



(19) **HU**

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: **224 713**

(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 01762**

(22) A bejelentés napja: **1997. 11. 18.**

(51) Int. Cl.: **C12N 15/86** (2006.01.)

C12N 7/01 (2006.01.)

(40) A közzététel napja: **2000. 09. 28.**

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértékesítőben: **2006. 01. 30.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/FR 97/02073

(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9822607**

(30) Elsőbbségi adatok:

96/14278 1996. 11. 22. FR

(73) Jogosult:

CENTELION, Vitry sur Seine (FR)

(72) Feltalálók:

Leblois-Prehaud, Hélène, Guyancourt (FR);

Perricaudet, Michel, Ecrosnes (FR);

Vigne, Emmanuelle, Ivry/Seine (FR);

Yeh, Patrice, Párizs (FR)

(74) Képvisező:

**dr. Láng Tivadarné, S. B. G. & K. Szabadalmi
Ügyvivői Iroda, Budapest**

(54)

Eljárás rekombináns vírusok előállítására

(57) Kivonat

A találmány tárgya eljárás hiányos rekombináns vírusok előállítására, amely abban áll, hogy kompetens sejtpopulációba bevezetnek egy hiányos rekombináns vírusgenomot és egy bakulovírust, amely a hiányos rekombináns vírusgenom transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét vagy azok

egy részét hordozza, a funkciók másik részét egy vagy több másik bakulovírus és/vagy a kompetens sejt szolgáltatja.

A találmány szerinti vírustermelő eljárás és rendszer számos előnnyel rendelkezik ipari alkalmazhatóság tekintetében.

HU 224 713 B1

A találmány tárgya eljárás rekombináns vírusok előállítására. A találmány tárgyát képezik ezenkívül még az eljárás megvalósításához alkalmazott szerkezetek, a termelősejtek és az így termelt vírusok. A vírusok gének in vitro, ex vivo vagy in vivo klónozására és/vagy expressziójára szolgáló vektorokként alkalmazhatók.

Víruseredetű vektorokat széles körben alkalmaznak gének in vitro (rekombináns fehérjék termeléséhez, szűrőtesztek megvalósítására, gének szabályozásának vizsgálatára stb.), ex vivo, vagy in vivo (állatmodellek előállítására vagy terápiás megközelítésekben) klónozásához, átviteléhez és expressziójához. Ezek közül a vírusok közül különösen az adenovírusokat, az adenoasszociált vírusokat (AAV), a retrovírusokat, a herpeszvírusokat vagy a vakcínavirust említhetjük meg.

Az Adenoviridae család emlősöknél és madaraknál igen elterjedt, és lipidtartalmú burokkal nem rendelkező, kétszálú DNS-vírusok több száz különböző szerotípusát foglalja magában, melyek szimmetrikus ikozaéderes kapsziddal rendelkeznek [Horwitz, in: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed. Virology, third edition ed. Philadelphia: Raven Publisher, 2149–2171 (1996)]. Ártalmatlanságukon túl az adenovírusok igen széles körű sejtes tropizmussal rendelkeznek. A retrovírusokkal ellentétben, melyek ciklusa a sejtosztódástól függ, az adenovírusok képesek mind aktív, osztódásban lévő, mind nyugalmi állapotban lévő sejteket fertőzni, és genomjuk episzomális formában fennmarad. Ezenfelül magas titerrel termelhetők (10^{11} pfu/ml). Ezek a lényeges tulajdonságok előnyös vektorrá teszik az adenovírusokat heterológ gének klónozásához és expresszálasához. A jelenleg alkalmazott vektorok a C típusú adenovírusokból, többek között a 2 és 5 típusú adenovírusokból, valamint a CAV-2 típusú kutyaadenovírusokból származnak, melyek molekuláris biológiája a legjobban ismert.

Az adenovírusok 36 kb linerális genommal rendelkeznek, amely mindkét végén 103 bp inverz ismétlődő szekvenciával (ITR) végződik, és tartalmaz egy replikációs origót, valamint a bal ITR mellett elhelyezkedő kapszidképződési szignált [Shenk, Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed. Virology, Philadelphia: Raven Publisher, 2111–2148 (1996)]. A vírus ciklusa során a gének három családja fejeződik ki:

- A közvetlen korai gének (E1, E2, E3 és E4), melyek a sejtgének szabályozásában vesznek részt, többek között lehetővé teszik, hogy a sejt S fázisba kerüljön (E1A), és meggátolják az apoptózist (E1B). Részt vesznek a korai vagy késői vírusgének szabályozásában is transzkripció, splicing szinten, vagy a messzendező RNS szállítás szintjén (E1A, E2A, E4). Szerepet játszanak a replikációban és az immunválasz elkerülésében is.
- A késleltetett korai gének (pIX és IVa2) a késői gének transzkripciójának szabályozásával (IVa2) vagy a virion összeállításával (pIX) kapcsolatosak.

– A késői gének (L1–L5) egy erős promoterből (MLP) íródnak át. Egy 28 kb elsődleges transzkriptum lehetővé teszi a vírusrészecskék összeállításában és érési folyamatában részt vevő különböző szerkezeti (core, penton, hexon) és nem szerkezeti fehérjéknek megfelelő transzkriptumok kialakítását alternatív splicinggal, és az 5 poliadenilációs hely alkalmazásával.

Adenovírusvektorokat alkalmaztak in vitro gének klónozásához és expresszálasához [Gluzman et al., Cold Spring Harbor, New York, 11 724, 187], transzgen állatok kialakítására (WO 95/22616), ex vivo gének átvitelére sejtekbe [WO 95/14785, WO 95/06120] vagy in vivo gének átvitelére sejtekbe [lásd többek között WO 93/19191, WO 94/24297, WO 94/08026].

Ami az adenoasszociált vírusokat (AAV) illeti, viszonylag kisméretű DNS-vírusokról van szó, melyek a fertőzött sejt genomjába stabil és viszonylag helyspecifikus módon beépülnek. Sejtek széles spektrumát képesek fertőzni anélkül, hogy a sejtek növekedésére, morfológiájára vagy differenciálódására hatással lennének. Másrészt úgy tűnik, nem vesznek részt emberi betegségek kialakításában. Az AAV-k genomját klónozták, szekvenálták és jellemezték. Ez körülbelül 4700 bázist tartalmaz, és mindkét végén egy körülbelül 145 bázisú inverz ismétlődő terület (ITR) található, amely a vírus replikációs origójaként szolgál. A genom fennmaradó része két alapvető területre osztható, melyek a részecskéképződésért felelős funkciókat hordozzák: a genom bal része, amely a vírusreplikációban és a virális gének expressziójában szerepet játszó rep gént tartalmazza, és a genom jobb része, amely a vírus-kapszidfehérjéket kódoló cap gént tartalmazza.

Az AAV-eredetű vektorok alkalmazását gének in vitro és in vivo átvitelére az irodalomban már leírták [lásd többek között WO 91/18088, WO 93/09239, US 4 797 368, US 5 139 941, EP 488 528].

Ami a retrovírusokat illeti, ezek integratív, szelektíven az osztódó sejteket fertőző vírusok. Ezek tehát például a rákos vagy resztenózisos alkalmazásokhoz megfelelő vektorok. A retrovírusok genomja alapvetően két LTR-t, egy részecskéképződésért felelős szekvenciát és három kódolóterületet (gag, pol, env) tartalmaz. Rekombináns vektorok kialakítását és in vitro vagy in vivo alkalmazásukat az irodalomban széles körben leírták [lásd többek között Breakfield et al., New Biologist 3, 203 (1991), EP 453 242, EP 178 220, Bernstein et al., Genet. Eng. 7, 235 (1985), McCormick, BioTechnology 3, 689 (1985) stb.].

Rekombináns vektorként való alkalmazásukhoz számos víruseredetű konstrukciót előállítottak, melyek különböző kívánt géneket tartalmaztak. Ezekben a konstrukciókban a vírusgenomot úgy módosították, hogy a vírust képtelenné tegyék a fertőzött sejten történő autonóm replikációra. Így az irodalomban ismertek konstrukciók olyan vírusok, melyekből genomjuk bizonyos, a replikációhoz elengedhetetlen területe hiányzik. Részletesen az adenovírusokról szólva az első generációs konstrukciók deléciót tartalmaznak az E1 régióban, amely a vírusreplikációhoz szükséges, és erre

a területre építették be a heterológ DNS-szekvenciákat [Levrero et al., *Gene* 101, 195 (1991); Gosh–Choudhury et al., *Gene* 50, 161 (1986)]. Másrészt a vektorok tulajdonságainak javítására azt javasolták, hogy az adenovírusok genomjában más deléciókat vagy módosításokat is végezzenek. Így a ts125 mutánsba bevezettek egy hőmérséklet-érzékeny pontmutációt, amely lehetővé teszi, hogy az E2 területen kódolt 72 kD DNS-kötő fehérjét (DBP) inaktívvá tegyék [Van der Vliet et al. (1975)]. Más vektorok egy másik, a replikációhoz vagy a vírus terjedéséhez elengedhetetlen területen, az E4 régióban tartalmazzak deléciókat. Azok az adenovírusvektorok, melyekben az E1 és E4 régió deletált, nagymértékben lecsökkent transzkripció alapzajjal és a virális gének expressziójának alacsony szintjével rendelkeznek. Ilyen vektorokat írnak le például a WO 94/28152, WO 95/02697, WO 96/22378 számon közzétett bejelentésekben. Másrészt leírtak olyan vektorokat is, melyek a 1Va2 gén területén tartalmazzak egy módosítást [WO 96/10088]. Ezenkívül leírták az úgynevezett „minimális adenovírusokat” vagy „pszeudoadenovírusokat” (vagy másként AdΔ) [WO 94/12649, WO 94/28152, WO 95/02697], melyek csak a vírusok termelődéséhez cisz-helyzetben szükséges területeket (ITR és részecskéképződésért felelős szekvenciák) tartalmazzák, és hiányzik belőlük minden kódolószekvencia, bár ezek termelése igen nehéz, amint a következőkben megmagyarázzuk.

Az AAV-kről beszélve a leírt vektorokból általában hiányoznak a Rep és Cap kódoló régiók, melyek a kívánt nukleinsavval vannak helyettesítve.

A retrovíruseredetű rekombináns vektorokban a gag, pol és env gének általában deletáltak, részben vagy egészben, és azokat egy kívánt heterológ nukleinsavszekvencia helyettesíti. Másrészt a rekombináns retrovírusok tartalmazhatnak módosításokat az LTR-ek területén a transzkripció aktivitás megszüntetésére, valamint meghosszabbított részecskéképződésért felelős szekvenciákat, melyek a gag gén egy részét is tartalmazzák [Bender et al., *J. Virol.* 61, 1639 (1987)].

Replikációdefektív tulajdonságukat figyelembe véve a különböző rekombináns vírusok termelése magában foglalja a genomból deletált funkciók transzkomplementálását. A transzkomplementáció pontosan a fő nehézségek kiindulópontja az ilyen vírusok termelése esetében, többek között a transzkomplementáló funkciók biztosítása.

Ebben a tekintetben két megközelítést fejlesztettek ki. Az első transzkomplementáló sejtvonalak kialakításán alapul, melyeket részecskéképző sejtvonalaknak neveznek. A második helper adenovírusok vagy helper plazmidok alkalmazásán alapul.

Különböző részecskéképződésért felelős sejtvonalakat alakítottak ki hiányos vírusok számára. Ezek a sejtvonalak képesek a virális vektorból hiányzó funkciókat biztosítani. Általában az ilyen sejtvonalak genomjukba integrált módon tartalmazzák a virális genomból deletált területet vagy területeket (E1, E2 és/vagy E4 például adenovírus esetében, gag, pol

és/vagy env retrovírus esetében, rep és/vagy cap AAV esetében).

Az egyik hiányos adenovírusok termelésére ismert sejtvonal például a 293 sejtvonal, amelyben az adenovírus genomjának egy része van beépítve. Pontosabban a 293 sejtvonal humán embrionális vesesejtvonal, amely az 5 szerotípusú adenovírus (Ad5) genomjának bal szélét (körülbelül 11-12%) tartalmazza, amely rész magában foglalja a bal ITR-t, a részecskéképződésért felelős területet, az E1a és E1b régiókat tartalmazó E1 területet, a pIX fehérjét kódoló területet és a pIVa2 fehérjét kódoló terület egy részét. Ez a sejtvonal képes transzkomplementálni az E1 régiójában hiányos rekombináns adenovírusokat, azaz amelyekből az E1 régió vagy annak egy része hiányzik, és képes magas titerű vírusszuszpenziókat termelni. A sejtvonal képes permisszív hőmérsékleten (32 °C) többek között a hőmérséklet-érzékeny E2 mutációt hordozó vírusszuszpenziókat termelni. Más, az E1 régiót komplementálni képes sejtvonalakat is leírtak, melyek többek között az A549 humán tüdőkarcinóma-sejteken [WO 94/28152] vagy humán retinoblasztómasejteken alapulnak [Hum. Gen. Ther., 215 (1996)]. Másrészt az adenovírus több funkcióját transzkomplementálni képes sejtvonalakat is leírtak. Részletesen az E1 és E4 régiókat [Yeh et al., *J. Virol.* 70, 559 (1996); *Cancer Gen. Ther.* 2, 322 (1995); Krougliak et al., *Hum. Gen. Ther.* 6, 1575 (1995)], és az E1 és E2 régiókat [WO 94/28152, WO 95/02697, WO 95/27071] komplementáló sejtvonalakat említhetjük meg.

Különböző sejtvonalakat írtak le hiányos retrovírusok termelésére is, amelyek általában a gag, pol és env gének kifejezésére képesek. Ilyen sejtvonalak például a PA317 sejtvonal [US 4,861,719], a PsiCRIP sejtvonal [WO 90/02806], a GP+envAm-12 sejtvonal [WO 89/07150], a BOSC sejtvonal [WO 94/19478] stb. Egy kívánt nukleinsavat tartalmazó rekombináns retrovírusok előállításához egy olyan plazmidot hozunk létre, amely többek között az LTR-eket, a részecskéképződésért felelős szekvenciákat és az említett nukleinsavat tartalmazza, majd ezt alkalmazzuk egy, a fentebb leírt részecskéképző sejtvonal transzfektálására, amely képes transz-helyzetben biztosítani a plazmidból hiányzó retrovirális funkciókat. A termelt rekombináns retrovírusokat azután a klasszikus módszereket alkalmazva tisztítjuk.

Sejtvonalak alkalmazása azonban bizonyos hátrányokkal járhat. Így nehéz, drága, és ipari méretekben nehézségekbe ütközik ilyen sejtvonalak kialakítása és értékelése. A sejtvonalaknak ugyanis stabilnak és ipari méretekben alkalmazhatónak kell lenniük. Ezenfelül a leírt sejtvonalak nehezen teszik lehetővé, hogy a fertőző vírusrészecskék (RCA) termelődését elkerüljük. Másrészt a sejtvonalak nem teszik lehetővé napjainkban, hogy az ipari felhasználás szempontjából kielégítő módon transzkomplementáljuk a nagymértékben hiányos vírusok genomját, amilyenek például a minimális adenovírusok, amelyekről korábban beszéltünk. Az adenovírus ugyanis különböző transzkripció egységekre szervezett genommal rendelkezik, melynek tér-

beli és időbeli szabályozása nagyon összetett. Egy összes virális kódolóterületétől megosztott adenovírus transzkomplementálása olyan módon, hogy az minden transzkripciót egységet elkülönülten fejezzen ki, konstitutív vagy feltételes módon egy sejtvonalból kiindulva nem valósítható meg kielégítő módon napjainkig. Így sejtvonalakból kiindulva csak a genomnak egy kis része, amely az E1, E4, pIX régióknak és az E2 által kódolt három fehérjének (pol, DBP és p-TP) felel meg, fejeződött ki konstitutív módon. A genom fennmaradó része egy lényeges késői transzkripciót egységnek (MLTU) felel meg, amely egy 28 kb elsődleges transzkriptumból kiindulva szerkezeti és nem szerkezeti fehérjék összes messzendezőjét termeli, és a genom replikációja után aktiválódik. Minimális adenovírusok kialakításához ezen területek transzkomplementálása elengedhetetlen. A sejtvonalak nem teszik lehetővé azt sem, hogy magas titerrel kapjunk rekombináns retrovírusokat.

A másik megközelítés szerint a hiányos vírusgenommal együtt kotranszfectálnak egy olyan szerkezetet (plazmidot vagy adenovírust), amely a komplementáló funkciókat hordozza. Részletesen hiányos rekombináns AAV-ket általában úgy állítanak elő, hogy egy humán helpervírussal (például adenovírus) fertőzött sejtvonalba kotranszfectálnak egy plazmidot, mely a kívánt nukleinsavszekvenciát tartalmazza az AAV két inverz ismétlődő területe (ITR) között, és egy másik plazmiddal, amely az AAV-t komplementáló funkciókat (rep és cap gének) hordozza. Ennek változatait írták le a WO 95/14771; WO 95/13365; WO 95/13392; és a WO 95/06743 számon közzétett bejelentésekben. Egy helper adenovírus alkalmazásának fő hátránya az, hogy megnövekedik az adenovírusvektor és a helper adenovírus közötti rekombináció veszélye, és hogy nehéz elválasztani a helper rekombinánsait a vírusszárzók termelése és tisztítása során. Helper plazmid, például egy Rep/cap plazmid alkalmazásának hátránya az, hogy a kapott transzfectációs szint nem teszi lehetővé, hogy magas titerrel termeljék a vírusokat.

A találmány új vírustermelő rendszereket ismerteti, melyek lehetővé teszik e hátrányok kiküszöbölését. A találmány szerinti rendszer azon alapul, hogy a komplementáló funkciók biztosításához egy bakulovírust alkalmazunk.

A találmány szerinti termelőrendszer különösen előnyös módon lehetővé teszi, hogy a beállt komplementáló sejtvonalak alkalmazásától függetlenül magunkat, elkerüljük az RCA-k (fertőző vírusrészecskék) problémáját, és nagymértékben hiányos genomokat transzkomplementálunk. Másrészt a találmány szerinti rendszer bármely, a kívánt vírussal és egy bakulovírussal fertőzhető sejt esetében alkalmazható, és így nagy alkalmazási rugalmassággal rendelkezik.

A találmány egyik tárgya tehát eljárás hiányos rekombináns vírusok termelésére, amely szerint egy kompetens sejtpopuláció sejtjeibe bevezetjük a hiányos rekombináns vírus genomját és egy bakulovírust, amely a hiányos rekombináns genom transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét vagy

azok egy részét hordozza, a funkciók másik részét egy vagy több bakulovírus és/vagy a kompetens sejt szolgáltatja.

A találmány szerinti eljárás tehát a komplementáló funkciók biztosítására egy bakulovírust alkalmaz. Különböző megközelítések lehetségesek. Először is, alkalmazhatunk olyan kompetens sejteket, melyek nem fejeznek ki a hiányos rekombináns genomot transzkomplementáló funkciókat. Ebben az esetben vagy egy olyan bakulovírust alkalmazunk, amely a hiányos rekombináns genom transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét hordozza, vagy több bakulovírust, melyek mindegyike hordoz a hiányos rekombináns genom transzkomplementálásához szükséges egy vagy több funkciókat. Az is lehetséges, hogy olyan kompetens sejtpopulációt alkalmazunk, amely képes egy vagy több, a rekombináns genomból hiányzó funkció transzkomplementálására (részecskeképző sejtvonal). Ebben az esetben az alkalmazott bakulovírus vagy bakulovírusok kizárólag azokat a hiányos rekombináns genom transzkomplementálásához szükséges funkciókat hordozzák, amelyeket a kompetens sejtek nem transzkomplementálnak.

Amint a korábbiakban jeleztük, a találmány szerinti rendszer számos előnnyel rendelkezik az ipari alkalmazhatóság tekintetében (nincs szükség sejtvonalakra, nincs RCA stb.) és az alkalmazhatóság tekintetében (bármely típusú deléciót hordozó rekombináns vírusok, többek között nagymértékben hiányos adenovírusok termelése). Ezenkívül abban az esetben, amennyiben a bakulovírus nem replikálódik humán sejtekben, a kapott vírusrészecskéket nem szennyezi a bakulovírus. Ezenfelül mivel a bakulovírus filogenetikailag nagyon távol áll az adenovírusoktól, nem áll fenn a kettő közötti rekombináció vagy transzkomplementáció veszélye sem. A rendszer tehát lehetővé teszi, hogy előnyös módon hiányos vírusok koncentrált szárait termeljék, melyekben nincs RCA. A rendszer különösen előnyös hiányos rekombináns adenovírusok termelése esetén.

A bakulovírusok lipidburokkal rendelkező kettős szálú cirkuláris DNS-vírusok, melyek gerinctelenekre specifikusak. Prototípusuk, az AcNPV genomja 133 kb. Ezt a vírust gyakran használják eukarióta gének kifejezésére rovarsejtekben, két erős promoterből (polihedrin, Ph és P10) [King et Possee, The baculovirus expression system. London, Chapman & Hall (1992)]. Az AcNPV képes egyes emlőssejteket fertőzni, de a genom nem íródik át, és nem is transzlatálódik. A közel múltban Hofmann és munkatársai [PNAS 92, 10 099 (1995)] kimutatták, hogy in vitro hepatocita sejtek transzdukálhatók tisztított, a LacZ gént kifejező rekombináns bakulovírussal. Nem mutattak ki sejtsejt toxicitást, még 1000-szeres fertőzési multiplicitással sem, és a cikkben leírt transzfectációs hatások 100 MOI esetében körülbelül 50%.

A bejelentésben kimutatjuk, hogy különböző sejttípusok fertőzhetők rekombináns bakulovírussal. Részletesen a bejelentésben kimutatjuk, hogy rekombináns bakulovírussal lehetséges humán eredetű sejteket fer-

tőzni, amilyenek az immortalizált embrionális sejtek. A bejelentésben azt is kimutatjuk, hogy igen magas transzdukciós hatásfokot érhetünk el (>80%). A bejelentésben kimutatjuk azt is, hogy bevezethetünk egy bakulovírusba egy adenovírust transzkomplementáló funkciókat, és ezeket egy kompetens sejtpopulációban ki is fejezhetjük. A bejelentés így lehetővé teszi, hogy kimutassuk, hogy a bakulovírus olyan inert vektor, amely előnyösen alkalmazható vírusokat komplementáló funkciók átvitelére és kifejezésére emlős-, többek között humán sejtekben. A találmány szerinti rendszer más előnyei többek között (i) a nagy klónozási kapacitás, amely lehetővé teszi, hogy egy teljes adenovírusgenomot komplementáljunk, és (ii) a bakulovírust alkalmazó módszerek előrehaladott fejlettsége.

A vírust komplementáló funkciókat hordozó bakulovírust a következőkben helper bakulovírusnak is nevezzük. Ez különböző vírust komplementáló funkciókat hordozhat.

Így a helper bakulovírus hordozhatja az adenovírus E1 régióját. Egy bakulo-E1-et első generációs adenovírusok, azaz E1 régiójában hiányos adenovírusok (Ad Δ E1) termelésére használhatunk, bármilyen is azok E3 régiója (azaz Ad Δ E1, Δ E3 hiányos vagy nem). Az első generációs hiányos rekombináns adenovírusok (E1 és adott esetben E3 régiójukban hiányos adenovírusok) termelése a találmány szerinti eljárás egyik különösen előnyös alkalmazását képezi. Amint a korábbiakban leírtuk, különböző sejtvonalakat ismertet a szakirodalom, amelyek képesek az E1 régiót transzkomplementálni (293 sejtek, A549 sejtek, 911 sejtek stb.). A sejtvonal genomjába beépített transzkomplementáló funkciókat hordozó terület és a termeltetni kívánt rekombináns vírus DNS-e között azonban léteznek homológ területek. Ezért a termelés során különböző rekombinációs események fordulhatnak elő, amelyek replikatív vírusrészecskéket, többek között E1+ típusú adenovírusokat hoznak létre. Szó lehet egy egyszerű rekombinációról is, amit a kromoszóma törése követ, vagy kettős rekombinációról. Ez a két utóbbi típusú módosulás odavezet, hogy a sejtgénomban található E1 régió visszaépül eredeti helyére az adenovírusgenomban. Másrészt figyelembe véve, hogy a 293 sejtvonal magas titerrel termel rekombináns vektorokat (nagyobb, mint 10^{12}), megnő annak a valószínűsége, hogy ez a rekombinációs esemény bekövetkezik. Valóban, megállapították, hogy számos első generációs hiányos rekombináns adenovírusvektor-sarzs fertőzött volt replikatív vírusrészecskékkal, ami jelentős hátrány lehet gyógyászati felhasználásuk szempontjából. Ilyen részecskék jelenléte ugyanis terápiás készítményekben in vivo vírusszaporodáshoz és szabályozatlan szétterjedéshez vezetne, gyulladásos reakciók, rekombináció stb. veszélyével. A szennyezett sarzsokat tehát nem lehet humánterápiában felhasználni.

A találmány lehetővé teszi, hogy ezt a hátrányt kiküszöböljük. A találmány egy megvalósítási módja szerint ugyanis az E1, és adott esetben E3 régiójában hiányos rekombináns adenovírus genomját kompetens sejtekbe vezetjük be, és ezeket a sejteket egyidejűleg

vagy nem egyidejűleg az E1 régiót tartalmazó bakulovírral is fertőzzük, ahol a bakulovírusban jelen lévő adenovirális E1 régió és a hiányos rekombináns adenovírus nem tartalmaz olyan homológ területet (átfedést), ahol rekombináció történhetne. Így tehát ebben a megvalósítási módban gyorsan, beállt sejtvonalak nélkül termeltethetünk RCA-mentes első generációs rekombináns adenovírussarzsokat. Másrészt, amint a korábbiakban leírtuk, kompetens sejteknek egy bakulovírral és az így kialakított RCA-mentes rekombináns adenovírussarzsokkal történő együttes fertőzése révén ez utóbbiakat egy újabb termelési folyamat kiindulásként is alkalmazhatjuk.

A helper bakulovírus hordozhatja az adenovírus E2 régióját vagy annak egy részét, többek között az E2a és/vagy E2b területeket is. Egy bakulo-E2-t alkalmazhatunk kompetens sejtekben E2 (Ad Δ E2), és adott esetben E3 régiójában (Ad Δ E2, Δ E3) hiányos adenovírusok termeltetésére. Másrészt az adenovírus E1 régióját komplementálni képes kompetens sejtekben a bakulo-E2 lehetővé teszi E1 és E2 (Ad Δ E1, Δ E2), és adott esetben E3 régiójában (Ad Δ E1, Δ E2, Δ E3) hiányos rekombináns adenovírusok termeltetését. Ezenfelül az adenovírus E1 és E4 területeit komplementálni képes kompetens sejtekben (például az IGPR2 sejtekben) a bakulo-E2 lehetővé teszi, hogy E1, E2 és E4 (Ad Δ E1, Δ E2, Δ E4), és adott esetben E3 (Ad Δ E1, Δ E2, Δ E3, Δ E4) területeiben hiányos rekombináns adenovírusokat termeljünk.

A helper bakulovírus hordozhatja az adenovírus E4 régióját is (egészében vagy részben). Egy bakulo-E4-et kompetens sejtekben E4 (Ad Δ E4), és adott esetben E3 (Ad Δ E4, Δ E3) régiójában hiányos adenovírusok termelésére alkalmazhatunk. Ezenkívül az adenovírus E1 régióját komplementálni képes kompetens sejtekben a bakulo-E4 lehetővé teszi, hogy E1 és E4 (Ad Δ E1, Δ E4), és adott esetben E3 (Ad Δ E1, Δ E4, Δ E3) régiójában hiányos rekombináns adenovírusokat termeljünk.

A helper bakulovírus hordozhatja az adenovírus E1 és E4 területeit is (egészében vagy részben). Egy bakulo-E1,E4-et kompetens sejtekben E1 és E4 (Ad Δ E1, Δ E4), és adott esetben E3 (Ad Δ E1, Δ E4, Δ E3) régióban hiányos adenovírusok termelésére alkalmazhatunk, amint azt az 1. ábrán bemutatjuk.

Ezenkívül E1 és E4 régiókban hiányos vírusok kialakítására alkalmazhatunk két helper bakulovírust is, melyek közül az egyik az E1 funkciót, a másik az E4 funkciót fejezi ki részben vagy egészében.

Ugyanígy módon a helper bakulovírus hordozhatja az E1, E2 és E4 régiókat is (egészében vagy részben), és adott esetben a késői géneket (L1–L5) tartalmazó területeket is.

A helper bakulovírus hordozhatja az AAV Rep és/vagy Cap területeit is. Egy bakulo Rep/Cap lehetővé teszi, hogy kompetens sejtvonalban komplementáljunk egy olyan AAV genomot, amelyből minden virális kódoló régió hiányzik (5. ábra).

A bakulovírus hordozhatja egy retrovírus gag, pol és/vagy env régióit is. Egy bakulo gag/pol/env lehetővé teszi, hogy egy kompetens sejtvonalban komplemen-

táljunk egy minden virális kódoló régiótól mentes retrovírusgenomot. Alkalmazhatunk egy, a gag/pol régiókat hordozó, és egy második, az env régiót hordozó bakulovírust is.

Általános módon előnyös, ha a hiányos rekombináns vírusgenom és a bakulovírusban jelen lévő komplementálóterületek nem tartalmazzak átfedéseket. Ez lehetővé teszi, hogy a rekombináció és az RCA-k kialakulásának veszélyét elkerüljük. Ez különösen jelentős első generációs adenovírusok (AdΔE1) kialakítása esetében. Ebben az esetben a bakulovírusba bevezetett E1 régiót úgy határozzuk meg, hogy ne legyen a rekombináns genommal közös szekvenciája. Ehhez például a rekombináns genomból deletálhatunk egy, a bakulovírusba beépített komplementálórégiónál nagyobb területet, amint a példákban bemutatjuk. Ez AdΔE1, ΔE4 adenovírusok kialakítása esetében is előnyös.

Így a találmány egy megvalósítási módjában a hiányos rekombináns vírusgenomot egy kompetens sejtbe vezetjük be, a sejteket egyidejűleg vagy elkülönítetten egy bakulovírral fertőzzük, amely a hiányos genom komplementálásához szükséges funkciókat vagy azok egy részét hordozza, ahol a bakulovírusban jelen lévő komplementáló funkciók és a hiányos rekombináns vírusgenom nem tartalmaz olyan homológ területeket, ahol rekombináció történhetne. Előnyösen a vírusgenom egy E1 régiójában hiányos rekombináns adenovírus genomja, és a bakulovírus egy olyan adenovirális területet hordoz, amely képes transzkomplementálni az E1 régiót. Egy másik változat szerint a vírusgenom egy E1 és E4 régióban hiányos rekombináns adenovírus genomja, és a bakulovírus két olyan adenovirális területet hordoz, amelyek képesek az említett régiókat transzkomplementálni, vagy két olyan bakulovírust alkalmazunk, amelyek közül az egyik az E1 régiót transzkomplementálni képes adenovirális területet hordoz, a másik az E4 régiót transzkomplementálni képes adenovirális területet hordoz, a hiányos adenovírus genomjával homológ területek nélkül.

Egy különleges megvalósítási módban az adenovírus kódoló régióinak összességét egy vagy több helper bakulovírus hordozza. Egy különleges megvalósítási módban csak egy helper bakulovírust alkalmazunk, amely az adenovírus kódolóterületeinek összességét hordozza. Ilyen helper bakulovírust alkalmazhatunk például minimális rekombináns adenovírusok transzkomplementálására. Egy ilyen bakulovírus hordozhatja többek között az adenovirális genom összességét, a részecskeképző terület, és adott esetben az ITR-ek kivételével, amint a példákban bemutatjuk.

A komplementáló funkciók kialakítása

A helper bakulovírusba beépített komplementáló funkciók különböző szerotípusú vírusokból származhatnak.

Adenovírusokról szólva különböző szerotípusok léteznek, melyek szerkezete és tulajdonságai kissé eltérőek, de genetikai szerveződésük összehasonlítható. Részletesebben a találmány szerinti bakulovírusok ki-

alakításához alkalmazott komplementáló funkciók egy humán vagy állati adenovírusból származnak.

Ami a humán eredetű adenovírusokat illeti, előnyösen a C csoportba tartozókat említhetjük meg. Még előnyösebben a különböző szerotípusú humán adenovírusok közül a találmány keretein belül előnyben részesítjük a 2 vagy 5 típusú adenovírusok (Ad2 vagy Ad5) alkalmazását. A 7 vagy a 12 típusú adenovírusokból származó területeket is alkalmazhatjuk, amelyek az A és a B csoportokba tartoznak. A különböző állati eredetű adenovírusok közül a találmány keretein belül előnyben részesítjük a kutyaadenovírusokat, többek között a CAV-2 adenovírus bármely törzsét (például manhattan vagy A26/61 törzs, ATCC VR-800). Más állati eredetű adenovírusokat említenek többek között a WO 94/26914 számon közzétett bejelentésben, melyet referenciaként építünk be.

A találmány egy előnyös megvalósítási módjában a komplementáló funkció egy C csoportba tartozó humán adenovírus genomjából származik. Még előnyösebben az Ad2 vagy az Ad5 adenovírus genomjából származik.

A különböző komplementáló funkciókat hordozó területeket egy adenovírusgenomból a szakember számára ismert módszerek szerint enzimátikus hasítással kaphatjuk meg. Ezeket a területeket adott esetben módosíthatjuk is méretük csökkentésére vagy bizonyos szabályozóelemek (promoter, enhancer stb.) heterológ elemekkel történő helyettesítésére. Általános módon ezeket a területeket a következők szerint állítjuk elő. Egy adenovírus DNS-ét cézium-klorid-centrifugálással tisztítjuk, vagy in vitro egy prokarióta [WO 96/25506] vagy eukarióta [WO 95/03400] plazmidből kapjuk meg. Ezután a DNS-t a megfelelő restrikciós enzimekkel hasítjuk, és a kapott fragmentumokat, melyek a kívánt komplementáló funkciókat hordozzák, azonosítjuk és szelektáljuk. Az alkalmazott restrikciós enzimek megválasztása függ a kívánt komplementáló funkcióktól, és meghatározásukban segítségünkre vannak az adenovírusgenomok publikált szekvenciái és restrikciós térképei. Így az E1 régiót izolálhatjuk egy olyan fragmentum formájában, amely az E1A promoter alatt mindkét E1A és E1B leolvasási keretet hordozza. Az E4 régiót izolálhatjuk egy olyan fragmentum formájában, amely a leolvasási keretek összességét hordozza, vagy olyan fragmentum formájában, amely csak egy részüket hordozza, előnyösen az ORF3 vagy ORF6 vagy ORF6-ORF6/7 kereteket.

Hasonló eljárásokat dolgoztunk ki az AAV és a rekombináns retrovírusok komplementálóterületeinek előállítására is. Így az AAV rep és/vagy cap területeit különböző szerotípusú AAV-kból izolált virális DNS-ből kiindulva enzimátikus hasítással kaphatjuk meg. Előnyösen az AAV-2-ből indulunk ki. Retrovírusok esetében a gag, pol és/vagy env területeket szintén a molekuláris biológia klasszikus módszereivel kaphatjuk meg, különböző szerotípusú retrovírusokból kiindulva, amilyenek többek között a MoMuLV („Murin Moloney Leukemia Virus”, amelyet MoMLV-nek is jelölnek), az MSV („Murin Moloney Sarcoma Virus”), a HaSV („Har-

vey Sarcoma Virus”), az SNV („Spleen Necrosis Virus”), az RSV („Rous Sarcoma Virus”) vagy a Friend-vírus.

A helper bakulovírus kialakítása

A komplementálóterületeket hordozó fragmentumokat azután egy plazmidvektorba szubklónozzuk, ami lehetővé teszi kezelésüket (finomabb emésztések, szabályozószekvenciák hozzáadása stb.), például egy prokarióta vagy eukarióta szervezetben. A kapott végső fragmentumot, amely a komplementáló funkciót vagy funkciókat hordozza, ezután a helper bakulovírusba vezetjük be, a molekuláris biológia klasszikus módszereit alkalmazva. Pontosabban a fragmentumot két, a bakulovírus genomjának egy területével homológ szekvencia közé klónozzuk, majd a kapott fragmentumot vagy plazmidot a bakulovírus genomjával kotranszfektáljuk rovarsejtekbe [klasszikusan Sf9 és Sf21, amelyek *Spodoptera frugiperda* sejtek, de lehetnek Tn368 és High-Five™ BTI-TN-5B1-4 (Gibco), *Trichoplusia* sejtek, vagy bármely más bakulovírusokra permisszív és azok termelésére alkalmas rovarsejt]. A plazmid vagy fragmentum és a bakulovírusgenom közötti homológ rekombináció alakítja ki a kívánt rekombináns bakulovírust, amelyet a klasszikus módszerek szerint gyűjthetünk össze és tisztíthatunk [lásd többek között King et Possee: *The baculovirus expression system*. London, Chapman & Hall (1992)]. Rekombináns bakulovírusok kialakítására különböző ingázó vektorokat tartalmazó kitek vannak forgalomban és alkalmazhatók, a gyártók előírásait követve. Többek között alkalmazhatjuk a Clontech által forgalmazott pBAC ingázó vektorokat, a pAc vektorokat [Verne et al., *Bio/Technology* 6, 47 (1988), Phamingen, USA], a pBLue-Bac vektorokat (Invitrogen) vagy a pBSV vektorokat (Boehringer). A komplementáló funkciókat így a bakulovírus különböző helyeire építhetjük be, többek között a poli(hedringén vagy a p10 gén lokuszába. Másrészt különböző bakulovírustörzseket alkalmazhatunk, amilyenek többek között az AcNPV vagy *Bombyx mori* [Maeda et al., *Nature* 315, 592 (1988)]. Másrészt az alkalmazott bakulovírust módosíthatjuk is tropizmus javítására/megváltoztatására. Virális vektorok tropizmusát ugyanis modulálhatjuk azáltal, hogy felületi fehérjéiket megváltoztatjuk abból a célból, hogy (i) csökkentsük a tropizmust a virális fehérjét egy specifikus ligandumhoz (immunglobulin könnyű lánc, Gastrin Releasing-Peptid) fuzionáltatva, vagy (ii) megnöveljük azt, egy heterológ virális glikoproteinnel képzett pseudotípusokat kialakítva [a vezikulás szárgyulladás, stomatitis vesicularis vírusának (VSV) G-jé] [Liu et al., *J. Virol.* 70(4), 2497 (1996); Michael et al., *Gene Ther.* 2, 660 (1995)]. A közelmúltban kimutatták, hogy a bakulovírus felületi glikoproteinje (gp64) a VIH-vírus gp120 fehérjéjével fuzionáltatva képes volt a CD4 receptoron kötődni [Boublik et al., *Bio/Technology* 13, 1079 (1995)]. A gp64 ilyen módosítása nem érinti a bakulovírus életképességét rovarsejteken. Egy analóg szerkezet a VSV G-jével lehetővé tehetné a bakulovírus tropizmusának javítását emlőssejtek irányában, és így megnö-

velhetné Huh7 sejtek, valamint más sejtvonalak transzdukciójának hatékonyságát.

A helper bakulovírusban a komplementáló funkciók előnyösen egy heterológ (azaz a bakulovírustól eltérő eredetű) promoter irányítása alá vannak helyezve, amely a kompetens sejtekben működőképes. Ugyanis úgy tűnik, hogy a bakulovíruspromoterek nem teszik lehetővé, hogy a komplementáló funkciók megfelelő mértékű expresszióját érjük el rovarsejtektől eltérő sejtekben, és így nem a legmegfelelőbbek a találmány szerinti alkalmazások esetében. A promoter (homológ promoter) lehet a vírust komplementáló funkciók saját promotere (E1A, E4, E2, MLP promoterek adenovírus esetében, P5 vagy P19 promoterek AAV esetében, az RSV LTR-ének promotere stb.). De szó lehet bármely, az alkalmazott kompetens sejtben működőképes eltérő eredetű promoterről is. Ehhez például az ebben a sejtben kifejeződő gének promotereit, vagy az ismert általános promotereket, például a PGK gén promoterét, a CMV közvetlen korai promoterét, a herpeszvírus TK-génjének promoterét vagy az RSV LTR promoterét említhetjük meg. Szó lehet szabályozható promoterekről is, amilyenek például az MMTV-vírus promotere, egy hormonokra reagáló promoter, például egy GRE5 típusú, vagy egy tetraciklinel szabályozható promoter. Előnyösen egy homológ, egy erős általános vagy egy indukálható promoterről van szó.

Így a találmány másik tárgya egy rekombináns bakulovírus, amely genomjába beépített módon tartalmaz egy vírust komplementáló funkciót kódoló nukleinsavat egy heterológ promoter irányítása alatt. Részletesebben a komplementáló funkció egy olyan fehérje, amely az említett vírus termelődéséhez szükséges, és amelynek kódoló régiója inaktív (mutáns, deletált stb.) a hiányos vírus genomjában. Adenovírusok esetében a komplementáló funkciót az adenovírus E1, E2, E4, L1-L5, pIX és IVa2 területei által kódolt funkciók mindegyike vagy egy része közül választjuk, egymagában vagy kombinációban. AAV esetében a Rep és/vagy Cap, retrovírusok esetében a gag, pol és/vagy env régiók által kódolt funkciókról van szó. A nukleinsav előnyösen a virális genom egy olyan területének felel meg, amely tartalmazza a választott komplementáló funkciót kódoló területet. Részletesen egy Ad2 vagy Ad5 szerotípusú adenovírus, MoMLV vagy AAV-2 genomjának egy fragmentumáról van szó. Különösen előnyösen a nukleinsav tartalmazza a választott komplementáló funkciók expressziójáért természetes módon felelős promoterterületet is.

Példaképpen a találmány tárgyát képezi egy bakulovírus, amely egy adenovírus E1 régióját vagy annak egy részét tartalmazza. Részletesebben egy olyan bakulovíusról van szó, amely az E1a, az E1b, vagy az E1a és E1b területeket tartalmazza. Az adenovírus E1 területe az Ad5 104. nukleotidjától (E1a promoter) a 4070. nukleotidjáig (E1b poliA) tart. Részletesen az E1a promoter TATA boksza a 470. nukleotid területén helyezkedik el, az E1a ATG kodonja az 560. nukleotid területén, az E1b stopkodonja a 3511. nukleotid területén. Példaképpen említhetjük azt a bakulovírust, amely

a 391–3511. fragmentumot tartalmazza. Ez a helper bakulovírus különösen alkalmas olyan E1 régiójában hiányos rekombináns adenovírusok termelésére, amelyek a 391–3511. fragmentumnál nagyobb deléciót hordoznak. Többek között alkalmas első generációs adenovírusok termelésére, RCA nélkül, amelyek E1 régiójukban a 383–3512. nukleotidokat magában foglaló deléciót hordoznak.

Egy másik példa a találmány szerinti bakulovírusra egy olyan bakulovírus, amely például az adenovírus E1 és E4 területeit vagy azok egy részét tartalmazza. Az adenovírus E4 területe 7 nyílt leolvasási keretből áll, melyeket ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF3/4, ORF6 és ORF6/7 jelölnek. A különböző ORF-ek által kódolt fehérjék közül az ORF3 és az ORF6 által termelt tesztek lehetővé a vírus „replikációját”, és így egy E4 régiójában hiányos adenovírus transzkomplementálását, még akkor is, ha az egész E4 régió hiányzik. Ezért a találmány szerinti helper bakulovírus előnyösen az egész E4 régiót tartalmazza, vagy annak csak egy részét, amely legalább az ORF3-at vagy az ORF6-ot tartalmazza. Az E4 régió különböző részeit enzimatis hasításokkal vagy módosításokkal kaphatjuk meg a szakember számára ismert módszerek szerint. Részletesen az ORF6 leolvasási keretet az E4 régióból egy BgIII-PvuII fragmentum formájában izolálhatjuk, ami a 34 115–33 126. nukleotidoknak felel meg, és az ORF6–ORF6/7 leolvasási kereteket az E4 régióból egy BgIII-BgIII fragmentum formájában izolálhatjuk, amely az Ad5 34 115–32 490. nukleotidjainak felel meg. A bakulovírus hordozhatja az ORF1–ORF7 leolvasási keretek összességét is (például egy 32 800–35 826. vagy egy 32 811–35 614. vagy egy 32 811–35 640. fragmentum formájában). Természetesen más fragmentumokat is meghatározhatunk az adenovírusgenomok publikált szekvenciái alapján. Egy csökkentett méretű E4 régiót hordozó bakulovírus alkalmazása előnyös, mivel lehetővé teszi olyan hiányos adenovírusgenom transzkomplementálását, amely az E4 régió nagyobb delécióját hordozza, és így nincs homológ területe, és ezáltal lehetővé teszi, hogy a rekombináció lehetőségét is elkerüljük.

Az egyik megvalósítási mód szerint a komplementáló funkciót vagy funkciókat kódoló nukleinsavat a helper bakulovírusba egy expressziós kazetta formájában vezetjük be. Ezt a megvalósítási módot a legegyszerűbb alkalmazni. Különösen a közvetlen korai génekben hiányos rekombináns adenovírusok, és hiányos rekombináns retrovírusok és AAV-k termelésére alkalmas.

Egy másik megvalósítási mód szerint a komplementáló funkciót vagy funkciókat kódoló nukleinsavat a helper bakulovírusba egy kivágható kazetta formájában vezetjük be, amely a kompetens sejtben egy replikatív molekulát hoz létre. A kazetta replikációja a sejtben lehetővé teszi, hogy a komplementáló gének kópiaszámát előnyös módon megnöveljük, és így javítsuk a rendszer termelési szintjét. Ez a megvalósítási mód különösen nagy mértékben, többek között struktúrgénjeiben hiányos rekombináns adenovírusok termelésére alkalmas. Részletesen ez a megvalósítási mód különö-

sen alkalmas minimális adenovírusok termelésére. A szerkezeti fehérjék mennyisége ugyanis korlátozó tényező nagymértékben hiányos (minimális adenovírus típusú) adenovírusok jelentős titerben történő termelése esetében. Ez a megvalósítási mód elsőként teszi lehetővé, hogy jelentősen megnöveljük a transzkomplementáló fehérjék, többek között az adenovírus szerkezeti fehérjék (melyeket az L1–L5 területek kódolnak) intracelluláris szintjét, egészen egy minimális adenovírus transzkomplementálásának mértékéig.

Így a bejelentésben kimutatjuk, hogy szerkeszthetünk olyan rekombináns bakulovírusokat, amelyek egy olyan heterológ területet tartalmaznak, amely képes egy sejtben kivágódni, előnyösen indukálható és szabályozható módon, és így cirkuláris és replikatív (episzomális típusú) molekulát kialakítani.

A kivágást előnyösen egy helyspecifikus rekombinációs mechanizmussal valósítjuk meg, a sejtben belüli replikációt pedig egy sejtosztódási állapottól független replikációs origóval biztosítjuk.

Előnyösebben a találmány szerinti eljárásban alkalmazott helyspecifikus rekombinációt két specifikus szekvencia útján kapjuk meg, melyek képesek egymás között rekombinálódni egy specifikus, általában rekombinánsnak nevezett protein jelenlétében. Ezek a specifikus szekvenciák megfelelő orientációban elrendezve közrefogják a bakulovírusban a komplementáló funkciókat kódoló szekvenciákat. Így a találmány tárgya egy olyan rekombináns bakulovírus is, amely genomjába beépített módon tartalmaz legalább egy DNS-területet, amelyet két helyspecifikus rekombinációt lehetővé tevő, azonos orientációban elhelyezett szekvencia fog közre, ahol az említett DNS-terület legalább egy, a kompetens sejtekben működőképes replikációs origót és egy vírust komplementáló funkciót kódoló nukleinsavat tartalmaz.

A találmány keretein belül alkalmazott rekombinációt lehetővé tevő szekvenciák általában 5–100, előnyösebben kevesebb mint 50 bázispárt tartalmaznak. Különböző szerkezeti osztályokhoz tartozhatnak, többek között a P1 bakteriofág rekombinánsok családjába vagy egy transzpozon rezolváz családba.

Az 1 bakteriofág integrázainak családjába tartozó rekombinánsok közül többek között a lambda fág integrázát [Landy et al., *Science* 197, 1147 (1977)], a P22 és F80 integrázát [Leong et al., *J. Biol. Chem.* 260, 4468 (1985)], a *Haemophilus influenzae* HP1 fág integrázát [Hauser et al., *J. Biol. Chem.* 267, 6859 (1992)], a P1 fág Cre integrázát, a pSAM2 plazmid integrázát [EP 350 341] vagy a *Saccharomyces cerevisiae* 2 µm plazmidjának FLP rekombinánsát említhetjük meg.

A Tn3 transzpozoncsaládba tartozó rekombinánsok közül többek között a Tn3 transzpozon vagy a gd, Tn21 vagy Tn522 transzpozonok [Stark et al. (1992)] rezolvázát, a mu bakteriofág Gin invertázát, vagy plazmidok rezolvázát, például az RP4 par fragmentumát [Abert et al., *Mol. Microbiol.* 12, 131 (1994)] említhetjük meg.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a találmány szerinti rekombináns bakulovírusban a helyspecifikus

rekombinációt lehetővé tevő szekvenciák egy bakteriofágból származnak. Előnyösebben egy bakteriofág attachement szekvenciáiról (attP és attB szekvenciák) van szó, vagy ezek származékairól. Ezek a szekvenciák képesek egymással specifikusan rekombinálódni egy integráznak nevezett rekombinázt jelenlétében. Példaképpen említhetjük többek között a lambda, P22, F80, P1, Haemophilus influenzae HP1 fágok, vagy a pSAM2 vagy 2 µm plazmidok attachement szekvenciáit.

Még előnyösebben a helyspecifikus rekombinációt lehetővé tevő szekvenciákat a P1 fág rekombinációs rendszere képviseli. A P1 fág egy Cre nevű rekombinázzal rendelkezik, amely specifikusan felismer egy 34 bázispáros nukleotidszekvenciát, melyet loxP helynek neveznek [Sternberg et al., J. Mol. Biol. 150, 467 (1981)]. Ez a szekvencia két 13 bp palindrom szekvenciából áll, melyeket egy 8 bp konzervatív szekvencia választ el egymástól. A helyspecifikus rekombinációt előnyösen a LoxP szekvenciákat vagy ezek származékait, és a Cre rekombinázt alkalmazva kapjuk meg.

A származék szekvencia kifejezés magában foglalja a fentebbi rekombinációs szekvenciák módosításával vagy módosításaival kapott szekvenciákat, melyek megőrzik azt a tulajdonságukat, hogy képesek a megfelelő rekombinázt jelenlétében specifikusan rekombinálódni. Így szó lehet a szekvenciák lerövidített, vagy épp ellenkezőleg, más szekvenciák (restrikciós helyek stb.) hozzáadásával meghosszabbított fragmentumairól. Szó lehet mutációval vagy mutációkkal, többek között pontmutációval kapott változatokról is.

A találmány egy különleges megvalósítási módja szerint a helyspecifikus rekombinációt lehetővé tevő szekvenciák a P1 bakteriofág LoxP szekvenciái, a rekombináció pedig a Cre fehérje jelenlétében jön létre. Ebben a tekintetben a rekombináció úgy is létrejöhet, hogy a kompetens sejteket érintkezésbe hozzuk a Cre rekombinázzal, vagy úgy, hogy a Cre rekombinázt kódoló gént a kompetens sejtekben kifejezzük. Előnyösen a Cre rekombinázt a sejtben a megfelelő gén expressziójának indukálásával állítjuk elő. Így a rekombinázt kódoló gént előnyösen egy indukálható promotor irányítása alá helyezzük, vagy szabályozható formában szerkesztjük meg. Ebben a tekintetben előnyösen a Cre és a szteroidhormon- (ösztadiol, progeszteron stb.) kötő domén közötti fúziót alkalmazunk, amely lehetővé teszi, hogy a Cre aktivitását szabályozzuk, és így a rekombinációs eseményt kiváltsuk [Metzger et al., PNAS 92, 6991 (1995)]. Általánosabban a rekombinázt expresszióját szabályozhatjuk bármely erős szabályozott vagy nem szabályozott promotorral. Az expressziós kazettát a kompetens sejtekbe transzfektálhatjuk, vagy a kompetens sejtek genomjába építhetjük be, amint a példákban bemutatjuk.

A rendszer tehát lehetővé teszi, hogy olyan replikatív molekulákat hozzunk létre, amelyek kompetens sejtekben magas szinten termelik a vírust, többek között az adenovírust komplementáló funkciókat. Az ilyen típusú konstrukció különösen nagy mértékben hiányos genomok, különösen a késői génekben hiányos adeno-

virusgenomok komplementálására alkalmas. Így egy találmány szerinti konstrukció egy olyan bakulovírus, amely genomjába beépített módon tartalmaz legalább egy DNS-területet, amelyet két azonos orientációban elhelyezett LoxP szekvencia határol, ahol az említett DNS-terület legalább egy, a kompetens sejtekben működőképes replikációs origót és egy adenovírust komplementáló funkciót kódoló nukleinsavat tartalmaz. Előnyösen a komplementáló funkciók az E1, E2 és E4 régiókban lévő közvetlen korai géneket vagy azok egy részét tartalmazzák. Még előnyösebben a komplementáló funkciók a késleltetett korai géneket és a közvetlen korai géneket tartalmazzák. Előnyösen a komplementáló funkciók lehetővé teszik egy olyan adenovírust komplementálását, amelyből minden virális kódoló funkció hiányzik. Részletesen a komplementáló funkciókat az adenovírusgenom összessége alkotja, az ITR-ek és a részecskeképződésért felelős terület kivételével. Egy változat szerint a komplementáló funkciókat egy teljes adenovírusgenom alkotja, amelyből azonban a részecskeképződésért felelős terület hiányzik (Ad.Psi-). Ez a genom tartalmazza az ITR-eket, melyek kivágódás után a genom replikációjáért felelősek a kompetens sejtekben.

Az episzomális molekula replikációjának biztosítására tartalmaz tehát az alkalmazott kompetens sejtekben működőképes replikációs origót. Ez a replikációs origó előnyösen az adenovírus saját ITR-szekvenciáiból áll, melyek a molekula nagymértékű amplifikációját teszik lehetővé. De szó lehet más replikációs origóról is, amely előnyösen lehetővé teszi a kompetens sejtben a vírusgenom több mint 20-szoros amplifikálását. Példaképpen említhetjük az EBV-vírus Ori/EBNA1 origóját vagy a papillomavírus E2 régióját. Természetesen az adenovírus ITR-szekvenciái előnyösek.

A találmány szerinti eljárás megvalósítására a helper bakulovírust vagy bakulovírusokat általában olyan fertőzőési multiplicitással (MOI) alkalmazzuk, ami lehetővé teszi, hogy sejtek nagy populációját fertőzzük anélkül, hogy szignifikánsan lecsökkenne a sejtek életképessége. Ez általában 10 és 1000 közötti értéket jelent. A MOI a sejtenkénti vírusrészecskék számának felel meg. A MOI-t szakember könnyedén beállíthatja az alkalmazott kompetens sejtek függvényében, alapvetően két kritérium alapján: a fertőzés hatékonysága és az esetleges toxicitás. Előnyösen a bakulovírus esetében alkalmazott MOI 20 és 500 közötti.

A vírusgenom indukálása

Amint a korábbiakban leírtuk, a találmány szerinti eljárás tartalmazza a helper bakulovírus és a rekombináns vírusgenom bevezetését kompetens sejtekbe. Ebben a tekintetben a hiányos rekombináns adenovírusgenomot különböző módokon vezethetjük be a kompetens sejtbe.

Először is szó lehet tisztított hiányos rekombináns adenovírról, amely előnyösen RCA-mentes. Ebben az esetben a kompetens sejteket a hiányos rekombináns adenovírral és a helper bakulovírral fertőzzük. A rekombináns adenovírral történő fertőzés le-

hetővé teszi, hogy a kompetens sejtbe a megfelelő genomot vezessük be, amely azután RCA-mentes, magas titerű vírusszrások termeléséhez amplifikálódik és pakolódik. Ez a megvalósítási mód különösen első generációs vírusok (AdΔE1, AdΔE1, E3) kialakítása esetében előnyös. Ezeket a vírusokat ugyanis nehéz magas titerben termelni RCA-szennyeződés nélkül. A találmány szerinti eljárás szerint egy első generációs hiányos rekombináns adenovírusból kiindulva koncentrált, megnövekedett minőségű szrásokat kaphatunk úgy, hogy egy kompetens sejtet az E1 régiót tartalmazó bakulovírral kotranszfektálunk. Ez a megvalósítási mód genomjuk két vagy három alapvető területében (E1, E2, E4 többek között) hiányos vírusok termelése esetében is előnyös. Általánosan ez a megvalósítási mód előnyös, mivel az adenovírusfertőzés hatékonysága nagyon magas (magasabb a DNS-transzfektáció hatékonyságánál), és így lehetővé teszi koncentrált szrások előállítását. Ebben a megvalósítási módban a rekombináns vírust és a rekombináns bakulovírust olyan fertőzési multiplicitással (MOI) alkalmazzuk, amely lehetővé teszi, hogy nagy sejtpopulációt fertőzzünk anélkül, hogy ez a sejtek életképességét jelentősen lecsökkentené. A bakulovírus esetében alkalmazott MOI azonos a korábban említettel (10 és 1000 közötti). Ami az adenovírust illeti, a MOI előnyösen 1 és 1000, előnyösebben 1 és 500, még előnyösebben 1 és 100 közötti. Az adenovírus esetében alkalmazott MOI a választott sejttypustól függően is változhat. A megfelelő MOI-intervallumot egy szakember könnyen meghatározhatja például egy adenovírust és egy elkülönült markergént hordozó bakulovírust alkalmazva a fertőzési hatékonyság és az esetleges kompetíció mérésére. Előnyösen az adenovírus MOI 50-nél kisebb, például 1 és 20 közötti. Egy másik különösen előnyös megvalósítási mód szerint a hiányos rekombináns adenovírusgenomot DNS formájában vezetjük be. Ebben az esetben a genomot transzfektációval vezetjük be, adott esetben a transzfektációt megkönnyítő szer jelenlétében (lipidek, kalcium-foszfát stb.). Az így bevezetett rekombináns genomot in vitro különböző eljárásokkal állíthatjuk elő, részletesen E. coliban [WO 96/25506] vagy élesztőben [WO 95/03400]. Ez a megvalósítási mód különösen egy hiányos vírus első, RCA-mentes szrásának előállítására alkalmas, melyet azután magas titerű szrások termelésére alkalmazhatunk az előző megvalósítási mód szerint.

A hiányos rekombináns adenovírusgenomot bevezethetjük egy rekombináns bakulovírus alkalmazásával is. Ebben a megvalósítási módban a hiányos rekombináns adenovírusgenomot in vitro állítjuk elő például a korábbiakban ismertetett módon, majd egy bakulovírusba vezetjük be egy, a kompetens sejtben kivágható kazetta formájában. Ebben a megvalósítási módban a kompetens sejteket érintkezésbe hozzuk a hiányos rekombináns adenovírus genomját hordozó bakulovírral és egy vagy több helper (a komplementáló funkciókat hordozó) bakulovírral. Ez a megvalósítási mód nagymértékben hiányos rekombináns adenovírusok termelése esetében különösen előnyös. A rendszernek

köszönhetően ugyanis a kompetens sejtek populációjába nagy mennyiségben vezethetjük be egy időben a nagymértékben hiányos genomot és a megfelelő komplementáló funkciókat.

5 Ebben a tekintetben a találmány szerinti eljárás magában foglalja tehát kompetens sejtek fertőzését a hiányos rekombináns adenovírus genomját hordozó bakulovírral és egy vagy több, a komplementáló funkciókat hordozó helper bakulovírral. A megvalósítási módban alkalmazott MOI szintén 10 és 1000 közötti mindegyik alkalmazott bakulovírus esetében.

10 Minimális adenovírusok előállítására a szakirodalomban két típusú konstrukciót készítettek: (1) a transzgént (β -galaktozidáz) az ITR-ek közé klónozták, és mindezeket egy egyedi restrikciós hely határolta, vagy (2) a bal és jobb ITR-t azonos orientációban a transzgén 5'-végére klónozták [Fisher et al., *Virology* 217, 11 (1996); Kumar-Singh et al., *Hum. Mol. Genet.* 5, 913 (1996)]. A minimális adenovírusokat 293 sejtekben termeltették a linearizált (1) vagy cirkularizált (2) DNS transzfektálásával, a minigenom replikációjához és pakolásához szükséges virális fehérjéket egy helpervírus (AdΔE1) szolgáltatva transz-helyzetben. A minimális adenovírusok úgy viselkedtek, mint interferáló hiányos részecskék (ID), és progresszíven amplifikálódtak az egymást követő passzázsok során. A módszer alkalmazásakor felmerülő fő probléma a kétféle termelődött részecske elválasztása, amely a vírusszrások helpervírral történő szennyeződéséért felelős, és az így kapott minimális adenovírusok nagyon alacsony títere (alacsonyabb 10^8 pfu/ml-nél).

A bejelentés először teszi lehetővé, hogy minimális adenovírusokat termeljünk úgy, hogy egy bakulovírust alkalmazzunk az adenovírus minigenom biztosításához, és egy másik bakulovírust a transzkomplementáló funkciók összességének szolgáltatásához (komplementálógenom).

A rekombináns adenovírusgenomot előnyösen két olyan szekvencia közé építjük be a bakulovírusba, amelyek helyspecifikus rekombinációt tesznek lehetővé a kompetens sejtekben, amint azt a helper bakulovírus esetében leírtuk.

A bejelentésben egy olyan minimális adenovírusokat termelő rendszert ismertetünk, amely egy bakulovírust alkalmaz az adenovírus minigenom biztosításához a loxP/Cre rendszer segítségével, és egy másik bakulovírust a transzkomplementáló funkciók összességének szolgáltatásához (komplementálógenom) szintén egy Cre loxP rendszer segítségével (lásd a 2–4. ábrákat).

Egy másik megvalósítási mód szerint a komplementáló funkciók biztosításához alkalmazott helyspecifikus rekombinációs rendszer eltér a rekombináns adenovírusgenom szállításához alkalmazottól. Részletesen a LoxP/Cre rendszert alkalmazhatjuk a hiányos adenovírusgenom szállítására, és az AttP/AttB rendszert a komplementáló funkció vagy funkciók biztosításához.

A találmány szerinti eljárás így lehetővé teszi, hogy olyan adenovírusvektort hozzunk létre, amelyből minden

virális kódolószekvencia deletált, és csak az ITR-eket és a részecskeképződésért felelős jelet tartalmazza (minimális adenovírus). Ez a vektor elméletileg 37 kb exogén szekvenciát is hordozhat, míg a jelenlegi vektorok klónozási kapacitása nem haladja meg a 8,5 kb-t. Így lehetővé válhat a megcélzott szövetben történő optimális expresszió eléréséhez nagyméretű gének klónozása, amilyen például a disztrotin (14 kb), minden szabályozóelemükkel együtt (promoter, enhancer, intronok stb.). Ezenkívül az immunogén virális szekvenciák hiánya megnövelheti a transzgén expressziójának idejét nyugalomban lévő szövetekben.

A hiányos AAV vagy retrovírus genomját szintén vírus, genom vagy plazmid formájában vezethetjük be, a fentebb leírt módszerek szerint.

Kompetens sejtek

A találmány szerinti eljárást különböző sejtípusok alkalmazásával valósíthatjuk meg. A találmány keretein belül „kompetens sejtet” értünk egy sejtet, amely a bakulovírus és a termelendő vírus fertőzésére nézve permisszív, és lehetővé teszi ez utóbbi esetében a produktív vírusciklust. A sejtek fertőzési kapacitását ezekkel a vírusokkal egy markergént, például az E. coli LacZ gént kifejező rekombináns vírusok alkalmazásával határozhatjuk meg. Előnyösen emlőssejtekről van szó, még előnyösebben humán eredetű sejtekről. Az alkalmazott kompetens sejtek lehetnek nyugalomban lévő sejtek, vagy aktív osztódó sejtek, beállt sejtvonalak vagy primer tenyészetek. Előnyösen az ipari alkalmazás szempontjából megfelelő emlőssejtekről van szó, azaz amelyeknek nincs ismert patogén tulajdonsága, tenyészthetők, és adott esetben tárolhatók a megfelelő körülmények között. Az alkalmazott sejtek előnyösen máj-, izom-, fibroblaszt-, embrionális, idegi, epiteliális (tüdő-) vagy okuláris (retina-) sejtek. Nem korlátozó példaképpen említhetjük a 293 sejteket vagy bármely kiegészítő komplementáló funkciót hordozó származékát (293E4, 293E3a stb.), az A549 sejteket, a HuH7 sejteket, a Hep3B sejteket, a HepG2 sejteket, a humán retinoblasztómasejteket (HER911), a HeLa-sejteket, a 3T3 sejteket vagy a KB-sejteket.

A találmány szerinti eljárás megvalósításához a rekombináns vírus és a bakulovírus genomját a kompetens sejtpopulációba egyidejűleg vagy időben eltolva vezethetjük be. Előnyösen a sejteket egyszerre hozzuk érintkezésbe a rekombináns vírus és a helper bakulovírus genomjával. In vivo replikatív molekulákat termelő rendszer esetében a rekombináns előzőleg, egy időben vagy később adagoljuk vagy fejezzük ki.

A vírusok termelése általában a sejtek líziséhez vezet. A termelt vírusokat tehát a sejtízis után arathatjuk le, az ismert tisztítási eljárások szerint. Ezután különböző módon szerelhetjük ki, a kívánt felhasználástól függően. Másrészt, hogy a vírusszárz az adott esetben nyomokban jelen lévő, a kompetens sejtekbe nem bekerült bakulovírussal (helper bakulovírus vagy a rekombináns vírusgenomot szállító bakulovírus) történő szennyeződésének kockázatát elkerüljük, a következő eljárásokat alkalmazhatjuk:

– Az adenovírusokat tisztíthatjuk kromatográfiásan az FR 96/08164 számú francia iratban leírtak szerint. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy az adenovírust bármely adott esetben jelen levő maradvány bakulovírustól elválasszuk.

– Az is lehetséges, hogy szerves oldószerekkel (például éter, kloroform) kezeljük a tisztított adenovírusszárzot. A bakulovírus ugyanis lipidtartalmú burokkal rendelkező vírus (glikoproteinburok), tehát nagyon érzékeny minden szerves oldószerre (amelyek kivonják a lipideket a burokból), míg ezzel ellentétben, az adenovírusnak nincs lipidtartalmú burka, és ugyanazok az oldószerek nincsenek hatással arra.

– Az is lehetséges, hogy CsCl-gradiensén történő tisztítással sűrűségük alapján választjuk el az adott esetben jelen levő maradvány bakulovírusokat és a rekombináns vírusokat.

A három módszert egymástól függetlenül vagy együtt alkalmazhatjuk. Másrészt bármely más szakember számra ismert módszert is alkalmazhatunk.

A vírusok alkalmazása

Az így termelt vírusokat kívánt gének in vitro, ex vivo vagy in vivo klónozásához, átviteléhez és expressziójához használhatjuk. Ilyen kívánt gének például az enzimeket, vérszármaezőket, hormonokat, limfokineket: interleukinek, interferonok, TNF stb. [FR 9203120], növekedési faktorokat, neurotranszmittereket vagy ezek prekursorait vagy szintézisük enzimeit, trofikus faktorokat: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5 stb., az apolipoproteineket: ApoAI, ApoAIV, ApoE stb. [WO 94/25073], a disztrofint vagy egy minidisztrofint [WO 93/06223] kódoló gének, a tumorszuppresszor-gének: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev stb. [WO 94/24297], a véralvadásban részt vevő faktorokat kódoló gének: VII, VIII, IX stb. faktorok, az öngyilkos gének: timidin-kináz, citozin-dezamináz stb., vagy egy természetes vagy mesterséges immunglobulint vagy annak egy részét (Fab, ScFv stb.) [WO 94/29446] kódoló gének stb. A kívánt gén lehet egy antiszensz gén vagy szekvencia is, melynek a célsejtben a sejt mRNS-sel komplementer RNS-sé történő expressziója gének expressziójának vagy a sejt mRNS transzkripciójának szabályozását teszi lehetővé. Ilyen szekvenciák a célsejtben például a sejt mRNS-sel komplementer RNS-sé íródhatnak át, és így gátolhatják annak fehérjévé történő transzlációját, az EP 140 308 számú szabadalmi iratban leírt eljárás szerint. A kívánt gén lehet egy antigén tulajdonságú peptidet kódoló gén is, amely immunválaszt képes kiváltani, vakcinák kialakítása céljából. Szó lehet többek között az Epstein-Barr-vírusról, a HIV-vírusról, a hepatitis B vírusról (EP 185 573), az Aujeszky-betegség vírusáról vagy tumorokra [EP 259 212] specifikus antigén peptidekről. A gén lehet bármilyen DNS (gDNS, cDNS stb.), amely egy kívánt terméket kódol, beleértve adott esetben a megfelelő expressziós jeleket (promoter, terminátor stb.).

A vírusokat in vitro a rekombináns fehérjék termelésére alkalmazhatjuk. Szintén in vitro alkalmazhatók a fe-

hérjék hatásmechanizmusának, vagy a génexpresszió szabályozásának vagy promoterek aktivitásának vizsgálatára. Szintén alkalmazhatók in vivo állatmodellek vagy transzgén állatok kialakítására. Alkalmazhatók gének in vivo átvitelére is állatokba vagy emberbe, gén- vagy sejterápiás megközelítésekben.

A találmányt a következő példák segítségével ismertetjük részletesebben, amelyek azonban nem korlátozzák a találmány oltalmi körét, csupán illusztrációként szolgálnak.

Az ábrák ismertetése

1. ábra: Harmadik generációs (E1 és E4 funkciókra hiányos) hiányos rekombináns adenovírus bakulo-E1,E4 alkalmazásával történő termelésének vázlata.
- 2-4. ábrák: Minimális adenovírus termelésének vázlata, amely a hiányos adenovírus-genom bevezetéséhez egy első bakulovírust alkalmaz, és egy második bakulovírust a komplementáló funkciók bevezetéséhez.
5. ábra: Rep és Cap funkcióiban hiányos rekombináns AAV bakulo Rep/Cap alkalmazásával történő termelésének vázlata.

Példák

1. példa

Alkalmazott sejtek

A találmány keretein belül alkalmazott sejtek bármely sejtvonalból vagy sejtpopulációból származhatnak, amely adenovírral vagy AAV-val vagy retrovírral és bakulovírral fertőzhető, és terápiás célú felhasználásra alkalmas. Különösen a következőket említhetjük meg:

– 293 sejtvonal:

A 293 sejtvonal humán embrionális vesesejtvonal, amely az 5 szerotípusú adenovírus (Ad5) genomjának bal szélét (körülbelül 11-12%) tartalmazza, amely magában foglalja a bal ITR-eket, a részecskeképződésért felelős szekvenciákat, az E1a és E1b területeket magában foglaló E1 régiót, a pIX proteint kódoló régiót és a pIVa2 proteint kódoló terület egy részét [Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)]. A sejtvonal képes transzkomplementálni az E1 régióban hiányos rekombináns adenovírusokat, azaz amelyekből az E1 régió vagy annak egy része hiányzik, és képes magas titerű vírusszarszok termelésére.

– A549 sejtvonal:

Az A549 sejtekből kialakították az adenovírus E1 területét komplementáló sejteket [Imler et al., Gene Ther., 75 (1996)]. Ezek a sejtek az E1 régió csökkentett, a bal ITR nélküli fragmentumát tartalmazzák egy indukálható promoter irányítása alatt.

– HER-sejtvonal:

A humán embrionális retinasejtek (HER) fertőzhetők adenovírral [Byrd et al., Oncogene 2, 477 (1988)]. Ezekből a sejtekből kialakított adenovírus részecske-

képző sejteket írtak le például a WO 94/28152 számon közzétett bejelentésben, vagy Fallaux és munkatársai cikkében [Hum. Gene Ther., 215 (1996)]. Részletesebben a 911 sejtvonalat említhetjük meg, amely az Ad5 adenovírus genomjának E1 régióját tartalmazza a 79. nukleotidtól az 5789. nukleotidig a HER-sejtek genomjába beépítve. Ez a sejtvonal E1 régiójában hiányos adenovírusok termelését teszi lehetővé.

– IGPR2 sejtek:

Az IGPR2 sejtek a 293 sejtekből az E4 régió egy indukálható promoter irányítása alá helyezett működőképes egységének beépítésével kapott sejtek. Ezek a sejtek E1 és E4 régiójukban hiányos vírusok termelését teszik lehetővé [Yeh et al., J. Virol., 70 (1996)].

– VK-sejtek:

A VK-sejteket 193 sejtekből kapták, a teljes, egy indukálható promoter irányítása alá helyezett E4 régió és a pIX fehérjét kódoló terület beépítésével. A sejtek E1 és E4 régiójukban hiányos vírusok termelését teszik lehetővé [Krougliak et al., Hum. Gene Ther. 6, 1575 (1995)].

– 293E4 sejtek:

A 293E4 sejtek 293 sejtekből kapott sejtek, a teljes E4 régió beépítésével. Ezek a sejtek E1 és E4 régiójukban hiányos vírusok termelését teszik lehetővé [WO 95/02697; Cancer Gene Ther., 322 (1995)].

– Az Sf9 és Sf21 sejtek lepidoptera embrionális sejtek. Ezek, valamint tenyésztési körülményeik a sejtggyűjteményekben hozzáférhetők (ATCC CRL-1711). Kereskedelmi forgalomban is kaphatók (Gibco). Lásd még King és Possee: The baculovirus expression system, London, Chapman et Hall (1992).

– Humán hepatocita sejtek:

A HepG2, Hep3B és HuH7 sejtek humán hepatokarcinómaeredetű sejtvonalak. Sejtvonalgyűjteményekben hozzáférhetők, és tulajdonságaikat például az US 4 393 133 és az US 4 393 133 számú szabadalmakban írják le.

– Humán KB-sejtvonal: Humán epidermális karcinómaeredetű sejtvonal, amely a tenyésztését lehetővé tevő körülményekkel együtt az ATCC-nél hozzáférhető (CCL17 számon).

– Humán HeLa-sejtvonal: Humán epitéliumkarcinóma-eredetű sejtvonal, amely a tenyésztését lehetővé tevő körülményekkel együtt az ATCC-nél hozzáférhető (CCL2 számon).

– W162 sejtvonal: Ezek olyan Vero sejtek, melyek genomjukba beépítve tartalmazzák az Ad2 adenovírus E4 régióját. A sejteket Weinberg és munkatársai írták le [PNAS 80, 5383 (1983)].

2. példa

Humán sejtek fertőzése rekombináns bakulovírral

A példa a bakulovírusok azon tulajdonságát ismerteti, hogy képesek humán eredetű sejteket fertőzni.

Humán sejteket (többek között 293 sejteket vagy azok származékait) a LacZ gént az RSV LTR-e irányítása alatt kifejező rekombináns bakulovírusoldat külön-

bőző hígításaival fertőztünk. 48 órával a fertőzés után a kék sejtek megjelenését kimutattuk, és ez azt mutatja, hogy a sejtek fertőzhetők bakulovírral.

3. példa

Az adenovírus E1 régióját kifejező bakulovírus és a megfelelő hiányos adenovírus kialakítása

3.1. Az E1 két expressziós kazettájának klónozása

Az AE2 plazmid a következőképpen jött létre: a PCRII-be (Invitrogen) klónoztuk a pBRE1-en az 5'-TCCTTGCCATTTGGGTAACAG-3' és

5'-GCGGCCGCTCAATCTGTATCTTC-3'

oligonukleotidokkal végzett PCR termékét. Ez a PCR-termék az Ad5 3198–3511. nukleotidjait tartalmazza, azaz az E1B régió 5'-végét. A pBRE1 plazmid az Ad5 1–5788. nukleotidjait tartalmazza a pBR322-be klónozva, amelyből körülbelül az 1300–2300. nukleotidok deletáltak.

Az AE3 plazmid az AE2 PCR-terméket tartalmazó NotI-KpnI fragmentumának a NotI-KpnI-gyel emésztett pCDNA3-ba (Invitrogen) klónozásának eredménye. Az Ad5 3198–3511. nukleotidjait tartalmazza, melyet a BGH poliadenilációs helye követ.

Az AE4 plazmid az AE3 BglII-PvuII fragmentumának a pBRE1-be klónozásának eredménye. Az AE4 a következő E1 expressziós kazettát tartalmazó plazmid:

- az Ad5 1–3511. nukleotidjai, azaz a bal ITR, részecskeképződésért felelős szekvenciák, E1A promotor, ELA gén, E1B promotor, E1B gén,
- a pCDNA3-ból származó szarvasmarha növekedési hormon (BGH) polia.

A pBRE1-et BstNI-gyel emésztettük, majd T4 DNS-polimerázzal is kezeltük a túllógó 5'-végek betöltésére, majd XbaI-gyel emésztettük. Az így kialakított fragmentumot, amely az Ad5 391–1339. nukleotidjait tartalmazza, a SmaI-XbaI-gyel (nem metilált hely) emésztett pC20H-ba építettük be, és így az AE5 plazmidot kaptuk.

Az AE6 plazmid az AE5 EcoRI-SmaI fragmentumának az EcoRI-SmaI-gyel emésztett AE4-be klónozásának eredménye. Az AE6 a következő E1 expressziós kazettát tartalmazó plazmid:

- az Ad5 391–3511. nukleotidjai, azaz csökkent méretű E1A promotor, E1A gén, E1B promotor, E1B gén,
- a pCDNA3-ból származó szarvasmarha növekedési hormon (BGH) polia.

3.2. A két E1 kazetta klónozása bakulovírusba

Az AE4 és AE6 plazmidok EcoRI-SphI fragmentumait (miután a túllógó 5' SphI véget előzőleg tompává tettük T4 DNS-polimerázoz emésztéssel) a pAcSG2 (Pharming) plazmidba klónoztuk az EcoRI és EcoRV helyek közé. Ez az AE14 és AE15 plazmidokat hozta létre. Ebben a két esetben az E1 régió a polihedringén lokuszába van beépítve (a polihedringén és promotor deletált).

Az AE14 és AE15 plazmidokat az AcNPV törzsből (Pharming) származó BaculoGold bakulovírus DNS-sel kotranszfektáltuk Sf9 rovarsejtekbe, hogy kialakítsuk a BacAE14 és BacAE15 rekombináns baku-

lovírusokat, amelyek a két E1 expressziós kazettát hordozzák a polihedringén lokuszába beépülve.

3.3. Egy új E1 deléciót hordozó rekombináns adenovírus klónozása

A pCO1 plazmidot [WO 96/10088] BstXI-gyel emésztettük, majd a 3' túllógó vég eltávolítására T4 DNS-polimerázzal kezeltük, majd RsaI-gyel emésztettük. Az így létrehozott fragmentumot, amely az Ad5 3513–4607. nukleotidjait tartalmazza, az EcoRV-tel linearizált és borjú alkalikus foszfátázzal emésztett pBS-SK+-ba (Stratagene) vezettük be, és így az AEO plazmidot hoztuk létre.

A pMA37 plazmidot a következő fragmentumok ligálásával kaptuk:

- A pXL2756 sacB-t tartalmazó EcoRV-NsiI fragmentuma. A pXL2756 az EcoRI és KpnI helyeitől megfosztott SacB kontraszelekciós génnel, a kanamicinrezisztencia-génnel, egy multiklónozóhellyel és egy ColE1 replikációs origóval rendelkezik.

- A pCO1 NdeI-NsiI fragmentuma (az adenoszekvenciákat tartalmazza).

- A pXL2756 Sall (a túllógó 5'-véget T4 DNS-polimerázzal betöltve)-AseI fragmentuma (kanamicinrezisztens vektor).

A pMA37 tehát tartalmazza:

- a kanamicinrezisztencia-gént,
- az expresszálo baktériumnak szacharózérzékenységet biztosító SacB gént,
- az Ad5 1–382 (HinfI) szekvenciáit, melyeket az Ad5 3446–4415. (NsiI) szekvenciái követnek; transzgén nincs.

Az AE11 plazmidot az AE0 XhoI-NsiI fragmentumának a Sall-NsiI-gyel emésztett pMA37-be történő bevezetésével hoztuk létre. Ez tartalmazza:

- a kanamicinrezisztencia-gént,
- az expresszálo baktériumnak szacharózérzékenységet biztosító SacB gént,
- az Ad5 1–382 (HinfI) szekvenciáit, melyeket az Ad5 3513–4415. (NsiI) szekvenciái követnek; transzgén nincs.

Az AE11 plazmidból kiindulva ingázó öngyilkos vektorokat hoztunk létre (a kívánt transzgén beépítésével), amelyek E. coliban történő rekombinációval lehetővé teszik a rekombináns adenovírusok kialakulását. Az AE11 nem tartalmaz homológ szekvenciát az AE6-tal. Az AE11 és AE4 plazmidokban közös az Ad5 1–382. (HinfI) szekvencia az E1A felett, de nincs homológia a két plazmid között az E1 kazetta alatt. Így nem alakulhatnak ki RCA-k az AE11-ben lévő E1 deléciót hordozó adenovírus és a BacAE14 vagy BacAE15 bakulovírusok közötti homológ rekombinációval.

3.4. Első generációs rekombináns adenovírus kialakítása

Elsőként BacAE14 vagy 15 sarzsokat állítottunk elő a klasszikus módszerek szerint. Ezután a kompetens sejteket (például HuH7) 5 µg PacI-gyel emésztett pXL2822 plazmiddal transzfektáltuk [a pXL2822 plazmid az egész Ad5-öt tartalmazza, amelyből az E1 (382–3446.) és az E3 (28 592–30 470.) deletált, és tartalmaz egy CMV-β-Gal kazettát], és egy időben vagy

egymás után 10–1000 MOI-val fertőztük a BacAE14 vagy 15-tel. Amikor a sejtek lízáltak, a transzfekciós felülúszót begyűjtöttük, majd „friss” kompetens sejteknél alkalmaztuk az Ad2822 adenovírus amplifikálására, melyeket előzőleg vagy egy időben a BacAE14-gyel vagy 15-tel fertőztünk (MOI 10–1000), és így tovább egészen egy Ad2822 sarzs kialakulásáig. Az Ad2822 további amplifikációját megkönnyíti a lacZ gén jelenléte a vírusban. Minden amplifikációs lépésben a felülúszót a W162-re nézve „pszeudotitráltuk”. A vírus genomját az amplifikáció során vizsgáltuk, hogy igazoljuk integritását. Végül ez a stratégia azzal az előnnyel rendelkezik, hogy nem jöhetnek létre RCA-k az így termelt adenovírussarzsokban. A szennyeződés hiányát is igazoltuk.

4. példa

Az adenovírus E1 és E4 régióit kifejező bakulovírus kialakítása

4.1. E1,E4 bakulovírus (Bac.E1–E4) kialakítása

Az alkalmazott eljárás a következő: Az E1 és E4 régiókat ellentétes orientációban klónoztuk a polihedrin-gén (Ph) lokuszába a pBacPAAK8 ingázó vektorba (Clontech, USA), és így a pBacE1–E4-et kaptuk. A rekombináns bakulovírust ezután a klasszikus módszerrel izoláltuk a pBacE1–E4 és a BacPAK6 bakulovírus Sf9 sejtekbe történt kotranszfekciójával [Kitts et Possee, *Biotechniques* 14(5), 810 (1993)]. Az E1 és E4 régiók jelenlétét a rekombináns bakulovírusgenomban ezután PCR-rel igazoltuk a fertőzött Sf9 sejtekből kiindulva. Az E1 és E4 transzkripcióját a tisztított rekombináns bakulovírussal fertőzött Huh7 sejtekben RT-PCR-rel vizsgáltuk citoplazmatikus RNS-ből kiindulva.

Az E1–E4 bakulovírus kialakításához különböző E1 régiót hordozó fragmentumokat építhetünk be. A példában alkalmazott fragmentumok a 3. példában a bakulovírus-E1 esetében leírtakkal azonosak, és az E1 régiót saját promoterük (csökkentett E1 promoter és E1b promoter) irányítása alatt tartalmazzák. Az alkalmazott E4 fragmentumok a következők:

- MaeII-MscI 327 220–35 835. fragmentum, ami a teljes E4 régiót tartalmazza,
- BglII-PvuII 34 115–33 126. fragmentum, ami az ORF6-ot tartalmazza,
- BglII-BglII 34 115–32 490. fragmentum, ami az ORF6–ORF6/7-et tartalmazza,
- PvuII-AluI 34 801–334 329. fragmentum, ami az ORF3-at tartalmazza.

A fragmentumokat vagy az E4 promoter irányítása alá helyeztük, vagy más promoter, többek között a HSV-TK, DNV vagy LTR-RSV promoterek irányítása alá.

Az itt megadott helyzetek a vad típusú Ad5 adenovírus szekvenciájára hivatkoznak, amint azt publikálták és adatbázisokban hozzáférhető. Bár bizonyos kisebb eltérések létezhetnek a különböző szerotípusú adenovírusok között, ezek a helyzetek azonban általában átvihetők más szerotípusokra, többek között az Ad2, Ad7, Ad12 és AdCAV–2-re.

4.2. Az AdΔE1ΔE4-LacZ transzkomplementálása a Bac.E1–E4-gyel

Az AdΔE1ΔE4-LacZ termelését úgy értük el, hogy a kompetens sejtekbe a 4.1. példa szerint előállított E1,E4 bakulovírust vezettük be (lásd az 1. ábrát). Megvizsgáltuk az AdΔE1ΔE4-LacZ tisztított Bac.E1–E4-gyel történő transzkomplementálással való termelésének optimális körülményeit kompetens sejtekben. Az AdΔE1ΔE4-LacZ titerét β-galaktózidáz transzdukciós egységek számában (t.d.u.) határoztuk meg W162 sejtvonalon, és a kapott transzkomplementálási hatékonyságot az IGPR2 részecskeképző sejtvonallal hasonlítottuk össze.

5. Az adenovírusgenom egészét komplementáló bakulovírus kialakítása

Bár több protein egyidejű expresszióját, amely 13 kb szekvenciát is jelenthet, már leírták egyetlen vírusból [Belyaev et Roy, *NAR* 21, 1219 (1993)], a bakulovírusklónozás maximális kapacitása nem nagyon dokumentált. A példa azt mutatja be, hogy klónozzhatjuk a részecskeképző szignáljától megfosztott (Ad.Psi-) adenovírusgenomot két loxP hely között [loxP-ITR-ITR-től E4-ig-loxP] a bakulovírusba. A Cre rekombinázt indukálható vagy nem indukálható módon kifejező kompetens sejtek (Cre vagy Cre-ER sejtvonalak, lásd 7. példa) fertőzése ezzel a rekombináns bakulovírussal és a Cre rekombinázt aktiválása lehetővé teszi az adenovírusgenom kivágódását és cirkularizálódását. Ez azután képes átírni a korai géneket, replikálódni, és a késői géneket aktiválni, de nem képes részecskéket kialakítani, és így helperként szolgál a minimális adenovírus termelése során (lásd a 2–4. ábrákat). Ebben a rendszerben a minimális adenovírusok termelése két bakulovírussal történő fertőzésen, és két loxP helyek közötti rekombinációs esemény megvalósulásán alapul. Ez a megközelítés azzal az előnnyel rendelkezik, hogy nem hoz létre adenovírusrészecskéket a helpervírusból.

Az Ad.Psi- genom kialakítását E. coliban végeztük. Ehhez az Ad5 adenovírus teljes genomját egy prokarióta klónozóvektorba klónoztuk, a szomszédos ITR-ekkel együtt. A Psi szekvenciát enzimátikus hasítással és ligálással, vagy irányított mutagenézissel deletáltuk. Ezután egy LoxP szekvenciát vezettünk be az adenovírusgenom mindkét oldalára, azonos orientációban. A kapott szerkezetet (loxP-ITR-ITR-ΔPsi-től E4-ig-loxP) ezután egy ingázó vektorba klónoztuk, amely lehetővé teszi a rekombinációt egy bakulovírussal, a 3. példában leírt módszer szerint. A kapott rekombináns bakulovírust, melynek neve BacAd.Psi-, a klasszikus módszerek szerint izoláltuk.

6. példa

A hiányos adenovírusgenomot kivágható formában tartalmazó bakulovírus kialakítása

A példa egy olyan bakulovírus kialakítását ismerteti, amely lehetővé teszi kompetens sejtekben a hiányos adenovírusgenom szállítását. Pontosabban a rekombináns adenovírusból az összes kódoló régió hiányzik, és csak az ITR-ek és a Psi maradt meg (minimális adenovírus vagy AdΔ).

6.1. A minigenom (Ad Δ) kialakítása *E. coli*ban

Kialakítottunk egy p(loxpP-(ITR-ITR-Psi-P.CMV-LacZ-pA)-loxP) plazmidot. Ehhez az adenovírus ITR-szekvencia egy másolatát izoláltuk enzimatikus emésztéssel és/vagy amplifikáltuk PCR-rel, majd a pGY63 adenovírus ingázó vektorban lévő ITR-Psi szekvencia fölé klónoztuk. Ez a vektor a pCO1-ből származik [WO 96/10088], és tartalmazza a LacZ gént a citomegalovírus közvetlen korai promoterének irányítása alatt (P.CMV), az SV40 vírus poliadenilációs helyével (pA) lezárva, mindez az ITR-Psi és a pIX-et kódoló gén közé klónozva. A vektor (ITR-ITR-Psi-P.CMV-LacZ-pA) területét (amely egy minimális adenovírus genomjának felel meg) ezután enzimatikus hasítással izoláltuk, és a pBS246 plazmid (Gibco) multiklónozóhelyében lévő LoxP helyek közé klónoztuk, és így a p(loxpP-(ITR-ITR-Psi-P.CMV-LacZ-pA)-loxP) plazmidot hoztuk létre. Ezután teszteltük az adenovírus minigenom termelésének és pakolódásának képességét cirkuláris DNS-ből kiindulva, a plazmidnak a Cre rekombinázt kifejező Ad Δ E1 Δ E4-gyel (AdCre) fertőzött IGPR2 sejt vonalba történő transzfekciójával. A minimális adenovírusokat amplifikáltuk a transzfekciós felülúszónak néhány egymást követő IGPR2 sejt vonalba történő átoltásával. Ezután tisztítottuk cézium-klorid-gradiensben történő izopiknikus centrifugálással, és mennyiségét pszeidotitrálással határoztuk meg W162 sejt vonalon. Természetes, hogy a LacZ gént könnyen helyettesíthetjük bármely más kívánt nukleinsavval, a molekuláris biológia klasszikus módszereit alkalmazva.

6.2. A kivágható minigenom klónozása egy bakulovírusba

Az Ad Δ minigenomot a két loxP hely között tartalmazó fentebb leírt szerkezetet a bakulovírus P10 lokuszába klónoztuk a pAcUW1 ingázó vektorba (Pharmin-gen, USA). Az így termelődött Bac.Ad Δ bakulovírust ezután a klasszikus módszerek szerint termeltük és izoláltuk Sf9 sejtek kotranszfektálásával, a korábban leírtak szerint, és felületük fenotípusa alapján (fehér) szelektáltuk azokat, X-Gal festés után. A bakulovírus tehát tartalmazza a nagymértékben hiányos adenovírusgenomot, melyet két azonos orientációjú loxP hely fog közre.

6.3. Az Ad Δ termelése a BacAdPsi- bakulovírral történő transzkomplementálással

Kompetens sejteket fertőztünk egyszerre a Bac-AdPsi- bakulovírral (az 5. példában írtuk le), amely az adenovírusgenom transzkomplementáló funkcióinak összességét hordozza, és a Bac.Ad Δ bakulovírral (fentebb írtuk le), amely a pszeudoadenovírusgeno-

mot hordozza. A Cre rekombinázt vagy a fehérje tápközeghez adagolásával, vagy a sejteknek egy, a Cre-t kifejező plazmiddal vagy vírussal (bakulovírus) történő transzfekciójával, vagy a sejt vonal genomjába stabilan beépült kazetta expressziójával (például a 7. példában leírt) biztosítottuk. A minimális adenovírust a Bac-AdPsi- bakulovírral és a felülúszóval fertőzött sejttenyészet felülúszójának egymás utáni átoltásával amplifikáltuk, majd tisztítottuk és titráltuk a korábban idézett eljárások szerint. Ez a módszer lehetővé teszi, hogy egyetlen vírusként az Ad Δ -t kapjuk meg, ami lehetővé teszi ennek izolálását és tisztítását a klasszikus módszerekkel. Ezenkívül a kapott titer ipari alkalmazásra megfelelő.

7. A Cre fehérjét kifejező sejt vonal kialakítása

Létrehoztunk egy, a Cre fehérjét indukálható vagy nem indukálható módon kifejező sejt vonalat, a találmány szerinti bakulovírusban (például a Bac.Ad Δ és a BacAdPsi-) a loxP helyek közötti rekombináció hatékonyságának megnövelésére és a Cre kifejeződésének szabályozására. Ebben a szerkezetben a Cre egy magában fejeződik ki, vagy egy C-terminálisán az ösztadiolreceptor (ER)-kötő doménnel fuzionált formában [Metzger et al. (1996), korábban idézve], egy általános, előnyösen erős, indukálható vagy nem indukálható promoter irányítása alatt. Részletesebben az alkalmazott promoterek a pGRE5 promoter, a metallotioninpromoter, az SV40 promoter vagy a HSV-TK-gén promotere.

Az ilyen Cre sejt vonalak kialakításához a kompetens sejteket két plazmiddal kotranszfektáltuk, az egyik tartalmazta a Cre expressziós kazettát (Cre vagy Cre-ER), a másik egy szelekciós marker expressziós kazettáját (Neo). A G418 rezisztens klónokat szelektáltuk, a Cre-aktivitást a p(P.CMV-loxP-ATG.stop-pA-LoxP-LacZ) plazmid klónokba történő transzfektálásával teszteltük. Ez a plazmid a LacZ gént tartalmazza, amely inaktív, mivel a promoter (P.CMV) és a LacZ kezdete közé három leolvasási fázisban stopkodonokat és az SV40 vírus poliadenilációs helyét építettük be, melyeket két loxP hely határol. A Cre expresszióját a klónokban induktor (ösztadiol) jelenlétében vagy hiányában a β -galaktozidáz-aktivitás alapján mutattuk ki, melyet a két loxP hely közötti rekombináció vált ki. Így több olyan klónt szelektáltunk, amely stabilan kifejezi a Cre-ER fúziós fehérjét vagy önmagában a Cre fehérjét a lentebb megadott promoterekkel és kompetens sejtekkel. Ezek a klónok alkalmasak a találmány szerinti vírusok termelésére.

Kompetens sejtek	HSV-TK promoter		SV40 promoter		MMTV promoter		GRE5 promoter	
Rekombinázt	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER
293	#1	#7	#13	#19	#25	#31	#37	#43
IGPR2	#2	#8	#14	#20	#26	#32	#38	#44
HuF7	#3	#9	#15	#21	#27	#33	#39	#45

Táblázat (folytatás)

Kompetens sejtek	HSV-TK promoter		SV40 promoter		MMTV promoter		GRE5 promoter	
Rekombináz	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER	Cre	Cre-ER
HepG2	#4	#10	#16	#22	#28	#34	#40	#46
HER	#5	#11	#17	#23	#29	#35	#41	#47
Vero	#6	#12	#18	#24	#30	#36	#42	#48

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hiányos rekombináns vírusok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy kompetens sejtpopulációba bevezetünk egy hiányos rekombináns vírusgenomot és egy bakulovírust, amely a hiányos rekombináns vírusgenom transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét vagy azok egy részét hordozza, a funkciók másik részét egy vagy több másik bakulovírus és/vagy a kompetens sejt szolgáltatja.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bakulovírus a hiányos rekombináns vírusgenom transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét hordozza.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bakulovírus a hiányos rekombináns vírusgenom transzkomplementálásához szükséges funkciók egy részét hordozza, a funkciók másik részét a kompetens sejt szolgáltatja.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hiányos rekombináns vírusgenom transzkomplementálásához szükséges funkciókat több bakulovírus hordozza.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hiányos rekombináns vírus egy hiányos rekombináns adenovírus.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírus genomja az E1, E2, E3, E4, L1–L5, pIX és IVa2 funkciók közül egy vagy több funkcióban hiányos, és a bakulovírus a hiányos rekombináns genom transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét hordozza.

7. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírus genomja az E1, E2, E3, E4, L1–L5, pIX és IVa2 funkciók közül egy vagy több funkcióban hiányos, és a bakulovírus a hiányos rekombináns genom transzkomplementálásához szükséges funkciók egy részét hordozza, a funkciók másik részét egy vagy több másik bakulovírus és/vagy a kompetens sejt szolgáltatja.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírusgenom E1 régiójában hiányos, és a bakulovírus az adenovírus E1 régióját vagy annak egy részét hordozza.

9. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírusgenom E2 régiójában

15 hiányos, és a bakulovírus az adenovírus E2 régióját vagy annak egy részét hordozza.

10. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírusgenom az E4 régiójában hiányos, és a bakulovírus az adenovírus E4 régióját vagy annak egy részét hordozza.

11. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírusgenom E1 és E4 régióiban hiányos, és a bakulovírus az adenovírus E1 és E4 régióját vagy azok egy részét hordozza.

12. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns adenovírus genomjából minden virális kódoló régió hiányzik, és a bakulovírus ezek transzkomplementálásához szükséges funkciók összességét hordozza.

13. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bakulovírus az adenovírusgenom összességét hordozza, a részecskeképződésért felelős terület és adott esetben az ITR-ek kivételével.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bakulovírusban jelen lévő komplementáló funkciók és a hiányos rekombináns vírusgenom nem tartalmaznak olyan homológ területeket, ahol rekombináció végbemehet.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kompetens sejtekbe bevezetünk egy E1 és adott esetben E3 régiójában hiányos rekombináns adenovírusgenomot, a sejteket egyidejűleg vagy elkülönülten egy, az adenovirális E1 régiót hordozó bakulovírustal fertőzzük, ahol a bakulovírusban jelen lévő adenovirális E1 régió és a hiányos rekombináns adenovírusgenom nem tartalmaz olyan homológ területeket, ahol rekombináció mehet végbe.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bakulovírus az Ad5 adenovírusgenom 391–3511. nukleotidjait tartalmazó fragmentumát hordozza, és az E1 régióban hiányos rekombináns adenovírus ennél nagyobb deléciót hordoz.

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a bakulovírus az Ad5 adenovírusgenom 391–3511. nukleotidjait tartalmazó fragmenst hordozza, és a hiányos rekombináns adenovírus az E1 régiójában a 383–3512. nukleotidokat magában foglaló deléciót hordozza.

18. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hiányos rekombináns vírusgenomot a sejtbe

az említett genomot hordozó adenovírusal történő fertőzés útján vezetjük be.

19. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hiányos rekombináns vírusgenomot a sejtbe transzfekcióval vezetjük be.

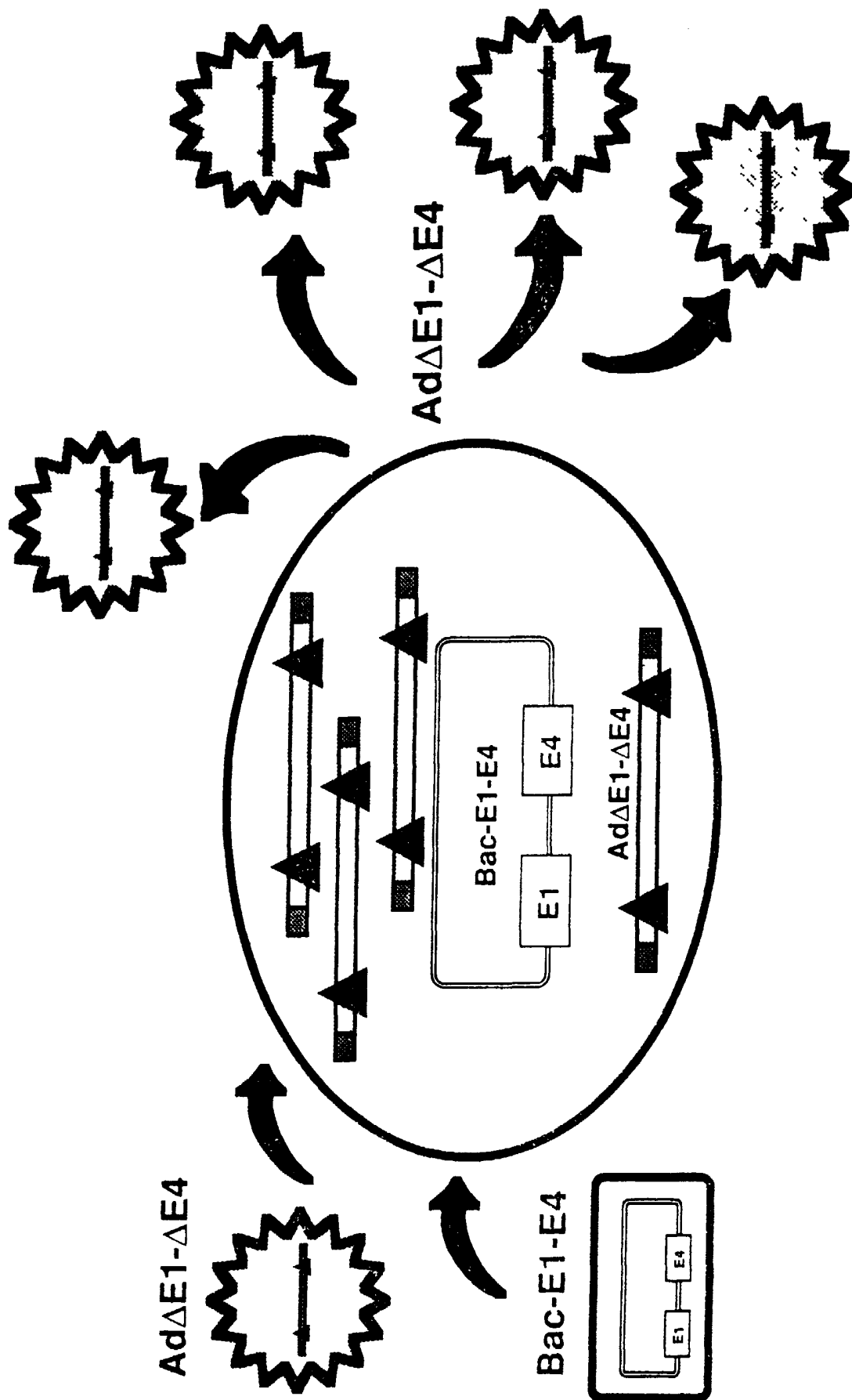
20. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hiányos rekombináns vírusgenomot a sejtbe a komplementáló funkciókat hordozó bakulovírustól eltérő rekombináns bakulovírusal vezetjük be.

21. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kompetens sejtpopuláció májsejtek, izom-

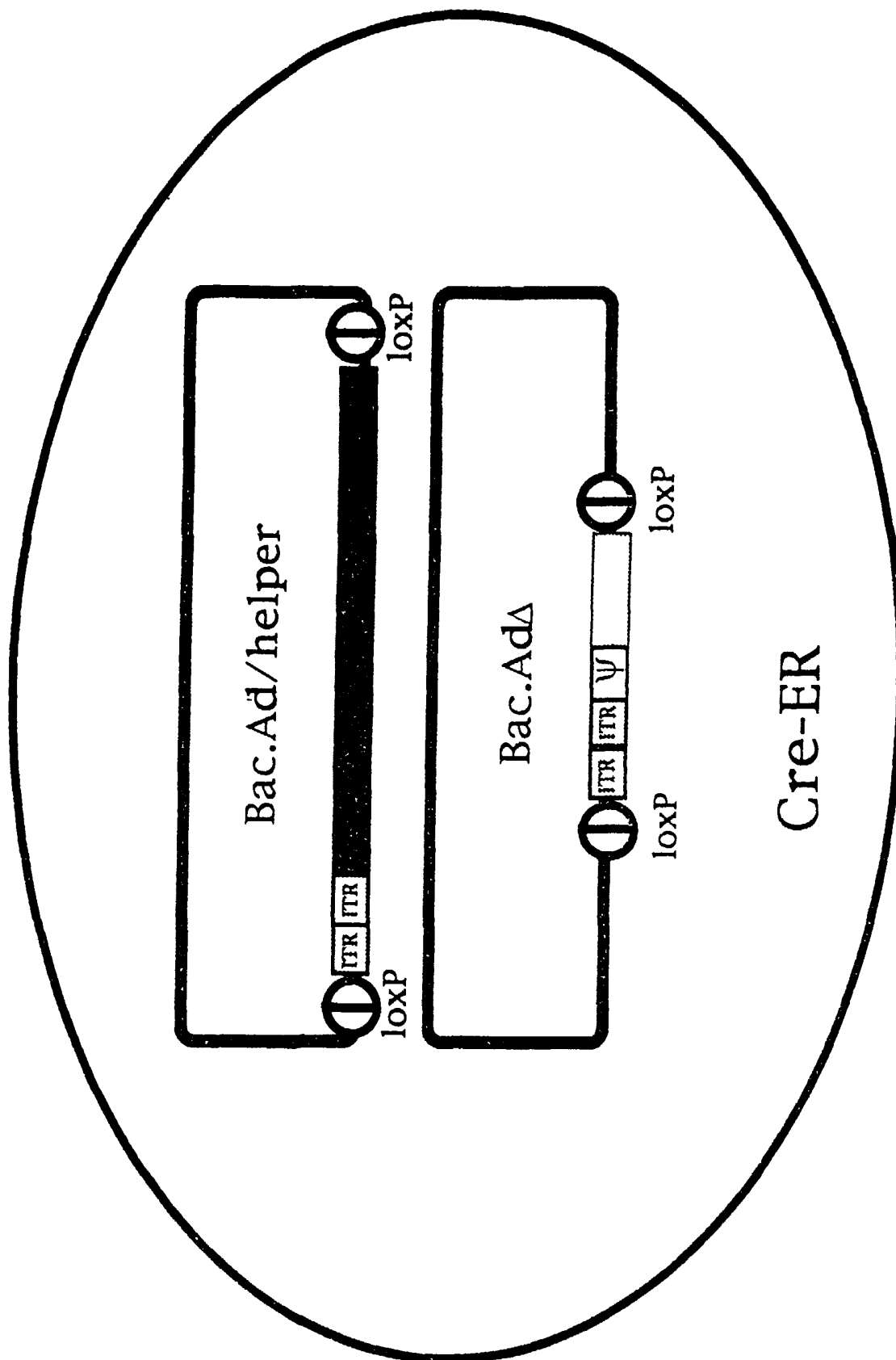
sejtek, fibroblasztok, embrionális sejtek, epiteliális sejtek, okuláris sejtek vagy idegsejtek populációja.

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az epiteliális sejtek tüdő epiteliális sejtek és az okuláris sejtek retinasejtek.

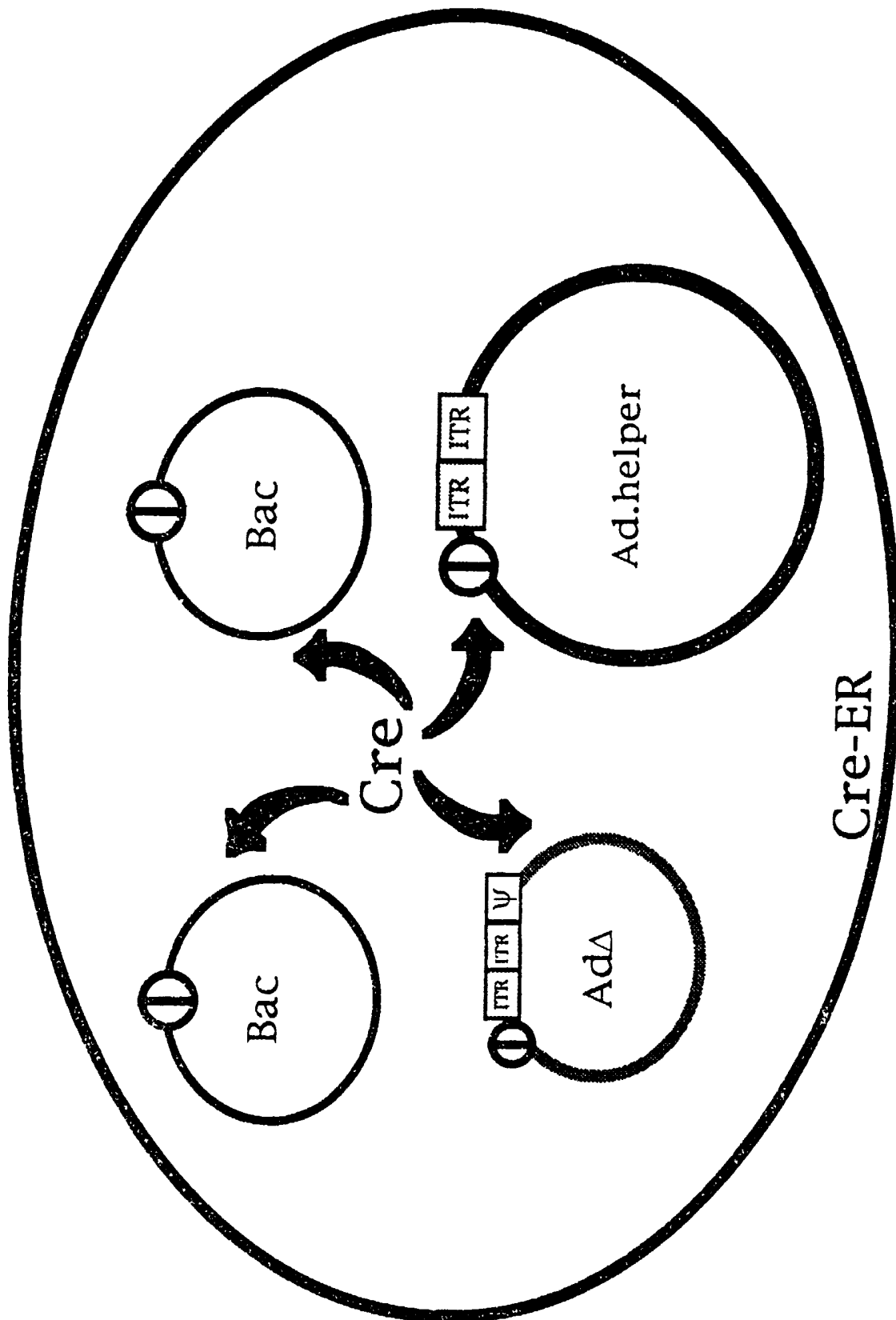
23. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kompetens sejtek populációját 293 sejtek vagy ezek bármely kiegészítő komplementáló funkciót hordozó származéka, az A549, HuH7, Hep3B, HepG2, HER, 911, HeLa- vagy KB-sejtek közül választjuk ki.



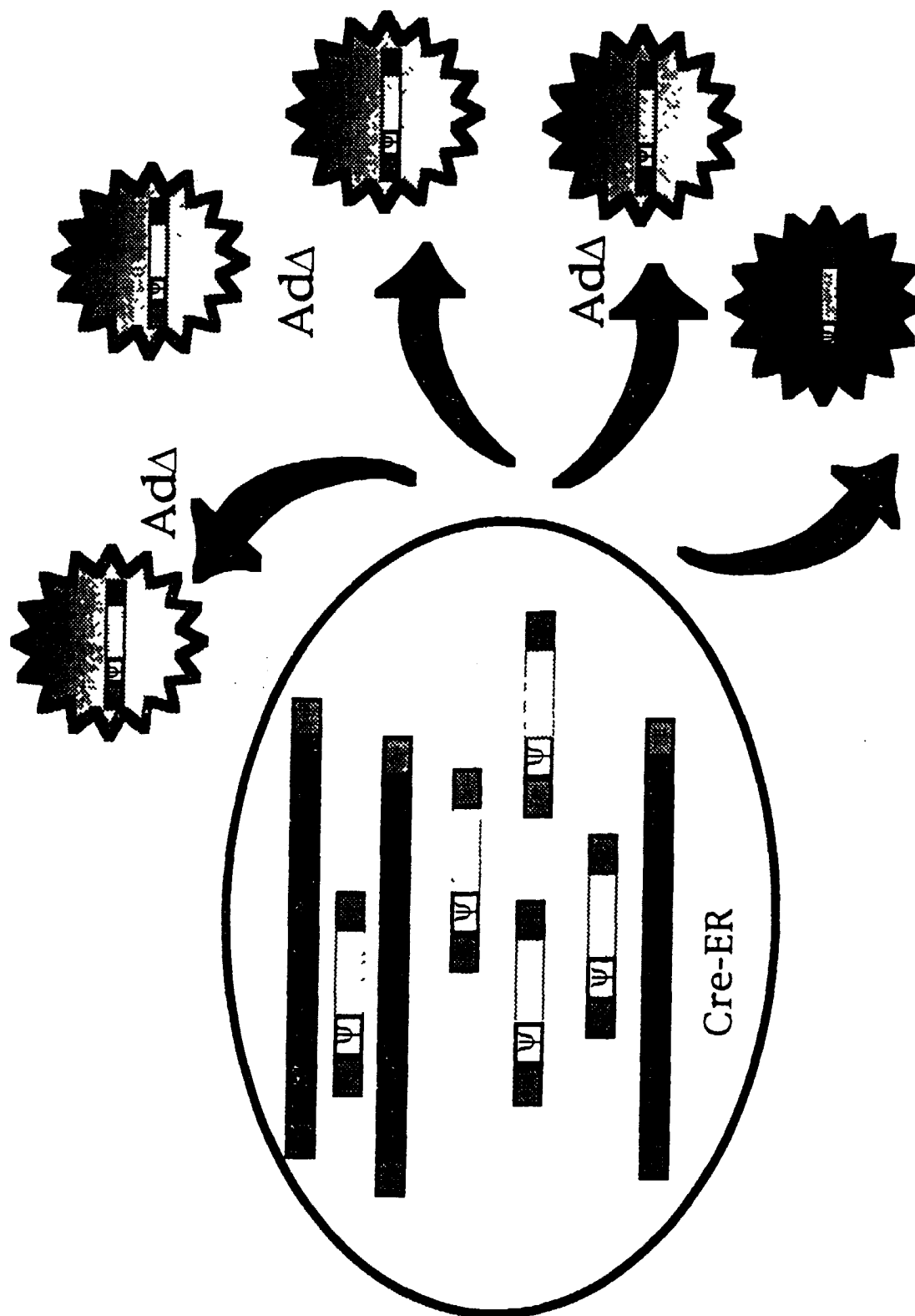
1. ábra



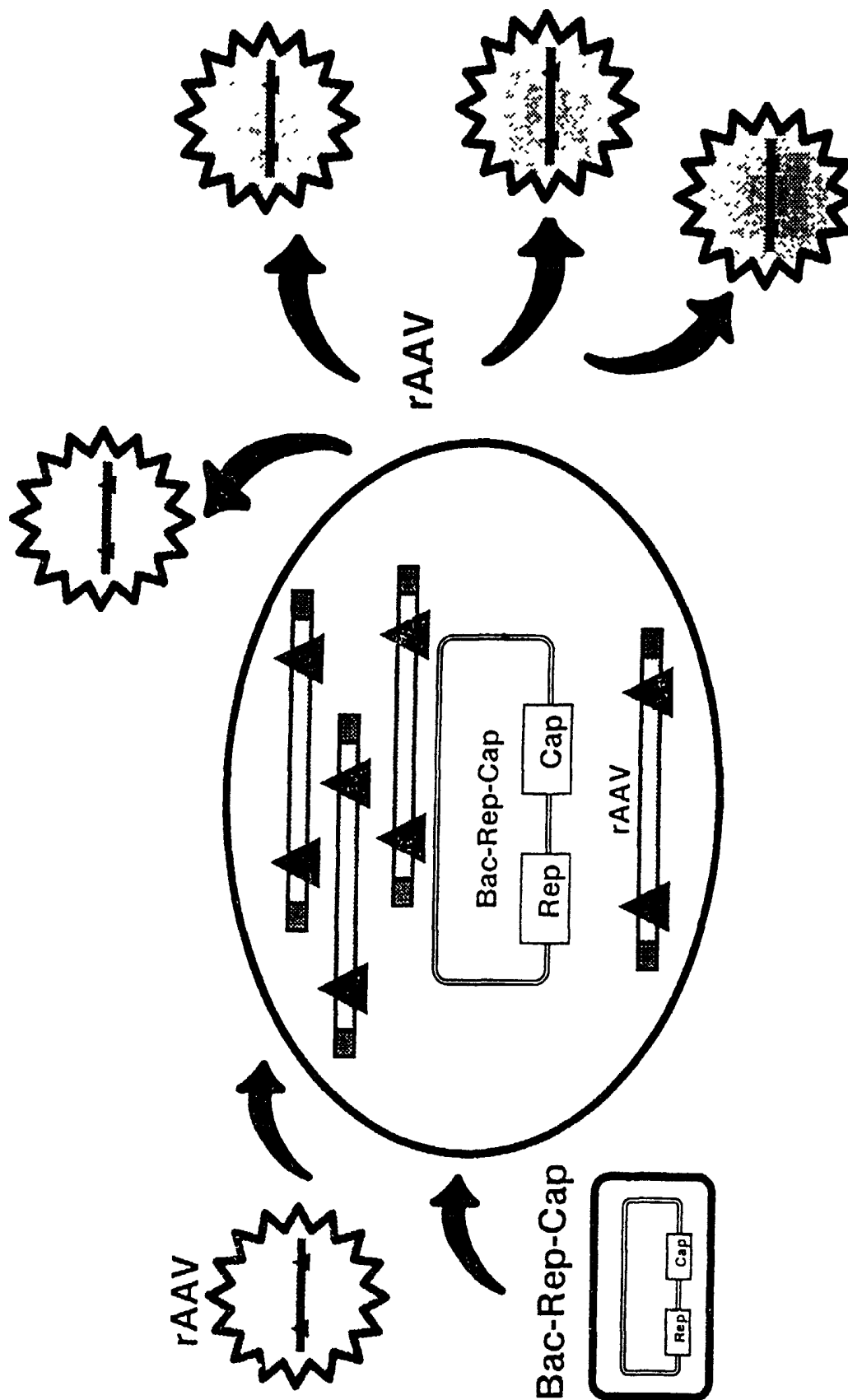
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra