

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2002-2757**
(22) Přihlášeno: **09.02.2001**
(30) Právo přednosti: **17.02.2000 IT RM00A000077**
(40) Zveřejněno: **12.02.2003**
(Věstník č. 2/2003)
(47) Uděleno: **19.07.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **29.08.2012**
(Věstník č. 35/2012)
(86) PCT číslo: **PCT/IT2001/000057**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/061025**

(11) Číslo dokumentu:

303 403

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 99/57094; WO 99/56784; WO 98/01128; EP 0681839; US 5656628; EP 1257658.
Gadaleta a kol. (1990) FEBS Lett. 277, 191-193.

(73) Majitel patentu:

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S. P. A., Rome, IT

(72) Původce:

Pisano Claudio, Pomezia, IT

(74) Zástupce:

BOHEMIA PATENT, Ing. Jana Vanděliková, Spálená
97/29, Praha I, 11000

(54) Název vynálezu:

**Použití acetyl-L-karnitinu k přípravě léčiva pro
zvýšení exprese transfektovaných genů**

(57) Anotace:

Použití acetyl-L-karnitinu (ALC) k přípravě léčiva určeného
pro použití v kombinaci s genovou terapií. Současné podávání
acetyl-L-karnitinu vede ke zvýšení exprese transfektovaných
genů.

CZ 303403 B6

Použití acetyl-L-karnitinu k přípravě léčiva pro zvýšení exprese transfektovaných genů

Oblast techniky

5 Zde popisovaný vynález se týká použití $C_1 - C_6$ alkanoyl-L-karnitinů, zvláště acetyl-L-karnitinu k přípravě rekombinantních proteinů.

10 Dosavadní stav techniky

Výroba proteinů technologií genetického inženýrství, tj. využíváním buněčných klonů, ve kterých jsou vloženy geny transfekcí, je známa. Jeden z problémů, se kterým je nutno počítat při použití transfektovaných klonů tkví v tom, že po určité době se geny uměle do buněk vkládané za účelem tvorby požadovaného proteinu utlumí. Problém útlumu genů si uvědomujeme mnohem pronikavěji v genové terapii. V tomto případě geny, které byly pacientovi vloženy přestávají vytvářet terapeuticky nezbytný protein.

20 Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že $C_1 - C_6$ alkanoyl-L-karnitiny a zvláště acetyl-L-karnitin nebo L-karnitin zvyšuje genovou expresi transfektovaných genů.

25 "Karnitinem" je pro účel tohoto vynálezu míněn $C_1 - C_6$ alkanoyl-L-karnitin nebo L-karnitin. V následujícím popisu, čistě jako příklad, se bude odkazovat na upřednostňované řešení s acetyl-L-karnitinem.

Působení acetyl-L-karnitinu v buněčných klonech transfektovaných známými technikami, např. liposomy, značně zvyšuje expresi proteinů, kódovaných transfektovanými geny.

30 Předmětem předloženého vynálezu je způsob zvýšení genové exprese transfektovaných genů spočívající v podávání acetyl-L-karnitinu.

35 Z hlediska průmyslové využitelnosti při použití acetyl-L-karnitinu odkazuje zde popisovaný vynález na zvýšení exprese rekombinantních proteinů současně se způsobem výroby těchto rekombinantních proteinů spočívající v použití acetyl-L-karnitinu ke zvýšení exprese jmenovaných proteinů.

40 V terapeutické oblasti a v oblasti genetického inženýrství obecně, je předmětem zde popisovaného vynálezu použití acetyl-L-karnitinu k přípravě produktu vhodného ke genové terapii pro zlepšení exprese proteinů, rovněž tak jako jeho použití (acetyl-L-karnitinu) k přípravě produktu vhodného k udržení transfektovaných genů v klonech.

45 Zde popisovaný vynález je dále ilustrován dále uváděnou pokusnou částí.

Materiály a metody

Pokusy in vitro

50

Buněčné kultury.

Byly použity buněčné linie HeLa ATCC rakoviny děložního hrdla. Buňky byly kultivovány v mediu RPMI 1640 (eurobio) obsahujícím antibiotika a 10% fetální telecí sérum.

55

Pokusy s acetyl-L-karnitinem (ALC)

4.10⁶ a 5.10⁶ buněk kultivovaných v mediu obsahujícím ALC o výsledné koncentraci 5mM a 10mM bylo naočkováno po dvou 125ml lahví, přičemž 2.10⁶ buněk, na které se nepůsobilo ALC bylo naočkováno do 75ml lahve. Pokus byl opakován po 48 hodinách (shodující se s naočkováním buněk pro transfekci) a po 72 hodinách (na konci transfekce) a opakoval se také po 120 hodinách, a to pouze u vzorků transfektovaných na lysi ve 72 hodině.

Přechodná transfekce plasmidu pRL-CMV

Buňky pro transfekci byly naočkovány 24 hodin předem na 12 jamkové plotny (Corning) v počtu odpovídajícím 10⁵ buněk na jamku. Transfekce byla provedena trojnásobně pro každý vzorek s použitím liposomu DOTAP (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) a plasmidu pRL-CMV (Promega, č. kat. E2261). Stručně: na každý vzorek bylo použito 1,5 µg DNK na jednu jamku a 9,2 µM liposomu na jednu jamku s tím, že konečný objem byl 1050 µl na jeden vzorek; transfekční směs (25 µl na vzorek) byla ponechána při teplotě okolí po dobu 30 minut a potom přidán HBS2x (20mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) v množství 25 µl roztoku na jeden vzorek a 50 µl takto získaného roztoku z jednoho vzorku bylo přidáno k buňkám na dobu 5 hodin. Po provedení tří promytí PBS (fosforečnanový ústojný roztok o pH 7,4) bez vápníku a hořčíku se ponechaly buňky kultivovat v růstovém mediu obsahujícím ALC v koncentracích vyznačených u pokusů až do doby kyze buněk na luciferázovou zkoušku. Jako kontrolní byla přidána čistá DNK v roztoku 1x HBS.

Luciferázová zkouška v transfektovaných vzorcích in vitro

Buňky byly promyty PBS (fosforečnanový ústojný roztok o pH 7,4) bez vápníku a hořčíku a podrobeny lyzi přidavkem 200 µl lyzačního ústojného roztoku obsaženého v soupravě GeneLux L002-100 (Wallac) používané pro luciferázovou zkoušku. Po 20 minutách byly odebrány celkové proteiny a 10 µl z každého vzorku analyzováno na luciferázu postupem vedeným v soupravě; zkouška byla provedena na 96 jamkových plotnách za použití luminometru Victor² (Wallac). Získané hodnoty luminiscence vyjádřené v relativních světelných jednotkách (RLU) byly přepočteny na mg celkových proteinů s použitím výpočtu Bransfordovy metody.

Pokusy in vivo

Působení acetyl-L-karnitinem (ALC)

Použitými zvířaty pro pokusy in vivo byly myši Balb/c (Harlan), a to v každé skupině 5 zvířat. Skupiny byly rozděleny na kontrolní zvířata (3 skupiny) a na zvířata (6 skupin), která dostávala orálně ALC v dávce 100 mg.kg⁻¹. Pokus začal čtyři dny před transfekcí při denním podávání a byl opakován každý den až do utracení.

Utracení zvířat

Zvířata byla utracena 24, 48 a 72 hodin po transfekci.

Z každého zvířete byly odebrány plíce, promyty fyziologickým roztokem, zváženy, zmrazeny kapalným dusíkem a skladovány při -80 °C až do doby extrakce proteinu.

Transfekce plasmidu pRL-CMV

Zvířata tvořící kontrolní skupiny a tři skupiny zvířat zkoušených ALC obdržely intravenózní injekce 25 µg pRL-CMV plasmidu na jednu myš použitím liposomu o koncentraci 12 µm.µg⁻¹ injikované DNK. Liposomy a DNK byly smíseny v roztoku PBS a uchovávány na ledu po dobu 1 hodiny před injikováním. Další tři skupiny zkoumaných zvířat obdržely injekce 25 µg pRL-CMV

plasmidu na jednu myš v roztoku samotného PBS. Výsledný objem injikovaného roztoku každému zvířeti byl 208 μ l.

Extrakce proteinů z plic a luciferázová zkouška

5

Výsledky

Expresce luciferázy při transfekci in vitro

10 Lyzáty ve 24 hodině. Expresce luciferázy získaná ze vzorků zkoušených s ALC byla vyšší než u vzorků kontrolních buněk. Střední hodnota RLU na mg celkových proteinů počítaná na základě trojnásobně provedených vzorků vykazovala v porovnání s kontrolními vzorky přibližně 1,6 násobné zvýšení u vzorků na které se působilo 5mM ALC. Navíc bylo pozorováno, že ve vzorcích zkoušených s 10mM ALC nebylo žádné další zvýšení. Získané výsledky ukazují, že neexistuje vztah dálkové závislosti mezi ALC a expresí luciferázy, a to alespoň u koncentrací použitých

15 v našich pokusech, zatímco na expresi transfektované luciferázy kladný účinek vykazují. U vzorků transfektovaných samotnou DNK, která tvoří naši kontrolní skupinu, nebyla pozorována žádná aktivita luciferázy.

20 Lyzáty ve 48. hodině. Pozorovaný účinek na vzorcích vystavených lyzi ve 24. hodině se neudržel 48 hodin po transfekci, kde se expresce luciferázy v absolutních hodnotách snižovala u všech transfektovaných vzorků. Získané hodnoty RLU na mg proteinu nevykazují žádné významné rozdíly mezi pokusnými a kontrolními vzorky.

25 Lyzáty ve 72. hodině. Vzorky nevykazovaly žádnou expresi luciferázy, takže hodnoty $RLU \cdot mg^{-1}$ nemohly být stanoveny.

Expresce luciferázy in vitro

30 Pokus 1. HeLa 100 000/12 jamkové plotny 1,5 μ g na jamku

	RLU. mg^{-1} střední hodnota a std. odch.
Dotap. + LUC	491,090
	142,451
Dotap + ETC	20,802
	2,283
5mM ALC + LUC	18,060
	3,241
5mM ALC + ETS	17,025
	3,481
5mM ALC + dotap + LUC	779,340
	159,453
5mM ALC + dotap + ETS	22,411
	2,447
10mM ALC + LUC	20,481
	7,044
10mM ALC + ETS	17,724
	1,020
10mM ALC + dotap + LUC	750,034
	94,431
10mM ALC + dotap + ETS	20,520
	2,180

Usoudili jsme, že k ověření, zda kladný účinek ALC na aktivitu luciferázy má vztah k aktivaci transkripčního mechanismu nebo zvýšení propustnosti buněk, vyhodnotíme celkové množství transfektované nitrobuněčné plasmidové DNK analýzou "slot blot".

5 "Slot blot"

Buněčná kultura. Buněčné linie HeLa (ATCC) rakoviny děložního hrdla byla uchovávána v médiu RPMI (Europio) doplněného 10% fetálním telecím sérem, 1% P/S ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂.

10

Působení s ALC.

5.10⁶ buněk bylo naočkováno do 125ml lahve a uchováno v RPMI doplněného jako v předchozím postupu a obsahujícího ALC ve dvou koncentracích (5mM a 10mM) 4 dny před transfekcí. Působení bylo opakováno na konci transfekce. Buňky, na které nebylo působeno ALC byly kultivovány za stejných podmínek a použity jako kontrolní.

15

Přechodná exprese pRL-CMV.

20 Na 12jamkové plotně (Corning) bylo 1 den před transfekcí naočkováno 10⁵ buněk na jamku. Pro transfekci byl použit liposom DOTAP (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) a plasmid pRL-CMV (Promega, č. kat. E2261) v 6 jamkách na vzorek. Stručně: 1,5 µg DNK a vodný roztok liposomu o koncentraci 9,2µM na jamku byly za laboratorní teploty smíseny (25 µl na vzorek) k vytvoření komplexu DNK-liposom. Po inkubaci po dobu 30 minut byl přidán stejný objem HBS 2x (20mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7,4) na jednu jamku a transfekční směs byla rozdělena (50 µl na jamku v doplněném mediu). Buňky byly s tímto komplexem inkubovány po dobu 5 hodin a potom komplex odstraněn promytím PBS (fosforečnanem pufrovaný fyziologický roztok o pH 7,4, prostý Ca²⁺ a Mg²⁺). Buňky byly udržovány v doplněném mediu obsahujícím ALC po dobu 24 hodin a potom použity k analýze. Jako kontrolní byla transfektována čistá DNK v PHS 1x (pRL-CMV).

30

Extrakce DNK.

35 Celková buněčná DNK byla od transfektovaných buněk extrahována alkalickou lyzí metodou uváděnou maniatismem. Po promytí PBS byly buňky odebrány s PBS (1 molů na jamku) a centrifugovány při 15 000 g po dobu 10 minut za laboratorní teploty.

40 Podle postupu byla každá peleta umístěna na led lyzována za použití: 100 µl roztoku I (50mM glukóza, 25mM Tris-HCl (pH = 8), 10mM EDTA (pH = 8)), 200 µl roztoku II (0,2N NaOH, 1% SDS), 150 µl roztoku III (5M octan draselný, ledová kyselina octová). Po odstředění při 12 000 g po dobu 5 minut při 4 °C byl supernatant oddělen a DNK vysrážena EtOH. Pelety byly resuspendovány v Te 1x (50 µl na vzorek).

40

Značení vzorků

45

Vzorek luciferázového genu byl získán štěpením pRL-CMV po dobu 2 hodin HindIII při 37 °C a potom za stejných podmínek BamHI. Po štěpení byla směs podrobena elektroforéze na 0,8 % agarózovém gelu v ústojném roztoku TAE 1x (40 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1,1mM EDTA a 37mM octan sodný) a excizí izolován fragment odpovídající luciferázovému genu. Značení luciferázového genu bylo provedeno značkovacím systémem Rediprime II DNK (Amersham Pharmacia biotech, č. kat. RPN 1633) a stabilizovaný Ridivue [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia biotech, č. kat. AA 0005) podle obdrženého návodu.

50

"Slot blot"

Vzorky DNK byly absorbovány na kladně nabitou nylonovou membránu (Boehringer, č. kat. 1209299) za použití přístroje Biorad Slot Blot. DNK byla navázána na filtr UV Stratalinkerem-2400 (Stratagene). Po předběžné inkubaci na filtru s hybridizačním roztokem QuikHyb (Stratagene, č. kat. 201220) po dobu 20 minut při 68 °C bylo po povaření s DNK lososího spermatu po dobu 2 minut přidáno $2,5 \cdot 10^6$ cpm.ml⁻¹ značeného vzorku. Hybridizace byla prováděna při 68 °C po dobu 1 hodiny a potom byl filtr dvakrát promýván ústojným roztokem I (SSC 2x SDS, 0,1 %) po dobu 15 minut za laboratorní teploty a potom ústojným roztokem II (SSC 0,1x, SDS, 0,1% po dobu 30 minut při 60 °C. Filtr byl k zobrazení vystaven v luminiscenčním přístroji ("Phosphor Imager") záření a potom denzitometricky analyzován s použitím softwaru IPLab Gel.

Denzitometrie "slot blot" (viz tabulka) prozrazuje, že neexistuje žádný rozdíl mezi hodnotami získanými u transfektovaných buněk v přítomnosti a nepřítomnosti ALC. Malý pokles byl pozorován u 10mM ALC. Tyto výsledky ukazují, že přítomnost ALC nemění buněčnou absorpci komplexu DNK-liposom buňkou, což ukazuje, že by ALC mohla ovlivňovat expresi luciferázy v oblasti transkripce.

Denzitometrické hodnoty (v relativních jednotkách)

	slot	objem	střední hodnota
čistá DNK	1	81620	
	2	93505	
	3	85305	72618,2
	4	64280	
	5	56880	
	6	54119	
komplex Dotap/DNK	7	239399	
	8	250530	
	9	251720	252088,5
	10	258812	
	11	258100	
	12	253970	
čistá DNK + 5mM ALC	13	59846	
	14	58324	
	15	61431	61441,5
	16	70373	
	17	63045	
	18	55630	
komplex Dotap/DNK + 5mM ALC	19	222013	
	20	255756	
	21	253422	240634,5
	22	234654	
	23	239053	
	24	238909	
čistá DNK + 10mM ALC	25	26328	
	26	71831	
	27	54172	52595,2
	28	70498	
	29	48707	
	30	44037	
komplex Dotap / DNK + 10mM ALC	31	173870	
	32	225644	
	33	116848	165345
	34	114911	
	35	157762	
	36	203035	

5 Tabulka: na obrázku jsou znázorněny jednotlivé hodnoty (v relativních jednotkách) navzokovaných filtrů získané denzitometrickou analýzou za použití softwaru IPLab Gel. Jak je výše uvedeno, pRL-CMV DNK byla transfektována Dotap (komplex Dotap/DNK) a transfekce byla provedena jak s buňkami, na které nebylo působeno (slot 7 až 12), tak s buňkami s 5mM (slot 19 až 24) a 10mM (slot 31 až 36) ALC. Jako kontrolní byla za stejných pokusných podmínek použita pRL-CMV bez liposomu (čistá DNK): buňky, na které nebylo působeno (slot 1 až 6), buňky s 5mM (slot 13 až 18) a 10mM (slot 25 až 30) ALC.

10 Shrnutí.

Porovnání mezi denzitometrickými hodnotami získanými transfekcí provedenou v přítomnosti nebo nepřítomnosti ALC ukazuje, že mezi permeabilitou buněk pro komplex DNK/Dotap a kladným účinkem ALC na aktivitu luciferázy není žádný vztah.

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Použití acetyl-L-karnitinu k přípravě léčiva pro použití v kombinaci s genovou terapií ke zvýšení exprese proteinů kódovaných transferovanými geny.

25

Konec dokumentu
