



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 321454

(13) B1

(51) Int Cl.

*C12N 15/86 (2006.01)*  
*C12N 7/01 (2006.01)*  
*A61K 48/00 (2006.01)*  
*C12N 15/11 (2006.01)*  
*C12N 15/861 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19954132	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.04.15 PCT/FR94/00421
(22)	Inng.dag	1995.10.17	(85)	Videreføringsdag	1995.10.17
(24)	Løpedag	1994.04.15	(30)	Prioritet	1993.04.22, FR, 9304745
(41)	Alm.tilgj	1995.10.17			
(45)	Meddelt	2006.05.15			

(73)	Innehaver	Aventis Pharma SA , 20, avenue Raymond Aron, 92160 ANTONY CÉDEX, FR		
(72)	Oppfinner	Hédi Haddada, 1, rue Jules-Guesde, Apartment 221, F-94140 Alfortville, FR Michel Perricaudet, 20, résidence du Moulin, F-28150 Quarville, FR Evelyne May, Paris, FR		
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO		

---

(54) Benevnelse **Defektiv, rekombinant adenovirus inneholdende en heterolog DNA-sekvens hvis ekspresjon i en målcelle tillater i det minste partielt å inhibere celledeling, anvendelser og farmasøytisk preparat derav.**

(56) Anførte publikasjoner WO 93/03769

(57) Sammendrag

Rekombinante adenoviruser omfatter en heterolog DNA-sekvens. Fremstillingen av de rekombinante adenoviruser beskrives. Adenovirusene finner anvendelse for behandling og/eller prevensjon av cancere eller for fremstilling av medikamenter for behandling eller prevensjon av cancere.

Foreliggende oppfinnelse angår rekombinante vektorer av viral opprinnelse og deres anvendelse. Mer spesielt angår oppfinnelsen rekombinante adenoviruser som bærer en heterolog DNA-sekvens hvis ekspresjon i en celle, da den deler seg anormalt, tillater i det minste delvis å inhibere deling av cellen. Oppfinnelsen angår også preparater  
5 inneholdende disse.

Celleveksten reguleres på ekstremt subtil måte av to signaltyper. Visse favoriserer en multiplikasjon av cellen mens andre tvert imot gjør at de går inn i en hviletilstand eller differensieres, i henhold til organismens krav.  
10

Cancere karakteriseres alle ved en deregulering av mekanismene som kontrollerer celledelingen og fører til en anormal proliferering. Som oftest implikerer utviklingen av en cancer således en aktivering av genene som favoriserer multiplisering av cellene (gener kalt proto-onco-gener som aktiveres til onco-gener) og til en forsvinnende eller  
15 inaktivering av genene som inhiberer den cellulære proliferering. Foreliggende oppfinnelse tilbyr muligheten til å behandle cancere ved genterapi ved, til de tumorale celler, å administrere ett eller flere av disse gener hvis ekspresjon tillater i det minste partielt å inhibere den cellulære proliferering.

Genterapi består i å korrigere en defekt eller en anormalitet (mutasjon, abnorm ekspresjon og så videre) ved å innføre en genetisk informasjon i cellen eller det påvirkede organ. Denne genetiske informasjon kan innføres enten in vitro i en celle som er trukket ut fra organet og der den modifiserte celle så gjeninnføres i organismen, eller direkte in vivo i det tilsiktede vev. I det andre tilfellet foreligger det forskjellige  
25 teknikker blant hvilke skal nevnes forskjellige teknikker for transfeksjon som implikerer komplekser av DNA og DEAE-dekstran (Pagano et al., "J.Virol." 1 (1967) 891), DNA og nukleære proteiner (Kaneda et al., "Science" 243 (1989) 375), DNA og lipider (Felgner et al., "PNAS" 84 (1987) 7413), anvendelsen av liposomer (Fraley et al., "J.Biol.Chem." 255 (1980) 10431), og så videre. I den senere tid har anvendelsen av  
30 viruser som vektorer for overføring av gener dukket opp som et lovende alternativ ved disse fysiske transfeksjonsteknikker. I denne forbindelse er forskjellige viruser prøvet med henblikk på evnen til å infektere visse cellulære populasjoner. Særlig skal nevnes retrovirusene (RSV, HMS, MMS, og så videre), HSV-viruset, de adenoassosierte viruser og adenovirusene.

35 Muligheten for å benytte genterapi for behandling av cancere er allerede belyst i den internasjonale søknad WO91/15580. Denne søknad beskriver konstruksjonen av

retroviruser inneholdende et gen som koder for et ribozym hvis ekspresjon i cellekultur kan tillate å ødelegge et mRNA av et onco-gen.

5 Foreliggende oppfinnelse er basert på oppdagelsen at adenovirusene utgjør spesielt effektive vektorer for overføring og ekspresjon av terapeutiske gener i tumorer. Særlig oppviser adenovirusene fordel av ikke å integrere i genomet til cellene de infekterer, å holde seg der meget stabilt, noe som tillater å oppnå en varig terapeutisk effekt, og å ha et meget stort vertsspektrum, noe som tillater en applikasjon ved behandling av cancere som påvirker alle typer celler. Videre er oppfinnelsen også basert på oppdagelsen at 10 virusene av adenovirus-typen er i stand til å overføre og å uttrykke gener som er i stand til i det minste partielt å inhibere celledelingen direkte på tumornivå.

En første gjenstand for oppfinnelsen ligger således i en defektiv, rekombinant adenovirus som inneholder en heterolog DNA-sekvens hvis ekspresjon tillater i det 15 minste partielt å inhibere celledeling. Mer spesifikt omfatter foreliggende oppfinnelse en defektiv, rekombinant adenovirus inneholdende en heterolog DNA-sekvens hvis ekspresjon i en målcelle tillater i det minste partielt å inhibere celledeling, kjennetegnet ved at sekvensen omfatter:

- minst en gen som koder for p53-protein; og
- 20 - en promotersekvens som tillater ekspresjon, i den infiserte celle, av nevnte gen, idet promotersekvensen har en opprinnelse som er forskjellig fra den til genet.

25 Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av en adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9 for fremstilling av et farmasøytisk preparat ment for terapi og/eller prevensjon av cancer ved innføring direkte i vevet som skal behandles.

30 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av en adenovirus ifølge et at kravene 1 til 9 for fremstilling av et farmasøytisk preparat ment for fremstilling av et farmasøytisk preparat ment for terapi eller prevensjon av cancere ved administrering direkte til tumoren som skal behandles.

35 Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av en adenovirus ifølge krav 2 for preparering av et farmasøytisk preparat ment for behandling og/eller prevensjon av cancere forbundet med nærvær av en mutert form av p53.

Oppfinnelsen har likeledes til gjenstand en slik defektiv, rekombinant adenovirus for

fremstilling av et farmasøytisk preparat ment for behandling eller prevensjon av  
cancere.

Følgelig omfatter oppfinnelsen også et farmasøytisk preparat, kjennetegnet ved at det  
5 inneholder en eller flere defektive, rekombinante adenoviruser ifølge et av kravene 1 til  
9.

Innenfor oppfinnelsens ramme angir uttrykket "defektiv adenovirus" en adenovirus som  
ikke er i stand til replikering på autonom måte i målcellen. Generelt er således genomet  
10 av den defektive adenovirus som benyttes innenfor rammen av oppfinnelsen berøvet for  
i det minste de sekvenser som er nødvendige for replikering av cellen i den infekteerte  
celle. Disse områder kan enten elimineres (helt eller delvis), gjøres ikke-funksjonelle,  
eller erstattes med andre sekvenser og særlig av det innskutte gen. Fortrinnsvis bevarer  
imidlertid den defektive virus ikke desto mindre sekvensene av sitt genom som er  
15 nødvendig for innkapsling av de virale partikler.

Det foreligger forskjellige adenovirus-serotyper hvis struktur og egenskaper varierer  
noe. Ikke desto mindre er disse viruser ikke patogene for mennesker og særlig ikke  
immunodeprimerte personer. Blant disse serotyper foretrekker man innenfor rammen av  
20 oppfinnelsen å benytte adenovirusene av type 2 eller 5 (Ad 2 eller Ad 5). Når det gjelder  
adenovirusene Ad 5, er de sekvenser som er nødvendig for replikeringen, områdene  
E1A og E1B.

Blant tumor-supressor-gener kan man spesielt nevne de følgende gener:

25

- Gen p53:

Genet p53 koder for et nukleærprotein på 53 kDa. Den muterte form ved delesjon  
og/eller mutasjon av dette gen er implikert i utviklingen av de fleste humane  
30 (Baker et coll., "Science" 244 (1989) 217). Dets muterte former er likeledes i stand til å  
samarbeide med ras-oncogenet for å transformere murine fibroblaster. Villtype-genet  
som koder for nativ p53 inhiberer på sin side dannelsen av transformasjonssteder i  
fibroblaster fra gnagere som er transfektert med forskjellige kombinasjoner av  
oncogener. Senere funn understreker at proteinet p53 i seg selv kan være en  
transkripsjonsfaktor og stimulere ekspresjonen av andre tumorsupressor-gener.

35

- Gen Rb:

Genet Rb bestemmer syntesen av et nukleærfosfoprotein på ca. 927 aminosyrer (Friend

et coll., "Nature" 323 (1986) 643) hvis funksjon er å holde tilbake celledelingen og å bringe den til å gå inn i en hvilefase. De inaktive former av genet Rb er påvist i forskjellige tumorer og særlig i retinoblastomene eller i de mesenchymatiske cancere som osteosarcomer. Gjeninnføringen av dette gen i de tumorale celler der de har vært

5 inaktivert, gir en tilbakevending til normalt tilstand og et tap av tumorigeniteten (Huang et coll., "Science" 242 (1988) 1563). I den senere tid er det vist at det normale proteinet Rb, men ikke i sine muterte former, holder tilbake ekspresjonen av proto-oncogenet c-fos, genet som er uunnværlig for celleprolifisering.

10 - Genet rap 1A:

Genet rap 1A (også kalt k-rev1) koder for et protein på 21 kDa, forbundet med den indre flate av det cytoplasmiske membran. Dette protein er, på høyere nivåer, i stand til å revertere transformerte celler under ekspresjon av de muterte ras-oncogener (Kitayama et coll., "Cell" 56 (1989) 77).

15

- Genet DCC:

Genet DCC koder for et protein som er homologt med de cellulære adhesjonsproteiner av familien N-CAM. Dette gen er hyppig deletert i colon-carcinomer (Fearon et coll., "Science" 247 (1990) 49).

20

- Genene k-rev2 og k-rev3:

Genet k-rev2 koder for et sekretert protein på 60 aminosyrer og genet k-rev3 koder for en avskåret versjon av et protein i den ekstracellulære matrise. Disse to gener er i stand til å revertere NIH 3T3-celler som er transformert av Ki-ras-oncogenet.

25

Andre gener kan også tenkes benyttet for den anti-tumorale effekt, særlig andre tumor-supressor-gener som er beskrevet i litteraturen, eller et hvilket som helst annet gen hvis ekspresjonsprodukt kan indusere cellulær apoptose.

30

Som antydnet ovenfor kan den heterologe DNA-sekvens bære det native tumor-supressor-gen eller et aktiv derivat av dette gen. Et slik derivat kan oppnås ved mutasjon, delesjon, substitusjon og/eller addisjon av et eller flere basepar i gensekvensen i henhold til klassiske molekylærbiologiske teknikker. Aktiviteten for det således oppnådde derivat kan deretter bekreftes in vitro på prøver som er kjent for

35 fagmannen, for eksempel som de som er beskrevet i eksemplene.

Heterolog DNA-sekvens kan likeledes omfatte et anti-retningsgen hvis ekspresjon i

målcellen tillater å kontrollere ekspresjonen av genet eller transkripsjon av cellulær mRNA som koder for proteinene som favoriserer den cellulære proliferering. Slike gener kan for eksempel i målcellene transkribes til RNA som er komplementære til de cellulære mRNA og således blokkere deres traduksjon til protein.

5

Blant de anti-retningsgener som kan benyttes, kan mer spesielt nevnes en hvilken som helst anti-retningssekvens som tillater å redusere produksjonsnivået for onco-genene ras, myc, fos, c-erb B og så videre.

- 10 Generelt omfatter den heterologe DNA-sekvens også promotersekvenser som tillater ekspresjon av genet eller genene som er i stand til i det minste partielt å inhibere celledeling i målcellen. Det kan dreie seg om promotersekvenser som naturlig er ansvarlig for ekspresjonen av genet når disse sekvenser er i stand til å virke i den infektete celle. Det kan likeledes dreie seg om promotersekvenser av en annen
- 15 opprinnelse (ansvarlig for ekspresjonen av andre proteiner, eller også syntetiske). Særlig kan det dreie seg om promotersekvenser av eukaryote eller virale gener. For eksempel kan det dreie seg om promotersekvenser som stammer fra genomet til den celle man ønsker å infektete. På samme måte kan det dreie seg om promotersekvenser som stammer fra genomet av en virus, derunder det benyttede adenovirus. I denne
- 20 forbindelse kan man for eksempel nevne promoterene av genene E1A, MLP, CMV, RSV, og så videre. Videre kan disse promotersekvenser modifiseres ved addisjon av aktiverings- eller reguleringssekvenser og så videre. Når videre den heterologe DNA-sekvens ikke omfatter ekspresjonssekvenser kan disse skytes inn i det defektive virus-genom nedstrøms en slik sekvens. Det er likeledes mulig å benytte induktible
- 25 promotere.

- Det kan også tenkes en heterolog DNA-sekvens i tillegg til tumor-supressorgenet eller anti-retningsgenet, et gen som koder for et anti-gen som er spesifikt for tumoren og/eller et gen som koder for et lymfokin. Kombinasjonen av disse gener tillater således (i) å
- 30 stanse celledelingen i en tumor og derfor å føre til regress av denne tumor, og (ii) å øke immunresponsen hos organismen mot denne tumor.

- Anti-genene som er spesifikke for tumoren er anti-gendeler som opptrer på overflaten av de tumorale celler men som ikke eksisterer på overflaten av ikke-tumorale slike
- 35 celler. Slike anti-gener benyttes generelt for cancer-diagnose. I den senere tid er de beskrevet for fremstilling av anti-tumorvaksiner (EP 259 212). Imidlertid har de aldri vært kombinert med andre terapeutiske gener.

Blant de gener som koder for lymfokinene, kan man mer spesielt nevne gener som koder for interleukinene (IL-2 til IL-13), interferonene, tumor-nekrose-faktorene, de kolonistimulerende faktorer (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, og så videre), TGF $\beta$  og så videre. Videre omfatter generelt genet som koder for lymfokin, oppstrøms den kodende sekvens, en ekspresjonssekvens og en signalsekvens som styrer det syntetiserte polypeptid inn i målcellens sekresjonsveier. Denne signalsekvens kan være den naturlige signalsekvens for lymfokinet men det kan også dreie seg om en hvilken som helst annen funksjonell signalsekvens, eller en kunstig signalsekvens. Slike konstruksjoner tillater særlig å øke mengden av lymfokin på meget lokalisert måte og også, i nærvær av et anti-gen som er spesifikt for tumoren, å forsterke immunresponsen mot en spesiell type tumor, noe som gir en spesielt fordelaktig effekt. Slike rekombinante adenoviruser er spesielt egnet for fremstilling av anti-tumor-vaksiner.

De defektive, rekombinante adenoviruser ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved en hvilken som helst for fagmannen kjent teknikk (Levrero et al., "Gene" 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, "EMBO J." 3 (1984) 2917). Særlig kan de fremstilles ved homolog rekombinering mellom et adenovirus og et plasmid som blant annet bærer den heterologe DNA-sekvens. Den homologe rekombinering skjer etter ko-transfeksjon av adenoviruset og plasmidet i en egnet cellelinje. Den benyttede cellelinje må fortrinnsvis (i) være transformerbar med disse elementer, og (ii) bære sekvenser som er i stand til å komplementere delen av genomet av det defektive adenovirus, fortrinnsvis i integrert form for å unngå rekombineringsrisiko. Som eksempel på en linje kan nevnes den humane embryonyre linje 293 (Graham et al., "J.Gen.Virol." 36 (1977) 59) som særlig integrert i sitt genom, inneholder den venstre del av genomet av et Ad5 adenovirus (12 %).

Deretter blir adenovirusene som har multiplisert seg, gjenvunnet og rensset i henhold til klassiske molekylær-biologi-teknikker som vist i eksemplene.

Foreliggende oppfinnelse angår likeledes et farmasøytisk preparat som omfatter en eller flere defektive, rekombinante adenoviruser som beskrevet ovenfor. Fortrinnsvis inneholder de farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen en farmasøytisk akseptabel bærer for en formulering som er direkte injiserbar i tumoren som skal behandles. Det kan særlig dreie seg om sterile, isotoniske oppløsninger eller tørre preparater, særlig lyofiliserte, som ved tilsetning alt etter som av sterilisert vann eller et fysiologisk serum, tillater konstituering av injiserbare oppløste stoffer. Den direkte injeksjon i en tumor

som skal behandles er fordelaktig fordi den tillater å konsentrere den terapeutiske virkning om det påvirkede vev.

- Dosene av de defektive, rekombinante adenoviruser som benyttes for injeksjon kan tilpasses som en funksjon av forskjellige parametere og særlig som funksjon av den benyttede administreringsmåte, den angjeldende patologi, genet som skal uttrykkes eller også den ønskede varighet av behandlingen. Rent generelt formuleres og administreres de rekombinante adenoviruser ifølge oppfinnelsen i form av doser på mellom  $10^4$  og  $10^{14}$  pfu/ml og fortrinnsvis  $10^6$  til  $10^{10}$  pfu/ml. Uttrykket pfu, "plaque forming unit", tilsvarer infeksjonskraften for en virusoppløsning og bestemmes ved infeksjon av en egnet cellekultur og måles, generelt etter 48 timer, med henblikk på antall kolonier av infekterte celler. Teknikkene for bestemmelse av pfu-verdien for en viral oppløsning er godt dokumentert i litteraturen.
- 15 Foreliggende oppfinnelse muliggjør således et meget effektivt middel for behandling eller prevensjon av cancere. Videre kan behandlingen gjennomføres både på mennesker og dyr som sau og geit, fe, husdyr som hunder, katter og så videre, hester, fisk og så videre.
- 20 Oppfinnelsen skal beskrives nærmere under henvisning til de følgende, illustrerende eksempler.

Figurforklaring:

- Figur 1: Illustrasjon av vektoren mp53wtI-CMV
- 25 Figur 2: Illustrasjon av vektoren mp53pIX.CMV.

Generelle molekylærbiologi-teknikker.

- De klassiske metoder som benyttes i molekylærbiologien, for eksempel preparativ ekstrahering av plasmidisk DNA, sentrifugering av plasmidisk DNA i cesiumklorid-gradient, elektroforese på agarose- eller akrylamidgel, rensing av fragmenter av DNA ved elektroeluering, ekstrahering av proteiner med fenol eller fenolkloroform, presipitering av DNA i saltmedium med etanol eller isopropanol, transformering i *Escherichia coli*, og så videre, er godt kjent av fagmannen og rikelig beskrevet i litteraturen [Maniatisk T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al., (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].
- 30
- 35

Plasmidene av typen pBR322, pUC og fagene fra serie M13 er av kommersiell opprinnelse (Bethesda Research Laboratories).

5 For ligeringene kan DNA-fragmentene separeres i henhold til størrelse ved elektroforese på agarose- eller akrylamid-gel, ekstrahering med fenol:kloroform, presipitering i etanol og inkubering i nærvær av DNA-ligase av fagen T4 (Biolabs) i henhold til leverandørens anbefalinger.

10 Oppfyllingen av de fremstikkende 5'ender kan gjennomføres med Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I av E.coli (Biolabs) i henhold til leverandørens spesifikasjoner. Destrueringen av de fremstikkende 3' ender gjennomføres i nærvær av DNA-polymerase av fag T4 (Biolabs) som benyttes i henhold til fabrikkantens anbefalinger. Destrueringen av de fremstikkende 5' ender gjennomføres ved en behandling med nukleasen S1.

15 Den styrte mutagenese in vitro med syntetiske oligo-deoksynukleotider kan gjennomføres i henhold til den metode som er utviklet av Taylor et al., ["Nucleic Acids Res." 13 (1985) 8749-8764] under anvendelse av det kit som kan oppnås fra Amersham.

20 Den enzymatiske forsterkning av DNA-fragmentene av den såkalte PCR-teknikk ["Polymérase-catalyzed Chain Reaction", Saiki R.K. et al., "Science" 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., "Meth.Enzym." 155 (1987) 335-350] kan gjennomføres ved å anvende en "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) i henhold til fabrikantens spesifikasjoner.

25 Verifiseringen av nukleotid-sekvensene kan gjennomføres ved den metode som er utviklet av Sanger et al., ["Proc.Natl. Acad.Sci." USA, 74 (1977) 5463-5467] under anvendelse av det kit som er tilgjengelig fra Amersham.

30

### Eksempler

**E1. Konstruksjon av vektoren mp53wtI-CMV som bærer genet p53 under kontroll av cytomegalovirus-promoteren (figur 1).**

35 Den eukaryote ekspressjonsvektor mp53wtI-CMV er konstruert fra plamid pUC19 ved innskyting:

- av et promoterområde av viral opprinnelse som tilsvarer den tidlige

cytomegalovirus (CMV)-promoter. Dette området omgis i vektoren av unike restriksjonssteder EcoRI-SphI i forbindelsen CMV/pUC og BamHI ved forbindelsen CMV/p53. Nærværet av unike steder som flankerer promoterområdet tillater å erstatte CMV-området med en hvilken som helst annen promoter. En andre serie vektorer oppnås så der genet p53 anbringes under kontroll av en induktiv promoter: promoteren av metallotionin, indukterbar av tungmetaller (kadmium og sink);

5 - av en sekvens på 1173 pb tilsvarende cDNA som koder for proteinet p53 fra mus i sin ville form (Zakut-Houri et al., "Nature" 36 (1983) 594). I denne konstruksjon er suppressor-genet i form av cDNA, det vil si berøvet for introner. Dette tilsvarer

10 særlig å redusere vektorens størrelse. Videre er det verifisert at de oppnådde ekspresjonsnivåer er sammenlignbare i nærvær av eller i fravær av introner;

- av et polyadenyleringssignal for de sene virus-SV-40-gener som tilsvarer et meget effektivt polyadenyleringssignal. To unike restriksjonssteder SallI og HindIII befinner seg nedstrøms polyadenyleringssignalet. Disse steder har tillatt innskylling

15 av pIX-områder av adenovirus (jfr. E3).

## **E2. Aktivitet in vitro av vektoren mp53wtI-CMV.**

Funksjonaliteten for vektoren mp53wtI-CMV er bekreftet in vitro ved transitorisk ekspresjon i HeLa-celler. For dette formål er vektoren innført i cellene ved transfeksjon og, 40 timer senere, er protein p53 dosert ved immunofluorescens og immunopresipitering. De oppnådde resultater viser at mer enn 50 % av de transfekterte celler inducerer vesentlige mengder protein p53.

20

## **E3. Konstruksjon av vektoren mp53pIX.CMV.**

Plasmidene som benyttes for ved homolog rekombinering å danne de rekombinante adenoviruser som uttrykker gen p53 er konstruert som følger:

30 Den eukaryote ekspresjonsvektor mp53pIX.CMV konstrueres ved innskyting av sekvensen pIX fra genomet av adenovirusene mellom setene SallI og EcoRI av mp13wtI.CMV. Sekvensen pIX isoleres fra det rekombinante plasmid pLTR-βgal pIX (Stratford-Perricaudet et al., "J.Clin.Invest." 90 (1992) 626) ved fermentering ved hjelp av enzymene EcoRV og HindIII.

35

Ekspresjonsvektoren mp53pIX.CMV som oppnås på denne måte (figur 2) har et unikt HindIII-sete nedstrøms innskuddet pIX som tillater en linearisering av konstruksjonen

(jfr. E4).

**5 E4. Konstruksjon av en defektiv, rekombinant adenovirus som bærer genet p53 under kontroll av promoteren CMV.**

Vektoren mp53pIX.CMV lineariseres og ko-transfekteres med en defekt adenoviralvektor i hjelperceller (linje 293) som i trans bærer funksjonene som kodes av områdene E1 (E1A og E1B) av adenovirusen.

10

Man oppnår adenovirus Ad.p53 ved homolog rekombinering in vivo mellom det mutante adenovirus Ad-d1324 (Thimmappaya et al., "Cell" 31 (1982) 543) og vektoren mp53pIX.CMV, i henhold til følgende protokoll: etter linearisering med enzymet HindIII blir plasmidet mp53pIX.CMV og adenovirusen d1324 ko-transfektet i linje 293 i nærvær av kalsiumfosfat for derved å tillate homolog rekombinering. De således dannede rekombinante adenoviruser selekteres ved rensing på plater. Etter isolering blir det rekombinante adenovirus DNA forsterket i cellelinjen 293, noe som fører til en kultur-supernatant inneholdende ikke-renset, rekombinant, defektivt adenovirus med en titer på ca.  $10^{10}$  pfu/ml.

20

De virale partikler renses deretter ved sentrifugering over cesiumkloridgradient i henhold til kjente teknikker (se særlig Graham et al., "Virology" 52 (1973) 456). Adenoviruset Adp53 kan bevares ved  $-80^{\circ}\text{C}$  i 20 % glycerol.

25

Evnen hos adenovirus Adp53 til å infekttere celler i kultur og i kulturmediet å uttrykke en biologisk aktiv form av vill-p53 er påvist ved infeksjon av celler av human-linjen 293. Nærværet av p53 i kultur-supernatanten påvises deretter ved hjelp av et monoklonalt antistoff som er spesifikt for p53.

30

Disse studier tillater å vise at adenoviruset godt uttrykker en biologisk aktiv form av GAD67 i cellekultur.

P a t e n t k r a v

1.

Defektiv, rekombinant adenovirus inneholdende en heterolog DNA-sekvens hvis  
5 ekpresjon i en målcelle tillater i det minste partielt å inhibere celledeling,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at sekvensen omfatter:

- minst en gen som koder for p53-protein; og
- en promotersekvens som tillater ekspresjon, i den infiserte celle, av nevnte  
10 gen, idet promotersekvensen har en opprinnelse som er forskjellig fra den til  
genet.

2.

Defektiv, rekombinant adenovirus ifølge krav 1,  
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en sekvens som  
koder for villtype-proteinet p53 under kontroll av en heterolog promoter.

3.

Defektiv, rekombinant adenovirus ifølge krav 1 eller 2,  
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at promotersekvensen er en  
promotersekvens som stammer fra genomet av den infiserte celle.

4.

Defektiv, rekombinant adenovirus ifølge krav 1 eller 2,  
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at promotersekvensen er en syntetisk  
sekvens.

5.

Defektiv, rekombinant adenovirus ifølge krav 1 eller 2,  
30 k a r a k t e r i s e r t v e d at promotersekvensen er en sekvens av  
viral opprinnelse, valgt blant promotersekvensen av genene CMV eller RSV.

6.

Defektiv, rekombinant adenovirus ifølge krav 1 eller 2,  
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en sekvens som  
koder for villtype-proteinet p53 under kontroll av en tidlig promoter av cyto-  
megalovirus.

7.

Adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6,  
karakterisert ved at den er berøvet for regionene av sitt  
5 genom som er nødvendige for replikering i målcellen.

8.

Adenovirus ifølge krav 7, karakterisert ved at den  
er en adenovirus av typen Ad5.

10

9.

Adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 8,  
karakterisert ved at den heterologe DNA-sekvens videre  
omfatter et gen som koder for et anti-gen som er spesifikt for tumoren og/eller et gen  
15 som koder for et lymfokin.

10.

Anvendelse av en adenovirus ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9 for  
fremstilling av et farmasøytisk preparat ment for terapi og/eller prevensjon av cancer  
20 ved innføring direkte i vevet som skal behandles.

11.

Anvendelse av en adenovirus ifølge et at kravene 1 til 9 for fremstilling av et  
farmasøytisk preparat ment for fremstilling av et farmasøytisk preparat ment for terapi  
25 eller prevensjon av cancere ved administrering direkte til tumoren som skal behandles.

12.

Anvendelse av en adenovirus ifølge krav 2 for preparering av et farmasøytisk preparat  
ment for behandling og/eller prevensjon av cancere forbundet med nærvær av en mutert  
30 form av p53.

13.

Anvendelse ifølge kravene 10 eller 11 for fremstilling av en anti-tumoral vaksine.

35 14.

Farmasøytisk preparat, karakterisert ved at det  
inneholder en eller flere defektive, rekombinante adenoviruser ifølge et av kravene 1 til

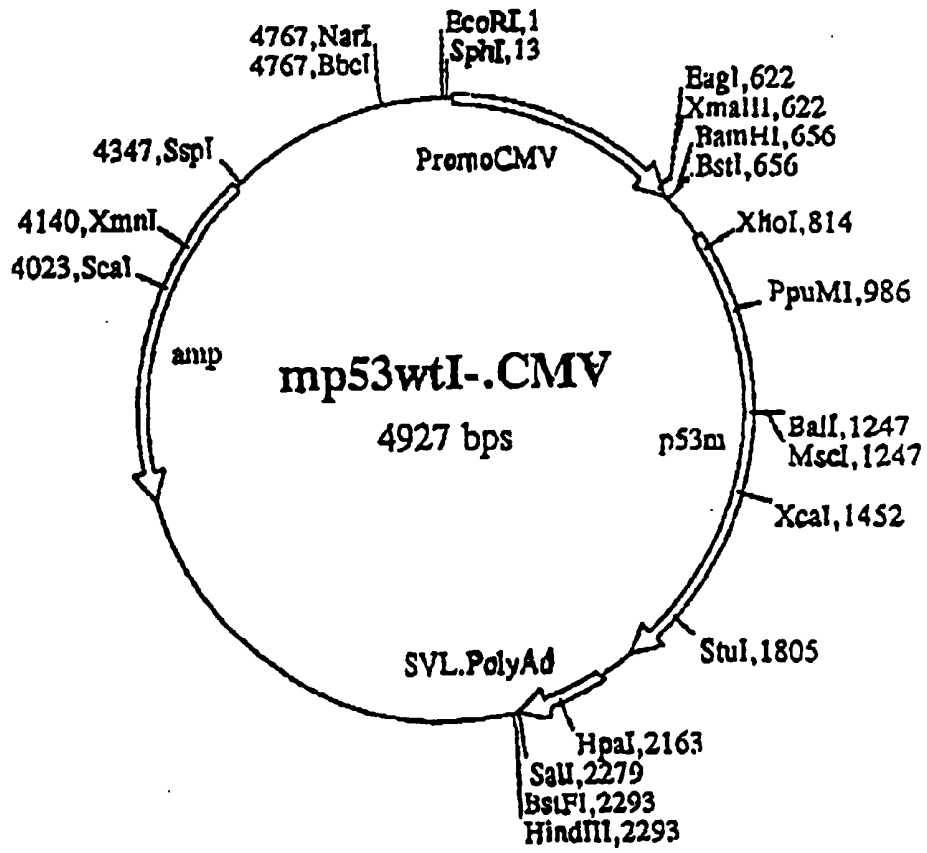
9.

15.

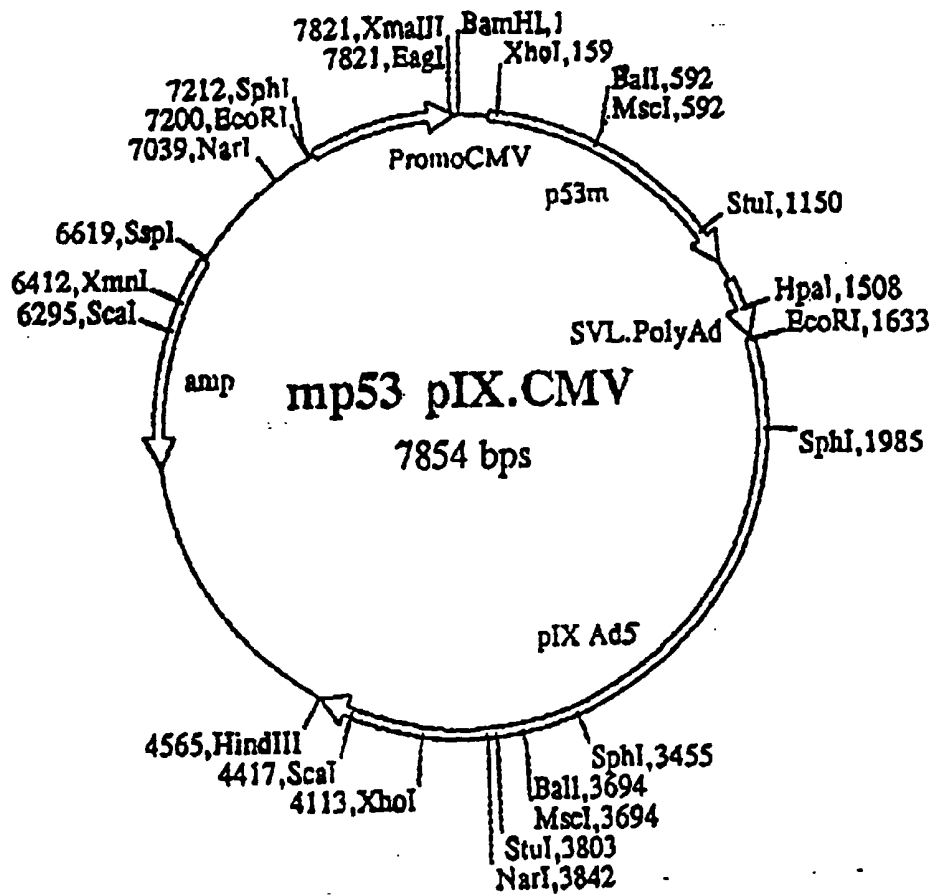
Farmasøytisk preparat ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t  
5 v e d at det foreligger i injiserbar form.

16.

Farmasøytisk preparat ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at det omfatter mellom  $10^4$  og  $10^{14}$  pfu/ml og fortrinnsvis mellom  $10^6$  til  
10  $10^{10}$  pfu/ml defektive, rekombinante adenoviruser.



FIGUR 1



FIGUR 2