační sekvence, které zahrnují část gag genu (Bender a kol., J. Virol. 61 (1987) 1693). Rekombinantní retroviry, které byly vyrobeny, byly následně čištěny běžnými technikami.

Použití poškozených rekombinantních adenovirů pro léčení restenozy je velmi výhodné. Adenoviry mají vysokou infekční kapacitu pro proliferující buňky vaskulárního hladkého svalstva. To umožňuje použít relativně malá množství aktivní složky (rekombinantního adenoviru), která tak vedou k účinnému a velmi rychlému působení v léčených místech. Adenoviry podle předkládaného vynálezu jsou také schopny exprimovat velkými rychlostmi vložený gag gen, což vede k velmi účinnému terapeutickému působení. Navíc díky jejich episomální povaze, setrvávají adenoviry podle předkládaného vynálezu v proliferujících buňkách po omezenou dobu, a tak mají přechodný vliv, který je vynikajícím způsobem upraven pro žádaný terapeutický efekt.

Předkládaný vynález se také týká farmaceutického prostředku, který obsahuje jeden nebo více poškozených rekombinantních virů, které již byly popsány. Takové prostředky mohou být v takové podobě, která je vhodná pro plánovaný způsob jejich podávání povrchovou, orální, parenterální, intranasální,



intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární atd. cestou.

S výhodou obsahuje prostředek podle předkládaného vynálezu excipienty, které jsou farmaceuticky přijatelné pro injikovatelné prostředky, zejména pro injekce do buněčné stěny. Tyto excipienty jsou, zejména, sterilní, isotonické roztoky solí (hydrogen nebo dihydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý nebo hořečnatý, atd. nebo směsi takových solí), nebo suché, zejména lyofilizované prostředky, které se rekonstituují přidáním sterilizované vody nebo fyziologického roztoku na injikovatelné roztoky. Excipient také může být hydrogel, který se připravuje z jakéhokoliv biokompatibilního nebo nejedovatého (homo nebo hetero) polymeru. Takové polymery byly popsány, například, v přihlášce WO 93/08845. Některé z nich, jako zejména ty z ethylenoxidu nebo propylenoxidu jsou komerčně dostupné.

Při léčení patologií, které souvisejí s hyperproliferativními nemocemi, lze poškozené rekombinantní adenoviry podle předkládaného vynálezu podávat různými cestami, zejména injekčně. S výhodou, jsou při léčení restenozy adenoviry podle předkládaného vynálezu podávány přímo do stěny krevní cévy pomocí angioplastického balónku, který je pokryt hydrofilním filmem (například hydrogelem), který je nasycený adenoviry, nebo pomocí jiného katetru obsahujícího infuzní komůrku pro roztok adenoviru, kterou pak lze aplikovat přesně do místa léčení a umožňuje adenovirům místní a účinné uvolnění v místě léčené buňky. Tento způsob podávání s výhodou umožňuje infikovat velké množství (až 9,6 %) buněk tunica media, které tvoří preferovaný cíl pro léčení restenozy, zatímco standardní způsoby podávání (například intravenózní injekce) neumožňují, aby byly buňky infikovány v takovém rozsahu.

Způsob léčení podle předkládaného vynálezu s výhodou sestává z podávání prostředku, který obsahuje hydrogel nasycený

rekombinantními adenoviry, do léčeného místa. Hydrogel může být umístěn přímo na povrch léčené tkáně, například během chirurgického zákroku. S výhodou je hydrogel podáván na léčené místo pomocí katetru, například balónkového katetru, zejména při angioplastii. Zejména výhodným způsobem je když je nasycený hydrogel dodáván na léčené místo pomocí balónkového katetru.

Dávky virů, které se používají do injekcí lze upravit podle podmínek, zejména podle použitého způsobu podávání a žádaného trvání léčení. Obecně, jsou rekombinantní viry podle předkládaného vynálezu podávány ve formě dávek 10^4 až 10^{11} pfu/ml. V případě AAV a adenovirů lze použít dávky 10^6 až 10^{10} pfu/ml. Pojem pfu ("jednotka tvorby destiček") odpovídá infekční síle suspenze virionů a je stanovován infikováním vhodné buněčné kultury a měřením, obecně po 48 hodinách, počtu destiček infikovaných buněk. Techniky stanovení pfu titru virového roztoku jsou dobře dokumentovány v literatuře.

Předkládaný vynález nabízí nový a velmi účinný prostředek léčení nebo prevence patologií, které souvisejí s hyperproliferativními nemocemi jako je restenosa.

Dále lze toto léčení použít na lidech stejně jako na jakýchkoliv zvířatech jako jsou ovce, hovězí dobytek, domácí zvířata (psi, kočky, atd.), koně, ryby, atd.

Předkládaný vynález je úplněji popsán v následujících příkladech, které jsou pouze ilustrativní a nijak neomezující.

Popis obrázku

Obrázek 1 : Zobrazení plasmidu pC01.

Obrázek 2 : Zobrazení plasmidu pXL-CMV-Gax^{HA}.

Obrázek 3 : Jaderné umístění GAX-HA proteinu ve VSMC transfekovaných pXL-CMV-Gax^{HA}.

Obrázek 3A : VSMC transfekované s vektorem pCGN (chybí GAX insert).

Obrázek 3B : VSMC transfekované s vektorem pXL-CMV-Gax^{HA}.

Obrázek 4 : Jaderné umístění GAX-HA proteinu ve VSMC transfekovaných Ad-CMV-Gax.

Obrázek 5 : Vliv Ad-CMV-GAX na proliferaci VSMC (t = 24 hodin)

- VSMC jsou sčítány po 24 hodinách po působení Ad-CMV-Gax (1000 pfu/buňka) nebo kontrolním adenovirem (Ad-RSV- β Gal, 1000 pfu/buňka). Buněčný růst je blokován (0,5 % FCS) nebo stimulován (FCS 20 %).

Obrázek 6 : Vliv Ad-CMV-GAX na proliferaci VSMC (t = 48 hodin)

- VSMC jsou sčítány po 48 hodinách po působení Ad-CMV-Gax (1000 pfu/buňka) nebo kontrolním adenovirem (Ad-RSV- β Gal, 1000 pfu/buňka). Buněčný růst je blokován (0,5 % FCS) nebo stimulován (FCS 20 %).

Obrázek 7 : Vliv Ad-CMV-GAX na životnost VSMC, které jsou inkubovány v přítomnosti fetálního telecího séra (FCS 20 %).

- experimentální podmínky, srov. obrázek 6.

Obrázek 7A : buňky, které nejsou léčeny adenovirem

Obrázek 7B : buňky, které jsou léčeny Ad-RSV- β Gal

Obrázek 7C : buňky, které jsou léčeny Ad-CMV-Gax

Obrázek 8 : Vliv Ad-CMV-Gax a Ad-RSV- β Gal na krysí karotidovou artérii po působení balónkového katetru.

Obrázek 8A : měření povrchové oblasti v intima

Obrázek 8B : měření poměru intima ku media

Obrázek 8C : měření lumenálního zúžení.

Obrázek 9 : Arteriální průřez kontrolních a léčených cév

Obrázek 9A : kontrolní cévy léčené Ad-RSV- β Gal

Obrázek 9B : cévy léčené Ad-CMV-Gax.

Příklady provedení vynálezu

Obecné molekulárně biologické techniky

Standardní metody používané v molekulární biologii, jako jsou preparativní extrakce plasmidové DNA, centrifugace plasmidové DNA v gradientu chloridu cesného, elektroforéza na agarosovém nebo akrylamidovém gelu, čištění fragmentů DNA elektroelucí, extrakcí proteinů fenolem nebo směsí fenol/chloroform, srážením DNA v solném médiu pomocí ethanolu nebo izopropanolu, převedení do *Eschericia coli*, atd., ..., jsou odborníkům dobře známy a jsou rozsáhlým způsobem popsány v literatuře [Maniatis T., a kol., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982; Ausubel F. M., a kol. (editoři), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Plasmidy typů pBR322 a pUC a fágy série M13 byl získány komerčně (Bethesda Research Laboratories).

Pro ligace se DNA fragmenty oddělují podle velikosti elektroforeticky na agarosovém nebo akrylamidovém gelu, extrahují fenolem nebo směsí fenol/chloroform, srážejí ethanolem a pak inkubují v přítomnosti T4 DNA ligasy (Biolabs) podle doporučení dodavatele.

5' prodloužené konce lze při používání vyplnit Klenowovým fragmentem *E. coli* DNA polymerasy I (Biolabs) podle údaje výrobce. 3' prodloužené konce jsou zničeny v přítomnosti T4 DNA polymerasy (Biolabs), která se používá podle doporučení výrobce. 5' prodloužené konce jsou zničeny opatrným působením S1 nukleasy.

In vitro místně specifickou mutagenezi pomocí syntetických oligonukleotidu lze provést způsobem vyvinutým Taylorem a kol. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] použitím soupravy distribuované firmou Amersham.

Enzymatické zmnožení DNA fragmentu pomocí techniky označované jako PCR [polymerase-catalyzed chain reaction - polymerasou katalyzovaná řetězová reakce, Saiki R.K. a kol., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K. B. a Faloona F. A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] se provádí pomocí DNA tepelného cyklieru (Perkin Elmer Cetus) podle doporučení výrobce.

Nukleotidové sekvence se stanovují metodou podle Sangera a kol. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, (1977) 5463-5467] pomocí soupravy dodávané firmou Amersham.

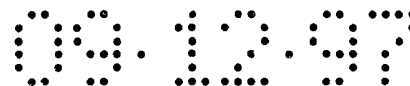
Příklad 1: konstrukce vektoru pXL-CMV-Gax^{HA} nesoucího gen kódující krysí gax protein pod kontrolou CMV promotoru.

Tento příklad popisuje konstrukci vektoru, který obsahuje cDNA kódující gax protein (krysí) a adenovirové sekvence, které umožňují rekombinaci. K N-konci gax proteinu (Field a kol., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165, 1988) byl přidán epitop chřipkového viru haemagglutinin (epitop HA1), zahrnující 18 aminokyselin. Takové přidání epitopu umožňuje sledovat expresi gax, zejména imunofluorescenčními technikami, použitím protilátek proti HA1 epitopu. Kromě své citlivosti tato metoda zároveň umožňuje vyloučit, jak *in vivo* tak *in vitro*, šum pozadí, který odpovídá expresi endogenních gax proteinů.

1.1. Konstrukce plasmidu pC01

A - Konstrukce plasmidu pCE

EcoRI/XbaI fragment odpovídající levorukému konci genomu adenoviru Ad5 byl nejprve klonován mezi EcoR a Xba místy vektoru pIC19H. Tím byl generován plasmid pCA. Plasmid pCA pak byl přestřižen HinfI a jeho 5' prodloužené konce byly vyplněny Klenowovým fragmentem E. coli DNA polymerasy I; vše pak bylo přestřiženo EcoR. Fragment plasmidu pCA, který byl takto generován a který obsahuje levoruký konec genomu adenoviru Ad5, pak byl klonován mezi EcoRI a SmaI místy vektoru pIC20H (Marsh a kol., Gene 32 (1984) 481). Tím byl generován plasmid



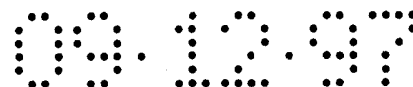
pCB. Plasmid pCB byl pak přestřižen EcoRI a jeho 5' prodloužené konce byly vyplněny Klenowovým fragmentem E. coli DNA polymerasy I; vše pak bylo přestřiženo BamHI. Fragment plasmidu pCB, který byl takto generován a který obsahuje levoruký konec genomu adenoviru Ad5, pak byl klonován mezi NruI a BglII místy vektoru pIC20H. Tím byl generován plasmid pCE jehož výhodná charakteristika spočívá v prvních 382 párech bází adenoviru Ad5, které následuje mnohonásobné klonovací místo.

B - Konstrukce plasmidu pCD'

Sau3A (3346)/SstI (3645) a SstI (3645)/NarI (5519) fragmenty z genomu adenoviru Ad5 byl nejprve spolu ligovány a klonovány mezi ClaI a BamHI místy vektoru pIC20H, čímž byl generován plasmid pPY53. SaliI/TaqI fragment z plasmidu pPY53 (připraveného z dam- pozadí), obsahující část genomu adenoviru Ad5 mezi místy Sau3A (3346) a TaqI (5207) pak byl klonován mezi SaliI a ClaI místy vektoru pIC20H, čímž byl generován plasmid pCA'. TaqI (5207)/NarI (5519) fragment genomu Ad5 adenoviru, připraveného z dam- pozadí, a SaliI-TaqI fragment z plasmidu pCA' pak byly spolu ligovány a klonovány mezi SaliI a NarI místy vektoru pIC20H. Tím byl generován plasmid pCC'. NarI (5519)/NruI (6316) fragment genomu adenoviru Ad5, připraveného z dam- pozadí, a SaliI/NarI fragment z plasmidu pCC' pak byly spolu ligovány a klonovány mezi SaliI a NruI místy vektoru pIC20H. Tím byl generován plasmid pCD'.

C - Konstrukce plasmidu pC01

Částečným odbouráváním plasmidu pCD' pomocí XhoI a pak úplným odbouráváním pomocí SaliI byl generován fragment, který obsahoval sekvenci adenoviru Ad5 od místa Sau3A (3446) až k místu NruI (6316). Tento fragment byl klonován do SaliI místa plasmidu pCE. Tím byl generován plasmid pC01 (obrázek 1), který obsahoval levorukou část adenoviru Ad5 až do místa HinfI (382), mnohonásobného klonovacího místa a Sau3A (3446)/NruI (6316) fragmentu adenoviru Ad5.



1.2 Konstrukce vektoru pXL-CMV-Gax^{HA} (srov. obrázek 2)

Gax cDNA byl klonován mezi XbaI a BamHI místy vektorem pCGN (Tanaka a Herr, Cell 60: 375-386, 1990). Výsledný vektor, pCGN-Gax, obsahoval promotorovou a enhancerovou sekvenci cytomegaloviru (CMV) (-522, +72; Boshart a kol., Cell, 41: 521-530, 1985), hlavní sekvenci herpes simplex virus thymidin kinasy, včetně AUG iničializačního kodonu, stejně jako prvních třech aminokyselin (+55, +104; Rusconi a Yamamoto, EMBO J., 6: 1309-1315, 1987), sekvenci kódující HA1 epitop [Y P Y D V P D Y A S L G G P (sekvence id. č. 1)], kyslí gax cDNA a, nakonec, polyadenylační sekvenci králičího β -globinového genu (Pábo a kol., Cell, 35: 445-453, 1983).

Vektor pCGN-Gax pak byl přestřížen XmnI a SfiI a vzniklý fragment obsahující promotor, cDNA a polyadenylační sekvenci, byl po úpravě podle Klenowa vložen do EcoRV místa člunkového vektoru pC01, který obsahoval adenovirové sekvence nutné pro rekombinaci. Plasmid, který byl získán byl označen pXL-CMV-Gax^{HA} (srov. obrázek 2).

Příklad 2: demonstrace proliferačně inhibičních vlastností plasmidu pXL-CMV-gax-HA.

Tento příklad popisuje postupy, které lze použít pro demonstraci kvality homologních rekombinačních vektorů (srov. příklad 1), v ohledu exprese (detekce gax proteinu a HA epitopu) a v ohledu aktivity (vliv na proliferaci).

Buňky vaskulárního hladkého svalstva (vascular smooth-muscle cells - VSMC) byly kultivovány enzymatickým odbouráváním NZW králičí aorty způsobem upraveným podle Chamley a kol. (Cell Tissue Res. 177: 503-522 1977). Stručně řečeno, po vyjmutí byla aorta inkubována při 37 °C po dobu 45 minut v přítomnosti kolagenasy (kolagenasa II, Cooper Biomedical). Druhé odbourávání se pak provádělo po dobu dvou hodin v přítomnosti kolagenasy a elastasy (Biosys), čímž byla získána buněčná



suspenze. Buňky byly udržovány v přítomnosti 20 % fetálního telecího séra a použity pro všechny testy (srov. dále). Ve všech těchto experimentech byly buňky hladkého svalstva charakterizovány imunoznačením pomocí anti- α SM aktin protilátky (F-3777, Sigma).

Pro ověření kvality expresních vektorů (srov. Příklad 1), byly přítomnost a umístění gax proteinu monitorovány u každého konstruktů imunofluorescencí. Aby bylo možné toto sledování provést, buňky hladkého svalstva nebo 3T3 buňky byly transfekovány plasmidy pXL-CMV-Gax^{HA} a pCGNgax v přítomnosti směsi DOSPA/DOPE (Lipofectamine, Gibco BRL). Buňky byly inkubovány v přítomnosti komplexu DNA/liposom v médiu neobsahujícím fetální telecí sérum po dobu 4 až 8 hodin (optimální trvání: 8 hodin pro SMC). Po inkubaci po dobu 24 hodin v přítomnosti fetálního telecího séra byly buňky kultivovány na mikroskopické destičce (Titertek), při sledování imunofluorescence, po dobu dalších 24 hodin. Buňky pak byly fixovány v přítomnosti 4 % paraformaldehydu a následně permabilizovány přidavkem 0,1 % tritonu. Po nasycení buněk v přítomnosti hovězího serum albuminu (BSA, Sigma), byla přidána pro úspěšné provedení pokusu anti-HA protilátka (12CA5, Boehringer Mannheim) a pak protilátka konjugovaná s fluoresceinem.

Imunofluorescenční pokusy provedené současně na NIH3T3 buňkách a na primární kultuře králičích VSMC prokázaly, že jak plasmid pCGNgax tak "člunkový" plasmid pXL-CMV-Gax^{HA} skutečně kódují protein, který je umístěn v jádře (srov. obrázek 3A: kontrolní plasmid; 3B: plasmid pXL-CMV-Gax^{HA}). Navíc bylo možné po extrakci jaderných proteinů z buněk transfekovaných pXL-CMV-Gax^{HA} prokázat, pomocí western blottu, protein, který je detekován protilátkou proti HA epitopu.

Pak byl zjišťován vliv uvedených vektorů na proliferaci buňky. Aby bylo možné toto stanovení provést byla použita

nepřímá metoda, která je založena na měření tvorby kolonie. Stručně řečeno, NIH3T3 myšší embryonální buňky byly použity k provedení testu vzniku kolonie upraveným způsobem podle Schweighoffer a kol. (Mol. Cell. Biol. 1993, 13: 39-43). Stručně řečeno, buňky jsou kotransfekovány s plasmidem, který nese gen rezistence na neomycin a s přebytkem požadovaného vektoru (pCGNgax nebo pXL-CMV-Gax^{HA}). Po selekci v G418 byly kolonie obarveny roztokem karbolfuchsinu (Diagnostica, Merck) a spočítány. Výsledky reprezentativního experimentu, které jsou uvedeny v tabulce 1, demonstrují snížení počtu kolonií v případě buněk transfekovaných pCGNgax.

Tabulka 1

Podmínky transfekce 3T3 buněk	Počet kolonií po selekci v G418
pCGN (5 µg) + pSV2neo (1 µg) (S)	183 ± 28 (*)
pCGNgax (5 µg) + pSV2neo (1 µg)	93 ± 11

(S) pCGN kontrolní vektor: nepřítomnost gax insertu

(*) $p < 0,01$

Příklad 3: Konstrukce rekombinantního adenoviru Ad-CMVgax

Vektor pXL-CMV-Gax^{HA}, připravený podle příkladu 1, byl následně linearizován a kotransfekován, pro rekombinaci, s poškozeným adenovirovým vektorem do pomocných buněk (buněčná linie 293), které dodávají funkce kódované oblastmi adenoviru E1 (E1A a E1B).

Adenovirus Ad-CMVgax byl získán prostředky *in vivo* homologní rekombinace mezi adenovirem Ad.RSVβgal (Stratford Perricaudet a kol., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626) a vektorem pXL-CMV-Gax^{HA} podle následujícího postupu: vektor pXL-CMV-Gax^{HA}, linearizovaný s enzymem XmnI, a adenovirus Ad.RSVβgal, linearizovaný s ClaI, byly kotransfekovány do buněčné linie 293 v přítomnosti fosforečnanu vápenatého, aby mohla



probíhat homologní rekombinace. Rekombinantní adenoviry, které byly tímto způsobem generovány, byly vybrány destičkovým čištěním. Po izolaci byl rekombinantní adenovirus zmnožen v buněčné linii 293, což vede ke kapalině nad kulturou, která obsahuje nevyčištěné rekombinantní poškozené adenoviry, které mají titr 10^7 pfu/ml.

Virové částice byly čištěny odstředováním v gradientu chloridu cesného podle známých postupů (viz, zejména Graham a kol., *Virologie* 52 (1973) 456). Adenovirus Ad-CMVgax byl uchováván při -80 °C ve 20 % (hmot.) glycerolu.

Příklad 4: demonstrace proliferačně inhibičních vlastností adenoviru Ad-CMVgax.

Tento příklad popisuje postupy, které lze použít pro demonstraci kvality rekombinantního adenoviru, v ohledu produkce gax proteinu a v ohledu biologické aktivity (vliv na buněčnou proliferaci).

Králičí aorta byla inkubována v přítomnosti adenoviru Ad-CMVgaxHA a kontrolního adenoviru (ad-RSV β Gal: rekombinantní adenovirus exprimující β -galaktosidasu za kontroly RSV promotoru), který je naředěn v médiu (DMEM, 0,5 % FCS). Po jedné hodině při 37 °C ve vlhké atmosféře bylo médium obsahující roztok adenoviru odsáto a nahrazeno novým médiem (DMEM, 0,5 % FCS) na dobu 18 až 24 hodin. Pak bylo přidáno médium bohaté na FCS (konečná koncentrace FCS: 20 %), aby se stimulovala proliferace buněk a buňky byly po 24 hodinách a po 48 hodinách spočítány.

Navíc, 24 hodin po přidání roztoku adenoviru, byla monitorována exprese gax proteinu buňkami VSMC technikou popsanou v příkladu 2, zejména značením jádra prostředky imunofluorescence (lokalizace proteinu) a také western blottem. Protein produkovaný rekombinantním adenovirem je účinně detekován protilátkami, které rozpoznávají HA epitop a

mají stejnou elektroforetickou mobilitu jako gax protein, který je detekován v jádře VSMC, které byly transfekovány s pCGNgax nebo pXL-CMV-Gax^{HA}. Obrázek 4 ilustruje umístění Gax proteinu ve VSMC, které byly inkubovány v přítomnosti Ad-CMVgaxHA.

Výsledky reprezentativního experimentu, které jsou uvedeny v na obrázku 4, demonstrují znatelné snížení počtu buněk po přidání Ad-CMVgaxHA viru. Na druhou stranu, toto snížení počtu buněk nebylo pozorováno po působení kontrolního adenoviru použitého ve stejné koncentraci (M.O.I. 1000). Současně jsme pomocí imunofluorescence ověřili, že tato vysoká infekčnost umožňuje jak β -gal značkovému genu (použití anti-E.Coli β -gal protilátky, Monosan) tak gax proteinu (použití anti-HA protilátky, srov. příklad 2), aby byly exprimovány ve více než 90 % populace králičích VSMC.

Přidání ad-RSV- β gal viru je spojeno se slabým cytostatickým efektem (-13 %) po kultivaci po dobu 24 hodin v přítomnosti fetálního telecího séra (20 %). Za stejných experimentálních podmínek vedlo působení Ad-CMVgaxHA k 57% snížení počtu buněk (srov. obrázek 5). Biologická aktivita Ad-CMVgaxHA viru je velmi zřejmá po 48 hodinách kultivace a dokonce může souviset i s buněčnou smrtí (srov. obrázky 6 a 7).

Tak je blokování proliferace, která je způsobena Ad-CMVgaxHA, spojeno se znatelným snížením počtu buněk, které lze detekovat po kultivaci po dobu 24 hodin (srov. obrázek 5). Je zajímavé, že tento vliv Ad-CMVgaxHA byl pozorován u buněk, které byly stimulovány vysokou koncentrací FCS (20 %), ale ne u buněk, které byly zbaveny FCS (0,5 %) (srov. obrázek 6). Tento příklad proto ukazuje, že rekombinantní adenovirus, který kóduje gax protein, může účinně blokovat buněčné dělení bez jakéhokoliv znatelného vlivu na životnost buněk, které jsou blokovány v G0 fázi jejich cyklu.

Vliv Ad-CMVgaxHA adenoviru na životnost VSMC v kultuře je dále ilustrován obrázkem 7.

Inhibiční vlastnosti Ad-CMVgaxHA na syntézu DNA byly potvrzeny pokusy o začlenění bromdeoxyuridinu (BrdU). Stručně řečeno, po 24 hodinách po přidání adenoviru, byly inkubovány VSMC v přítomnosti FCS (10 % až 20 %) a BrdU (10 μ M), který je do buněk začleňován místo thyminu při fázi DNA syntézy a lze jej detekovat specifickými protilátkami. Začlenění BrdU bylo kvantifikováno pomocí průtokové cytometrie.

Tentýž způsob průtokové cytometrie byl použit pro vizualizaci postupu králičích VSMC buněk, upravených Ad-CMVgaxHA, v jejich buněčném cyklu. Působení Ad-CMVgaxHA je spojeno s blokováním buněčného cyklu ve fázi G0/G1.

Příklad 5: inhibice intimální hyperplasie pomocí adenovirus-gax *in vivo*.

Tento příklad ukazuje účinnost rekombinantních adenovirů v modelu vaskulární patologie.

Použitý model arteriální léze je založen na obušování krysí karotidy (Clows a kol., Lab. Invest. 49 (1983) 327-333). U tohoto modelu, VSMC dediferencují, prolifерují a migrují do formy neointimy, která může částečně pohlcovat arterii, do dvou týdnů po poškození.

Sprague-Dawley krysy byly anestetikovány intraperitoneální injekcí pentobarbitalu (45 mg/kg). Následovala vnější karotidová arteriotomie, krysí karotidové arterie byly obnaženy balónkovým katétrem a vystaveny $1 \cdot 10^9$ pfu Ad-CMVgaxHA nebo Ad-RSV β Gal. Adenovirus byl použit v roztoku obsahujícím 15 % poloxameru 407, který usnadňuje přenos genu adenoviru. Dvacet minut po inkubaci byl roztok viru odebrán a byly odstraněny ligatury, čímž byla obnovena cirkulace. Krysy byly utraceny po dvou týdnech a na řezu léčených cév byly provedeny

kvantitativní morfometrické analýzy. Výsledky jsou uvedeny na obrázcích 8 a 9.

Získané výsledky ukazují, že všech devět Ad-RSV β -Gal transfekovaných karotidových arterií mělo silnou VSMC proliferaci a rozvoj znatelného neointimálního ztlustění. Plocha neointimy byla $0,186 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ (SEM) s rozsahem 0,10 až 0,28. Luminální patentence byla příslušně zúžena na $40 \pm 4 \%$ (rozsah 21 až 63), obrázek 8C. Poměr intima : media byl $1,51 \pm 0,1$ (rozsah 0,87 až 2,17). Tyto výsledky byly podobné výsledkům získaným dříve u kontrolních cév, na které se působilo fyziologickým roztokem. Na rozdíl od toho, působení Ad-CMVgaxHA znatelně snížilo patologickou reakci na poškození balónkem. U cév léčených Ad-CMVgaxHA byla průměrná plocha neointimální léze $0,076 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ (rozsah 0 až 0,19), luminální zeslabení bylo sníženo na $17,5 \pm 5 \%$. Statistická analýza potvrdila, že léčení Ad-CMVgaxHA znatelně inhibuje rozvoj intimálního ztlustění relativně ke kontrolám Ad-RSV β -Gal. Konkrétně, léčení Ad-CMVgaxHA snížilo poměr intima : media o 69 %, intimální plochu o 59 % a luminální zeslabení o 56 % (obrázky 8A a 8B). Znatelný vliv na intimální hyperplasii byl dále zdůrazněn výsledky získanými z průřezů kontrolních (obrázek 9A) nebo léčených (obrázek 9B) zvířat.

Tento příklad demonstruje velmi účinnou aktivitu při zastavování rustu konstruktů Ad-CMVgaxHA *in vivo*. Tato aktivita je velmi specifická a nebyla pozorována u kontrolních zvířat. Presentované výsledky jasně ukazují terapeutickou aktivitu Ad-CMVgaxHA na vaskulární morfologii a zejména na hyperplasii, která je spojena s postangioplastickou restenózou. Použití viru, jako je adenovirus, pro přenos Gax genu *in vivo* je zvláště účinné. Tento způsob je dále výhodný, protože je založen na nahrazení genu. Tento způsob je jedinečný v tom, že spojuje účinnost dopravy a genovou terapii do dvou terapeutických vlastností: zastavení rustu a

konstitutivní expresi ve vaskulárním systému. Přenos Gax genu podle předkládaného vynálezu vyvolává specifickou regresi hyperproliferativního onemocnění vaskulární cévy a následně tak normalizuje arteriální funkce. Místní přenos Gax genu podle předkládaného vynálezu je také zejména výhodný v tom, že nevedí reendothelizačnímu procesu, který následuje po lézi artérie. Navíc, kromě přímého vlivu na buněčnou proliferaci a vaskulární morfologii, přenos gax genu podle předkládaného vynálezu může také mít užitečný nepřímý vliv na syntézu extracelulární matrice a na remodelaci. Tyto výsledky ukazují, že přenos Gax genu podle předkládaného vynálezu je výrazný nový pokrok v léčení vaskulárních lézí, které vznikají po angioplastii.

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace:

(i) Vynálezce:

Jméno: CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY

Ulice:

Město: Cleveland

Stát: Ohio

Země: USA

Poštovní kód: 44106

(i) Vynálezce:

Jméno: Branellec, Didier

Ulice: 1, Rue Saint-Benoit

Město: 94210 La Varenne-Saint Hilaire

Stát:

Země: Francie

Poštovní kód:

(i) Vynálezce:

Jméno: Walsh, Kenneth
Ulice: 207 Judy Farm Road
Město: Carlisle
Stát: Massachusetts
Země: USA
Poštovní kód: 01741

(i) Vynálezce:

Jméno: Isner, Jeffrey M.
Ulice: 34 Brenton Road
Město: Weston
Stát: Massachusetts
Země: USA
Poštovní kód: 02193

(ii) Název vynálezu: Virové vektory a jejich použití pro
léčení hyperproflerativních nemocí, zejména restenozy

(iii) Počet sekvencí: 1

(iv) Korespondenční adresa:

(A) Adresa: Rhone-Poulenc Rorer Inc.
(B) Ulice: 500 Arcola Rd. 3C43
(C) Město: Colledgeville
(D) Stát: PA
(E) Země: USA
(F) Poštovní kód: 19426

(v) Forma čitelná pro počítač:

(A) Typ média: disketa
(B) Počítač: IBM PC kompatibilní
(C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release č. 1.0, Verze č. 1.30

(vi) Údaje o současné přihlášce:

- (A) Číslo přihlášky: PCT
- (B) Datum podání:
- (C) Klasifikace:

(vii) Údaje o předchozí přihlášce:

- (A) Číslo přihlášky: Fr 95-04234
- (B) Datum podání: 31. 3. 1995

(viii) Informace o právním zástupci / agentovi

- (A) Jméno: Savitzki, Martin F.
- (B) Registrační číslo: 26,699
- (C) Číslo reference / označení: ST95022-US

(ix) Telekomunikační údaje:

- (A) Telefon: (610)454-3816
- (B) Telefax: (610)454-3808

(2) Údaje o sekvenci id. č. 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

- (A) Délka: 14 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselinová
- (C) Vlákňitost:
- (C) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(ix) Popis sekvence: sekvence id. č. 1:

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly Pro

Průmyslová využitelnost

Virové vektory podle předkládaného vynálezu jsou průmyslově využitelné při výrobě léků pro léčení hyperproliferativních nemocí, zejména restenosy.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Poškozený rekombinantní virus obsahující přinejmenším jeden vložený gen kódující celý nebo část GAX proteinu nebo variantu tohoto proteinu.
2. Virus podle nároku 1, ve kterém v jeho genomu chybí oblasti, které jsou nezbytné pro jeho replikaci v infikované buňce.
3. Virus podle nároku 1 nebo 2, který je adenovirus, s výhodou typu Ad 5 nebo Ad 2.
4. Virus podle nároku 1 nebo 2, který je adenovirus zvířecího, s výhodou psího, původu.
5. Virus podle jednoho z nároků 1 nebo 2, ve kterém vložený gen kóduje celý nebo část krysího GAX proteinu nebo variantu tohoto proteinu.
6. Virus podle nároku 5, ve kterém vložený gen kóduje krysí GAX protein nebo jeho lidský homolog.
7. Virus podle jednoho z nároků 1 nebo 2, ve kterém vložený gen je cDNA.
8. Virus podle jednoho z nároků 1 nebo 2, ve kterém vložený gen je gDNA.
9. Virus podle jednoho z nároků 1 nebo 2, ve kterém vložený gen obsahuje sekvence, které mu umožňují být exprimován v infikované buňce.
10. Virus podle jednoho z nároků 1 nebo 2, ve kterém vložený gen obsahuje signální sekvenci, která směřuje syntetizovaný polypeptid do sekrečních cest cílové buňky.
11. Adenovirus podle nároku 3, který obsahuje delecí celé nebo části oblasti E1.
12. Adenovirus podle nároku 11, který navíc obsahuje delecí celé nebo části oblasti E4.
13. Virus podle nároku 1 nebo 2, který je adenosouvisející virus (adeno-associated virus - AAV).
14. Virus podle nároku 1 nebo 2, který je retrovirus.

15. Použití viru podle jednoho z nároků 1 nebo 2 pro přípravu farmaceutického prostředku, který je určen pro léčení nebo prevenci patologií, které souvisejí s hyperproliferativními nemocemi.

16. Použití podle nároku 15, pro přípravu farmaceutického prostředku, který je určen pro léčení restenozy.

17. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jeden nebo více poškozených rekombinantních virů podle jednoho z nároků 1 nebo 2.

18. Farmaceutický prostředek podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je v injikovatelné formě a tím, že obsahuje 10^4 až 10^{14} pfu adenoviru/ml.

19. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje rekombinantní adenovirus, který je nasycen do hydrogelu.

09.12.97

~~86849~~

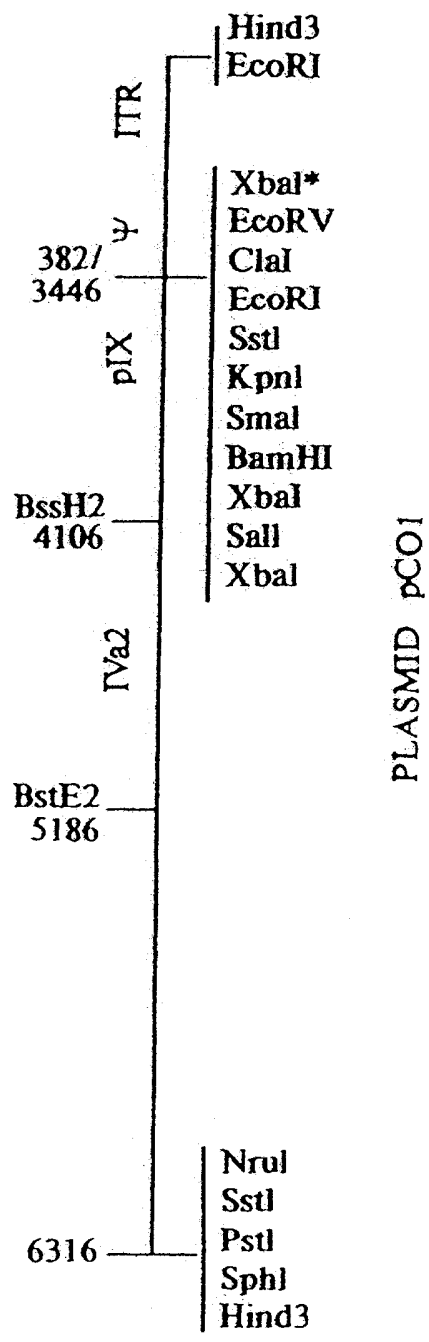


FIG. 1

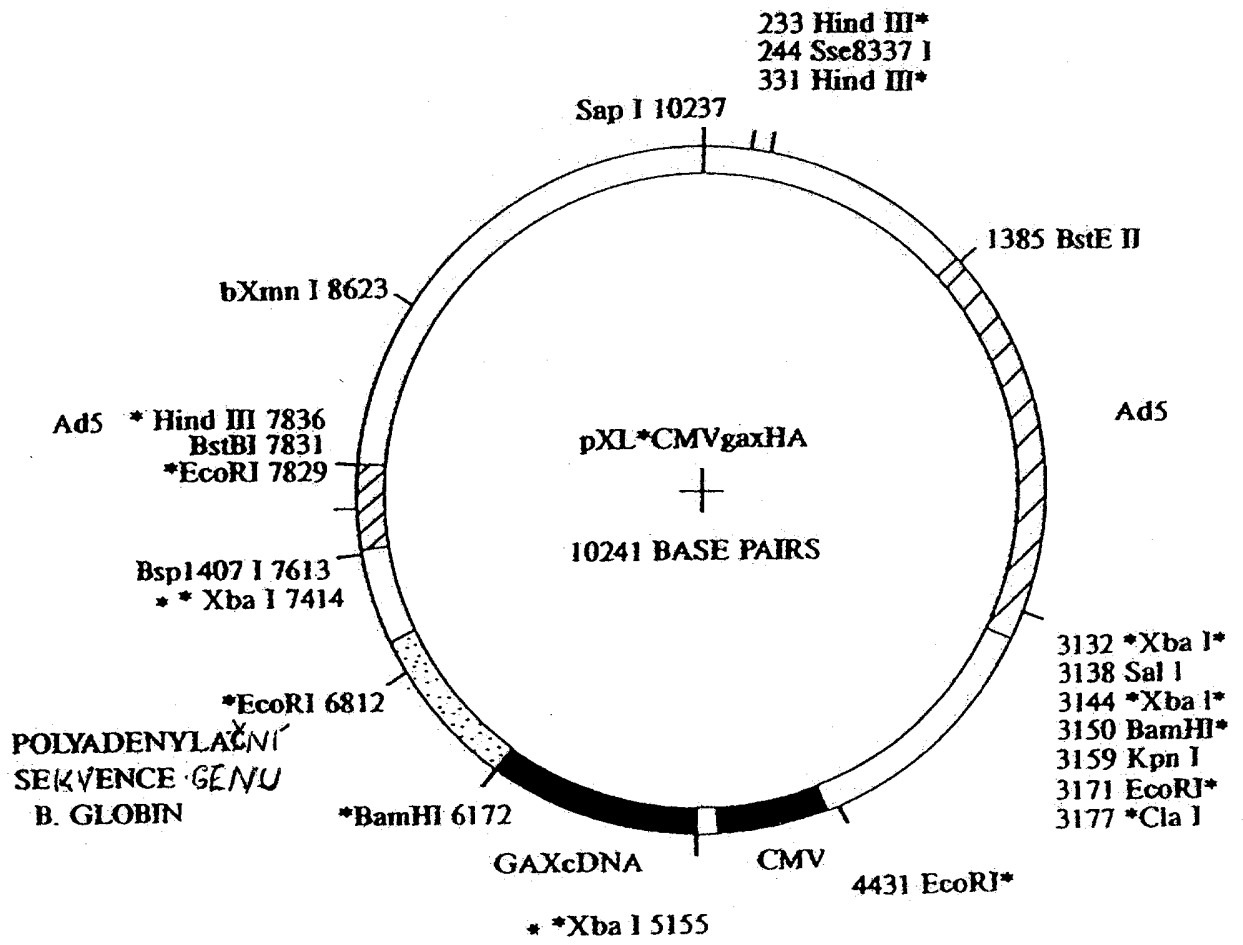


FIG. 2

PU 3088-97

09.12.97

86849

3 / 13



FIG. 3A

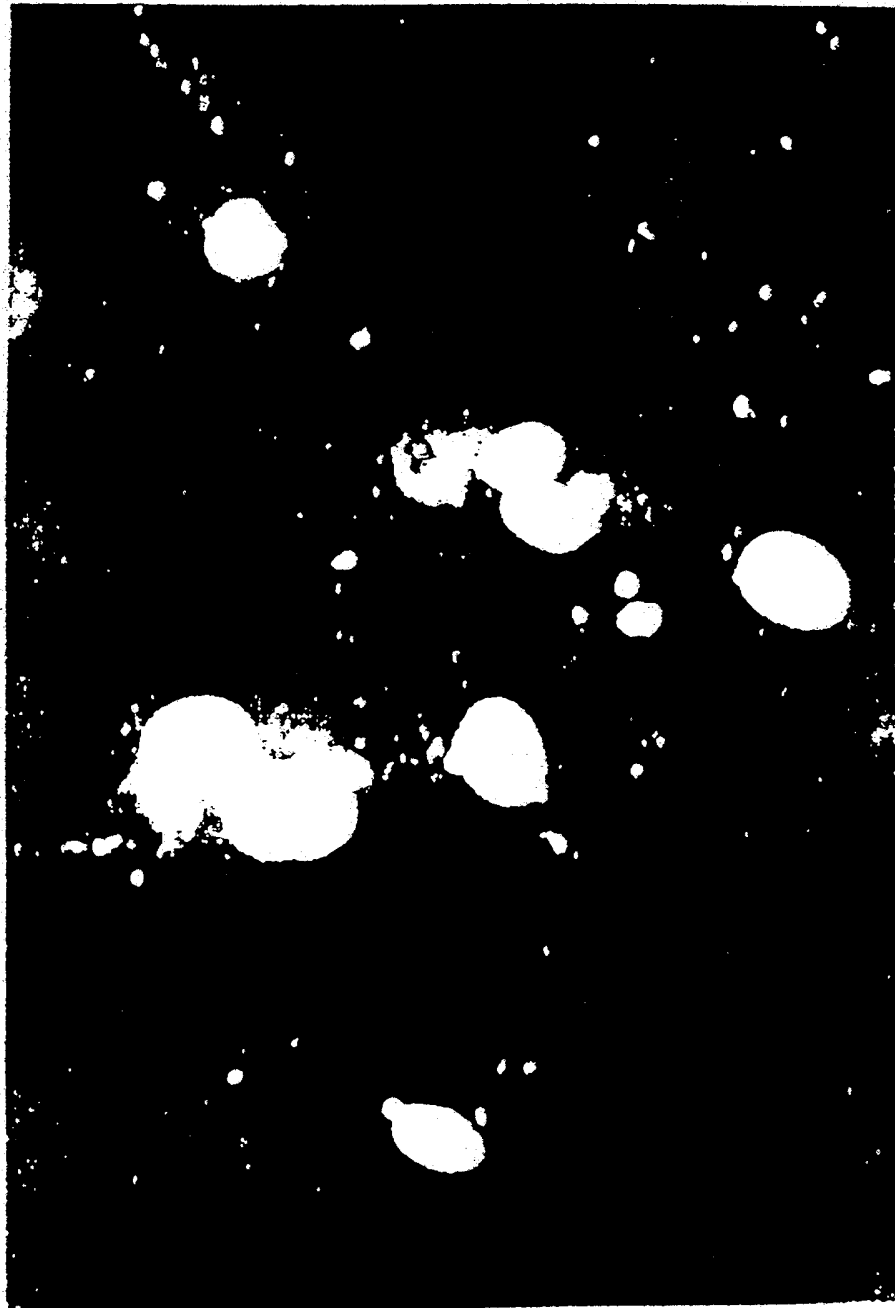


FIG. 3B

09.12.97

P6849

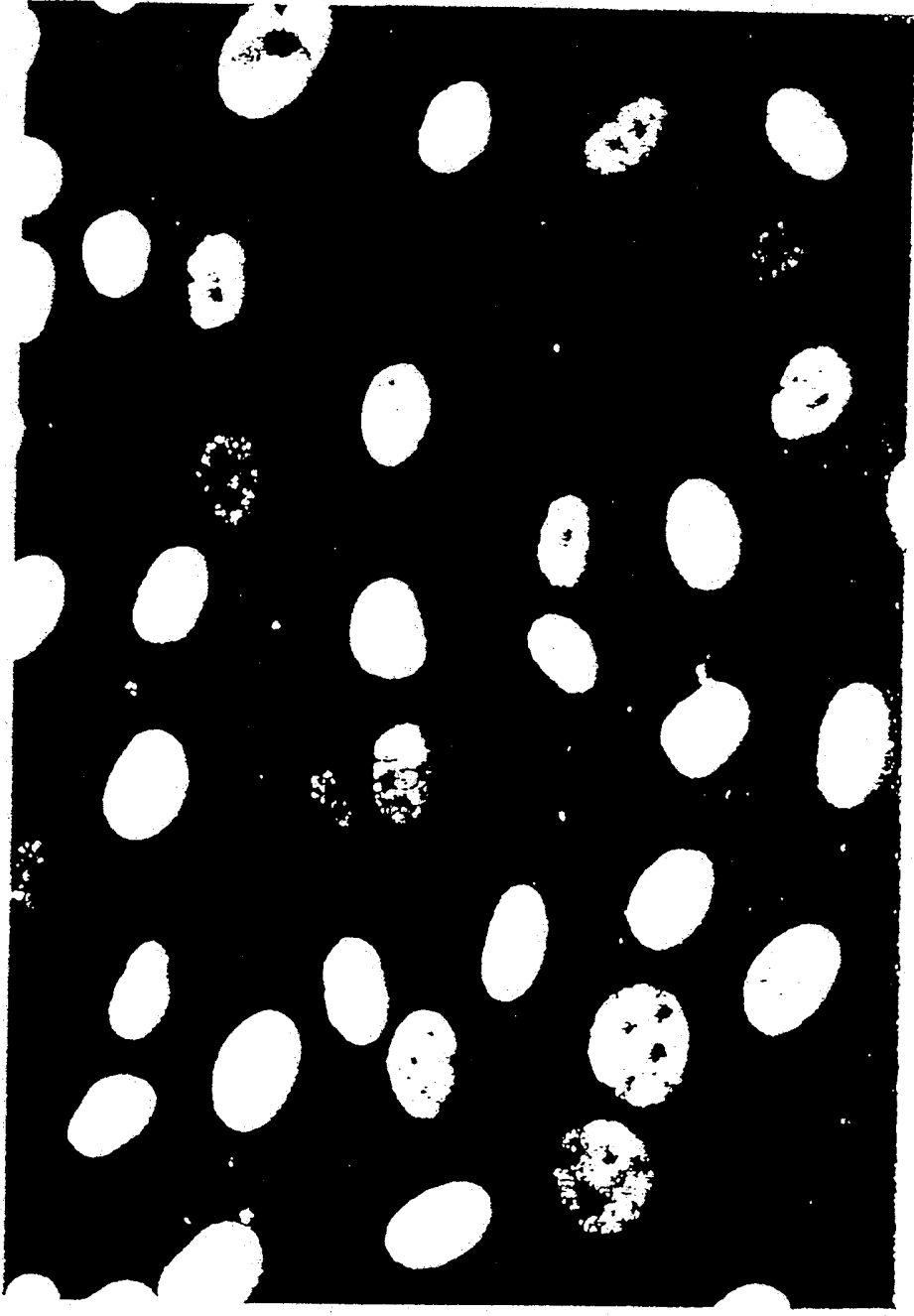


FIG. 4

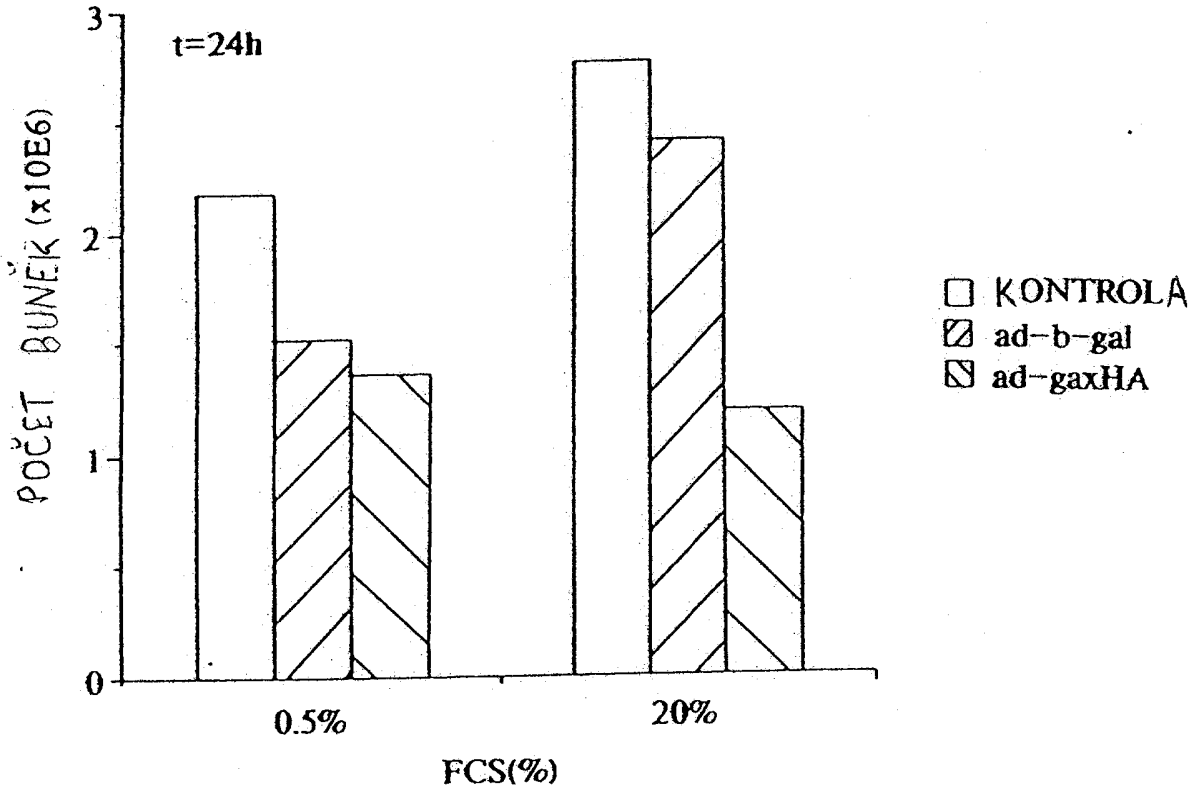


FIG. 5

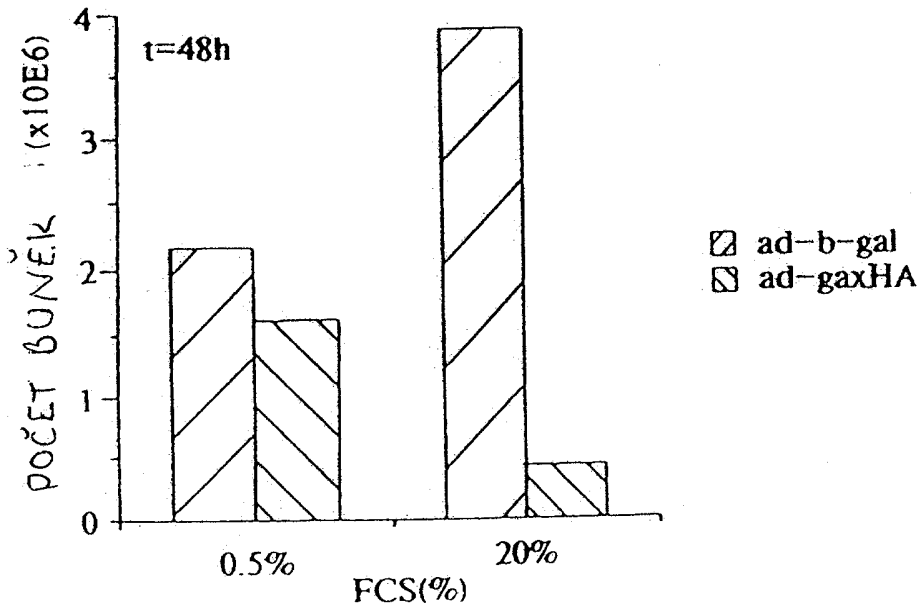




FIG. 7A

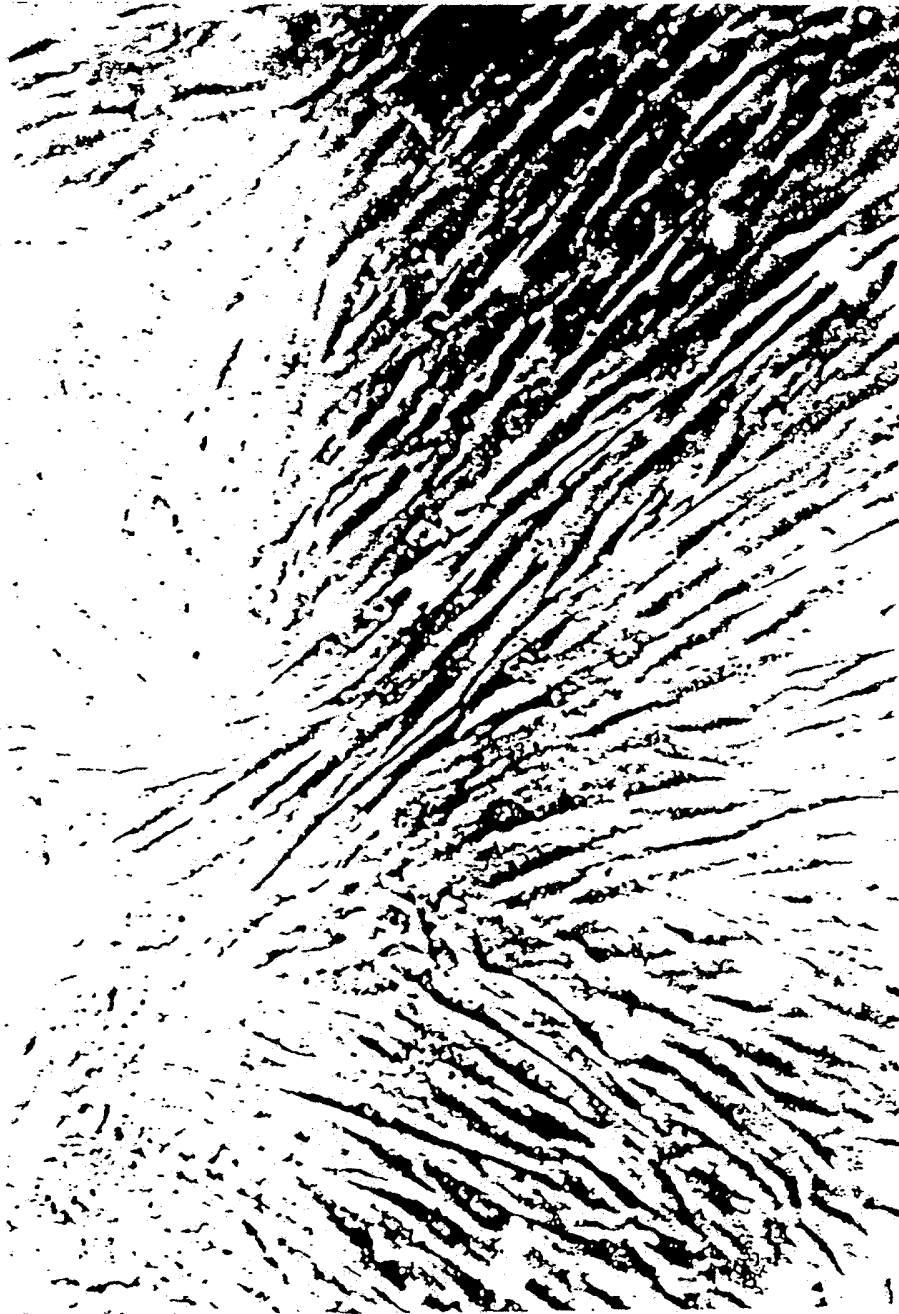


FIG. 7B

09.10.97

~~P6819~~



FIG. 7C

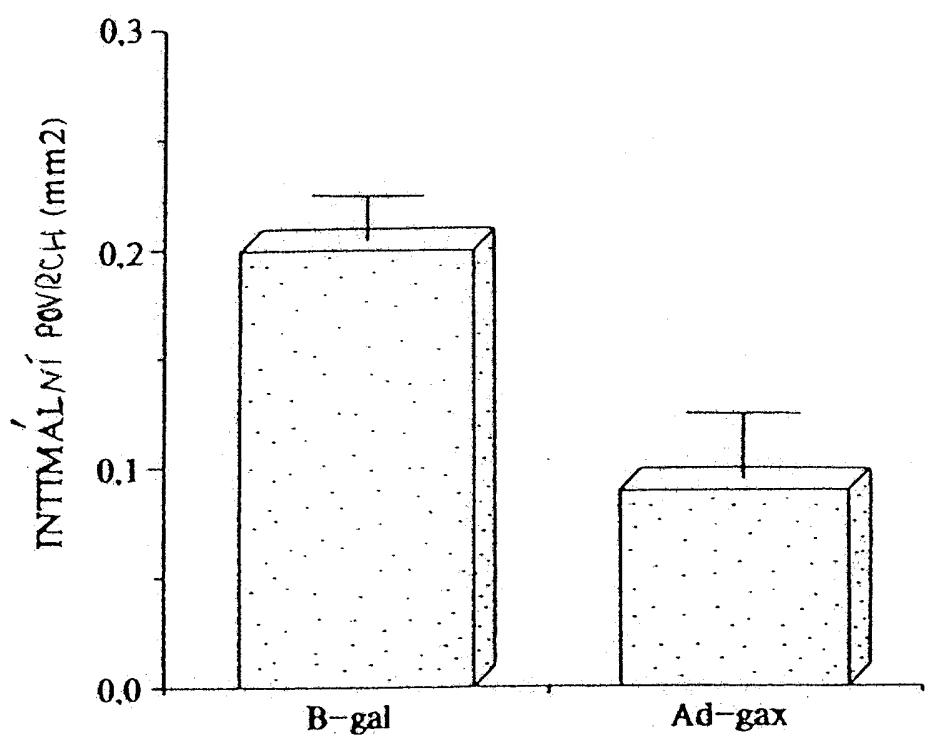


FIG. 8A

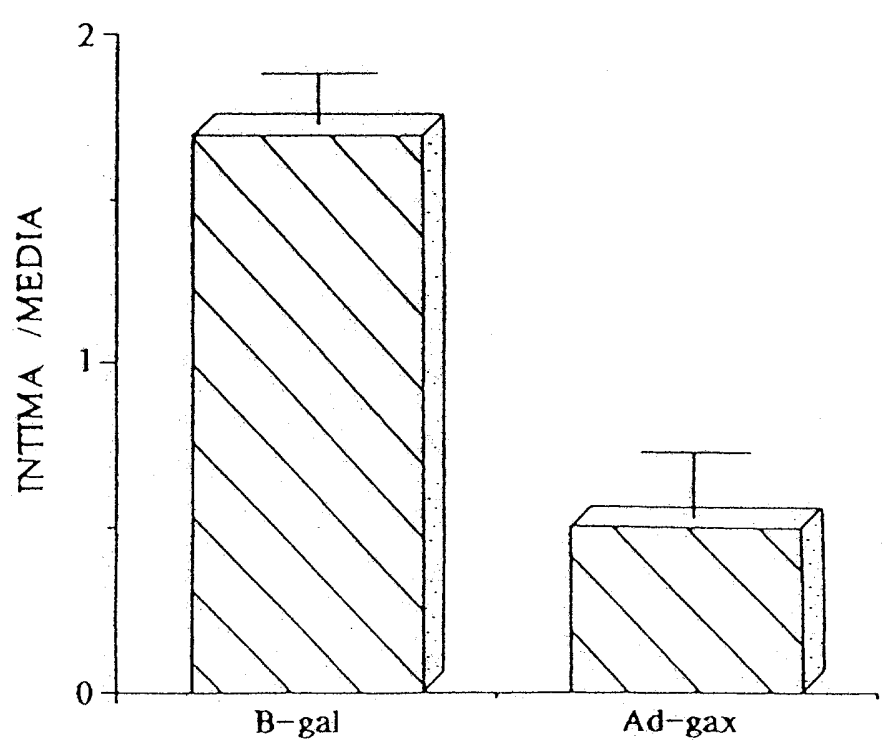


FIG. 8B

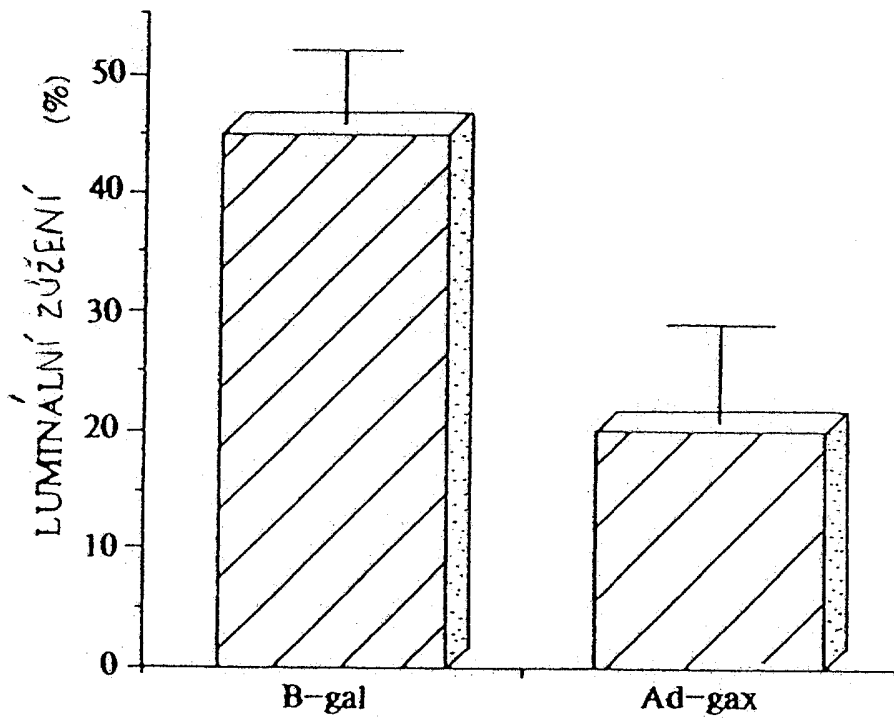


FIG. 8C

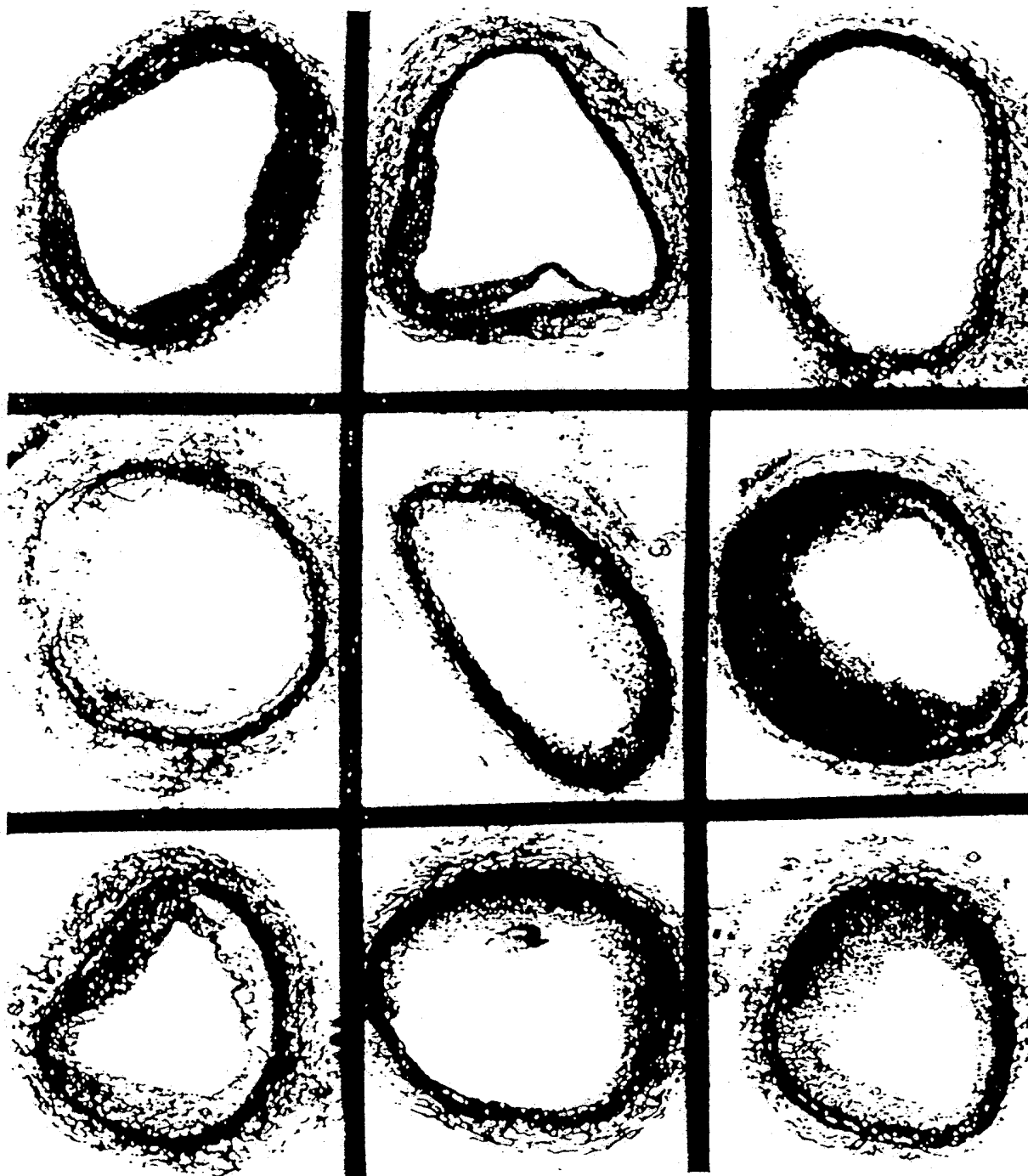


FIG. 9A

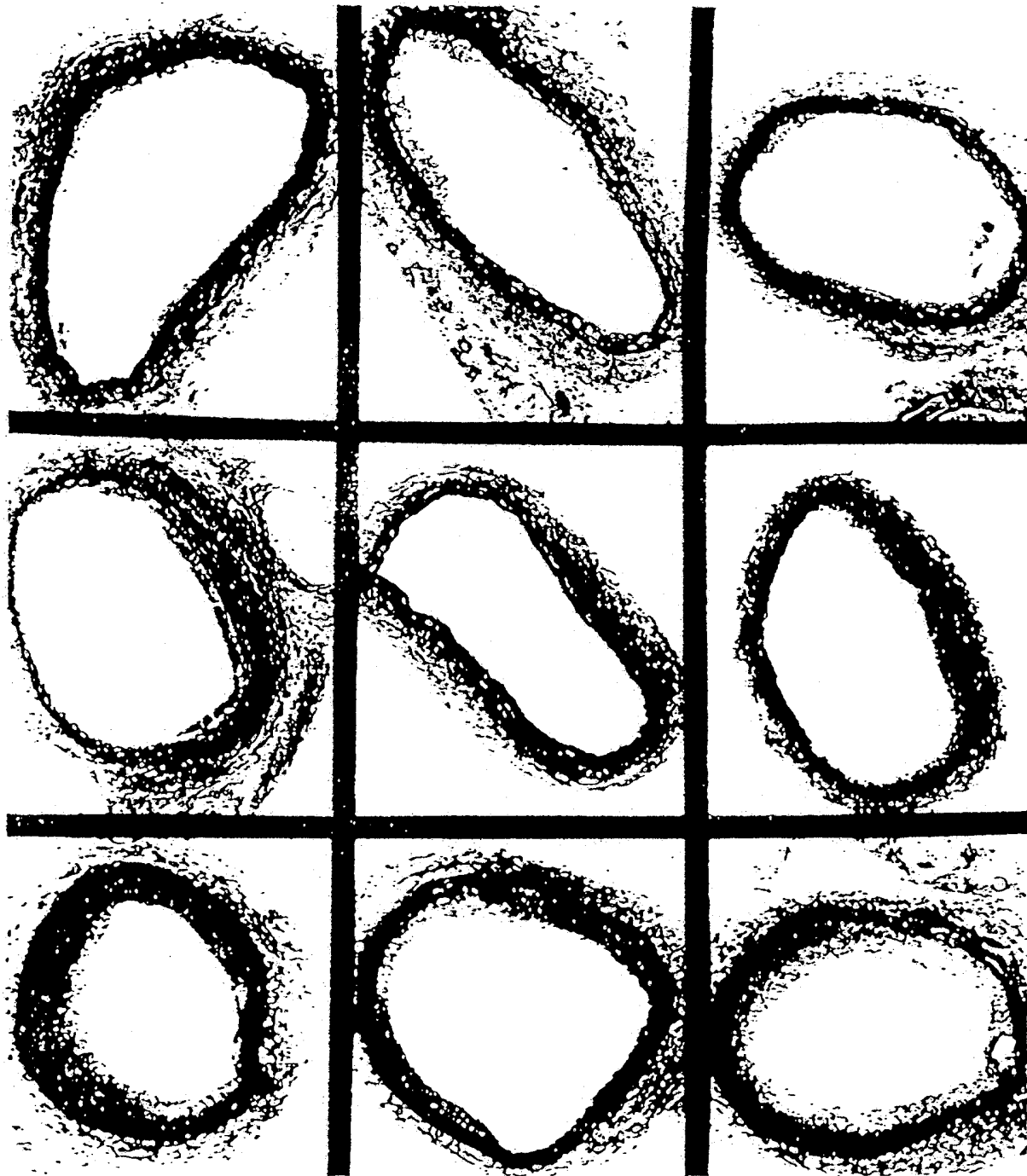


FIG. 9B