

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

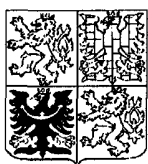
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

154-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17. 07. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/502881**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**
(Věstník č. 7/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/11787**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/03635**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/86
C 12 N	15/79
C 12 N	15/65
C 07 K	14/47
A 61 K	48/00

(71) Přihlášovatel:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM, Austin, TX, US;

(72) Původce:

Jin Xiaomei, Houston, TX, US;

Roth Jack, Houston, TX, US;

(74) Zástupce:

Jírotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha
7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Konstrukce pro expresi p16 a její aplikace
při léčení rakoviny**

(57) Anotace:

Genové konstrukce, které se používají in vivo i in vitro v oblasti biologie nádorů a léčby rakoviny. Zvláště se popisují expresivní konstrukce, které obsahují oblast kódující p16 a jiné řídicí elementy, které jsou nutné pro expresi transkriptu p16. Jedna verze expresivní konstrukce je adenovirový vektor s nedostatečnou replikací. Dále se popisují způsoby transformace buněčných linií a inhibice proliferace buněk.

CZ 154-98 A3

Konstrukce pro expresi p16 a její aplikace při léčení rakoviny.

Oblast techniky

Vynález obecně spadá do oblasti biologie nádorů. Zvláště se týká nukleové kyseliny kódující supresor nádoru a jeho použití při inhibici růstu nádoru. V jednom provedení se vynález týká exprese konstrukcí kódující p16 a použití těchto konstrukcí při inhibici rakoviny.

Dosavadní stav techniky

Rakovina je jedno z nejběžnějších lidských onemocnění. Ve Spojených státech odpovídá ročně za 526 000 úmrtí (Boring et al., 1993). Ve Spojených státech na samotnou rakovinu plic ročně zemře více jak 140 000 lidí. V současné době úmrtnost na rakovinu plic v závislosti na věku předčila u žen rakovinu prsu. Ačkoli zavedení programů na omezení kouření snížilo počet kuřáků, četnost úmrtí na rakovinu plic zůstane vysoká až do jednadvacátého století. Bohužel je známo, že úspěšnost současných způsobů léčby zahrnující radioterapii, chirurgické metody a chemoterapii je omezená. Vývoj nových metod léčby rakoviny plic z velké části záleží na porozumění biologii rakoviny na molekulární úrovni.

Na základě znalostí molekulární genetiky a biologie je zřejmé, že změna exprese normálních genů vede k vyvolání případů transformace, která vede ke vzniku rakovinových buněk. Konvenční terapie zhoubných nádorů, jako je chemoterapie a radiace, není specificky cílena, je pouze zaměřena na usmrcení množství buněk. Často je doprovázena vedlejšími nežádoucími účinky. Nový směr léčby rakoviny je zavedení normálního genu za účelem záměny nebo opravy mutovaného genu. Tím se změní maligní fenotyp transformovaných buněk. Aby se mohlo provést účinné zavedení

genů do somatických buněk, vyvinulo se několik expresivních konstrukcí.

Buňky se regulují jak pozitivním (stimulace), tak i negativním způsobem (suprese). Ztráta negativní regulace se často vyskytuje právě u maligních buněk. Na základě molekulárně genetických důkazů se zjistilo, že ztráta negativních regulátorů nebo nárůst pozitivních regulátorů v normálních buňkách vede ke vzniku abnormalit buněčného růstu. Je známo, že nejvíce negativní regulátory (Marx, "Learning how to suppress cancer," Science, 261:1385-1387, 1993; Grunicke and Maly, "Role of GTPase regulatory proteins in oncogenesis," Crit. Rev. Oncog., 4:389-402, 1993), které se řadí k supresorům nádoru, jsou zahrnuty přímé regulace buněčného cyklu (například Rb, p53, WT-1) nebo do signální cesty růstu buněk nebo jejich diferenciaci (například NF-1). Jistá data navíc naznačují, že geny, které se vztahují k uchování buněčné architektury a polarity mají také funkci jako supresory nádoru (Marx, 1993; citace uvedena shora v textu; Fearon et al., Science, 247:49, 1990.; Trofatter et al., "A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor," Cell, 72:791-800, 1993).

Hlavní změny cyklu eukaryontních buněk se zpouští kinázami závislými na cyklinu (CDK). Jedna CDK, kináza 4 závislá na cyklinu (CDK4), reguluje progresi pomocí G_1 . Aktivita tohoto enzymu může spočívat ve fosforylaci Rb v pozdní fázi G_1 . Aktivita CDK4 se kontroluje aktivační podjednotkou, což je D-typ cyklinu, a inhibiční podjednotkou, což je protein $p16^{INK4}$. Protein $p16^{INK4}$ se biochemicky charakterizoval jako protein, který se specificky váže a inhibuje CDK4 a touto cestou může regulovat fosforylaci Rb (Serrano et al., "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4,"

Nature, 366:704-707, 1993; Serrano et al., "Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by *p16^{INK14}*", Science, 267:249-252, 1995). Protože protein *p16^{INK4}* je inhibitorem CDK4 (Serrano, 1993 citace uvedena shora v textu), delece tohoto genu může zvýšit aktivitu CDK4, která vede ke fosforylaci Rb proteinu. O proteinu *p16* je také známo, že reguluje funkci CDK6.

Protein *p16^{INK4}* patří do nově popsané třídy proteinů inhibujících CDK, které zahrnují *p15^B*, *p21^{WAF1}* a *p27^{KIP1}*. Gen *p16^{INK4}* mapuje 9p21, což je oblast chromozomu, která často chybí u mnoha typů nádoru. Homozygotní delece a mutace genu *p16^{INK4}* se často vyskytují v liniích lidských nádorových buněk. Tento důkaz naznačuje, že gen *p16^{INK4}* je gen supresoru nádoru. Tato interpretace byla zpochybněna zjištěním, že frekvence změny genu *p16^{INK4}* jsou mnohem menší v primárně nekulturních nádorech ve srovnání s kultivovanými buněčnými liniemi (Cladas et al., "Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the *p16* (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma," Nat. Genet., 8: 27-32, 1994; Cheng et al., "p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma," Cancer Res., 54:5547-5551, 1994; Hussussian et al., "Germline *p16* mutations in familial melanoma," Nature Genetics, 15-21, 1994; Kamb et al., "A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types," Science, 2674: 436-440, 1994.; Kamb et al., "Analysis of the *p16* gene (CDKN2) as a candidate from chromosome 9P melanoma susceptibility locus," Nature Genetics, 8: 22-26, 1994.; Mori et al., "Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor supressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma," Cancer Res., 54: 3396-3397, 1994.; Okamoto et al., "Mutations and altered expression of *p16^{INK4}* in human cancer," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 11045-11049, 1994; Orlow et al.,

"Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumors," Cancer Res., 54: 2848-2851, 1994; Arap et al., "Replacement of the p16/CDNK2 gene suppresses human glioma cell growth," Cancer Res., 55: 1351-1354, 1995). Obnovení funkce genu $p16^{INK4}$ divokého typu transfekcí plazmidovým expresivním vektorem redukuje tvoření kolonií u některých linií lidských rakovinových buněk (Okamoto, 1994; Arap, 1995; citace uvedeny shora v textu).

Podstata vynálezu

Současný vynález reaguje na potřebu zdokonalení léčby rakoviny plic a dalších typů rakoviny spojených s p16 tím, že se uskutečnila exprese konstrukcí obsahující nukleovou kyselinu, která kóduje p16. Dalším předmětem vynálezu jsou způsoby použití takových kompozic a zvláště jejich použití při léčbě rakoviny. V jiném provedení vynálezu se uvádí způsob transformace buněk za použití expresivní konstrukce, která nese nukleovou kyselinu p16.

Vynález také zahrnuje expresivní konstrukce, které obsahují promotor, který je funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující p16, kde transkripce nukleové kyseliny se řídí promotorem.

V preferovaném provedení expresivní konstrukce dále obsahuje polyadenylační signál. V dalším provedení konstrukce dále obsahuje selekční marker. V dalším provedení expresivní konstrukce je adenovirus. V preferovaném provedení expresivní konstrukce je adenovirus, kterému přinejmenším chybí část oblasti E1. V jistých provedeních nukleová kyselina je cDNA. V jiném provedení nukleová kyselina je genomová DNA. Další provedení zahrnuje kombinaci cDNA a genomové DNA například konstrukci mini-genu. V příkladném provedení nukleová kyselina je umístěna v orientaci mající smysl ^("sense") s ohledem na

zmíněný promotor. V dalším provedení je nukleová kyselina umístěna v „antisense“ orientaci.

Vynález také zahrnuje farmaceutické kompozice zahrnující expresivní konstrukci s promotorem, funkčním v eukaryontních buňkách, a nukleovou kyselinu kódující p16 spolu s farmaceuticky přijatelným pufrem, rozpouštědlem nebo ředidlem. V určitých provedeních je expresivní konstrukce a farmaceuticky přijatelný puf, rozpouštědlo nebo ředidlo dodáváno v kitu.

Vynález také zahrnuje způsob obnovení správné funkce p16 v buňce, které chybí funkci p16 nebo která exprimuje funkční p16, který je nesprávně strukturovaný. Tento způsob zahrnuje kontakt takové buňky s expresivní konstrukcí, jak se popisuje shora, kde nukleová kyselina je umístěna v sense orientaci. V příkladném provedení vynálezu je buňka transformovanou buňkou a při kontaktu se obrátí transformovaný fenotyp. V dalším provedení je buňkou rakovinová buňka pocházející z plic, močového měchýře, leukemie nebo melanomu a v dalším provedení je expresivní konstrukcí adenovirus.

Vynález dále zahrnuje způsob inhibice funkce p16 v buňce. Tento způsob zahrnuje kontakt takové buňky s expresivní konstrukcí, jak se popisuje shora, kde nukleová kyselina je umístěna v antisense orientaci. V dalším provedení je expresivní konstrukcí adenovirus.

Jiné provedení vynálezu je způsob léčby rakoviny u savce. Tento způsob zahrnuje podávání farmaceutické kompozice, zahrnující expresivní konstrukci, která obsahuje promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující p16, umístěnou v sense orientaci, ve farmaceuticky přijatelném pufru, rozpouštědle nebo ředidle, zvířeti. V konkrétním provedení vynálezu je savcem člověk. V jiném provedení

se aplikace provádí intravenózní injekcí. V dalším provedení je rakovinou plicní rakovina.

V dalších provedeních vynález zahrnuje způsoby detekce rakovinových buněk ve vzorku detekcí p16 nebo nukleové kyseliny kódující p16.

Nyní se nahromadily se důkazy, že k maligní progresi buněk přispívá dysregulace jistých genů, které jsou zahrnuty do řízení buněčného cyklu. Například předčasný vstup buňky do další fáze buněčného cyklu může vést k neúplné reparaci poškozené DNA a následné genomové nestabilitě. Jak se už zmiňuje shora, v regulaci buněčného cyklu mohou hrát významnou roli kinázy závislé na cyklinu. Je známo, že protein p16^{INK4} může tvořit komplex s cyklinem D1-CDK4 a inhibovat jeho interakci s Rb, což zpožďuje průchod buněčným cyklem. Přítomnost bodových mutací a homozygotních delecí u vysokého procenta linií rakovinových buněk dále naznačuje, že p16^{INK4} může působit jako nádorový supresorový gen.

Zmiňují se mutace u primární lidské rakoviny jícnu a pankreatu, rakoviny močového měchýře, melanomu a metastáz NSCLC, ačkoli výskyt mutací je u primárních nádorů nižší ve srovnání s mutacemi, které se vyskytují v buněčných liniích (Mori et al., 1994; Okamoto et al., 1994; Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994; (citace uvedeny shora v textu) Okamoto et al., Mutations in the p16^(INK4)/MTS1/CDKN2, p15^(INK4b)/MTSB2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer; Cancer Res., 55:1448-1451, 1995; Zhou et al., The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors; Oncogene, 9:3737-3741, 1994; Cairns et al., Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss; Science, 265-416, 1994; Gruis et al., Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression, Am. J. Pathol., 146: 1199-1206, 1995). Delece a mutace však nemusejí být primárním

způsobem inaktivace $p16^{INK4}$, protože u rakoviny plic, hlavy a krku, v linii buněk gliomu a čerstvých nádorů se bez delece nebo mutace často vyskytuje hypermetylace $p16^{INK4}$ spojená s utlumením transkripce (Herman et al., Abnormal DNA methylation frequently inactivates the putative tumor supressor DKDN2/p16 in many tumor types; Proc Am Assoc Cancer Res, 36: 20, 1995).

Zde prezentovaná data poprvé ukazují, že $p16$ působí jako supresor nádoru *in vivo*. Současný vynález reaguje na potřebu zdokonalení léčby rakoviny plic a dalších typů rakoviny spojených s $p16$. Zejména je možno pro inhibici proliferace nádorových buněk použít expresivní konstrukce schopné exprimovat funkční produkt $p16$. Vynález dále zahrnuje použití antisense metodiky, cílené na $p16$, k transformaci buněčných linií nebo jinému zvýšení rychlosti nebo rozšíření růstu.

Existuje rovněž důkaz, že léčba cílená na $p16$ má léčebné implikace při anti-angiogenním přístupu. Existuje mnoho nemocí, kde je žádoucí omezení cévního zásobení. Navíc může být léčba pomocí $p16$ přínosná také s ohledem na hyperproliferální poruchy, jako je restenóza.

A. $p16$ a nukleové kyseliny příbuzné s $p16$

Nukleová kyselina podle vynálezu může kódovat celý gen $p16$, funkční domenu proteinu $p16$ nebo libovolný polypeptid, peptid nebo fragment $p16$, který postačuje k vyvolání inhibice CDK4. Nukleová kyselina $p16$ se může odvodit z genomové DNA, to znamená, že se klonovala přímo z genomu určitého organismu. V preferovaném provedení však nukleová kyselina kódující $p16$ bude zahrnovat komplementární DNA (cDNA) nebo cDNA plus intron, to je mini-gen.

Termín "cDNA" zde znamená DNA připravenou způsobem, kde se jako templát použije mediátorová DNA (mRNA). Výhodou

použití cDNA, n^arozdí^l od genomové DNA nebo DNA polymerizované z genomového, nezpracovaného nebo částečně zpracovaného RNA templátu je, že cDNA neobsahuje žádné nekódující sekvence, ale spíše osahuje pouze kódující oblast korespondujícího proteinu. Může přijít okamžik, kdy se preferuje celá nebo část genomové sekvence, takové kde pro optimální expresi jsou nutné nekódující oblasti nebo kde nekódující oblasti, jako jsou introny, jsou cílem pro "antisense" strategii.

Spolu s termínem "p16" se používá jako synonymum označení MTS1, CDK4I a CDKN2. Termín "p16" zahrnuje všechny homology jiných druhů.

Uvažovalo se, že daný p16 může být reprezentován přirozenými variantami, které mají trochu odlišné primární sekvence, ale přesto jsou biologicky funkčními ekvivalenty jeden druhého (uvedeno dále v textu). Aby tyto ekvivalenty fungovaly podle vynálezu, je nutné ^{povze,} aby se p16 vázal na CDK4. Testovat takové působení je jednoduše otázkou testu vázání proteinu kódovaného nukleovou kyselinou p16 *in vitro* nebo nebo použitím metod transfekce, jak popisuje Serrano et al., 1993 (citace uvedena shora v textu).

Termín "nukleová kyselina kódující p16" znamená molekulu nukleové kyseliny, která se izolovala bez celkové buněčné nukleové kyseliny. V preferovaných provedeních vynález zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny uvedenou na obrázku č. 1A (SEQ ID č. 1). Termín "uvedenou na obrázku č. 1A" znamená, že sekvence nukleové kyseliny v podstatě koresponduje s částí, která je zobrazena na obrázku č. 1A, a že má relativně málo kodonů, které nejsou identické nebo nejsou funkčně ekvivalentní s kodony na obrázku č. 1A. Termín "funkčně ekvivalentní kodon" se používá v případě kodonů, které kódují stejnou aminokyselinu, jako je šest kodonů pro arginin nebo serin a také v případě kodonů, které kódují biologicky

ekvivalentní aminokyseliny (jak se uvádí v tabulce 1 dále v textu).

Tabulka č. 1

Aminokyseliny			Kodony
alanin	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
cystein	Cys	C	UGC UGU
kyselina aspartová	Asp	D	GAC GAU
kyselina glutamová	Glu	E	GAA GAG
fenylalanin	Phe	F	UUC UUU
glycin	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
histidin	His	H	CAC CAU
isoleucin	Ile	I	AUA AUC AUU
lysin	Lys	K	AAA AAG
leucin	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
metionin	Met	M	AUG
asparagin	Asn	N	AAC AAU
prolin	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
glutamin	Gln	Q	CAA CAG
arginin	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
serin	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
treonin	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
valin	Val	V	GUA GUC GUG GUU
tryptofan	Trp	W	UGG
tyrozin	Tyr	Y	UAC UAU

Jestliže se počítá s degenerací genetického kódu, pak sekvence, které obsahují přibližně 50 a 75%; nebo s výhodou přibližně 76 a 99% nukleotidů identických s nukleotidy na obrázku č. 1A jsou sekvence "uvedené na obrázku č. 1A". Sekvence, které jsou v podstatě stejné jako ty uvedené na obrázku č. 1A, mohou být také funkčně definovány jako sekvence, které jsou schopny za standardních podmínek hybridizovat se segmentem nukleové kyseliny obsahujícím komplement uvedený na obrázku č. 1A.

Vhodné hybridizační podmínky jsou odborníkovi dobře známy. V jistých přihláškách například u substituce aminokyselin místně řízenou mutagenézí je výhodné, že jsou nutné pouze méně přísné podmínky. Za těchto podmínek může dojít k hybridizaci, i když dokonce sekvence sondy a cíleného

řetězce nejsou zcela komplementární, ale jsou chybně spárovány v jedné nebo více pozicích. Méně přísných podmínek se dosáhne zvýšením koncentrace soli a snížením teploty. Například středně přísné podmínky mohou vzniknout při koncentraci NaCl asi 0,1 až 0,25M při teplotě okolo 37°C až 55°C, zatímco málo přísné podmínky jsou při koncentraci sole okolo 0,15M až 0,9M a při teplotě v rozpětí okolo 20°C až 55°C. Tak je možno hybridizační podmínky snadno měnit a obecně volit v závislosti na požadovaných výsledcích.

V dalším provedení se může hybridizace dosáhnout za podmínek například 50mM Tris-HCl (pH 8,3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol při teplotách mezi přibližně 20°C až 37°C. Další využívané hybridizační podmínky mohou zahrnovat přibližně 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂ a teplotu okolo 40°C až 72°C. Pro změnu podmínek hybridizace se může dále použít formamid a SDS.

Vynález samozřejmě zahrnuje i segmenty DNA, které jsou komplementární nebo v podstatě komplementární k sekvenci uvedené na obrázku č. 1A. Sekvence nukleové kyseliny, které jsou "komplementární", jsou sekvence schopné párování bazí podle standardních Watson-Crickových komplementárních pravidel. Termín "komplementární sekvence" znamená sekvence nukleové kyseliny, které jsou v podstatě komplementární, což se může stanovit výše uvedeným srovnáním nukleotidů nebo schopností hybridizovat se segmentem nukleové kyseliny uvedeným na obrázku č. 1A za relativně přísných podmínek, například jaké jsou zde popsány. Takové sekvence mohou kódovat celou molekulu p16 nebo její funkční fragmenty.

V jiném případě mohou být hybridizačními segmenty kratší oligonukleotidy. Sekvence dlouhá 17 bazí se může v lidském genomu vyskytnout pouze jednou a proto je dostatečná pro specifikaci jediné cílové sekvence. Ačkoli je jednodušší připravit kratší oligomery, které jsou *in vivo* snadněji

přístupny, specifitu hybridizace ovlivňuje řada dalších faktorů. Vazebná afinita a sekvenční specifita oligonukleotidu s jeho komplementárním cílem se zvyšuje s rostoucí délkou. Předpokládá se, že se budou používat oligonukleotidy, které obsahují 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nebo více párů bazí. Takových nukleotidů lze použít například jako sond a jako primerů při amplifikačních reakcích.

Segmenty DNA podle vynálezu zahrnují ty, které kódují biologicky funkční ekvivalent proteinů a peptidů p16. Takové sekvence mohou vzniknout jako důsledek redundance a funkční ekvivalence kodonu, o nichž se ví, že se vyskytují přirozeně v sekvencích nukleové kyseliny a v proteinech takto kódovaných. Alternativně je možno vytvořit funkčně ekvivalentní proteiny nebo peptidy použitím metod genového inženýrství, které mohou změnit strukturu proteinu na základě vlastností aminokyselin, které se zamění. Těchto uměle způsobených změn se může dosahnout místně řízenou mutagenezí a nebo mohou být zavedeny náhodně a později se může testovat jejich funkce.

Je-li to žádoucí, mohou se také připravit fúzní proteiny a peptidy, kde oblasti kódující p16 se fúzí s kódujícími oblastmi pro jiné proteiny nebo peptidy, mající požadované funkce, například pro izolaci, imunodetekci, stabilizaci nebo pro účely zavádění. Tyto fúzní proteiny nebo fúzní peptidy mohou také obsahovat vnitrobuněčnou cílovou sekvenci, která bude řídit jejich transport do vybraných částí buňky, zvláště do jádra. Tyto fúzní proteiny nebo fúzní peptidy mohou být exprimovány konstrukcí DNA, která se zavedla do zvířecích buněk.

Rozumí se také, že sekvence aminokyselin a nukleových kyselin mohou zahrnovat další zbytky, jako jsou další N- nebo C-koncové aminokyseliny nebo 5' nebo 3' sekvence, a přitom

stále být v podstatě stejné jako jedna ze zde uvedených sekvencí, pokud sekvence splňuje shora uvedená kritéria včetně zachování biologické aktivity proteinu, pokud se týká exprese. Přidání terminačních sekvencí se zvláště hodí ke kódujícím sekvencím nukleové kyseliny, které mohou například zahrnovat různé nekódující sekvence lemující buď 5' nebo 3' části kódující oblasti, jako jsou promotory. K sekvencím nukleové kyseliny se mohou přidat afinitní nebo detekční části, jako jsou digoxigenin nebo avidin.

Jak je shora uvedeno, v primární struktuře p16 se mohou provést modifikace a změny (jak se ukazuje na obrázku č. 1B) a stále je možné získat molekulu, která má podobné nebo jinak vyžadované charakteristiky. Například jisté aminokyseliny se mohou nahradit v proteinové struktuře jinými aminokyselinami, aniž dojde k pozorovatelné ztrátě interaktivní vazebné kapacity se struktarami, jako jsou například oblasti protilátek, které vážou antigen, nebo vazebná místa na molekulách substrátu, receptory nebo signální transdukce. Protože biologickou funkční aktivitu proteinu definuje interaktivní kapacita a charakter proteinu, mohou se v proteinové sekvenci (nebo samozřejmě v jeho kódující sekvenci DNA) provést jisté substituce aminokyselinových sekvencí a přesto je možné získat protein s podobnými (agonistickými) vlastnostmi. Na základě stejných úvah je možno vytvořit protein nebo polypeptid s opačně působícími (například antagonistickými) vlastnostmi. Podle vynálezu se tedy předpokládá, že v sekvenci p16 proteinů nebo peptidů (nebo odpovídající DNA) je možné udělat různé změny, aniž dojde ke ztrátě jejich biologické využitelnosti nebo aktivity.

Odborníkovi je rovněž zřejmé, že definice biologicky funkčního ekvivalentního proteinu nebo peptidu zahrnuje koncept, že existuje hranice počtu změn, které je možno

provést v definované oblasti molekuly za získání molekuly s ještě přijatelnou úrovní ekvivalentní biologické aktivity. Biologicky funkční ekvivalentní peptidy jsou zde tedy definovány jako peptidy, v nichž mohou být substituovány určité (ne většina nebo všechny) aminokyseliny. Zejména pokud jde o N-konec proteinu p16, předpokládá se, že v daném peptidu může být změněno pouze asi 16 nebo výhodněji asi 5 aminokyselin. Podle vynálezu může být samozřejmě snadno vyrobeno a použito množství jednotlivých proteinů/peptidů s různými substitucemi.

Substituce aminokyselin se obecně zakládají na relativní podobnosti substituentů postranního řetězce aminokyseliny, například jejich hydrofobitě, hydrofilitě, náboji, velikosti a podobně. Analýza velikosti, tvaru a typu substituentů postranního řetězce aminokyseliny ukázala, že arginin, lysin a histidin jsou všechno zbytky s pozitivním nábojem; alanin, glycin a serin mají podobnou velikost a fenylalanin, tryptofan a tyrosin mají obecně podobný tvar. Na základě těchto úvah jsou zde proto arginin, lysin a histidin; alanin, glycin a serin; a fenylalanin, tryptofan a tyrosin definovány jako biologicky funkční ekvivalenty.

Při provádění změn je možno vzít v úvahu hydropatický index aminokyselin. Každé aminokyselině byl přiřazen hydropatický index na základě její hydrofobicity a nábojové charakteristiky. Jsou to: isoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenylalanin (+2,8); cystein/cystin (+2,5); metionin (+1,9); alanin (+1,8); glycin (-0,4); treonin (-0,7); serin (-0,8); tryptofan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamát (-3,5); glutamin (-3,5); aspartát (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9) a arginin (-4,5).

V oboru je důležitost hydropatického indexu aminokyselin, který proteinu dodává interaktivní biologickou

funkci, zřejmá a obecně dobře známa (Kyte and Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol., 157 (1): 105-132, 1982). Ví se, že jisté aminokyseliny se mohou substituovat jinými aminokyselinami, které mají podobný hydropatický index nebo hodnotu a uchovávají si podobnou biologickou aktivitu. Při záměnách aminokyselin na základě hydropatického indexu se preferuje substituce aminokyselin, jejichž hydropatické indexy se liší v rozsahu do ± 2 , zejména do ± 1 a zvláště do $\pm 0,5$.

Je známo, že aminokyselina se může substituovat jinou aminokyselinou, která má podobnou hodnotu hydrofilnosti a stále je možné získat biologicky ekvivalentní protein. Jak se detailně popisuje v U.S. patentu 4,554,101 aminokyselinovým zbytkům se přidělily následující hodnoty hydrofilnosti: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartát (+3,0); glutamát (+3,0 $\pm$ 1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glycin (0); treonin (-0,4); prolin (-0,5 $\pm$ 1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cystein (-0,1); metionin (-1,3); valin (-1,5); leucin (-1,8); isoleucin (-1,8); tyrosin (-2,3); fenylalanin (-2,5); tryptofan (-3,4).

Při záměnách aminokyselin na základě podobných hodnot hydrofilnosti se preferuje substituce aminokyselin, jejichž hodnoty hydrofilnosti se liší v rozsahu do ± 2 , zejména do ± 1 a zvláště do $\pm 0,5$.

I když byla předcházející diskuse zaměřena na funkčně ekvivalentní polypeptidy vzniklé na základě záměn aminokyselin, je zřejmé, že tyto změny mohou být provedeny i alterací kódující DNA, také s uvážením toho, že genový kód je degenerován a že stejnou aminokyselinu mohou kódovat dva nebo více kodonů. Mimo peptidylové sloučeniny, které se zde popisují vynález dále předpokládá, že se mohou vytvořit jiné

stericky podobné látky, aby napodobovaly klíčové oblasti peptidové struktury. Takové látky, které je možné nazvat peptidomimetiky, se mohou použít stejným způsobem jako peptidy podle vynálezu a proto jsou také funkčními ekvivalenty. Tvorby strukturního funkčního ekvivalentu lze dosáhnout metodou modelování a chemického inženýrství, která je známa v oboru. Rozumí se, že všechny takové stericky podobné konstrukce spadají do rozsahu vynálezu.

B. Antisense konstrukce

V jiném provedení může nukleová kyselina p16 kódovat „antisense“ verzi libovolné ze shora zmiňovaných nukleových kyselin v plné délce nebo jejich fragmentů. „Sense“ čili kódující konstrukce se obecně budou používat při inhibici proliferace nádoru, kde problémem je chybějící funkce p16 a je nutné záměnit funkci p16. Avšak v provedení, kde je problémem nadměrná exprese p16, například když se vyžaduje inhibice nebo potlačení exprese p16, se mohou používat „antisense“ molekuly.

Termín „antisense nukleová kyselina“ znamená oligonukleotidy komplementární se základními sekvencemi DNA nebo RNA, které kódují p16. Antisense oligonukleotidy, jsou-li zavedeny do cílové buňky, se specificky vážou na svou cílovou nukleovou kyselinu a interferují s transkripcí, zpracováním, transportem, translací a/nebo stabilitou RNA. Cílení oligo nebo oligonukleotidů na dvouřetězcovou DNA vede ke vzniku trojšroubovicové formace; jestliže je cílem RNA, vznikne dvoušroubovicová formace.

Antisense konstrukce mohou být navrhovány tak, že se vážou na promotor a jiné řídicí oblasti, exony, introny nebo dokonce hranice exon-intron v genu. Antisense konstrukce RNA nebo DNA kódující takové antisense RNA mohou být použity k inhibici transkripce nebo translace genu nebo obou

v hostitelské buňce, buď *in vitro* nebo *in vivo*, například v hostitelském zvířeti, včetně lidského subjektu. Sekvence nukleové kyseliny, které zahrnují "komplementární nukleotidy", jsou sekvence, které jsou schopné párování bazí podle standardních Watson-Crickových pravidel komplementarity. To znamená, že větší puriny tvoří páry bazí s menšími pyrimidiny, aby vytvořily kombinace guaninu a cytosinu (C:G) a adeninu buď s thyminem (A:T) v případě DNA nebo adeninu s uracilem (A:U) v případě RNA. Jestliže se do hybridizačních sekvencí zahrnou méně běžné báze, jako jsou inosin, 5-metylcytosin, 6-metyladenin, hypoxantin a jiné báze, při párování neinterferují.

Termíny "komplementární" nebo "antisense sekvence" zde znamenají sekvence nukleové kyseliny, které jsou v podstatě komplementární v celé své délce a vykazují velmi málo chybného párování bazí. Například sekvence nukleové kyseliny s 15 bázemi se může nazvat komplementární v případě, že má komplementární nukleotidy ve 13 nebo 14 pozicích pouze s jedním chybným párováním. „Zcela komplementární“ jsou přirozeně sekvence nukleové kyseliny, které jsou zcela komplementární po své celé délce a nevykazují žádné chybné párování.

Předpokládají se i jiné sekvence s nižšími stupni homologie. Například by mohla být sestrojena antisense konstrukce, která má omezené oblasti s vysokou homologií, ale obsahuje také nehomologní oblast (například ribozym). Tyto molekuly, i když mají nižší než 50% homologii, se váží za vhodných podmínek na cílové sekvence.

Zatímco pro antisense konstrukci se může využít celá nebo část genové sekvence, statisticky by se libovolná sekvence dlouhá 17 bazí měla objevit v lidském genomu pouze jednou a proto dostačovat ke specifikaci jednotlivé cílové sekvence. Ačkoli je jednodušší připravit kratší oligomery,

kteřé jsou *in vivo* snadněji přístupny, specifitu hybridizace ovlivňuje řada dalších faktorů. Vazebná afinita a sekvenční specifita oligonukleotidu s jeho komplementárním cílem se zvyšuje s rostoucí délkou. Předpokládá se použití oligonukleotidů s 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nebo více páry bazí. Je snadné zjistit, zda daná antisense nukleová kyselina je účinná při směrování na odpovídající gen hostitelské buňky jednoduchým testováním konstrukce *in vitro* za účelem určit, zda je ovlivněna funkce endogenního genu nebo zda je ovlivněna exprese příbuzných genů, které mají komplementární sekvence.

V jistých provedeních může být žádoucí využít antisense konstrukcí, které zahrnují jiné elementy, například ty, jež obsahují C-5 propinpyrimidiny. Ukázalo se, že oligonukleotidy, které obsahují C-5 propinové analogy uridinu a cytidinu, se váží na RNA s vysokou afinitou a jsou silnými antisense inhibitory exprese genu (Wagner et al., Science, 260: 1510-1513, 1993).

Alternativním způsobem cíleného antisense zavádění je použití cílených ribozymů. Termín "ribozym" znamená enzym založený na RNA, který je schopný směrování a štěpení určitých bazí v sekvencích DNA nebo RNA pl6. Ribozymy buď mohou být směrovány přímo do buněk ve formě RNA oligonukleotidů, které inkorporují sekvence ribozymu nebo se zavedou do buňky jako expresivní konstrukce, které kódují požadovanou ribozymální RNA. Ribozymy se mohou použít nebo aplikovat ve velmi velké míře podobným způsobem, který se popisuje pro antisense nukleové kyseliny. Sekvence ribozymu se mohou také modifikovat stejným způsobem, který se popisuje pro antisense nukleové kyseliny. Například se mohou inkorporovat báze, které neodpovídají Watson-Crick pravidlům nebo se může připravit směs oligonukleotidů RNA/DNA nebo se může modifikovat fosfodiesterová kostra.

C. Expresivní konstrukce

Termín "expresivní konstrukce" zahrnuje libovolný typ genové konstrukce obsahující nukleovou kyselinu, kódující produkt genu, ve které se může přepisovat část nebo celá kódující sekvence nukleové kyseliny. Transkript může, ale nemusí být překládán na protein. V určitých provedeníh vynálezu tak exprese zahrnuje jak transkripci genu p16, tak i translaci mRNA p16 na produkt genu p16. V jiných provedeníh vynálezu exprese pouze zahrnuje transkripci nukleové kyseliny kódující p16.

V preferovaných provedeníh vynálezu je transkripce nukleové kyseliny kódující produkt odvozený od p16 řízena promotorem. Termín "promotor" znamená sekvenci DNA, kterou rozeznává syntetizující aparát buňky nebo zavedený syntetizující aparát, jenž je nutný pro iniciaci specifické transkripce genu. Termín "řízena promotorem" znamená, že promotor se nachází ve správné poloze a orientaci ve vztahu k nukleové kyselině, aby mohl řídit iniciaci RNA polymerázy a expresi genu.

Termín promotor se používá pro skupinu modulů, které řídí transkripci, které jsou nahromaděny kolem iniciačního místa RNA polymerázy II. Většina představ jak jsou promotory organizovány, se odvozuje z analýzy několika virových promotorů, které zahrnují promotory pro HSV tymidino kinázu (tk) a jednotky časně transkripce SV40. Tyto studie, podpořené pozdějšími pracemi, ukazují, že promotory se skládají z diskretních funkčních modulů, z nichž každý obsahuje přibližně 7 až 20 bp DNA, a dále obsahují jedno nebo více míst rozeznatelných aktivátorem transkripce nebo represorovými proteiny.

V každém promotoru nejméně jeden modul lokalizuje počáteční místo syntézy RNA. Nejlépe známý příklad je TATA box, ale v některých promotorech, které nemají TATA box, jako

jsou například promotor genu savčí terminační deoxynukleotidylové transferázy a pozdních genů SV40, napomáhá fixovat místo iniciace diskretní element přesahující počáteční místo.

Přídavné elementy promotoru regulují frekvenci iniciace transkripce. Tyto elementy se typicky nacházejí v oblasti 30 až 110 bp od počátečního místa proti směru transkripce, ačkoli se ukázalo, že řada promotorů obsahuje funkční elementy, které se nacházejí od počátečního místa po směru transkripce. Mezera mezi elementy promotoru je často flexibilní, tak že funkce promotoru je zabezpečena i v případě, že dojde mezi nimi k vzájemnému obrácení nebo pohybu. V případě promotoru tk se může mezera mezi elementy promotoru zvětšit až na 50 bp, aniž dojde k poklesu aktivity. Ukazuje se, že v závislosti na promotoru jednotlivé elementy mohou, za účelem aktivace transkripce, fungovat buď kooperativně nebo nezávisle.

Konkrétní promotor, použitý pro řízení exprese nukleové kyseliny kódující p16, se nezdá být důležitý, pokud je schopný v cílových buňkách exprimovat nukleovou kyselinu. Jestliže se DNA směřuje do lidských buněk, preferuje se umístit kódující oblast nukleové kyseliny do sousedství a pod kontrolu promotoru, jenž je schopný být exprimován v lidské buňce. Obecně řečeno, takový promotor může být buď lidský nebo virový.

V různých provedeních vynalezuje možno pro dosažení vysoké úrovně exprese p16 použít bezprostřední promotor časného genu lidského cytomegaloviru (CMV), časný promotor SV40 a dlouhou terminační repetice viru Rousova sarkomu. Předpokládá se použití dalších virových nebo savčích buněčných nebo bakteriálních fágových promotorů, o nichž je známo, že dosahují exprese p16, pokud je úroveň exprese pro daný účel dostatečná.

Použitím promotoru se známými vlastnostmi je možno optimalizovat úroveň a vzorec exprese p16 po transfekci. Například volba promotoru, který je aktivní konkrétně v buňkách plic, jako je tyrosinaza (melanom), alfa-fetoprotein a albumin (nádory jater), CC10 (nádor plic) a specifický antigen pro rakovinu prostaty (nádor prostaty), umožňuje tkáňově specifickou expresi p16. Dále může volba promotoru, který je regulován odezvou na specifické fyziologické signály, umožnit indukovatelnou expresi p16. Například je-li nukleová kyselina kódující p16 exprimována z lidského promotoru PAI-1, lze expresi vyvolat nádor nekrotizujícím faktorem. Tabulky 2 a 3 uvádějí několik elementů/promotorů, které mohou být podle vynálezu použity v souvislosti s regulací exprese p16. Tento seznam není vyčerpávající a nezahrnuje všechny elementy, které se podílí na expresi p16, ale jsou zde uvedeny jejich příklady.

Popis obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1A se uvádí nukleotidová sekvence p16 (SEQ ID č. 1).

Na obrázku č. 1B se uvádí aminokyselinová sekvence p16 (SEQ ID č. 2).

Na obrázku č. 2 se zobrazují růstové křivky infikovaných buněčných linií Ad-p16. Buňky se nanosily 24 hodin před infekcí na kultivační plotnu o průměru 60mm v hustotě 5×10^4 a infikovaly se Ad-p16 nebo Ad5CMV-lacZ při hustotě 50 plaků na buňku. Při slepém pokusu se za účelem infekce používá samotné kultivační médium. Od prvního postinfekčních o dne do šestého dne se denně počítaly tři kultury každé buněčné linie. Křivky se vynesly na základě reprezentačního testu tří pokusů (průměr $\pm$ standardní odchylka).

Na obrázku č. 3A až D je znázorněn růst nádoru u myši, který následuje po intratumorálních injekcích Ad-p16,

kontrolního viru AD5CMV-lacZ nebo PBS. Skupina obsahovala pět myší. Po té, co se aplikovala injekce 5×10^6 buněk H460 suspendovaných v 0,1ml PBS do dorzálních slabin holých myší, se vytvořily podkožní nádorové uzlíky. Nádorové uzlíky (180 až 220mm) se ošetřily 16 dní po implantaci buněk. Přímě do nádoru se aplikovala injekce s Ad-p16, Ad5CMV-lacZ nebo PBS. Do každého nádorového uzlíku se vstříklo každý druhý den po dobu šesti dnů 10^{10} jednotek tvořících plaky Ad-p16 nebo Ad5CMV-lacZ rozdělených stejnoměrně do tří dávek. Aplikace PBS sloužila jako kontrolní pokus. Každý druhý den se měřila velikost nádoru lineárním posuvným měřítkem ve dvou orthogonálních směrech a vypočítaly se objemy nádorů (průměr $\pm$ standardní odchylka). Symbol (A) značí buňky H322; (B) HBL100 buňky; (C) H460 buňky; (D) H226Br buňky.

Zesilovače se původně detekovaly jako genové elementy, které zesilovaly transkripci z promotoru, nacházejícího ve vzdálené pozici stejné molekuly DNA. Tato schopnost působit na velkou vzdálenost měla málo precedentů u prokaryont při klasických studiích regulace transkripce. Další práce ukázaly, že oblasti DNA s aktivitou zesilovače mají velice podobné uspořádání jako promotory. To znamená, že se skládají z mnoha jednotlivých elementů, kde každý váže jeden nebo více transkripčních proteinů.

Základní rozlišení mezi zesilovačem a promotorem je funkční. Zesilovací oblast jako celek musí být schopna zdálky stimulovat transkripci; to nemusí platit pro oblast promotoru nebo její elementy. Na druhé straně musí mít promotor jeden nebo více elementů, které řídí iniciaci syntézy RNA v určitém místě a v určité orientaci, zatímco zesilovač tyto specifity nemá. Promotory a zesilovače se často překrývají a navazují na sebe, přičemž se často zdá, že mají velmi podobné modulární uspořádání.

Dále se uvádí seznam virových promotorů, buněčných promotorů/zesilovačů a indukovatelných promotorů/zesilovačů, které se mohou použít v kombinaci s nukleovou kyselinou, která kóduje p16 v expresivní konstrukci (tabulka č. 2 a tabulka č. 3). Dále libovolná kombinace promotor/zesilovač (Eukaryontní promotorová databáze EPDB) se může také použít k rozběhnutí exprese p16. Použití cytoplazmového expresivního systému T3, T7 nebo SP6 je další možné provedení. Jestliže je dostupná vhodná bakteriální polymeráza, buď jako část zaváděcího komplexu nebo v podobě přídavné genové expresivní konstrukce, eukaryontní buňky mohou podporovat cytoplazmatickou transkripci z jistých bakteriálních promotorů.

Tabulka č. 2

Zesilovač
těžký imunooglobulinový řetězec
lehký imunooglobulinový řetězec
receptor T-buněk
HLA DQ α a DQ β
β -interferon
interleukin2
receptor interleukinu 2
MHC třída II 5 ^k α
MHC třída II HLA-DR α
β -aktin
svalová kreatinová kynáza
prealbumin (transtyretein)
elastáza I
metallotionein
kolagenáza

gen albuminu
α -fetoprotein
τ -globin
β -globin
c-fos
c-HA-ras
inzulin
adhezní molekula neurálních buněk (NCAM)
α_1 -antitrypsin
H2B (TH2B) histon
myší kolagen nebo kolagen typ I
proteiny řízené glukózou (GRP94 a GRP78)
kryší růstový hormon
amyloid lidského séra (SAA)
troponin I (TN I)
růstový faktor získaný z krevních destiček
Duchenneova svalová dystrofie
SV40
polyoma
retroviry
papilomové viry
virus hepatitidy B
HIV
cytomegalovirus
virus leukemie gibona Ape

Tabulka č. 3

Element	Indukční činidlo
Mt II	ester forbolu (TFA) těžké kovy
MMTV (virus myšího nádoru mléčné žlázy)	glukokortikoidy
β -interferon	poly(rI)X poly(rc)
adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	ester forbolu (TPA), H_2O_2
kolagenáza	ester forbolu (TPA)
stromolysin	ester forbolu (TPA), IL-1
SV40	ester forbolu (TFA)
myší gen MX	interferon, virus onemocnění Newcastle
gen GRP78	A23187
α -2-makroglobulin	IL-6
vimentin	serum
MHC třída I gen H-2kb	interferon
HSP70	Ela, SV40, velký T antigen
proliferin	ester forbolu-TPA
nádor nekrotizující faktor	FMA
gen hormonu α stimulující štítnou žlázu	hormon štítné žlázy

V jistých provedeních podle vynálezu může být zjištěno zavedení nukleové kyseliny do buňky *in vitro* nebo *in vivo* tím, že se do expresivní konstrukce zabuduje marker. Marker způsobí identifikovatelnou změnu transfektovaných buněk, což umožní stanovení exprese. Zahrnutí selekčního markeru pro léčiva obvykle napomáhá při klonování a při selekci transformantů. V jiném případě se mohou použít enzymy, jako jsou tymidin kináza (tk) viru herpes simplex (eukaryontní) nebo chloramfenikol acetyltransferáza (CAT) (prokaryontní). Mohou být použity i imunologické markery. Má se za to, že použitý selekční marker není důležitý, pokud je schopen být exprimován současně s nukleovou kyselinou kódující p16. Odborníkovi jsou známy další příklady selekčních markerů.

Tam, kde se používá inzert cDNA je nutné zahrnout polyadenylační signál za účelem zaručit správnou polyadenylaci transkriptu p16. Věří se, že povaha polyadenylačního signálu není pro úspěšné provedení vynálezu podstatná a proto se může použít libovolná taková sekvence. V tomto vynálezu se používá sekvence polyadenylačního signálu SV40, protože je pro tento případ vhodná a její funkce v cílových buňkách je dobře známa. Počítá se, že další element expresivní kazety je terminátor. Tyto elementy mohou sloužit ke zvýšení hladin signálů (message) a minimalizovat čtení sekvencí navazujících na kazetu.

V preferovaném provedení vynálezu expresivní konstrukce obsahuje virus nebo konstrukci, která je odvozena z virového genu. Schopnost jistých virů vstupovat do buněk receptory zprostředkovanou endocytozou a integrovat se do genomu hostitelské buňky a stabilně a dostatečně exprimovat virové geny je dělá atraktivními kandidáty při přenosu cizích genů do savčích buněk (Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez RL, Denhardt DT, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988; Nicolas and Rubenstein, "Retroviral vectors," In: Rodriguez RL, Denhardt DT, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth, pp. 493-513, 1988; Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruse: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, pp. 117-148, 1986; Temin, "Retrovirus vectors for gene transfer: Efficient integration into and expression of exogenous DNA in vertebrate cell genome," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986). Prvními viry, které se používaly jako genové vektory byly DNA viry, jež zahrnují papovaviry (SV40, telecí

papilomaviry a polyoma) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986) a denoviry (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986). Tyto vektory mají relativně malou kapacitu pro sekvence cizí DNA a mají omezené spektrum hostitelů. Navíc, vzhledem k onkogennímu potenciálu a cytopatogenním účinkům v permisivních buňkách nejsou zcela bezpečné. Vektory mohou pojmout pouze 8 kilobází cizorodého genového materiálu, ale mohou se snadno vnést do různých buněčných linií a laboratorních zvířat (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986).

(i) Retroviry

Retroviry je skupina virů z jednořetězcovou RNA, pro něž je charakteristická jejich schopnost v infikovaných buňkách postupem reverzní transkripce přeměnit svou RNA na dvouřetězcovou DNA (Coffin, "Retroviridae and their replication," In: Fields BN, Knipe DM, ed Virology. New Yourk: Raven Press, pp. 1437-1500, 1990). Výsledná DNA je pak stabilně včleněna do buněčných chromozomů jako provirus a řídí syntézu virových proteinů. Začlenění vede v buňkách příjemce a v jejich potomcích k retenci virových genových sekvencí. Retrovirový genom obsahuje tři geny gag, pol a env, které kódují kapsidové proteiny, enzym polymerázu, resp. komponenty obalu. Sekvence, která se nachází proti směru transkripce před genem gag a nazývá se ψ , funguje jako signální sekvence pro zabalení genomu do virionů. Dvě koncové dlouhé repetice (LTR) se nacházejí na 5' a 3' konci virového genomu. Obsahují sekvence silného promotoru a zesilovače a jsou také nutné při integraci do genomu hostitelské buňky (Coffin, 1990; citace uvedena shora).

Za účelem vytvoření konstrukce retrovirového vektoru je nukleová kyselina kódující p16 začleněna do virového genomu na místo jistých virových sekvencí, aby byl produkován virus, který se nereplikuje. Za účelem produkce virionů se vytvořila

buněčná linie, která je schopna balení, obsahuje geny pol, gag a env, ale nemá LTR a ψ komponenty (Mann et al., "Construction of retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus," Cell, 33:153-159, 1983). V případě, že rekombinantní plazmid obsahující lidskou cDNA spolu s retrovirovým LTR a sekvencemi ψ se zavede do této buněčné linie (například srážením fosforečnanem vápenatým), sekvence ψ umožňuje, že transkript RNA rekombinantního plazmidu je zabalen do virových částic, které se pak vylučují do kultivačního média (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983; citace uvedeny shora). Médium obsahující rekombinantní retroviry se pak shromáždí, podle potřeby se zakoncentruje a používá se při přenosu genů. Retrovirové vektory jsou schopny infikovat široký rozsah typů buněk. Avšak integrace a stabilní exprese vyžaduje dělení hostitelských buněk (Paskind et al., "Dependence of moloney murine leukemia virus production on cell growth," Virology, 67:242-248, 1975).

Na základě chemické modifikace retrovirů chemickou adicí laktózových zbytků do virového obalu, vznikl nový přístup, který umožňuje specifické zavádění retrovirových vektorů. Tato modifikace umožňuje specifickou infekci hepatocytů pomocí sialoglykoproteinových receptorů.

Vytvořil se odlišný přístup k cílenému zavádění rekombinantních retrovirů, při kterém se používají protilátky proti retrovirovému obalovému proteinu a proti specifickému buněčnému receptoru označené biotinem. Protilátky se spojují přes biotinové komponenty za použití streptavidinu (Roux et al., "A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: Application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses," Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9079-9083, 1989). Použitím protilátek proti antigenům třídy I a třídy II hlavního komplexu histokompatibility byla demonstrována infekce různých lidských buněk, které nesly tyto povrchové antigeny, ekotropními viry *in vitro* (Roux et al., 1989).

Ve všech aspektech tohoto vynálezu existují jistá omezení pro použití retrovirových vektorů. Například retrovirové vektory se obvykle začleňují do náhodných míst do buněčného genomu. To může vést k inzerční mutagenезi prostřednictvím přerušení hostitelských genů nebo prostřednictvím inzerce virových regulačních sekvencí, které mohou interferovat s funkcí přilehlých genů (Varmus et al., "Retroviruses as mutagens: Insertion and excision of a nontransforming provirus alter the expression of a resident transforming provirus," Cell, 25:23-36, 1981). Další riziko použití defektivních retrovirových vektorů je potenciální výskyt replikačně kompetentního viru divokého typu při balení v buňkách. K tomu může dojít v případech rekombinace, kdy je intaktní sekvence ψ z rekombinantního viru začleněna před sekvence gag, pol, env, integrované v hostitelském genomu. Avšak nyní jsou dostupné nové buněčné linie schopné balení, které by měly výrazně snížit pravděpodobnost rekombinace (Markowitz et al., "A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids," J. Virol., 62: 1120-1124, 1988; Hersdorffer et al., "Efficient gene transfer in live mice using a unique retroviral packaging line," DNA Cell Biol., 9: 713-723, 1990).

Jedno omezení použití retrovirových vektorů *in vivo* představuje limitovaná schopnost produkovat titry retrovirového vektoru vyšší než 10^6 infekčních jednotek/ml. Při mnoha aplikacích *in vivo* jsou nezbytné titry, které jsou 10 až 1 000 krát vyšší.

Několik vlastností retrovirů omezuje jejich použití při léčení rakoviny plic (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, "Gene transfer into animals: the promise of adenovirus," p. 51-61, In: Human Gene Transfer, Eds, O. Cohen-Haguenauer and M. Boiron, Editions John Libbey Eurotext, France, 1991): (i) infekce retroviru závisí na dělení hostitelských buněk. V případě lidské rakoviny se v nádorových lézích může najít velmi malé množství mitotických buněk (Warner and Heston, "Future developments of nonhormonal systemic therapy for prostatic carcinoma," Urol. Clin. N. Am., 18: 25-33, 1991). (ii) integrace retroviru do hostitelského genomu může působit nepříznivě na cílové buňky, protože maligní buňky jsou vysoce genově nestabilní. (iii) retrovirová infekce je často limitována určitým rozsahem hostitelů. (iv) retrovirus je spojován s mnoha maligními nádory u savců a obratlovců. (v) titr retroviru je obecně 100 až 1 000 násobně nižší než u adenoviru.

(ii) Adenovirus

Znalost organizace genomu adenoviru, což je virus s 36kb velkou, lineární a dvouřetězcovou DNA, umožňuje substituci velkého kusu adenovirové DNA cizorodými sekvencemi až do velikosti 7kB (Grunhaus and Horwitz, "Adenovirus as cloning vector," Seminar in Virology, 3: 237-252, 1992). Na rozdíl od retrovirů, infekce adenovirovou DNA nevede k integraci do chromozomu, protože adenovirová DNA se může replikovat epizomálním způsobem bez potencionální genotoxicity. Adenoviry jsou také strukturně stabilní a po rozsáhlé amplifikaci se nezaznamenala žádná změna v uspořádání genomu. Adenovirus může infikovat prakticky všechny epiteliální buňky bez ohledu na stadium jejich buněčného cyklu. Adenovirová infekce se dosud jeví býti spojena pouze s mírným onemocněním, jako je akutní respirační onemocnění u lidí.

Adenovirus je zvláště vhodný pro použití jako vektor pro přenos genů, protože má genom střední velikosti, jednoduše se s ním manipuluje, tvoří vysoký titr, má široké rozmezí cílových buněk a vysokou úspěšnost infekce. Oba konce virového genomu obsahují 100 až 200 párů bazí (bp) obrácených terminačních repetitiv (ITR), které jsou cis elementy nezbytnými pro replikaci a balení virové DNA. Časně (E) a pozdní (L) oblasti genomu obsahují různé transkripční jednotky, které se rozdělují začátkem replikace virové DNA. Oblast E1 (E1A a E1B) kóduje proteiny odpovědné za regulaci transkripce virového genomu a několika buněčných genů. Exprese oblasti E2 (E2A a E2B) vede k syntéze proteinů pro replikaci virové DNA. Tyto proteiny jsou zahrnuty do procesu replikace DNA, exprese pozdních genů a porušení hostitelské buňky (Renan, "Cancer genes: current status, future prospects, and applications in radiotherapy/oncology," Radiother. Oncol., 19: 197-218, 1990). Produkty pozdních genů, které zahrnují většinu virových kapsidových proteinů, se exprimují pouze po podstatném zpracování jednoduchého primárního transkriptu vycházejícího z hlavního pozdního promotoru (MLP). MLP (lokalizován na 16,8 m.u.) je zvláště účinný během pozdní fáze infekce a všechny mRNA vycházející z tohoto promotoru mají 5' trojdílnou vedoucí sekvenci (TL), pro kterou jsou preferovanými mRNA při translaci.

V popisovaném systému vzniká rekombinantní adenovirus homologní rekombinací mezi pendlujícím vektorem a provirovým vektorem. V důsledku možné rekombinace mezi dvěma provirovými vektory může být tímto postupem vytvořen adenovirus divokého typu. Proto je nezbytné z jednotlivého plaku izolovat jediný klon viru a vyšetřit jeho genomovou strukturu. Použití systému YAC je alternativní přístup k produkci rekombinantního adenoviru.

Vznik a pomnožení současných adenovirových vektorů, které se nereplikují, závisí na jediné buněčné linii "helprů" označené jako linie 293, která vznikla transformací ledvinových buněk lidského plodu fragmenty DNA Ad5 a konstitutivně exprimuje proteiny E1 (Graham et al., "Characteristics of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5," J. Gen. Virol., 36: 59-72, 1977). Protože oblast E3 je oddělitelná od adenovirového genomu (Jones and Shenk, "Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5," Cell, 13: 181-188, 1978) současné adenovirové vektory za pomoci buněk 293 nesou cizorodou DNA buď v oblasti E1, E3 nebo v obou těchto oblastech (Graham and Prevec, "Manipulation of adenovirus vector," In: E.J.Murray (ed.), Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expressional Protocol, Clifton, NJ: Humana Press, 7: 109-128, 1991). V podstatě adenovirus může zabalit přibližně 105% genomu divokého typu (Gosh-Choudhury, et al., "Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full-length genomes," EMBO J., 6: 1733-1739, 1987), což poskytuje kapacitu pro přibližně 2kB cizorodé DNA. Jestliže se tato kapacita kombinuje s přibližně s 5,5kB DNA, která je nahraditelná v oblastech E1 a E3, maximální kapacita současných adenovirových vektorů je pod 7,5kB nebo okolo 15% celkové délky vektoru. Více než 80% adenovirového genomu zůstává na kostře vektoru a je zdrojem cytotoxicity způsobené vektorem. Také replikace viru s delecí oblasti E1 není úplná. Například, u současně dostupných adenovirových vektorů se pozorovaly ^{defektu} exprese virového genomu při infekci s vysokou multiplicitou (Mulligan, "The basic science of gene therapy," Science, 260: 9260-932, 1993).

Buněčné linie "helprů" mohou vzniknout z lidských buněk, jako jsou ledvinové buňky lidského embrya, svalové buňky, hematopoietické buňky nebo jiné mezenchymální nebo epiteliální buňky lidského embrya. V jiném případě "helpry" mohou vzniknout z buněk jiného druhu savců, které jsou přístupné lidským adenovirům. Mezi takové buňky patří například buňky Vero nebo jiné mezenchymální nebo epiteliální buňky embryí opic. Jak je uvedeno shora, preferovaná buněčná linie "helprů" je linie 293.

Povaha adenovirového vektoru kromě požadavku, aby byl replikačně defektní nebo alespoň podmíněně defektní, se nepovažuje za rozhodující pro úspěšné provádění vynálezu. Může se vybrat libovolný adenovirus z 42 různých známých serotypů nebo podskupin A-F. Abychom mohli získat adenovirový vektor s podmíněně defektní replikací, který lze použít způsobem podle vynálezu, preferuje se jako počáteční materiál adenovirus typ 5 podskupiny C. Adenovirus typ 5 je totiž lidský adenovirus, o němž je známo mnoho biochemických a genetických informací, a používá se historicky ve většině konstrukcí, kde je adenovirus použit jako vektor.

Jak se uvádí shora, typický vektor podle vynálezu má defektní replikaci a neobsahuje adenovirovou oblast E1. Nejvýhodnější je proto začlenit nukleovou kyselinu kódující p16 do polohy, odkud byly odstraněny E1 kódující sekvence. Avšak pozice inserce kódující oblasti p16 v adenovirových sekvencích není podstatná pro tento vynález. Nukleová kyselina, která kóduje transkripční jednotku p16, se může také začlenit místo deletované E3 oblasti ve vektorech se záměnou E3, jak dříve popsal Karlsson et al., (1986) nebo do oblasti E4, kde buněčná linie "helprů" nebo pomocný virus doplňuje defekt oblasti E4.

Kultivace a manipulace s adenoviry je snadná a adenoviry je možné použít pro široký rozsah hostitelů *in vitro* a *in*

aplikaci rekombinantního adenoviru do různých tkání zahrnují zavedení do trachei (Rosenfeld et al., "Adenovirus-mediated transfer of a recombinant α 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo," *Science*, 252: 431-434, 1991; Rosenfeld et al., "In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium," *Cell*, 68: 143-155, 1992), injekce do svalů (Ragot et al., "Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice," *Nature*, 361: 647-650, 1993), periferní intravenózní injekci (Herz and Gerard, "Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2812-2816, 1993) a stereotaktickou inokulací do mozku (Le Gal La Salle et al., "An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain," *Science*, 259: 988-990, 1993).

(iii) Jiné virové vektory jako expresivní konstrukce

Pro vytvoření expresivních konstrukcí se mohou použít jiné virové vektory. Mohou se použít vektory vzniklé z virů jako je virus vakcinie (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; citace uvedeny shora, Coupar et al., "A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes," *Gene*, 68: 1-10, 1988), adenoasociovaných virů (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; citace uvedeny shora, Hermonat and Muzycska, "Use of adenoassociated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81: 6466-6470, 1984) a herpesvirus. Tyto viry nabízejí několik atraktivních rysů vhodných pro různé savčí buňky (Friedmann, "Progress toward human gene therapy," *Science*, 244: 1275-1281, 1989;

Ridgeway, et al., 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; citace uvedena shora; Horwich et al., "Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells," J. Virol., 64: 642-650, 1990).

S rozpoznáním defektních virů hepatitidy B vznikl nový pohled na vztah struktura-funkce různých virových sekvencí. Studie *in vitro* ukázaly, že virus si může udržet schopnost na "helprech" závislého balení a schopnost obrácené transkripce navzdory až 80% delecí svého genomu (Horwich et al., citace uvedena shora). Tato skutečnost naznačuje, že velké části genomu se mohou nahradit cizorodým genetickým materiálem. Hepatotropismus a stálost (integrace) jsou vlastnosti zvláště atraktivní v případě přenosu genu do jater. Chang et al., zavedl gen chloramfenikol acetyltransferázy (CAT) do genomu kachního viru hepatitidy B do místa polymerázu, povrchovou a pre-povrchovou kódující sekvence. Tento virus se kotransfektoval s virem divokého typu do buněčné linie z ptačího hepatomu. Pro infekci primárních kachních hepatocytů bylo použito kultivační medium obsahující vysoké titry rekombinantního viru. Stabilní exprese genu CAT se detekovala nejméně 24 dní po transfekci (Chang et al., "Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector," Hepatology, 14: 124A, 1991).

D. Způsoby přenosu genů

Za účelem ovlivnit expresi „sense“ nebo „antisense“ konstrukcí p16, musí být expresivní konstrukce zavedena do buňky. Toto zavedení se může uskutečnit *in vitro* jako laboratorní postup transformace buněčných linií nebo *in vivo* nebo *ex vivo* (uvedeno dále v textu), například při léčbě stavu jistého onemocnění. Jak se popisuje shora, preferovaným

mechanizmem zavádění je virová infekce, kde expresivní konstrukce je zabalena v infekčních virových částicích.

Vynález dále zahrnuje několik nevirových způsobů transferu expresivních konstrukcí do kultivovaných savčích buněk. Mezi tyto způsoby patří srážení fosforečnanem vápenatým (Graham and Van Der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA," *Virology*, 52: 456-467, 1973; Chen and Okayama, "High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA," *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745-2752, 1987; Rippe et al., "DNA-mediated transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990), DEAE-dextran (Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures," *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985), elektroporace (Tur-Kaspa et al., "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986; Potter et al., "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165, 1984), přímá mikroinjekce (Harland and Weintraub, "Translation of mammalian mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA," *J. Cell Biol.*, 101: 1094-1099, 1985), liposomy naplněné DNA (Nicolau and SENE "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells," *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982; Fraley et al., "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979) a komplexy lipofektamin-DNA, sonikace buněk (Fechheimer et al., "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467, 1987), genové

bombardování za použití mikroprojektilů s velkou rychlostí Yang et al., "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment," *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568-9572, 1990) a transfekce zprostředkovaná receptorem (Wu and Wu "Receptor-mediated in vitro gene transfections by a soluble DNA carrier system," *J.Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987; Wu and Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells in vitro," *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988). Některé z těchto metod mohou být úspěšně upraveny pro použití *in vivo* nebo *ex vivo*.

Po té, co se expresivní konstrukce zavede do buňky, nukleová kyselina kódující p16 se může umístit a exprimovat na různých místech. V jistých provedeních nukleová kyselina kódující p16 se může stabilně integrovat do genomu buňky. Tato integrace může být v obdobné poloze a orientaci skrz homologní rekombinaci (záměna genu) nebo se může integrovat do náhodné, nespecifické polohy (genová augmentace). V dalším provedení se může udržovat v buňce jako oddělený episomální segment DNA. Takové segmenty nukleové kyseliny nebo "episomy" kódují sekvence dostatečné, aby umožnily udržení a replikaci nezávislou nebo synchronizovanou na cyklu buňky hostitele. Druh použité expresivní konstrukce ovlivňuje, jak bude expresivní konstrukce zavedena do buňky a kde zde setrvá nukleová kyselina.

V jednom provedení podle vynálezu expresivní konstrukce může jednoduše obsahovat surovou rekombinantní DNA nebo plazmidy. Přenos konstrukce se může uskutečnit libovolným shora zmíněným způsobem, který umožní průchod buněčnou membránou buď fyzikální nebo chemickou cestou. Tuto skutečnost lze zvláště využít při *in vitro* přenosu, ale může se použít i při přenosu *in vivo*. Dubensky et al v publikaci "directed transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 781: 7529-

7533, 1984 popisuje úspěšnou injecktáž polyomavirové DNA, která je ve formě CaPO_4 sraženiny, do jater a sleziny dospělých a novorozených myší, čímž demonstruje aktivní virovou replikaci a akutní infekci. Benvenisty and Neshif v publikaci "Direction introduction of genes into rats and expression of the genes," Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9551-9555, 1986) také ukazuje, že přímá intraperitonální injekce plamidů srážených s CaPO_4 vede k expresi transfektovaných genů. Předpokládá se, že DNA kódující p16 se může také přenést podobným způsobem *in vivo* a exprimovat p16.

V jiném provedení vynálezu, kde dochází k přenosu surové expresivní konstrukce DNA do buněk, se uplatňuje bombardování partikulemi. Tato metoda závisí na schopnosti udělit mikroprojektilům potaženým DNA vysokou rychlost a umožnit jim průchod buněčnou membránou a vstoupit do buňky, aniž by ji usmrtily (Klein et al., "High-velocity mikroprojectiles for delivering nucleic acids into living cells," Nature, 327: 70-73, 1987). Vyvinulo se několik zařízení pro urychlení malých partikulí. Na jednom takovém zařízení se uvolňuje náboj vysokého napětí a vzniká elektrický proud, který je hybnou silou (Yang et al., 1990 citace uvedena shora). Použité mikroprojektily obsahují biologicky inertní látky, jako jsou wolframové nebo zlaté částice.

Vybrané orgány krys nebo myší, mezi něž patří játra, kůže a svalová tkáň, se bombardovaly *in vivo* (Yang et al., 1990; citace uvedena shora, Zelenin et al., "High-velocity mechanical DNA transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and *in vivo*," FEBS Lett., 280: 94-96, 1991). Tento přístup může vyžadovat chirurgické vynětí tkáně nebo buněk za účelem odstranění intervenující tkáně mezi zbraní a cílovým orgánem, to je léčba *ex vivo*. Opět DNA

kódující p16 může být zaváděna tímto způsobem a stále spadá do rozsahu vynálezu.

V dalším provedení vynálezu může být expresivní konstrukce uzavřena v liposomu. Liposomy jsou vesikulární struktury, charakterizované fosfolipidovou dvojvrstvou membránou a vnitřním vodným médiem. Multilamelární liposomy mají více lipidových vrstev oddělených vodným médiem. Vznikají samovolně při suspendování fosfolipidů v přebytku vodného roztoku. Lipidové vrstvy se samy uspořádají před vytvořením uzavřené struktury a uzavřou mezi lipidovou dvojvrstvou vodu a rozpuštěné látky (Ghosh and Bachhawat, "Targeting of liposomes to hepatocytes," In: Wu G, Wu C ed. Liver disease, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands. New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991). V úvahu připadají také komplexy lipofektamin-DNA.

Zavedení nukleové kyseliny zprostředkované liposomy a exprese cizorodé DNA in vitro je velmi úspěšné. Wong et al., v publikaci "Appearance of β -lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer," Gene, 10: 87-94, 1980 demonstruje proveditelnost zavedení cizorodé DNA zprostředkované liposomy a její exprese v kultivovaném kuřecím embryu, HeLa buňkách a v buňkách hepatomu. Nicolau et al., v publikaci "Liposomes as carriers for in vivo gene transfer and expression," Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987 dokládá úspěšný přenos genu zprostředkovaný liposomy do krys po intravenózní injekci.

V jistých provedeních podle vynálezu mohou liposomy tvořit komplexy s hemaglutinačními viry (HJV). Ukázalo se, že ulehčují fúzi s buněčnou membránou a podporují vstup v liposomech uzavřené DNA do buňky (Kaneda et al., "Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver," Science, 243: 375-378, 1989). V dalším provedení podle vynálezu mohou liposomy tvořit komplexy s jadernými

nehistonovými chromozomálními proteiny (HMG-1) (Kato et al., "Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver," J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991). V dalších provedeních mohou tvořit komplexy jak s HVJ tak i HMG-1. V takovém případě expresivní konstrukce se mohou úspěšně použít při přenosu a expresi nukleové kyseliny *in vitro* nebo *in vivo*. V Případě, že se v DNA konstrukci použije bakteriální promotor, je nutné, aby v liposomu byla zahrnuta vhodná bakteriální polymeráza.

Jiné expresivní konstrukce, které se mohou použít pro zavedení nukleové kyseliny kódující p16 do buněk, jsou zaváděcí prostředek, který funguje na základě existence vhodného receptoru. S výhodou se používají makromolekuly selektivně pojmuté endocytozou zprostředkovanou receptorem ve většině eukaryontních buňkách. Vzhledem k typově specifickému rozdělení různých receptorů zavedení může být vysoce specifické (Wu and Wu, 1993; citace uvedena shora).

Nástroje pro zavádění genu pomocí receptoru se obecně skládají ze dvou komponentů: ligandu, který je specifický pro buněčný receptor a s činidla, které váže DNA. Pro přenos genu zprostředkovaný receptorem se může použít několik ligand. Nejlépe jsou charakterizovány ligandy asialoorosomukoid (ASOR) (Wu and Wu, 1987; citace uvedena shora) a transferin (Wagner et al., 1990; citace uvedena shora). Jako nástroj pro zavedení genu se použil syntetický neoglykoprotein, který rozeznává stejný receptor jako ASOR (Ferkol et al., 1993; Perales et al., 1994) a pro zavedení genů do destičkových buněk karcinomu se použil epidermální růstový faktor (EGF) (Myers, EPO 0273085).

V jiných provedeních zaváděcí nástroje mohou obsahovat ligand a liposom. Například Nicolau et al., (1987) (citace uvedena shora) popisuje použití laktosylceramidu, asialgangliosid zakončený galaktosou, které jsou začleněny do

liposomů, přičemž se pozorovalo zvýšení úspěšného zavedení genu insulinu do hepatocytů. Proto je možné také specificky zavést nukleovou kyselinu kódující p16 do buněk typu jako jsou plicní, epiteliální nebo nádorové buňky pomocí libovolného počtu receptor-ligand za přítomnosti nebo bez liposomů. Například pro zavedení nukleové kyseliny kódující p16 do mnoha nádorových buněk, které vykazují regulaci EGF receptoru, může být použit epidermální růstový faktor (EGF). Manóza se může použít k cílení na manózový receptor na jaterních buňkách. Také protilátky CD5 (CLL), CD22 (lymfom), CD25 (T-buňky leukemie) a MAA (melanom) se mohou použít podobně jako zaváděcí části.

V jistých provedeníh podle vynálezu může dojít k přenosu genu snadněji za podmínek *ex vivo*. *Ex vivo* genová terapie zahrnuje izolaci buněk ze zvířete, zavedení nukleové kyseliny do buněk *in vitro* a návrat modifikovaných buněk zpět do zvířete. Tento přístup může zahrnovat chirurgické odstranění tkáně/orgánů ze zvířete nebo primární kultury buněk a tkáně. Anderson et al., v US patentu dokládá terapeutické metody *ex vivo*.

Primární kultury savčích buněk se mohou připravit různými způsoby. Aby se buňky udržely životaschopné *in vitro* a při kontaktu s expresivní konstrukcí, je nezbytné zajistit, aby byly v kontaktu se správným poměrem kyslíku a oxidu uhličitého a s nutrieny, ale musí být chráněny před mikrobiální kontaminací. Metody kultivace buněk jsou dobře zdokumentovány a jsou doloženy v publikaci Freshner, R.I. "Animal Cell Culture: a Practical Approach," Second Edition, Oxford/New York, IRL Press, Oxford University Press, 1992.

Během podmínek kultivace *in vitro* se může pomocí expresivní konstrukce zavést a exprimovat v buňkách nukleová kyselina kódující p16. Buňky se mohou opět zavést do původních zvířat nebo se mohou aplikovat odlišnému zvířeti ve

farmaceuticky přijatelné formě libovolným z dále popsaných způsobů. Způsob ex vivo léčby savce s patologickým stavem je tedy v rozsahu vynálezu.

E. Expresivní konstrukce p16 v kombinaci s jiným druhem léčby

Hlavní problém v klinické onkologii je rezistence nádorových buněk k činidlům, která poškozují DNA. Jeden cíl současného výzkumu rakoviny je najít cesty vylepšení účinnosti chemoterapie a radioterapie kombinací s genovou terapií. Například zavedení genu tymidin kinázy viru herpes simplex (HS-tK) do nádorů mozku systémem retrovirového vektoru úspěšně vyvolalo citlivost na antivirové činidlo ganciclovir (Culver, et al., "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors," Science, 256: 1550-1552, 1992). V souvislosti s vynálezem se předpokládá, že podobně by bylo možno použít substituční terapii p16 ve spojení s chemoterapeutickou nebo radioterapeutickou intervencí.

Za účelem usmrcení buněk, jako jsou maligní nebo metastatické buňky, s použitím způsobů a kompozic podle vynálezu se obecně „cílová“ buňka uvede do kontaktu s expresivní konstrukcí p16 a s nejméně jedním činidlem, poškozujícím DNA. Tyto kompozice jsou dodávány v kombinovaném množství, dostatečném k usmrcení buněk nebo k inhibici jejich proliferace. Tento proces může zahrnovat současný kontakt buněk s expresivní konstrukcí p16 a s činidly nebo faktory poškozujícími DNA. Toho může být dosaženo tak, že se na buňku působí jednou kompozicí nebo farmakologickou formulací, která zahrnuje obě činidla nebo se na buňku působí dvěma rozdílnými kompozicemi nebo formulacemi ve stejný okamžik, kde jedna kompozice zahrnuje expresivní konstrukci p16 a druhá obsahuje činidlo poškozující DNA.

V jiném případě léčba pomocí p16 může předcházet nebo následovat po léčbě činidlem poškozujícím DNA v intervalu od minut do týdnů. V provedeních, kde faktor poškozující DNA a expresivní konstrukce p16 se aplikují na buňku odděleně, musí být obecně zajištěno, aby mezi jednotlivými aplikacemi neuběhla významná doba, aby bylo činidlo poškozující DNA a expresivní konstrukce p16 byly ještě schopny poskytnout výhodně kombinovaný účinek na buňku. V takových případech se předpokládá, že kontakt buňky s oběma činidly bude navzájem probíhat v rozmezí asi 12 až 24, přednostně asi 6 až 12 h a zejména je preferována doba prodlevu pouze asi 12 h. V některých situacích však může být žádoucí podstatně prodloužit dobu léčby, kdy mezi jednotlivými aplikacemi uplyne několik dní (2, 3, 4, 5, 6 nebo 7) až několik týdnů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 nebo 8).

Je také představitelné, že je žádoucí více jak jedna aplikace buď p16 nebo činidla poškozujícího DNA. Mohou se použít různé kombinace, kde p16 je označeno "A" a činidlo poškozující DNA jako "B":

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	B/B/B/A	B/B/A/B
A/A/B/B	A/B/A/B		A/B/B/A	B/B/A/A	B/A/B/A
A/A/A/B	B/A/A/A		A/B/A/A	A/A/B/A	A/B/B/B

Za účelem dosažení usmrcení buněk jsou do buňky zavedena obě činidla v kombinovaném množství účinném k usmrcení buněk.

Činidla nebo faktory poškozující DNA se zde definovaly jako chemické látky nebo léčebné metody, které indukují poškození DNA, jsou-li aplikovány na buňku. Taková činidla a faktory zahrnují radiaci a vlny, které vyvolávají poškození DNA, jako je γ -záření, paprsky X, UV záření, mikrovlny, emise elektronů apod. Poškození DNA vyvolávají různé chemické sloučeniny, nazývané také „chemoterapeutická činidla“, které všechny připadají v úvahu při kombinované léčbě podle vynálezu. Použitelná chemoterapeutická činidla

například adriamycin, 5-fluorouracil (5FU), etoposid (VP-16), kamptotecin, aktinomycin-D, mitomycin C, cisplatinu (CDDP) a dokonce peroxid vodíku. Vynález také zahrnuje použití kombinace jednoho nebo více činidel poškozujících DNA, ať už je jeho účinek založen na radiaci nebo jde o skutečnou sloučeninu, jako je použití rentgenového záření s cisplatinou nebo použití cisplatiny s etoposidem. V jistých provedeních se zvláště preferuje použití cisplatiny v kombinaci s expresivní konstrukcí p16.

Při léčbě rakoviny podle vynálezu se na nádorové buňky vedle expresivní konstrukce p16 působí činidlem poškozujícím DNA. Toho může být dosaženo ozářením lokalizovaného nádoru zářením, které poškozuje DNA, jako je rentgenové záření, UV záření, paprsky γ nebo dokonce mikrovlny. V jiném případě se na nádorové buňky může působit činidlem poškozujícím DNA tak, že se subjektu se podává terapeuticky účinné množství farmaceutické kompozice obsahující látku poškozující DNA, jako je adriamycin, 5-fluorouracil, etoposid, kamptotecin, aktinomycin-D, mitomycin C nebo výhodně cisplatina. Činidlo poškozující DNA se může připravit a použít jako kombinovaná terapeutická kompozice nebo souprava s expresivní konstrukcí p16, jak se popisuje shora.

Pro vyvolání poškození DNA, vedoucího k synergické neoplastické kombinaci se předpokládají činidla, která přímo sítují nukleové kyseliny, specificky DNA. Je možno použít činidla, jako je cisplatina a jiná činidla, alkylující DNA. Cisplatina se používá v širokém rozsahu pro léčbu rakoviny, přičemž pro klinické použití je účinná dávka 20 mg/m^2 po dobu pěti dnů každé tři týdny celkově třikrát. Cisplatina není orálně absorbovatelná a musí se proto aplikovat intravenózně, podkožně, intraperitonálně nebo intratumorálně injekcí.

Činidla, která poškozují DNA, také zahrnují látky, jež interferují s replikací DNA, mitózou a chromozomální

segregací. Takové chemoterapeutické látky zahrnují adriamycin, který je také znám jako doxorubicin, etoposid, verapamil, podofylotoxin a podobně. Tyto látky se široce používají v klinické praxi pro léčbu neoplázií. Podávají se intravenózně v dávkách od 25 až 75 mg/m² ve 21denních intervalech pro adriamycin do intravenózní dávky 35 až 50 mg/m² nebo dvojnásobku intravenózní dávky orálně pro etoposid.

Činidla, která přerušují průběh syntézy a ovlivňují přesnost prekursorů nukleových kyselin a jejich podjednotek, také poškozují DNA. Vyvinula se řada takových prekursorů nukleových kyselin. Zvláště užitečná jsou činidla, která se podrobila rozsáhlému testování a jsou jednoduše dostupná. Neoplastická tkáň preferuje použití činidel, jako je 5-fluorouracil (5-FU), což činí činidlo zvláště použitelné pro cílení do neoplastických buněk. Ačkoli je poměrně toxický, je 5-FU je aplikovatelný v širokém rozmezí nosičů, včetně povrchových, avšak běžně se používá aplikace intravenózní v dávkách od 3 do 15 mg/kg/den.

Jiné faktory, které způsobují poškození DNA a široce se používají, zahrnují běžně známé paprsky γ , rentgenové záření a/nebo cílené zavedení radioizotopů do nádorových buněk. V úvahu přiadají také jiné formy faktorů poškozujících DNA, jako jsou mikrovlny a UV-záření. Je velmi pravděpodobné, že všechny tyto faktory způsobují široký rozsah poškození DNA na prekurzorech DNA, v replikaci a reparaci DNA a uspořádání a udržení chromosomů. V případě rentgenového záření se denní dávka pohybuje v rozsahu od 50 do 200 rentgenů po delší dobu (3 až 4 týdny) až po jednorázovou dávku 2000 až 6000 rentgenů. Rozsah dávek v případě radioizotopů se mění a závisí na poločasu rozpadu izotopu, síle a typu radiace a schopnosti neoplastických buněk absorbovat záření.

Odborník se řídí publikací "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, chapter 33, zvláště jsou v tomto ohledu zajímavé stránky 624 až 652. Nezbytně se objeví v závislosti na podmínkách a léčeném subjektu různé odchylky v dávce. Osoba odpovědná za léčbu musí stanovit vhodnou dávku pro dané individuum. V případě aplikace na lidech by měl přípravek splňovat standardy sterility, pyrogenity, obecné bezpečnosti a čistoty, jak vyžaduje instituce Office of Biological standards FDA.

Předpokládá se, že místní zavedení expresivních konstrukcí p16 do pacienta, který má rakovinu spojenou s p16, je velmi účinná metoda pro zavedení terapeuticky účinného množství genu, která působí proti onemocnění. Podobně chemoterapie nebo radioterapie se může cílit do určité oblasti těla subjektu. V jiném případě může být za jiných okolností vhodné systémové zavedení expresivní konstrukce p16 nebo aplikace činidla, které poškozuje DNA. Jde například o situaci, kdy se objeví rozsáhlé metastázy.

Výhodné, vedle kombinace p16 cílených terapií s chemoterapií nebo radioterapií, je také uvažovat kombinování genové terapie. Například, jestliže dojde ve stejný okamžik k vytvoření p16 a p53 mutací, může se zlepšit léčba rakoviny. Tímto způsobem se může zavést libovolný gen, který se zmiňuje ve spojitosti s nádory, například p21, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fmc*, *jun*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *bcl* a *abl*.

F. Nukleová kyselina kódující p16 nebo p16 AS markery

V jistých provedeních podle vynálezu se může pro diagnostické účely použít nukleová kyselina kódující p16 nebo peptid p16. Nepřítomnost nebo redukováná/zvýšená hladina nukleové kyseliny kódující p16 může indikovat stadium onemocnění, jako je rakovina. Vynález také zahrnuje použití

p16 a nukleové kyseliny kódující p16 jako markerů. Existuje řada metod, které jsou odborníkovi dobře známy a které se mohou použít při detekci p16 nebo nukleové kyseliny kódující p16. Dvě běžné metody detekce nukleových kyselin kódující p16 jsou Southernova a northernova analýza a jejich varianty. Hladina message p16 se může použít jako marker pro indikaci tvoření nádorů.

V příkladu 1 je popsán alternativní přístup pro detekci p16. Jde o imunotest za použití protilátek, které se při westernově přenosu a při FACS analýze váží na p16. Obě tyto metody se použily při detekci exprese p16 na povrchu buněk. Často je vhodné, aby detekce nebyla limitována na shora zmíněné metody a pak existuje řada jiných metod, na které vynález klade důraz.

Mezi používané imunotesty patří různé typy ELISA-testu (enzyme-linked immunosorbent assays) a radioimunotestů (RIA), které jsou odborníkům známy. Zvláště se používají imunohistochemické detekce za použití tkáňových sekcí.

Při testu ELISA se imobilizují protilátky anti-p16 (jako jsou Ab669) na vybraném povrchu, který vykazuje proteinovou afinitu, jako jsou komůrky na polystyrenových mikrotitračních destičkách. Do komůrek se pak přidá testovaná kompozice obsahující buňky nebo buněčný materiál. Po navázání a promytí, za účelem odstranění nespecificky vázaných imunokomplexů, se může detekovat vázaný p16. Detekce lze obecně dosáhnout přidáním jiných anti-p16 protilátek, které se vážou na detekovatelné značky. Tento typ testu ELISA je jednoduchý. Nazývá se sendvičový test ELISA. Detekce lze také dosáhnout přidáním druhých anti-p16 protilátek, pak následuje přidání třetích protilátek, které vykazují vazebnou afinitu pro druhé anti-p16 protilátky. Prostřednictvím třetích protilátek se váží na detekovatelné značky.

V jiných testech ELISA se ve vzorcích, které obsahují buněčný materiál, testuje obsah p16. Vzorky se imobilizují na povrchu a pak se na ně aplikují anti-p16 protilátky. Po navázání a správném promytí se detekují vázané imunokomplexy. V případě, že se počáteční anti-p16 protilátky vážou na detekovatelné značky, mohou být imunokomplexy detekovány přímo. Imunokomplexy se mohou detekovat za použití druhých protilátek, které mají vazebnou afinitu pro první anti-p16 protilátky. Prostřednictvím druhých protilátek se váží na detekovatelné značky.

Kompetitivní test ELISA je použitelný, jestliže testované vzorky soutěží v navázání se známým množstvím značeného antigenu p16 nebo s protilátkami. Množství reaktivního specie se známým značeným specie před nebo během inkubace v potažených komůrkách. Přítomnost reaktivních specie ve vzorku způsobuje redukci množství značené specie, která je dostupná pro navázání na povrch komůrky, a tak redukuje konečný signál.

Bez ohledu na použitý formát testy ELISA mají jisté společné rysy, jako je potažení, inkubace a promytí za účelem odstranění nespecificky vázaných specií a detekování vázaných imunokomplexů. Tyto rysy se popisují následovně:

K potažení destiček slouží buď antigen nebo protilátka. V komůrkách destiček se bude inkubovat roztok antigenu nebo protilátek, buď přes noc nebo po specifikovaný časový úsek. Komůrky destiček se pak promyjí a tím se odstraní ne zcela adsorbovaný materiál. Libovolný zbývajících povrch komůrek je pak potažen nespecifickým proteinem, který je s ohledem na testovanou antiséra antigenně neutrální. K potažení se používá albumin telecího séra (BSA), kasein, želatina a roztoky mléčného prášku. Blokovací roztoky také obvykle obsahují detergent Tween-20, který velice pomáhá zredukovat nespecifické vázání. Potažení umožňuje blokování

nespecifických adsorbčních míst na imobilizujícím povrchu a tak redukuje pozadí, způsobené nespecifickým navázáním antiséra na povrch.

Při testech ELISA je obvyklejší použít sekundární nebo terciální detekci místo přímého postupu. Po navázání p16 nebo anti-p16 protilátky na komůrku, potažení nereaktivní látkou pro redukci pozadí a promytí pro odstranění nenavázaného materiálu se imobilizovaný povrch uvede do kontaktu s testovaným klinickým nebo biologickým vzorkem za podmínek, účinných pro vytvoření imunokomplexu (antigen/protilátka). Detekce imunokomplexu pak vyžaduje značený sekundární vazebný ligand nebo protilátku nebo sekundární vazebný ligand nebo protilátku ve spojení se značenou terciální protilátkou nebo třetím vazebným ligandem.

Termín „za podmínek, účinných pro vytvoření imunokomplexu (antigen/protilátka)“ znamená, že podmínky s výhodou zahrnují ředění antigenů a protilátek roztoky, jako jsou BSA, telecí gammaglobulin (BGG) a fosforečnanem pufrovaný fyziologický roztok (PBS)/Tween-20. Tato přidaná činidla mají také sklon napomáhat při redukci nespecifického pozadí.

Vhodné podmínky také znamenají, že inkubace probíhá při teploty a po dobu, dostačující k umožnění účinného navázání. Inkubace typicky trvá 1 až 2 až 4 hodiny, při teplotě přednostně 25 až 27°C nebo přes noc při teplotě asi 4°C apod.

Po ukončené inkubaci v ELISA následuje promytí kontaktního povrchu pro odstranění nekomplexovaného materiálu. Promytí často zahrnuje promytí roztokem PBS/Tween-20 nebo borátovým pufrem. Po vytvoření specifických imunokomplexů mezi testovaným vzorkem a původně navázaným materiálem je možno stanovit i malá množství imunokomplexů.

Druhé a třetí protilátky budou mít sdruženou značku, aby umožnily detekci. Upřednostňuje se enzym, který vyvolá při

inkubaci s vhodným chromogenním substrátem zbarvení. Pak je například nutné inkubovat první nebo druhý imunokomplex po určitou dobu a za podmínek, které zvýhodňují tvoření dalších imunokomplexů, s ureázou, glukózovou oxidázou, alkalickou fosfatázou nebo hydrogen peroxidázou konjugovanou s protilátkami (například inkubace po dobu 2 hodin při teplotě místnosti v roztoku obsahujícím PBS, jako je PBS/Tween-20).

Po inkubaci se značenými protilátkami a následným promytím za účelem odstranění nevázaného materiálu se kvantifikuje množství značky, například inkubace s chromogenním substrátem, jako je močovina nebo bromokrezolový purpur nebo 2,2'-azino-di-(3-etyl-benzthiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS) a H_2O_2 . Jako značka se používá enzym peroxidáza. Kvantifikace se docílí měřením stupně vývoje barvy, například ve viditelném spektru na spektrofotometru.

F. Farmaceutické kompozice a způsoby aplikace

V případě, že se přemýšlí o klinické aplikaci expresivní konstrukce obsahující nukleovou kyselinu kódující p16, je nezbytné připravit komplex jako farmaceutickou kompozici, která je vhodná pro zamýšlenou aplikaci. Obecně je nutné připravit farmaceutickou kompozici, která neobsahuje pyrogeny ani jiné nečistoty, jež by mohly lidem nebo zvířatům uškodit. Je nutné také použít vhodné soli a pufry, aby komplex byl stabilní a mohl být pojmout cílovými buňkami.

Vodné kompozice podle vynálezu obsahují účinné množství expresivní konstrukce a nukleové kyseliny, rozpuštěné nebo rozptýlené ve farmaceuticky přijatelném nosiči nebo ve vodném médiu. Takové kompozice se mohou také vztahovat k inokulu. Termíny "farmaceuticky a farmakologicky přijatelné" znamená molekulové entity a kompozice, které nepůsobí adverzní, alergické nebo jiné nevhodné reakce po aplikaci na zvířatech nebo lidech. Termín "farmaceuticky přijatelný nosič" zahrnuje

libovolné nebo všechna rozpouštědla, disperzní média, izotonická a absorpční opožděně účinkující činidla a podobně. Použití takových medií a činidel v případě farmaceutických aktivních látek je v oboru dobře známo. V úvahu připadá použití jakéhokoli běžného média v terapeutických kompozicích, pokud není nekompatibilní s účinnou látkou. Do kompozic je možno rovněž začleňovat další účinné látky.

Roztoky aktivních látek jako volné báze nebo farmakologicky přijatelné sole se mohou připravit ve vodě vhodně smíchané s povrchově aktivní látkou, jako je hydroxypropylcelulóza. Pro přípravu disperze se také může použít glycerol, kapalně polyetylglykoly a jejich směsi a oleje. Za běžných podmínek skladování a použití tyto preparáty obsahují konzervační činidla, která brání růstu mikroorganismů.

Expresivní konstrukce a zaváděcí nástroje podle vynálezu mohou zahrnovat farmaceutické přípravky. Aplikace terapeutických kompozic podle vynálezu může probíhat prostřednictvím libovolné běžné cesty, pokud je cílová tkáň dostupná pro tuto cestu. Cesty aplikace jsou orální, nasální, bukalní, rektální, vaginální nebo povrchová. Povrchová aplikace je zvláště výhodná při léčbě rakoviny kůže, přičemž brání chemoterapeuticky indukované plešatosti nebo jiným dermálním hyperproliferacním vadám. V jiném případě může dojít k aplikaci orthotopické, intradermální, podkožní, intramuskulární, intraperitonální nebo intravenézní injekcí. Takové kompozice se mohou aplikovat jako farmaceuticky přijatelné kompozice, které zahrnují fyziologicky přijatelné nosiče, pufry nebo jiné excipienty.

Terapeutické kompozice podle vynálezu se s výhodou aplikují ve formě injektovatelných kompozic, buď jako kapalně roztoky nebo suspenze; pevné formy vhodné pro kapalně roztoky

nebo kapalně suspenze, které se připraví před aplikací injekcí. Tyto přípravky také mohou tvořit emulze. Typická kompozice pro takový účel obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič. Například kompozice může obsahovat 10 mg, 25 mg, 50 mg nebo až okolo 100 mg lidského sérového albuminu na jeden mililitr fyziologického roztoku pufovaného fosforečnanem. Jiné farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují vodné roztoky, netoxické excipienty, sole, konzervační činidla, pufrы a podobně. Příklady nevodných rozpouštědel jsou propylen glykol, polyetylen glykol, rostlinný olej a injektovatelné organické estery, jako je etyloléat. Vodné nosiče zahrnují vodu, alkohol/vodné roztoky, fyziologický roztok, parenterální činidla, jako je chlorid sodný, Ringerova dextróza atd. Intravenózní nástroje zahrnují kapalně a nutriční plnidla. Konzervační činidla zahrnují antimikrobiální činidla, anti-oxidanty, chelatační činidla a inertní plyny. Hodnota pH a skutečná koncentrace různých komponent farmaceutické kompozice jsou upraveny podle dobře známých parametrů.

Přídavné formulace jsou vhodné pro orální aplikaci. Orální formulace zahrnují takové typické excipienty jako například manitol, laktózu, škrob, stearát hořečnatý, sodný sacharin, celulózu, uhličitan hořečnatý, které splňují požadavky čistoty pro farmaka. Kompozice mohou mít formu roztoků, suspenzí, tablet, pilulí, kapsulí, formulací, které se nepřerušovaně uvolňují nebo prášku. Pokud se kompozice aplikují povrchově, mohou se použít formy krém, mast, pomáda nebo spray.

Účinné množství terapeutického činidla se určí na základě zamýšleného cíle, například (i) inhibice proliferace nádorových buněk nebo (ii) eliminace nádorových buněk. Termín "jednotková dávka" znamená fyzicky diskrétní jednotky vhodné pro použití na subjektu, každá jednotka obsahující předem

určené množství terapeutické kompozice, které je vypočítané tak, aby se dosáhlo požadované odezvy ve vztahu s jeho aplikací, t.j. vhodný způsob aplikace a režim léčby. Množství, které se má aplikovat, vzhledem počtu aplikací a jednotkové dávky závisí na subjektu, který má být léčen, stavu subjektu a požadované ochraně. Přesné množství terapeutické kompozice také závisí na odhadu praktika.

G. Soupravy

Všechny podstatné materiály a činidla, která jsou nutná pro inhibici proliferace nádorových buněk, transformování buněk nebo detekci rakovinových buněk, jsou obsažena v kitu. Obecně budou obsahovat vybrané expresivní konstrukce. Také mohou obsahovat různá media a hostitelské buňky sloužící k replikaci expresivních konstrukcí. V takových soupravách bude každé činidlo umístěno v odděleném kontejneru.

V případě, že komponenty soupravy jsou obsaženy v jednom nebo více kapalných roztoků pak se upřednostňuje, aby kapalný roztok byl vodný roztok, zvláště se preferují sterilní vodné roztoky. Pro použití *in vivo* se může vytvořit farmaceuticky přijatelná injektovatelná kompozice obsahující expresivní konstrukci. V tomto případě může být kontejnerem inhalátor, injekční stříkačka, pipeta, kapátko nebo jiné zařízení, jehož pomocí se aplikuje formulace do infikované oblasti těla, jako jsou plíce nebo se injekcí zavede do zvířete a nebo se nanese a promíchá s jinými komponenty soupravy.

Komponenty soupravy se mohou vyskytovat v suché nebo lyofilizované formě. V případě, že se komponenty soupravy vyskytují v suché nebo lyofilizované formě provede se rekonstituce přidáním vhodného rozpouštědla. Je zřejmé, že rozpouštědlo může také být obsaženo v jiném kontejneru. Souprava podle vynálezu bude typicky zahrnovat nástroje

05.04.98

vhodné pro těsné uložení nádobek pro komerční prodej, například vstřikované nebo vyfukované plastové stojánky.

Bez ohledu na typ a počet kontejnerů mohou soupravy podle vynálezu také mohou obsahovat nebo být společně baleny s nástrojem napomáhajícím aplikaci nebo umístění konečné komplexní kompozice do těla zvířete. Tímto nástrojem může být inhalátor, injekční stříkačka, pipeta, pinzeta, odměrná lžička, kapátko nebo jakýkoli zdravotně shválený nástroj.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Materiál a metody

Buněčné linie

Buněčná linie 293 se udržovala v upraveném Eagle médiu doplněném 10% teplem inaktivovaným koňským sérem. Lidské buněčné linie NSCLC H226Br, H322 rostou v médiu RPMI, které obsahuje 5% fetální bovinní sérum. Buněčná linie lidského normálního prsu HBL100 se kultivovaly v F12 médiu doplněném 10% fetálním bovinním sérem.

Subklonování p16^{INK4} cDNA

Původní p16^{INK4} cDNA se amplifikovala z celkové RNA normálních lidských lymfocytů pomocí RT-PCRTM za použití primerů 5'-ATGGAGCCTTCGGC TGACTGG-3' (SEQ ID č. 3) a 5'-CCTGTAGGACCTTCGGTGACT-3' (SEQ ID č.4). Produkt PCRTM se subklonoval do vektoru pCRTM (Invitrogen, San Diego, CA) a správnost sekvence se potvrdila sekvenováním dvouřetězcové DNA. Vzhledem k opravě sekvence p16^{INK4} cDNA v databázi GenBank se později přidala na 5' konec klónované p16^{INK4} cDNA další sekvence 42 párů bazí pomocí dvou kroků PCRTM. V prvním kroku PCRTM se použil primer A (5'-GATCCGGCGG CGGGGAGCAGCATGGAGCCTTC GGCTGACTGG-3'; SEQ ID č. 5); a primer C (5'-GCCTCTCTGGTTCTTTCA-3'; SEQ ID č.6). Ve druhém kroku

PCRTM se použil primer B (5'-CGGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCGG CGGCGGGGAGC-3'; SEQ ID č. 7) a primer C. Konečná sekvence p16^{INK4} cDNA divokého typu se opět ověřila sekvenováním dvouřetězcové DNA.

Konstrukce pAd-p16.

Pendlující vektor pEC53 (Zhang et al., "High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus," Cancer Gene Therapy, 1:5-13, 1994) se štěpil restričními enzymy HindIII a HpaI. Kostra vektoru se oddělila od cDNA p53 na 1% agarózovém gelu a izolovala se. p16^{INK4} cDNA se vyštěpila z pCR-p16 a ligovala se do izolované kostry pendlujícího vektoru. Konečný produkt pAD-p16 nese expresivní kazetu p16^{INK4} obsahující lidský promotor CMV (Boshart et al., "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of hman cytomegalovirus," Cell, 41:521-530, 1985), p16^{INK4} cDNA divokého typu a časný polyadenylační signál SV40.

Tvoření rekombinantního adenoviru p16^{INK4}

Rekombinantní adenovirová DNA Ad5CMV-lacZ se štěpila restričními enzymy XbaI a ClaI a na 0,3% agarózovém gelu se izoloval fragment DNA adenoviru o velikosti 32kb. Fragment DNA a plazmidová DNA pAD-p16 se kotransfektovaly do buněk 293 transfekcí zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým. Tranfektované buňky se udržovaly v médiu až došlo k cytopatickému účinku. Pomocí analýzy PCRTM vzorků DNA připravených z buněčné kultury supernatantu se určil nově vzniklý rekombinantní adenovirus sekvence p16^{INK4} (Ad-p16). Rekombinantní adenovirus Ad5CMV-lacZ, který nese gen lacZ z *E.coli*, má strukturu podobnou struktuře Ad-p16 a použil se jako kontrola v těchto studiích.

Zásoba viru, titry a infekce

Jednotlivé klóny viru Ad-p16 a Ad5CMV-lacZ se získaly izolací přes plaky a pomnožily se v buňkách 293 metodou podle publikace Graham and Prevec (1991) (citace uvedena shora). Virové titry se určily plakovým testem. Linie buněk se infikovala nanesením roztoků virů na buněčnou monovrstvu a inkubací při teplotě místnosti po dobu 30 minut s krátkým promýcháním každých 5 minut. Pak následovalo přidání kultivačního média a buňky se dále inkubovaly v inkubátoru při teplotě 37°C.

Test vzniku nádoru

Buňky H460 se infikovaly virem Ad-p16 nebo Ad5CMV-lacZ v koncentraci 50 jednotek tvořících plaky/buňku. Na stejný počet buněk se nanoslo pouhé médium. Tento pokus sloužil jako slepý pokus. Dvacetčtyři hodin po infekci se buňky shromáždily a promyly se dvakrát roztokem PBS. 5×10^6 buněk v objemu 0,1 ml roztoku PBS se injektovalo podkožně do dorzální části boku myši BALB/c nu/nu (Harlan Sprague-Dawley Co., Houston, TX). Uvedené myši se po aplikaci injekce testovaly v týdenních intervalech. Vznik nádoru se hodnotil na konci tří týdenního časového úseku. Pro výpočet objemu nádoru se bral v úvahu sférický tvar a průměrný průměr nádoru. Objem nádoru se vypočítal jako druhá odmocnina součinu ortogonálního průměru.

Příklad 2: Výsledky

Tvoření rekombinantního viru Ad-p16

Jednou z výhod adenoviru jako vektoru pro přenos genu je jeho vysoká účinnost v širokém rozmezí hostitelských buněk (Berkner, "Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes," BioTechniques, 6: 616-629,

1988). Zkonstruoval se pendlující vektor odvozený z adenoviru pEC53, který se využívá při genové terapii rakoviny u lidí (Zhang et al., 1994; citace uvedena shora). Rekombinantní virus získaný z tohoto vektoru Ad5CMV-p53 má schopnost infikovat 97 až 100% plicních rakovinových buněk několika buněčných linií (Zhang et al., 1994; citace uvedena shora). Mezi ně patří H460, H322 a H226Br. V této studii se gen p53 ve vektoru pEC53 nahradil $p16^{INK4}$ cDNA v plné délce. Konečný produkt pAd-p16 nese genovou expresivní kazetu $p16^{INK4}$, která obsahuje lidský promotor CMV (Boshart et al., 1985; citace uvedena shora), $p16^{INK4}$ cDNA divokého typu a časný polyadenylační signál SV40. Fragment adenovirové DNA o velikosti 32kB vytvořený štěpením DNA rekombinantního viru Ad5CMV-lacZ enzymem XbaI se kotransfektoval s plazmidem Ad-p16 do buněk 293 pomocí homologní rekombinace. Rekombinantní virový produkt Ad-p16 má genovou strukturu podobnou struktuře Ad5CMV-lacZ kromě skutečnosti, že gen lacZ je nahrazen genem $p16^{INK4}$. Protože oblasti E1 rekombinantního adenoviru jsou nahrazeny expresivní kazetou s genem $p16^{INK4}$ nebo lacZ, mohou se pomnožit pouze v buňkách 293, které doplňují deleci E1. Ad5CMV-lacZ se používal jako virová kontrola pro Ad-p16.

Exprese exogenního proteinu $p16^{INK4}$ v lidských plicních rakovinových buňkách

Pro tuto studii se vybraly tři lidské buněčné linie NSCLC: H460, H322 a H226Br. Buňky H460 nesou homozygotní delece genu (Kamb et al., 1994; citace uvedena shora), přičemž geny p53 (Takahashi et al., "p53 a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer," Science, 246: 491-494, 1989) a Rb (Harbour et al., "Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC," Science, 241:353-357, 1988) jsou geny divokého typu. Buňky H322 nesou homozygotní deleci genu $p16^{INK4}$ (Okamoto et al.,

1994; citace uvedena shora), gen Rb divokého typu (Harbour et al., 1988; citace uvedena shora) a homozygotní mutaci p53 v kodonu 248 (Mitsudomi et al., "p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features," *Oncogene*, 7: 171-180, 1992). Buňky H226Br nesou gen p16^{INK4} detekovatelný Southernovým přenosem a analýzou PCRTM, který nebyl sekvenován, ale neexprimují gen p16^{INK4} na úrovni proteinu. Tyto buňky nesou homozygotní mutaci p53 v kodonu 254 (Fujiwara et al., "Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model," *JNCI*, 86: 1458-1462, 1994) a exprimuje protein Rb divokého typu (Harbour et al., 1988; citace uvedena shora). Kultivované normální epiteliální buňky z lidského prsu HBL100 exprimující p16^{INK4} divokého typu, p53 divokého typu a gen RB divokého typu se použily jako kontrola. Před virovou infekcí exprimovaly protein p16^{INK4} pouze buňky HBL100. Za účelem získat vysokou expresi exogenního proteinu p16^{INK4} se použil lidský promotor CMV (Boshart et al., 1985; citace uvedena shora), který řídí expresi genu p16^{INK4}. Vysoké exprese exogenního proteinu p16^{INK4} se dosahlo v buňkách H460, H322 a H226Br po infekci Ad-p16. Hladina proteinu p16^{INK4} v buňkách HBL100 byla daleko vyšší po infekci Ad-p16, což indikuje expresi exogenního proteinu p16^{INK4} v těchto buňkách. Následně se testoval účinek(y) proteinu p16^{INK4}, který je zavedený do linie nádorových buněk.

Účinek proteinu p16^{INK4} na růst plicních rakovinových buněk

NSCLC buněčné linie H460, H322 a H226Br a normální prsní buňky HBL100 se infikovaly viry Ad-p16 nebo AD5CMV-lacZ při 50 jednotkách tvořících plaky/buňku. Tři sety infikovaných a kontrolních buněk se počítaly každý den po dobu 6-ti dnů a každý den se určil průměrný počet buněk. Jak je ukázáno na

obrázku č. 2, růstová rychlost buněk H460, H322 a H226Br infikovaných Ad-p16 ve srovnání s buňkami, které se infikovaly virem Ad5CMV-lacZ, se inhibovala z 94%, 85% a 97%. Avšak růstová rychlost buněk HBL100 infikovaných virem Ad-p16 se inhibovala méně než ze 3%, porovnávalo s buňkami, které se infikovaly virem Ad5CMV-lacZ. To naznačuje, že zavedení genu $p16^{INK4}$ do této buněčných linií by mohlo obnovením exprese $p16^{INK4}$ specificky potlačit proliferaci buněk. Růstové rychlosti všech buněčných linií infikovaných Ad5CMV-lacZ byly nižší než růstové rychlosti kontrolních infikovaných buněk, což indikuje cytotoxicitu způsobenou virovými proteiny a genem lacZ. Když se použilo vyšší MOI zvýšila se i cytotoxicita způsobená virem. Buněčné linie vykazovaly odlišnou citlivost na tento efekt.

Zastavení buněčného cyklu zprostředkované Ad-p16

Je známo, že protein $p16^{INK4}$ může inhibovat aktivitu CDK4 a CDK6, přičemž blokuje přechod proliferujících buněk z fáze G_1 do fáze S (Serrano, et al., 1993; Serrano, et al., 1995; citace uvedena shora). Při testování mechanismu inhibice růstové rychlosti zprostředkované Ad-p16, se infikovaly buňky H460, H322, H226Br a HBL100, jak se popisuje v testu rychlosti růstu. Infikované buňky se shromáždily 24 hodin po infekci a proběhla analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií. Jak ukazuje tabulka č. 4 exprese proteinu $p16^{INK4}$ v buňkách s delecí linií nádorových buněk podstatně zvyšuje počet buněk ve fázi G_1 a snižuje počet buněk ve fázi S a ($G_2 + M$), což naznačuje zastavení indukce G_1 . Naopak nepozastavení fáze G_1 se pozorovalo v buněčné linii normálních prsních buněk HBL100, které exprimují $p16^{INK4}$. Tyto výsledky naznačují, že protein $p16^{INK4}$ potlačuje růst nádorových buněk prostřednictvím zastavení fáze G_1 v buněčné linii, která neexprimuje $p16^{INK4}$.

Tabulka č. 4

Analýza průtokovou cytometrií účinků p16^{INK4} na buněčný cyklus, které jsou zprostředkovány Ad-p16.

typy buněk & infikované viry	Procento buněk v		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HBL100/Ad-p16	36	42	22
HBL100/ H226Br/	31	44	25
HBL100/medium	31	42	27
H460/Ad-p16	88	9	3
H460/Ad-5CMV-lacZ	41	32	27
H460/medium	39	35	26
H322/Ad-p16	80	6	14
H322/Ad-5CMV-lacZ	30	36	34
H322/medium	30	36	34
H226Br/Ad-p16	80	11	9
H226Br/Ad-5CMV-lacZ	20	53	27
H226Br/medium	26	44	30

Uvedené hodnoty se získaly v reprezentačním testu. Buňky se infikovaly stejným způsobem jako při testu určení růstové rychlosti buněk. Dvacet čtyři hodin po infekci se na buňky aplikoval 1% Tween-20 a obarvily se propidiumjodidem a testovala se syntéza DNA a stádium buněčného cyklu. Test průtokové cytometrie se uskutečnil na zařízení FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA), které je vybaveno vzduchem chlazeným 15-mW 488nm argonovým laserem. Červená fluorescence se měřila filtrem s dlouhou průchodností, který odděluje vlnovou délku 650nm.

Inhibice vzniku nádorů zprostředkovaná virem Ad-p16

Za účelem určit, zda virus Ad-p16 může inhibovat tvorbu nádorů v lidských buňkách NSCLC, se BALB/c nu/nu myším podkožně aplikovala injekce s buňkami H460, z důvodu tvorby nádoru. Každé myši se aplikovala injekce s buňkami v množství 5×10^6 . Buňky se po dobu 24 hodin infikovaly buď virem Ad-p16 nebo Ad5CMV-lacZ v koncentraci 50 jednotek tvořících plaky na buňku. Buňky H460, na které se aplikovalo samotné medium, se použily jako kontroly. Každá uvedená aplikace se provedla na čtyřech myších. Myši se pozorovaly a když se objevily nádory, jejich velikost se měřila v tří týdenních intervalech. Za účelem potvrdit reprodukovatelnost se uskutečnily dvě nezávislé studie. Data získaná z obou studií se uvádějí v tabulce č. 5. Buňky infikované virem Ad-p16 podstatně snížily růst nádoru *in vivo*. U 100% myší, kterým se zavedly buňky ošetřené pouhým médiem a u 87,5% myší, kterým se zavedly buňky infikované virem AD5CMV-lacZ, se vytvořily nádory. Na druhé straně v obou studiích pouze u 50% myší, kterým se aplikovaly buňky infikované Ad-p16, se vytvořily nádory. Střední objem nádorů byl pouze 11% objemu nádoru myší s buňkami infikovanými virem Ad5CMV-lacZ a 6% objemu nádoru myší s buňkami ošetřenými pouze médiem ($p < 0,001$, tato hodnota se vypočítala dvoustranným studentským T testem). Tvorba nádorů plicních rakovinových buněk tedy byla inhibována předchozí infekcí virem Ad-p16, což indikuje, že protein p16^{INK4} může mít terapeutický účinek.

Tabulka č. 5:

Účinek proteinu p16^{INK4} na tvoření nádorů buněčné linie H460 u nahých myší

	Aplikace	Počet nádorů	Střední objem
--	----------	--------------	---------------

		Počet myší (%)	(mm ³ ± SD)
experiment 1	medium	4/4 (100%)	1047,3±104,7
	Ad5/CMV-lacZ	4/4 (100%)	740,5±205,5
	Ad-p16	0/4 (0%)	-
experiment 2	medium	4/4 (100%)	1158,6±200,2
	Ad5/CMV-lacZ	3/4 (75%)	658,3±144,3
	Ad-p16	4/4 (100%)	71,2±19,6

Buňky H460 se infikovaly viry při MOI 50 jednotek tvořících plaky na buňku po dobu 24 hodin a aplikovaly se myším podkožní injekcí. Injekce obsahovala 5×10^6 buněk/myš. Velikosti nádoru se určily na konci třítýdenního období.

Terapeutický potenciál viru Ad-p16 se testoval na modelu BALB/c nu/nu myši. Uzlíky podkožních nádorů vznikly 20 dnů po podkožně aplikované injekci myším. Injekce obsahovala 5×10^6 buněk H460. Do výsledných nádorů se injekcí zavedl virus Ad-p16 (10^{10} jednotek tvořících plaky/nádor), Ad5CMV-lacZ (10^{10} jednotek tvořících plaky/nádor) nebo PBS. Jak ukazuje obrázek č. 3, osmnáct dnů po aplikaci injekce průměrný objem nádorů ošetřených virem Ad-p16 byl pouze 49% objemu nádorů ošetřených kontrolním virem a 34% objemu nádorů, které jsou ošetřeny pouhým PBS ($p < 0,001$, tato hodnota se určila studentovým T testem).

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) Údaje k SEQ ID NO: 1.

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 987 párů bází

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Druh řetězce: jednořetězcová

(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence SEQ ID NO:1

CGGAGAGGGG GAGAACAGAC AACGGGCGGC GGGGAGCAGC ATGGAGCCGG CGGCGGGGAG	60
CAGCATGGAG CCTTCGGCTG ACTGGCTGGC CACGGCCGCG GCCCGGGGTC GGGTAGAGGA	120
GGTGCGGGCG CTGCTGGAGG CGGGGGCGCT GCCCAACGCA CCGAATAGTT ACGGTCGGAG	180
GCCGATCCAG GTCATGATGA TGGGCAGCGC CCGAGTGGCG GAGCTGCTGC TGCTCCACGG	240
CGCGGAGCCC AACTGCGCCG ACCCCGCCAC TCTACCCGA CCCGTGCACG ACGCTGCCCCG	300
GGAGGGCTTC CTGGACACGC TGGTGGTGCT GCACCGGGCC GGGGCGCGGC TGGACGTGCG	360
CGATGCCTGG GGCCGTCTGC CCGTGGACCT GGCTGAGGAG CTGGGCCATC GCGATGTCGC	420
ACGGTACCTG CGCGCGGCTG CGGGGGGCAC CAGAGGCAGT AACCATGCCC GCATAGATGC	480
CGCGGAAGGT CCCTCAGACA TCCCCGATTG AAAGAACCAG AGAGGCTCTG AGAAACCTCG	540

GGAAACTTAG ATCATCAGTC ACCGAAGGTC CTACAGGGCC ACAACTGCCC CCGCCACAAC 600
 CCACCCCGCT TTCGTAGTTT TCATTTAGAA AATAGAGCTT TTAAAAATGT CCTGCCTTTT 660
 AACGTAGATA TAAGCCTTCC CCCACTACCG TAAATGTCCA TTTATATCAT TTTTATATA 720
 TTCTTATAAA AATGTAAAAA AGAAAAACAC CGCTTCTGCC TTTTCACTGT GTTGGAGTTT 780
 TCTGGAGTGA GCACTCACGC CCTAAGCGCA CATTATGTG GGCATTTCTT GCGAGCCTCG 840
 CAGCCTCCGG AAGCTGTCGA CTTCATGACA AGCATTTTGT GAACTAGGGA AGCTCAGGGG 900
 GGTACTGGC TTCTCTTGAG TCACACTGCT AGCAAATGGC AGAACCAAAG CTCAAATAAA 960
 AATAAAATAA TTTTCATTCA TTCACTC 987

(2) Údaje k SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 156 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Druh řetězce:

(D) Topologie: lineární

(ii) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
20 25 30

Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
35 40 45

Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu
50 55 60

(2) Údaje k SEQ ID NO: 4

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 21 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Druh řetězce: jednořetězcová
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

CCTGTAGGAC CTTCGGTGAC T

21

(2) Údaje k SEQ ID NO: 5

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 42 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Druh řetězce: jednořetězcová
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

GATCCGGCGG CGGGGAGCAG CATGGAGCCT TCGGCTGACT GG

42

(2) Údaje k SEQ ID NO: 6

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 18 párů bazí
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Druh řetězce: jednořetězcová
- (D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

GCCTCTCTGG TTCTTTCA

18

(2) Údaje k SEQ ID NO: 7

(i) Charakteristika sekvence:

- (A) Délka: 36 párů bazí

05.04.98

67

- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Druh řetězce: jednořetězcová
- (D) Topologie: lineární
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

CGGGCGGGGA GCAGCATGGA GCCGGCGGCG GGGAGC

36

Změněné nároky

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Virová expresivní konstrukce, zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, kde nukleová kyselina je pod transkripční kontrolou uvedeného promotoru.

2. Expresivní konstrukce podle nároku 1, dále zahrnující polyadenylační signál.

3. Expresivní konstrukce podle nároku 1 nebo 2, dále zahrnující selekční marker.

4. Expresivní konstrukce podle libovolného z nároků 1 až 3, kde uvedená nukleová kyselina je cDNA.

5. Expresivní konstrukce podle libovolného z nároků 1 až 3, kde uvedená nukleová kyselina je genomová DNA.

6. Expresivní konstrukce podle libovolného z nároků 1 až 3, kde uvedená nukleová kyselina je hybrid cDNA a genomové DNA.

7. Expresivní konstrukce podle libovolného z předcházejících nároků, kterou je replikačně deficitní adenovirus.

8. Expresivní konstrukce podle nároku 7, kde uvedenému adenoviru chybí alespoň část oblasti E1.

9. Expresivní konstrukce podle libovolného z předcházejících nároků, kde uvedená nukleová kyselina je umístěna v sense orientaci vzhledem k uvedenému promotoru.

10. Expresivní konstrukce podle libovolného z nároků 1 až 9, kde uvedená nukleová kyselina je umístěna v antisense orientaci vzhledem k uvedenému promotoru.

11. Farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

(i) virovou expresivní konstrukci, zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, tato nukleová kyselina je pod transkripční kontrolou uvedeného promotoru a

(ii) farmaceuticky přijatelný pufr, rozpouštědlo nebo ředidlo.

12. Způsob obnovení funkce p16 v buňce, které chybí funkce p16, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(i) se použije virová expresivní konstrukce zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, přičemž tato nukleová kyselina je pod kontrolou uvedeného promotoru a je umístěna vůči tomuto promotoru v sense orientaci; a

(ii) tato virová expresivní konstrukce se uvede do kontaktu s uvedenou buňkou, které chybí funkce p16.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená buňka je transformovaná buňka a uvedený kontakt obrací transformovaný fenotyp.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená buňka je nádorová buňka.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená nádorová buňka je plicní rakovinová buňka, rakovinová buňka močového měchýře nebo buňka melanomu.

16. Způsob podle libovolného z nároků 12 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená virová expresivní konstrukce je replikačně deficitní adenovirus.

17. Způsob inhibice funkce p16 v buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(i) se použije virová expresivní konstrukce zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, přičemž tato nukleová kyselina je pod kontrolou uvedeného promotoru a je umístěna vůči tomuto promotoru v antisense orientaci; a

(ii) tato expresivní konstrukce se uvede do kontaktu s uvedenou buňkou.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená buňka je uvedeným kontaktem transformována.

19. Způsob podle nároku 17 nebo 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e virová expresivní konstrukce je replikačně deficitní adenovirus.

20. Způsob léčby savce s rakovinou, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(i) se použije farmaceutická kompozice zahrnující

(a) adenovirus zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, přičemž tato nukleová kyselina je pod kontrolou

uvedeného promotoru a je umístěna vůči tomuto promotoru v sense orientaci; a

(b) farmaceuticky přijatelný pufr, rozpouštědlo nebo ředidlo; a

(ii) tato farmaceutická kompozice se aplikuje uvedenému savci.

21. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený savec je člověk.

22. Způsob podle nároku 20 nebo 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená aplikace se uskuteční intravenozní injekcí.

23. Způsob podle nároku 20 nebo 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zmíněná aplikace se uskuteční orthotopickou injekcí.

24. Způsob podle libovolného z nároků 20 až 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e rakovina je rakovina plic, rakovina močového měchýře nebo melanom.

25. Souprava, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e ve vhodném kontejneru zahrnuje virovou expresivní konstrukci, zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, kde uvedená nukleová kyselina je pod transkripční kontrolou uvedeného promotoru, a farmaceuticky přijatelný pufr, rozpouštědlo nebo ředidlo.

26. Způsob detekce rakovinových buněk ve vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se detekuje nukleová kyselina kódující funkčné p16.

27. Způsob detekce rakovinových buněk ve vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se detekuje funkční p16.

28. Způsob obnovení funkce p16 *in vitro* nebo *ex vivo* v buňce, které chybí funkce p16, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(i) se použije virová expresivní konstrukce zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, přičemž tato nukleová kyselina je pod kontrolou uvedeného promotoru a je umístěna vůči tomuto promotoru v sense orientaci; a

(ii) tato expresivní konstrukce se uvede do kontaktu s uvedenou buňkou, které chybí funkce p16.

29. Expresivní konstrukce podle nároku 1 pro použití při obnovení funkce p16 v buňce, které chybí funkce p16, kde konstrukce je umístěna vůči tomuto promotoru v sense orientaci; a uvede se do kontaktu s uvedenou buňkou, které chybí funkce p16.

30. Způsob nebo konstrukce podle nároku 28 nebo 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená buňka je transformovaná buňka a zmíněný kontakt obrací transformovaný fenotyp.

31. Způsob nebo konstrukce podle libovolného z nároků 28 až 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená buňka je nádorová buňka.

32. Způsob nebo konstrukce podle libovolného z nároků 28 až 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená

nádorová buňka je buňka rakoviny plic, rakoviny močového měchýře nebo melanomu.

33. Způsob nebo konstrukce podle libovolného z nároků 28 až 32, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená virová expresivní konstrukce je replikačně deficitní adenovirus.

34. Způsob inhibice in vitro nebo ex vivo funkce p16 v buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(i) se použije virová expresivní konstrukce zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční p16, přičemž tato nukleová kyselina je pod kontrolou uvedeného promotoru a je umístěna vůči tomuto promotoru v antisense orientaci; a

(ii) tato expresivní konstrukce se uvede do kontaktu s uvedenou buňkou.

35. Virová expresivní konstrukce podle nároku 1 pro použití při inhibici funkce p16 v buňce, kde konstrukt je umístěn vůči promotoru v antisense orientaci a uvede se do kontaktu s uvedenou buňkou.

36. Způsob nebo konstrukce podle nároku 34 nebo 35, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená buňka je uvedeným kontaktem transformována.

37. Způsob nebo konstrukce podle libovolného z nároků 34 až 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená virová expresivní konstrukce je replikačně deficitní adenovirus.

38. Farmaceutická kompozice, zahrnující

(a) adenovirus zahrnující promotor funkční v eukaryontních buňkách a nukleovou kyselinu kódující funkční

p16, přičemž tato nukleová kyselina je pod kontrolou uvedeného promotoru a je umístěna vůči tomuto promotoru v sense orientaci; a

(b) farmaceuticky přijatelný pufr, rozpouštědlo nebo ředidlo,
pro použití při léčbě savce s rakovinou.

39. Farmaceutická kompozice podle nároku 38, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený savec je člověk.

40. Farmaceutická kompozice podle nároku 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se aplikuje intravenozní injekcí.

41. Farmaceutická kompozice podle nároku 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se aplikuje orthotopickou injekcí.

42. Farmaceutická kompozice podle libovolného z nároků 38 až 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená rakovina je rakovina plic, rakovina močového měchýře nebo melanom.

43. Způsob detekce *in vitro* nebo *ex vivo* rakovinových buněk ve vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se stanoví nukleová kyselina kódující funkční p16.

44. Způsob detekce *in vitro* nebo *ex vivo* rakovinových buněk ve vzorku, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se stanoví funkční p16.

45. Způsob inhibice proliferace nádorových buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným buňkám se aplikuje

(i) virová expresivní konstrukce, zahrnující nukleovou kyselinu kódující funkční polypeptid p16 a promotor aktivní v eukaryontních buňkách, přičemž tento promotor je operativně spojen s oblastí kódující p16; a

(ii) činidlo, poškozující DNA; přičemž uvedená konstrukce a uvedené činidlo poškozující DNA se aplikují v množství, účinném při inhibici proliferace uvedených nádorových buněk.

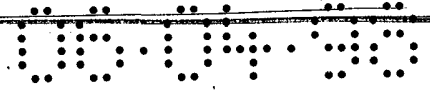
46. Způsob podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené činidlo poškozující DNA je chemické činidlo.

47. Způsob podle nároku 46, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené chemické činidlo je vybráno ze skupiny zahrnující adriamycin, 5-fluorouracil, cisplatinu, etoposid, doxorubicin, verapamil, podofyllotoxin, kamptothecin, aktinomycin D a mitomycin C.

48. Způsob podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e činidlo poškozující DNA je záření.

49. Způsob podle nároku 48, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e záření je vybráno ze skupiny zahrnující záření γ , rentgenové záření, mikrovlnné záření a uv-záření.

50. Způsob podle nároku 45, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e virový vektor je adenovirový vektor, retrovirový vektor, adeno-asociovaný virový vektor, virový vektor vakcinie nebo herpesvirový vektor.



21048

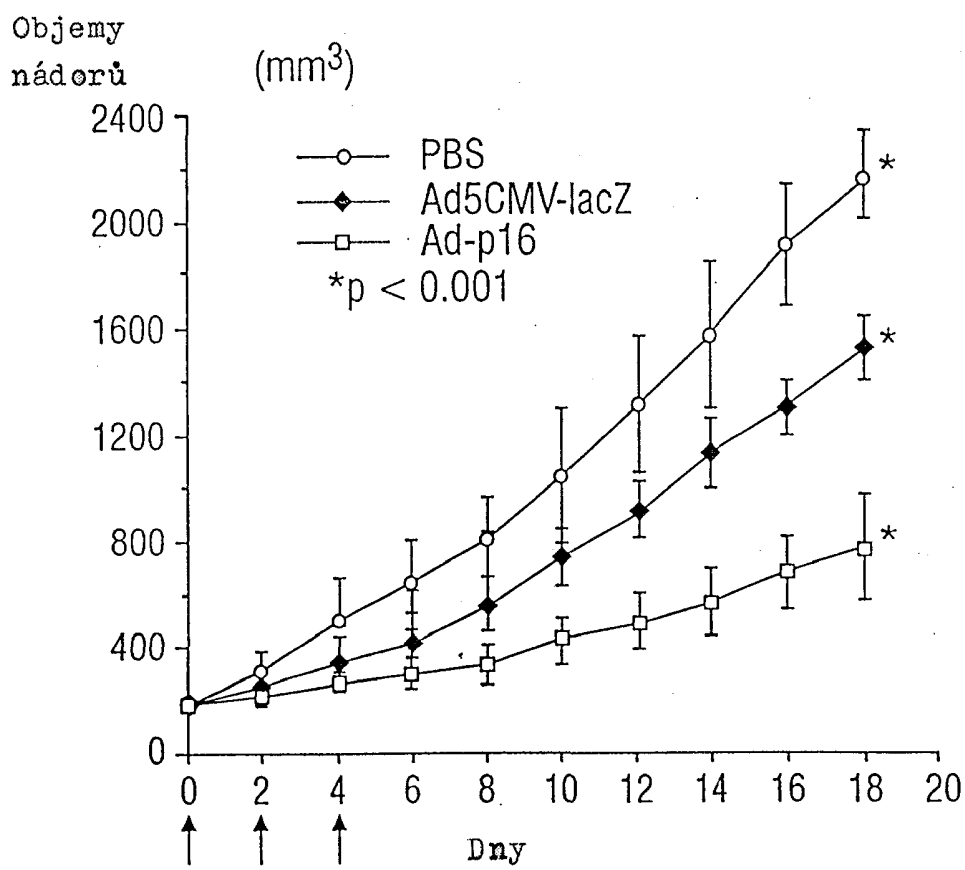
1 cggagagggg gagaacagac aacggggcggc ggggagcagc atggagccgg cggcgggggag
 61 cagcatggag ccttcggctg actggctggc cacggccggc gcccggggtc gggtagagga
 121 ggtgcgggag ctgctggagg cggggggcgct gcccaacgca ccgaatagtt acggtcggag
 181 gccgatccag gtcattgatga tgggcagcgc ccgagtggcg gagtgtgtgc tgtccacgg
 241 ccggagccc aactgcgcg aaccgccac tctacccga cccgtgcacg acgctgccc
 301 ggagggttc ctggacacgc tgggtgtgtc gcaccgggccc gggcgcgccg tggacgtgcg
 361 ccatgcctgg ggcgtctgc ccgtggacct ggctgaggag ctgggccatc gcgatgtcgc
 421 acggtacctg cgcgcggctg ccctcagaca tcccgatcg aaagaaccag agaggctctg agaaaccctc
 481 cgcggaaggt atcatcagtc accgaaggct ctacagggccc acaactgccc ccgccacaac
 541 ggaacttag ttcgtagttt taagccttcc ccactaccc agaaatgtt ttaataatata
 601 ccaccccgct aatgtataaa aatgtataaa agaaaaaacac cgcttctgccc ttttataata
 661 aacgtagata gcactcacgc cctaagcgc cattcatgtg ggcatttctt gcgagccctc
 721 tctttataaa aagctgtcga cttcatgtg agcatttctt gaactaggga agctcagggg
 781 tctggagtga ttctcttgag tcacactgct agcaaatggc agaaccctaaag ctcaaatata
 841 cagcctccgg
 901 ggttactggc
 961 aataaaataa ttttcattca ttcactc

Obrázek č. 1A

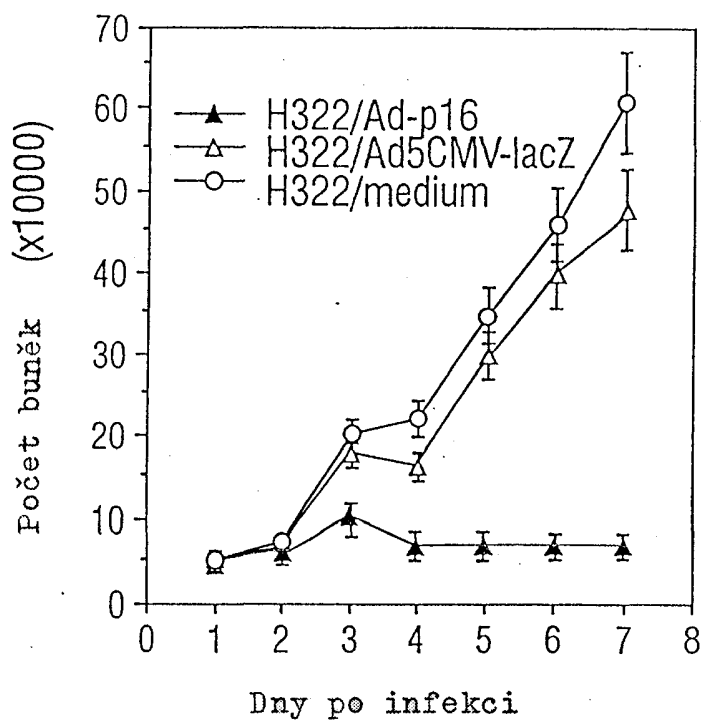
1 MEPAAGSSME PSADWLATAA ARGRVEEVRA LLEAGALPNA PNSYGRRPIQ 50
51 VMMGSSARVA ELLLLHGAEP NCADPATLTR PVHDAAREGF LDTLVVLIHRA 100
101 GARLDVRDAW GRLPVDLAE E LGHRDVARYL RAAAGGTRGS NHARIDAAEG 150
151 PSDIPD 156

Obrázek č. 1B

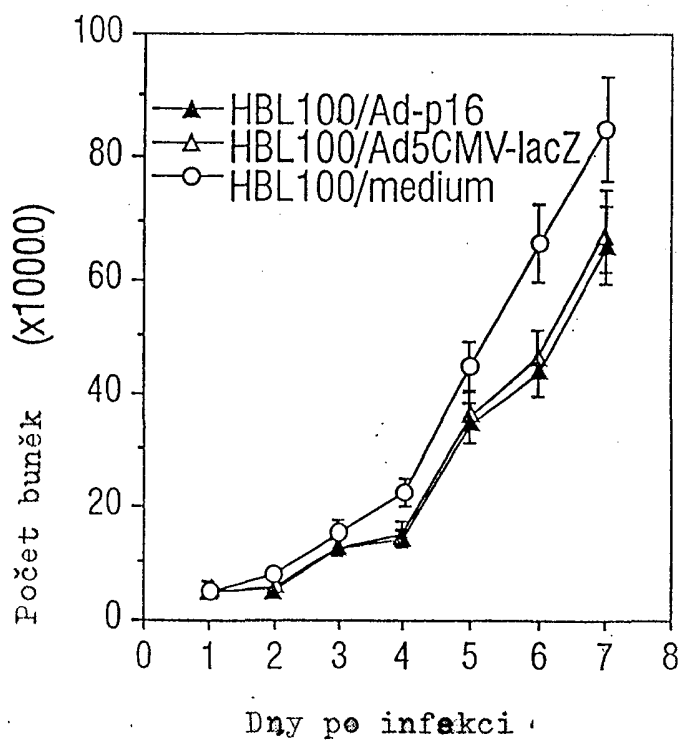
05.04.80



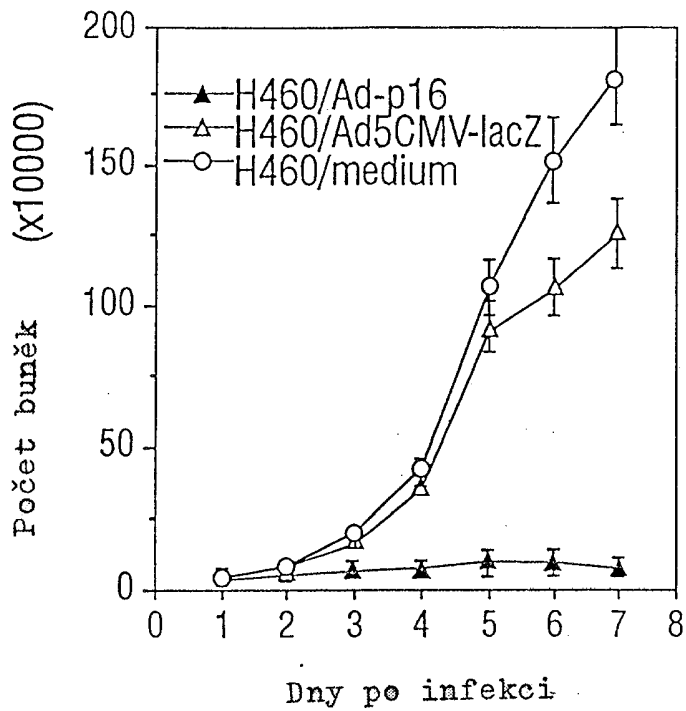
Obrázek č. 2



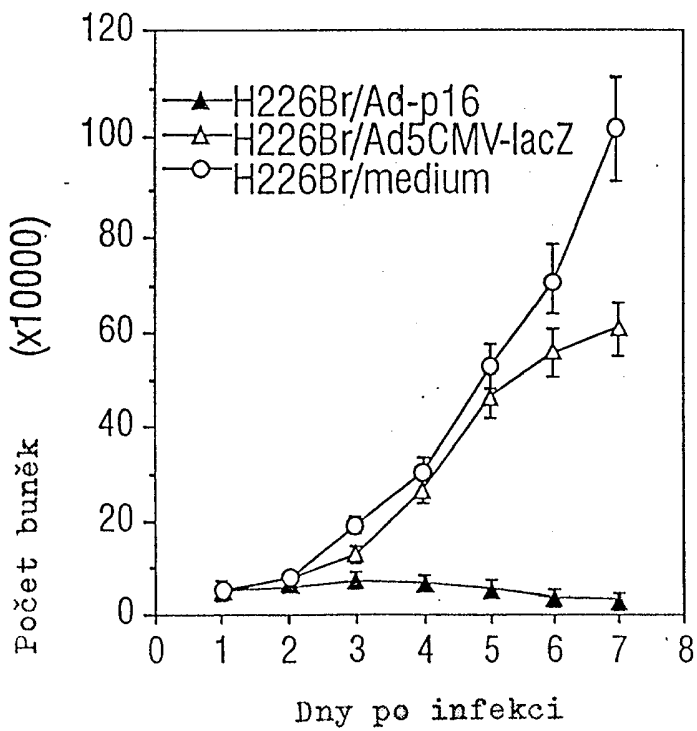
Obrázek č. 3A



Obrázek č. 3B



Obrázek č. 3C



Obrázek č. 3D