

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 902 A9

- (21) A kérelem ügyszáma: P/P 00695
(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 30.
(30) Elsőbbségi adatok:
767 787 1991. 09. 30. US
827 049 1992. 01. 30. US
864 758 1992. 04. 07. US

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 92/6767 országkódja: ZA
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1992. 09. 07.
Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.
A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/64
A 61 K 48/00

(72) Feltalálók:

dr. Curiel, David, Birmingham, Alabama (US)
Hu, Ping-Chuang, Chapel Hill, North Carolina (US)
dr. Wagner, Ernst, Langenzersdorf (AT)
Birnstiel, Max L., Bécs (AT)
dr. Cotten, Matt, Bécs (AT)

(73) Szabadalmazók:

The University of North Carolina at Chapel Hill,
Chapel Hill, North Carolina (US)
Boehringer Ingelheim International GmbH.,
Ingelheim/Rhein (DE)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Új konjugátumok nukleinsavak magasabb rendű eukarióta sejtekbe való
bejuttatására**

Az átmeneti oltalom az 9–18., 20., 23., és a 24. igénypontra vonatkozik.

A találmány hatóköre a DNS technológia területe. Pontosabban, a találmány tárgyat nukleinsavaknak magasabb rendű eukarióta sejtekbe történő bevitelére képezi.

A találmány háttere

Különösen a génterápiában szükség van egy hatékony rendszerre nukleinsavak az élő sejtekbe történő bevezetésére. A géneket bejuttatják a sejtekbe annak érdekében, hogy terápiásan hatásos géntermékek in vivo szintézisét érik el, például egy genetikai hiba esetében helyettesítsék a hibás gént. A „klasszikus” génterápia azon az elven nyugszik, hogy egyszeri kezelés által tartós gyógyulást érjenek el. Emellett fennáll az igény olyan kezelési módszerek iránt is, amelyeknél a terápiásan hatásos DNS-t (vagy akár mRNS-t), mint egy gyógyszert („génterapeutikum”), igény szerint egyszer vagy ismételt adagban adják be. Olyan genetikai eredetű megbetegedésekre, amelyeknél a génterápia egy sikert ígérő kezdeményezést mutat fel, példa a hemofília, béta-talasszémia és a súlyos összetett immunhiány (Severe Combined Immune Deficiency = SCID), egy szindróma, amelyet az adenzin-dezamináz enzim genetikai eredetű hiánya okoz. Alkalmazási lehetőségeket jelent továbbá az immunszabályozás, ahol egy szekretált antigén-fehérjét vagy egy nemszekretált antigén-fehérjét kódoló, működőképes nukleinsav oltással történő beadása révén, humorális vagy intracelluláris immunitást érnek el. További példák a genetikai hibákra, amelyeknél a kódoló nukleinsav a hibás gén helyett például egyéni igény által meghatározott formában beadható, az izom-disztrofia (Dystrophin gén), cisztikus fibrózis (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gén), hiperkoleszterinémia (LDL-receptor gén). A génterápiás kezelési módoknak továbbá akkor lehet jelentőségük, amikor hormonokat, növekedési faktorokat vagy citotoxikus vagy immunszabályozó hatással rendelkező fehérjéket kell szintetizálni az élőlényben.

A génterápia a rák kezelésére is ígéretesnek tűnik úgynevezett „rákvakcinák” beadásával. A daganatsejtek immunogenitásának növelése céljából megváltoztatják azokat vagy erősebben antigén jellegűvé téve, vagy bizonyos citokinek termelésére ösztönözve őket annak érdekében, hogy immunválaszt váltssanak ki. Ezt úgy valósítják meg, hogy a sejteket olyan DNS-sel transzformálják, amely egy citokint, például IL-2-t, IL-4-et, IFN-gammát, TNF-alfát kódol. Eddig az autológ daganatsejtekbe retrovirális vektorok segítségével végezték el a géntranszfert.

Az antiszenz RNS-ek és DNS-ek, valamint ribozimok hatásmódja lehetővé teszi ezeknek gyógyászati hatóanyagként történő alkalmazását, bizonyos gének (például szabályozatlan onkogének vagy vírusgének) in vivo kifejeződésének blokkolására. Bemutatták már, hogy rövid antiszenz oligonukleotidok bejuttathatók a sejtekbe, és ott kifejezhetik gátló hatásukat [Zamecnik P.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4143–4146 (1986)] még akkor is, ha sejtben belüli koncentrációjuk csekély a nukleinsavak erős negatív töltése miatt a sejtmembránon keresztüli korlátozott átjutásuk következtében.

Az emlősök sejtjeinek in vitro géntranszformációjára különböző technikák ismeretesek, amelyeknek in vivo használhatósága azonban korlátozott (ide tartozik a DNS bevitel liposzómák, elektroporáció, mikroinjektálás, sejtfüzió, DEAE-dextrán vagy a kalcium-foszfát precipitációs eljárás segítségével).

A legutóbbi időben olyan biológiai vektorokat fejlesztettek ki, amelyek megvalósítják gének átvitelét, miközben víruseredőjük hatásos belépési mechanizmusát használják ki. Ezt a stratégiát alkalmazták rekombináns retrovírus és adenovírus vektorok összeállításánál, hogy nagy hatásfokú in vitro és in vivo géntranszfert érjenek el [Berkner K. L., BioTechniques 6, 616–629 (1988)]. Minden hatásosságuk mellett e vektorok, figyelembe véve a szállítandó DNS nagyságát és szerkezetét, korlátoknak vannak alárendelve. Ezen kívül ezek az anyagok, az eredeti vírus életképes virális génelemeinek ko-transzferei miatt, biztonsági kockázatokat hordoznak. Így például a retrovírusok felhasználása problematikus, mivel ezek, legalábbis egy csekély százalékban, olyan mellékhatások veszélyét hordozzák magukban, mint a víruseredő (endogén vírusokkal való rekombinálódás és ezt követő, patogén formává váló lehetséges mutáció révén) vagy rák kialakulása. Ezen kívül nem minden esetben kívánatos a beteg szomatikus sejtjeinek stabil transzformációja, mint ahogyan azt retrovírusok segítségével elérik, mivel ezáltal, például mellékhatások fellépése esetén, a kezelés csak nagy nehézségek árán fordítható vissza.

Ezeknek a korlátoknak a kiküszöbölésére alternatív stratégiákat fejlesztettek ki a géntranszfer számára azon mechanizmusok alapján, amelyeket a sejt makromolekulák transzportjához igénybe vesz. Egy példa erre gének bevitel a sejtbe a leghatékonyabb úton, receptor-közvetítette endocitózissal [Wu G. Y. és Wu C. H., J. Biol. Chem. 262, 4429–4432 (1987); Wagner E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410–3414 (1990); EP-A1 0 388 758 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés]. Ez a megközelítés bifunkciós molekuláris konjugátumokat vesz igénybe, amelyek egy DNS kötő doménnel és egy sejt felszíni receptorra specifikus doménnel rendelkeznek [Wu G. Y. és Wu C. H., J. Biol. Chem. 262, 4429–4432 (1987); Wagner E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410–3414 (1990)]. Ha az ismertetőjelet magán viselő domént (továbbiakban internalizáló faktorként nevezve) a sejt felszíni receptor felismeri, a konjugátum a receptorközvetítette endocitózis útján internalizálódik, amelynek következtében a konjugátumhoz kapcsolt DNS is átkerül. Ennek a módszernek az alkalmazásával részleges géntranszfereket tudtak elérni, amelyek legalább olyan jók voltak, mint amelyeket a hagyományos módszerekkel értek el [Zenke M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655–3659 (1990)].

Miközben ez a vektorrendszer nagy mennyiségű DNS-t képes olyan sejtekbe bevinni, amelyek az alkalmas sejt felszíni receptorral rendelkeznek, a megfelelő gén kifejeződés nagyon gyakran nincs összhangban a szállítási kapacitással [Cotten M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033–4037 (1990)]. Feltételezték

többek között, hogy e jelenség oka abban áll, hogy a receptorközvetítette endocitózis által a sejtbe szállított DNS a lizoszómákba kerül, ahol lebontásnak van kitéve [Zenke M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3655–3659 (1990); Cotten M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4033–4037 (1990)]. Ezért az a tény, hogy a lizoszómákban internalizált DNS semmilyen specifikus mechanizmussal nem rendelkezik az intracelluláris vezikulumból való kilépéshez, ebben a transzport-rendszerben rejlő korlát.

A jelen találmány feladatának azt tekintettük, hogy a fenti korlátokat csökkentsük, illetve elhárítsuk.

A vírusok nagy része az eukarióta gazdasejtbe történő behatoláshoz felhasználja azokat a mechanizmusokat, amelyek a receptor-közvetítette endocitózis elvének felelnek meg. E mechanizmus alapján egy vírusfertőzés általában a víruspartikulának a sejtmembrán receptoraihoz való kötődésével kezdődik. Ezután következik a vírus internalizációja a sejtbe. Ez az internalizációs folyamat egy sajátos utat követ, fiziológias ligandumok vagy makromolekulák sejtbe való belépésének megfelelően: a receptorok a sejt felszínén mindenekelőtt csoportokba rendeződnek, a sejtmembrán betüremkedik és egy burokkal körülvett vezikulumot képez. Miután ez a vezikulum a Clathrinburkától megszabadult, a belsejében egy, a membránban elhelyezkedő proton-pumpa segítségével kiváltott savasodás indul meg. Ez előidézi a vírus szabaddá válását az endoszómából. Attól függően, hogy a vírus rendelkezik-e lipidburokkal vagy sem, a vírus endoszómából történő szabaddá válásának két módját vettük figyelembe: az úgynevezett „meztelen” vírusok esetében (például adenovírus, poliovírus, rhinovírus) azt feltételeztük, hogy az alacsony pH érték konformáció változásokat okoz a vírusfehérjében. Ennek következtében hidrofób domének válnak szabaddá, amelyek fiziológias pH értéknél nem hozzáférhetők. Ezáltal ezek a domének megszerzik az endoszóma-membránnal való kölcsönhatásba lépés, és ezzel a vírusgenom endoszómából a citoplazmába történő szabaddá válásának képességét. A burokkal rendelkező vírusokról (például vesicular stomatitis vírus, semliki forest vírus, influenza vírus) azt tartják, hogy az alacsony pH érték néhány vírusfehérjének a szerkezetét vagy a konformációját módosítja, ezáltal elősegítve a vírusmembrán és az endoszóma-membrán fúzióját. Azok a vírusok, amelyek ezen mechanizmus segítségével hatolnak be a sejtbe, meghatározott molekuláris különlegességekkel rendelkeznek, amely lehetővé teszi számukra az endoszóma-membrán felszakítását ahhoz, hogy beléphessenek a citoplazmába.

Más vírusoknak, például a burokkal rendelkező Sendai, HIV és néhány Moloney leukémia vírus törzsnek vagy a burokkal nem rendelkező SV40 és Polyomavírusoknak nincs szükségük alacsony pH értékre a sejtbe történő behatoláshoz, közvetlen a sejt felszínén elő tudnak idézni a membránnal egy fúziót (Sendai vírus, esetleg HIV), vagy pedig olyan mechanizmust képesek kifejteni, hogy felszakítsák a sejtmembránt vagy átjussanak rajta. Azt feltételezik, hogy a pH értéktől független vírusok is igénybe tudják venni az endo-

citózis útját [McClure M. O., et al., J. General Virol. 71, 767–773 (1990)].

Azokban a kísérletekben, amelyek a jelen találmányt megelőzték, megállapítást nyert, hogy a nukleinsav-komplexek segítségével végzett géntranszfer – amelyekben a nukleinsav polikationokkal képez komplexet szabadon kapcsolva egy internalizáló faktorttal, például transzferrin-polilizin konjugátumokkal – adenovírusokkal, bizonyos retrovírusokkal vagy vírusfragmentumokkal kezelve jelentősen megnő. Ezt a hatást értük el annak a jelenségnek a kihasználásával, hogy ezek a vírusok endocitózis folyamatával jutnak be a sejtekbe, és egy specifikus mechanizmussal rendelkeznek a vezikulum-rendszerből történő kiszabadulásra az endoszómák felszakításával, például az adenovírusok esetében [Pastan I., et al., in Virus Attachment and Entry into Cells, Eds. Crowell, R. L. and Lonberg-Holm, K., Am. Soc. for Microbiol., Washington DC, 141–146 (1986)]. Ezekből a megfigyelésekből kiindulva az adott feladatot egy olyan biokonjugátum kifejlesztésével oldottuk meg, amely működőképes szerkezetének szerves alkotórészeként tartalmazza a vírust.

25 A találmány összefoglalása

A találmány tárgyát olyan új konjugátumok képezik nukleinsavaknak magasabb rendű eukarióta sejtekbe történő bevezetésére, amelyek rendelkeznek nukleinsavval történő komplexek képzésének képességével, és amelyek egy internalizáló faktort és egy nukleinsav-affin anyagot tartalmaznak, azzal jellemezve, hogy az internalizáló faktor lehet egy vírus, amely a nukleinsav-affin anyaghoz egy antitesten keresztül oly módon kapcsolódik, hogy a konjugátum/nukleinsav-komplex részeként per se képes a sejtbe behatolni és az endoszómák tartalmát – amelyekben a sejtbe lépés után a komplex lokalizálva van – a citoplazmába kiengedni.

A találmány tárgyát képezik olyan komplexek is, amelyek egy nukleinsavat és egy, internalizáló faktort és egy nukleinsavaffin anyagot magában foglaló, találmány szerinti konjugátumot tartalmaznak.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan komplexek, amelyek alkalmasak kevés vagy semmi vírusreceptorral rendelkező magasabb rendű eukarióta sejtek transzformálására, azzal jellemezve, hogy tartalmaznak még egy második, nukleinsav-affin anyaghoz kötött internalizáló faktorból álló konjugátumot, amelyben az internalizáló faktor specifikus a magasabb rendű eukarióta sejt felszíni receptorára, és amelyben a vírus konjugátum és az internalizáló faktor konjugátum komplexet képez a nukleinsavval.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás is, nukleinsavnak magasabb rendű eukarióta sejtekbe történő bevitelére, azzal jellemezve, hogy a sejteket az itt leírt, találmány szerinti nukleinsav-komplexekkel kezeljük.

A találmány tárgyát képezik gyógyászati készítmények is, azzal jellemezve, hogy aktív komponensként a találmány szerinti nukleinsav-komplexek valamelyikét tartalmazzák.

Az ábrák leírása

1. ábra: Az adenovírus kapszidon egy idegen építőpot tartalmazó adenovírus-polikation-DNS-komplexek vázlatos bemutatása. Egy adenovírus és egy polikation-DNS-kötő domén összekötésének megvalósításához a hexon fehérjének külső doménjén egy heterológ építőpot tartalmazó P202-Ad5 kiméra adenovírust alkalmaztunk az erre az építőpra specifikus MP301 monoklonális antitesttel együtt. A monoklonális antitestet alkalmassá tettük az idegen DNS szekvenciák hordozására egy polilizin rész hozzákapcsolásával. A polilizin-antitesttel komplexben levő DNS-nek a P202-Ad5 adenovírral való kölcsönhatása a konjugált antitest specificitása révén jött létre.

2. ábra: Az Ad5-P202 kiméra adenovírus előállítás

3. ábra: Géntranszfer adenovírus-polikation-DNS komplexek felhasználásával

Specifikus és nem-specifikus komplex komponenseket értékeltünk HeLa sejtekbe történő riporter gén transzfert közvetítő képességükre nézve. pRSVL riporter plazmidot (6 µg) [DNS] vittünk komplexbe antitest-polilizinnel (9,5 µg) [MP301pLys] vagy nemkonjugált polilizin ekvimoláris mennyiségével (4 µg) [pLys]. A komplexált DNS-t az adenovírral való kombináció előtt meghígítottuk. Epitóppal rendelkező vírust [P202-Ad5] vagy irreleváns adenovírust [WT300] ($2,5 \times 10^{10}$ partikula) adtunk a DNS komplexekhez ($2,5 \times 10^{10}$ DNS molekula) lizinnel nem kapcsolt monoklonális antitest [MP301], vagy irreleváns monoklonális antitest [anti-patkány IgG] ekvimoláris mennyiségének hiányában vagy jelenlétében. Néhány kísérlethez hővel inaktiváltuk a P202 adenovírust [P202-Ad5 (h. i.)] az antitest-polilizin-DNS komplexekkel való kombináció előtt. Inkubálás után luciferáz riporter gén kifejeződésére nézve kiértékeljük a sejtizátumokat.

4. ábra: A géntranszferhez optimális adenovírus és polilizin-antitest-komplexált DNS arány meghatározása. Antitest-polilizin-DNS komplex rögzített mennyiségét kombináltuk az epitóppal ellátott adenovírus különböző moláris arányaival és értékeltük a géntranszfer közvetítő képességet HeLa sejtekbe.

5. ábra: Az adenovírus-polikation-DNS komplexek által elért géntranszfer meghatározása

A komplex hígítmányainak behatárolásával értékeltük HeLa sejtekben a kimutatható luciferáz génkifejeződést közvetítő képességet. Szaggatott vonal jelzi a luciferáz génkifejeződés háttér értékét kezeletlen HeLa sejtekben.

6. ábra: Géntranszfer adenovírus-polikation-DNS komplexek segítségével különböző sejtvonalakba. Epitóppal rendelkező adenovírust P202-Ad5 ($2,5 \times 10^{10}$ partikula) adtunk az MP301pLys antitest-polilizin és a pRSVL riporter plazmid DNS alkotta komplexekhez. A kapott adenovírus-polilizin-DNS komplexeket HeLa, HBE1, KB és MRC-5 sejtvonalakkal inkubáltuk, mint a 3. ábránál. A riporter gén kifejeződését a sejtizátumokban az előzőekben leírtakhoz hasonlóan értékeltük.

7. ábra: Géntranszfer adenovírust és humán transzferrint tartalmazó kiméra komplexek segítségével

A. A humán transzferrin-polilizin-DNS komplexek, adenovírus-polilizin-DNS komplexek valamint adenovírus és humán transzferrin domének kombinációját tartalmazó hármas komplexek által közvetített génkifejeződés relatív szintjei. Transzferrin-polilizin-DNS komplexeket képeztünk pRSVL DNS (6 µg) és humán transzferrin-polilizin konjugátumok (12 µg) [hTfpl] kombinációjával Wagner és munkatársai leírása szerint [Wagner E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410–3414 (1990)]. Adenovírus-polilizin-DNS komplexeket [AdpL] készítettünk a 3. ábra szerint. Kiméra komplexeket képeztünk polilizin-monoklonális antitest MP301pLys (2 µg), plazmid DNS pRSVL (6 µg) és humán transzferrin-polilizin hTfpl (9 µg) epitóppal rendelkező adenovírushoz P202-Ad5 ($2,5 \times 10^{10}$ partikula) történő egymás utáni hozzáadásával [AdpL/hTfpl]. A bevitel HeLa sejtekbe és a riporter gén kifejeződésének értékelése az előzőekben leírtakhoz hasonlóan történt.

B. Relatív érzékenység az adenovírus és humán transzferrin hármas komplexek közvetítette géntranszferre. Adenovírust és humán transzferrin doménket tartalmazó kiméra komplexeket képeztünk fentiek szerint. A bevitel HeLa és HBE1 sejtvonalakba és a riporter gén kifejeződésének értékelése a 3. ábrán leírtak szerint történt.

8. ábra: Irányított mutációval létrehozott lehetséges inszerciós helyek az Ad5-hexon gén szekvenciájában.

In vitro mutagenézist hajtottunk végre az EcoRI-Ad5 plazmid segítségével, amely az Ad5 genom bal felét (0–76 m. u. = map unit = vázlatrajzi egység) tartalmazza. A hexon gén az 52–60 m. u. között helyezkedik el. A hexon alegység háromdimenziós vázlatát Roberts és munkatársaitól vettük át [Roberts M. M., et al., Science 232, 1148–1151 (1986)].

Az előnyben részesített megvalósítási formák

A találmány tárgyát olyan konjugátum képezi nukleinsavaknak magasabb rendű eukarióta sejtekbe történő bevezetésére, amely rendelkezik nukleinsavval történő komplexek képzésének képességével, és amely egy internalizáló faktort és egy nukleinsavaffin anyagot tartalmaz. A konjugátum azzal jellemezhető, hogy az internalizáló faktor egy vírus, amely a nukleinsavaffin anyaghoz egy antitesten keresztül oly módon kapcsolódik, hogy a konjugátum/nukleinsav-komplex részeként per se képes a sejtbe behatolni és az endoszómák tartalmát – amelyekben a sejtbe lépés után a komplex lokalizálva van – a citoplazmába kiengedni. Ilyen konjugátumok felhasználhatók nukleinsavnak olyan magasabb rendű eukarióta sejtekbe történő bevitelére, amelyek adenovírus receptorokkal rendelkeznek. A találmány tárgyát képezik továbbá komplexek, amelyek nem, vagy csak kevés vírusreceptorral rendelkező magasabb rendű eukarióta sejtek transzformálására alkalmasak, azzal jellemezve, hogy továbbá magukban foglalnak egy második, nukleinsav-affin anyaghoz kötődő internalizáló faktor konjugátumot, ahol az internalizáló faktor specifikus a magasabb rendű eukarióta sejt felszíni receptorára, és ahol a víruskonjugátum

és az internalizáló faktor konjugátum komplexet képez a nukleinsavval.

A vírusnak azt a képességét, hogy a sejtbe behatol, és az endoszómák tartalmát, amelyekben a konjugátum/nukleinsav komplex lokalizálva van, a citoplazmába kiengedi, a következőkben „felvételi funkció” elnevezéssel illetjük.

A találmány szerinti konjugátumok egyesítik az internalizáló faktor-konjugátumokra alapozott vektorrendszerek előnyeit azokkal az előnyökkel, amelyeket a vírusok hoznak be ebbe a rendszerbe.

A receptor-közvetítette endocitózison keresztül végzett géntranszferrel összevetve a találmány szerinti vírus-polikation-DNS komplexek azzal az előnnyel rendelkeznek, hogy túlhaladják azokat az alapvető korlátokat, amelyek az ismert molekuláris konjugátumrendszerek velejárói, mivel ellentétben az előzőleg ismert konjugátumokkal, egy specifikus mechanizmussal rendelkeznek, amely lehetővé teszi a sejtvezikulum-rendszerből történő szabaddá válásukat. A biológiai vektorokkal szemben a találmány szerinti vektorrendszer egy alapvető koncepciózus eltérést jelent a rekombináns vírusvektoroktól azáltal, hogy a szállítandó idegen DNS-t a virion a külső oldalán hordozza. Ennélfogva a találmány szerinti konjugátumok segítségével egészen nagy génszerkezetek is bevihetők a sejtbe, ahol a szekvenciára nézve semmiféle korlátozás nem áll fenn.

A jelen találmány keretei között a vírus alkalmasságát annak felvételi funkciójával definiáljuk. Az alkalmas vírusok egyrészt olyanok, amelyek rendelkeznek a receptor-közvetítette endocitózis képességével, hogy a sejtbe behatoljanak, és kiszabadulásukat az endoszómából a citoplazmába – és ezzel együtt a nukleinsav szabaddá tétele – előidézzék. (A jelen találmány keretei között a vírusok sajátosága továbbá, hogy ezt a képességüket a nukleinsav-komplexek alkotórészeként is megtartják.) Anélkül, hogy ezt az elméletet rögzíteni akarnánk, ez a mechanizmus kedvező lehetne a sejtbe bejuttatott nukleinsav-komplexeknek, ameddig a vírusnak azon képessége, hogy az endoszómák tartalmát szabaddá teszi megakadályozza az endoszómák és lisoszómák fúzióját, és ezáltal az ezekben a sejtalkotókban normális körülmények között végbemenő enzimes lebontást.

A magasabb rendű eukarióta sejtek jól ismertek, az élesztőket nem soroljuk ide [Watson J. D., et al., *Mol. Biol. of the Gene*, Benjamin/Cummings Publ. Company Inc., 676–677 (1987)]. Az adenovírusokkal fertőzhető magasabb rendű eukarióta sejtekre Fields és Knipe írtak le példákat [Fields B. N. és Knipe D. M. *Virology* 2nd edition, Raven Press Ltd., New York (1990)].

Egy adott sejt vonal fogékonysága a transzformációra egy vírus által, amely a konjugátumnak a sejtbe történő belépését segíti elő, illetve ezen sejt típus számára egy ligandumot képvisel, a célsejt vírus számára megfelelő felületi adenovírusreceptorok számától függ. Sejt felületi adenovírusreceptorok számának meghatározását HeLa- és KB-sejtekre Svensson és

Defer [Svensson U., *J. Virol.*, 55, 442–449 (1985); Defer C. et al., *J. Virol.*, 64, 3661–3673 (1990)] írták le. Feltételezik, hogy az adenovírus-receptor meglehetősen elterjedten fordul elő. Ezért sok sejt vonal transzformálható olyan vektorrendszerrel, amely adenovírust vagy annak egy részét tartalmazza. Néhány magasabb rendű eukarióta sejtnek azonban nincs, vagy kevés virális receptora van. Ha ilyen sejteket kell transzformálni, szükséges lehet egy internalizáló faktornak egy második konjugátumát is beépíteni, amelyet egy nukleinsav-affin anyaghoz kötünk, ahol az internalizáló faktor specifikus a magasabb rendű eukarióta sejtnek egy felületi receptorára, és ahol a víruskonjugátum és az internalizáló faktor konjugátuma komplexben van a nukleinsavval. Ilyen „hármass komplexeket” sikerrel alkalmazhatunk, hogy magasabb rendű eukarióta sejtek – mint például légúti hámsejtek, amelyek viszonylag csekély sejt felületi adenovírus-receptor populációval rendelkeznek (például a HBE1 sejt vonal) – transzformációját megerősítsük.

Azokhoz a vírusokhoz – amelyeknél a fertőzés kezdetekor receptor-közvetítette endocitózissal lezajló felvételi funkció végbemegy, és e tulajdonságuk alapján megfelelnek a találmány szerinti konjugátum alkotórészeként – tartoznak egyrészt a lipidburok nélküli vírusok, mint adenovírus, poliovírus, rhinovírus, másrészt a burokkal rendelkező vesicular stomatitis vírus, semliki forest vírus, influenza vírus; ezenkívül megfelelnek a Moloney vírus pH értékétől függő törzsei. A vírus előnyösen az adenovírus C alcsoport, 5 típus, semliki forest vírus, vesicular stomatitis vírus, poliovírus, rhinovírusok és Moloney leukémia vírus törzsek. Mivel sok vírusnak még nem ismert teljesen a felvételi ciklusa, valószínűleg sok más vírus mutatja majd a kívánt felvételi funkciót, és így alkalmazható lesz a találmány szerinti módszerekben. A jelen találmányból adódó lényeges előny, hogy a szállítandó idegen DNS nem része a kiindulási vírus genomjának, mint a rekombináns vírus-vektorok esetében [Berkner K. L., *BioTechniques* 6, 616–629 (1988); Eglitis és Anderson *BioTechniques* 6, 608–614 (1988)]. Ennélfogva a jelen találmány nagyobb rugalmasságot nyújt a kifejezendő idegen szekvenciák kiválasztására nézve, mivel a transzkripció nem a kiindulási vírusban levő promotórektól függ. Azonkívül ez a stratégia megengedi a szállítható idegen DNS nagyságának tetemes emelését, mivel azok a megszorítások, amelyek a vírust a bevonatára nézve sújtják, a külső részen vihető DNS mennyiségét nem korlátozzák. Ezeken a gyakorlati és közvetlen előnyökön túl, a vektor tervezésből lényeges, lehetséges biztonsági jellegek származnak. A hagyományos rekombináns vírusvektorok kényszerűen magukkal viszik a kiindulási vírus genom-elemeit, amelyből lehetséges biztonsági kockázatok származnak [Ledley F. D. et al., in *Biotechnology* eds. Rehm and Reed, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim Vol. 7b H-J, 401–457 (1989); Anderson W. F., *Science* 226, 401–409 (1984)]. Mivel az adenovírus-polilizin komplexek szelektíven a vírus felvételi funkcióját használják ki, a vírusgenom nem lényeges jelleg. Ez az elképzelés megengedi a

jelen rendszer módosításának lehetőségét egy működésében és/vagy szerkezetében inaktivált vírusgenommal, a kiindulási vírus életképes génjeinek transzferéből adódó, biztonsági kockázatok minimalizálása céljából.

A jelen találmány keretei között vírus fogalom alatt értjük – feltéve, hogy a fenti meghatározás értelmében vett felvételi funkcióval rendelkeznek – a vad típusok mellett a mutánsokat is, amelyek a vad típusoknak a felvételi funkciótól eltérő bizonyos működéseit, különösen a replikáció képességét, egyszeri vagy többszöri mutációval elvesztették. A jelen találmány gyakorlatában azonban felvételi funkciójukat elvesztett mutánsokat is felhasználhatunk, amennyiben őket egy „hármaskomplex” részeként a fenti definíció szerint alkalmazzuk, és a mutáns vírus az endoszóma-litikus aktivitását nem veszítette el.

Ilyen mutánsokat azon vírusfehérje régiók szokásos mutagén kezelésével állíthatunk elő, amelyek a replikációs funkciókért felelősek és a bevonatháton keresztül komplementálhatók. Ide tartoznak például az adenovírus esetében a ts-mutánsok (temperatursensitív = hőmérsékletre érzékeny), E1A- és E1B-mutánsok, az MLP-hajító génekben mutációt szenvedett mutánsok [Berkner K. L., *BioTechniques* 6, 616–629 (1988)] és a bizonyos kapszidfehérjék terén mutációval rendelkező mutánsok. Továbbá alkalmasak olyan vírustörzsek, amelyek megfelelő spontán mutációt szenvedtek. A vírusok replikációs képességét például az irodalomból ismert tarfolt-meghatározással (plaque assay) vizsgálhatjuk, amelynél különböző víruskoncentrációjú szuszpenziókat rétegezzük sejtkultúrákra, és a lizált sejtek számát, amelyek a plakkok révén láthatóak, állapítjuk meg [Dulbecco R., *Microbiology*, 3. Edition, Ed. Davis, B. D. et al., Harper and Row, *The Nature of Viruses*, 853–884 (1980)].

A jelen találmány keretei között történő felhasználásra alkalmasak ezenkívül úgynevezett hibás vírusok, azaz amelyeknek az önálló vírusreplikációhoz szükséges funkcióhoz hiányzó egy, vagy több gén erejéig helper vírusokra van szükségük. Ennek a csoportnak a képviselői DI-partikulák („defective interfering particles”), amelyek a fertőző standard vírusból származnak, a standard vírussal azonos szerkezeti fehérjékkel rendelkeznek, mutációt szenvedtek, és a standard vírusra, mint helper vírusra van szükségük replikációjukhoz [Huang A. S., *The Molecular Basis of Viral Replication*, ed. Bercoff, R. P., Plenum Press New York and London, *The Role of Defective Interfering (DI) Particles in Viral Infection*, 191–194 (1987); Holland J. J., *Virology*, 2. Edition, Ed. Fields, B. N., Knipe, D. M. et al. Raven Press Ltd., New York, *Defective Viral Genomes*, 151–165 (1990)]. Egy másik csoport a parvovírusok osztálya, amelyet adenoszattellitaként („adeno-associated virus”) jellemeznek [Berns K. I., *Virology*, 2. Edition, Ed. Fields, B. N., Knipe, D. M. et al. Raven Press Ltd., New York, 1743–1759 (1990)].

A jelen találmány keretei között megfelelőek továbbá legyengített élő vakcinák [Ginsberg H. S., *Microbiology*, 3. Edition, Ed. Davis, B. D. et al., Harper and

Row, *Picornaviruses*, 1095–1117 (1980)], vagy oltóanyagok.

Vírus fogalom alá tartoznak továbbá a jelen találmány keretei között az inaktivált vírusok, például kémiai kezeléssel, így formaldehides kezeléssel, UV-besugárással, kémiai kezelés és UV-besugárzás kombinációjával, például psoralen/UV-kezeléssel, gamma-besugárással vagy neutronbombával inaktivált vírusok, továbbá vírus-részecskék, például a nukleinsavtól megszabadított fehérjerész (az üres vírus-kapszid), amennyiben rendelkeznek az intakt vírus felvételi funkciójával.

Inaktivált vírusokat, ahogyan például vakcinának használják azokat, az irodalomból ismert standard eljárások [Davis B. D. és Dulbecco R., *Microbiology*, 3. Edition, Ed. Davis, B. D. et al., Harper and Row, *Sterilization and Disinfection*, 1264–1274 (1980); Hearst J. E. és Thiry I., *Nucl. Acids Res.* 4, 1339–1347 (1977)] szerint állíthatunk elő, és vizsgálhatjuk abból a célból, vajon megfelelnek-e a találmány szerinti konjugátumok alkotórészeként.

Adott esetben a vírus lehet egy kiméra vírus, amely egy olyan részén, amely a felvételi funkció számára nem lényeges, egy idegen epitóppal rendelkezik. Kiméra vírusok azonban akkor is felhasználhatók az itt definiált „hármaskomplex” részeként a jelen találmány szerint, ha elvesztették felvételi funkciójukat, de az endoszóma-litikus tulajdonságaikat nem veszítették el.

Egy vírus, egy inaktivált vírus vagy egy víruskomponens kiválasztása az egyedileg végrehajtandó transzfekcióhoz, például úgy történik, hogy a vírust mindelelőtt előkísérletekben megvizsgáljuk, vajon hatásos van-e a nukleinsav/polikation komplexnek a célsejtbe történő felvételére. Továbbiakban vizsgálhatjuk a felvételi funkcióját, ahol alkalmazzuk, biokonjugátumokkal, például transzferrin-polikation-konjugátumokkal, vagy egy másik, a transzformálódó célsejtre specifikus biokonjugátummal történő transzfekciónál, és megvizsgáljuk géntranszferkapacitást növelő képességét egy riporter gént kifejeződésének mérésével.

Intakt vírusok felhasználása esetén célszerűen párhuzamosan az előkísérletekkel, a vírusnak a tervezett transzfekcióban való alkalmasságát egy nukleinsav-affin anyaggal kötött internalizáló faktort tartalmazó második konjugátum jelenlétében vagy anélkül vizsgáljuk annak eldöntésére, hogy replikációra képes-e a vírus. A replikációs képesség vizsgálata citopatogén vírusok vagy olyan vírusok esetében, amelyek a gazdasejt növekedését észrevehetően korlátozzák, tarfolt módszer segítségével történik (leírást lásd fent). Más vírusoknál a mindenkori vírusról speciális kimutatási módszereket alkalmazzuk, például hemagglutinációs tesztet vagy fizikai-kémiai módszereket (elektronmikroszkópos vizsgálatot).

A jelen találmány keretei között olyan vírusokat részesítünk előnyben, amelyek magas titerrel állíthatók elő, stabilak, vad típusaik csekély patogenitást mutatnak, és amelyeknél lehetséges a replikációs funkció célzott kikapcsolása, különösen adenovírusokat. Amikor egy meghatározott sejtpopulációt kell transzformálni, azokat a vírusokat részesítjük előnyben, ame-

lyek specifikusan ezt a sejtpopulációt fertőzik. Abban az esetben, ha a transzfekciónak különböző sejttípusokra kell kiterjednie, olyan vírusokat alkalmazunk, amelyek a sejttípusok széles körére nézve fertőzőek.

A jelen találmány in vivo terápiás alkalmazása szempontjából minden esetben csak olyan vírusok vagy víruskomponensek jöhetnek szóba, amelyeknél a biztonsági kockázatokat – különösen a vírusnak a sejtben való replikálódását illetően, mint a vírus DNS rekombinációját a gazdasejt DNS-sel – a legmesszebbmenőkig lecsökkentjük.

A jelen találmányhoz végzett előkísérletekben inaktivált adenovírus preparátumokat készítettünk egy szokásos UV-sterilizáló lámpa vagy formaldehid segítségével, és meglepő módon azt állapítottuk meg, hogy a vírusok inaktiválódásának mértéke jóval nagyobb volt, mint a géntranszfer-hatás csökkenése. Ez egyértelműen arra utal, hogy azok a mechanizmusok, amelyek az aktív vírusoknál a normális fertőzési mechanizmussal vannak összefüggésben, tönkreteszhetők anélkül, hogy a géntranszfer számára lényeges hatás eltűnne.

A jelen találmány keretei között alkalmazható nukleinsav-affin anyagok például homológ polikationok, mint polilizin, poliarginin, poliornitin vagy heterológ, két vagy több különböző, pozitív töltésű aminosavat tartalmazó polikationok, amelyek különböző lánc-hosszúságúak lehetnek, továbbá nem peptid jellegű szintetikus polikationok, mint a poli(etilén-imin). Alkalmas nukleinsav-affin anyagok továbbá a természetes, polikation karakterű DNS-kötő fehérjék, mint a hisztonok vagy protaminok, illetve ezek analógjai vagy fragmentumai.

A találmány szerinti komplexek a víruskonjugátum mellett még egy további konjugátumot tartalmazhatnak, amelyben egy nukleinsav-affin anyag – általában ugyanaz, mint a víruskonjugátumban – egy olyan internalizáló faktorról van összekapcsolva, amely a célsejtekre nézve affinitást mutat. A jelen találmánynak ezt a kiviteli formáját különösen akkor használjuk, ha a célsejt a vírus számára nem, vagy csak kevés receptorral rendelkezik. Egy további internalizáló faktor/kötőfaktor-konjugátum jelenlétében a vírus kihasználja a második konjugátum internalizáló képességét ezzel együtt kapcsolódva a nukleinsavhoz komplexként, és az így előálló kombinációs komplex részeként kerülve be a sejtbe.

Egyedileg, előkísérletekben meghatározható, hogy vajon egy internalizáló faktor alkalmazása lehetővé teszi-e, vagy megkönnyíti-e a nukleinsav-komplex felvételét. Egy ilyen vizsgálat magában foglal párhuzamos nukleinsav-komplex transzfekciókat, először internalizáló faktor kiegészítés nélkül, azaz nukleinsavból és víruskonjugátumból álló komplexekkel, másrészt olyan komplexekkel, amelyekben a nukleinsav egy további, a célsejtek receptorainak megfelelő internalizáló faktort és egy nukleinsavaffin anyagot tartalmazó konjugátummal van összekötve. Amennyiben egy kiegészítő internalizáló faktort alkalmazunk, ezt mindenekelőtt a célsejtek határozzák meg, például egy sejttípusra specifikus sejtfelületi antigének vagy receptorok által, amelyek lehetővé teszik a nukleinsav célzott bevitelét ebbe a sejttípusba.

A jelen találmány célkitűzésének megfelelően internalizáló faktor alatt olyan ligandumok vagy azok fragmentumai értendők, amelyek a sejthez való kötődést követően endocitózissal, előnyösen receptor-közvetítette endocitózissal internalizálódnak, vagy olyan faktorok, amelyeknek kötődése/internalizálódása a sejtmembrán elemeivel történő fúzióval következik be. A megfelelő internalizáló faktorok közé tartoznak a transzferrin ligandumok [Klausner R. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2263–2266 (1983)], konalbumin [Sennett C. et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 1053–1086 (1981)], aszialo-glikoproteinek (mint aszialo-transzferrin, aszialo-rozomukoid vagy aszialo-fetuin) [Ashwell G. et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 531–554 (1982)], illetve olyan anyagok, amelyek galaktózt tartalmaznak, és az aszialo-glikoprotein-receptoron keresztül internalizálódnak; mannóz tartalmú glikoproteinek [Stahl P. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1399–1403 (1978)], lizoszóma enzimek [Sly W. et al., *J. Cell Biochem.*, 18, 67–85 (1982)], LDL [Goldstein J. L. et al., *Clin. Res.*, 30, 417–426 (1982)], módosított LDL [Goldstein J. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 333–337 (1979)], olyan lipoproteinek, amelyeket a sejt a receptorokon keresztül vesz föl (apo B100/LDL); vírusfehérjék, mint a gp120 HIV-fehérje; antitestek [Mellmann I. S. et al., *J. Cell Biol.*, 98, 1170–1177 (1984); Kuhn L. C. et al., *Trends Biochem. Sci.*, 7, 299–302 (1982); Abrahamson D. R. et al., *J. Cell Biol.*, 91, 270–280 (1982)], illetve azok sejtfelszíni antigének elleni fragmentumai, például anti-CD4, anti-CD7; citokinek, mint interleukin-1 [Mizel S. B. et al., *J. Immunol.*, 138, 2906–2912 (1987)], interleukin-2 [Smith K. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 864–867 (1985)], TNF [Imamura K. et al., *J. Immunol.*, 139, 2989–2992 (1987)], interferonok [Anderson P. et al., *J. Biol. Chem.*, 257, 11301–11304 (1982)]; CSF („Colony-stimulating Factor” = kolóniasztimuláló faktor) [Walker F. et al., *J. Cell Physiol.*, 130, 255–261 (1987)], faktorok és növekedési faktorok, mint inzulin [Marshall S., *J. Biol. Chem.*, 250, 4133–4144 (1985)], EGF („Epidermal Growth Factor” – hám eredetű növekedési faktor) [Carpenter G., *Cell*, 37, 357–358 (1984)]; PDGF („Platelet-derived Growth Factor” = vérlemezke eredetű növekedési faktor) [Heldin C-H. et al., *J. Biol. Chem.*, 257, 4216–4221 (1982)], TGF β („Transforming Growth Factor β ” = transzformáló β növekedési faktor) [Massague J. et al., *J. Cell Physiol.*, 128, 216–222 (1986)], idegnövekedési faktor [Hosang M. et al., *EMBO J.* 6, 1197–1202 (1987)], inzulinhoz hasonló növekedési faktor I („Insulin-like Growth Factor”) [Schalch D. S. et al., *Endocrinology*, 118, 1590–1597 (1986)], LH, FSH [Ascoli M. et al., *J. Biol. Chem.*, 253, 7832–7838 (1978)], növekedési hormon [Hizuka N. et al., *J. Biol. Chem.*, 256, 4591–4597 (1981)], prolaktin [Posner B. I. et al., *J. Cell Biol.*, 93, 560–567 (1982)], glukagon [Asada-Kubota M. et al., *Exp. Pathol.*, 23, 95–101 (1983)], tiroid-hormonok [Cheng S-Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3425–3429 (1980)], α -2-makroglobulin-proteáz [Kaplan J. et al., *J. Biol. Chem.*, 254, 7323–7328 (1979)],

valamint a hatástalanított toxinok. További példák az immunglobulinok vagy fragmentumaik, mint az Fc-receptor ligandumjai, vagy anti-immunglobulin antitestek, amelyek az SIg-khez („Surface Immunglobulins”= sejtfelszíni immunglobulinok) kötődnek. A ligandumok természetes vagy szintetikus eredetűek lehetnek [lásd Trends Pharmacol. Sci., (1989) és az abban található hivatkozásokat].

A jelen találmány keretei között az ilyen internalizáló faktorok alkalmazása szempontjából lényegesek a következők:

a) hogy specifikus sejttípus által, amelyikbe a nukleinsavat be kell vinni, internalizálhatók legyenek; és internalizáló képességüket ne, vagy lényegesen ne befolyásolja amikor a kötőfaktorral konjugáljuk őket, és

b) hogy ezen tulajdonságuk keretein belül képesek arra, hogy a nukleinsavat az általuk használt útvonalon keresztül a sejtbe a „háttukon” („piggyback”) bevigyük.

Anélkül, hogy ezt az elméletet rögzíteni akarnánk, a kombinációs komplexeket a sejtek vagy az internalizáló faktorra specifikus felületi receptorhoz történő kötés révén, vagy vírus vagy egy víruskomponens alkalmazása esetén a vírusreceptorhoz vagy mindkét receptorhoz történő kötés révén, receptorközvetítette endocitózis útján veszik föl. Amikor a vírus szabaddá válik az endoszómákból, a vírussal komplexben levő DNS is kikerül a citoplazmába és ezáltal megmenekül a lizoszomális lebontástól.

Vírus hozzákötése a nukleinsav-affin anyaghoz a következő előnyöket eredményezi:

1) A géntranszfer-technika szélesebb körű alkalmazhatóságát nukleinsav-komplexekkel, mivel maguk a vírusok alkothatják az internalizáló faktort, vagy egy másik internalizáló faktort (például transzferrinnel vagy aszialo-fetuinnal stb.) együttesen képezhetnek komplexet a DNS-sel. Ezáltal lehet a vírusok pozitív hatását kihasználni még olyan sejtekben is, amelyek nem rendelkeznek az illető vírushoz receptorral.

2) A géntranszfer hatásfokának javulását, mivel a vírusoknak a DNS-hez történő kötődése által biztosítva van a sejtbe történő együttes felvételük. A vírusok és DNS-ek összehangolt felvétele és kiszabadulása révén lehetővé válik továbbá a hatásos géntranszferhez szükséges vírus és DNS mennyiség csökkentése, ami különösen in vivo alkalmazásnál lényeges jelentőségű.

A jelen találmány szerint elvégzett kísérletekben humán transzferrint alkalmaztunk kiegészítő internalizáló faktorként, azonkívül a találmány szerinti konjugátumokat DNS-ből és polilizin-konjugált vírusból álló komplexek segítségével mutattuk be, amelyek nem tartalmaztak kiegészítő internalizáló faktorkötőfaktor konjugátumot.

A vírus hozzákötését a nukleinsav-affin anyaghoz a nukleinsav-affin anyagnak egy antitesthez történő kovalens kötésével végezzük. Előnyösen olyan antitestet használunk, amely egy vírusfehérje régiójának egy olyan epitópjához kötődik, amely a vírus felvételi funkciójában nem vesz részt.

A jelen találmány keretei között elvégzett kísérletekben egy adenovírus és egy polikation közötti kötést

valósítottunk meg azáltal, hogy az adenovírus-kapszidra specifikus antitestet egy polilizin molekulával kovalensen konjugáltuk. Ismert, hogy az adenovírus-fiber és -pentonfehérjék a vírusnak a sejthez való kötődéséhez és felvételéhez lényegesek, miközben a fő kapszidfehérje, a hexon ezekben a folyamatokban csekélyebb szerepet játszik. Ezért egy olyan antitestet építettünk be, amely az adenovírusnak polilizinnel való összekötését a hexon-fehérje egy epitópjának a felismerése révén valósítja meg. Nem-neutralizáló anti-hexon monoklonális antitestekről számol be Russell [Russell W. C. et al., J. Gen. Virol. 56, 393–408 (1981)]. Ezt a specifikus kötést létrehozhatjuk egyrészt egy olyan kiméra adenovírus használatával, amely hexon-fehérjéinek felületén egy idegen epitóppal rendelkezik. Másrészt egy olyan monoklonális antitest beépítésével, amely a heterológ epitóra specifikus. (Ezt a szerkezetet vázlatosan az 1. ábrán mutatjuk be.) Ez az adenovírusnak polilizinnel való összekötését eredményezi anélkül, hogy a kapszid-fehérjét funkcionálisan tönkretettük volna.

Speciális antitest felhasználása a vírus és a nukleinsavkötő anyag között kötés létesítéséhez nem jelent nehézséget. A kitétel egy bizonyos antitest alkalmazására nézve, hogy a vírus felvételi funkcióját ne, vagy csak részben semlegesítse.

A jelen találmány keretei között olyan vírusfehérje régiók epitópjai elleni antitesteket részesítünk előnyben, amelyek a felvételi funkció számára nem nélkülözhetetlenek. Ilyen vírus régiókra példák a már említett adenovírus hexon-fehérje, vagy az influenza neuraminidáz.

Vannak azonban olyan alkalmas antitestek is, amelyek olyan vírusfehérjékre specifikusak, amelyek részt vesznek a felvételi funkcióban, amennyiben a megfelelő sztöchiometriai viszonyok betartását biztosítjuk, hogy az antitest a vírus sejt kötő régiójának csak egy részét foglalja le, és ezáltal még elegendő domén marad szabadon a vírusnak a sejthez való kötődéséhez. Másrészt, alkalmazhatunk olyan antitesteket, amelyek a vírus felvételi funkcióját blokkolják, amennyiben ezen kívül egy második, internalizáló faktorból és nukleinsav-affin anyagból álló konjugátumot tartalmaz (tehát egy „hármass komplex” áll rendelkezésre). A specifikus alkalmazási esethez megfelelő antitest mennyiséget titrálás segítségével állapíthatjuk meg.

Előnyben részesítünk monoklonális antitesteket, adott esetben azok Fab'-fragmentumait.

Abban az esetben, ha a vírus egy idegen epitóppal rendelkező kiméra vírus, az antitestet ezen epitóp ellen irányítjuk. A vírus előnyösen egy olyan kiméra adenovírus, amelyben a hexonfehérjét kódoló régiót módosítottuk egy heterológ fehérjét kódoló szekvencia beírásával, amely ellen előállíthatunk egy antitestet. A hexon-fehérje egy nagyon állandó bázis-doménből és három, kevésbé állandó hurokból épül fel, amelyek a vírus felületén jól hozzáférhetőek [Roberts M.M. et al., Science, 232, 1148–1151 (1986)]. Ezekben a hurkokban több rövid régió van, amelyekben az Ad2- és Ad5-aminosav-szekvenciák eltérőek, ahol az Ad5 az

Ad2-vel összehasonlítva változásokat és kivágásokat egyaránt mutat. Ezek lehetséges helyek a heterológ génszekvenciák beillesztésére, amelyek az adenovírust immunológiailag a nukleinsav-affin anyaghoz történő kötéshez alkalmazható heterológ fehérjét kódolják. A heterológ génszekvenciát előnyösen az Ad5-génszekvencia 161–165, 188–194, 269–281, és 436–438 aminosav-pozícióiba építjük be, amelyekre a 8. ábrán az I, II, III és IV helyek jelöléssel hivatkozunk. Az Ad5-hexonon egy szubklónjának irányított („site-directed”) mutagenézisével mindegyik lehetséges helyen nyerhetünk egy, csak egyszer előforduló restrikciós helyet. A nem-állandó aminosavakat kódoló nukleotidokat ugyanakkor kivághatjuk, ahol ezáltal a heterológ génszekvenciák inszerciójára több hely marad. Az I, II, III és IV helyekre beépíthető aminosavak kis száma miatt (körülbelül 65 aminosav), a heterológ génszekvencia általában csak azokat az aminosavakat kódolja, amelyek megfelelnek az epitópoknak, valamint a kísérő szekvenciáknak egy minimális mennyiségét.

Egy heterológ fehérjére specifikus monoklonális antitest epitóp specificitását fehérje-vizsgálattal (peptid-scanning) határozhatjuk meg [Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3998 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 178 (1985); Geysen et al., *Mol. Immunol.*, 23, 709 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102, 259 (1987) és az EP-A 392 369 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés]. E módszer szerint a heterológ fehérjének nyolc aminosavból álló, egymást átfedő peptidláncait állítottuk elő szilárd-fázisú szintézissel. Például az 1. peptid 1–8. aminosavakból, a 2. peptid 2–9. aminosavakból áll, és így tovább. A peptidok a szintézist követően a szilárd hordozón maradnak. Ezekután megvizsgáljuk a hibridómasejt-kultúrák felülszóiinak vagy az azokból tisztított monoklonális antitesteknek az immobilizált peptidokkal szembeni reakcióképességét ELISA segítségével. Ha az epitóp régiót már azonosítottuk, az I, II, III és IV régiók minden egyes restrikciós helyére beilleszthető az epitóp régiót kódoló génszekvencia. Sok példa van fehérjékre és a fehérjékre specifikus antitestekre. Az átlag szakember kiválaszthat egy, a jelen találmány keretei között felhasználásra alkalmas heterológ fehérje/antitest kombinációt olyan kísérletek segítségével, amelyek a megszokott kísérletek kereteit nem haladják túl. Például egy fehérjét kódoló ismert szekvenciát, amellyel szemben ismert az antitest is, illetve ismert eljárásokkal előállítható, beépíthetünk egy adenovírus hexon-régiójába. Ennek alapján a létrejött kiméra vírusnak például egy markírozott antitesthez való immunológiai kötődését egy kompetíciós-, ELISA- vagy más immuno-assay típusal vizsgálhatjuk. Az ilyen típusú immunmeghatározási technikák jól ismertek, és az átlag szakember részéről is rutinszerűen kivitelezhetők.

Antitest-polikation-konjugátumokat kémiai úton, ismert módon állíthatunk elő per se peptidok megkötésére, ahol előnyösen a Wagner és munkatársai által [Wagner E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3410–3414 (1990)] és az EP-A1 388 758 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentésben

leírt módszer szerint járunk el.

Ha a monoklonális antitestek a nehéz lánc konstans régiójában megfelelő szénhidrát oldalláncokkal, különösen végállású szialin-savakkal rendelkeznek, a konjugátumokat a polikationoknak a szénhidrát oldallánc-hoz történő hozzákötésével állíthatjuk elő a Wagner és munkatársai [Wagner E. et al., *Biocunjugate Chemistry* 2, 226–231 (1991b)] által leírt módszer alkalmazásával.

A találmány tárgyát egy másik vonatkozásban nukleinsavat, és egy – internalizáló faktorból és egy nukleinsav-affin anyagból álló – konjugátumot tartalmazó kettős és hármas komplexek képezik, amelyeket magasabb rendű eukarióta sejtekbe viszünk be. A kettős komplexek azzal jellemezhetők, hogy az internalizáló faktor egy vírus, amely oly módon van egy antitesten keresztül a nukleinsav-affin anyaghoz kötve, hogy a konjugátum/nukleinsavkomplex alkotórészeként rendelkezik a sejtbe történő behatolás és az endoszómák tartalmának – amelyekben a komplex a sejtbe lépés után lokalizálva van – a citoplazmába történő kiengedése képességével. A hármas komplexek tartalmaznak egy további, a nukleinsav-affin anyaghoz kötődő internalizáló faktort, ahol az internalizáló faktor specifikus a magasabb rendű eukarióta sejt egy felszíni receptorára. Ilyen hármas komplexek felhasználhatók a nukleinsav olyan sejtekbe történő felvételének megkönnyítésére, amelyek nem, vagy csak kevés adenovírus receptorral rendelkeznek.

Tekintettel a nukleinsav-komplex minőségi összetételére, általában legelőször a sejtbe bejuttatandó nukleinsavat határozzuk meg. A nukleinsavat mindenképp a sejtben elérendő biológiai hatás által definiáljuk, a génterápia keretei közötti felhasználás esetében a kifejezésre juttatandó gén, illetve génkivágás – például egy hibás gén helyettesítése céljából – vagy egy gátolandó gén célszekvenciája által. A sejtbe szállítandó nukleinsavaknál DNS-ről vagy RNS-ről lehet szó, ahol a nukleotid-szekvenciára nézve nem állnak fenn korlátozások.

Ha a találmányt daganatsejteknél alkalmazzuk, mint rákvakcina bevetését, a sejtbe bevezetendő DNS előnyösen egy citokint – mint IL-2, IL-4, IFN-gamma, TNF- α – kódol. Különösen hasznos lehet citokineket – például IL-2-t és IFN-gammát – kódoló DNS-ek kombinációja. Egy további hasznos gén lehet a „Multi Drug Resistance Gene” (mdr).

A sejtbe két vagy több különböző nukleinsav-szekvenciát is be lehet vinni, például két különböző fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó plazmidot megfelelő regulátor-szekvenciák kontrollja alatt, vagy két, különböző cDNS-eket tartalmazó plazmidszerkezetet.

A sejtbe specifikus génszekvenciák gátlása céljából bevezetett, terápiásan hatásos inhibáló nukleinsavak közé tartoznak olyan génszerkezetek, amelyekből antiszenz RNS vagy ribozim íródik át. Továbbá oligonukleotidok, például antiszenz oligonukleotidok sejtbe történő bevitele is lehetséges. Antisense-oligonukleotidok előnyösen 15 vagy több nukleotidot tartalmaznak.

Adott esetben az oligonukleotidok multimerek is lehetnek. Ribozimokat előnyösen egy olyan génszerkezet részeként vihetünk be a sejtbe, amely stabilizáló gènelemeket, például tRNS-gènelemeket tartalmaz. Ilyen típusú génszerkezeteket az EP-A 0 387 775 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés ismerteti.

A nukleinsav molekulákon kívül, amelyek géneket, például virális géneket komplementaritásuk alapján gátnak, más gátló hatással rendelkező géneket is használhatunk. Erre példák az olyan gének, amelyek olyan virális fehérjét kódolnak, melyek úgynevezett transzdomináns mutációt szenvedtek [Herskowitz I., *Nature* 329, 219 (1987)]. A gének kifejeződése a sejtben olyan fehérjét szolgáltat, amelyek a megfelelő vad típusú fehérjét elnyomják, és ily módon védik a sejtet, amely celluláris immunitást szerez, miközben a vírusreplikációt megakadályozzák.

Alkalmasként olyan transzdomináns mutáns vírusfehérjék, amelyek a replikációhoz és a kifejeződéshez szükségesek, – például Gag-, Tat- és Rev-mutánsok – amelyekről kimutatták, hogy gátolják a HIV-replikációt [Trono D. et al., *Cell* 59, 113–120 (1989); Green M. et al., *Cell* 58, 215–223 (1989); Malim M. et al., *Cell* 58, 205–214 (1989)].

Az intracelluláris immunitás megszerzésének egy másik mechanizmusa magában foglalja olyan RNS molekulák kifejeződését, amelyek egy nélkülözhetetlen virális fehérje számára kötő helyet tartalmaznak, például úgynevezett „TAR Decoys” [Sullenger B. A. et al., *Cell* 63, 601–608 (1990)].

A genterápia keretei között felhasználható génekre – amelyek a jelen találmány segítségével, mint génszerkezetek alkotórészei a sejtbe juttathatók – példák a VIII. Faktor (hemofília A) [Wood W. I. et al., *Nature*, 312, 330–337 (1984)], IX. Faktor (hemofília B) [Kurauchi K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6461–6464 (1982)], adenzin-dezamináz (SCID) [Valerio D. et al., *Gene*, 31, 147–153 (1984)], α -1 antitripszin (tüdőemfizéma) [Ciliberto G. et al., *Cell*, 41, 531–540 (1985)] vagy a cisztikus fibrózis (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gén) [Riordan J. R. et al., *Science*, 245, 1066–1073 (1989)]. Ezek a példák nem jelentenek semmiféle korlátozást.

A nukleinsavak nagyságára vonatkozóan a felhasználás igen széles területen lehetséges; a jelen találmány segítségével körülbelül 0,15 kb (egy ribozim gént tartalmazó tRNS gén esetében) és 50 kb közötti nagyságrendben és e fölött vihetők be nukleinsav molekulák a sejtbe; kisebb nukleinsav molekulákat oligonukleotidként alkalmazhatunk.

Az antitest-polikation : nukleinsav molarányának meghatározásánál figyelembe kell venni, hogy a nukleinsav(ak) komplexbe vitele megy végbe. Korábbi találmányok során megállapítást nyert, hogy a nukleinsav sejtbe történő bevitelére egy optimum érhető el, amennyiben a konjugátum nukleinsav arányt úgy választottuk meg, hogy az internalizáló faktor-polikation/nukleinsav komplexek lényegében elektroneutrálisak voltak. Megállapítást nyert, hogy a sejtbe felvett nukleinsav mennyiségét

nem csökkenti, ha a transferrin-polikation-konjugátum egy részét nemkovalensen kötött polikationon keresztül visszük be, sőt bizonyos esetekben a DNS felvétel jelentős megnövekedését érhetjük el [Wagner E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4255–4259 (1991a)]. Emellett megfigyeltük, hogy a DNS a komplex belsejében toroidális szerkezetben található, 80–100 nm átmérőjű, tömörített formában. A polikation mennyiségét tehát a két paraméterre – elektroneutralitás és egy kompakt szerkezet elérésére – való tekintettel választjuk ki, ahol a polikation mennyisége, tekintettel az elektroneutralitás elérésére a nukleinsavak töltéséből adódik, és általában a DNS tömörítését is szavatolja.

Egy alkalmas módszer a találmány szerinti komplexekben található komponensek arányainak meghatározására abban áll, hogy először a sejtbe bejuttatandó génszerkezetet definiáljuk, és mint fent leírtuk, egy, az adott transzfekcióra alkalmas vírust meghatározzuk. Ezután egy olyan antitestet, amely a vírushoz kötődik, egy polikationnal konjugálunk és a génszerkezettel komplexbe visszük. Egy definiált vírusrészmennyiségből kiindulva titrálásokat végzünk, míg a célsejteket ezzel a (konstans) vírusrészmennyiséggel és a DNS-komplex csökkenő koncentrációival kezeljük. Ezen a módon állapítjuk meg az optimális DNS-komplex : vírus arányt. Egy második lépésben a sejteket a vírus/DNS-komplex keverék csökkenő koncentrációival (konstans vírus : komplex arány mellett) kezeljük, és meghatározzuk az optimális koncentrációt.

A vírus előnyösen egy adenovírus, és az adenovírus : nukleinsav-affin anyag molaránya körülbelül 1:1 és 1:100 közötti.

A polikation hossza nem döntő jelentőségű, amennyiben a komplexek lényegében elektroneutrálisak. A polilizin lánc hossz előnyben részesített tartománya körülbelül 20 és 1000 lizinmonomer között van. Egy előre megadott DNS hosszúsághoz azonban nem tartozik kritikus polikation lánc hossz. Ha a DNS 6000 bázispárból áll, és 12 000 negatív töltése van, a polikation mennyisége DNS mólonként például

60 mól polilizin 200 monomer, vagy
30 mól polilizin 400 monomer, vagy
120 mól polilizin 100 monomer, stb. lehet.

Az átlag szakember egyszerű rutin kísérletek segítségével kiválaszthat más polikation hossz és molaris mennyiség kombinációkat.

A találmány szerinti komplexeket előállíthatjuk azáltal, hogy a nukleinsav és az antitesthez kapcsolt polikation komponenseket – amelyek mindig hígított oldatok formájában állnak rendelkezésre – összekeverjük. A DNS-komplexek előállítása fiziológias sókoncentrációknál történhet. Egy további lehetőség magasabb sókoncentrációk (körülbelül 2 M NaCl) bevetése és ehhez kapcsolódva a fiziológias körülmények lassú hígítással, illetve dialízissel történő beállítás.

A nukleinsav, antitest-polikation-konjugátum és vírus komponensek összekeverésének mindenkori legmegfelelőbb sorrendjét egyedileg, előkísérletekben határozzuk meg.

A találmány tárgyát egy további vonatkozásban

nukleinsavnak magasabb rendű eukarióta sejtekbe történő bevezetésére szolgáló olyan eljárás képezi, ahol a találmány szerinti komplexekkel oly módon hozzuk kapcsolatba a sejteket, hogy bekövetkezik a komplexek internalizációja és az endoszómából történő szabaddá válásuk.

A találmány tárgyát egy további vonatkozásban gyógyászati készítmények képezik, amelyek hatásos komponensként egy – terápiásan hatásos nukleinsavból, előnyösen egy génszerkezet alkotórészeként, és egy polikationon keresztül kapcsolódó antitestből álló – komplexet tartalmaznak. Ez a készítmény előnyösen liofilizátumként vagy egy megfelelő pufferben mélyfagyasztott állapotban áll rendelkezésre, és a vírus-készítményt röviddel a felhasználás előtt keverjük össze a komplex-oldattal. Adott esetben a gyógyászati készítmény már tartalmazhatja a vírust, ebben az esetben mélyfagyasztott állapotban áll rendelkezésre. A felhasználáshoz szükséges komponensek egy transzfecció kit alkotórészeként (részben) egymástól elkülönítve állhatnak rendelkezésre, amely úgyszintén a jelen találmány tárgyát képezi. Egy ilyen transzfecció kit-ben különböző DNS-ek és/vagy különböző internalizáló faktor konjugátumok a víruspreparátumtól és/vagy az antitest konjugátumtól elválasztva állhatnak rendelkezésre. Egy specifikus alkalmazásnál a beadandó alkotórészekről függően, a szakmában használatos eljárások valamelyikével különböző transzfecció kit-eket tervezhetünk a lehető legnagyobb rugalmasság biztosítására.

A terápiás alkalmazás tervszerűen történhet, előnyben részesítjük az intravénás útvonalat. Ennek az alkalmazási formának a célszervei például a máj, lép, tüdő, csontvelő és a daganatok.

Nemrég adódott a lehetőség mioblasztok (éretlen izomsejtek) alkalmazására, gének egerek izomrostjaiba való bevitelére. Mivel a mioblasztokról kimutattuk, hogy a génterméket a véráramba kiválasztják, ez a módszer szélesebb alkalmazásra találhat az izomsejtek genetikai hibáinak a kezelésénél, mint például az izomdisztrófiával összefüggő hibáinál. Tehát génebeszetileg előállított mioblasztok használhatók olyan géntermékek szállítására, amelyek vagy a vérben szerepelnek, vagy a vér szállítja azokat.

Példák a helyi alkalmazásra a tüdőszövet (a találmány szerinti komplexeknek egy gyógyászati készítmény részeként történő alkalmazása, amely például becspeptetéshez egy folyadékot vagy belélegzésre egy aeroszolt tartalmaz). Ezenkívül a találmány szerinti gyógyászati készítmények beadhatók közvetlen injekcióval az izomszövetbe vagy egy daganatba, vagy helyi alkalmazással a gyomor- és bélrendszerbe.

A gyógyászati alkalmazás ex vivo is végbemehet, ahol a kezelt sejteket – például csontvelő-sejteket, hepatocitákat vagy daganatsejteket – visszavezetjük a testbe [Ponder K. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1217–1221 (1991)].

Bármilyen inert, gyógyászati elfogadható hordozót alkalmazhatunk, például konyhasó-oldatot vagy foszfát-pufferrel készített konyhasó-oldatot vagy bármilyen

olyan hordozót, amelyben a DNS-komplexek megfelelően oldhatók ahhoz, hogy a jelen találmány keretei között felhasználhatók legyenek. A gyógyászati készítmény formulázási módszereit illetően a Remington's Pharmaceutical Sciences 1980 (Mack Publ. Co., Easton, PA, Osol ed.) kiadványára hivatkozunk.

A géntranszfer számára létrehozott adenovírus-antitest-polikation/DNS-komplexek teljesítőképességének meghatározására DNS-ként egy Photinus pyralis luciferázt kódoló gént [De Wet J. et al., Mol. Cell Biol. 7, 725–737 (1987)] mint riportergént tartalmazó plazmidot vittünk be. A komplexek számára célsejteként HeLa-sejteket alkalmaztunk; ezek a sejtek adenovírusokra egy meghatározott sejtfelületi-receptor populációval rendelkeznek [Philipson L., J. Virol. 2, 1064–1075 (1968)]. Ha a találmány szerinti konjugátumok komponenseit (vírus, antitest-polilizin-konjugátum, DNS) kombinációban használtuk fel, a luciferáz riportergén kifejeződésére magas értékeket kaptunk (3. ábra). Összehasonlító kísérletek azt mutatták, hogy az adenovírus a nem-komplex plazmid-DNS transzferét csak csekély mértékben fokozta. Ezenkívül megállapítottuk, hogy az antitesthez kapcsolt polilizinnel komplexbe vitt DNS (vírushoz kötés nélkül) felvétele HeLa-sejtekbe nem volt említésre méltó. Ezzel szöges ellentétben, magas génkifejeződést tudtunk elérni a komplexszel, ha a DNS az antitesthez kötődés révén az adenovírral kölcsönhatásba léphetett. Ezt a hatást megszüntettük, ha a virionokat a komplexképzés előtt hőkezeltük. Mivel ez a kezelés szelektíven a virális felvételi funkciót függeszti fel anélkül, hogy a vírus szerkezeti integritását zavarná [Defer C. et al., J. Virol. 64, 3661–3673 (1990)], ezekből a kísérletekből arra lehet következtetni, hogy az adenovírus specifikus felvételi funkciói azok, amelyek a döntő hozzájárulást jelentik a géntranszfer sikerességéhez. Továbbá megállapítottuk, hogy a kiméra adenovírus felületén lévő heterológ epitóp körüli versengés specifikus, polilizinhez nem kötött monoklonális antitest esetén a nettó génkifejeződésben szintén csökkenést okoz. Ez a hatás nem lépett föl, ha nem-specifikus antitestet alkalmaztunk. Ezért lényeges a specifikus kölcsönhatás az antitesthez kötött DNS és az annak megfelelő adenovírus felületi epitóp között a komplex segítségével működő géntranszport elérésére. Továbbá megállapítottuk, hogy a polilizin-komplexben lévő DNS-t az adenovírus nem vitte be említésre méltó mértékben a célsejtekbe. Ez arra utal, hogy a komplexek géntranszfer-kapacitása nem a DNS kondenzálásán alapul, hanem a riportergénnek a virionhoz való, antitestközvetítette kötődésétől függ.

Ezzel összhangban, egy olyan vírus alkalmazásával, amely nem rendelkezett a polilizinhez kapcsolt antitest által felismert epitóppal, nem tudtuk elérni azt a magas génkifejeződést, amelyet egy olyan vírussal értünk el, amelynek megvolt ez az epitópja. Ez a vírus azonban a géntranszfer mértékét a háttérnívó fölé tudta emelni. Mivel az adenovírusokról ismert, hogy makromolekulák sejtekbe történő felvételét a folyadékfázison keresztül nem specifikusan fokozni tudják [Defer C. et al., J. Virol. 64, 3661–3673 (1990)], ez az

eredmény nem volt váratlan. Az a tény, hogy ez a nem specifikus transzport a riporter gének egy érthetően csekélyebb kifejeződését okozta, mint az a specifikus vírus, amelyik kötődni tudott az antitest-polilizin/DNS-komplexhez, mutatja a komplexalkotók specifikus kötődésének fontosságát.

A plazmid-DNS kölcsönhatása polilizin-konjugátumokkal a DNS molekula szerkezetének szignifikáns változásait eredményezi, amelyet a legérthetőbben egy 80–100 nm-es toroidális szerkezetté történő szembetűnő kondenzációval jellemezünk [Wagner E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4255–4259 (1991a)]. A vírus átmérője 70–80 nm nagyságrendű [Philipson L. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 109, 2. (1983)]. Ezért a sztérikus átfedések alapján abból indultunk ki, hogy az adenovírusnak az antitest-polilizin-DNS-komplexhez viszonyított aránya ne legyen nagyobb 1:1-nél. Ebből következően a ragados üreg (coated pits) átmérője, amelyen keresztül a receptor-közvetítette endocitózis kezdő felvételi lépése megtörténik, körülbelül 100 nm [Darnell J. et al., Mol. Cell Biol., Ed. Darnell, J., Freeman, New York, 567 (1975)]. E tény alapján feltételeztük, hogy multimerek, amelyek ezt a nagyságot túllépik, felvételükben korlátozva lennének. A jelen találmány keretei között analizáltuk ezeket az összefüggéseket, ahol az adenovírust az antitest-polilizin-DNS-kompleksszel szemben moláris túlsúlyban alkalmazva kimutattuk, hogy a riporter gén kifejeződésének maximuma 1:1 aránynál következett be (4. ábra). Az elvégzett kísérletek keretein belül ezért optimális konjugátumként egy olyat határoztunk meg, amelyik egyetlen adenovírus internalizáló doménből és hozzákötött polilizin-DNS-kötődoménből áll.

A következőkben az – ezt az optimalizált arányt felmutató adenovírus-antitest-polikation-konjugátumok géntranszferének teljesíthetőségét vizsgáltuk meg. Ha a komplex logaritmikus hígítmányait juttattuk a célsejtekbe, megfelelő logaritmikus csökkenés adódott a riporter gén kifejeződésében (5. ábra), miközben említésre méltó volt, hogy 10^7 DNS molekula, amelyeket ezen vektorrendszer segítségével 10^6 HeLa-sejtre alkalmaztunk, a riporter gének kimutatható kifejeződését eredményezte. Meglepő módon tehát ilyen kevéssel, mint 10 DNS molekula sejtenként-adenovírus-polikation-DNS-komplexe formájában – egy idegen gének hatásos kifejeződését valósítottuk meg.

Ez tehát a DNS felvétel nagyságrendjére nézve a találmány szerinti konjugátumok világos fölényét mutatja a DNS-géntranszfer vektorokkal szemben, amelyeknél sejtenként nagyságrendileg 500.000 DNS molekulára van szükség [Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413–7417 (1987); Felgner P. L. et al., Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115 (1989); Maurer R. A., Focus 11, 25 (1989)]. Mivel ezek a módszerek a DNS nagyobb részét hatásosan a sejt célterületére, nevezetesen a citoszolba szállítják [Felgner P. L. et al., Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115 (1989); Malone R. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6077 (1989); Loyter A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 422 (1982)], a találmány szerinti konju-

gátumok teljesíthetősége alkalmasint nem kizárólag az idegen DNS citoplazmába történő kiengedésének fokozásán alapul; valószínűleg még további folyamatoknak is fel kell erősödniük a géntranszfer útján.

- 5 A találmány általános leírása után ugyanez jobban érthetővé válik a következő példákra történő hivatkozáson keresztül, amelyeket szemléltetés céljából bocsátunk közre, és nem jelentenek semmiféle korlátozást. Az itt hivatkozott szabadalmakat és publikációkat hivatkozásként teljes egészükben beépítettük.

Példák

A találmányt a következő példák segítségével illusztráljuk:

15

1. példa: Antitest-polilizin-konjugátumok előállítása

1) Az Ad-P202 kiméra adenovírus előállítása

- Ahhoz, hogy az Ad5-hexongénben változtatásokat foganatosítsunk, először a gén szubklónozására volt szükség. A pEcoRIA-Ad5 plazmid [Berkner K. L. és Sharp P. A. Nucl. Acids Res. 11, 6003–6020 (1983)] az adenovírus genom baloldali részét tartalmazza 0–76. m. u. (map unit – vázlatrajzi egység). A hexongén az 52. és 60. m. u. között helyezkedik el. Egy 2,3 kbp HindIII/SstI-fragmentum tartalmazza a hexongénnek azt a részét, amelyen a változtatást el kell végezni. Mivel a pEcoRIA-Ad5 plazmidban több HindIII- és SstI-hely található, szükség volt néhány közbenső plazmid elkészítésére, hogy a megváltoztatott hexongént újra vissza tudjuk ültetni az eredeti plazmidba. Egy Sall/BamHI-fragmentum (46–60. m. u.) kiegészítő HindIII- vagy SstI-helyek nélkül tartalmazza a hexongént. Először az adenovírus DNS-t a 0–76 m. u. között reklónoztuk, ahol egy olyan p142 jelű vektort (a kereskedelembe kapható pIBI24 plazmidból [IBI, Inc.] PvuII restrikciós emésztéssel levezetve, amelyet egy EcoRI linker inszerciója követett) használtunk, amelyik nem rendelkezik SstI- vagy BamHI-helyekkel. Ezután a 26. m. u.-nál eltávolítottuk a Sall-helyeket azáltal, hogy az XbaI-fragmentumot (3,7–29. m. u.) kivágtuk; a kapott vektort p142-12 jelzéssel láttuk el. Végül a kívánt HindIII/SstI-fragmentumot klónoztuk az M13mp18-ba, és ezzel készen állt a mutagenézisre. A kapott klónok egyikén a Kunkel [Kunkel T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488–492 (1985)] által leírt módszer szerint, irányított mutagenézist (site directed mutagenesis) hajtottunk végre. A hexongén 188–194 kódonjait eltávolítottuk, és helyükre egy, csak egyszer előforduló PmlI-helyet vittünk be. A kapott klónt (167-1) ezt követően PmlI-gyel hasítottuk, és egy duplaszá-
50 lú, a Mycoplasma pneumoniae P1-fehérjének 914–928. aminosavait kódoló oligonukleotidot ültettünk be [Inamine J. M. et al., Gene 73, 175–183 (1988)]. Ez az inszerció a hexon fehérje 11. hurokjában található, amely a virion külső felületén helyezkedik el [Roberts M. M. et al., Science 232, 1148–1151 (1986)]. A P1-szekvencia tartalmaz egy epitópot, amelyet a 301-es monoklonális antitest – előállítását a következőkben írjuk le – felismer. A megváltoztatott HindIII/SstI-fragmentumot a p167-1-ből izoláltuk, és az eredeti pEco-
60

RIA-Ad5 plazmidba visszakapcsoltuk. Az Ad-202 előállítását a 2. ábrán mutatjuk be.

2) A kiméra adenovírusra specifikus monoklonális antitest (MP301) előállítása

a) Immunizálás

A monoklonális antitest előállítását a standard eljárásoknak megfelelően végeztük el. Antigénként a *Mycoplasma pneumoniae* M-129 (ATCC#29342) törzset használtuk. Egy tenyésztő-edényben történő elszaporítás [Hu P. C. et al., *The Journal of Exp. Medicine* 145, 1328–1343 (1977)] után 3-szor mostuk PBS-sel, kinyertük a *Mycoplasma pneumoniae*-t; és felvettük 0,5 ml PBS-ben. Az immunizáláshoz 10 µg antigént használtunk fel: három, körülbelül 6 hetes BALB/c nőstény egeret immunizáltunk a következő vázlat szerint:

1. immunizálás: körülbelül 10 µg antigén egerenként komplett Freund-féle adjuvánsban intraperitoneálisan
2. immunizálás: körülbelül 10 µg antigén egerenként inkomplett Freund-féle adjuvánsban szubkután, az 1. immunizálás után 3 héttel
3. immunizálás: körülbelül 10 µg antigén egerenként inkomplett Freund-féle adjuvánsban intraperitoneálisan 2 héttel a 2. immunizálás után

Egy héttel ezután szérumprobákat vettünk az ege-
rekből, és meghatároztuk a szérum-titert. A legmagasabb titert mutató egér farkába intravénás injekcióval 10 µg antigént löttünk be; ennek az egérnek a lépsejtjeit 3 nap múlva kieszedtük a hibridoma sejtekkel történő fúzióhoz.

b) Fúzió

Körülbelül 10^8 lépsejtet fuzionáltattunk Köhler és Milstein módszere szerint [Köhler és Milstein, (1975)] PEG 4000 (50% szérummentes táptalajban) jelenlétében körülbelül 10^8 , az SP2/0 Ag14 (ATCC CRL-1581) vonalba tartozó mielomasejttel. Ezekután a sejteket 2 hétig HAT-szelekciós táptalajban, ezt követően HT-táptalajban, végül normál szaporító táptalajban (DMEM + 10% FCS + penicillin, sztreptomycin) tenyésztettük. Radioimmunosorbent assay (RIA) segítségével kiválogattuk az antitestet termelő klónokat, a *Mycoplasma pneumoniae* P1-fehérjével szembeni specifitást Western Blot analízissel határoztuk meg. A monoklónok fenntartására a „Soft Agar” módszert alkalmaztuk.

c) Az MP301 monoklonális antitestek adenovírus Ad-P202 semlegesítő hatásának vizsgálata

Annak megállapítására, vajon semlegesíti-e az MP301 monoklonális antitest a vírus sejtfertőző képességét, az Ad-P202 titert egyszer antitest hozzáadásával (7 µg/ml), egyszer pedig anélkül határoztuk meg, ahol célsejteként HeLa-sejteket (körülbelül 50% összefolyó 2%-os FCS/DMEM 96-lyuk-lemezen) alkalmaztunk. Az Ad-P202-ből hígítási sorozatokat készítettünk, és felvittük a HeLa-titerlemezekre antitest hozzáadásával vagy anélkül. A lemezeket 48 órán át 37 °C-on 5% CO₂ mellett inkubáltuk, kristályibolyával megszíneztük,

és IC 50-re („inhibition concentration” = gátlási koncentráció, körülbelül 50% sejt-lízis) vizsgáltuk. Antitesttel és antitest nélkül 1:2048 titert kaptunk.

5 d) MP301-polilizin-konjugátumok előállítása

A monoklonális antitest polilizinhez történő hozzákapsolását Wagner és munkatársai [Wagner E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3410–3414 (1990)], és az EP-A1 388 758 számú nyilvánosságra hozott európai szabadalmi bejelentés által leírt módszer szerint végeztük el.

- 10 Az MP301 monoklonális antitest 20,6 nmólját (3,3 mg) 1 ml 200 mM HEPES-ben pH 7,9 oldva, egy 5 mM etanolos SPDP (100 nmól) oldattal kezeltük. 3 óras szobahőn tartás után a módosított antitestet Sephadex G-25 oszlopon géliszűrtük, ahol 19 nmól, 62 nmól ditio-piridin-linkerrel módosított antitestet kaptunk. A módosított antitestet 3-merkaptó-propionáttal módosított polilizinnel (22 nmól, átlagos lánc hossz 300 lizin-monomer, FITC-vel markírozva, 56 nmól merkaptó-propionát-linkerrel módosítva) 100 mM HEPES-ben pH 7,9, argon-atmoszférában reagáltattuk. A konjugátumokat kationcserés-kromatográfiával, egy Mono S HR5- oszlopon (Pharmacia) izoláltuk. (Gradiens: 20–100% puffer. A puffer: 50 mM HEPES pH 7,9; B puffer: A puffer + 3 M nátrium-klorid. A termékfrakció 1,65 M és 2 M közötti sókoncentrációnál jelent meg. A HBS-sel (20 mM HEPES pH 7,3, 150 mM NaCl) szembeni dialízis 9,1 nmól MP301-ből és 9,8 nmól polilizinből álló konjugátumot eredményezett.
- 15
- 20
- 25
- 30

2. példa: Adenovírus-polikation-DNS-komplexek segítségével végzett géntranszfer magasabb rendű eukarióta sejtekbe

- 35 Ebben a példában elvégzett kísérletek során specifikus és nem specifikus komplex-komponensek különböző kombinációinak azon képességét vizsgáltuk, hogy be tudnak-e vinni egy riporter gént HeLa- és más sejtekbe.
- 40 Komplexbe vittük a DNS-t az antitesthez kapcsolt polilizinnel oly módon, hogy 6 µg tisztított pRSVL-DNS-t HBS-ben (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,3) 350 µl-re feltöltve meghígítottunk és 9,5 µg MP301pL-t ugyanebben a pufferben 150 µl-re feltöltve, a kettőt egyesítettük. (A pRSVL a *Photinus pyralis* luciferáz génjét tartalmazza, a Rous Sarcoma Vírus LTR Enhancer/Promoters kontrollja alatt [Uchida Y. et al., *J. Biochem.* 82, 1425–1433 (1977); De Wet J. et al., *Mol. Cell. Biol.* 7, 725–737 (1987)], Triton-X Lyse Standard módszer szerint előállítva [Maniatis T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 474 (1982)], amelyet CsCl/EtBr egyensúlyi-réteggradiens centrifugálás, butanolos színtelenítés, és 10 mM Tris/HCl pH 7,5 + 1 mM EDTA-t tartalmazó 350 µl HBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,3) oldattal szembeni dialízis követ. Az antitesthez kapcsolt polilizin mennyiségét a számított mennyiségre alapoztuk, amely a bevitt DNS elektronsemlegesítő tételezéséhez szükséges. Az antitest-polilizinnel komplexbe vitt DNS végső koncentrációját
- 50
- 55
- 60

2×10^{11} DNS molekula/ml-re, HBS-sel történő hígítással állítottuk be.

Az adenovírus P202-Ad5 végső koncentrációját jég-hideg, 2% FCS-sel kiegészített DMEM-ben meghígítva 2×10^{11} víruspartikula/ml-re állítottuk be. Antitest-polilizin-DNS-ből és víusból azonos térfogatokat egyesítettünk és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. A géntranszfer számára célsejteként HeLa-sejteket alkalmaztunk, amelyeket 5% FCS-sel, 100 I. E. penicillin/ml-rel és 100 µg sztreptomycin/ml-rel kiegészített DMEM táptalajban, 60 mm-es szövettenyésztő csészékben szaporítottunk el (300 000 sejt). A HeLa-sejtekkel összehasonlíttásképpen a HBE1-, KB- (ATCC Nr. CCL 17) és MRC-5-sejtvonalakat (ATCC Nr. CCI 171) is megvizsgáltuk. A HBE1, egy légúti sejtvonal sejtjeit F12-7X táptalajban tenyésztettük [Willumsen J. J. et al., *Am. J. Physiol.* 256, C1033–C1044 (1989)]. A KB- és MRC-5-sejteket 10%, hővel inaktivált FCS, 100 I. E. penicillin/ml, 100 µg sztreptomycin/ml, 10 mM nem-esszenciális aminosavak és 2 mM glutamin tartalmú DMEM táptalajban tenyésztettük.

A transzfekciós táptalaj alkalmazása előtt a lemezeket 30 percig hűtöttük 4 °C-on, a táptalajt eltávolítottuk, 1 ml transzfekciós táptalajt adtunk hozzájuk és a sejteket 2 órán át 4 °C-on inkubáltuk. Ezt a lépést annak érdekében tettük, hogy a DNS-komplexek megkötése a sejteken anélkül jöjjön létre, hogy már internalizálódnak. Ezután a kötési lépés után a lemezeket 3-szor mostuk jég-hideg 2% FCS/DMEM-ben, hogy a nem kötődött reakció-komponenseket a folyadékfázissal eltávolítsuk. 2 ml jég-hideg 2% FCS/DMEM hozzáadása után hagytuk a lemezeket lassan felmelegedni. Ezt követően 16 órára termosztátba tettük azokat (37 °C, 5% CO₂). A riporter gén kifejeződésének mérése sejtlyúzatumokat készítettünk, összes fehérjére standardizáltuk és pontosan a Zenke által [Zenke M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3655–3659 (1990)] leírtak szerint vizsgáltuk a luciferáz aktivitást. (A lumino métert úgy kalibráltuk be, hogy egy pikogramm luciferáznak 50 000 fényegység feleljen meg.)

Egyesítettük a pRSVL-riporter plazmid-DNS-t az adenovírus P202-Ad5-tel anélkül, hogy előzőleg a polilizin-antitest konjugátummal komplexbe vittük volna (DNS + P202-Ad5). Továbbá a pRSVL-DNS-t komplexbe vittük az antitesthez kapcsolt polilizinnel, specifikus vírus (DNS + MP301pL) jelenléte nélkül vizsgálva, és ezt a két reakció-táptalajt egy olyan reakció-táptalajjal hasonlítottuk össze, amelyik a komplex-komponensek teljes kombinációját tartalmazta (DNS + MP301pL + P202-Ad5). Ehhez hasonlóan tanulmányoztuk a komplexek teljesítményét a géntranszferben, ahol egy olyan specifikus antitestet alkalmaztunk, amelyik a komplexképzés előtt hőkezelve volt (45 °C, 30 perc) (DNS + MP301pL + P202-Ad5). Összehasonlító kísérleteket végeztünk, amelyben a specifikus adenovírus egy polilizinhez kapcsolt antitest MP301pL és egy tízszeres moláris fölöslegben levő, polilizinhez nem-kapcsolt MP301 (DNS + MP301pL + MP301 + P202-Ad5) jelenlétében, vagy az MP301pL és egy tízszeres moláris fölöslegben levő,

nem-kapcsolt irreleváns monoklonális antitest Anti-Rat IgG (DNS + MP301pL + anti-rat IgG + P202-Ad5) jelenlétében vett részt. Továbbá a specifikus vírussal történő inkubáció előtt a riporter plazmid-DNS-t nem-konjugált polilizinnek (4 µg) az antitesthez kapcsolt polilizinnel ekvimoláris mennyiségével vittük komplexbe (DNS + pL + P202-Ad5). A komplexképzési reakciót ugyanúgy elvégeztük az adenovírus WT 300 változattal, amelyikben az MP301 által felismert építóp nincs jelen, mint a specifikus P202-Ad5 vírussal. A kísérleteket összesen háromszor végeztük el. A kapott eredményeket a 3. ábrán mutatjuk be; az adatok az átlagértékeket $\pm$ SEM jelentik. A vonalkázott vízszintes vonal mutatja a nem kezelt HeLa-sejtek háttér-luciferáz aktivitását.

Eredmények

Az adenovírus-polilizin-DNS komplexek közvetítette géntranszfer teljesítő-képességének értékelésére a szentjánosbogár luciferáz gént kódoló plazmidot alkalmaztuk riporterként [De Wet J. et al., *Mol. Cell Biol.* 7, 725–737 (1987)]. A HeLa hámsejt vonalat használtuk a komplexekhez célsejteként, mivel ezek a sejtek rendelkeznek az adenovírusokra sejtfelszíni receptorok egy definiált populációjával [Philipson L. et al., *J. Virol.* 2, 1064–1075 (1968)]. Kombinációban alkalmazva, ennek a konjugátum rendszernek a komponensei a luciferáz riporter gént magas kifejeződési szinten közvetítették (3. ábra). Kontroll kísérletek azt mutatták, hogy az adenovírus nem emelte szignifikánsan a nem-komplexált plazmid DNS-nek a célsejtbe történő szállítási kapacitását. A polilizin-monoklonális antitesttel komplexben levő riporter DNS szintén nem szállított jelentős mértékben a cél HeLa sejtekbe. Szöges ellentétben ezzel, amikor a monoklonális antitesthez kötött DNS-t összehoztuk az építőpallal ellátott adenovírral, a kapott komplex magas szintű génkifejezést közvetített. Ezt a hatást megszüntette a virionoknak a komplexképzés előtti hővel történő kezelése. Mivel a hővel történő kezelés az adenovírusnak szerkezeti integritásának megmaradása mellett [Defer C. et al., *J. Virol.* 64, 3661–3673 (1990)], nyilvánvaló, hogy az adenovírus specifikus internalizáló funkciói magukban foglalják a komplexek géntranszfer kapacitásának jelentős komponensét. A kiméra adenovírus felületi heterológ építőpjáért folytatott versengés a nem-lizinezett specifikus monoklonális antitestek között szintén gyengítette a komplex által teljesített nettó génkifejezést. Ez a hatás nem mutatkozott irreleváns monoklonális antitest esetében. Tehát a monoklonális antitesthez kötött DNS és a megfelelő adenovírus felületi építőp közötti specifikus kölcsönhatás fontos a komplex által közvetített géntranszfer elősegítésében. Egybevéve ezzel az elképzeléssel, egy adenovírus, amelynek hiányzott a polilizin-antitest által felismert építőpja, nem volt képes olyan magas génkifejeződés közvetítésére, amelyet olyan vírussal értünk el, amely rendelkezett ezzel az építőpallal. Továbbá, polilizinnel komplexált DNS nem szállított jelentős mértékben a

célsejtekbe az adenovírussal, jelezvén, hogy a komplexek géntranszfer kapacitása nem a DNS kondenzációján alapul, hanem az antitest közvetítette riporter gén és virion közötti összekapcsolódás függvénye.

3. példa: A géntranszfer számára optimális adenovírus és antitest-polilizin/DNS arány meghatározása

Az elvégzett kísérletekben, amelyeknek az eredményeit a 4. ábrán mutatjuk be, az adenovírus-antitest-polilizin/DNS-komplexeknek a HeLa-sejtekbe történő géntranszfert megvalósító képességét vizsgáltuk a komplex komponenseinek különböző arányai mellett. A komplexképzési reakciókat a 2. példában megadott módon végeztük, azzal a különbséggel, hogy $2,5 \times 10^{10}$ – antitest-polilizin-konjugátummal komplexben levő – DNS molekulát használtunk, amelyhez a specifikus adenovírus P202-Ad5 különböző mennyiségeit alkalmaztuk. A sejtek szaporítása, a komplex fölville a sejtekre, a sejtek inkubálása és a riporter gén kifejeződésének meghatározása a 2. példában leírtakhoz hasonló volt. Az adatok négy különböző kísérlet átlagértékeit $\pm$ SEM jelentik.

Eredmények

A plazmid DNS és a polilizin konjugátumok kölcsönhatása jelentős szerkezeti változásokat okoz a DNS molekulában, amelyet legjobban egy 80–100 nm átmérőjű toroid struktúrába történő kondenzáció jellemez [Wagner E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4255–4259 (1991)]. Az adenovírus átmérője szintén 70–80 nm körül van [Philipson L., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 109, 2 (1983)]. Kísérletileg értékelve azt találtuk, hogy az adenovírus bevitel a polilizin-antitesttel komplexben levő DNS moláris fölöslegével a riporter gén kifejeződésében egy állandó értéket (plató) ért el egy-egy aránynál (4. ábra). Tehát az optimális konjugátum egy egyedüli adenovírus-rokon doménből és vele kapcsolódva egy egyedüli polilizin-antitest-DNS-kötő doménből áll.

4. példa: Adenovírus-polikation-DNS-komplexek géntranszfer teljesítő-képességének meghatározása

A komplex limitáló hígítmányait, amelyeket pontosan a 2. példában leírtak szerint állítottunk elő, abból a célból vizsgáltuk, hogy mennyire hatékonyak a riporter gén kimutatható kifejeződésének elősegítésében HeLa-sejtekben. A komplexképzés utána komplex logaritmikus hígításait 2% FCS/DMEM-ben készítettük el. A különböző hígítmányok 1 ml alikvot részét 60 mm-es tenyésztő-csészékre vittük, amelyek 5×10^5 HeLa-sejtet tartalmaztak. Egyórás inkubálás után (37 °C, 5% CO₂) hozzáadtunk 3 ml 5% FCS/DMEM-et és a lemezeket további 16 órán keresztül ugyanazon körülmények között inkubáltuk. A riporter gén kifejeződésének meghatározását a 2. példánál leírtak szerint végeztük el. Az 5. ábrán megadott luciferáz kifejeződés értékek megfelelnek 3. és 4. kísérlet átlagértékei $\pm$ SEM-nek. A vonalkázott vízszintes vonal mutatja a nem kezelt HeLa-sejtek háttér-luciferáz aktivitását.

Eredmények

Az adenovírus-polilizin konjugátumok géntranszférének hatásosságát vizsgáltuk az optimalizált 1:1 arány mellett. A komplex logaritmikus hígítmányait adva a célsejtekhez, az ennek megfelelő logaritmikus csökkenést kaptuk a riporter gén kifejeződésben (5. ábra). 5×10^6 DNS molekula bevitele ezzel a vektor rendszerrel 5×10^5 HeLa sejtbe, szignifikánsan kimutatható szintet eredményezett a riporter gén kifejeződésben. Tehát sejtenként 10 DNS molekula bevitele adenovírus-polilizin-DNS komplex formájában kimutatható idegen gén kifejeződést eredményezett. Ez feltűnő ellentétben áll a DNS közvetítette géntranszfer vektorok által megkívánt bemenő DNS mennyiségtől, ahol 500 000 DNS molekulára van szükség sejtenként [Felgner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413–7417 (1987); Felgner P. L. et al., Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115 (1989); Maurer R. A. Focus 11, 25 (1989)].

Az adenovírus-polilizin-DNS komplexek konfigurációjában az adenovírus rész mind endoszóma felszakító ágensként, mind a komplex ligandum doménjeként funkciók szerepet tölt be. Így tehát a komplexek egy adott célsejtre vonatkozó géntranszfer hatékonyságának tükröznie kell az adenovírus sejtfelületi receptorok relatív számát. Mind a HeLa, mind a KB sejtvonalakról tudott, hogy nagy mennyiségű adenovírus receptorral rendelkeznek [Philipson L. et al., J. Virol. 2, 1064–1075 (1968)], ennek megfelelően az érzékenység magas szintjét mutatták az adenovírus-polilizin-DNS komplexek útján végzett géntranszfernek (6. ábra). Ezzel ellentétben az MRC-5 [Precious B. és Russell W. C., Virology: A practical approach, B. W. J. Mahy, ed. (IRL Press, Oxford, Washington, DC) 193–205 (1985)] és HBE1 (nincs adat) sejteket jellemző relatíve alacsony adenovírus receptor szám tükröződik a komplexekkel ezekbe a sejtekbe közvetített géntranszfer alacsonyabb szintjében.

5. példa: Adenovírust és humán transzferrint tartalmazó kiméra komplexek előállítás

A hármas komplexek – amelyek adenovírus- és humán transzferrin-domének kombinációját tartalmazzák – előállítására az egy epitóppal ellátott adenovírust P202-Ad5 ($2,5 \times 10^{10}$ partikula) 750 μ l 2% FCS/DMEM-ben hígítottuk és a polilizinzel kapcsolt monoklonális antitesttel (2 μ g MP301pLys) 250 μ l HBS-ben egyesítettük. Az inkubációt szobahőmérsékleten 30 percig végeztük. Ezután a pRSVL plazmid-DNS-t (6 μ g) 250 μ l HBS-ben meghígítottuk, hozzáadtuk a keverékhez és további 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az eredményül kapott adenovírus-polilizin-DNS komplexekről feltételeztük, hogy az összes polilizin-tartalom alapján nem teljesen kondenzált DNS-t tartalmaznak. A DNS-kondenzáció teljessé tételére és egy humántranszferrinnek a komplexekbe történő bekebelezése érdekében, 250 μ l HBS-ben meghígított 9 μ g humán transzferrin-polilizin-konjugátumot [Wagner E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3410–3414 (1990)] adtunk az adenovírus-polilizin-DNS-komplexekhez. Végül 30 percig szobahőmérsék-

leten inkubáltuk. A kapott kiméra komplexekkel szövettenyészetek sejtjeit inkubáltuk a leírás szerint, hogy a képződött komplexek specifikus kötődését elérjük (4 °C-on 2 órán át). Ezután a lemezeket 3-szor mostuk jéghideg 2% FCS/DMEM-ben és 2 ml 2% FCS/DMEM hozzáadása után 16 órára termosztátba (37 °C, 5% CO₂) tettük. A riportergén kifejeződésének mérése az előzőekben leírtak szerint történt.

Eredmények

A molekuláris konjugátum géntranszfer vektorok specifikus internalizációját a sejtfelszíni receptorok konjugátum ligandum doménjének tropizmusá vezérli. Az internalizációt követően a géntranszfer hatékonyságát korlátozza a konjugátumból hiányzó specifikus mechanizmus a sejtvezikulum rendszerben történő bentmaradás elkerülésére. Az adenovírus-polilizin-DNS komplexek kihasználják az adenovírus közvetítette endoszóma felszakítást a géntranszfer hatékonyságának fokozására. Ebben a specifikus konfigurációban azonban az adenovírus domén a konjugátum ligandum részeként is funkcionál, korlátozva ennek a vektornak a hatásosságát az adenovírus felszíni receptorokat tartalmazó célsejtekre. Az adenovírus endoszóma felszakító képességének kihasználására, egy alternatív lehetőségként olyan hármas komplexeket állítottunk össze, amelyek egy változó sejtfelszíni ligandum részt tartalmaztak együtt egy adenovírus résszel. Ebben az elrendezésben feltételeztük, hogy az adenovírus rész közvetítene az endoszóma felszakítást az internalizáció után az adenovírus vagy a változó ligandum hatásmechanizmusa szerint. Ennek az elképzelésnek az értékelésére, olyan hármas komplexeket állítottunk össze, amelyek egy humán transzferrin ligandum domént egy adenovírus doménnel együtt tartalmaztak. Ezeknek a kiméra komplexeknek a géntranszfer hatékonyságát vetettük össze a humán transzferrin-polilizin-DNS komplexekkel [Wagner E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410–3414 (1990)] és adenovírus-polilizin-DNS komplexekkel HeLa sejtekben, egy olyan sejtvonalban, amely adenovírus és transzferrin sejtfelszíni receptorokat egyaránt tartalmazott [Heubers H. és Finch C., Physiol. Rev. 67, 520–582 (1987)]. A hármas komplexek jelentősen magasabb riportert gén kifejeződést eredményeztek, mint azok a konjugátumok, amelyek kizárólag transzferrin vagy adenovírus ligandum doménnel rendelkeztek (7A. ábra). Ennek a növekedésnek a nagysága nyilvánvalóan nem a humán transzferrin-polilizin-DNS komplexek plusz adenovírus-polilizin-DNS komplexek additív hatásán alapszik. Mivel a hármas komplexek az adenovírus vagy transzferrin útvonalon keresztül internalizálódhatnak, ez a nyilvánvaló együttműködés azt sugallja, hogy az adenovírus domén mindkét útvonalon elősegíti a belépést, valószínűleg az adenovírus közvetítette endoszómális alapján.

A hármas komplex adenovírus doménje endoszóma felszakító képességének szelektív alkalmazását bemutatandó, a kiméra komplexeket olyan sejtvonalakba vittük be, amelyek változó érzékenységet mutattak az adenovírus-polilizin-DNS komplexekre (7B. ábra). A

HBE1 légzési hámsejt vonal nagyon alacsony adenovírus-polilizin-DNS közvetítette géntranszfert mutat a HeLa sejtekkel összevetve (6. ábra), tükrözve a relatíve alacsony sejtfelszíni adenovírus populációt, amely jellemző erre a sejtvonalra. Ezzel ellentétben az adenovírus-transzferrin hármas komplexek alkalmazása a HeLa sejtekben látottakkal összehasonlítható mértékű génkifejeződést eredményezett. Ennek a sejtvonalnak az érzékenysége a hármas komplexek útján végzett géntranszferre egybevág azzal az elképzeléssel, hogy az adenovírus domén a transzferrin útvonalon internalizálódik, ahol növeli a géntranszfert az endoszómák felszakításának elősegítésével. Tehát megvalósíthatóan tűnik az adenovírus endoszómális sajátságának szelektív kihasználása molekuláris konjugátum vektorok tervezésénél, amelyek ezáltal rendelkeznek a sejt vezikulum rendszerből való kiszabadulás a képességével. Miután részletesen leírtuk a jelen találmányt, érthetővé válik, hogy a szakterületen használatos módszerekkel az eljárásnak számos, vele egyenértékű módoszata valószínűleg meg ugyanúgy, mint más paraméterekkel, anélkül hogy eltérnénk a találmány vagy annak bármely megvalósítási formája oltalmi körétől.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy nukleinsavval komplex képzésére és a nevezett nukleinsav magasabb rendű eukarióta sejtbe való bevitelére képes, egy internalizáló faktort és egy nukleinsav-affin anyagot tartalmazó konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az internalizáló faktor egy vírus, amely antitesten keresztül immunológiailag kötődik a nukleinsav-affin anyaghoz, ahol a nevezett vírus a konjugátum/nukleinsav komplex alkotórészeként képes a sejtbe történő behatolásra, és az endoszómák tartalmának – amelyekben a komplex a sejtbe lépés után lokalizálva van – a citoplazmába történő kibocsátására.

2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antitest a nevezett vírusnak egy olyan fehérjéjéhez kötődik, amelyik a vírus sejtbe történő behatolásának és az endoszómák tartalma kibocsátásának natív funkciójában nem vesz részt.

3. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a vírus egy adenovírus.

4. A 3. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antitest egy, az adenovírus hexon régiójában levő epitóphoz kötődik.

5. A 3. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az adenovírus egy kiméra vírus, amely a hexonfehérjét kódoló szekvenciának megfelelő 188–194. kodonok helyén a Mycoplasma pneumoniae P1 fehérje 914–928. aminosavait kódoló szekvenciát tartalmazza, és hogy az antitest immunológiailag a P1-régióhoz kötődik.

6. A 2. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antitest egy monoklonális antitest.

7. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsav-affin anyag egy polikation.

8. A 7. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a polikation polilizin.

9. Egy nukleinsav és az 1. igénypont szerinti konjugátum komplexe.

10. A 9. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a nukleinsav egy olyan génszerkezet, amely egy terápiásan aktív gént tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a gén génterápiában aktív gén vagy génszekció.

12. A 10. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a génszerkezet egy olyan nukleinsav-szekvenciát tartalmaz, amelyből olyan RNS molekulák írhatók át, amelyek a sejtfunkciókat specifikusan gátolják.

13. A 9. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a konjugátum tartalmaz egy vírust, amely önmagában (per se) egy internalizáló faktor a magasabb rendű eukarióta sejt számára.

14. A 9. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a konjugátum tartalmaz egy olyan vírust, amely önmagában nem internalizáló faktor a magasabb rendű eukarióta sejt számára, és hogy a komplex tartalmaz még egy internalizáló faktort.

15. A 9. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy tartalmaz még egy nukleinsav-affin anyaghoz kötött internalizáló faktorból álló második konjugátumot, nevezett internalizáló faktor specifikus egy magasabb rendű eukarióta sejt egy felületi receptorára, ahol a vírus konjugátum és az internalizáló faktor konjugátum a nukleinsavval komplexben van.

16. A 15. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a második konjugátum nukleinsav-affin anyaga egy polikation.

17. A 16. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a nevezett polikation polilizin.

18. A 16. igénypont szerinti komplex, *azzal jellemezve*, hogy a második konjugátum internalizáló faktorra transzferrin.

19. Eljárás nukleinsav bevitelére magasabb rendű eukarióta sejtekbe, amely a sejteknek a 9., 14. vagy 15. igénypontok bármelyike szerinti komplexszel való kezeléséből áll.

20. Gyógyszerkészítmény, amely hatóanyagként a 9., 14. vagy 15. igénypont szerinti komplexet és egy gyógyszerészeti elfogadható hordozót tartalmaz.

21. Transzfekciós kit, amely a 9., 14. vagy 15. igénypontok szerinti komplexek komponenseit különálló vagy részben különálló alkotórészekként tartalmazza.

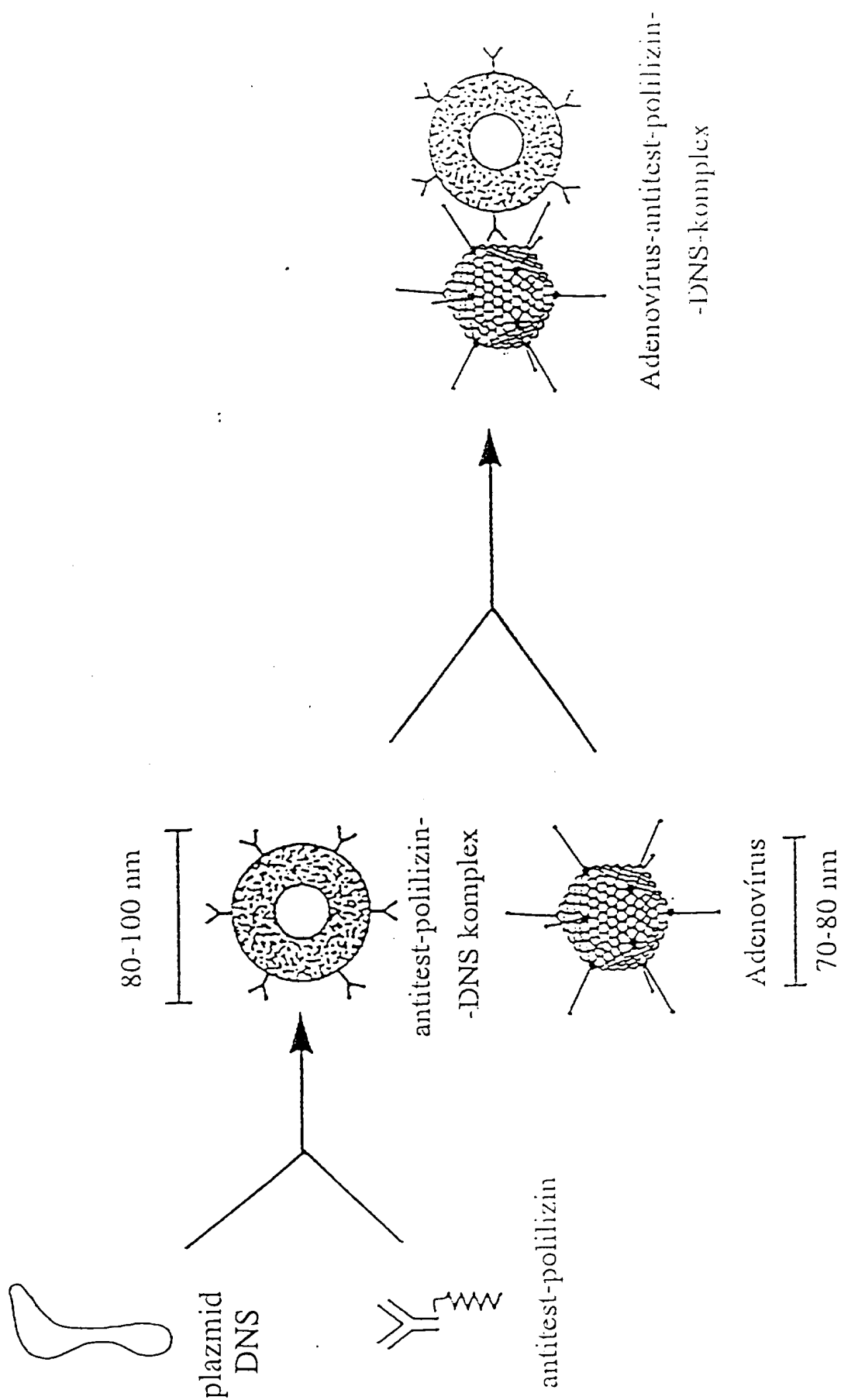
22. Az 1. igénypont szerinti konjugátum lényegében ahogy itt leírtuk hivatkozással a mellékelt példákra.

23. Egy nukleinsav és egy konjugátum komplexe lényegében ahogy itt leírtuk hivatkozással a mellékelt példákra.

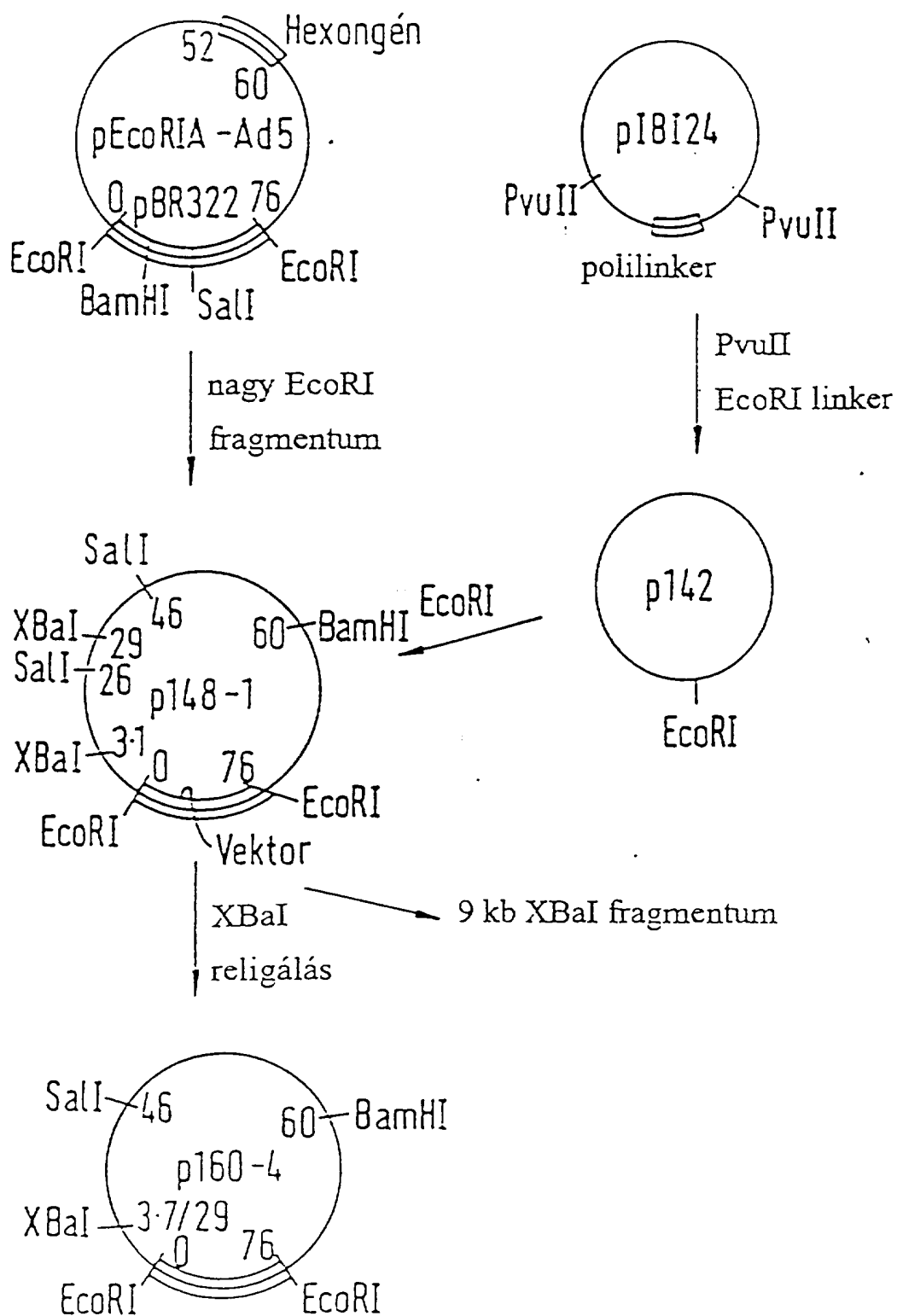
24. Egy gyógyszerkészítmény lényegében ahogy itt leírtuk hivatkozással a mellékelt példákra.

25. Egy transzfekciós kit lényegében ahogy itt leírtuk hivatkozással a mellékelt példákra.

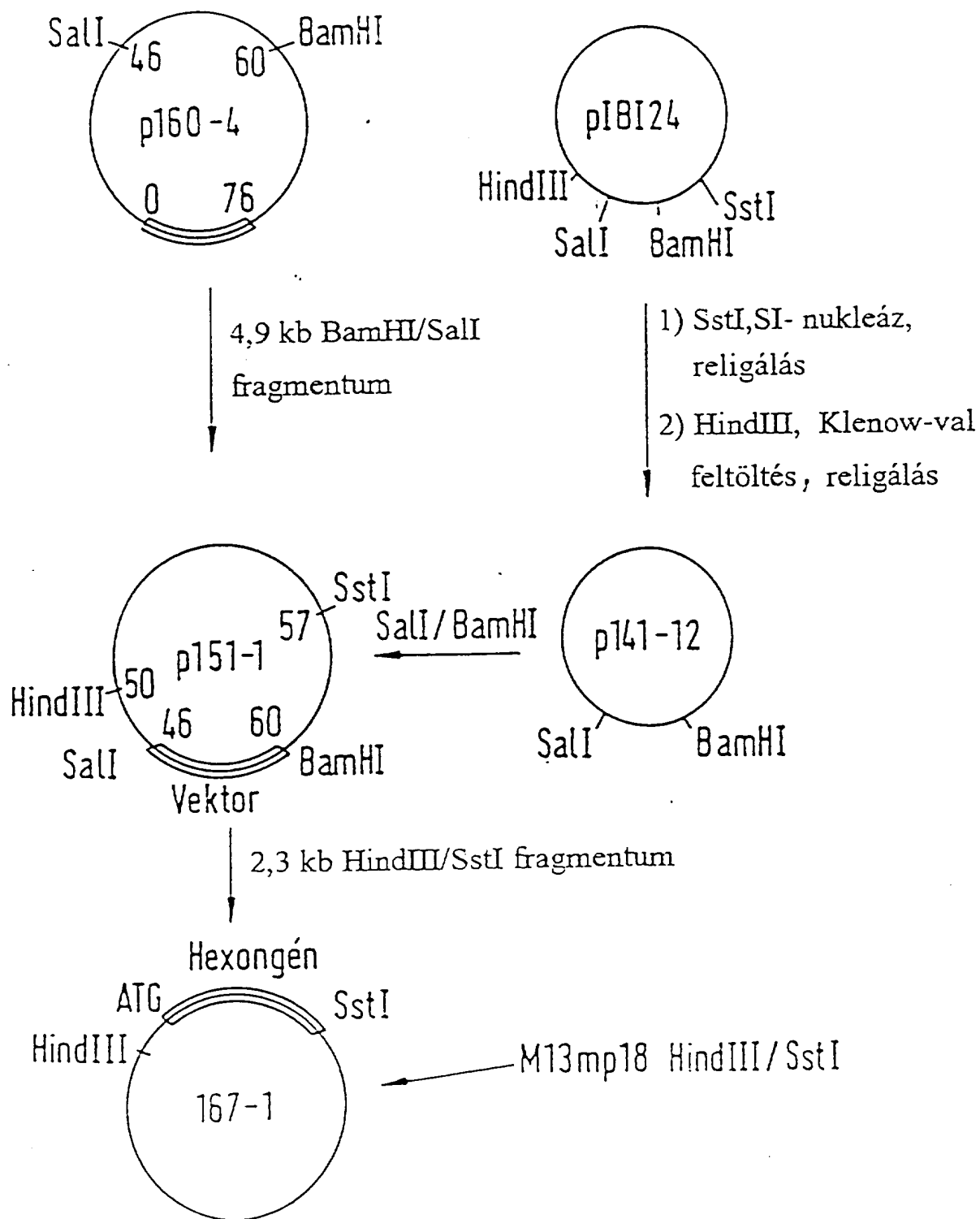
1. ábra

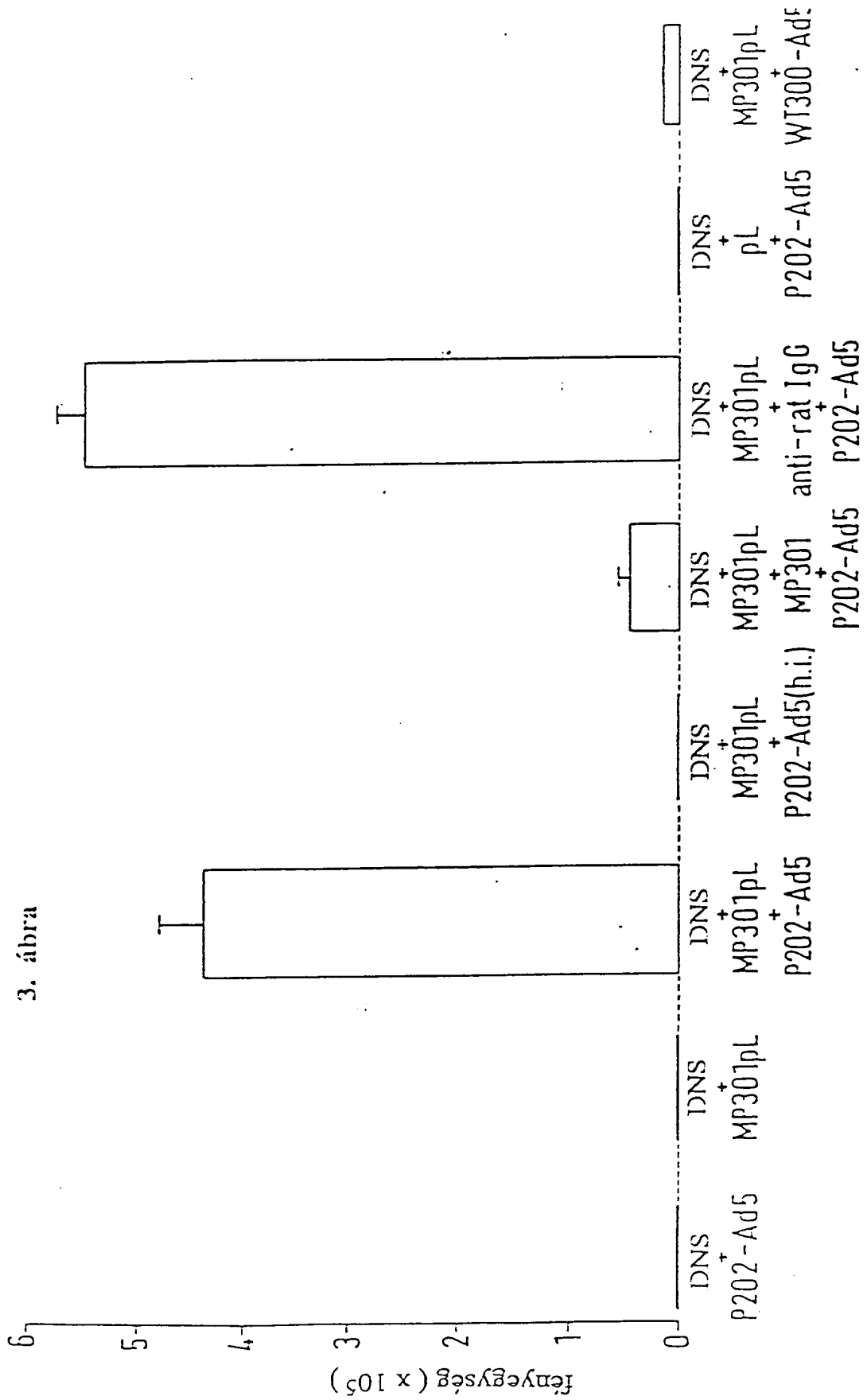


2.A. ábra

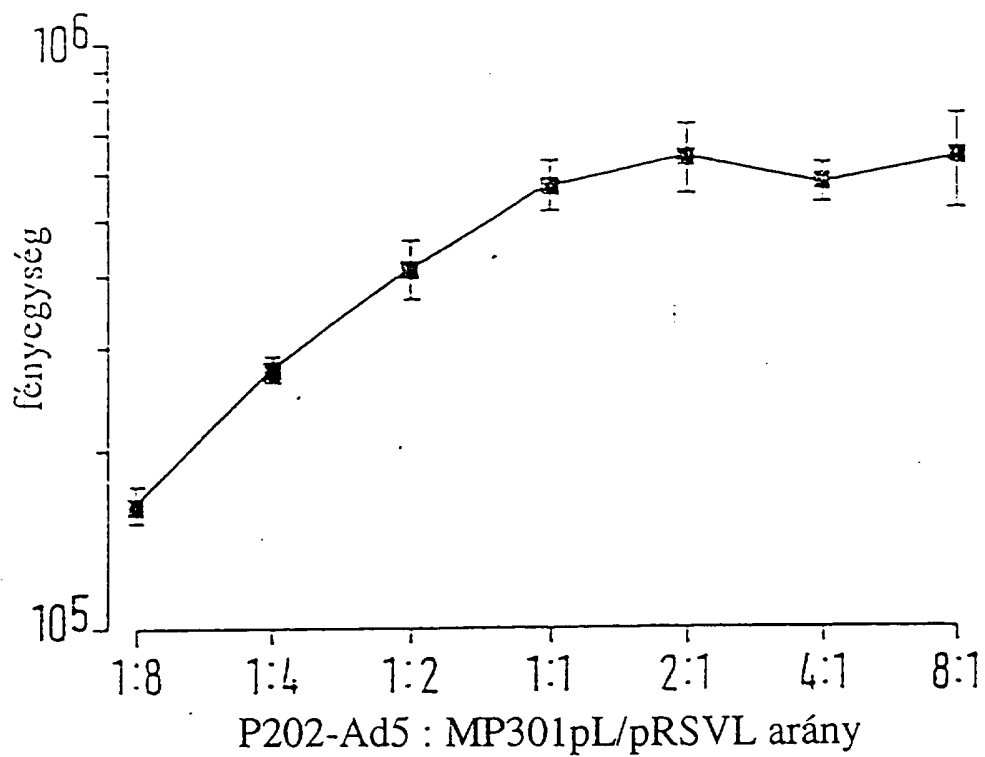


2B. ábra

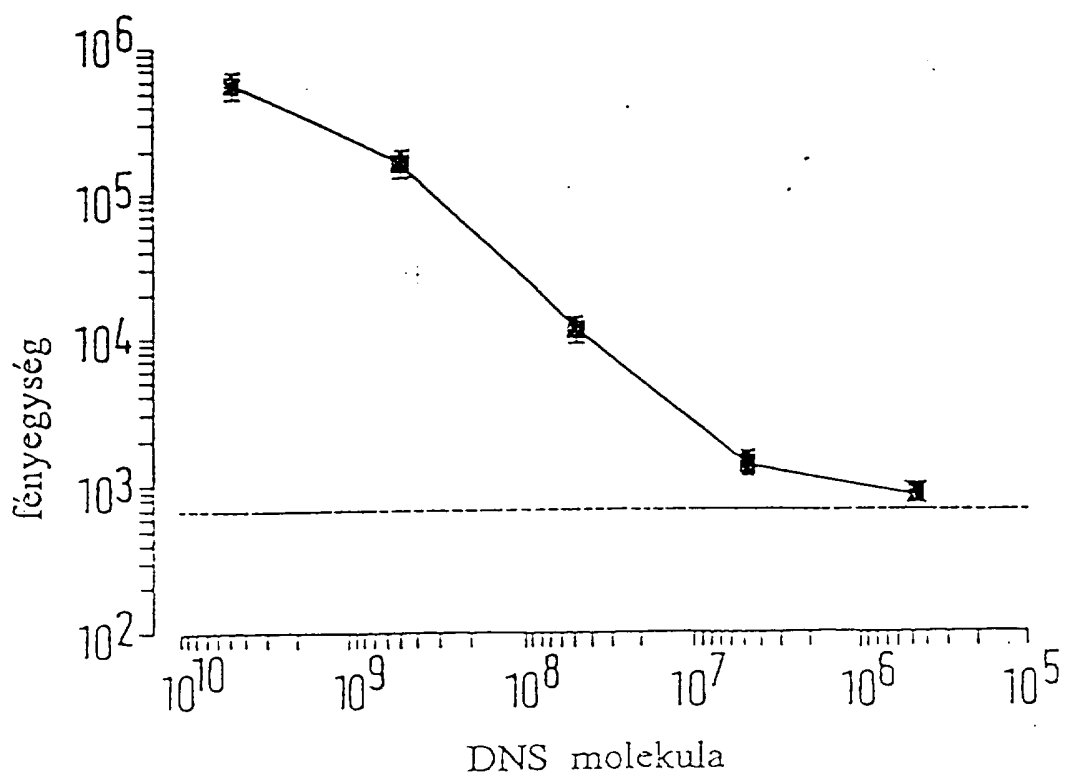




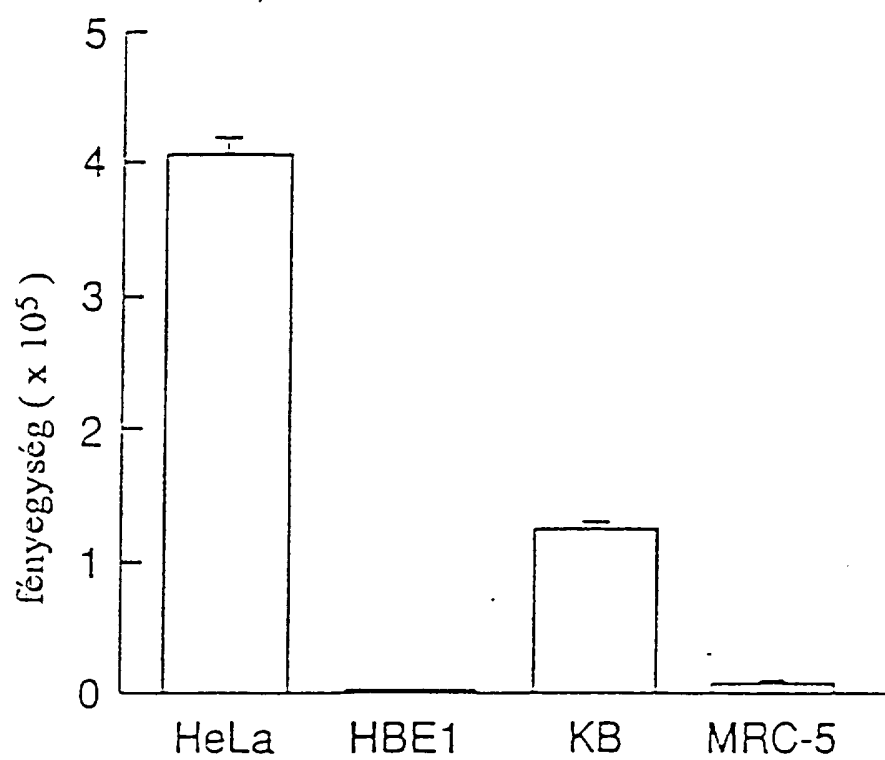
4. ábra



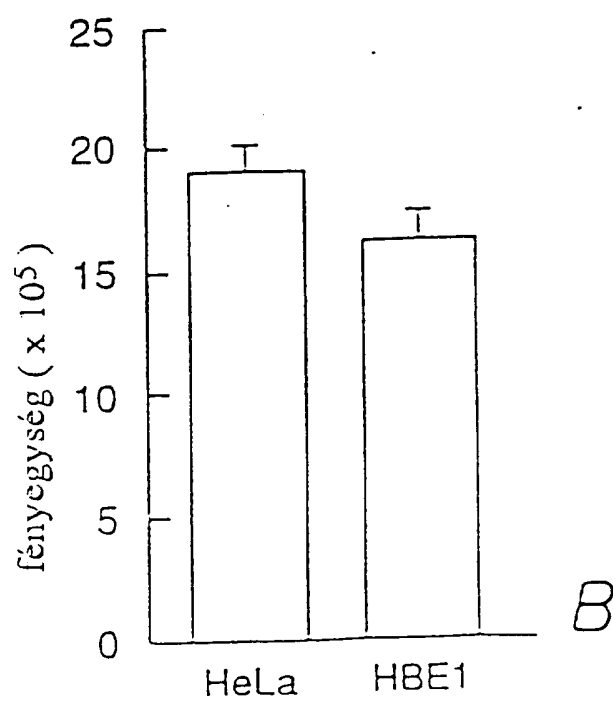
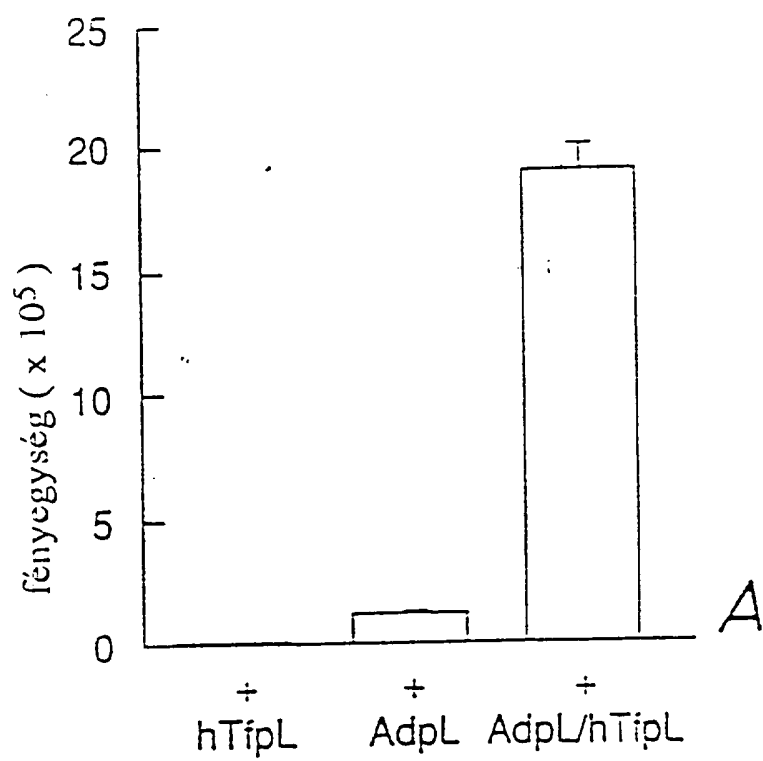
5. ábra



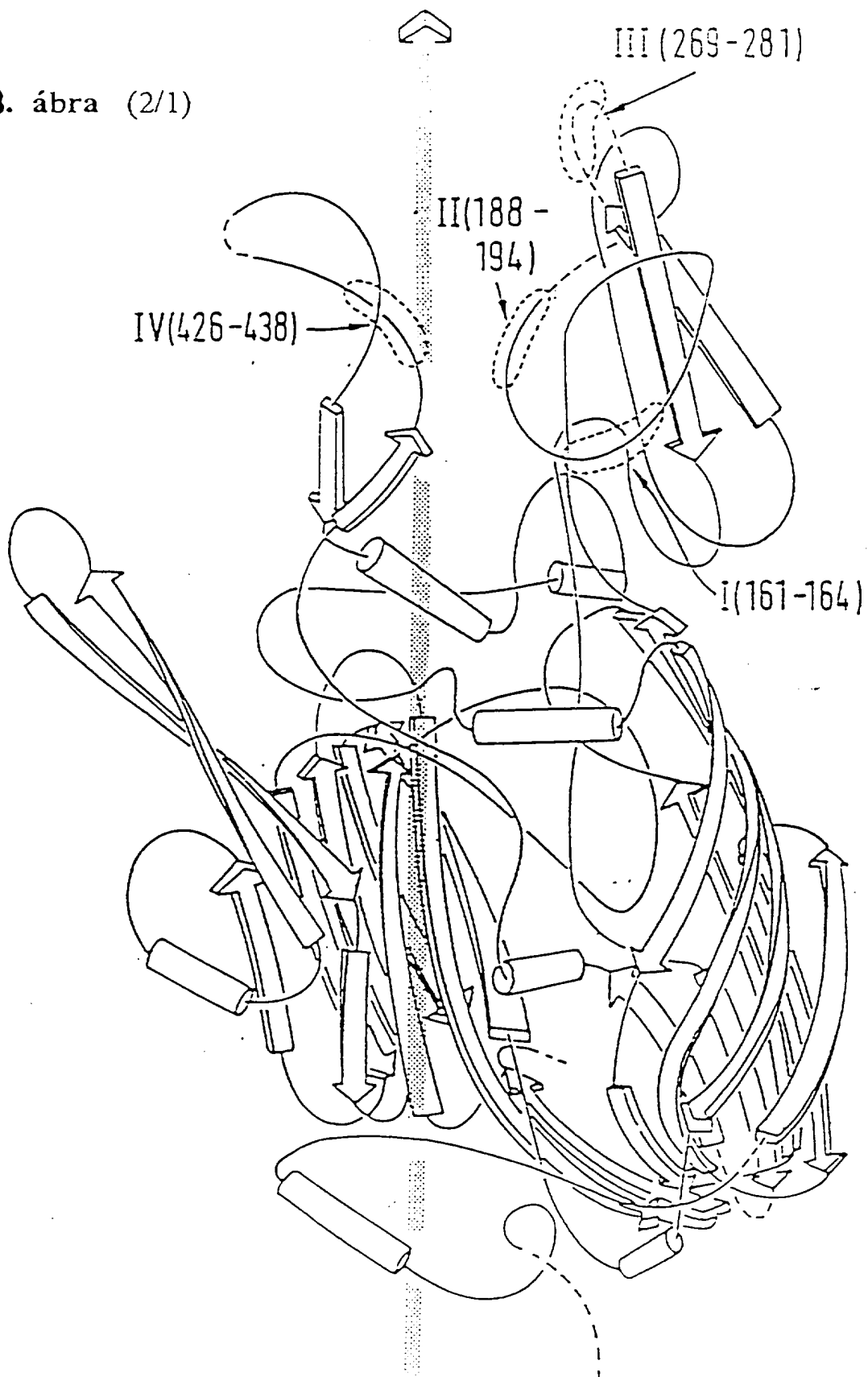
6. ábra



7. ábra



8. ábra (2/1)



8. ábra (2/2)

I: -160-GCT-GAG-CAG-CAA-165-
 ↓ mutagenesis

GAT ATC

Eco RV

II: -187-GTC-GAA-GGT-CAA-ACA-CCT-AAA-195-
 ↓ mutagenesis

CAC GTG

Pml I

III: -268-TCA-ACT-ACT-GAG-GCG-ACC-GCA-
 GGC-AAT-GGT-GAT-AAC-TTG-ACT-282-
 ↓ mutagenesis

AGT ACT

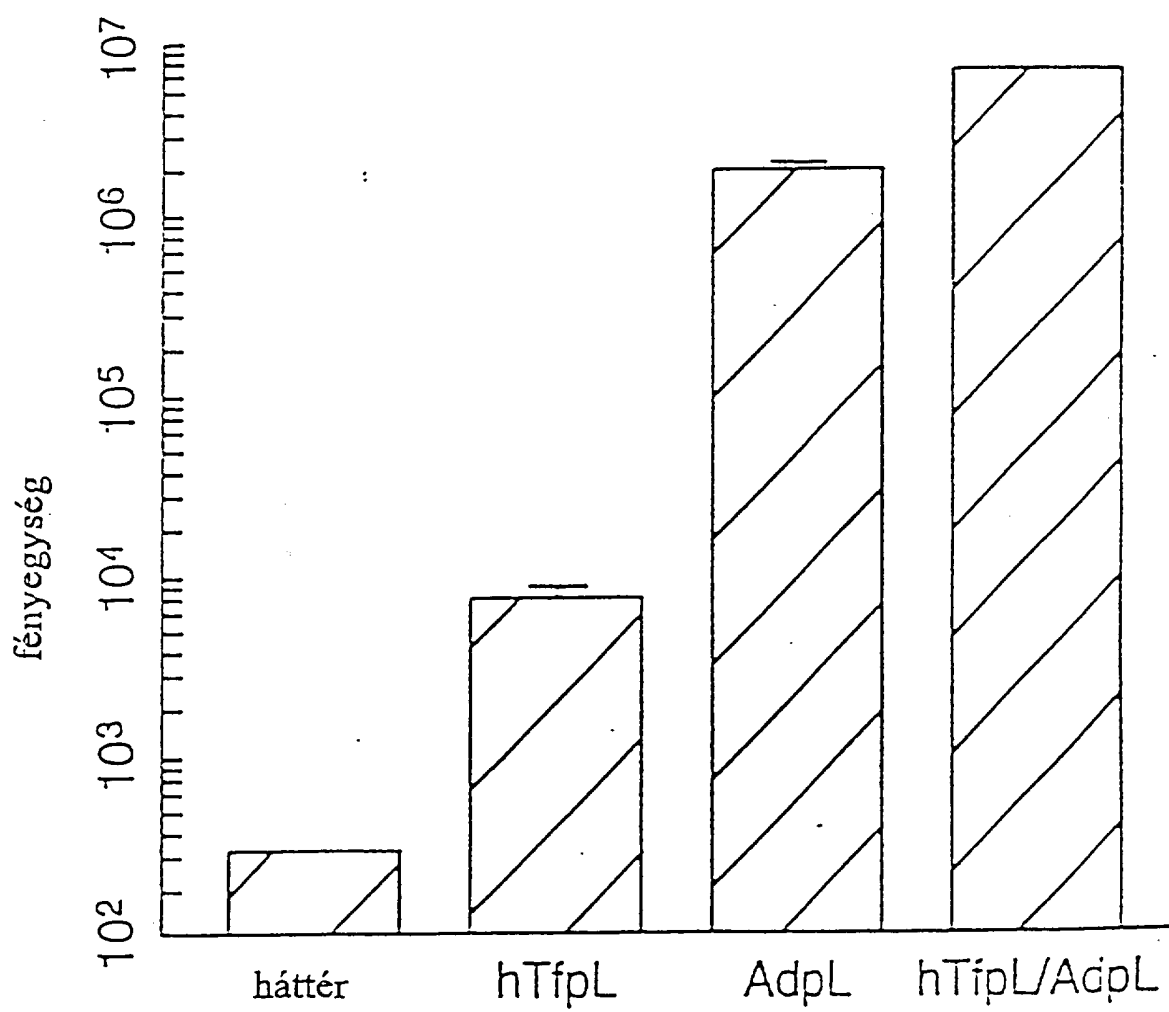
Sca I

IV: -425-CTT-ACC-AAG-GTA-AAA-CCT-AAA-
 ACA-GGT-CAG-GAA-AAT-GGA-439-
 ↓ mutagenesis

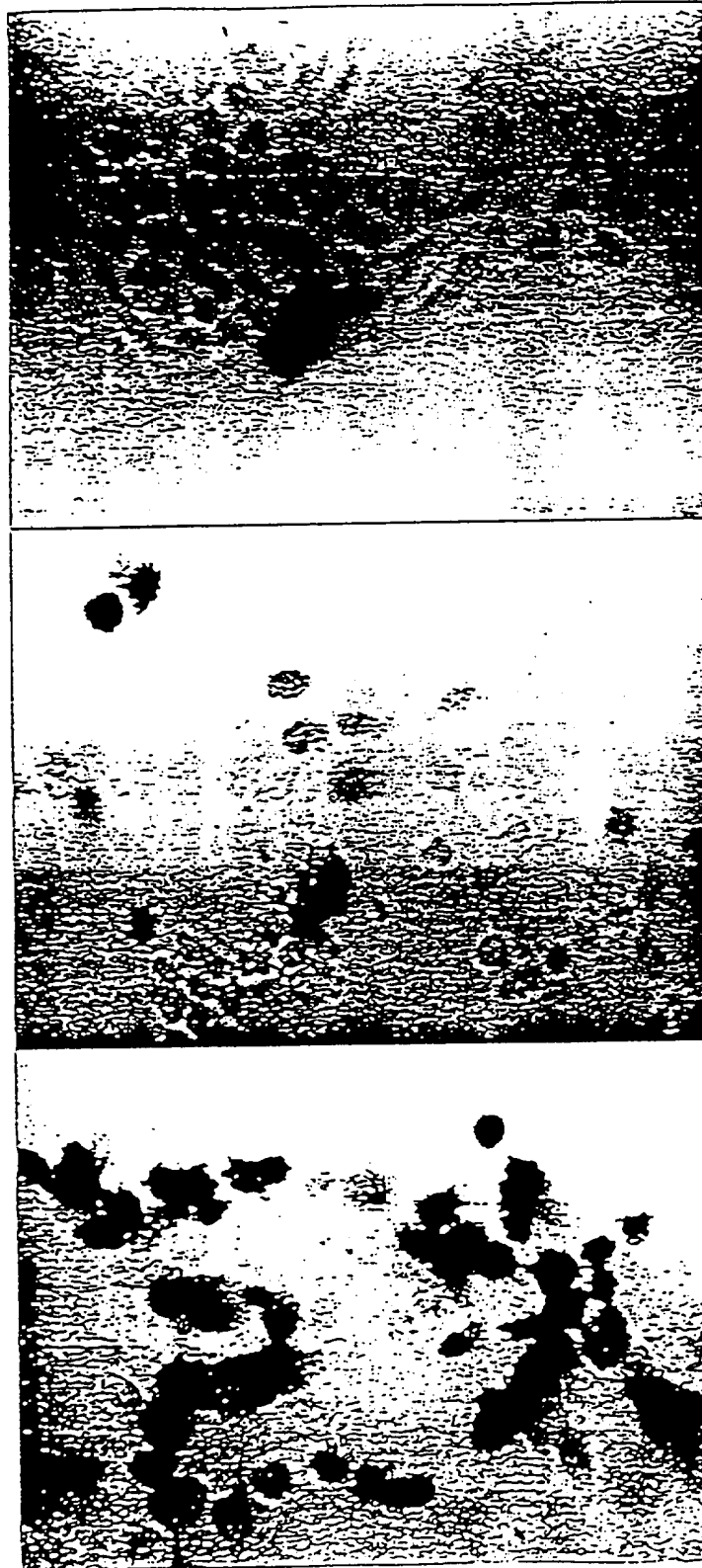
GAT ATC

Eco RV

9. ábra



10. ábra

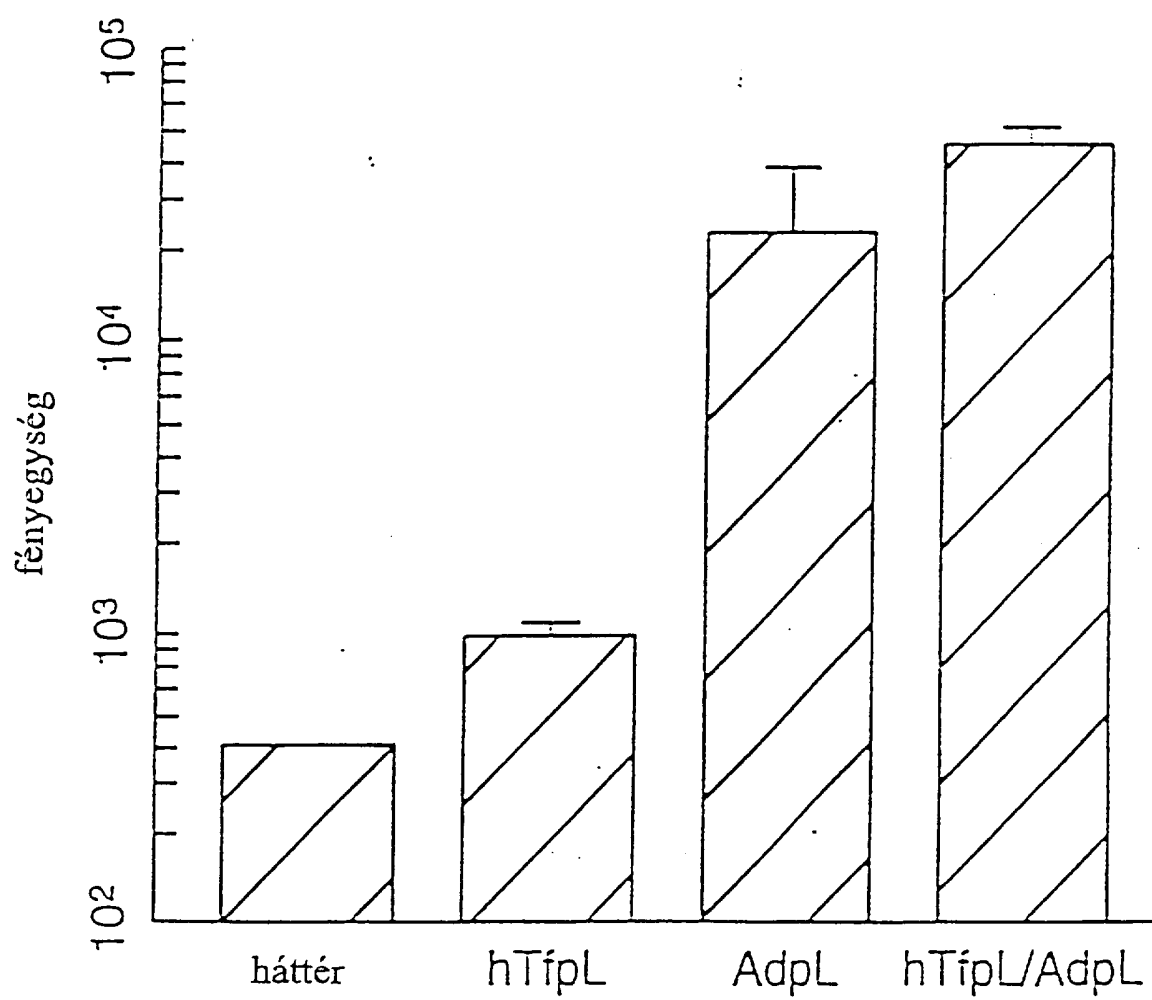


A.

B.

C.

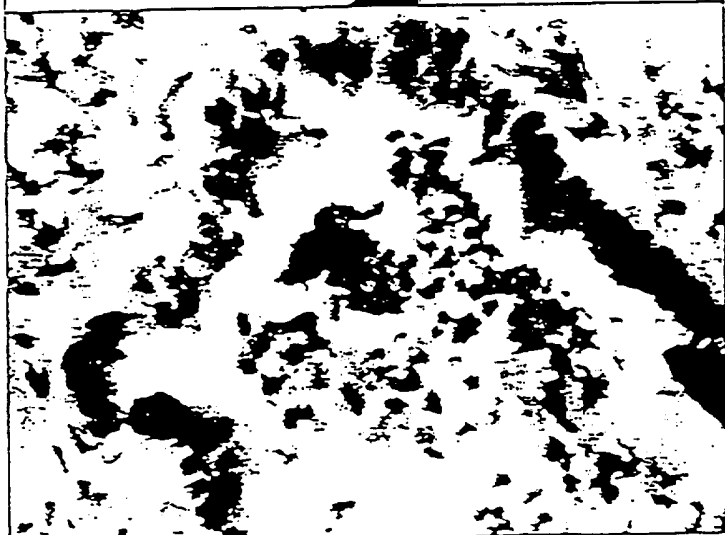
11. ábra



12A. ábra



A.

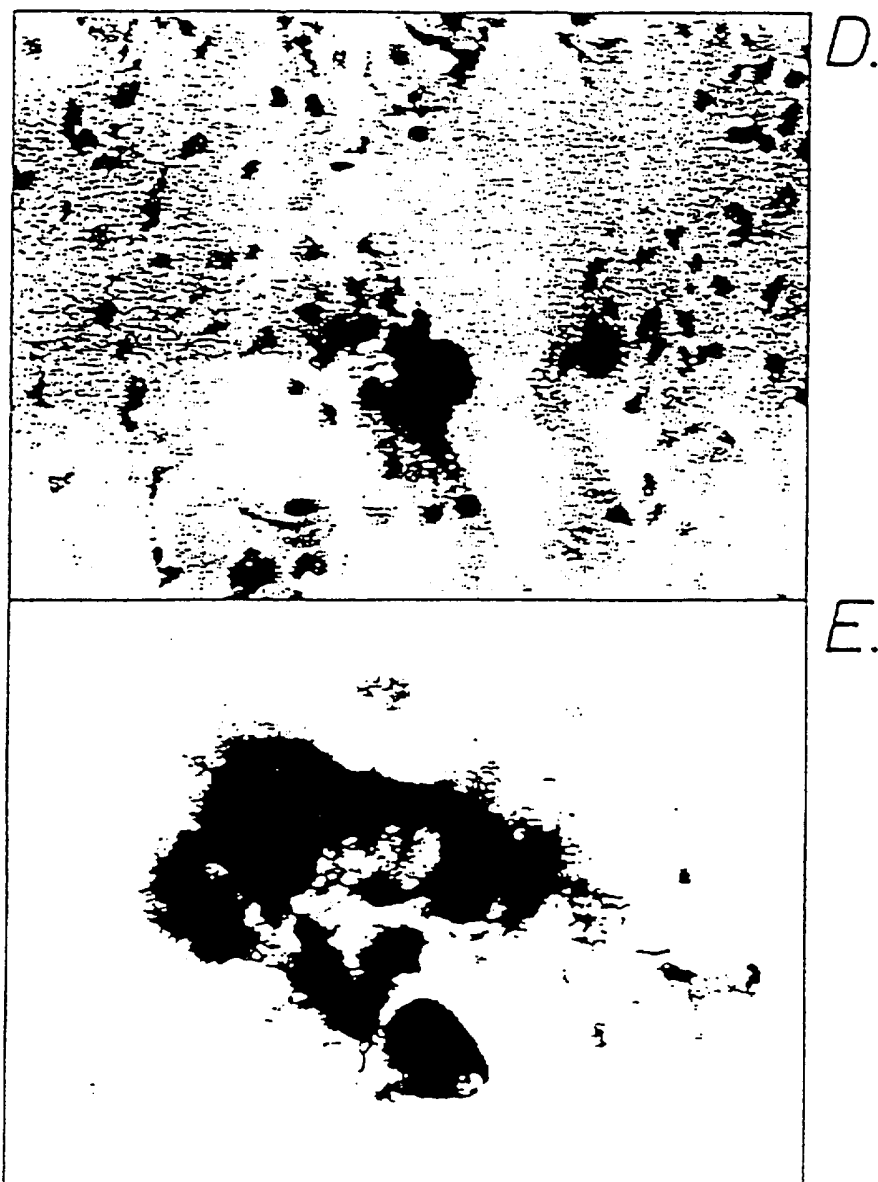


B.



C.

12B. ábra



13. ábra

