

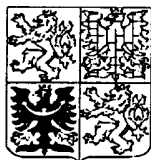
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

284 903

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3028-95**

(22) Přihlášeno: **06. 05. 94**

(30) Právo přednosti:
18. 05. 93 FR 93/9305954

(40) Zveřejněno: **14. 02. 96**
(Věstník č. 2/96)

(47) Uděleno: **03. 02. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **14. 04. 99**
(Věstník č. 4/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FR94/00531**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/26914**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/86

C 12 N 15/26

C 07 K 14/075

A 61 K 48/00

C 12 N 7/01

A 61 K 39/235

(73) Majitel patentu:

**RHONE-POULENC RORER S. A., Antony,
FR;**

(72) Původce vynálezu:

**Haddada Hedi, Alfortville, FR;
Klonjowski Bernard, Bondy, FR;
Perricaudet Michel, Ecrosnes, FR;
Vigne Emmanuelle, Ivry, FR;**

(74) Zástupce:

**Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24, Praha
7, 17000;**

(54) Název vynálezu:

**Rekombinantní adenovir nelidského
zvířecího původu, farmaceutický
přípravek tento adenovir obsahující
a použití tohoto adenoviru pro přípravu
uvedeného farmaceutického přípravku
nebo lidské vakcíny**

(57) Anotace:

Rekombinantní adenovir nelidského zvířecího původu schopný infikovat lidské buňky, neschopný replikace v lidských buňkách a obsahující alespoň jeden inzerovaný terapeutický gen kódující terapeutický proteinový produkt, přičemž terapeutickým genem je antimediatorový gen nebo antimediatorová sekvence. Farmaceutický přípravek, který obsahuje uvedený rekombinantní adenovir jako účinnou složku, a použití uvedeného rekombinantního adenoviru pro přípravu farmaceutického přípravku nebo lidské vakcíny.

CZ 284 903 B6

Rekombinantní adenovir nelidského zvířecího původu, farmaceutický přípravek tento adenovir obsahující a použití tohoto adenoviru pro přípravu uvedeného farmaceutického přípravku nebo lidské vakcíny

5

Oblast techniky

Vynález se týká nových virových vektorů, jejich přípravy a jejich použití v genové terapii. Vynález se rovněž týká farmaceutických přípravků obsahujících tyto virové vektory. Vynález se zejména týká použití rekombinantních adenovirů zvířecího původu jako vektorů pro genovou terapii.

Dosavadní stav techniky

15

Genová terapie spočívá v tom, že se nedostatečnost nebo abnormalita (mutace, aberantní exprese, atd.) koriguje zavedením genetické informace do postižené buňky nebo do postiženého orgánu. Tato genetická informace může být zavedena buď in vitro do buňky izolované z postiženého orgánu, načež se modifikovaná buňka opětovně zavede do organismu, nebo přímo in vivo do příslušné tkáně. Pro tento druhý způsob zavedení genetické informace byly vyvinuty různé techniky, z nichž lze uvést některé transfekční techniky zahrnující použití komplexů DNA a DEAE-dextranu (Pagano a kol., J. Virol. 1 (1967) 891), DNA a nukleových proteinů (Kaneda a kol., Science 243 (1989) 375), DNA a lipidů (Felgner a kol., PNAS 84 (1987) 7413), použití liposomů (Fraley a kol., J. Biol. Chem. 255 (1980) 10431), atd.. V poslední době se jako slibná alternativa uvedených fyzikálních transfekčních technik ukázalo použití viru jako vektoru pro přenos genů. Za tímto účelem již byly testovány četné viry za účelem stanovení jejich schopnosti infikovat určité buněčné populace. Jedná se zejména o retroviry (RSV, HMS, MMS, atd.), vir HSV, adeno-přidružené viry a o adenoviry.

Mezi těmito viry zaujímají adenoviry zvláštní postavení vzhledem k některým vlastnostem, které jsou zajímavé pro použití v genové terapii. V tomto ohledu lze zejména uvést jejich poměrně široké hostitelské spektrum, jejich schopnost infikovat klidové (quiescentní) buňky a neintegrovat se do genomu infikované buňky. Z těchto důvodů již byly adenoviry použity in vivo pro přenos genů. Za tímto účelem byly připraveny různé vektory odvozené od adenovirů a inkorporující různé geny (beta-gal, OTC, alfa-1AT, cytokiny, atd.). Všechny tyto vektory odvozené od adenovirů a popsané v rámci dosavadního stavu techniky v souvislosti s jejich použitím v humánní genové terapii byly až dosud připraveny z adenovirů lidského původu. Takové adenoviry se skutečně zdají být nejvhodnější pro uvedené použití. Za účelem omezení rizika množení a tvorby infekčních částic in vivo jsou použité adenoviry obecně modifikovány tak, aby nebyly schopné replikace v infikované buňce. Konstrukce popsané v rámci dosavadního stavu techniky jsou takto tvořeny adenoviry s delecí oblasti E1 (E1a nebo/a E1b) a případně oblasti E3, v jejichž úrovni jsou inzerovány sekvence tvořící přenášenou genovou informaci (Levrero a kol., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury a kol. Gene 50 (1986) 161). Nicméně, kromě této nutné modifikace mají vektory popsané v rámci dosavadního stavu techniky ještě další nedostatky, které omezují jejich využití v rámci genové terapie, mezi které patří zejména riziko rekombinace s divokými adenoviry. Vynález přináší výhodné řešení tohoto problému.

V patentovém dokumentu WO91/11525 jsou popsány rekombinantní adenoviry obsahující zainteresované geny. Na rozdíl od obsahu tohoto patentového dokumentu však vynález využívá zjištění výhodných vlastností rekombinantních virů zvířecího původu, které jsou schopné infikovat lidské buňky, nejsou schopné se v nich replikovat nejsou schopné komplementace lidskými adenoviry.

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v použití rekombinantních adenovirů zvířecího původu pro humánní genovou terapii. Vynález je důsledkem zjištění, že adenoviry zvířecího původu jsou schopné s vysokou účinností infikovat lidské buňky. Vynález je rovněž založen na zjištění, že adenoviry zvířecího původu nejsou schopné množení v lidských buňkách, ve kterých byly testovány. Podstatu vynálezu konečně tvoří překvapující objev spočívající v tom, že adenoviry zvířecího původu nejsou nikterak trans-komplementovány adenoviry lidského původu, což eliminuje jakékoliv riziko rekombinace a propagace in vivo v přítomnosti lidských adenovirů, která by mohla vést k tvorbě infekční částice. Vektory podle vynálezu jsou tedy mimořádně výhodné, neboť v jejich případě je riziko spojené s použitím viru jako vektoru v genové terapii a reprezentované například patogenicitou transmisí, replikací a rekombinací silně redukováno a případně zcela potlačeno.

Vynález takto poskytuje virové vektory obzvláště vhodné pro přenos nebo/a expresi požadovaných sekvencí DNA u člověka.

Předmětem vynálezu je rekombinantní adenovir nelidského zvířecího původu schopný infikovat lidské buňky, neschopný replikace v lidských buňkách a obsahující alespoň jeden inzerovaný terapeutický gen kódující terapeutický proteinový produkt, přičemž terapeutickým genem je antimediatorový gen nebo antimediatorová sekvence.

Rekombinantní adenovir podle vynálezu případně obsahuje také promotorovou sekvenci umožňující expresi inzerovaného genu nebo inzerovaných terapeutických genů.

Rekombinantní adenovir podle vynálezu případně také obsahuje signální sekvence umožňující indukovat sekreci produktu exprese terapeutického genu.

Rekombinantní adenovir podle vynálezu je výhodně zvolen z množiny zahrnující psy, hovězí, myši, ovčí, prasečí, ptačí a opičí adenoviry. Výhodně jde o psí adenovir, který je výhodně zvolen z množiny zahrnující kmeny adenoviru CAC2.

Výhodně je adenovir zbaven alespoň sekvencí nezbytných pro replikaci, zejména oblastí E1A a E1B.

Výhodně adenovir podle vynálezu obsahuje ještě oblasti jiného zvířecího nebo lidského adenoviru, znemožňující produkci nežádoucích virových proteinů u člověka nebo umožňující inzerci heterologních sekvencí DNA, jejichž přenos nebo/a exprese je u člověka žádoucí, nebo/a inzerci stanovených oblastí genomu jiného zvířecího nebo lidského adenoviru.

Předmětem vynálezu je také farmaceutický přípravek, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje alespoň jeden rekombinantní adenovir, který byl definován výše.

Předmětem vynálezu je také použití výše uvedeného rekombinantního adenoviru pro přípravu farmaceutického přípravku určeného k terapeutickému nebo/a chirurgickému ošetření lidského těla, pro přípravu farmaceutického přípravku pro přenos terapeutických genů u člověka a pro přípravu lidské vakcíny.

Adenoviry zvířecího původu, které jsou použitelné v rámci vynálezu, mohou být adenoviry různého specifického původu s výjimkou adenovirů lidského původu. Lidskými adenoviry jsou adenoviry, které jsou přirozeným infekčním faktorem schopným infikovat člověka a které jsou obecně označovány symboly HAd nebo Ad.

Adenoviry zvířecího původu, které jsou použitelné v rámci vynálezu, mohou být adenoviry psího, hovězího, myšího (příklad: Mav1, Beard a kol., *Virology* 75 (1990) 81), ovčího, prasečího, ptačího nebo také opičího (příklad: SAV) původu.

5 Z ptačích adenovirů lze zejména uvést sérotypy 1 až 10 dostupné ve sbírce kultur ATCC, přičemž jako příklad takových adenovirů lze uvést kmeny Phelp (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) nebo také kmeny uváděné jako ATCC VR-831 až 835. Z hovězích adenovirů lze použít různé známé sérotypy a zejména sérotypy dostupné ve
10 sbírce kultur ATCC (typy 1 až 8) pod označením ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 a 769. Rovněž lze uvést myší adenoviry FL (ATCC VR-550) a E20308 (ATCC VR-528), ovčí adenovir typu 5 (ATCC VR-1343) nebo typu 6 (ATCC VR-1340), prasečí adenovir 5359 nebo opičí adenoviry, jakými jsou zejména adenoviry vedené ve sbírce kultur ATCC pod čísly VR-591-594, 941-943, 195-203, atd.

15 V rámci vynálezu se výhodně použijí adenoviry psího původu a zejména všechny kmeny adenovirů CAV2 (například kmen Manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800)). Psí adenoviry již byly předmětem četných strukturních studií. V rámci dosavadního stavu techniky byly takto popsány úplné restriční mapy adenovirů CAV1 a CAV2 (Spibey a kol., *J. Gen. Virol.* 70 (1989)
20 165), přičemž byly klonovány a sekvenovány geny E1a a E3, jakož i sekvence ITR (viz zejména Spibey a kol., *Virus Res.* 14 (1989) 241; Linné, *Virus Res.* 23 (1992) 119, WO 91/11525). Jinak byly psí adenoviry již použity pro přípravu vakcín určených k imunizaci psů proti vzteklině (parvoviry a pod. (WO 91/11525)). Nicméně nebyla až dosud v rámci dosavadního stavu techniky navržena nebo zmíněna možnost použití těchto adenovirů pro genovou humánní terapii, ani
25 nebyl specifikován pokrok, kterého by bylo takovýmto použitím dosaženo.

Adenoviry použité v rámci vynálezu musí být výhodně defektní, tzn. neschopné autonomní propagace v organismu, do kterého byly přeneseny. Jak již bylo uvedeno výše, bylo prokázáno, že adenoviry zvířecího původu jsou schopné infikovat lidské buňky, ale nejsou schopné
30 propagace v těchto lidských buňkách. V tomto ohledu jsou adenoviry zvířecího původu vzhledem ke člověku přirozeně defektní a na rozdíl od použití lidských adenovirů adenoviry zvířecího původu nevyžadují výše uvedenou genetickou modifikaci, která viry činí defektními. Nicméně defektní povaha těchto adenovirů může být posílena genetickými modifikacemi jejich genomu, zejména modifikací sekvencí nezbytných pro replikaci daného viru v buňkách. Tyto
35 oblasti mohou být buď odstraněny (zcela nebo částečně), nebo učiněny nefunkčními nebo modifikovány inzercí dalších sekvencí a zejména heterologní sekvence DNA.

Podle povahy adenoviru se sekvence nezbytné k replikaci mohou poněkud měnit. Nicméně tyto sekvence jsou obecně lokalizovány v blízkosti konců genomu. Takto byla v případě adenoviru CAV-2 identifikována, klonována a sekvenována oblast E1a (Spilbey a kol., *Virus Res.* 14 (1989) 241). Tato oblast se nachází na fragmentu s délkou 2 kb na levém konci genomu adenoviru.

45 Nicméně adenoviry mohou být geneticky modifikovány i jinak, zejména za účelem zabránění produkci nežádoucích virových proteinů u člověka, za účelem umožnění inserce heterologních sekvencí DNA výrazné délky nebo/a za účelem inserce stanovených oblastí genomu jiného zvířecího nebo lidského adenoviru (příklad: gen E3).

50 V rámci tohoto vynálezu výraz „heterologní sekvence DNA“ zahrnuje libovolnou sekvenci DNA zavedenou do viru, jejíž přenos nebo/a exprese je u člověka žádoucí.

Taková heterologní sekvence DNA může zejména zahrnovat jeden nebo několik terapeutických genů nebo/a jeden nebo několik genů kódujících antigenní peptidy.

V rámci specifického provedení se tedy vynález zejména týká použití adenoviru zvířecího původu pro přípravu farmaceutických přípravků určených pro přenos terapeutických genů u člověka. Terapeutickými geny, které mohou být takto přeneseny, jsou libovolné geny, jejichž transkripce a případně translace v cílové buňce generuje produkty mající terapeutickou účinnost.

5 Může se zejména jednat o geny kódující proteinové produkty mající terapeutický účinek. Takto kódovaným proteinovým produktem může být protein, peptid, aminokyselina a podobně. Tento proteinový produkt může být homologní vůči cílové buňce (což znamená, že tento produkt se normálně exprimuje v cílové buňce v případě, že tato buňka nevykazuje žádnou patologii).
 10 V tomto případě exprese proteinu umožňuje například léčit nedostatečnou expresi v uvedené buňce nebo expresi neúčinného nebo málo účinného proteinu, způsobenou modifikací buňky, nebo také umožňuje nadměrnou expresi uvedeného proteinu. Terapeutický gen může také kódovat mutant buněčného proteinu mající zvýšenou stabilitu, modifikovanou účinnost a podobně. Proteinový produkt může být rovněž heterologní vůči cílové buňce. V tomto případě může
 15 exprimovaný protein na příklad kompletovat nebo poskytovat dostatečnou činnost buňky, což jí umožní bojovat proti dané patologii.

Jako terapeutické produkty ve smyslu tohoto vynálezu lze zejména uvést enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny: interleukiny, interferony a podobně (FR 9203120), růstové
 20 faktory, přenašeče nervových vzrůtů nebo jejich prekurzory nebo syntézní enzymy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5 a podobně, apolipoproteiny: ApoAI, ApoAIV, ApoE a podobně (FR 93 05125), dystrophin nebo minidystrophin (FR 9111947), geny potlačující nádory: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev a podobně (FR 93 04745), geny kódující faktory uplatňující se při koagulaci: faktory VII, VIII, IX, a podobně.

25 Terapeutickým genem může být také antimediatorový gen nebo antimediatorová sekvence, jehož resp. jejíž exprese reguluje expresi genů nebo transkripci buněčných RNAm. Takové sekvence mohou být například přepsány do cílové buňky jako RNA komplementární k buněčným RNAm a mohou takto blokovat jejich translaci na protein, a to podle techniky popsané v evropském
 30 patentovém dokumentu EP 140 308.

Jak již bylo uvedeno výše, může heterologní sekvence DNA rovněž obsahovat jeden nebo několik genů kódujících antigenní peptid, který je schopen generovat u člověka imunitní odezvu. V rámci tohoto specifického provedení vynález umožňuje realizaci vakcíny umožňující imuni-
 35 zovat člověka, zejména proti mikroorganismům a virům. Zejména se může jednat o specifické antigenní peptidy viru Epstein a Barrové, viru hepatitidy B (EP 185 573), viru pseudovztekliny nebo také specifických nádorových virů (EP 259 212).

Obecně heterologní sekvence DNA také obsahuje sekvence umožňující expresi terapeutického genu nebo/a genu kódujícího antigenní peptid v infikované buňce. Může se jednat o sekvence, které jsou přirozeně zodpovědné za expresi uvažovaného genu za předpokladu, že jsou tyto sekvence schopné funkce v infikované buňce. Rovněž se může jednat o sekvence různého
 40 původu (zodpovědné za expresi dalších proteinů) nebo dokonce o syntetické sekvence. Zejména se může jednat o promotorové sekvence eukaryotických nebo virových genů. Například se může jednat o promotorové sekvence pocházející z genomu buňky, která má být infikována. Stejně tak se může jednat o promotorové sekvence pocházející z genomu viru, včetně použitého adenoviru. V tomto ohledu lze například citovat promotory genů E1A, MLP, CMV, RSV a podobně. Kromě toho mohou být tyto expresní sekvence modifikovány zavedením aktivačních, regulačních a podobných sekvencí. V případě, že inzerovaný gen neobsahuje expresní sekvence, potom může
 45 být inzerován do genomu defektního viru za takovou sekvenci.

Jinak heterologní sekvence DNA může rovněž obsahovat, a to zejména před terapeutickým genem, signální sekvenci směřující syntetizovaný terapeutický produkt do sekrečních cest cílové buňky. Touto signální sekvencí může být přirozená signální sekvence terapeutického produktu,

i když se může také jednat o libovolnou jinou funkční signální sekvenci nebo o umělou signální sekvenci.

Defektní adenoviry podle vynálezu mohou být připraveny libovolnou známou technikou. Zejména mohou být připraveny podle protokolu popsaného v patentové přihlášce WO 91/11525. Klasická technika přípravy spočívá v homologní rekombinaci mezi zvířecím adenovirem a plazmidem nesoucím mezi jiným heterologní sekvenci, která má být inzerována. Tato homologní rekombinace proběhne po ko-transfekci uvedených adenovirů a plazmidu ve vhodné buněčné řadě. Použitá buněčná řada musí být výhodně transformovatelná uvedenými prvky a v případě, že se použije modifikovaný adenovir zvířecího původu, může buněčná řada případně obsahovat sekvence, které jsou schopné komplementovat část genomu defektního adenoviru, výhodně v integrované formě za účelem eliminace rizika rekombinace. Jako příklady uvedených buněčných řad lze uvést renální buněčnou řadu chrta GHK (Flow laboratoires) nebo buněčnou řadu MDCK. Podmínky, za jakých se provádí kultivace buněčných řad a příprava virů nebo virové DNA, byly rovněž popsány v literatuře (viz zejména Macatney a kol., Science 44 (1988)9; Fowlkes a kol., J. Mol. Biol. 132 (1979)163).

Multiplikované vektory se potom izolují a purifikují klasickými technikami molekulární biologie.

Dalším předmětem vynálezu je rekombinantní adenovir zvířecího původu obsahující heterologní sekvenci DNA zahrnující alespoň jeden výše definovaný terapeutický gen.

Předmětem vynálezu je rovněž každý farmaceutický přípravek obsahující výše definovaný rekombinantní adenovir zvířecího původu. Tyto farmaceutické přípravky mohou být formulovány s ohledem na topické, perorální, parenterální, intranasální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární a ostatní podání.

Výhodně farmaceutický přípravek obsahuje farmaceuticky přijatelné nosiče pro injikovatelnou formulaci. Může se zejména jednat o roztoky solí (sekundární a terciární fosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý nebo hořečnatý a podobně nebo směsi těchto solí) ve sterilní isotonické formě, nebo o suché kompozice, zejména lyofilizované, které po přidání sterilizované vody nebo fyziologického roztoku poskytují injikovatelné roztoky.

Dávky viru použité pro injekci mohou být závislé na různých parametrech, zejména na použitém způsobu podání, na typu léčeného patologického stavu, na genu, který má být exprimován nebo také na požadované době léčení. Obecně jsou rekombinantní adenoviry podle vynálezu formulovány a podány ve formě dávek obsahujících mezi 10^4 a 10^4 pfu/ml a výhodně mezi 10^6 a 10^{10} pfu/ml. Výraz pfu („plaque forming unit“) odpovídá infekční potenci roztoku viru a je stanoven infikováním vhodné buněčné kultury a určením (obvykle po 5 dnech) počtu oblastí infikovaných buněk. Technika stanovení veličiny pfu virového roztoku je velmi dobře dokumentována v literatuře.

Podle inzerované heterologní sekvence DNA mohou být adenoviry podle vynálezu použity pro léčení nebo prevenci četných patologických stavů, zahrnujících genetická onemocnění (dystrofie, cystická fibróza a podobně), neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, ALS a podobně), rakoviny, patologické stavy spojené s poruchami koagulace a s dyslipoproteinemiemi, patologické stavy sdružené s virovými infekcemi (hepatitida, AIDS a podobně) a podobné patologické stavy.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn na příkladech jeho konkrétních provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen formulací patentových nároků.

Příklady provedení vynálezu

Na připojených výkresech

- 5 obr. 1 znázorňuje restriční mapu kmene Manhattan adenoviru CAV2 (podle výše uvedeného odkazu Spilbey a kol.),
 obr. 2 znázorňuje mapu plazmidů p1, p2 (obr. 2a) a p3 (obr. 2b) a
 obr. 3 znázorňuje konstrukci rekombinantního psího adenoviru obsahujícího heterologní sekvenci DNA.

10

Obecné techniky molekulární biologie

- Klasické metody používané v molekulární biologii, jakými jsou preparativní extrakce plazmidové DNA, odstředování plazmidové DNA v gradientu chloridu cesného, elektroforéza na
 15 agarosovém gelu nebo na akrylamidovém gelu, purifikace fragmentů DNA elektroelucí, extrakce proteinů fenolem nebo soustavou fenol–chloroform, precipitace DNA v solném prostředí ethanolem nebo isopropanolem, transformace v *Escherichia coli* a další metody, jsou velmi dobře známé a hojně popsány v literatuře /Maniatis T. a kol. „Molecular Cloning, a Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982; Ausubel F. M.
 20 a kol. (eds), „Current Protocols in Molecular Biology“, John Wiley and Sons, New York, 1987/.

Plazmidy typu pBR322, pUC a fagy řady M13 jsou komerčně dostupné u firmy Bethesda Research Laboratories.

- 25 Pro ligace mohou být fragmenty DNA separovány podle velikosti elektroforézou na agarosovém nebo akrylamidovém gelu, extrahovány fenolem nebo soustavou fenol/chloroform, vysráženy ethanolem a potom inkubovány v přítomnosti DNA–ligázy fagu T4 (Biolabs) podle doporučení dodavatele.
- 30 Naplnění proeminentních konců 5' může být provedeno Klenowovým fragmentem ADN–polymerázy I *Escherichia coli* (Biolabs) podle údajů dodavatele. Destrukce proeminentního konce 3' se provede v přítomnosti DNA–polymerázy fagu T4 (Biolabs) použité podle doporučení výrobce. Destrukce proeminentního konce 5' se provede zpracováním za použití nukleázy S1.
- 35 Mutagenese provedení in vitro syntetickými oligodeoxynukleotidy může být provedena metodou vyvinutou Taylor–em a kol. /Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749–8764/ za použití soupravy distribuované firmou Amersham.

- 40 Enzymatická amplifikace fragmentů DNA technikou nazvanou PCR /Polymerase–catalyzed Chain Reaction, Saiki R. K. a kol., Science 230 (1985) 1350–1354; Mullis K. B. a Faloona F. A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335–350/ může být provedena za použití činidla označeného jako „DNA thermal cycler“ (Perkin Elmer Cetus) podle údajů výrobce.

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

E1 Infekce lidských buněk adenoviry psího původu

- 50 Tento příklad demonstruje schopnost adenovirů zvířecího (psího) původu infikovat lidské buňky.

E1.1 Použité buněčné řady

V tomto příkladu byly použity následující buněčné řady:

- 5 – řada z ledviny lidského embrya 293 (Graham a kol., J. Gen. Virol. 36 (1977)59); tato buněčná řada obsahuje zejména integrovaně ve svém genomu levou část genomu lidského adenoviru Ad5 (12 %),
- 10 – lidská buněčná řada KB: tato buněčná řada pochází z lidského epidermického karcinomu a je dostupná ve sbírce kultur ATCC (ref. CCL17), stejně jako podmínky umožňující její kultivaci,
- lidská buněčná řada Hela: tato buněčná řada pochází z lidského epiteliálního karcinomu a je dostupná ve sbírce kultur ATCC (ref. CCL2), stejně jako podmínky umožňující její kultivaci,
- 15 – psí buněčná řada MDCK: podmínky kultivace této buněčné řady MDCK byly zejména popsány Macatney–em a kol. v Science 44 (1988)9.

E1.2 Infekce

20 Výše uvedené buněčné řady byly infikovány virem CAV2 (kmen Manhattan). Za tím účelem byly tyto buňky (asi 10^7 /miska) inkubovány po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C v přítomnosti 10 pfu viru/buňka. Potom bylo přidáno 5 ml kultivačního prostředí a v kultivaci se pokračuje při teplotě 37 °C po dobu asi 48 hodin. Po této době byla analyzována DNA přítomná
 25 v infikovaných buňkách v episomní formě. Získané výsledky ukazují, že všechny buněčné řady mají ve svých jádrech DNA adenoviru CAV2, což dokazuje jejich infikovatelnost psími adenoviry.

E2 Absence propagace adenovirů psiho původu v lidských buňkách

30 Tento příklad demonstruje skutečnost, že i když jsou psí adenoviry schopné infikovat lidské buňky, nedochází k jejich propagaci v těchto lidských buňkách.

Po infekci buněk podle příkladu 1 bylo sledováno množství DNA adenoviru CAV2 v závislosti na čase podle následujícího protokolu: Episomní DNA přítomná v buňkách se izoluje technikou popsanou Hirt–em a kol. (J. Virol. 45 (1983)91), přičemž množství DNA bylo stanoveno porovnáním se škálou etalonů. Získané výsledky ukazují, že se množství virové DNA v buňkách KB a 293 nezvětšuje, což dokazuje úplnou absenci replikace adenoviru CAV2 v těchto buňkách. V buňkách MDCK a Hela dochází k mírnému zvětšení množství virové DNA adenoviru CAV2.
 35 Nicméně stanovení tvorby virových částic ukazuje, že k žádné propagaci adenoviru CAV2 nedochází v buněčných řadách 293, KB a Hela, přičemž k této propagaci dochází výlučně v psí buněčné řadě MDCK. Uvedená propagace byla stanovena sběrem infikovaných buněk, uvolněním případných virů zmražením a rozmražením a infikováním buněk MDCK takto získaným supernatantem za výše popsaných podmínek. Po 48 hodinách kultivace dokazuje
 40 nepřítomnost virové DNA v takto infikovaných buňkách, že v lidských buňkách nedošlo k žádné virové propagaci.

Uvedené výsledky jednoznačně dokazují, že psí adenoviry jsou neschopné propagace v lidských buňkách.

E3 Prokázání absence trans–komplementace psích adenovirů lidskými adenoviry

50 Tento příklad prokazuje, že absence propagace psích adenovirů v lidských buňkách není trans–komplementována přítomností lidských adenovirů.

Buňky lidských buněčných řad 293, KB a Hela a psí buněčné řady MDCK byly ko-infikovány adenovirem CAV2 a lidským adenovirem Ad5. Přítomnost virové DNA (psí a lidské) v buňkách byla stanovena stejně jako v příkladu E1 a v závislosti na čase bylo sledováno množství DNA a uvedená propagace. Získané výsledky ukazují, že v buňkách KB a 293 se množství DNA adenoviru CAV2 v průběhu času nezvětšuje, což dokazuje, že přítomnost lidského adenoviru Ad5 neindikuje trans-komplementací replikaci adenoviru CAV2 v těchto buňkách. Nepřítomnost virové DNA v buňkách MDCK infikovaných případnými viry pocházejícími z buněk KB, 293 a Hela dokazuje stejným způsobem, že v lidských buněčných řadách nedochází k žádné propagaci adenoviru CAV2 a to dokonce ani v přítomnosti lidského adenoviru.

E4 Konstrukce banky genomové DNA adenoviru CAV2

Z restrikčních fragmentů genomu adenoviru CAV2 byla vytvořena banka plazmidů. Tato banka byla získána digescí adenoviru CAV2 enzymy SmaI a PstI a klonováním fragmentů SmaI: A, B, C, D, E, F, I a J a PstI: A, B, C, D, E, F, G, H (obr. 1) do vektoru pGem3Zf+ (Promega). Plazmid nesoucí fragment SmaI C se potom podrobí ko-transfekci v buňkách MDCK s plazmidem pUC4KIXX (Pharmacia) nesoucím gen resistance proti neomycinu za vzniku řady MDCK, která konstitučně exprimuje geny E1A a E1B adenoviru CAV2. Tato řada umožňuje konstrukci rekombinantních virů s delekcemi v těchto oblastech (viz E5.2).

E5 Konstrukce psího rekombinantního adenoviru nesoucího gen interleukinu-2 pod kontrolou promotoru MLP adenoviru Ad2

Byly vypracovány dvě strategie konstrukce psích rekombinantních adenovirů nesoucích gen interleukinu-2 pod kontrolou promotoru MLP adenoviru Ad2 lidského původu.

E5.1 První z těchto strategií spočívá v inzerci požadované sekvence heterologní DNA (promotor MLP – gen interleukinu-2) mezi oblast E4 a pravou oblast ITR celého genomu adenoviru CAV2 v úrovni restrikčního místa SmaI. Konstrukce takového rekombinantu se provádí buď ligací, nebo rekombinací in vivo mezi plazmidem nesoucím požadovanou heterologní sekvenci DNA a genomem adenoviru CAV2. Plazmidy použité pro získání rekombinantních adenovirů nesoucích gen interleukinu-2 pod kontrolou promotoru MLP se konstruují následujícím způsobem (obr. 2):

- první plazmid mající označení p1 se získá klonováním fragmentu SalI B adenoviru CAV2 (obr. 1) obsahujícího zejména pravou oblast ITR, místo SmaI a gen E4 v plazmidu pGem3Zf+ (promega), přičemž místo SmaI se výlučně nachází na plazmidu p1,
- v úrovni místa SmaI plazmidu p1 se zavede heterologní sekvence DNA (promotor MLP–gen interleukinu-2) za vzniku plazmidu p2 a
- fragment Pst–I–SalI obsažený ve fragmentu PstI D genomové banky a nesoucí část genu E3 se potom klonuje v odpovídajícím místě v plazmidu p2 za vzniku plazmidu p3 (obr. 2).

Takto získané plazmidy se použijí pro přípravu rekombinantních adenovirů podle následujících dvou protokolů (viz obr. 3):

- a) ligace in vitro plazmidu p2 digerovaného působením SalI ve fragmentu SalI A adenoviru CAV2 a transfekce ligačního produktu v buňkách MDCK (obr. 3a),
- b) rekombinace mezi plazmidem p3 a fragmentem SalI A adenoviru CAV2 po kotransfekci v buňkách MDCK (obr. 3b). Získané rekombinantní adenoviry se potom izolují a amplifikují o sobě známými technikami.

Tyto manipulace umožňují konstrukci psích rekombinantních adenovirů nesoucích gen interleukinu-2 a použitelných pro přenos tohoto terapeutického genu u člověka (obr. 3).

- 5 E5.2 Druhá vypracovaná strategie spočívá v použití buněčné řady MDCK, která konstitučně exprimuje geny E1A a E1B adenoviru CAV2 (viz příklad E4). Tato buněčná řada umožňuje trans-komplementovat psí adenoviry s delecí v těchto oblastech a takto konstruovat rekombinantní viry, ve kterých je heterologní sekvence DNA substituována v oblasti E1. Za tím účelem se konstruuje plazmid obsahující levý konec (sekvence ITR a enkapsidační sekvence) genomu adenoviru CAV2 a heterologní sekvence DNA. Tento plazmid se podrobí ko-transfekci ve výše uvedených buňkách MDCK v přítomnosti genomu adenoviru CAV2 s delecí jeho vlastního levého konce. Produkované rekombinantní psí adenoviry se izolují, případně amplifikují a konzervují s ohledem na následné použití v humánním lékařství.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20

1. Rekombinantní adenovir nelidského zvířecího původu schopný infikovat lidské buňky, neschopný replikace v lidských buňkách a obsahující alespoň jeden inzerovaný terapeutický gen kódující terapeuticky proteinový produkt, přičemž terapeutickým genem je antimediatorový gen nebo antimediatorová sekvence.

25

2. Rekombinantní adenovir podle nároku 1, obsahující rovněž promotorové sekvence umožňující expresi inzerovaného terapeutického genu nebo inzerovaných terapeutických genů.

30

3. Rekombinantní adenovir podle nároku 1 nebo 2, obsahující rovněž signální sekvence umožňující indukovat sekreci produktu exprese terapeutického genu.

4. Rekombinantní adenovir podle nároků 1 až 3, zvolený z množiny zahrnující psí, hovězí, myší, ovčí, prasečí, ptačí a opičí adenoviry.

35

5. Rekombinantní adenovir podle nároku 4, tvořený psím adenovirem, výhodně zvoleným z množiny zahrnující kmeny adenoviru CAV2.

6. Rekombinantní adenovir podle některého z nároků 1 až 5, zbavený alespoň sekvencí nezbytných pro replikaci, zejména oblastí E1A a E1B.

40

7. Rekombinantní adenovir podle nároku 6 obsahující oblasti jiného zvířecího nebo lidského adenoviru, znemožňující produkci nežádoucích virových proteinů u člověka nebo umožňující inzerci heterologních sekvencí DNA, jejichž přenos nebo/a exprese je u člověka žádoucí, nebo/a inzerci stanovených oblastí genomu jiného zvířecího nebo lidského adenoviru.

45

8. Farmaceutický přípravek, **v y z n a č e n ý t í m**, že obsahuje alespoň jeden rekombinantní adenovir podle některého z nároků 1 až 7.

50

9. Použití rekombinantního adenoviru podle některého z nároků 1 až 7 pro přípravu farmaceutického přípravku určeného k terapeutickému nebo/a chirurgickému ošetření lidského těla.

10. Použití rekombinantního adenoviru podle některého z nároků 1 až 7 pro přípravu farmaceutického přípravku určeného pro přenos terapeutických genů u člověka.

11. Použití rekombinantního adenoviru podle některého z nároků 1 až 7 pro přípravu lidské vakcíny.

5

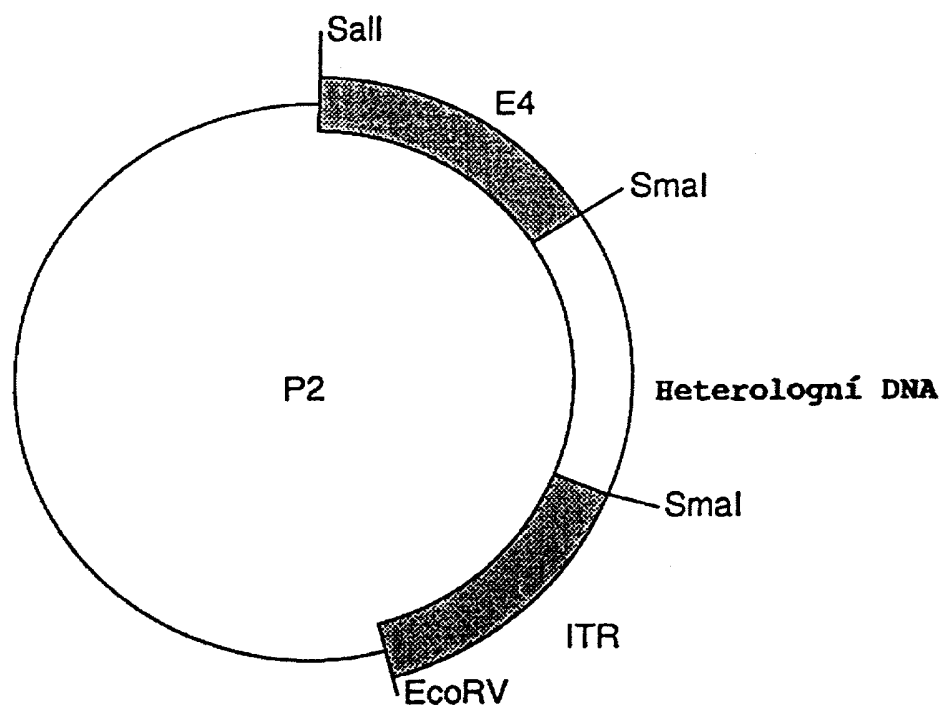
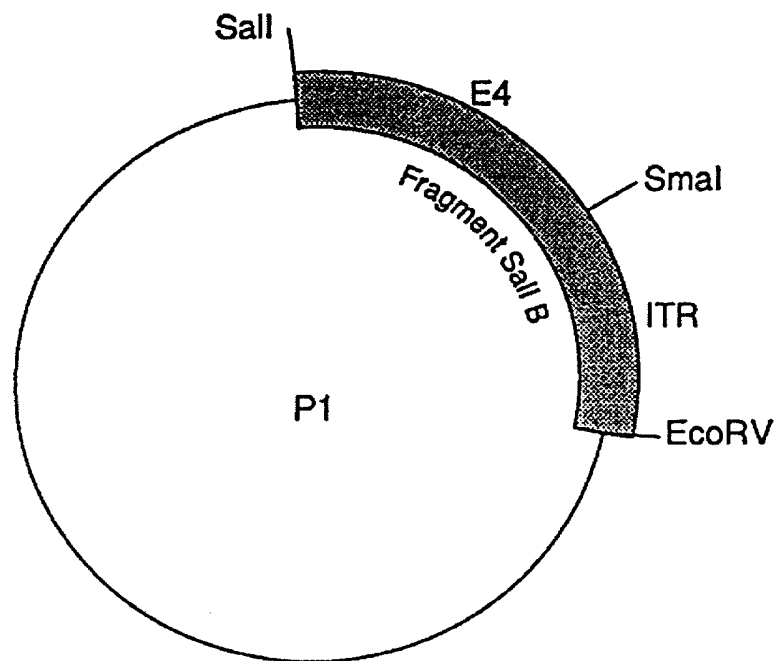
5 výkresů

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

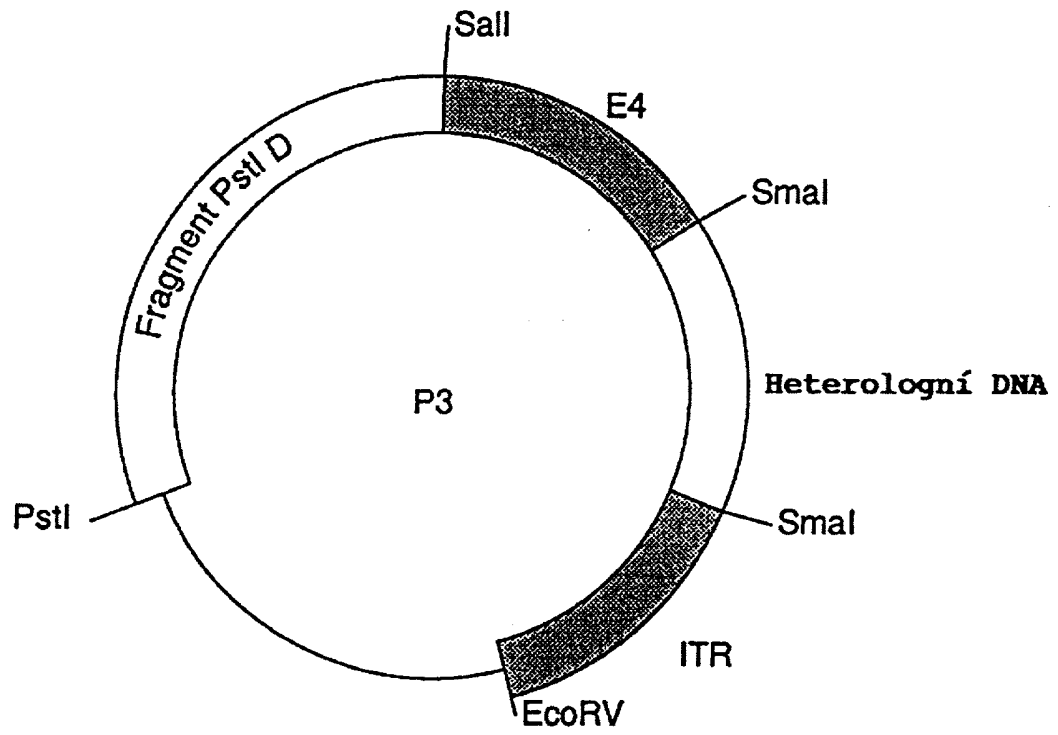
A B Sal I

I C E F GH A B D J Sma I

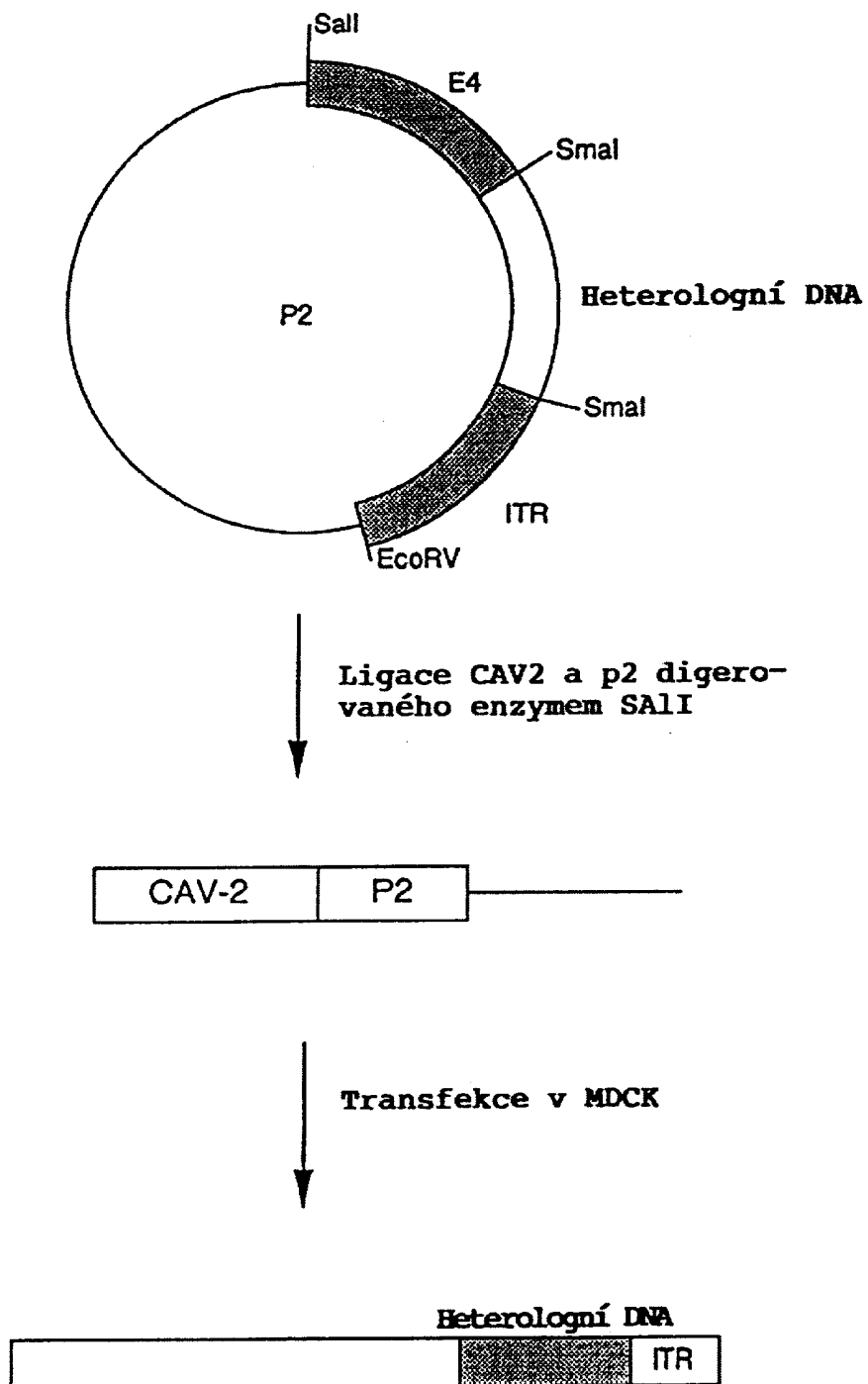
OBR. 1



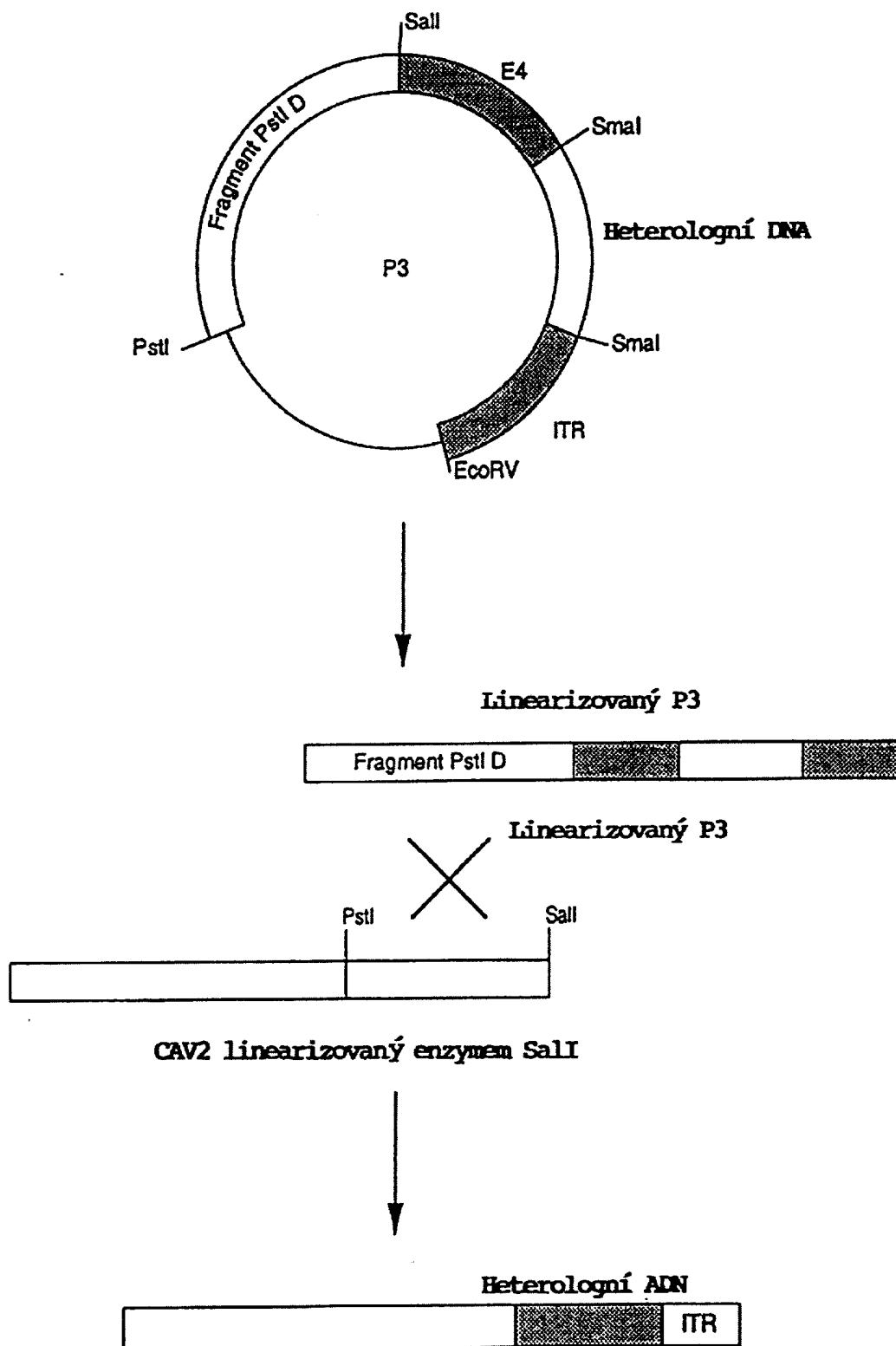
OBR. 2a



OBR. 2b



OBR. 3a



OBR. 3b

Konec dokumentu