

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

418-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11. 02. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.02.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/19605274**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 09. 97**
(Věstník č. 9/97)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/19
C 12 N	15/11
C 12 N	15/52
C 12 N	15/74
C 12 N	15/79
A 61 K	38/18
A 61 K	38/19

(71) Přihlášovatel:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Müller Rolf prof. dr., Marburg, DE;
Zwicker Jörk dr., Marburg, DE;
Sedlacek Hans Harald prof. dr., Marburg,
DE;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

konstrukty nukleových kyselin najdou
uplatnění především v genové terapii.

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Konstrukty nukleových kyselin pro regu-
lovanou expresi genů, buňky obsahující
takové konstrukty a jejich použití pro vý-
robu léčiv**

(57) Anotace:

Konstrukty nukleových kyselin pro expresi genů regulovanou buněčným cyklem, buňky obsahující takové konstrukty jakož i jejich využití pro výrobu léků. Popisují se konstrukty nukleových kyselin pro buněčně nebo virově specifickou, jakož i pro buněčným cyklem regulovanou expresi nejméně jednoho z genů, obsahující následující komponenty: a) aktivátorovou sekvenci, která může aktivovat buněčně nebo virově specifickou bazální transkripci. b) promotorový modul obsahující nukleotidovou sekvenci, která váže alespoň jeden protein rodiny E2F a jinou nukleotidovou sekvenci, která váže nejméně jeden protein rodiny CHF, a která může dále obsahovat sekvenci iniciující transkripci. c) strukturní gen kodující účinnou látku, která je exprimována jednak buněčně nebo virově specificky, jakož i v závislosti na buněčném cyklu. Tyto

CZ 418-97 A3

418-97

Č. j.	12113
DOŠLO	18. III. 97
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ PŘÍL.	

Konstrukty nukleových kyselin pro expresi genů regulovanou buněčným cyklem, buňky obsahující tyto konstrukty a jejich použití k výrobě léčiv

Oblast techniky

Vynález se týká přípravy konstruktů nukleových kyselin (NK) pro expresi genů regulovanou buněčným cyklem, buněk obsahujících takové konstrukty jakož i jejich využití pro výrobu léků.

Dosavadní stav techniky

Byly popsány konstrukty NK, které mohou být využívány v genové technologii a především v genové terapii onemocnění. Při genové terapii se zavedou geny do organismu, ve kterém se mají exprimovat. Regulace exprese takových genů je důležitá pro terapeutický efekt genové terapie.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou konstrukty nukleových kyselin, které mohou být využity v genové terapii. Konstrukty nukleových kyselin podle vynálezu pro buněčně nebo virově specifickou, jakož i pro buněčným cyklem regulovanou expresi nejméně jednoho z genů, obsahují následující komponenty:

- a) aktivátorovou sekvenci, která může aktivovat buněčně nebo virově specifickou bazální transkripci.
- b) promotorový modul obsahující nukleotidovou sekvenci, která váže alespoň jeden protein rodiny E2F a jinou nukleotidovou sekvenci, která váže nejméně jeden protein rodiny CHF, a která může dále obsahovat sekvenci iniciující transkripci.

c) strukturální gen kódující účinnou látku, která je exprimována jednak buněčně nebo virově specificky, jakož i v závislosti na buněčném cyklu.

Promotorový modul konstruktů nukleových kyselin (b) podle vynálezu je nukleotidová sekvence, která váže alespoň jeden protein rodiny E2F. Tato sekvence ve výhodném provedení vynálezu obsahuje nukleotidovou sekvenci CTTGGCGGG nebo funkčně podobnou (analogickou) sekvenci, jako například TTTCGCGCC (E2F-vazebné místo pro DHFR gen) nebo TTTCGCGGC (E2F-1 vazebné místo).

Promotorový modul (b) podle vynálezu obsahuje také nukleotidovou sekvenci, která váže alespoň jeden protein rodiny CHF. Tato sekvence obsahuje ve výhodném provedení vynálezu nukleotidovou sekvenci TAGGAAA nebo funkčně podobnou (analogickou) sekvenci.

Promotorový modul (b) konstruktů nukleových kyselin podle vynálezu může brzdit účinek aktivátorové sekvence lokalizované proti směru transkripce (upstream sequence) v G0 a G1-fázi buněčného cyklu, a tak inhibovat expresi po směru transkripce lokalizovaných genů (c) (downstream sequence).

Ve výhodném provedení vynálezu jsou konstrukty nukleových kyselin aktivátorových sekvencí (a) buněčně nebo virově specifické.

Konstrukty nukleových kyselin se výhodně skládají z DNA. Pod pojmem "konstrukty nukleových kyselin (NK)" se rozumí umělé výtvořky z nukleových kyselin, které se mohou transkribovat v cílových buňkách. Ve výhodném provedení vynálezu jsou vloženy do vektoru, přičemž jsou obzvláště výhodné plazmidové a virové vektory.

Podle vynálezu může být prostřednictvím konstruktů nukleových kyselin nějaký gen (c) exprimován jednak buněčně, nebo virově specificky, jakož i v závislosti na buněčném

cyklu, přičemž se výhodně jedná o gen, který kóduje farmakologicky aktivní látku nebo enzym, který štěpí inaktivní předstupeň léčiva v jeho aktivní formu.

Konstrukty nukleových kyselin podle vynálezu obsahují aktivační sekvenci (a), která je výhodně vybrána ze skupiny promotorů nebo enhancerů (zesilovačů), které aktivují transkripci v endotheliálních buňkách, v buňkách hladkých svalů, v krevetvorných buňkách, lymfocytech, makrofázích, v tumorových buňkách nebo gliových buňkách, nebo z promotorových, eventuálně z enhancerových sekvencí virů HBV (virus hepatitidy B), HCV (virus hepatitidy C), HSV (herpes simplex virus), HPV (lidský papilomavirus), EBV (virus Epstein-Barrův), HTLV (lidský T-leukemický virus), HIV (virus lidské imunodeficiencie).

Předmětem předloženého vynálezu jsou také izolované buňky, které obsahují konstrukt nukleových kyselin podle vynálezu.

Ve výhodném provedení vynálezu se konstrukty nukleových kyselin podle vynálezu, nebo buňky, které je obsahují, využívají k výrobě léků pro léčbu nemoci, která se objevuje s nadměrným množением buněk, přičemž příprava léků zahrnuje zavedení konstrukt nukleových kyselin do cílové buňky a jeho expresi ve stadiu buněčné proliferace (dělení).

Konstrukty nukleových kyselin podle vynálezu se v této formě nevyskytují v přírodě, to znamená, že gen (c) konstrukt NK není přirozeně kombinovaný s aktivátorovou sekvencí (a) a promotorovým modulem (b).

Pod pojmem aktivační sekvence (a) se rozumí částečný úsek genu, na který se mohou vázat regulační proteiny, takzvané transkripční faktory, které jako celek aktivují geny lokalizované po směru transkripce.

Jako sekvence po směru transkripce (down stream sequence) se označují ty oblasti DNA, které leží ve směru transkripce, naproti tomu sekvence, které jsou uspořádané v opačném směru, se označují jako sekvence proti směru transkripce (up stream sequence).

Na promotorový modul podle vynálezu, který je od aktivační sekvence lokalizovaný po směru transkripce, se vážou transkripční faktory rodiny E2F, jakož i transkripční faktory rodiny CHF.

K rodině E2F-molekul patří například molekuly E2F1, E2F2, E2F3, E2F4 a E2F5, které mohou být eventuálně v komplexu s DP1, DP2 nebo DP3. K E2F-molekulám patří aktivující dimerní komplexy, jako například E2F1-DP1 a trimerní komplexy jako například E2F1-DP1-pRb (viz Bandara a další, Nature, 252, strana 249 (1991); Chellappan a další, Cell 65, strana 1053 (1991); Chittenden a další, Cell 65, strana 1073 (1991); Helin a další, Cell 70, strana 337 (1992); Kaelin a další, Cell 70, strana 351 (1992)). Komplexy E2F4-DP1 a E2F4-DP1-p107 byly popsány například v publikaci Beijersbergen a další, Genes Dev. 8, strana 2680 (1994) a Ginsberg a další, Genes Dev. 8, 2665 (1994). Dále by byly popsány odpovídající komplexy obsahující E2F2, E2F3, DP2 a DP3.

Transkripční faktory, ke kterým patří E2F-molekuly, mají společnou vlastnost, že obstarávají vztah mezi expresí genů a stavem, ve kterém se buňka nachází. V klidových buňkách je transkripce genů velmi malá, naproti tomu v dělících se buňkách je transkripce zvýšená. V experimentu s kultivovanými buňkami může být stimulace exprese dosažena přidáním séra, výhodně fetálního telecího séra, ke klidovým buňkám.

Buňky se množí buněčným dělením, přičemž se genom buňky před mitózou zreplikuje. Nedělící se, klidové buňky se nacházejí ve fázi označené jako G0 nebo jsou v buněčné progresi inhibované G1 fází. Když začne buněčné dělení,

opouštějí buňky G0 fázi eventuálně G1 blok. G1 fáze je obvykle poměrně dlouhotrvající fáze. V G0 a G1 fázi se obsah DNA buňky nachází v diploidním stavu. Na G1 fázi navazuje S-fáze, ve které probíhá syntéza DNA a ve které je genom duplikován. Na ni navazuje druhá G-fáze (G2-fáze), ve které je buňka v tetraploidním stavu. Poté probíhá mitóza a buňka se dostane opět do G1- nebo G0 fáze.

Gen B-myb participuje na buněčném dělení. Transkripce genů B-myb vzrůstá (například u myších fibroblastů) v pozdní G1-fázi buněčného cyklu a je nejvýraznější v S-fázi, viz Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705 (1993). Nukleotidová sekvence CTTGGCGGGAG je součástí promotorové sekvence genu B-myb a zúčastňuje se represe genů v G0 a G1 fázích (Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705 (1993)). Sekvence TTTCGCGC je součástí promotoru E2a adenoviru a reprezentuje zónu aktivujících E2F-vazebných míst, viz Mudryj a další, EMBO J. 9, strana 2179 (1990).

Určitá oblast promotorové sekvence genu B-myb může řídit expresi jiného genu, který je součástí konstruktů nukleových kyselin podle vynálezu. Tato sekvence, podle vynálezu označená jako promotorový modul (b), se podstatně účastní na regulaci především represe po směru transkripce lokalizované v genu v G0 a v rané G1 fázi.

Podle vynálezu má používaný promotorový modul (b) nukleotidovou sekvenci, na kterou se mohou vázat transkripční faktory E2F rodiny. Jedná se o následující sekvence:

CTTGGCGGG Sekvence Id. č. 1

nebo analogické varianty této sekvence jako například

TTTCGCGCC Sekvence Id. č. 2

TTTCGCGGC Sekvence Id. č. 3

Dále má podle vynálezu promototový modul (b) sekvenci lokalizovanou od E2F místa na 3'-konci po směru transkripce, na kterou se může vázat molekula rodiny CHF. Tato nukleotidová sekvence je nutná pro represi a navíc kooperuje při represi s vazebným místem pro E2F. Tato sekvence obsahuje obsah sekvenci

TAGGAAA Sekvence Id. č. 4

nebo funkčně analogickou variantu této sekvence.

V genu B-myb leží sekvence 1 a sekvence 4 promotorového modulu podle vynálezu v následujícím uspořádání:

CTTGCGGGAGATAGGAAAGT Sekvence Id. č. 5

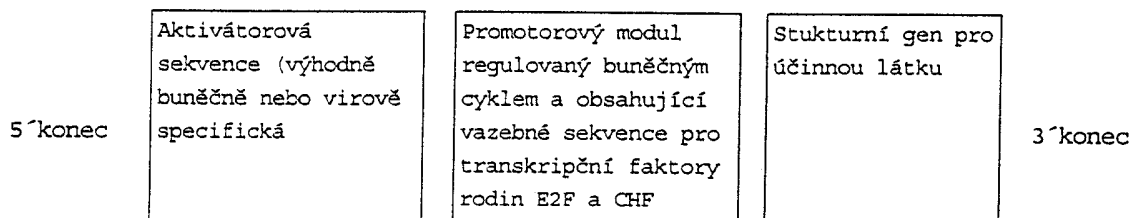
Promotorový modul obsahuje tuto sekvenci ve zvláště výhodném provedení vynálezu.

Tento promotorový modul podle vynálezu má vysokoafinitní vazebné místo pro E2F. Dochází k překvapující vazbě molekul E2F na tuto sekvenci (především CTTGCGGG) in vivo, tedy v živých buňkách (v protikladu k biochemickým (in vitro) vazebným datům, viz Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705 (1993). Tato vazba je časově omezená na G0- a rannou G1-fázi, zatímco v S, G2 a M fázi (to znamená při intenzivnější transkripci genu B-myb) není prokazatelná.

Dále nebylo známo, že pro účinnou represi je potřebný další vazebný region pro proteiny, lokalizovaný po směru transkripce od vazebného místa E2F z rodiny CHF (výhodně TAGGAAA).

Protože v okamžiku transkripce genu B-myb nebyla zjištěna žádná vazba proteinu E2F na nukleotidovou sekvenci CTTGCGGGAG, nehrají aktivované E2F-dimery, které jsou v buňkách k dispozici, žádnou znatelnou roli. Tím je represe zprostředkována molekulou E2F rozhodujícím mechanismem v regulaci B-myb.

Uspořádání konstruktů nukleových kyselin podle vynálezu může být schématicky znázorněno následovně:



Aktivátorová sekvence a strukturní gen pro účinnou látku konstruktů nukleových kyselin se podle vynálezu volí dle účelu použití. Především jsou to následující možnosti použití:

1. Terapie tumorů a chronických zánětů inhibicí proliferujících endoteliálních buněk

1.1.a. Aktivátorová sekvence aktivovaná v endoteliálních buňkách

Výhodné aktivátorové sekvence podle vynálezu jsou takové sekvence, které regulují gen, popřípadě elementy promotorů pro geny, které kódují proteiny vyskytující se především v buňkách endotelií, nebo v buňkách v bezprostředním sousedství s proliferujícími endoteliálními buňkami.

Některé z těchto proteinů byly popsány, viz Burrows a další, *Pharmac. Therp.* 64, strana 155, (1994) a Plate a další, *Brain Pathol.* 4, strana 207 (1994). Především se k těmto endoteliálně-specifickým proteinům například počítají:

- mozkově-specifický, endoteliální glukóza-1 přenášec, jeho promotorová sekvence byla popsána, viz Murakami a další (*J. Biol. Chem.* 267, strana 9300, (1992)).
- endoglin, jeho promotorová sekvence byla popsána, viz Bellon a další (*Eur. J. Immunol.* 23, strana 2340 (1993)) a Ge a další (*Gene* 138, strana 201 (1994)).

- receptory VEGF. Byly rozlišeny dva receptory, viz Plate a další, Int. J. Cancer 59, strana 520 (1994), VEGF-receptor-1 (ftl-1), viz de Vries a další, Science 255, strana 989 (1992)) a VEGF-receptor-2 (flk-1, KDR), viz Terman a další, BBRC 187, strana 1579 (1992)

Oba receptory jsou téměř výlučně exprimované na endotheliálních buňkách, viz Senger a další, Cancer Metast. Rev. 12, strana 303 (1993).

- ostatní endotheliálně specifické receptor-tyrozinkinázy

til-1 nebo til-2, viz Partanen a další, Mol. Cell. Biol. 12, strana 1698 (1992), Schnürch a Risau, Development 119, strana 957 (1993), Dumont a další, Oncogene 7, strana 1471 (1992)).

receptor pro B61 (Eck-receptor), viz Bartley a další, Nature 368, strana 558 (1994), Pandey a další, Science 268, strana 567 (1995), van der Geer a další, Ann. Rev. Cell. Biol. 10, strana 251 (1994)).

- B61, molekula B61 je ligandem pro B61-receptor, viz Holzman a další, J. Am. Soc. Nephrol. 4, strana 466 (1993), Bartley a další, Nature 368, strana 558 (1994)

- Endothelin, a to především

Endothelin B, jeho promotorová sekvence byla popsána, viz Benatti a další, J. Clin. Invest. 91, strana 1149 (1993).

Endothelin-1, jeho promotorová sekvence byla popsána Wilsonem a dalšími, Mol. Cell. Biol. 10, strana 4654 (1990).

- Receptory pro endothelin, především receptor pro endothelin-B, viz Webb a další, Mol. Pharmacol. 47,

- strana 730 (1995); Haendler a další, J. Cardiovasc. Pharm. 20, strana 1(1992).
- Receptor pro manóza-6-fosfát, jeho promotorová sekvence byla popsána, viz Ludwig a další (Gene, 142, strana 311 (1994)), Oshima a další (J. Biol. Chem. 263, strana 2553 (1988)) a Pohlmann a další (PNAS USA 84, strana 5575, (1987)).
 - von Willebrandův faktor, jeho promotorová sekvence byla popsána v publikaci Jahroudi a Lynch, Mol. Cell. Biol. 14, strana 999 (1994); Ferreira a další, Biochem. J. 293, strana 641 (1993) a Aird a další, PNAS USA 92, strana 4567 (1995)).
 - IL-1 α , IL-1 β (interleukin 1 α a 1 β), jejich promotorové sekvence byly popsány v publikacích Hangen a další, Mol. Carcinog. 2, strana 68, (1986); Turner a další, J. Immunol. 143, strana 3556 (1989); Fenton a další, J. Immunol. 138, strana 3972 (1987); Bensi a další, Cell Growth Diff. 1, strana 491 (1990); Hiscott a další, Mol. Cell. Biol. 13, strana 6231 (1993) a Mori a další, Blood 84, strana 1688 (1994).
 - IL-1-receptor, promotorová sekvence byla popsána, viz Ye a další, PNAS USA 90, strana 2295 (1993).
 - VCAM-1 (adhezivní molekula vaskulárních buněk), promotorová sekvence byla popsána, viz Neish a další, Mol. Cell. Biol. 15, strana 2558 (1995); Ahmad a další, J. Biol. Chem. 270, strana 8976 (1995); Neish a další, J. Exp. Med. 176, strana 1583 (1992), Iademarco a další, J. Biol. Chem. 267, strana 16323 (1992) a Cybulsky a další, PNAS USA 88, strana 7859 (1991).
 - syntetické aktivátorové sekvence, jako alternativa k přirozeným endotheliálně specifickým promotorům se dají použít také syntetické aktivátorové sekvence, které se skládají z oligomérních vazebných míst pro transkripční

faktory, které jsou preferenčně nebo selektivně aktivní v endoteliálních buňkách. Příkladem je transkripční faktor GATA-2, jehož vazebné místo v genu pro endothelin-1 je 5'-TTATCT-3', viz Lee a další, J. Biol. Chem. 266, strana 16188 (1991); Dorfmann a další, J. Biol. Chem. 267, strana 1279 (1992) a Wilson a další, Mol. Cell. Biol. 10, strana 4854 (1990).

1.1b Aktivátorové sekvence aktivované v buňkách v sousedství aktivovaných endoteliálních buněk

U proliferujících endoteliálních buněk se stávají sousední buňky přístupné pro makromolekuly z krevního řečiště prostřednictvím otevřených "těsných spojení" (tight junctions). Pro vzájemné funkční a anatomické vztahy jsou buňky v sousedství aktivovaných endoteliálních buněk cílovými buňkami v smyslu tohoto vynálezu.

- VEGF, regulační sekvence genu VEGF jsou:

promotorová sekvence genu VEGF (5' hraniční oblast), viz Michenko a další, Cell. Mol. Biol. Res. 40, strana 35 (1994); Tischer a další, J. Biol. Chem. 266, strana 11947 (1991) nebo

enhancerové sekvence genu VEGF (3' boční oblast), viz Michenko a další, Cell. Mol. Biol. Res. 40, strana 35 (1994) nebo

gen c-Src, viz Mukhopadhyay a další, Nature 375, strana 557 (1995); Bonham a další, Oncogene 8, strana 1973 (1993); Parker a další, Mol. Cell. Biol. 5, strana 831 (1985); Anderson a další, Mol. Cell. Biol. 5, 1122 (1985) nebo

gen V-Src, viz Mukhopadhyay a další, Nature 375, strana 557 (1995); Anderson a další, Mol. Cell. Biol. 5, 1122 (1985); Gibbs a další, J. Virol. 53, strana 19 (1985)

- receptory pro steroidní hormony a jejich promotorové elementy (Truss a Beato, Endocr. Rev. 14, strana 459 (1993)), především
- virový promotor tumoru myší prsní žlázy (mouse mammary tumor virus, MMTV), cDNA sekvence promotorové oblasti LTR (long terminal repeat, dlouhá koncová repetice) viru MMTV byla popsána, viz Chalepakis a další, Cell 53, strana 371 (1988) a Truss a Beato (Endocr. Rev. 14, strana 459 (1993)).

1.2 Strukturní geny pro protinádorové (nebo protizánětlivé) látky.

1.2.a Inhibitory proliferace.

Za protinádorové a protizánětlivé látky podle vynálezu jsou považované DNA sekvence kódující proteiny, které inhibují proliferaci endotheliálních buněk. Patří sem například sekvence DNA pro:

- retinoblastomový protein (pRb/p110) a jeho analoga p107 a p120
- protein p53
- protein p21 (WAF-1)
- protein p16
- CdK-inhibitory
- protein GADD45
- protein bak

Aby se zabránilo rychlé intracelulární inaktivaci těchto inhibitorů buněčného cyklu, jsou využívány výhodně takové geny, které vykazují mutace v inaktivačních místech exprimovaných proteinů, přičemž není nijak omezena jejich funkce.

Retinoblastomový protein (pRb) a jeho příbuzní p107 a p130 jsou inaktivovány prostřednictvím fosforylace. Výhodně jsou tudíž využívány sekvence cDNA pro pRb/p110-, p107- nebo p130-protein, které mají takové bodové mutace, že místa, kde je původně kódovaný protein fosforylován, jsou zaměněna za nefosforylovatelné aminokyseliny.

1.2b) Inhibitory angiogeneze

Za protinádorové eventuálně protizánětlivé látky jsou považovány sekvence DNA kódující proteiny, které inhibují angiogenezi. K těmto proteinům se počítají například:

- tkáňový faktor (tissuefactor, TF) a jeho fragmenty schopné koagulace
- inhibitor-1 plasminogenového aktivátoru (PAI-1)
- PAI-2
- PAI-3
- angiostatin
- interferony
 - IFN- α
 - IFN- β
 - IFN- γ
- faktor krevních destiček 4 (platelet factor)
- IL-12 (interleukin-12)
- TIMP-1
- TIMP-2
- TIMP-3
- leukémii inhibující faktor (Leukemia Inhibitor Factor LIF)

1.2c) cytostatické a cytotoxické proteiny

Za protinádorové eventuálně protizánětlivé látky se také považují sekvence DNA pro proteiny, které přímo nebo nepřímo vykazují cytostatické účinky na tumory. K nim počítáme především:

- protilátky a stěpné produkty protilátek
- perforin
- granzym
- IL-2
- IL-4
- IL-12
- interferony, jako například
 - IFN- α
 - IFN- β
 - IFN- γ
- TNF (faktor nekrotizující tumory)
 - TNF- α
 - TNF- β
- onkostatin M
- magainín a jeho deriváty, viz Cruciani a další, PNAS USA 88, strana 3792 (1991); Peck-Miller a další, Cancer Chemoth. Pharmac. 32, strana 109 (1993)
- sfingomyelináza (Jarvis a další, PNAS USA 91, strana 73 (1994)).

1.2d) Induktory zánětu

Za protinádorovou látku je dále považována sekvence DNA proteinu, který přímo eventuálně dodatečně stimuluje k

protinádorovému účinku záněty a tím přispívá k eliminaci tumorových buněk. K nim jsou především počítány:

- RANTES (MCP-2)
- chemotaktický a aktivační faktor monocytů (monocyte chemotactic and activating factor MCAF)
- IL-8
- makrofágový protein-1 zánětu (macrophage inflammatory protein-1, MIP-1a, - β)
- neutrofily aktivující protein-2 (neutrophile activating protein-2, NAP-2)
- IL-3
- IL-5
- inhibiční faktor lidské leukémie (human leukemia inhibitory factor, LIF)
- IL-7
- IL-11
- IL-13
- GM-CSF
- G-CSF
- M-CSF
- bakteriální proteiny aktivující komplement
- faktor kobřího jedu (Cobra Venom Factor, CVF) a jeho částečné sekvence.

Jako účinné látky vynálezu podle vynálezu mohou být k použity také DNA sekvence kódující fúzní proteiny složené z vybraného cytokinu a Fc-části lidského imunoglobulinu. Takové sekvence DNA a jejich příprava byly popsány v EP 0464 633 A1.

1.2e) Enzymy aktivující prekurzory cytostatika

Za protinádorové eventuálně protizánětlivé látky je nutné také považovat sekvence DNA pro enzym, který je schopen převést prekurzor protinádorově účinné látky na aktivní protinádorovou látku.

Takové enzymy, které stěpí inaktivní prekurzory (prodrugs) v aktivní cytostatika (drugs), jsou již dle příslušných prekurzorů i dle aktivních léků přehledně popsány, viz Deonarain a další, Br. J. Cancer 70, 786 (1994); Mullen, Pharmac. Ther. 63, strana 199 (1994); Harris a další, Gene Ther. 1, strana 170 (1994).

Například je možné využít sekvence DNA pro následující enzymy:

- thymidinkináza viru Herpes Simplex, viz Garapin a další, PNAS USA 76, strana 3755, (1979); Vile a další, Cancer Res. 53, strana 3860 (1993); Wagner a další, PNAS USA 78, strana 1441 (1981); Moelten a další, Cancer Res. 46, strana 5276 (1986); J. Natl. Cancer Inst. 82, strana 297 (1990)).
- thymidinkináza viru Varicella Zoster, viz Huber a další, PNAS USA 88, strana 8039 (1991); Snoek, Int. J. Antimicrob. Agents 4, strana 211(1994)
- bakteriální nitroreduktáza, viz Michael a další, FEMS Microbiol. Letters 124, strana 195 (1994); Bryant a další, J. Biol. Chem. 266, strana 4126 (1991); Watanabe a další, Nucleic Acids Res. 18, strana 1059 (1990))
- bakteriální β -glukuronidáza, viz Jefferson a dalsi, PNAS USA 83, strana 8447, (1986)
- rostlinná β -glukuronidáza ze Secale cereale, viz Shulz a další, Phytochemistry 26, strana 933 (1987))
- lidská β -glukuronidáza, viz Bosslet a další, Br. J. Cancer 65, strana 234 (1992); Oshima a další, PNAS USA 84, strana 685 (1987)

- lidská karboxypeptidáza (CB) například:

CB-A žírných buněk, viz Reynolds a další, J. Clin. Invest. 89, strana 273 (1992)

CB-B pankreasu, viz Yamamoto a další, J. Biol. Chem. 267, strana 2575 (1992); Catusus a další, J. Biol. Chem. 270, strana 6651 (1995))

- bakteriální karboxypeptidáza, viz Hamilton a další, J. Bacteriol. 174, strana 1626 (1992); Osterman a další, J. Protein Chem. 11, strana 561 (1992)

- bakteriální β -laktamáza, viz Rodrigues a další, Cancer Res. 55, strana 63, (1995); Hussain a další, J. Bacteriol. 164, strana 223 (1985); Coque a další, EMBO J. 12, strana 631 (1993))

- bakteriální cytozindeamináza, viz Mullen a další, PNAS USA 89, strana 33 (1992); Austin a další, Mol. Pharmac. 43, strana 380 (1993); Danielson a další, Mol. Microbiol. 6, strana 1335 (1992)

- lidská kataláza eventuálně peroxidáza, viz Ezurum a další, Nucl. Acids Res. 21, 1607 (1993)

- fosfatázy, především

lidská alkalická fosfatáza, viz Gum a další, Cancer Res. 50, strana 1085 (1990)

lidská kyselá fosfatáza, viz Sharieff a další, Am. J. Hum. Gen. 49, strana 412 (1991); Song a další, Gene 129, strana 291, (1993); Taylor a další, Nucl. Acids Res. 18, strana 4928 (1990))

kyselá fosfatáza typu 5, viz Gene 130, strana 201 (1993)

- oxidázy, především

lidská lisyloxidáza, viz Kimi a další, J. Biol. Chem. 270, strana 7176 (1995)

lidská kyselá D-aminooxidáza, viz Fukui a další, J. Biol. Chem. 267, strana 18631 (1992)

- peroxidázy, obzvláště

lidská glutathion peroxidáza, viz Chada a další, Genomics 6, strana 268 (1990); Ishida a další, Nucl. Acids Res. 15, strana 10051 (1987)

lidská peroxidáza eosinofilů, viz Ten a další, J. Exp. Med. 169, strana 1757 (1989); Sahamaki a další, J. Biol. Chem. 264, strana 16828 (1989))

lidská peroxidáza štítné žlázy, viz Kimura, PNAS USA 84, 5555 (1997)

K usnadnění sekrece enzymu může být v DNA nahrazena homologní signální sekvence heterologní sekvencí, která zlepší sekreci proteinu do extracelulárního prostoru.

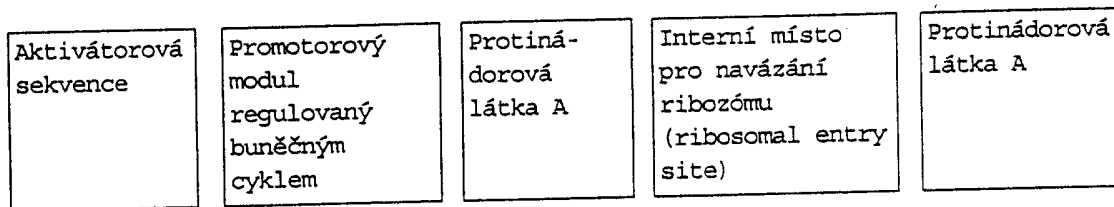
Tak může být například signální sekvence β -glukuronidázy (nukleotidy na pozici 27 až 93; viz Oshima a další, PNAS USA 84, strana 685 (1987)) nahrazena signální sekvencí pro imunoglobulin (nukleotidy na pozici 63 až 107; Riechmann a další, Nature 332, strana 323 (1988)).

Dále jsou výhodné DNA kódující takové enzymy, které jsou díky bodovým mutacím ve zmenšené míře uskladňovány v lyzozómech a více sekretovány.

1.3. Kombinace několika protinádorových nebo protizánětlivých látek

Předmětem vynálezu jsou dále konstrukty nukleových kyselin, ve kterých existuje kombinace DNA-sekvencí několika stejných protinádorových nebo protizánětlivých látek (A,A) nebo odlišných protinádorových substancí (A,B). Jako regulační element se k expresi dvou DNA-sekvencí mezi ně vsouvá cDNA

vnitrogenového místa pro nasednutí ribosomu "internal ribosome site" (IRES).



Takové IRES regulační elementy byly popsány, viz například Mountford a Smith, TIG, 11, strana 179 (1995); Kaufman a další, Nucl. Acids Res. 19, strana 4485 (1991); Morgan a další, Nucl. Acids Res. 20, strana 1293 (1992); Dirks a další, Gene 128, strana 247 (1993); Pelletier a Sonenberg, Nature 334, strana 320 (1988); Sugitomo a další, BioTechn. 12, strana 694 (1994).

Ke spojení DNA pro protizánětlivou látku A (na 3' konci) a DNA pro protizánětlivou látku B (na 5' konec) mohou být využity cDNA IRES-sekvence Polioviru (nukleotidy na pozici 140 až 630 5' nepřekládané terminální části (UTR); viz Pelletier a Sonenberg, Nature 334, strana 320 (1988)).

Taková účinná látka má podle kombinace aditivní (A+A, A+B1) nebo synergické účinky podle vynálezu.

2. Účinné látky k odstranění nedostatku tvorby krevních buněk

2.1. Výběr aktivátorových sekvencí pro buňky krvetvorby

Aktivátorové sekvence podle vynálezu výhodně využívají regulační sekvence respektive elementy genu, který kóduje protein exprimovaný zvláště intenzívně nebo selektivně krvetvorných buňkách. K takovým regulačním sekvencím patří promotorové sekvence pro geny cytokinů nebo jeho receptorů, jejichž exprese v nezralých krvetvorných buňkách (nebo v okolních buňkách, jako například v buňkách stromatu) poskytuje

jako účinnou látku žádaný cytokin, účinkující na krvinečné buňky.

K takovým cytokinům působícím na nezralé buňky krvinečvorby patří například:

- faktor kmenových buněk (Stem Cell Factor)
- IL-1
- IL-3
- IL-6
- GM-CSF

2.2. Výběr strukturních genů pro účinné látky použité v krvinečvorných buňkách

Účinnou látkou podle vynálezu je sekvence DNA, jejíž protein po exprimaci způsobí proliferaci a/nebo diferenciaci krvinečných buněk.

3. Účinné látky pro terapii autoimunních onemocnění, alergií, zánětů a pro zamezení odhojení orgánů

3.1. Výběr aktivátorových sekvencí pro autoimunní onemocnění a jiné

Jakožto aktivátorové sekvence je možné využít promotorové sekvence genů pro proteiny, které jsou intenzivněji tvořené při imunitních reakcích v makrofázích a/nebo v lymfocytech. Takovými proteiny jsou například:

- IL-1
- IL-1 β
- receptor pro IL-1
- IL-2
- receptor pro IL-2

- IL-3
- receptor pro IL-3
- IFN- γ
- IL-4
- receptor pro IL-4
- IL-5
- IL-6
- LIF
- IL-7
- IL-10
- IL-11
- IL-12
- IL-13
- GM-CSF
- receptor pro GM-CSF
- proteiny integrin- β 2

3.2. Výběr genů pro účinné látky pro léčbu autoimunních onemocnění a jiných

Účinná látka podle vynálezu je sekvence DNA pro cytokin, chemokin, růstový faktor nebo jeden z jeho inhibitorů, protilátku, fragment protilátky, inhibitor enzymu nebo enzym. Výběr účinné látky se řídí podle léčeného základního onemocnění a vybrané promotorové sekvence.

4. Účinná látka k léčení artritídy

4.1. Výběr aktivátorové sekvence pro artritidu

Za aktivátorovou sekvenci podle vynálezu je považována nukleotidová sekvence (promotorová nebo enhancerová sekvence),

interagující s transkripčními faktory, která je tvořena nebo je aktivní v synoviálních a zánětlivých buňkách. Výhodnými promotorovými sekvencemi podle vynálezu jsou regulační sekvence respektive elementy genů, které kódují proteiny exprimované obzvláště v synoviálních buňkách a v buňkách zánětu.

4.2. Výběr strukturních genů účinných látek pro artritidu

Aktivní látkou podle vynálezu je sekvence DNA, která exprimuje protein inhibující přímo či nepřímo zánět například v kloubu a/nebo podporuje rekonstrukci extracelulární matrix (chrupavky, vazebné tkáně) v kloubu.

5. Příprava účinné látky proti původci infekce

Účinná látka může být připravená ve dvou základně rozdílných formách

- pro léčbu virových infekcí a parazitárních invazí nebo
- k ochraně před infekčními onemocněními způsobenými viry, bakteriemi, nebo parazity.

K ochraně před infekčními onemocněními slouží očkovací látky. Možnosti konvenčních cest výroby účinných očkovacích preparátů jsou však omezené, viz Brown, Int. J. Technol. Assessm. Health Care 10, strana 161 (1994); Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, strana 263 (1992); Arnon a další, FASEB J. 6, strana 3265 (1992).

Důsledkem toho byl vývoj technologie DNA-vakcinace. DNA-vakcíny však kladou vysoké požadavky na bezpečnost a zamezení vedlejších účinků, viz Fynan a další, Int. J. Immunopharm. 17, strana 79 (1995), Donnelly a další, Immunol. 2, strana 20 (1994).

Účinné látky k ochraně před infekčním onemocněním podle vynálezu vykazují vysokou mírou bezpečnosti s ohledem na jejich buněčnou specifitu a regulaci buněčným cyklem.

5.1. Výběr aktivátorových sekvencí

a) k léčení infekčních onemocnění:

Za aktivátorové sekvence jsou zvoleny promotorové sekvence buněčných genů, jejichž aktivita se obzvláště mění ve spojení s bakteriální a parazitární infekcí nebo promotorové sekvence takových virů, které infikované buňky transformují a podnítí je k proliferaci.

K takovým virům patří například HBV, HCV, HSV, HPV, HIV, EBV a HTLV.

5.2. Výběr strukturních genů pro účinné látky

a) pro léčení infekčních onemocnění

Za účinnou látku je zvolena taková DNA proteinu, který vykazuje cytostatické, cytotoxické, antibakteriální nebo antivirální účinky. Příklady pro cytotoxické a cytostatické proteiny byly uvedeny již výše. Jako příklad pro antibakteriální nebo antivirální proteiny je možné vzít protilátky nebo fragmenty protilátek. Při volbě enzymu je přihlíženo k tomu, zda enzym poskytuje ze stěpitelného prekursoru antibakteriální, antivirální, cytotoxický nebo antiparazitárně účinnou látku.

Účinnými látkami podle vynálezu jsou antivirálně účinné cytokiny a růstové faktory. K nim se počítají například sekvence DNA kódující následující účinné látky:

- IFN- α
- IFN- β
- IFN- γ

- TNF- β
- TNF- α
- IL-1
- TGF- β

Jako účinné látky ve smyslu vynálezu mohou být využity také sekvence DNA fúzních proteinů mezi cytokinem, růstovým faktorem nebo extracelulární částí receptoru a Fc-částí lidského imunoglobulinu. Takové sekvence a jejich výroba byly popsány například v EPA 0464 633 A1.

b) k ochraně před infekčními onemocněními

Jako účinná látka je zvolena DNA pro protilátku nebo fragment protilátky se specifitou proti původci infekce, nebo DNA pro takový protein původce infekce, který imunitní reakcí (to znamená prostřednictvím vazby protilátky a/nebo prostřednictvím cytotoxických T-lymfocytů) způsobí neutralizaci a/nebo odstínění původce. Takové neutralizační antigeny se již používají jako očkovací antigeny, viz. přehled Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, strana 263 (1992).

6. Účinné látky k léčení leukémií a tumorů

6.1. Výběr aktivátorových sekvencí pro leukémie a tumory.

Za aktivátorovou sekvenci je považována nukleotidová sekvence (promotorová nebo enhancerová), která je vytvořena nebo je aktivní v leukemických nebo tumorových buňkách, a která interaguje s transkripčními faktory.

Výhodné aktivátorové sekvence podle vynálezu jsou regulační sekvence respektive elementy genů, které kódují proteiny tvořené především v leukemických a tumorových buňkách.

6.2. Výběr strukturního genu pro látky účinné v leukemických a nádorových buňkách

Za účinnou látku ve smyslu vynálezu je považována sekvence DNA kódující protein, který po exprimaci inhibuje proliferaci buněk a to především buněk tumorových a leukemických. K těmto inhibitorům buněčného cyklu patří například sekvence DNA pro cytostatické a cytotoxické proteiny a enzymy, jak již byly popsány.

Za inhibitor buněčného cyklu je dále považována sekvence DNA, která exprimuje protein vykazující přímý nebo nepřímý cytostatický nebo cytotoxický účinek na leukémie a tumory.

7. Látky účinné v inhibici proliferace buněk hladkých svalů při ucpání cév

7.1. Výběr aktivátorové sekvence pro buňky hladkého svalu

Jako aktivátorové sekvence podle vynálezu jsou výhodně využívány regulační sekvence respektive elementy genů, kódujících proteiny tvořené přednostně v buňkách hladkých svalů.

7.2. Výběr strukturních genů látek účinných v buňkách hladkého svalu

Za účinné látky podle vynálezu jsou považovány sekvence DNA, které exprimují protein inhibující proliferaci buněk hladkého svalu. K těmto inhibitorům proliferace patří výše zmíněné proteiny.

Za účinnou látku je však také považována sekvence DNA kódující enzym, který mění inaktivní prekurzor cytostatika ve formu aktivní.

8. Účinné látky pro inhibici nebo aktivaci koagulace

8.1. Výběr aktivátorové sekvence k inhibici nebo aktivaci srážení

Jako aktivátorové sekvence podle vynálezu jsou výhodně využívány regulační sekvence respektive elementy genů, které kódují proteiny prokazané v buňkách hladkého svalu, v aktivovaných endotheliálních buňkách, v aktivovaných lymfocytech nebo v aktivovaných makrofázích.

a) buňky hladkého svalu

Příklady promotorových sekvencí genů exprimovaných v buňkách hladkého svalstva již byly uvedeny.

b) aktivované endotheliální buňky

Příklady proteinů, které jsou přednostně tvořeny v aktivovaných endotheliálních buňkách byly popsány, viz Burrows a další (Pharmac. Therp. 64, strana 155 (1994)). K těmto proteinům produkovaným intenzivněji v endotheliálních buňkách se počítají především proteiny, které již byly popsány výše a to i se svými promotorovými sekvencemi .

c) aktivované makrofágy a/nebo aktivované lymfocyty.

Za aktivátorové sekvence podle vynálezu jsou považovány promotorové sekvence genů pro proteiny, které jsou intenzivně tvořené při imunologické reakci v makrofázích a/nebo v lymfocytech.

8.2. Volba strukturního genu pro účinnou látku k inhibici nebo aktivaci srážení.

Jako účinná látka podle vynálezu je využívána sekvence DNA kódující protein, který přímo nebo nepřímo inhibuje agregaci trombocytů nebo některý krevní koagulační faktor nebo stimuluje fibrinolýzu.

Taková účinná látka je označovaná jako inhibitor koagulace. Jako inhibitory koagulace je možné použít například geny pro: aktivátory plasminogenu (PA), tkáňové aktivátory plasminogenu (tPA) nebo urokináze podobné PA (uPA), dále pak protein C, antitrombín-III, C-1S-inhibitor, μ 1-antitrypsín,

inhibitor dráhy tkáňového faktoru (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI) nebo hirudin.

Jako účinné látky podle vynálezu jsou také využívány sekvence DNA, které kódují protein podporující srážení krve. Příklady takových proteinů jsou například proteiny krevní plazmy jako je faktor VIII nebo faktor IX.

9. Účinné látky k ochraně poškození CNS (poškození centrální nervové soustavy)

9.1. Aktivátorové sekvence pro účinnou látku vhodnou ochraně před poškozeními CNS

9.1a) Aktivátorové sekvence aktivované v endotheliálních buňkách

Předevšímse mezi takové aktivátorové sekvence počítají promotorové sekvence pro geny endotheliálně specifických proteinů.

9.1b) Aktivátorové sekvence aktivované v gliových buňkách

Za preferovanou aktivátorovou sekvenci je dále považována nukleotidová sekvence (promotorová nebo enhancerová), která interaguje s transkripčními faktory a je tvořená nebo je aktivní zvlátní mírou v gliových buňkách.

9.2. Volba strukturního genu pro neurospecifické faktory.

Za neurospecifický faktor podle vynálezu je považována DNA sekvence, která kóduje neuronální růstový faktor. Vynález je blíže popsán v následujících příkladech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Biochemické experimenty

Vzájemný účinek mezi nukleotidovou sekvencí CTTGCGGGAG B-myb promotoru a E2F-komplexy byl zkoumán pomocí změny elektroforetické mobility (electrophoretic mobility shift assay) (EMSA) a otiskem bazí chráněných břed methylocí (methylation protection footprinting, MPF).

EMSA byla provedena podle publikace Barberis a další, Cell 50, strana 347 (1987).

Následující fúzní proteiny GST byly exprimovány v E. coli a přečištěny afinitní chromatografií:

- E2F1, aminokyseliny 87 až 1398, viz Helin a další, Cell 70, strana 337 (1992); Kaelin a další, Genes Dev. 8, strana 2665 (1994)
- E2F4, celý protein, viz Beijersbergen a další, Genes Dev. 8, strana 2680 (1994); Ginsberg a další, Genes Dev. 8, strana 2665 (1994)
- protein pRb, aminokyseliny 300 až 928, Bernards a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, strana 6474 (1989)
- protein p107, aminokyseliny 744-2460 (Ewen a další, Cell 66, strana 1155 (1991))

Purifikované proteiny (asi 100 ng) byly inkubovány s 0.5 pmol ³²P-značené sondou 30 minut při 22°C v 15 µl pufru obsahujícího 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% v/v glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT a 67 µg poly[dA/dT]/µl. Sondy byly značeny zavedením 4 až 6 bází na 5' přesahující konec. Sondy byly rozděleny ve 4% nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu s 0.5 x TBE při 4°C a 10 V/cm. Gely byly exponovány s filmem citlivým na rentgenové záření a kvantitativně

analyzovány s pomocí zařízení "Molecular Dynamics Phosphor-Imager".

Byly použity následující sondy:

- B myb, viz Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705, (1993)

5'-GGCGCCGACGCACTTGGCGGGAGATAGGAAAGTGGTTCTGTG

Sekvence Id. č. 6 (E2F vazebné místo je podtržené)

- mutovaný B-myb

5'-GGCGCCGACGCACTTGGCTGGAGATAGGAAAGTGGTTCTGTG

Sekvence Id. č. 7

- E2a promotor adenoviru

5'-gatcGACTAGTTTCGCGCCCTTCTActag

Sekvence Id. č. 8 (malá písmena znázorňují nedůležité sekvence, které byly použity pro doplňovací reakci (fill-in labelling reaction))

- kontrolní sonda:

5'-GATCCTCTCACCTGCTGCTAG

Sekvence Id. č. 9

MPF byla provedena následujícím způsobem:

oligonukleotid kódující B-myb byl označen na konci, přečistěn a spojen s antikódujícím řetězcem. Vazba proteinů byla provedena tak, jak u bylo popsáno u metody EMSA. Bylo přidáno dva mikrolitry 2% dimethylsulfátu (DMS) a methylační reakce byla zastavena po 3 minutách přidáním 2 μ l 60mM β -merkaptoethanolu. Sondy byly rozděleny ve 4% gelu a přeneseny na iontoměničový papír. Pruhy byly vystřiženy, promyty v TE pufre a eluovány při 65°C s TE pufrem, který obsahoval 1,5 M NaCl. Eluovaná DNA byla extrahována chloroformem, precipitována a rozpustěna ve vodě. Stejná

množství radioaktivně značených pruhů, které zůstaly na místě nanesení (volná sonda) a které odputovaly (komplex), byla stěpena 10% piperidinem při 95°C po dobu 30 minut. DNA byla precipitována a nanášena na 15% denaturující akrylamidový gel.

Jak ukazuje obrázek 1, vážou se proteiny E2F1-DP1, E2F1-DP1-pRb, E2F4-DP1 a E2F4-DP1-p107 na vazebné místo pro E2F B-myb promotoru se srovnatelnou silou a s podobnou afinitou jako k vysokoafinitnímu E2a-promotor-vazebnému místu adenoviru, viz Mudryj a další, EMBO J. 9, strana 2179 (1990)).

Kvantifikace vazby E2F-komplexu na E2F-vazebné místo B-myb promotoru byla stanovena pomocí zařízení "Phosphor-Imager", přičemž se ukázalo množství vázané sondy.

Byly získány následující výsledky (podíl vázané sondy):

- E2F-vazebné místo E2a-promotoru: 1.0% (E2F1-DP1) respektive 0.8% (E2F4-DP1)
- B-myb: 0.7% (E2F1-DP1) eventuálně 2.0% (E2F1-DP1) eventuálně 2.0% (E2F4-DP1).
- mutovaný B-myb: < 0.01%
- negativní kontrolní sonda: <0.002%.

E2F4 komplexy byly vybrány pro "protection footprinting" analýzu s dimethylsulfátem (DMS), protože protein p107 byl prokázán jako důležitý vazebný protein E2F komplexu, který reaguje s vazebnou strukturou, viz Lam a další, EMBO J. 13, strana 871 (1994)) a E2F4 je jediný známý člen Rodiny E2F, který reaguje s p107, viz Beijersbergen a další, Genes Dev. 8, strana 2680 (1994); Ginsberg a další, Genes Dev. 8, strana 2665 (1994)).

Jako ukazuje obrázek 2, byly nukleotidy v oblasti E2F-vazebného místa chráněny (CTTGGCGGGAG, chráněné guaniny jádra E2F-vazebného místa jsou podtržené, přičemž dva nejkrajnější guaniny lokalizované na 3' konci po směru

transkripce vykazují jenom částečnou ochranu). Výsledky dále ukazují, že nebyly prokázány žádné rozdíly mezi otisky E2F4-Dp1 (volný E2F) a E2F4-DP1-p107. Tato pozorování jasně ukazují, že se E2F-komplexy vážou na DNA nezávisle na proteinu p107 a že tyto vazby na DNA mohou být prokázány metodou MPF. Ve shodě je taky zjištění, že asociační a disociační poměr pro E2F4-DP1 a E2F4-DP1-p107 komplexy si je velmi podobný.

Příklad 2: Výzkum na živých buňkách.

Aby byla prokázána vazba E2F na B-myb promotor nejen v biochemických testech, ale také v živých buňkách, byly NIH3T3 fibroblasty synchronizovány odejmutím séra a následně stimulovány 10% FKS. V různých časech po stimulaci byla in vivo zkoumána progresse buněčného cyklu (obsah DNA), exprese mRNA B-myb a vazba E2F-komplexů na E2F-vazebné místo (ochrana před methyací). Jako ukazuje obrázek 3A, vede stimulace klidových buněk asi po 12 hodinách ke vstupu do S-fáze.

Jak již bylo prokázáno, viz Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705 (1993)), vzrůstá exprese B-myb mRNA 8 hodin po stimulaci (to znamená v pozdní G1-fázi) a dosahuje nejvyšší hodnoty po asi 12 hodinách, to znamená v čase vstupu do S-fáze.

Pro analýzu role E2F-vazebného místa v buňce, byl proveden genomický DMS "footprinting", viz Lucibell a další EMBO J. 14, strana 132 (1995); Pfeifer a další, Science 246, strana 810 (1989).

Byly použity následující primery:

1. primer: 5'-TCAGGACTCAGGCTGCT Sekvence Id. č. 10
2. primer: 5'-CGAGCCGCTCCGGCCCCAGG Sekvence Id. č. 11
3. primer: 5'-GGCCCCAGGCGGTGCTCTCAGGCG Sekvence Id. č. 12

Analýza buněk v G0 fázi prostřednictvím genomického "footprintingu" (obrázek 3C) ukazuje zřetelné obsazení E2F-vazebného místa, a to jak jádra elementu tak také dvou guaninů bezprostředně lokalizovaných po směru transkripce. Šest guaninů v pozicích -209, -208, -206, -205, -204 a -202 (vztaženo na ATG start kodón (Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705, (1993)) bylo jednoznačně chráněno, přičemž poslední dva vykazovaly jenom částečnou ochranu. Tato ochrana proti methylaci byla podobná ochraně pozorované při biochemických výzkumech. Z toho vyplývá, že proteinový intracelulárně chánící komplex je E2F.

Podobné výsledky by byly dosaženy s komplexy, které obsahovaly E2F2, E2F3, E2F5, DP2 a DP3. Podle očekávání nebyla zjištěna žádná vazba, když do E2F-vazebného místa byla vložena bodová mutace (CTTGGCGG -> CTTGGCTG).

Analýza buněk stimulovaných sérem ukázala podobnou ochranu E2F-vazebné sekvence po 4 hodinách. Po 8 hodinách byla tato ochrana však značně snižena a později nebyla pozorována žádná signifikantní ochrana. Tento úbytek ochrany probíhal současně se vzrůstem B-myb transkripce. V protikladu k ochraně E2F-vazebné sekvence před methylací, která je regulována buněčným cyklem, byl například guanin v poloze -223 po celý cyklus hypermetylován.

Výsledky dokazují, že E2F-komplexy nebyly v živých buňkách (in situ) vázány na E2F-vazebnou sekvenci B-myb, přestože byly objeveny při analýze buněčných extraktů v pozdní G1 a S fázi, například jako volné E2F a E2F-komplexy.

Tyto výsledky dále dokládají, že vazba E2F na E2F-vazebnou sekvenci nehraje rozhodující roli v aktivaci transkripce genu B-myb, protože tato sekvence není obsažena faktorem E2F v okamžiku vzrůstu transkripce. Naopak: principiální mechanismus účinku E2F například v regulaci B-myb

exprese po dobu buněčného cyklu je inhibice exprese v G0- a G1-fázi.

Porovnání proximální promotorové sekvence CDC25C, cyklinu A a CDC2-genu s B-myb-promotorem ukazuje na zřetelnou podobnost nejen mezi CDE a E2F-vazebným místem, ale i v oblasti CHR (obrázek 4). Vazebné pokusy EMSA in vitro s jadernými extrakty HeLa buněk ukazují na skutečnost, že B-myb-CHR je rozpoznáno nukleárním(i) proteinem(y). Na základě tohoto nálezu byly připraveny konstrukty, ve kterých byl B-myb promotor, viz Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705, (1993) spojen s luciferázovým reportérovým genem (p x P2-vektor, viz Nordeen BioTechniques 6, strana 454, (1988)). Tento konstrukt vykazuje, jak bylo popsáno Lam a dalšími (1993), asi 15 násobnou represi v klidových buňkách oproti proliferujícím. Tato represe byla prakticky úplně eliminovaná (asi 2 násobná represe) prostřednictvím mutace v CHR-sekvenci (TAGGAAAG->TAGGCCTG). V dalších pokusech byly vyrobeny konstrukty, ve kterých byl CDC25C-promotor spojen s Luciferázovým reportérovým genem. Mimoto byl v tomto konstruktu vyměněn CHR-element CDC25C-genu za CHR-element B-myb-genu (obrázek 5). Tento chimerický konstrukt nebyl regulován buněčným cyklem. Tato data jednoznačně dokládají, že B-myb-CHR a CHR z CDC25C-genu nejsou funkčně ekvivalentní.

Nukleotidové sekvence, na které se vážou transkripční faktory rodiny E2F a CHF, jako například nukleotidová sekvence CTTGGCGGGAGATAGGAAAGT musí být považovány za nové promotorové moduly, které vazbou E2F- a CHF-komplexů v G0 a G1 fázi inhibují transkripci genů lokalizovaných po směru transkripce. Výsledky pokusů blíže vysvětlují předložené obrázky.

Popis obrázků

Obrázek 1:

Vzájemný účinek B-myb E2F-vazebného místa s různými E2F-DP1 a E2F-DP1-p107 komplexy. Komplexy byly připraveny jako rekombinantní GST-fúzní proteiny a analyzovány EMSA metodou, viz Barberis a další, Cell 50, strana 347 (1987) s pomocí syntetických oligonukleotidů, které obsahovaly buď B-myb E2F-vazebné místo, viz Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705, (1993) nebo vazebné místo E2F promotoru E2a adenoviru, viz Mudryj a další, EMBO J. 9, strana 2179 (1990). Rozdíly v intenzitě, které jsou pozorovány mezi E2F1 a E2F4 komplexy, odrážejí rozdíly v různých purifikátech proteinu E2F a méně rozdíly ve vazebných afinitách. Symbol **A** značí hybridizační sondu, symbol **B** pak jednotlivé proteiny

Obrázek 2

"Methylation protection footprints" E2F2-DP1 (a) a E2F4-DP1-p107 (d) komplexů. Methylované komplexy byly rozděleny pomocí EMSA (obrázek 1) a chráněné guaniny byly analyzovány (viz text). **b**, **c**: volná sonda; **f**: sekvence E2F-vazebného místa; plné body symbolizují plnou ochranu, částečně vyplněné body pak částečnou ochranu.

Obrázek 3

Kinetika exprese mRNA B-myb a obsazení vazebného místa E2F v buňce.

3A) Analýza buněčného cyklu buněk NIH3T3, synchronizovaných v G0 fázi odebráním séra a stimulovaných 10% FKS. Buňky byly barveny na důkaz DNA barvivem Hoechst 33258 a analyzovány pomocí FACS, viz Luzibello a další, EMBO J. 14, strana 132 (1995); osa **y**: relativní aktivita.

3B) Exprese mRNA B-myb po dobu buněčného cyklu měřené RT-PCR. Izolování RNA a RT-PCR bylo provedeno podle Luzibello a další, EMBO J. 14, strana 132 (1995). Oblast B-myb cDNA od pozice +1630 do +2228 byla amplifikována pomocí následujících primerů: 5'-GACACCCCTGCACCAGAAGTATC a 5'-GGCTGGACTTCAGGCGGCT. GPDH sloužilo jako kontrola; časové údaje (0 až 20 hodin) udávají dobu od stimulace tkáňové kultury.

3C) Genomický DMS "footprinting", viz Luzibello a další, EMBO J. 14, strana 132 (1995); Pfeiffer a další, Science 256, strana 810 (1989) jádra B-myb promotorové oblasti v odlišných stádiích buněčného cyklu. E2F-vazebné místo a potenciální Sp1-vazebné místo jsou označeny. Symbol A značí dobu od stimulace tkáňové kultury, v první stopě zleva je vzorek z nestimulovaných buněk pěstovaných in vitro; plné kruhy v sekvenci: silná ochrana (> 80 %, podle "phosphor-imaging" analýzy; z poloviny vybarvené kruhy : částečná ochrana (asi 50%).

Analýza na obrázcích 3A, 3B a 3C byla provedena s totožnými buněčnými populacemi.

Obrázek 4

Sekvenční srovnání proximální promotorové sekvence cdc25C, cyklinu A, cdc2 a genu B-myb. Údaje pozic jsou převzány z literatury, viz Zwicker a další, EMBO J. 14, strana 132 (1995) respektive vztahují se k počátku transkripce, (B-myb, Lam a další, EMBO J. 12, strana 2705 (1993)).

Obrázek 5

Analýza reporterového konstruktu cdc25C-promotor-luciferáza v klidových (G0) a v rostoucích NIH3T3 buňkách. Divoký typ Cdc29C konstrukt (sekvence A, viz Zwicker a další, (1995) byl v CHR mutovaný (sekvence B, báze podtržené), takže vznikla CHR oblast B-myb. Analýza byla provedena jako u Luzibello a

dalších, EMBO J. 14, strana 132 (1995) a Zwicker a další, EMBO J. 14, strana 132 (1995); šrafovaně - klidové (G0) buňky, plně - rostoucí buňky; osa x vyznačuje relativní aktivitu luciferázy.

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 9 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 9

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 1:

CTTGGCGGG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 9 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 9

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 2:

TTTCGCGCC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 3:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 9 párů basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

- (ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:
 - (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
 - (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 9

- (xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 3:

TTTCGCGGC

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 7 párů basí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: jedno
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

- (ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

- (ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:
 - (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
 - (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 7

- (xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 4:

TAGGAAA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 21

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 5:

CTTGG CGGGA GATAG GAAAG T

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 42 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 42

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 6:

GGCGC CGACG CACTT GGCGG GAGAT AGGAA AGTGG TTCTG TG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 42 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 42

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 4:

GGCGC CGACG CACTT GGCTG GAGAT AGGAA AGTGG TTCTG TG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 30

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 8:

GATCG ACTAG TTTCG CGCCC TTTCT ACTAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 21

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 9:

GATCCTCTCACCTGCTGCTAG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 17 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 17

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 10:

TCAGG ACTCA GGCTG CT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 21 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 21

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 11:

CGAGC CGCTC CGGGC CCCAG G

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 24

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 12:

GGCCC CAGGC GGTGC TCTCA GGCG

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Konstrukt nukleové kyseliny v y z n a č u j í c í s e t í m , že umožňuje buněčným cyklem regulovanou expresi alespoň jednoho genu a obsahuje následující komponenty:
 - a) aktivátorovou sekvenci
 - b) promotorový modul obsahující nukleotidovou sekvenci, která váže alespoň jeden protein rodiny E2F a jinou nukleotidovou sekvenci, která váže nejméně jeden protein rodiny CHF a
 - c) strukturní gen kódující účinnou látku, která je exprimována v závislosti na buněčném cyklu.
2. Konstrukt nukleové kyseliny podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že promotorový modul (b) obsahuje nukleotidovou sekvenci, která váže alespoň jeden protein rodiny E2F, která a obsahuje alespoň jednu sekvenci obsahující oligonukleotid vybraný ze skupiny tvořené oligonukleotidy CTTGGCGGG, TTTCGCGCC a TTTCGCGGC.
3. Konstrukt nukleové kyseliny podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m , že promotorový modul (b) obsahuje nukleotidovou sekvenci, která váže alespoň jeden protein rodiny CHF, a která obsahuje alespoň jednu sekvenci, ve které je obsažen oligonukleotid TAGGAAA.
4. Konstrukt nukleové kyseliny podle nároku 2 nebo 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že nukleotidová sekvence, která váže protein CHF leží po směru transkripce od nukleotidové sekvence pro vazbu proteinu E2F a mezi oběma sekvencemi se nachází triplet AGA (CTTGGCGGGAGATAGGAAA).

5. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 4 vyznačující se tím, že promotorový modul (b) může interagovat s aktivátorovou sekvencí (a) ležící proti směru transkripce a tím ovlivňovat po směru transkripce položené geny (c), zvláště pak tyto geny inhibovat.
6. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 5 vyznačující se tím, že aktivátorová sekvence je buněčně specifická.
7. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 6 vyznačující se tím, že aktivátorová sekvence je virově specifická.
8. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 7 vyznačující se tím, že nukleovou kyselinou je DNA.
9. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 8 vyznačující se tím, že tímto konstruktem je vektor.
10. Konstrukt nukleové kyseliny podle nároku 9 vyznačující se tím, že tímto konstruktem je plazmidový vektor.
11. Konstrukt nukleové kyseliny podle nároku 9 vyznačující se tím, že jde o nevirový vektor.
12. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 11 vyznačující se tím, že gen (c)

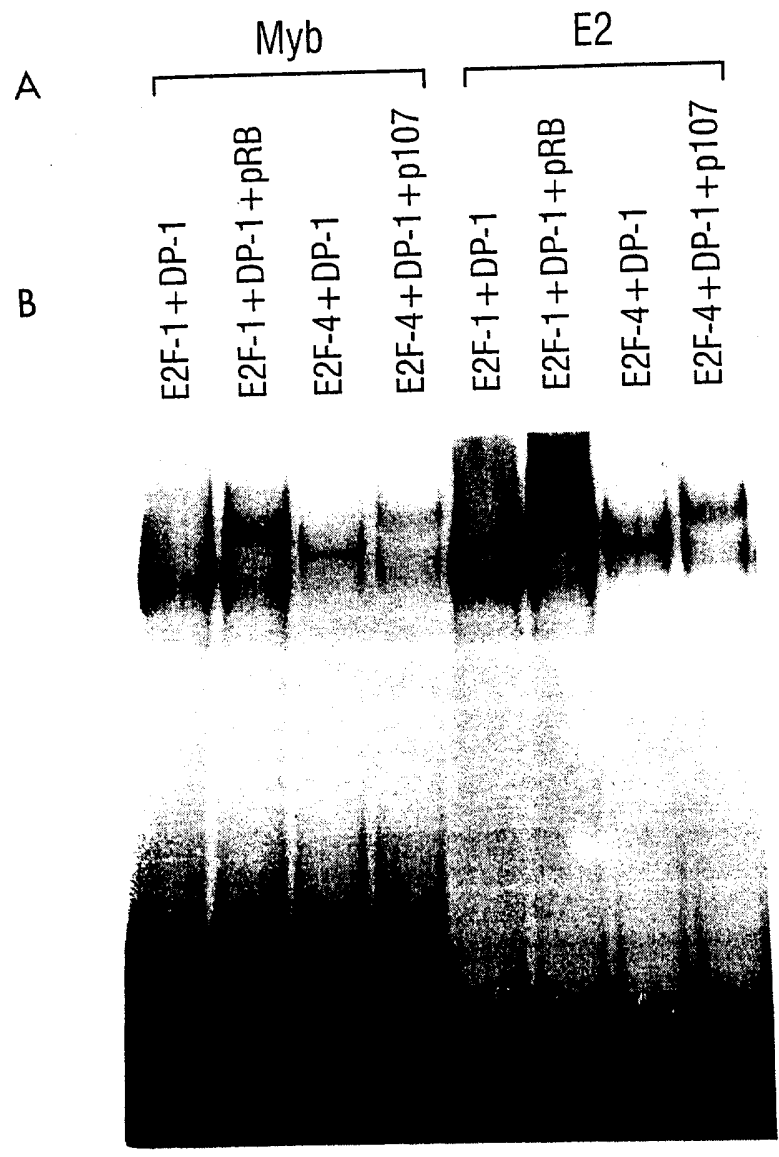
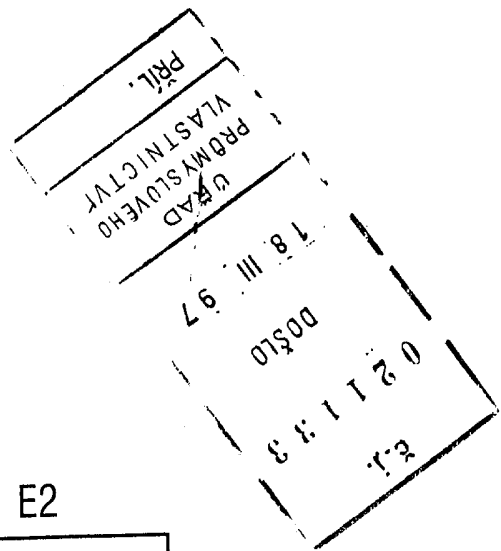
kóduje účinnou látku, která je vybrána ze skupiny tvořené cytokiny, růstovými faktory, receptory pro cytokiny a růstové faktory, antiproliferativně nebo cytostaticky účinkujícími proteiny, protilátkami, fragmenty protilátek, inhibitory angiogeneze, koagulačními faktory a faktory inhibujícími koagulaci.

13. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 12 vyznačující se tím, že aktivátorová sekvence (a) je vybrána ze skupiny promotorů, které aktivují transkripci v endotheliálních buňkách, v buňkách hladkých svalů, lymfocytech, makrofázích, v leukemických nebo tumorových buňkách nebo v gliových buňkách, nebo z promotorových sekvencí virů HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV nebo HIV.
14. Konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 13 vyznačující se tím, že gen (c) kóduje enzym, který štěpí prekursor léčiva na jeho aktivní formu.
15. Izolované buňky vyznačující se tím, že obsahují konstrukt nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 14.
16. Použití konstruktů nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 14 nebo buňky podle nároku 15 pro výrobu léčiva k léčbě nemoci, která je spojena s nadměrnou proliferací buněk vyznačující se tím, že je dosaženo vložení konstruktů nukleové kyseliny do cílové buňky.

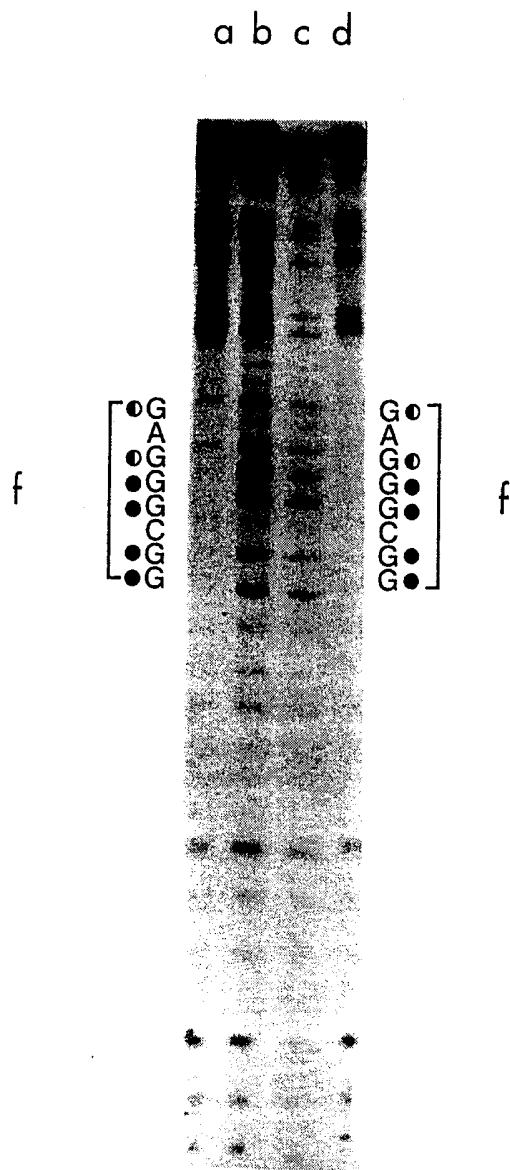
17. Použití podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m , že onemocnění spojeným s nadměrnou proliferací buněk je tumor.

18. Použití podle nároku 16 nebo 17 v y z n a č u j í c í s e t í m , že výroba léčiva zahrnuje převedení konstruktů nukleové kyseliny podle libovolného z nároků 1 až 14 do takové formy, která umožní vložení tohoto konstruktů do cílové buňky.

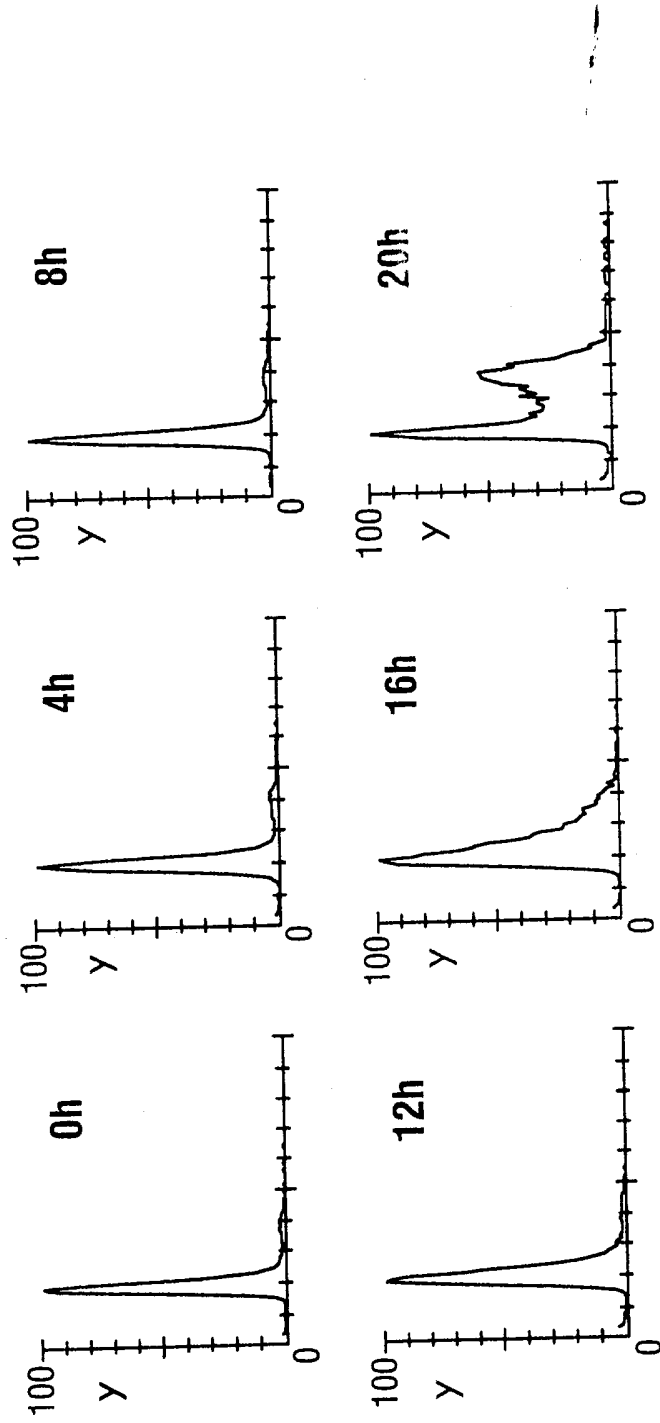
Obr. 1



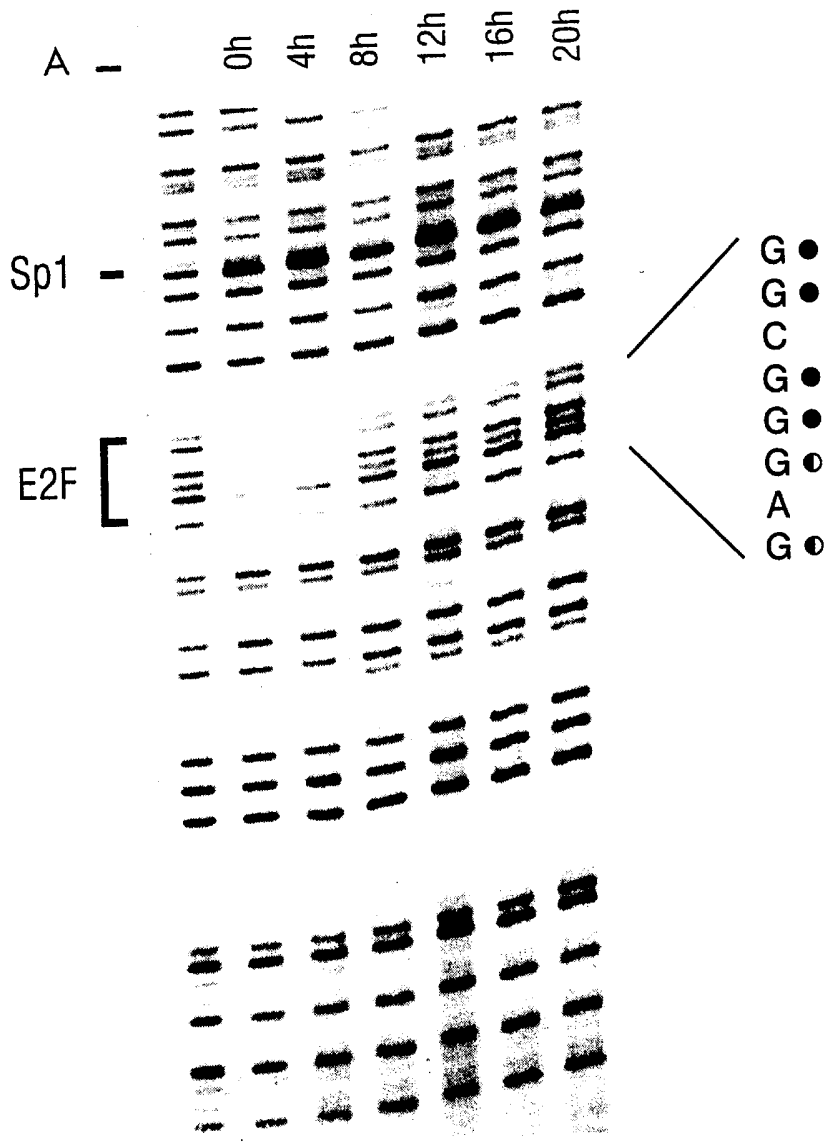
Obr. 2



Obr. 3A



Obr. 3C



Obr. 4

			CDE		CHR	
<i>cdc25C</i>	-20	GGCT	GGCGG	AAGGT	TTGAAT	GG +1
<i>cdc2</i>	-26	TTAG	CGCGG	TGAGT	TTGAA	ACT - 5
<i>Cyclin A</i>	-39	TAGT	CGCGG	GATACT	TTGAA	CTG -18
<i>B-Myb</i>	-50	ACTT	GGCGG	GAGAT	AGGAA	AGT -29
			E2F			

Obr.5

