

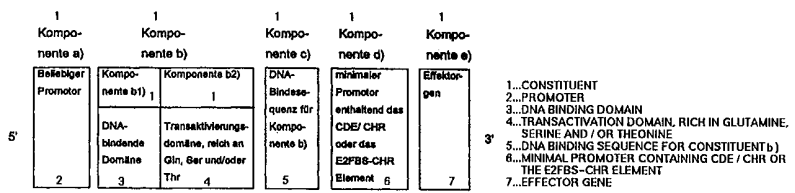


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : C12N 15/85, 15/63, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/04178</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Januar 2000 (27.01.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04527 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Juli 1999 (01.07.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 31 420.5 14. Juli 1998 (14.07.98) DE  (71) Anmelder: HOECHST MARION ROUSSEL DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).  (72) Erfinder: MÜLLER, Rolf; Poitiersstrasse 8, D-35037 Marburg (DE). NETTELBECK, Dirk; Steinweg 41, D-35037 Marburg (DE). SEDLACEK, Hans-Harald; Sonnenhang 3, D-35041 Marburg (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>

(54) Title: EXPRESSION SYSTEM CONTAINING CHIMERIC PROMOTERS WITH BINDING SITES FOR RECOMBINANT TRANSCRIPTION FACTORS

(54) Bezeichnung: EXPRESSIONSSYSTEME ENTHALTEND CHIMÄRE PROMOTOREN MIT BINDUNGSSTELLEN FÜR REKOMBINANTE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN



(57) Abstract

The present invention relates to a nucleic acid construct characterized in that it contains the following constituents: constituent a): at least one promoter, b): DNA coding for at least one recombinant transactivator, whereby the transcription thereof is a) activated and contains constituent b1): DNA coding for a DNA binding domain, constituent b2): DNA coding for a transactivation domain that is rich in glutamine, serine and threonine, constituent c): at least one DNA sequence for binding an expression product of constituent b), constituent d): at least one minimal promoter containing the CDE-CHR element or the E2F-BS-CHR element and bound with its 5'-end to the 3'-end of constituent c), constituent e): at least one effector gene, whereby the transcription thereof is activated by binding the expression product of constituent b) to constituent c). The invention also relates to the production and use of said nucleic acid construct, vectors containing the nucleic acid construct, cells containing said vectors and to the use of the nucleic acid construct in the production of a medicament.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Nukleinsäurekonstrukt, dadurch charakterisiert, daß es folgende Komponenten enthält: Komponente a): mindestens einen Promotor; Komponente b): DNA kodierend für mindestens einen rekombinanten Transaktivator, dessen Transkription durch die Komponente a) aktiviert wird und der enthält: Komponente b1): DNA, kodierend für eine DNA-bindende Domäne; Komponente b2): DNA, kodierend für eine Transaktivierungsdomäne, welche reich ist an Glutamin, Serin und Threonin; Komponente c): mindestens eine DNA-Sequenz zur Bindung des Expressionsproduktes von Komponente b); Komponente d): mindestens einen minimalen Promotor, der das CDE-CHR-Element oder das E2F-BS-CHR-Element enthält und mit seinem 5'-Ende an das 3'-Ende von Komponente c) gebunden ist; Komponente e): mindestens ein Effektorgen, dessen Transkription durch Bindung des Expressionsproduktes von Komponente b) an die Komponente c) aktiviert wird; seine Herstellung und Verwendung; Vektoren enthaltend das Nukleinsäurekonstrukt; Zellen enthaltend diese Vektoren und die Verwendung des Nukleinsäurekonstrukts zur Herstellung eines Heilmittels.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Beschreibung

Expressionssysteme enthaltend chimäre Promotoren mit Bindungsstellen für rekombinante Transkriptionsfaktoren

5

### A) Einleitung

Die Transkription eines Genes wird durch Aktivierungssequenzen (Promotoren und Enhancer) gesteuert. Derartige Aktivierungssequenzen stellen Nukleotidsequenzen dar, an welche Transkriptionsfaktoren binden, die hierdurch die Transkription des zugehörigen Genes in die Wege leiten.

10

Zahlreiche Aktivierungssequenzen sind als Promotoren oder Enhancersequenzen mittlerweile bekannt.

15

Entsprechend ihrer Funktion oder Herkunft werden sie eingeordnet in universal, d.h. in jeder Zelle wirkende Aktivierungssequenzen, in Aktivierungssequenzen viraler Herkunft und in eingeschränkt wirkende Aktivierungssequenzen.

Die Einschränkung kann z.B. zellspezifisch, metabolisch (z.B. unter hypoxischen Bedingungen) oder zellzyklusspezifisch sein.

20

Diese Einschränkungen in der Funktion der Aktivierungssequenzen werden genutzt bei der gezielten Expression eines Strukturgenes, z.B. im Rahmen der Gentherapie.

25

So ist es eine gängige Technologie, die Expression eines Strukturgenes unter die Kontrolle eines zellspezifischen Promotors zu stellen (Sikora, Trends Biotech. 11, 197 (1993)).

Die durch einen zellspezifischen Promotor eingeschränkte Aktivierung der Transkription eines Effektorgenes ist jedoch in vielen Fällen nicht ausreichend, teils weil die Aktivierung des zellspezifischen Promotors nicht genügend zellspezifisch

30

ist, teils weil die Expression des Effektorgenes nur in solchen Zellen des ausgewählten Zelltyps gewünscht wird, die einen bestimmten Funktionszustand aufweisen. Ein derartiger Funktionszustand kann beispielsweise die Zellzyklusphase der Zelle sein.

5

Für eine weitergehende Regulation der Expression eines Effektorgenes ist es somit wünschenswert, mehrere Promotoren unterschiedlicher Spezifität für die Kontrolle der Expression eines Strukturgenes einzusetzen.

10 Für die Kombination eines Promotors einer beliebigen Spezifität mit einem zellzyklusspezifischen Promotor wurde die chimäre Promotortechnologie entwickelt (Patentanmeldungen z.B. PCT/GB95/02000, EP-A 0 790 313). Sie besteht in einer Verknüpfung eines stromaufwärts gelegenen Promotors beliebiger Spezifität mit dem stromabwärts gelegenen CDE-CHR Element oder dem E2FBS-CHR Element.

15

Die Zellteilung wird unterteilt in die aufeinanderfolgenden Phasen G<sub>0</sub> oder G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M. Die S-Phase ist die DNA Synthese-Phase, ihr folgt die Übergangsphase G<sub>2</sub> (G<sub>2</sub>-Phase), an die sich die Mitose-Phase (M-Phase) anschließt, in welcher sich eine Mutterzelle in zwei Tochterzellen teilt. Zwischen der M-Phase und der S-Phase  
20 liegt die Ruhephase G<sub>0</sub> (G<sub>0</sub>-Phase) oder die Übergangsphase G<sub>1</sub> (G<sub>1</sub>-Phase).

Die Zellteilung wird vorangetrieben durch die Gruppe von Proteinkinasen, den Cyclin/cdk-Komplexen. Diese bestehen aus einer katalytischen Untereinheit [cyclin dependent kinase (cdk, zum Beispiel cdk-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 oder -8) und einer  
25 regulativen Untereinheit, dem Cyclin (zum Beispiel Cyclin A, -B1-B3, -D1-D3, -E, -H oder -C)].

In jeder Phase des Zellzyklus sind unterschiedliche cdk-Komplexe besonders aktiv, so in der

30

mittleren G<sub>1</sub>-Phase

cdk4/Cyclin D1-3 und

	späten G1-Phase	cdk6/Cyclin D1-3
	S-Phase	cdk2/Cyclin E cdk2/Cyclin A
5	G2/M-Übergangsphase	cdk1/Cyclin B1-3 und cdk1/Cyclin A

Die Aktivität der Cyclin/cdk-Komplexe besteht in der Phosphorylierung und damit Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen, die an der Kontrolle der DNA-  
10 Synthese und der Mitose direkt oder indirekt beteiligt sind.

Korrespondierend mit ihrer Funktion im Zellzyklus werden die Gene für einige Cycline und cdk's periodisch transkribiert und/oder periodisch aktiviert oder inhibiert, so durch den regulierten Abbau von Cyclinen, durch  
15 zellzyklusphasenspezifische Bindung von Inhibitoren (z.B. p16INK4A, p15INK4B, p21Cip1, p27Kip1, p18INK4C, p19INK4D, p57) oder durch Modifizierung durch aktivierende (z.B. durch die cdc25-Phosphatasen, wie cdc25A, cdc25B und cdc25C oder cdk7/Cyclin H) oder inhibierende (z.B. wee1 kinase) Enzyme (Übersicht bei Zwicker und Müller, Progr. Cell Cycle Res. 91 (1995); La Thangue, Curr Opin. Cell  
20 Biol. 443 (1994); MacLachlan et al., Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr. 127 (1995)).

Die periodische Expression von cdc25C in der G2-Phase des Zellzyklus wird im wesentlichen geregelt durch ein Element (CDE-CHR) in der Promotorregion des Genes für cdc25C. Dieses CDE-CHR-Element ist in der G0-/G1-Phase von einem reprimierenden Protein besetzt und in der G2-Phase frei. Die Nukleotidsequenz  
25 dieses Promotorelements konnte identifiziert und gleichermaßen auch in den Promotoren der Gene für Cyclin A und cdk-1 gefunden werden, während im Promotor für B-myb eine zum Teil unterschiedliche Nukleotidsequenz (E2FBS-CHR) nachgewiesen wurde. Die Untersuchung der zellzyklusabhängigen Funktionsweise  
30 dieser Promotorelemente zeigte, daß ihre Blockade in der G0-/G1-Phase gefolgt wird von einer Hochregulierung der Transkription des jeweiligen Genes, welches

beim B-myb Gen besonders früh (in der mittleren G1-Phase), beim Cyclin A in der G1/S-Übergangsphase, beim cdk-1 Gen in der S-Phase und beim cdc25C Gen erst in der späten S-Phase stattfindet (Zwicker und Müller, Progr. Cell Cycle Res. 91 (1995); Lucibello et al., EMBO J. 132 (1995); Liu et al., Nucl. Acids Res. 2905 (1995); Zwicker et al., Nucl. Acids Res. 3822 (1995); EMBO J. 4514 (1995)).

Überraschenderweise wurde des weiteren gefunden, daß das Element CDE-CHR (des Promotors für das Cyclin 25C, Cyclin A und cdk-1 Gen) wie auch das Element E2FBS-CHR (des Promotors für das B-myb Gen) nicht nur die Aktivierung und Transkription der homologen Gene in der G0-/G1-Phase inhibieren kann, sondern auch die Aktivierung und Transkription anderer Gene. Diese Erfindung führte zu den Patentanmeldungen PCT/GB95/02000, EP-A 0 777 739, EP-A 0 777 740, EP-A 0 804 601, EP-A 0 807 183, EP-A 0 790 313 und EP-A 0 860 445.

In diesen Patentanmeldungen wird offenbart, einen zellzyklusabhängigen Promotor zu kombinieren mit einem unspezifischen, zellspezifischen, virusspezifischen oder metabolisch aktivierbaren Promotor zur regulierten Aktivierung der Transkription eines Effektorgenes, welches ein Protein kodiert für die Prophylaxe und/oder Therapie einer Erkrankung. Derartige Erkrankungen können beispielsweise Tumorerkrankungen, Leukämien, Autoimmunerkrankungen, Arthritiden, Allergien, Entzündungen, Abstoßungen von transplantierte Organen, Erkrankungen des Blutkreislaufsystems, des Blutgerinnungssystems, Infektionen oder Schäden des zentralen Nervensystems sein.

Für die Kombination von unterschiedlichen Promotoren mit einem zellzyklusspezifischen Promotorelement wurde der sogenannte chimäre Promotor entwickelt. In diesem chimären Promotor wird die Aktivität einer unspezifischen, zellspezifischen, virusspezifischen oder metabolisch aktivierbaren Aktivierungssequenz (bzw. Promotorsequenz) durch das sich stromabwärts unmittelbar anschließende Promotorelement CDE-CHR oder E2FBS-CHR weitgehend auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt.

Weiterführende Untersuchungen zur Funktionsweise, insbesondere des Promotorelementes CDE-CHR, ergaben, daß die durch das CDE-CHR Element zellzyklusabhängige Regulation einer stromaufwärts gelegenen Aktivatorsequenz weitgehend davon abhängig ist, daß die Aktivierungssequenz von

- 5 Transkriptionsfaktoren mit glutaminreichen Aktivierungsdomänen aktiviert wird (Zwicker et al., Nucl. Acids. Res. 3822 (1995)).

Zu derartigen Transkriptionsfaktoren gehört beispielsweise Oct-2, Sp1 und NF-Y.

- 10 Dieses schränkt konsequenterweise die Verwendung des Promotorelementes CDE-CHR für chimäre Promotoren ein. Gleiches ist für das Promotorelement E2F-BS-CHB des B-myb Genes anzunehmen (Zwicker et al., Nucl. Acids Res. 23, 3822 (1995)).
- 15 Es besteht somit ein dringliches Bedürfnis nach einem Expressionssystem, in welchem ein beliebiger Promotor mit einem zellzyklusspezifischen Promotor kombiniert werden kann.

#### B) Allgemeine Beschreibung der Erfindung

20

Gegenstand der Erfindung ist nunmehr ein Nukleinsäurekonstrukt, in welchem ein beliebiger Promotor mit dem CDE-CHR Element oder dem E2FBS-CHR Element zu einem funktionsfähigen chimären Promotor verknüpft werden kann und der folgende Komponenten enthält:

25

##### Komponente a)

mindestens ein Promotor

##### Komponente b)

30

DNA kodierend für mindestens einen rekombinanten Transaktivator, dessen Expression durch die Komponente a) aktiviert wird und der enthält

b1) DNA, kodierend für eine DNA bindende Domäne

b2) DNA, kodierend für eine Transaktivierungsdomäne, welche reich ist an Glutamin, Serin und Threonin.

5 Komponente c)

mindestens eine DNA Sequenz zur Bindung des Expressionsproduktes von Komponente b)

Komponente d)

10 mindestens ein minimaler Promotor, der das CDE-CHR Element oder das E2F-BS-CHR Element enthält und mit seinem 5' Ende an das 3' Ende der Komponente c) gebunden ist

Komponente e)

15 mindestens ein Effektorgen, dessen Transkription durch Bindung des Expressionsproduktes der Komponente b) an die Komponente c) aktiviert wird.

Die Anordnung der einzelnen Komponenten ist beispielhaft in Figur 1 dargestellt.

20 Der minimale Promoter aus Komponente d) enthält mindestens ein transkriptionsaktivierendes Element.

Die Funktionsweise des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes ist dergestalt, daß die Aktivierung des zellspezifischen, metabolisch aktivierbaren,

virusspezifischen, zellzyklusspezifischen oder universell aktivierbaren Promotors

25 [Komponente a)] zu einer Transkription des Genes [Komponente b)] für den

rekombinanten Transkriptionsaktivator führt, welcher wiederum an seine DNA-

Bindesequenz [Komponente c)] bindet, hierdurch den minimalen CDE-CHR

enthaltenden Promotor [Komponente d)] aktiviert und dadurch die Transkription des

Effektorgenes [Komponente e)] in die Wege geleitet wird.

30

In der G0/G1-Phase des Zellzyklus ist das CDE-CHR Element der Komponenten d) durch Bindung des sogenannten CDF Proteins blockiert und damit die Aktivierung der Transkription der Komponente e) inhibiert.

- 5 Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt kann in verschiedener Form erweitert werden:
- Es können mehrere gleiche oder unterschiedliche Effektorgene [Komponenten e, e', e''] in das Nukleinsäurekonstrukt eingeführt werden, wobei diese Effektorgene  
10 entweder mit jeweils einer IRES-Sequenz miteinander verbunden oder aber jedem Effektorgen die Komponenten c) und d) stromaufwärts angefügt werden.
  - Der Komponente a) kann die Komponente c) stromaufwärts angefügt werden, so daß der rekombinante Transaktivator, exprimiert von Komponente b), auch eine  
15 Verstärkung der Aktivierung der Komponente a) im Sinne eines selbst verstärkenden Promotors bewirkt.

Derartige Expressionssysteme sind beispielsweise in Figur 2/I dargestellt.

- 20 Derartige selbstverstärkende Promotoren wurden bereits in der Patentanmeldung EP-A 0 848 061 im Detail beschrieben.

In einer besonderen Ausführungsform dieser Erfindung kann das selbstverstärkende Promotorsystem auch dem erfindungsgemäßen  
25 Expressionssystem angefügt werden, wie beispielsweise in Figur 2/II dargestellt.

- Die Komponente b) kann durch Einführung einer Komponente b3), die ein Protein A exprimiert, welches an eine Kupplungssubstanz [Komponente f)] bindet und durch Einfügung einer Komponente b4), die ein Protein B exprimiert, welches  
30 ebenso an die Kupplungssubstanz f) bindet, zu einem durch die Kupplungssubstanz f), d.h. pharmakologisch kontrollierbaren rekombinanten Transaktivator [Komponente b')], erweitert werden.

Eine derartige Erweiterung ist beispielsweise in Figur 3 dargestellt.

Durch Einfügung eines derartigen Transaktivators ist das erfindungsgemäße Expressionssystem pharmakologisch kontrollierbar. Derartige

5 Expressionssysteme wurden bereits im Detail in der Patentanmeldung EP-A 0 848 061 beschrieben.

– Durch Kombination der Komponente b) und/oder der Komponente f) mit der Progesteronrezeptorligand-Bindedomäne (Wang et al., Gene Therapy 4, 432  
10 (1997)) entsteht ein weiteres, durch Progesteron induzierbares Expressionssystem.

– Das Expressionssystem kann durch Einfügung der Nukleinsäuresequenz für ein Bindeprotein [Komponente b5)] für ein zelluläres Regulatorprotein zwischen oder  
15 an die Komponenten b1) und b2) [Komponente b" bestehend aus Komponente b1), b2) und b5)] eine zusätzliche Steuerung erfahren. Diese ist dadurch bedingt, daß in der normalen Zelle das Regulatorprotein an das Bindeprotein haftet und hierdurch die Funktion des von der Komponente b") exprimierten rekombinanten Transaktivators, nämlich seine Bindung an die Komponente c), blockiert. In  
20 Zellen, in denen das zelluläre Regulatorprotein mutiert ist und hierdurch nicht an das Bindeprotein haften kann oder in denen das Regulatorprotein vermindert ist, fehlt oder an mit der Komponente b5) konkurrierenden zellulären, viralen, bakteriellen oder parasitären Bindeproteinen gebunden ist, ist der rekombinante Transaktivator [Komponente b")]  
25 binden.

Die Komponente b") ist beispielhaft in Figur 4 dargestellt.

– Durch Einfügung eines nuklearen Lokalisationssignales in die Komponente b), b')  
30 oder b") kann die Funktionsfähigkeit des erfindungsgemäßen Expressionssystems gesteigert werden.

- Durch Kombination von zwei oder mehr der aufgeführten Erweiterungen.

Das Effektorgen [Komponente d)] kodiert für einen pharmakologisch aktiven Wirkstoff, der ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Cytokine,

- 5 Wachstumsfaktoren, Antikörper oder Antikörperfragmente, Rezeptoren für Cytokine oder Wachstumsfaktoren, antiproliferativ, apoptotisch oder zytostatisch wirkende Proteine, Angiogeneseinhibitoren, Gerinnungshemmer, Thrombose-induzierte Substanzen und Gerinnungshemmer, fibrinolytisch wirkende Substanzen, Plasmaproteine, Komplement-aktivierende Proteine, Peptidhormone,
- 10 Virushüllproteine, bakterielle Antigene und parasitäre Antigene, auf den Blutkreislauf wirkende Proteine und Ribozyme.

Bevorzugterweise kodiert das Effektorgen für ein Ribozym, welches die mRNA inaktiviert, welche kodiert für ein Protein ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- 15 Zellzykluskontrollproteine, insbesondere Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D1, Cyclin E, E2F1-5, cdc2, cdc25C oder DP1 oder Virusproteine oder Cytokine oder Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren.

- 20 In einer anderen Ausführungsform kodiert das Effektorgen für ein Enzym, welches eine Vorstufe eines Pharmakons in ein Pharmakon spaltet.

- 25 In einer weiteren Ausführungsform kann das Effektorgen für ein Ligand-Effektorfusionsprotein kodieren, wobei der Ligand ein Antikörper, ein Antikörperfragment, ein Cytokin, ein Wachstumsfaktor, ein Adhäsionsmolekül oder ein Peptidhormon sein kann und der Effektor ein wie oben beschriebener pharmakologisch aktiver Wirkstoff oder ein Enzym. Beispielsweise kann das Strukturgen ein Ligand-Enzymfusionsprotein kodieren, wobei das Enzym eine Vorstufe eines Pharmakons in ein Pharmakon spaltet und der Ligand an eine Zelloberfläche bindet, bevorzugt an Endothelzellen oder Tumorzellen.

- Die Nukleinsäurekonstrukte bestehen bevorzugterweise aus DNS. Unter dem Begriff Nukleinsäurekonstrukte werden künstliche Gebilde aus Nukleinsäure verstanden, die in den Zielzellen transkribiert werden können. Sie sind bevorzugt in einen Vektor eingefügt, wobei Plasmidvektoren oder virale Vektoren besonders
- 5 bevorzugt sind. In einer bevorzugten Ausführungsform werden diese Vektoren Patienten äußerlich oder innerlich, lokal, in eine Körperhöhle, in ein Organ, in den Blutkreislauf, in den Atemweg, in den Magen-Darm-Trakt, in den Urogenitaltrakt oder intramuskulär oder subkutan verabreicht.
- 10 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte kann ein Effektorgen [Komponente e)] sowohl zellspezifisch, virusspezifisch, unter bestimmten metabolischen Bedingungen und/oder zellzyklusspezifisch exprimiert werden, wobei es sich bei dem Effektorgen bevorzugt um ein Gen handelt, das für einen pharmakologisch aktiven Wirkstoff oder aber für ein Enzym kodiert, welches eine
- 15 inaktive Vorstufe eines Pharmakons in ein aktives Pharmakon spaltet. Das Effektorgen kann so gewählt sein, daß der pharmakologisch aktive Wirkstoff oder das Enzym als Fusionsprotein mit einem Liganden exprimiert wird und dieser Ligand an die Oberfläche von Zellen, z.B. proliferierende Endothel- oder Tumorzellen, bindet.
- 20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zellen von Hefen oder Säugern, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt enthalten. In besonders bevorzugter Ausführungsform werden die Nukleinsäurekonstrukte in Zelllinien eingebracht, die dann nach Transfektion zur Expression des Transgens verwendet
- 25 werden können. Diese Zellen können somit zur Bereitstellung eines Heilmittels für Patienten verwendet werden. Eine bevorzugte Verwendung des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes besteht in der Behandlung einer Erkrankung, wobei die Bereitstellung des Heilmittels die Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes in eine Zielzelle und dessen virus- oder zielzellspezifische oder metabolisch spezifische
- 30 oder unspezifische und zellzyklusspezifische Expression umfaßt.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren die Verabreichung von Säugerzellen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt enthalten, zur Herstellung eines Heilmittels zur Behandlung einer Erkrankung. Beispielsweise können Endothelzellen aus dem Blut gewonnen, in vitro mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt transfiziert und dem Patienten beispielsweise intravenös injiziert werden.

Derartige in vitro transfizierte Zellen können auch in Kombination mit einem erfindungsgemäßen Vektor Patienten verabreicht werden. Diese Kombination beinhaltet, daß Zellen und Vektoren jeweils gleichzeitig oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten, an gleichen oder an unterschiedlichen Orten verabreicht oder injiziert werden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte kommen in dieser Form nicht in der Natur vor, d.h. das Effektorgen für den Wirkstoff oder für ein Enzym oder für ein Ligand-Effektor-Fusionsprotein ist nicht natürlicherweise kombiniert mit dem erfindungsgemäßen minimalen Promotor enthaltend ein CDE-CHR Element oder ein E2F-BS-CHR Element und mit einer DNA-Bindesequenz für einen rekombinanten Transaktivator.

20

Die Promotoren und das Effektorgen für den Wirkstoff (oder für das Enzym) der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte werden je nach Verwendungszweck ausgewählt.

25 C) Detaillierte Beschreibung der Komponenten des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes

l) Promotoren [Komponente a)]

30 Im Sinne der Erfindung sind als Promotorsequenzen Nukleotidsequenzen zu verwenden, welche nach Bindung von Transkriptionsfaktoren die Transkription

eines am 3'-Ende benachbart gelegenen Strukturgenes aktivieren. Die Wahl der mit der CDE-CHR oder E2F-BS-CHR enthaltenden Promotorsequenz [Komponente d)] zu kombinierenden Promotorsequenz richtet sich nach der zu behandelnden Erkrankung und der zu transduzierenden Zielzelle. So kann die zusätzliche

5 Promotorsequenz uneingeschränkt, zielzellspezifisch, unter bestimmten metabolischen Bedingungen, zellzyklusspezifisch oder virusspezifisch aktivierbar sein. Zu den auszuwählenden Promotorsequenzen gehören beispielsweise:

a) uneingeschränkt aktivierbare Promotoren und Aktivatorsequenzen, wie

10 beispielsweise

- der Promotor der RNA-Polymerase III
- der Promotor der RNA-Polymerase II
- der CMV-Promotor und -Enhancer
- der SV40-Promotor und -Enhancer

15

b) virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, wie beispielsweise

- HBV
- HCV
- HSV

20

- HPV
- EBV
- HTLV
- HIV

25

Bei Verwendung des HIV-Promotors ist die gesamte LTR-Sequenz einschließlich der TAR-Sequenz [Position < -453 bis > -80, Rosen et al., Cell 41, 813 (1985)] als virusspezifischer Promotor einzusetzen.

c) Metabolisch aktivierbare Promotor- und Enhancersequenzen, wie beispielsweise der durch Hypoxie induzierbare Enhancer (Semenza et al., PNAS 88, 5680

30 (1991); McBurney et al., Nucl. Acids Res. 19, 5755 (1991)) oder durch Strahlung induzierbare Promotoren wie beispielsweise das durch ionisierende Strahlen

induzierbare Element des egr-1 Promotors (Hallahan et al., Nature Med. 1, 786, 1995)).

5 d) Zellzyklusspezifisch aktivierbare Promotoren. Solche sind beispielsweise der Promotor des cdc25C Gens, des Cyclin A Gens, des cdc2 (cdk-1) Gens, des Bmyb Gens, des DHFR-Gens oder des E2F-1 Gens, oder aber Bindesequenzen für während der Zellproliferation auftretende oder aktivierte Transkriptionsfaktoren. Zu diesen Bindesequenzen sind Monomere oder Multimere der als Myc E-Box bezeichneten Nukleotidsequenz [5'-  
10 GGAAGCAGACCACGTGGTCTGCTTCC-3'; SEQ ID NO: 1]; Blackwood und Eisenmann, Science 251, 1211 (1991)] zu zählen.

15 e) Tetrazyklin aktivierbare Promotoren, wie beispielsweise der Tetrazyklin-Operator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor.

f) Zellspezifisch aktivierbare Promotoren  
Hierzu zählen bevorzugt Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine bevorzugt gebildet in ausgewählten Zellen kodieren.

20 Zum Beispiel sind im Sinne der Erfindung in folgenden Zellen Promotoren für folgende Proteine bevorzugt zu verwenden:

f1) Promotor- und Aktivatorsequenzen aktiviert in Endothelzellen

- 25
- Hirn-spezifischer, endothelialer Glucose-1-Transporter
  - Endoglin
  - VEGF-Rezeptor-1 (flt-1)
  - VEGF-Rezeptor-2 (flk-1, KDR)
  - VEGF-Rezeptor-3 (flt-4)

30

  - tie-1 oder tie-2
  - B61-Rezeptor (Eck-Rezeptor)

- B61
  - Endothelin, im speziellen Endothelin B oder Endothelin-1
  - Endothelin-Rezeptoren, insbesondere der Endothelin B-Rezeptor
  - Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren
  - 5 – von Willebrand Faktor
  - PECAM-1
  - ICAM-3
  - IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$
  - IL-1-Rezeptor
  - 10 – Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1)
  - synthetische Aktivatorsequenzen
- Als Alternative zu natürlichen endothelzellspezifischen Promotoren lassen sich auch synthetische Aktivatorsequenzen verwenden, die aus oligomerisierten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die preferentiell oder selektiv in Endothelzellen aktiv sind, bestehen. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor GATA-2, dessen Bindestelle im Endothelin-1 Gen 5'-TTATCT-3' ist [Lee et al., Biol. Chem. 266, 16188 (1991), Dormann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279 (1992) und Wilson et al., Mol. Cell Biol. 10, 4854 (1990)].
- 20
- f2) Promotoren oder Aktivatorsequenzen, aktiviert in Zellen in Nachbarschaft aktivierter Endothelzellen
- VEGF
- Die genregulatorischen Sequenzen für das VEGF-Gen sind die 5' flankierende Region, die 3' flankierende Region, das c-Src-Gen oder das v-Src-Gen
- Steroid-Hormonrezeptoren und deren Promotorelemente (Truss und Beato, Endocr. Rev. 14, 459 (1993)), insbesondere der Maus-Mammatumor-Virus-Promotor
- 30

f3) Promotoren oder Aktivatorsequenzen aktiviert in Muskelzellen, insbesondere glatten Muskelzellen

– Tropomyosin

–  $\alpha$ -Actin

5 –  $\alpha$ -Myosin

– Rezeptor für PDGF

– Rezeptor für FGF

– MRF-4

– Phosphofruktokinase A

10 – Phosphoglyceratmutase

– Troponin C

– Myogenen

– Rezeptoren für Endothelin A

– Desmin

15 – VEGF

Die genregulatorischen Sequenzen für das VEGF-Gen sind bereits im Abschnitt "Promotoren aktiviert in Zellen in Nachbarschaft aktivierter Endothelzellen" aufgeführt worden (s.o.)

– "artifizielle" Promotoren

20 Faktoren der Helix-Loop-Helix (HLH)-Familie (MyoD, Myf-5, Myogenen, MRF4) sind als muskelspezifische Transkriptionsfaktoren beschrieben. Des weiteren gehören zu den muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren das Zinkfingerprotein GATA-4.

25 Die HLH-Proteine sowie GATA-4 zeigen muskelspezifische Transkription nicht nur mit Promotoren von muskelspezifischen Genen, sondern auch im heterologen Kontext, so auch mit artifiziellen Promotoren. Derartige artifizielle Promotoren sind beispielsweise multiple Kopien der (DNA) Bindestelle für muskelspezifische HLH-Proteine wie der E-Box (Myo D) (z.B. 30 4x AGCAGGTGTTGGGAGGC, SEQ ID NO: 2); oder multiple Kopien der DNA Bindestelle für GATA-4 des  $\alpha$ -Myosin-Heavy Chain Gens (z.B. 5'-

GGCCGATGGGCAGATAGAGGGGGCCGATGGGCAGATAGAGG3', SEQ ID  
NO: 3)

f4) Promotoren und Aktivatorsequenzen, aktiviert in Gliazellen

5

Hierzu zählen im besonderen die genregulatorischen Sequenzen bzw.  
Elemente aus Genen, die beispielsweise für folgende Proteine kodieren:

- das Schwannzell-spezifische Protein Periaxin
- Glutaminsynthetase
- 10 – das Gliazell-spezifische Protein (Glial fibrillary acid protein = GFAP)
- das Gliazellprotein S100b
- IL-6 (CNTF)
- 5-HT-Rezeptoren
- TNF $\alpha$
- 15 – IL-10
- Insulin-like Growth Factor Receptor I and II
- VEGF

Die genregulatorischen Sequenzen für das VEGF-Gen sind bereits oben  
aufgeführt worden.

20

f5) Promotoren und Aktivatorsequenzen aktiviert in blutbildenden Zellen

Zu solchen genregulatorischen Sequenzen gehören Promotorsequenzen für  
Gene eines Cytokins oder seines Rezeptors, die in blutbildenden Zellen oder in  
25 benachbarten Zellen, wie beispielsweise dem Stroma, exprimiert sind.

Hierzu gehören Promotorsequenzen für beispielsweise folgende Cytokine und  
ihre Rezeptoren:

- Stem Cell Factor-Receptor
- 30 – Stem Cell Factor
- IL-1 $\alpha$

- IL-1-Rezeptor
  - IL-3
  - IL-3-Rezeptor ( $\alpha$ -subunit)
  - IL-3-Rezeptor ( $\beta$ -subunit)
  - 5 – IL-6
  - IL-6-Rezeptor
  - GM-CSF
  - GM-CSF-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette)
  - Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1)
  - 10 Der Promotor von IRF-1 wird durch IL-6 gleichermaßen aktiviert wie durch IFN $\gamma$  oder IFN $\beta$
  - Erythropoietin
  - Erythropoietin-Rezeptor.
- 15 f6) Promotoren und Aktivatorsequenzen aktiviert in Lymphozyten und/oder Makrophagen
- Hierzu gehören beispielsweise die Promotor- und Aktivatorsequenzen der Gene für Cytokine, Cytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für
- 20 das Fc-Fragment von Antikörpern.
- Hierzu gehören beispielsweise:
- IL-1-Rezeptor
  - IL-1 $\alpha$
  - 25 – IL-1 $\beta$
  - IL-2
  - IL-2-Rezeptor
  - IL-3
  - IL-3-Rezeptor ( $\alpha$ -subunit)
  - 30 – IL-3-Rezeptor ( $\beta$ -subunit)
  - IL-4

- IL-4-Rezeptor
- IL-5
- IL-6
- IL-6-Rezeptor
- 5 – Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1)  
(Der Promotor von IRF-1 wird durch IL-6 gleichermaßen aktiviert wie durch IFN $\gamma$  oder IFN $\beta$ ).
- IFN $\gamma$  Responsive Promotor
- IL-7
- 10 – IL-8
- IL-10
- IL-11
- IFN $\gamma$
- GM-CSF
- 15 – GM-CSF-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette)
- IL-13
- LIF
- Makrophagen-Colony Stimulating Factor (M-CSF)-Rezeptor
- Typ I und II Makrophagen Scavenger Rezeptoren
- 20 – MAC-1 (Leukozytenfunktionsantigen)
- LFA-1 $\alpha$  (Leukozytenfunktionsantigen)
- p150,95 (Leukozytenfunktionsantigen)
- 

f7) Promotor- und Aktivatorsequenzen aktiviert in Synovialzellen

25

Hierzu gehören die Promotorsequenzen für Matrix-Metalloproteinasen (MMP), beispielsweise für:

- MMP-1 (interstitielle Kollagenase)
- MMP-3 (Stromelysin/Transin)

30

Hierzu gehören des weiteren die Promotorsequenzen für Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP), beispielsweise

- TIMP-1
- TIMP-2
- 5 – TIMP-3

f8) Promotoren und Aktivatorsequenzen aktiviert in Leukämiezellen

Hierzu gehören beispielsweise Promotoren für

- 10 – c-myc
- HSP-70
- bcl-1/cyclin D-1
- bcl-2
- IL-6
- 15 – IL-10
- TNF $\alpha$ , TNF $\beta$
- HOX-11
- BCR-Abl
- E2A-PBX-1
- 20 – PML-RARA (Promyelocytic Leukemia - Retinoic Acid Receptor)
- c-myc
- c-myc-Proteine binden an und aktivieren Multimere der als Myc E-Box bezeichneten Nukleotidsequenz (5'-GGAAGCAGACCAGCTGGTCTGCTTCC-3', SEQ ID NO: 1)

25

f9) Promotoren oder Aktivatorsequenzen aktiviert in Tumorzellen

Als Promotor- oder Aktivatorsequenz ist eine genregulatorische Nukleotidsequenz vorgesehen, mit der Transkriptionsfaktoren, gebildet oder  
30 aktiv in Tumorzellen, interagieren.

Im Sinne dieser Erfindung zählen zu den bevorzugten Promotoren oder Aktivatorsequenzen genregulatorische Sequenzen bzw. Elemente aus Genen, die besonders in Krebszellen oder Sarkomzellen gebildete Proteine kodieren. So wird bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen bevorzugt der Promotor des N-CAM-Proteins, bei Ovarialkarzinomen der Promotor des "Hepatitis growth factor"-Rezeptors oder des L-Plastin und bei Pankreaskarzinomen der Promotor des L-Plastins oder des polymorphen epithelialen Mucins (PEM) verwendet.

II) Der rekombinante Transaktivator [Komponente b)]

Der rekombinante Transaktivator besteht im einfachsten Falle aus einer DNA-bindenden Domäne [Komponente b1) und einer Transaktivierungsdomäne, reich an Glutamin, Ser und/oder Thr [Komponente b2)].

Im Falle eines pharmakologisch kontrollierbaren rekombinanten Transaktivators [Komponente b')] werden die Komponenten b3) und b4) für die die Kopplungssubstanz bindenden Proteine eingefügt, im Falle eines durch Onkogene oder Viren gesteuerten rekombinanten Transaktivators [Komponente b'')] wird die Komponente b5) für das Bindungsprotein für ein Regulatorprotein eingefügt.

Durch Einfügung eines nuklearen Lokalisationssignals (NLS) kann die Funktionsfähigkeit der Komponente b), b') oder b'') gesteigert werden. Als NLS kann beispielsweise die NLS von SV40 (Dingwall et al., TIBS 16, 478 (1991)) verwendet werden.

1) Die DNA-bindende Domäne [Komponente b1)]

Die DNA-bindende Domäne stellt dar mindestens eine Sequenz

– der cDNA für die DNA-Bindedomäne des Gal4-Proteins (Aminosäuren 1 bis 147; Chasman und Kornberg, Mol. Cell Biol. 10, 2916 (1990)) oder

- des LexA-Proteins (Aminosäuren 1 bis 81; Kim et al., Science 255, 203 (1992) oder das ganze LexA-Protein (Aminosäuren 1 bis 202; Brent et al., Cell 43, 729 (1985)) oder
- des lac-Repressor (lac I) Proteins (Brown et al., Cell 49, 603 (1987); Fuerst et al., PNAS USA 86, 2549 (1989)) oder
- des Tetracyclin-Repressor(tet-R)-Proteins (Gossen et al., PNAS USA 89, 5547 (1992); Dingermann et al., EMBO J. 11, 1487 (1992)) oder
- des ZFHD1-Proteins (Pomerantz et al., Science 267, 93 (1995)).

10 2) Die Transaktivierungsdomäne [Komponente b2)]

Im Sinne der Erfindung ist die DNA solcher Transaktivierungsdomänen zu verwenden, welche reich an Glutamin, Serin und/oder Threonin sind.

15 Der Begriff reich bedeutet im Sinne dieser Erfindung, daß insgesamt

mindestens 20x Glutamin (= mindestens 20 Glutaminreste)  
mindestens 10x Serin und/oder  
mindestens 10x Threonin

20

in der Transaktivierungsdomäne enthalten sind.

Im Sinne der Erfindung gehören zu diesen Transaktivierungsdomänen beispielsweise die

25

- Aktivierungsdomäne von Oct-2 (Aminosäuren 438 bis 479; Tanaka et al., Mol. Cell Biol. 14, 6064 (1994)) oder Aminosäuren 3 bis 154; Das et al., Nature 374, 657 (1995)) oder
  - Aktivierungsdomäne von SP1 (Aminosäuren 340 bis 485; Courey und Tijan, Cell
- 30 55, 887 (1988)) oder

- Aktivierungsdomäne von NFY-1A (Aminosäuren 1 bis 132 oder 1 bis 233; Li et al., J. Biol. Chem. 267, 8984 (1992); van Huijsduijnen et al., EMBO J. 9, 3119 (1990); Sinha et al., J. Biol. Chem. 92, 1624 (1995); Coustry et al., J. Biol. Chem. 270, 468 (1995)) oder

5

- 3) Die die Kopplungssubstanz [Komponente f)] bindenden Proteine A [Komponente b3)] und B [Komponente b4)]

10 Beispiele für Kopplungssubstanzen und die zugehörigen Proteine A und B wurden bereits im Detail in der Patentanmeldung EP-A 0 848 061 beschrieben, auf welche ausdrücklich Bezug genommen wird.

Zu diesen Proteinen A und B gehören beispielsweise:

- 15 – für die Kopplungssubstanz: Rapamycin oder Rapamycin-Analoga
- das FK506 bindende Protein (FKBP)
  - das an den Rapamycin-FKBP-Komplex bindende FKBP-Rapamycin assoziiertes Protein, oder dessen an den Rapamycin-FKBP-Komplex bindende Teilsequenz (FRAP)
- 20 • statt Gene für das FKBP und das FRAP können Gene für rek. Fv verwendet werden, welche an Rapamycin binden und/oder die Bindung von FKBP bzw. von FRAP an Rapamycin inhibieren
- für die Kopplungssubstanz: Dimere (FK1012) von FK506
- das FK506 bindende Protein (FKBP)
- 25 • Calcineurin oder dessen an den FK506 Komplex bindende Teilsequenz
- statt des Genes für Calcineurin kann das Gen für ein rek. Fv eingefügt werden, welches die Bindung von FK506 an Calcineurin inhibiert
- für die Kopplungssubstanz: Dimere von Cyclosporin A
- Cyclophilin
- 30 • Calcineurin oder dessen an den Cyclosporin A/Cyclophilin Komplex bindende Teilsequenz

- statt des Genes für Cyclophilin kann das Gen für ein rek. Fv eingefügt werden, welches die Bindung von Cyclosporin A an Cyclophilin inhibiert
- für die Kopplungssubstanz: Monomere von Cyclosporin A mit folgenden  
5 bindenden Proteinen
  - Cyclophilin
  - Gen für einen rek. Fv, welcher an Cyclosporin A im Cyclophilin/Cyclosporin A-Komplex bindet
  - alternativ zu Cyclophilin können Gene für unterschiedliche rek. Fv verwendet  
10 werden, welche an unterschiedliche Epitope von Cyclosporin A binden
- für die Kopplungssubstanz: Methotrexat
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen Methotrexate
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen die Pteridringgruppe  
15
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen die Benzen-Gruppe
  - Dihydrofolatreductase
- für die Kopplungssubstanz: Gentamycin  
20
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen Gentamycin
- für die Kopplungssubstanz:
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen
- für die Kopplungssubstanz: Cephalexin  
25
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen die acyl Seitenkette an der C-7 Position des Cephem
- für die Kopplungssubstanz: Folsäure
  - Folsäure bindendes Protein
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen Folsäure  
30

- für die Kopplungssubstanz: Retinoinsäure
  - Retinoinsäure bindende Domäne des zelluläre Retinoinsäure-bindenden Proteins
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen Retinoinsäure

5

- für die Kopplungssubstanz:
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen Amoxicillin
  - Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen die Benzylpenicilloyl-Gruppe

10

- Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen Penicillin
- das Penicillin-bindende Protein

- für die Kopplungssubstanz: 4-Hydroxy-Tamoxifen oder Tamoxifen
  - Östrogen-bindende Domäne des Östrogenrezeptor-Proteins

15

- Antikörper oder Antikörperfragmente (rek. Fv) gegen den Östrogen-Rezeptor-Östrogen- bzw. 4-Hydroxy-Tamoxifen-Komplex

- für die Kopplungssubstanz: Tetrazyklin
  - das Tetrazyklin-Repressor-Protein

20

- Antikörper und Antikörperfragmente gegen Tetrazyklin

- für die Kopplungssubstanz: Konjugat aus Tetrazyklin- und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside

25

- das Tetrazyklin-Repressor-Protein
- das lac-Repressor-(lac I)-Protein

4) Das Bindeprotein für ein Regulatorprotein [Komponente b5)]

30

Zahlreiche zelluläre Bindeproteine für Regulatorproteine sind bereits beschrieben worden [Zwicker und Müller, Progress in Cell Cycle Res. 1: 91 (1995); Boulikas et al., Int. J. Oncol. 6: 271 (1995); Pawson, Nature 373: 573 (1995); Cotter, Leuk.

Lymph. 18: 231 (1995); Hesketh, the Oncogene Facts Book Acad. Press, ISBN 0-12-344550-7 (1995); Miller and Sarver, Nature Med. 3: 389 (1997)].

5 Geeignet im Sinne der Erfindung sind insbesondere Bindeproteine oder deren Bindesequenzen für solche Regulatorproteine, welche in erkrankten Zellen nur gering exprimiert sind, in ihrer Bindung an die Bindesequenz inhibiert sind, durch einen Überschuß der Bindesequenz nicht oder nur geringfügig in freier Form vorliegen oder in ihrer Funktion anderweitig, wie zum Beispiel durch Mutation, beeinträchtigt oder verändert sind.

10

Zu solchen Regulatorproteinen gehören beispielsweise die Proteine exprimiert von Tumorsuppressorgenen.

15 Eine die Erfindung nicht beschränkende Auswahl für derartige Regulatorproteine und ihre zugehörigen Bindeproteine und deren Bindesequenzen ist in folgenden Beispielen aufgeführt:

Regulatorprotein	Komponente b5) (zelluläres Bindeprotein mit Bindesequenz für das Regulatorprotein)
------------------	--

---

p53	MDM-2
PRb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transcription factor E2F, -1, -2, -3</li> <li>• Cyclin-D1, D2, -D3, oder -C</li> <li>• Cyclin-A, -E</li> <li>• Transcription factor PU.1</li> <li>• Transcription factor Elf-1</li> </ul>
p130	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transcription factor E2F-5</li> <li>• Cyclin A, - E</li> </ul>
Max	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Myc</li> </ul>
MAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Myc</li> </ul>
VHL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elongin C, - B</li> </ul>

cdk4	p14, p15, p16, p18, p27, p57, p21
MTS-1 (p16)	• cdk4
WT-1	• p53
SMAD2 (MADR2)	• DPC4
DPC-4	• SMAD2
$\beta$ -catenin	• LEF-1
LEF-1	• $\beta$ -catenin

In einer besonderen Ausführungsform dieser Erfindung ist die Komponente b5) eine Bindesequenz von einem nicht zelleigenen Bindeprotein für ein Regulatorprotein.

5 Eine solche nicht-zelleigene Bindesequenz kann beispielsweise viralen, bakteriellen oder parasitären Ursprungs sein.

Die Verwendung einer derartigen nicht-zelleigenen Bindesequenz ermöglicht, daß in Normalzellen durch Bindung des zugehörigen Regulatorproteins an die Komponente b5) die Funktion der Komponente b) gehemmt ist. In infizierten Zellen  
10 wird jedoch durch die intrazelluläre Produktion des die Bindesequenz enthaltenden Bindeproteins durch den jeweiligen Infektionserreger das zugehörige Regulatorprotein weitgehend gebunden. Damit ist in diesen Zellen die Komponente b) frei und funktionsfähig.

15 In einer weiteren besonderen Ausführungsform dieser Erfindung ist die Komponente b5) ein Antikörper oder ein Teil eines Antikörpers mit Bindesequenzen (VH und VL) für ein Regulatorprotein.

Eine die Erfindung nicht beschränkende Auswahl nicht-zelleigener Bindesequenzen  
20 ist in folgenden Beispielen aufgeführt:

Regulatorprotein      Komponente b2)  
(virales Bindepotein mit Bindesequenz für das  
Regulatorprotein)

---

p53

- IE 84 von CMV
- E1B (55 Kd) von AV
- EBNA-5 von EBV
- BHFR1 von EBV
- E6 von HPV, z.B von HPV-16 oder -18
- HBX protein von HBV
- T-Antigen von SV40

PRb

- E1A von AV
- EBNA-2 von EBV
- EBNA-1 oder -5 von EBV
- E7 von HPV
- T-Antigen von SV40

p130

- E1A von AV

CBF-1 (RBP-JK)

- EBNA-2 von EBV

NF-Kappa B

- Tax von HIV

Lyn-tyrosinkinase

- LMP-1 von EBV
- LMP-2A oder LMP-2B von EBV

Bak

- E1B (16 Kd) von AV

Bax

- E1B (19 kD) von Av

Regulatorprotein	Antikörper bzw. Antikörperfragmente mit Bindesequenz (VH, VL) für das Regulatorprotein
------------------	--

---

p53	monoklonale Antikörper spezifisch für die nicht mutierte DNA-Bindedomäne
-----	--

pRb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• monoklonale Antikörper spezifisch für aktives (nicht phosphoryliertes) pRb</li> </ul>
-----	--

myc	<ul style="list-style-type: none"> <li>• monoklonale Antikörper spezifisch für die DNA-Bindedomäne</li> </ul>
-----	---

Bei Wahl eines Antikörpers sind bevorzugt die epitopbindenden Teile des Antikörpers FVL und FVH als Komponente b5) einzusetzen, bei murinem Ursprung in humanisierter Form. Die Humanisierung erfolgt in der von Winter et al. (Nature 5 349, 293 (1991) und Hoogenbooms et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)) dargestellten Weise. Die Antikörperfragmente werden entsprechend dem Stand der Technik hergestellt, beispielsweise in der von Winter et al., Nature 349, 293 (1991), Hoogenboom et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993), Girol. Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993) 10 beschriebenen Weise.

Rekombinante Antikörperfragmente werden direkt aus existierenden Hybridomen hergestellt oder werden mit Hilfe der "phage display"-Technologie (Smith, Science 228, 1315, (1985)) aus Bibliotheken muriner bzw. humaner Antikörperfragmente 15 isoliert (Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433 (1994)). Diese Antikörperfragmente werden dann auf genetischer Ebene direkt für die Kopplung mit den Komponenten b1) und b2) eingesetzt.

Zur Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten aus Hybridomen wird die 20 genetische Information, die für die antigenbindenden Domänen (VH, VL) der Antikörper kodiert, durch Isolierung der mRNA, die reverse Transkription der RNA in

- cDNA und die anschließende Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., Science 230, 1350 (1985)) und Oligonukleotiden komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Enden der variablen Fragmente (Orlandi et al. 1989) gewonnen. Die VH- und VL-Fragmente werden dann in bakterielle Expressionsvektoren z.B. in Form
- 5 von Fv-Fragmenten (Skerra und Plückthun, Science 240, 1038 (1988)), einzelkettigen Fv-Fragmenten (scFv) (Bird et al., Science 242, 423 (1988); Huston et al., PNAS USA 85, 5879 (1988)) oder als Fab-Fragmente (Better et al., Science 240, 1041 (1988)) kloniert.
- 10 Neue Antikörperfragmente können mittels der "phage display"-Technologie auch direkt aus Antikörperbibliotheken (Immunbibliotheken, naive Bibliotheken) murinen oder humanen Ursprungs isoliert werden (McCafferty et al., Nature 348, 552 (1990); Reitling et al., Gene 104, 147 (1991); McCafferty et al., Nature 348, 552 (1990); Hoogenboom et al., Nucl. Acid Res. 19, 4133 (1991); Barbas et al., PNAS USA 88,
- 15 7978 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581 (1991); Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 (1992); Marks et al., Bio/Technol. 11, 1145 (1993)).

Immunbibliotheken werden hergestellt durch PCR-Amplifikation der variablen Antikörperfragmente aus B-Lymphozyten immunisierter Tiere (Sastry et al., PNAS

20 USA 86, 5728 (1989); Ward et al., Nature 341, 544 (1989); Clackson et al., Nature 352, 624 (1991)) oder Patienten (Mullinax et al., PNAS USA 87, 8095 (1990); Barbas et al., PNAS USA 88, 7978 (1991)).

Die Affinität von Antikörperfragmenten kann mittels der "phage display"-Technologie

25 weiter erhöht werden, wobei neue Bibliotheken von bereits existierenden Antikörperfragmenten durch zufällige (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 (1992); Gram et al., PNAS USA 89, 3576 (1992)), kodonbasierende (Glaser et al., J. Immunol. 149, 3903 (1992)) oder gezielte Mutagenese (Balint und Larrick, Gene 137, 109 (1993)), durch "chain shuffling" einzelner Domänen mit Fragmenten aus

30 naiven Repertoires (Marks et al., Bio/Technol. 10, 779 (1992)) oder unter Zuhilfenahme von bakteriellen Mutatorstämmen (Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359

(1996)) hergestellt werden und durch Reselektion unter stringenten Bedingungen (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 (1992)) Antikörperfragmente mit verbesserten Eigenschaften isoliert werden.

5 III) Die DNA-Bindesequenz für Komponente b) [Komponente c)]

Die Auswahl der DNA-Bindesequenz richtet sich nach der Wahl der DNA-bindenden Domäne. Für die unter II.1) aufgeführten Beispiele für die DNA-Bindedomänen bestehen beispielsweise folgende Möglichkeiten:

10

– mindestens eine Bindesequenz für das Gal4-Protein [Nukleotidsequenz: 5'-CGGACAACCTGTTGACCG-3', SEQ ID NO: 4]; Chasman und Kornberg, Mol. Cell Biol. 10, 2916 (1990) oder [Nukleotidsequenz: 5'-CGGAGGACTGTCCTCCG 3', SEQ ID NO: 5]; oder [Nukleotidsequenz: 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3', SEQ ID NO: 6]; Giniger et al., PNAS USA 85, 382 (1988)

15

– mindestens eine Bindesequenz [Nukleotidsequenz: 5'-TACTGTATGTACATA-CAGTA-3', SEQ ID NO: 7]; für das LexA Protein [LexA-Operator; Brent et al., Nature 612, 312 (1984)]

20

– mindestens eine Lac-Operator-Bindesequenz (Nukleotidsequenz: 5'-GAATTGTG AGGCTCACAATTC-3', SEQ ID NO: 8); für das lac I Repressorprotein (Fuerst et al., PNAS USA 86, 2549 (1989); Simons et al., PNAS USA 81, 1624 (1984))

25

– mindestens einer Tetrazyklin-Operator(tet O)-Bindesequenz (Nukleotidsequenz: 5'-TCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAG-3', SEQ ID NO: 9); für das Tetracyclin-Repressor(tet R)-Protein

30

– mindestens eine Bindesequenz (Nukleotidsequenz: 5'-TAATGATGGGCG-3', SEQ ID NO: 10); für das ZFHD-1 Protein (Pomeranth et al., Science 267, 93 (1995))

IV) Der minimale Promotor enthaltend CDE-CHR oder E2F-BS-CHR  
[Komponente d)]

Beispielsweise können Fragmente

5

- des cdc25C Genes (Nukleinsäuren -20 bis +121 oder Nukleinsäuren -20 bis +50)
  - des cdc2 (cdk-1) Genes (Nukleinsäuren -26 bis +121; Liu et al., Nucl. Acids Res. 24, 2905 (1996))
  - des CyclinA Genes (Nukleinsäuren -40 bis +94; Liu et al., Nucl. Acids Res. 24,
- 10 2905 (1996))
- des B-myb Genes (Nukleinsäuren -50 bis +50; Liu et al., Nucl. Acids Res. 24, 2905 (1996))

verwendet werden.

15

V) Effektorgene [Komponente e)]

Im Sinne der Erfindung kodieren die Effektorgene für einen Wirkstoff zur Prophylaxe und/oder Therapie einer Erkrankung. Effektorgene und Promotorsequenzen sind im  
20 Hinblick auf die Art der Therapie der Erkrankung und unter Berücksichtigung der zu transduzierenden Zielzelle auszuwählen.

Beispielsweise sind bei folgenden Erkrankungen folgende Kombinationen von Promotorsequenzen (Beispiele siehe Abschnitt C I) und Effektorgen zu wählen  
25 (eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 777 739, EP-A 0 777 740, EP-A 0 804 601, EP-A 0 807 183, EP-A 0 790 313 EP-A 0 805 209 und EP-A 0 848 063 auf die Bezug genommen wird).

a) Therapie von Tumoren

30

a.1) Zielzellen:

- proliferierende Endothelzellen oder

- der Endothelzelle benachbarte Stromazellen und Muskelzellen oder
- Tumorzellen oder Leukämiezellen

a.2) Promotoren:

- 5
- endothelzellspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
  - zellunspecific oder muskelspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
  - tumorzellspezifisch (solide Tumoren, Leukämien) und zellzyklusspezifisch

a.3) Effektorgene für Inhibitoren der Zellproliferation, zum Beispiel für

- 10
- das Retinoblastomprotein (pRb=p110) oder die verwandten p107 und p130 Proteine

Das Retinoblastomprotein (pRb/p110) und die verwandten p107 und p130 Proteine werden durch Phosphorylierung inaktiviert. Bevorzugt sind solche Gene dieser Zellzyklusinhibitoren zu verwenden, welche Mutationen für die Inaktivierungsstellen der exprimierten Proteine aufweisen, ohne daß diese hierdurch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Beispiele für diese Mutationen wurden beschrieben für das p110.

In analoger Weise wird die DNA-Sequenz für das p107 Protein oder das p130 Protein mutiert.

- 20
- das p53 Protein

Das Protein p53 wird in der Zelle inaktiviert entweder durch Bindung an spezielle Proteine, wie beispielsweise MDM2, oder durch Oligomerisierung des p53 über das dephosphorylierte C-terminale Serin. Bevorzugt wird somit eine DNA-Sequenz für ein p53 Protein verwendet, welches C-terminal verkürzt ist um das Serin 392.

- 25
- das p21 (WAF-1)
  - das p16 Protein
  - andere cdk-Inhibitoren
  - das GADD45 Protein
- 30
- das bak Protein

a.4) Effektorgene für Gerinnung induzierende Faktoren und Angiogeneseinhibitoren, zum Beispiel:

- Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1)
- PAI-2
- 5 – PAI-3
- Angiostatin und/oder Endostatin
- Interferone (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$ )
- Platelet factor 4
- IL-12
- 10 – TIMP-1
- TIMP-2
- TIMP-3
- Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
- Tissue Factor (TF) und dessen gerinnungsaktive Fragmente

15

a.5) Effektorgene für zytostatische und zytotoxische Proteine, zum Beispiel für

- Perforin
- Granzym
- IL-2
- 20 – IL-4
- IL-12
- Interferone, wie beispielsweise IFN- $\alpha$ , IFN $\beta$  oder IFN $\gamma$
- TNF, wie TNF $\alpha$  oder TNF $\beta$
- Oncostatin M
- 25 – Sphingomyelinase
- Magainin und Magainin-Derivate

a.6) Effektorgene für zytostatische oder zytotoxische Antikörper und für

- Fusionsproteine zwischen antigenbindenden Antikörperfragmenten mit
- 30 zytostatischen, zytotoxischen oder entzündungserregenden Proteinen oder Enzymen.

- 5
- Zu den zytostatischen oder zytotoxischen Antikörpern gehören solche gerichtet gegen Membranstrukturen von Endothelzellen wie sie beispielsweise von Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994)), Hughes et al., (Cancer Res. 49, 6214 (1989)) und Maruyama et al., (PNAS USA 87, 5744 (1990)) beschrieben wurden. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF-Rezeptoren.
  - Des weiteren gehören hierzu zytostatische oder zytotoxische Antikörper gerichtet gegen Membranstrukturen auf Tumorzellen. Derartige Antikörper wurden zum Beispiel von Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt. Weitere Beispiele stellen dar Antikörper gegen Sialyl Lewis<sub>x</sub>; gegen Peptide auf Tumoren, welche von T-Lymphozyten erkannt werden; gegen von Onkogenen exprimierte Proteine; gegen Ganglioside wie GD3, GD2, GM2, 9-O-acetyl GD3, Fucosyl GM1; gegen Blutgruppenantigene und deren Vorläufer; gegen Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin; gegen Antigene auf Heat Shock Proteinen
  - 15
  - Des weiteren gehören hierzu gehören Antikörper gerichtet gegen Membranstrukturen von Leukämiezellen. Eine große Anzahl derartiger monoklonaler Antikörper sind bereits für diagnostische und therapeutische
  - 20
  - Verfahren beschrieben worden (Übersichten bei Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, 3 (1990); Drexler et al., Leuk. Res. 10, 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, 1 (1989); Stickney et al., Curr. Opin. Oncol. 4, 847 (1992); Drexler et al., Blut 57, 327 (1988); Freedman et al., Cancer Invest. 9, 69 (1991)). Je nach Typ der Leukämie
  - 25
  - sind als Liganden beispielsweise monoklonalen Antikörper oder deren antigenbindende Antikörperfragmente gerichtet gegen folgende Membranantigene geeignet:

Zellen	Membranantigen
AML	CD13
	CD15
	CD33
	CAMAL
	Sialosyl-Le
B-CLL	CD5
	CD1c
	CD23
	Idiotypen und Isotypen der Membranimmunglobuline
T-CLL	CD33
	M38
	IL-2-Rezeptoren
	T-Zell-Rezeptoren
ALL	CALLA
	CD19
	Non-Hodgkin Lymphoma

- Die Humanisierung muriner Antikörper, die Herstellung und Optimierung der Gene für Fab und rek. Fv Fragmente erfolgt entsprechend der dem Fachmann bekannten Technik (Winter et al., Nature 349, 293 (1991); Hoogenbooms et al., Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993); Girol. Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) oder Huston et al., Intern. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)). Die Fusion der rek. Fv-Fragmente mit Genen für zytostatische, zytotoxische oder entzündungserregende Proteinen oder Enzymen erfolgt gleichermaßen entsprechend dem dem Fachmann bekannten Stand der Technik.

a.7) Effektorgene für Fusionsproteine von Zielzell-bindenden Liganden mit zytostatischen und zytotoxischen Proteinen. Zu den Liganden gehören alle Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf Endothelzellen binden. Beispielsweise gehören hierzu

- 5 – Cytokine wie beispielsweise IL-1 oder Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Endothelzellen binden, wie beispielsweise PDGF, bFGF, VEGF, TGF.
- Des weiteren gehören hierzu Adhäsionsmoleküle, welche an aktivierte und/oder proliferierende Endothelzellen binden. Hierzu gehören  
10 beispielsweise SLex, LFA-1, MAC-1, LECAM-1, VLA-4 oder Vitronectin.
- Hierzu gehören des weiteren Substanzen, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren von Tumor- oder Leukämiezellen binden. Beispielsweise gehören hierzu Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente  
15 bzw. Teilsequenzen von ihnen, die an Rezeptoren exprimiert durch Leukämiezellen oder Tumorzellen binden.

Derartige Wachstumsfaktoren wurden bereits beschrieben (Übersichten bei Cross et al., Cell 64, 271 (1991), Aulitzky et al., Drugs 48, 667 (1994), Moore, Clin. Cancer Res. 1, 3 (1995), Van Kooten et al., Leuk. Lymph. 12, 27  
20 (1993)).

- Die Fusion der Gene dieser an die Zielzelle bindenden Liganden mit zytostatischen, zytotoxischen oder entzündungserregenden Proteinen oder Enzymen erfolgt entsprechend dem Stand der Technik mit den dem  
25 Fachmann bekannten Methoden.

a.8) Effektorgene für Induktoren von Entzündungen, zum Beispiel für

- IL-1
- IL-2
- 30 – RANTES (MCP-2)
- monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)

- IL-8
- macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 $\alpha$ , - $\beta$ )
- neutrophil activating protein-2 (NAP-2)
- IL-3
- 5    – IL-5
- human leukemia inhibitory factor (LIF)
- IL-7
- IL-11
- IL-13
- 10   – GM-CSF
- G-CSF
- M-CSF
- Cobra venom factor (CVF) oder Teilsequenzen vom CVF, welchem dem menschlichen Komplementfaktor C3b funktionell entsprechen, d.h. welche an den Komplementfaktor B binden können und nach Spaltung durch den Faktor D eine C3 Konvertase darstellen
- 15   – der menschliche Komplementfaktor C3 oder seine Teilsequenz C3b
- Spaltprodukte des menschlichen Komplementfaktors C3, welche funktionell und strukturell dem CVF ähneln
- 20   – bakterielle Proteine, welche Komplement aktivieren oder Entzündungen auslösen, wie beispielsweise Porine von *Salmonella typhi* murium, "clumping" Faktoren von *Staphylococcus aureus*, Moduline besonders von gram-negativen Bakterien, "Major outer membrane protein" von Legionellen oder von *Haemophilus influenzae* Typ B oder von Klebsiellen oder M-Moleküle
- 25   von Streptokokken Gruppe G.

a.9) Effektorgene für Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika, zum Beispiel für Enzyme, welche inaktive Vorsubstanzen (Prodrugs) in aktive Zytostatika (Drugs) spalten.

Derartige Substanzen und die jeweils zugehörigen Prodrugs und Drugs sind bereits von Deonarain et al. (Br. J. Cancer 70, 786 (1994)), Mullen, Pharmac. Ther. 63, 199 (1994)) und Harris et al. (Gene Ther. 1, 170 (1994)) übersichtlich beschrieben worden. Beispielsweise ist die DNA-Sequenz eines der folgenden

5 Enzyme zu verwenden:

- Herpes Simplex Virus thymidinkinase
- Varizella Zoster Virus Thymidinkinase
- bakterielle Nitroreduktase
- bakterielle  $\beta$ -Glucuronidase
- 10 – pflanzliche  $\beta$ -Glucuronidase aus *Secale cereale*
- humane  $\beta$ -Glucuronidase
- humane Carboxy peptidase (CB) zum Beispiel CB-A der Mastzelle, CB-B des Pankreatische oder bakterielle Carboxypeptidase
- bakterielle  $\beta$ -Laktamase
- 15 – bakterielle Cytosine deaminase
- humane Catalase bzw. Peroxidase
- Phosphatase, im besonderen humane alkalische Phosphatase, humane saure Prostataphosphatase oder Typ 5 saure Phosphatase
- Oxidase, im besonderen humane Lysyloxidase oder humane saure D-
- 20 aminooxidase
- Peroxidase, im besonderen humane Gluthation Peroxidase, humane Eosinophilen Peroxidase oder humane Schilddrüsen Peroxidase
- Galaktosidase

25 b) Therapie von Autoimmunerkrankungen und Entzündungen  
(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in der Patentanmeldung EP-A 0 807 183, auf die Bezug genommen wird)

b.1) Zielzellen:

- 30 – proliferierende Endothelzellen oder
- Makrophagen und/oder Lymphozyten oder

- Synovialzellen

b.2) Promotoren:

- endothelzellspezifisch und Zellzyklusspezifisch oder
- 5 – makrophagen- und/oder lymphozytenspezifisch und/oder zellzyklusspezifisch  
oder
- synovialzellspezifisch und/oder Zellzyklusspezifisch

b.3) Effekorgene für die Therapie von Allergien, zum Beispiel für

- 10 – IFN $\beta$
- IFN $\gamma$
- IL-10
- Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen IL-4
- lösliche IL-4-Rezeptoren
- 15 – IL-12
- TGF $\beta$

b.4) Effekorgene für die Verhinderung der Abstoßung von transplantierten Organen,  
zum Beispiel für

- 20 – IL-10
- TGF $\beta$
- lösliche IL-1-Rezeptoren
- lösliche IL-2-Rezeptoren
- IL-1-Rezeptorantagonisten
- 25 – lösliche IL-6-Rezeptoren
- immunsuppressive Antikörper oder deren VH und VL enthaltende Fragmente  
oder deren über einen Linker verbundene VH- und VL-Fragmente.  
Immunsuppressive Antikörper sind beispielsweise Antikörper spezifisch für  
den T-Zell-Rezeptor oder seinen CD3-Komplex, gegen CD4 oder CD8 des
- 30 weiteren gegen den IL-2-Rezeptor, IL-1-Rezeptor oder IL-4-Rezeptor oder  
gegen die Adhäsionsmoleküle CD2, LFA-1, CD28 oder CD40

b.5) Effektorgene für die Therapie von Antikörper-mediierten Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel für

- 5 – TGF $\beta$
- IFN $\alpha$
- IFN $\beta$
- IFN $\gamma$
- IL-12
- lösliche IL-4-Rezeptoren
- 10 – lösliche IL-6-Rezeptoren
- immunsuppressive Antikörper oder deren VH und VL-enthaltende Fragmente

b.6) Effektorgene für die Therapie von Zell-mediierten Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel für

- 15 – IL-6
- IL-9
- IL-10
- IL-13
- TNF $\alpha$  oder TNF $\beta$
- 20 – IL-13
- einen immunsuppressiven Antikörper oder dessen VH- und VL-enthaltende Fragmente

b.7) Effektorgene für Inhibitoren der Zellproliferation, zytostatische oder zytotoxische Proteine und Enzyme für die Aktivierung von Vorstufen von Zytostatika

25

Beispiele für Gene kodierend für derartige Proteine sind bereits im Abschnitt "Effektorgene für die Therapie von Tumoren" aufgeführt.

30

In gleicher Form wie dort bereits beschrieben, können im Sinne der Erfindung Strukturgene verwendet werden, welche für Fusionsproteine aus Antikörpern

bzw. Fab oder rek. Fv-Fragmenten dieser Antikörper oder anderen Liganden spezifisch für die Zielzelle und den o.a. Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, zytostatischen oder zytotoxischen Proteinen und Enzymen kodieren.

5

#### b.8) Effektorgene für die Therapie der Arthritis

Im Sinne der Erfindung werden Strukturgene ausgewählt, deren exprimiertes Protein die Entzündung beispielsweise im Gelenk direkt oder indirekt hemmt und/oder die Rekonstitution von extrazellulärer Matrix (Knorpel, Bindegewebe) im Gelenk fördert.

10

Hierzu gehören zum Beispiel

- IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA);
- 15 IL-1-RA inhibiert die Bindung von IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$
- löslicher IL-1-Rezeptor;
- löslicher IL-1-Rezeptor bindet und inaktiviert IL-1
- IL-6
- IL-6 erhöht die Sekretion von TIMP und Superoxiden und vermindert die
- 20 Sekretion von IL-1 und TNF $\alpha$  durch Synovialzellen und Chondrozyten
- löslicher TNF-Rezeptor
- löslicher TNF-Rezeptor bindet und inaktiviert TNF.
- IL-4
- IL-4 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1, TNF $\alpha$  und MMP
- 25 – IL-10
- IL-10 inhibiert die Bildung und Sekretion von IL-1, TNF $\alpha$  und MMP und erhöht die Sekretion von TIMP
- Insulin-like growth factor (IGF-1)
- IGF-1 stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.
- 30 – TGF $\beta$ , im speziellen TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ 2
- TGF $\beta$  stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix.

- Superoxiddismutase
- TIMP, im speziellen TIMP-1, TIMP-2 oder TIMP-3

c) Therapie der mangelhaften Bildung von Zellen des Blutes

5 (eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in der Patentanmeldung EP-A 0 807 183, auf die Bezug genommen wird)

c.1) Zielzellen:

- proliferierende, unreife Zellen des blutbildenden Systems oder
- Stromazellen benachbart den blutbildenden Zellen

10

c.2) Promotoren:

- spezifisch für blutbildende Zellen und/oder Zellzyklusspezifisch
- zellunspezifisch und zellzyklusspezifisch

15 c.3) Effektorgene für die Therapie der Anämie, zum Beispiel für

- Erythropoietin

c.4) Effektorgene für die Therapie der Leukopenie, zum Beispiel für

- G-CSF
- 20 – GM-CSF
- M-CSF

c.5) Effektorgene für die Therapie der Thrombozytopenie, zum Beispiel für

- IL-3
- 25 – Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
- IL-11
- Thrombopoietin

d) Therapie von Schäden des Nervensystems

30 (eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in der Patentanmeldung EP-A 0 777 740, auf die Bezug genommen wird)

## d.1) Zielzellen:

- Gliazellen oder
- proliferierende Endothelzellen

5

## d.2) Promotoren:

- Gliazell-spezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- Endothelzell-spezifisch und Zellzyklusspezifisch oder
- unspezifisch und Zellzyklusspezifisch

10

## d.3) Effektorgene für neuronale Wachstumsfaktoren, zum Beispiel

- FGF
- Nerve growth factor (NGF)
- Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
- Neurotrophin-3 (NT-3)
- Neurotrophin-4 (NT-4)
- Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

15

## d.4) Effektorgene für Enzyme, zum Beispiel für

- Tyrosinhydroxylase
- Dopadecarboxylase

20

d.5) Effektorgene für Cytokine und deren Inhibitoren, welche die neurotoxische Wirkung von  $TNF\alpha$  inhibieren oder neutralisieren, zum Beispiel für

- $TGF\beta$
- lösliche TNF-Rezeptoren
- TNF-Rezeptoren neutralisieren  $TNF\alpha$
- IL-10
- IL-10 inhibiert die Bildung von  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-2 und IL-4
- lösliche IL-1-Rezeptoren
- IL-1-Rezeptor I
- IL-1-Rezeptor II

25

30

- lösliche IL-1-Rezeptoren neutralisieren die Aktivität von IL-1
  - IL-1-Rezeptor-Antagonist
  - lösliche IL-6-Rezeptoren
- 5 e) Therapie von Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems  
(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 777 739, EP-A 0 790 313, EP-A 0 805 209 und EP-A 0 848 063, auf welche Bezug genommen wird)
- 10 e.1) Zielzellen:
- Endothelzellen oder
  - proliferierende Endothelzellen oder
  - somatische Zellen in Nachbarschaft von Endothelzellen und glatte Muskelzellen oder
- 15 – Makrophagen
- e.2) Promotoren:
- zellunspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
  - spezifisch für Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Makrophagen und
- 20 zellzyklusspezifisch
- e.3) Effektorgene für die Inhibition der Gerinnung oder für die Förderung der Fibrinolyse, zum Beispiel für
- Tissue Plasminogen Activator (tPA)
- 25 – Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA)
- Hybride von tPA und uPA
  - Protein C
  - Hirudin
  - Serin Proteinase Inhibitoren (Serpine), wie beispielsweise C-1S-Inhibitor,  $\alpha$ 1-Antitrypsin oder Antithrombin III
- 30 – Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

e.4) Effektorgene für die Förderung der Gerinnung, zum Beispiel für

- F VIII
- F IX
- 5 – von Willebrand factor
- F XIII
- PAI-1
- PAI-2
- Tissue Factor and Fragmente hiervon

10

e.5) Effektorgene für Angiogenesefaktoren, zum Beispiel für

- VEGF
- FGF

15 e.6) Effektorgene für die Blutdrucksenkung, zum Beispiel für

- Kallikrein
- Endothelzell "nitric oxide synthase"

20 e.7) Effektorgene für die Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen nach Verletzungen der Endothelschicht, zum Beispiel für

- ein antiproliferatives, zytostatisches oder zytotoxisches Protein oder
- ein Enzym zur Aufspaltung von Vorstufen von Zytostatika in Zytostatika wie bereits oben (unter Tumor) aufgeführt oder
- 25 – ein Fusionsprotein eines dieser Wirkstoffe mit einem Liganden, beispielsweise einem Antikörper oder Antikörperfragmenten spezifisch für Muskelzellen

e.8) Effektorgene für weitere Blutplasmaproteine, zum Beispiel für

- 30 – Albumin
- C1-Inaktivator

- Serum Cholinesterase
- Transferrin
- 1-Antritypsin

5 f) Impfungen

(eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 807 183, EP-A 0 790 313, EP-A 0 860 445, auf welche Bezug genommen wird)

f.1) Zielzellen:

- Muskelzellen oder
- 10 - Makrophagen und/oder Lymphozyten

f.2) Promotoren:

- unspezifisch und zellzyklusspezifisch oder
- zielzellspezifisch und zellzyklusspezifisch

15

f.3) Effektorgene für die Prophylaxe von Infektionserkrankungen

Die Möglichkeiten, auf konventionellem Wege wirkungsvolle Impfstoffe herzustellen, sind beschränkt.

20 Demzufolge wurde die Technologie der DNA-Vakzine entwickelt. Diese DNA-Vakzinen werfen jedoch Fragen zur Wirksamkeitsstärke auf (Fynan et al., Int. J. Immunopharm. 17, 79 (1995); Donnelly et al., Immunol. 2, 20 (1994)).

25 Gemäß dieser Erfindung ist mit einer größeren Wirksamkeit der DNA-Vakzine zu rechnen.

Als Wirksubstanz ist die DNA eines vom Infektionserreger gebildeten Proteins auszuwählen, welches durch Auslösung einer Immunreaktion, d.h. durch Antikörperbindung und/oder durch zytotoxische T-Lymphozyten zur

30 Neutralisierung und/oder zur Abtötung des Erregers führt. Derartige

sogenannte Neutralisationsantigene werden als Impfantigene bereits angewandt (siehe Übersicht bei Ellis, Adv. Exp. Med. Biol. 327, 263 (1992)).

Bevorzugt im Sinne der Erfindung wird die DNA kodierend für

- 5 Neutralisationsantigene folgender Erreger:
- Influenza A-Virus
  - HIV
  - Tollwut-Virus
  - HSV (Herpes Simplex Virus)
  - 10 – RSV (Respiratory Syncytial Virus)
  - Parainfluenza-Virus
  - Rotavirus
  - VZV (Varizella Zoster Virus)
  - CMV (Cytomegalo-Virus)
  - 15 – Masern-Virus
  - HPV (Humanes Papillomvirus)
  - HBV (Hepatitis B-Virus)
  - HCV (Hepatitis C-Virus)
  - HDV (Hepatitis D-Virus)
  - 20 – HEV (Hepatitis E-Virus)
  - HAV (Hepatitis A-Virus)
  - Vibrio cholera-Antigen
  - Borrelia burgdorferi
  - Helicobacter pylori
  - 25 – Malaria-Antigen
  - Zu derartigen Wirksubstanzen im Sinne der Erfindung gehört jedoch auch die DNA eines Antiidiotyp-Antikörpers oder seiner Antigen-bindenden Fragmente, dessen Antigenbindungsstrukturen (die "complementary determining regions") Kopien der Protein- oder Kohlenhydratstruktur des
  - 30 Neutralisationsantigens des Infektionserregers darstellen.

Derartige Antiidiotyp-Antikörper können besonders Kohlenhydratantigene bei bakteriellen Infektionserregern ersetzen.

5 Derartige antiidiotypische Antikörper und ihre Spaltprodukte wurden von Hawkins et al. (J. Immunother. 14, 273 (1993)) und Westerink und Apicella (Springer Seminars in Immunopathol. 15, 227 (1993)) übersichtlich beschrieben.

#### f.4) Effektorgene für "Tumorstoffen"

10 – Hierzu gehören Antigene auf Tumorzellen. Derartige Antigene wurden zum Beispiel von Sedlacek et al., Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) und Contrib. to Oncol 43, Karger Verlag, München (1992) übersichtlich dargestellt.

15 Weitere Beispiele stellen die Gene für folgende Antigene bzw. für Antiidiotypantikörper korrespondierend mit folgenden Antigenen dar:

- Sialyl Lewis
- Peptide auf Tumoren, welche von T-Lymphozyten erkannt werden
- von Onkogenen exprimierte Proteine
- 20 – Blutgruppenantigene und deren Vorläufer
- Antigene auf dem polymorphen epithelialen Mucin
- Antigene auf Heat Shock Proteinen

g) die Therapie von chronischen Infektionserkrankungen  
25 (eine detaillierte Beschreibung erfolgte bereits in den Patentanmeldungen EP-A 0 807 183 und EP-A 0 860 445, auf welche Bezug genommen wird)

#### g.1) Zielzelle:

- Leberzelle
- Lymphozyt und/oder Makrophage
- 30 – Epithelzelle
- Endothelzelle

## g.2) Promotoren:

- virusspezifisch oder zellspezifisch und zellzyklusspezifisch

## 5 g.3) Effektorgene, beispielsweise für

- ein Protein, welches zytostatische, apoptotische oder zytotoxische Wirkungen aufweist.
- ein Enzym, welches eine Vorstufe einer antiviralen oder zytotoxischen Substanz in die aktive Substanz spaltet.

10

## g.4) Effektorgen für antivirale Proteine

- antiviral wirksame Cytokine und Wachstumsfaktoren. Hierzu zählen beispielsweise  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $TNF\beta$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1 oder  $TGF\beta$
- Antikörper einer Spezifität, die das jeweilige Virus inaktiviert oder dessen VH und VL enthaltende Fragmente oder dessen über einen Linker verbundene VH und VL Fragmente hergestellt wie bereits beschrieben.

15

Antikörper gegen Virusantigen sind beispielsweise:

20

anti HBV

anti HCV

anti HSV

anti HPV

anti HIV

25

anti EBV

anti HTLV

Anti Coxackie Virus

anti Hantaan Virus

- ein Rev bindendes Protein. Diese Proteine binden an die Rev-RNA und inhibieren Rev-abhängige posttranskriptionelle Stufen der Retrovirus-Genexpression. Beispiele für Rev-bindende Proteine sind:

5 RBP9-27

RBP1-8U

RBP1-8D

Pseudogene von RBP1-8

- 10 – Ribozyme, welche die mRNA von Genen für Zellzykluskontrollproteine oder die mRNA von Viren verdauen. Ribozyme katalytisch für HIV wurden beispielsweise von Christoffersen et al., J. Med. Chem. 38, 2033 (1995) übersichtlich beschrieben.

15 g.5) Effektorgene für antibakterielle Proteine

Zu den antibakteriellen Proteinen gehören beispielsweise Antikörper, die bakterielle Toxine neutralisieren oder Bakterien opsonieren. Beispielsweise gehören hierzu Antikörper gegen

20 Meningokokken C oder B

E. coli

Borrelia

Pseudomonas

Helicobacter pylori

25 Staphylococcus aureus

VI) Kombination gleicher oder unterschiedlicher Effektorgene

(eine detaillierte Beschreibung erfolgte in EP-A 0 777 739 und EP-A 0 860 445, auf welche Bezug genommen wird)

30

Zur Expression von zwei oder mehreren Effektorgenen [z.B. Komponenten e, e', e''] ist jeweils eine weitere Komponente c) und Komponente d) oder vorzugsweise die cDNA einer "internal ribosome entry site" (IRES) als regulatorisches Element zwischen den jeweiligen Effektorgenen geschaltet.

5

Eine IRES ermöglicht die Expression zweier über eine IRES miteinander verbundener DNA-Sequenzen.

Derartige IRES wurden beispielsweise von Montford und Smith (TIG 11, 179 (1995); Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991); Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992); Dirks et al., Gene 128, 247 (1993); Pelletier und Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) und Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994)) beschrieben.

10 So kann beispielsweise die korrespondierende DNA-Sequenz der IRES-Sequenz des Poliovirus (Position < 140 bis > 630 des 5' UTR verwendet werden.

Bevorzugt im Sinne der Erfindung sind über weitere Komponenten c) und d) oder über eine IRES-Sequenz Effektorgene zu verknüpfen, welche eine additive Wirkung aufweisen.

20

Im Sinne der Erfindung sind bevorzugte Kombinationen von Effektorgenen beispielsweise für

a) die Therapie von Tumoren

- 25
- gleiche oder unterschiedliche, zytostatische, apoptotische, zytotoxische und/oder entzündungserregende Proteine oder
  - gleiche oder unterschiedliche Enzyme für die Spaltung der Vorstufe eines Zytostatikums

30 b) die Therapie von Autoimmunerkrankungen

- unterschiedliche Cytokine oder Rezeptoren mit synergistischer Wirkung zur Hemmung der zellulären und/oder humoralen Immunreaktion oder
  - unterschiedliche oder gleiche TIMPs
- 5 c) die Therapie von mangelhafter Bildung von Zellen des Blutes
- unterschiedliche, hierarchisch aufeinanderfolgende Cytokine, wie beispielsweise  
IL-1, IL-3, IL-6 oder GM-CSF und Erythropoietin, G-CSF oder Thrombopoietin
- 10 d) die Therapie von Nervenzellschäden
- ein neuronaler Wachstumsfaktor und ein Cytokin oder der Inhibitor eines Cytokines
- e) die Therapie von Störungen des Blutgerinnungs- und Blutkreislaufsystems
- 15
- ein Antithrombotikum und ein Fibrinolytikum (z.B. tPA oder uPA) oder
  - ein zytostatisches, apoptotisches oder zytotoxisches Protein und ein Antithrombotikum oder ein Fibrinolytikum
  - mehrere unterschiedliche, synergistisch wirkende Blutgerinnungsfaktoren, beispielsweise F VIII und vWF oder F VIII und F IX
- 20
- f) Impfungen
- ein Antigen und ein immunstimulierendes Cytokin, wie beispielsweise IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, GM-CSF, IL-3 oder IL-4 Rezeptor
  - unterschiedliche Antigene eines Infektionserregers oder unterschiedlicher Infektionserreger oder
- 25
- unterschiedliche Antigene eines Tumortyps oder unterschiedlicher Tumortypen
- g) Therapie von viralen Infektionserkrankungen
- ein antivirales Protein und ein zytostatisches, apoptotisches oder
- 30
- zytotoxisches Protein

- Antikörper gegen unterschiedliche Oberflächenantigene eines Virus oder mehrere Viren

h) Therapie von bakteriellen Infektionserkrankungen

- 5
- Antikörper gegen unterschiedliche Oberflächenantigene und/oder Toxine eines Keimes

VII) Einfügung von Signalsequenzen und Transmembrandomänen

- 10
- a) Zur Verstärkung der Translation kann am 3' Ende der Promotorsequenz und unmittelbar am 5' Ende des Startsignals (ATG) der Signal- bzw. Transmembransequenz die Nukleotidsequenz GCCACC oder GCCGCC eingefügt (Kozak, J. Cell Biol. 108, 299 (1989)) werden.
- 15
- b) Zur Erleichterung der Sekretion des Expressionsproduktes des Effektorgenes kann die ggf. in der DNA-Sequenz des Effektorgenes enthaltene homologe Signalsequenz ersetzt werden durch eine heterologe, die extrazelluläre Ausschleusung verbessernde Signalsequenz.
- 20
- So kann beispielsweise die Signalsequenz für das Immunglobulin (DNA Position < 63 bis > 107; Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988)) oder die Signalsequenz für das CEA (DNA-Position < 33 bis > 134; Schrewe et al., Mol. Cell Biol. 10, 2738 (1990); Berling et al., Cancer Res. 50, 6534 (1990)) oder die Signalsequenz des humanen Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins
- 25
- (cDNA der Aminosäuren < 38 bis > 50 oder 48 bis 65; Lichtenstein et al., J. Gen. Virol. 77, 109 (1996)) eingefügt werden.
- 30
- c) Zur Verankerung des Wirkstoffes in die Zellmembran der den Wirkstoff bildenden transduzierten Zelle kann alternativ oder zusätzlich zur Signalsequenz eine Sequenz für eine Transmembrandomäne eingeführt werden.

5 So kann beispielsweise die Transmembransequenz des menschlichen  
Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktors (DNA-Position < 1485 bis > 1554;  
Cosman et al., Behring Inst. Mitt. 83, 15 (1988)) oder die DNA-Sequenz für die  
Signal- und Transmembranregion des menschlichen Respiratory Syncytial  
10 Virus (RSV)-Glykoproteins G (Aminosäuren 1 bis 63 oder deren  
Teilsequenzen, Aminosäuren 38 bis 63; Vijaya et al., Mol. Cell Biol. 8, 1709  
(1988); Lichtenstein et al., J. Gen. Virol. 77, 109 (1996)) oder die DNA-  
Sequenz für die Signal- und Transmembranregion der Influenzavirus-  
Neuraminidase (Aminosäuren 7 bis 35 oder die Teilsequenz Aminosäuren 7  
15 bis 27; Brown et al., J. Virol. 62, 3824 (1988)) zwischen der Promotorsequenz  
und der Sequenz des Effektorgens eingefügt werden.

d) Zur Verankerung des Wirkstoffes in die Zellmembran der den Wirkstoff  
bildenden transduzierten Zellen kann jedoch auch die Nukleotidsequenz für  
15 einen Glykophospholipid-Anker eingefügt werden.

Die Einfügung eines Glykophospholipid-Ankers erfolgt am 3' Ende der Nukleo-  
tidsequenz für das Strukturgen und kann zusätzlich zur Einfügung einer  
20 Signalsequenz erfolgen.

Glykophospholipid-Anker sind beispielsweise für das CEA, für das N-CAM und  
für weitere Membranproteine, wie beispielsweise Thy-1, beschrieben worden  
(siehe Übersicht Ferguson et al., Ann. Rev. Biochem. 57, 285 (1988)).

25 e) Eine weitere Möglichkeit der Verankerung von Wirkstoffen an die Zellmembran  
entsprechend der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer DNA-  
Sequenz für ein Ligand-Wirkstoff-Fusionsprotein. Die Spezifität des Liganden  
dieses Fusionsproteins ist gerichtet gegen eine Membranstruktur auf der  
30 Zellmembran der gewählten Zielzelle.

- e.1) Zu den Liganden, welche an die Oberfläche von Zellen binden, gehören beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, gerichtet gegen Strukturen auf der Oberfläche von beispielsweise
- 5 - Endothelzellen. Insbesondere zählen hierzu Antikörper gegen die VEGF Rezeptoren oder gegen Kinin-Rezeptoren
- oder von Muskelzellen, wie Antikörper gegen Actin oder Antikörper gegen Angiotensin II-Rezeptoren oder Antikörper gegen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise gegen EGF-Rezeptoren oder gegen PDGF-Rezeptoren oder gegen FGF-Rezeptoren oder Antikörper
- 10 gegen Endothelin A-Rezeptoren
- Zu den Liganden gehören auch Antikörper oder deren Fragmente, welche gerichtet sind gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzellmembran. Derartige Antikörper wurden bereits beschrieben.
- 15 Die murinen monoklonalen Antikörper sind bevorzugt in humanisierter Form einzusetzen. Fab und rek. Fv-Fragmente und deren Fusionsprodukte werden, wie bereits beschrieben, mit der dem Fachmann bekannten Technologie hergestellt.
- 20 e.2) Zu den Liganden gehören des weiteren alle Wirkstoffe, wie beispielsweise Cytokine oder Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren oder deren Fragmente bzw. Teilsequenzen von ihnen, Mediatoren oder Peptidhormone, welche an Membranstrukturen oder Membranrezeptoren auf der jeweiligen ausgewählten Zelle binden. Beispielsweise gehören hierzu
- 25 - Liganden für Endothelzellen, wie IL-1, PDGF, bFGF, VEGF, TGG $\beta$  (Pusztain et al., J. Pathol. 169, 191 (1993)) oder Kinin und Derivate oder Analoga von Kinin.
- Des weiteren gehören hierzu Adhäsionsmoleküle. Derartige Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise SLex, LFA-1, MAC-1, LeCAM-1, VLA-4 oder
- 30 Vitronectin und Derivate oder Analoga von Vitronectin, wurden bereits für Endothelzellen beschrieben (Übersichten bei Augustin-Voss et al., J. Cell

Biol. 119, 483 (1992); Pauli et al., Cancer Metast. Rev. 9, 175 (1990); Honn et al., Cancer Metast. Rev. 11, 353 (1992); Varner et al., Cell Adh. Commun. 3, 367 (1995)).

- 5 Die Erfindung wird an folgenden Beispielen näher erläutert, ohne sich darauf zu beschränken.

D) Beispiele zur Erläuterung des Erfindungsgedankens

- 10 Beispiel 1: Herstellung und Prüfung eines Expressionssystems enthaltend ein chimäres Promotorsystem mit einem rekombinanten Transkriptionsfaktor in Endothelzellen

b) Klonierung der verwendeten Plasmide

15

Das erfindungsgemäße Expressionssystem besteht aus den im Folgenden aufgeführten Konstrukten RTA- (Rekombinanter Transkriptionsaktivator) Konstrukt und Reporterkonstrukt 1 oder 2 mit unterschiedlichen, stromabwärts aufeinanderfolgenden Nukleotidsequenzen:

20

RTA-Konstrukt (Fig. 5A)

- der SV40 Promotor und Enhancer (Genbank SV40 zirkuläres Genom, NID  
25 g965480: Nukleotide 5172 - 294)
- dem Kaninchen  $\beta$ -Globin-Intron II (Genbank  $\beta$ -Globin-Gen, Accession-Nr. V00882: Nukleotide 700 - 1305, van Ooyen et al., Science 206, 337 (1979))
- der cDNA für die DNA-Bindedomäne des Gal4 Proteins [Aminosäuren 1 bis 147; Chasman und Kornberg, Mol. Cell Biol. 2916 (1990)]
- 30 — dem Linker: ATA GGC CGG GCC (SEQ ID NO: 11)

- der cDNA für die Transaktivierungsdomäne von NF-YA [Aminosäuren 1 bis 261 + Stop-Codon (TAG); Li et al., J. Biol. Chem. 267, 8984 (1992); van Huijsduijnen et al., EMBO J. 9, 3119 (1990); Sinka et al., J. Biol. Chem. 92, 1624 (1995)]
- 5 — dem SV40-Poly A-Signal (Vektor pGL3, Promega)  
(dieses Transkriptionsterminationssignal ist am 3' Ende aller nachfolgend angeführten Konstrukte angefügt, ohne gesondert aufgeführt zu sein)

Reporterkonstrukt 1 (Fig. 5B)

10

- 5x der Bindesequenz [Nukleotidsequenz: 5 x 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3', SEQ ID NO: 6] für das Gal4 Protein (Webster et al., Cell 52, 169 (1988))
- dem basalen Promotor von cdc25C [Nukleotidsequenz -20 bis +121; 15 Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)]
- der cDNA für Luciferase; sämtliche Luziferasekonstrukte sind in den Vektor pGL3 (Promega) kloniert, der zur Transkriptionstermination das SV40-Poly A-Signal beinhaltet

20 Reporterkonstrukt 2 (Fig. 5C)

- 3x der Bindesequenz [Nukleotidsequenz: 5 x 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3', SEQ ID NO: 6] für das Gal4 Protein (Webster et al., Cell 52, 169 (1988))
- 25 — dem basalen Promotor von cyclin A (Nukleotidsequenz -40 bis +94; Henglein et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 5490-5494 (1994))
- der cDNA für Luciferase (pGL3, Promega)

Als Kontrollen dienten folgende Konstrukte

30

Reporterkonstrukt 3 (Fig. 5D)

Entspricht dem Reporterkonstrukt 1, wobei in dem basalen Promotor von cdc25C [Nukleotidsequenz -20 bis +121; Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)] das CDE Element TGGCGGA mutiert wurde zu TGGC<sub>1</sub>GA.

5

Kontrollkonstrukt 1 (Fig. 6A)

"pGL3promoter" von Promega:

Expressionssystem mit folgenden Nukleotidsequenzen

- 10 — SV40 Promotor  
— cDNA für Luciferase

Kontrollkonstrukt 2 (Fig. 6B)

15 Expressionssystem mit folgenden Nukleotidsequenzen

- cyclin A Promotor (-214 bis +100, Henglein et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 5490-5494 (1994))  
— cDNA für Luciferase

20 Kontrollkonstrukt 3 (Fig. 6C)

Expressionsprodukt mit folgenden Nukleotidsequenzen

- cdc25C Promotor (-290 bis +121, Lucibello et al., EMBO J. 14, 132-142 (1995))  
25 — cDNA für Luciferase

Zur Klonierung sämtlicher Reporterkonstrukte und Kontrollkonstrukte wurde pGL3 (Promega, Luziferase-cDNA-Reporter) als Vektor verwendet. Die in diesen Vektor klonierten Promotorelemente wurden mittels PCR aus humaner, genomischer DNA  
30 amplifiziert. Die dazu verwendeten Oligonukleotide enthielten jeweils 4 Nukleotide Überhang (5'-GATC-3'), gefolgt von 6 Nukleotiden mit den benötigten

Restriktionsschnittstellen (5'-Primer: BamHI (GGATCC)/ 3'-Primer: HindIII (AAGCTT) für die Kontrollplasmide 1 und 2 und die Reporterplasmide 1 und 3; 5'-Primer: Bgl II (AGATCT)/ 3'-Primer: HindIII für das Reporterplasmid 2) und anschließend 20 - 25 zu dem zu amplifizierenden Promotor komplementäre Nukleotide (beginnend mit der in Klammern angezeigten Position relativ zum Transkriptionsstart). Die in Klammern angegebenen Positionen beziehen sich auf die in der zitierten Literaturstelle aufgeführte Sequenz.

Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick<sup>TM</sup> Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (diese Enzyme sind käuflich zu erwerben) und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erneut mit QIAquick<sup>TM</sup> Spin-Säulen aufgereinigt.

Gal4-Bindungsstellen wurden als Oligonukleotide mit für die entsprechenden Restriktionsschnittstellen benötigten Überhängen synthetisiert (5': BamHI/ 3': Bgl II), mit SephadexG25 (Pharmacia) aufgereinigt und hybridisiert.

Die verdauten PCR-Produkte und hybridisierten Oligonukleotide wurden anschließend in die entsprechend geschnittenen und aufgereinigten Vektoren unter Verwendung von T4 DNA-Ligase (Promega) ligiert. Sämtliche durch PCR und unter Verwendung von Oligonukleotiden erhaltenen Konstrukte wurden sequenziert, um Mutationen auszuschließen.

b) Reporterassays: Transiente Transfektion, Synchronisation und Luziferaseassay

Die Promotoraktivität der unter a) beschriebenen Konstrukte wurde durch transiente Transfektion bzw. Kotransfektion in Endothelzellen mit anschließender Messung der Luziferaseaktivität bestimmt. BAECs (bovine aortic endothelial cells = Rinder-aortaendothelzellen) wurden nach der DEAE/Dextran-Methode [modifiziert nach

Sompayrac et al., PNAS 78, 7575 (1981)] transient transfiziert. Der Luciferaseassay wurde, wie in Lucibello et al. (EMBO J. 14, 132 (1995)) beschrieben, durchgeführt.

Es wurden 8 mg Plasmid pro 3,5 cm-Schale transfiziert. Bei Kotransfektionen  
5 wurden 4 + 4 µg Plasmid transfiziert, wobei bei den Kontrollen mit dem pUC19-  
Plasmid aufgefüllt wurde. Zur Messung einer zellzyklusabhängigen Promtoraktivität  
wurden proliferierende Zellen (Vollmedium) mit durch einen 48-stündigen  
Methioninentzug in der G1-Phase des Zellzyklus arretierten Zellen verglichen.  
Dabei diente das nicht zellzyklusregulierte Kontrollkonstrukt 1 (enthaltend den  
10 SV40-Promotor) zur Standardisierung (seine Aktivität wurde gleich 1 gesetzt).

## c) Ergebnisse

Folgende Ergebnisse wurden erzielt (in Klammern angegebene Meßwerte stellen die relative Luziferaseaktivität (standardisiert mit dem SV40-Promotor =

5 Kontrollkonstrukt 1) in proliferierenden Zellen/relative Luziferaseaktivität in G1-Zellen dar):

Mit den Kontrollkonstrukten 2) und 3) transfizierte Endothelzellen bilden deutlich mehr Luziferase wenn sie proliferieren (DNA > 2S), als wenn sie in der G1-Phase  
10 des Zellzyklus (DNA = 2S) arretiert sind (Kontrollkonstrukt 3: > 40x; Kontrollkonstrukt 2: > 150x). Diese Konstrukte dienten als Kontrollen für die Experimente mit den erfindungsgemäßen Expressionssystemen.

Bei Kotransfektion der Reporterkonstrukte 1) und 2) mit dem RTA-Konstrukt konnte  
15 ebenfalls eine höhere Luziferaseaktivität in proliferierenden als in G1 arretierten Endothelzellen gezeigt werden (Reporterkonstrukt 1: 5,5x; Reporterkonstrukt 2: 8,3x). Kein Unterschied wurde nach Kotransfektion des Kontrollkonstruktes 3) mit dem RTA-Konstrukt gesehen (1,0x). Die Luziferaseaktivität lag jeweils deutlich höher als nach Transfektion der jeweiligen Reporterkonstrukte alleine.

20

Eine deutliche Zellzyklusregulation des erfindungsgemäßen Expressionssystems in Endothelzellen konnte somit gezeigt werden

Beispiel 2: Herstellung und Prüfung eines Expressionssystems enthaltend ein  
25 chimäres Promotorsystem mit einem rekombinanten Transkriptionsfaktor in Melanomzellen

## a) Klonierung der verwendeten Plasmide

30 Das erfindungsgemäße Expressionssystem besteht aus folgenden Konstrukten mit unterschiedlichen, stromabwärts aufeinanderfolgenden Nukleotidsequenzen:

## RTA-Konstrukte

Die RTA (Rekombinanter Transkriptionsaktivator)-Plasmide kodieren für ein Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und der Serin-, Threonin- und Glutamin-reichen Transaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors NF-YA.

— CMV-GN Gal4 (As 1-147), Linker: ATA GGC CGG GCC (SEQ ID. NO: 11), mNF-YA

10 (As 1-261 + Stop-Codon (TAG)) unter Kontrolle des CMV-Promotors und -Enhancers (nts 232-863 aus pcDNA3, Invitrogen), SV40-PolyA (Fig. 7A)  
(Li et al., J. Biol. Chem. 267, 8984-8990 (1992))

—Tyr-GN Gal4 (As 1-147), Linker: ATA GGC CGG GCC (SEQ ID NO: 11), mNF-YA (As 1-261 + Stop-Codon (TAG)) unter Kontrolle des

15 Tyrosinase-Promotors (s. Konstrukt Tyr), SV40-PolyA (Fig. 7B)  
(Li et al., J. Biol. Chem. 267, 8984-8990 (1992))

—Tyr-G Gal4 -Stop (As 1-147 + Stop-Codon (TAG)) unter Kontrolle des Tyrosinase-Promotors, SV40-PolyA (Fig. 7C)

## 20 Reporterkonstrukte

— 5G25C identisch dem Reporterkonstrukt 1) unter I)

— 5G25CRT7 identisch dem Reporterkonstrukt 2) unter I)

25 — 8GCycA 8 x Gal4-DNA-Bindungsstelle + cyclin A-Promotor (-40/+94; Henglein et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 5490-5494 (1994)) (Fig. 8A)

— 8GCycART7 wie 8GCycA, mit mutiertem CDE (TCGCGGG ->TCGCtGG, Zwicker et al. EMBO J. 14: 4514, 1995) (Fig. 8B)

30

Gal4-DNA-Bindungsstelle: 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3',  
SEQ ID NO: 6

#### Kontrollkonstrukte

- 5
- basic = "pGL3basic" (Promega, ohne Promotor oder Enhancer)  
(Fig. 9A)
  - SV40p = "pGL3promoter" (Promega, mit dem Simian Virus 40  
Basalpromotor) identisch dem Kontrollkonstrukt 1 unter I  
10 (Fig. 6A)
  - Tyr Tyrosinase-Promotor: 2 x distales Element (TDE, -2014/-1811)  
und 1 x proximales Element (TPE, -209/+51) (Shibata et al., J.  
Biol. Chem. 267, 20584 (1992)), cDNA für Luziferase (pGL3,  
Promega) (Fig. 9B)
  - 15 — cdc25C cdc25C-Promotor (-290/+121) (Lucibello et al., EMBO J. 14,  
132-142 (1995)), cDNA für Luziferase (pGL3, Promega);  
identisch dem Kontrollkonstrukt 3 unter I (Fig. 6C)
  - cycA cyclin A-Promotor (-214/+100) (Henglein et al., Proc. Natl Acad.  
Sci. USA 91, 5490-5494 (1994)), cDNA für Luziferase (pGL3,  
20 Promega); identisch dem Kontrollkonstrukt 2 unter I (Fig. 6B)

Bei sämtlichen Reporterkonstrukten und Kontrollkonstrukten wurde pGL3 (Promega, Luziferase-cDNA-Reporter) als Vektor verwendet. Die in diesen Vektor klonierten Promotorelemente wurden mittels PCR aus humaner, genomischer DNA amplifiziert.

25 Die dazu verwendeten Oligonukleotide enthielten jeweils 4 Nukleotide Überhang (GATC), gefolgt von 6 Nukleotiden mit den benötigten Restriktionsschnittstellen (BamHI (GGATCC)/HindIII (AAGCTT) für die Kontrollplasmide cdc25C und cycA und die Reporterplasmide 5G25C und 5G25CRT7; KpnI (GGTACC) /NheI (GCTAGC) bzw. NheI/XhoI (CTCGAG) für das TDE und XhoI/Bgl II (AGATCT) für  
30 das TPE, Bgl II/HindIII für die Reporterplasmide 8GCycA und 8GCycART7 und anschließend 20 - 25 zu dem zu amplifizierenden Promotor komplementäre

Nukleotide (beginnend mit der in Klammern angezeigten Position relativ zum Transkriptionsstart). Die in Klammern angegebenen Positionen beziehen sich auf die in der zitierten Literaturstelle aufgeführte Sequenz.

- 5 Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick<sup>TM</sup> Spin-Säulen (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (diese Enzyme sind käuflich zu erwerben) und nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese erneut mit QIAquick<sup>TM</sup> Spin-Säulen aufgereinigt.
- 10 Gal4-Bindungsstellen wurden als Oligonukleotide mit für die entsprechenden Restriktionsschnittstellen benötigten Überhängen synthetisiert (KpnI (top: 5'-; bottom: 3'-)/XhoI (top:5'-; bottom: 3'-) oder BamHI (top: 5'-; bottom: 3'-) /Bgl II (top: 5'-; bottom: 3'-)), mit SephadexG25 (Pharmacia) aufgereinigt und hybridisiert. Die verdauten PCR-Produkte und hybridisierten Oligonukleotide wurden
- 15 anschließend in die entsprechend geschnittenen und aufgereinigten Vektoren unter Verwendung von T4 DNA-Ligase (Promega) ligiert.

Sämtliche durch PCR und unter Verwendung von Oligonukleotiden erhaltenen Konstrukte wurden sequenziert, um Mutationen auszuschließen.

20

b) Reporterassays: transiente Transfektion, Synchronisation und Luziferaseassay

- 25 Die Promotoraktivität der unter a) beschriebenen Konstrukte wurde durch transiente Kotransfektion in Melanozyten (MeWo, human), Fibroblasten (3T3, murin) und Prostatakarzinomzellen (PC-3, human) mit anschließender Messung der Luziferaseaktivität bestimmt. Die Zellen wurden mit DOTAP (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers transient transfiziert.

- 30 Der Luciferaseassay wurde wie in Lucibello et al. (EMBO J., 14, 132 (1995)) beschrieben durchgeführt. Es wurden 1 mg (Reporter) + 2 mg (RTA) Plasmid mit 6

ml DOTAP pro 3,5 cm-Schale transfiziert, wobei bei den Kontrollen pUC19-Plasmid anstelle des RTA-Plasmids eingesetzt wurde.

5 Zur Messung einer zellzyklusabhängigen Promotoraktivität wurden proliferierende Zellen (Vollmedium) mit in der G1-Phase des Zellzyklus arretierten Zellen verglichen. Dabei diente das nicht zellzyklusregulierte Konstrukt SV40p zur Standardisierung (seine Aktivität wurde gleich 1 gesetzt). Die Synchronisation der Zellen in der G1-Phase erfolgte durch einen 60-stündigen Methioninentzug nach der Transfektion.

10

Zur Messung der zelltypspezifischen Promotoraktivität wurden die Luziferase-Aktivitäten der verschiedenen Zelltypen nach Standardisierung mit den Werten für den ubiquitären SV40-Promotor verglichen (mit SV40p = 1).

15 c) Ergebnisse

20 Tabelle 1 zeigt eine deutliche Zelltypspezifität des Systems: (1) das 8GCycA-Konstrukt hat eine nur geringe Aktivität, die im Bereich der Aktivität des Leervektors basic liegt, (2) durch Kotransfektion des CMV-GN-Konstruktes erfolgt eine deutliche Aktivierung in allen 3 Zelllinien, (3) eine spezifische Aktivierung wird durch Kotransfektion des Tyr-GN-Konstruktes nur in den Targetzellen, d.h. in den Melanomzellen, durch selektive Expression des Gal-NF-Y-Fusionsproteins erzielt und (4) es erfolgt eine nur sehr geringe Aktivierung durch Kotransfektion des Tyr-G-Konstruktes, d.h. die Aktivierung in (3) ist auf die Transaktivierungsdomäne des NF-  
25 YA zurückzuführen.

Die Spezifität des Systems 8GCycA+Tyr-GN liegt bei 58 (Vergleich MeWo : PC-3) bzw. 73 (Vergleich MeWo : 3T3) bei sehr geringer Aktivität in Nicht-Targetzellen.

30 Die Werte in Tabelle 2 belegen die zellzyklusregulierte Aktivität des Systems:

- der cyclinA-Promotor zeigt eine 26-fache Zellzyklusregulation (Aktivität proliferierende MeWos : Aktivität MeWos in G1, Positivkontrolle)
  - das System 8GCycA + Tyr-GN zeigt eine Zellzyklusregulation von 22.5-fach (ist also annähernd so gut reguliert wie der cyclinA Wildtyppromotor, bei nahezu gleicher Aktivität in proliferierenden Zellen) und
  - eine Mutation des CDE-Elementes (RT7) führt zu einer drastisch erhöhten Aktivität in G1-Zellen und damit zu einer geringeren Zellzyklusregulation von 5-fach. Die Zellzyklusregulation ist daher v.a. auf die CDE/CHR-vermittelte Repression in G1 (durch den CDE/CHR-bindenden Repressor, der die durch NF-YA bedingte Transaktivierung in G1-Zellen reprimiert) zurückzuführen. Die verbleibende Zellzyklusregulation der RT7-Mutante kann auf eine ebenfalls geringe Zellzyklusregulation des Tyrosinase-Promotors selbst (4.2-fach) zurückgeführt werden.
- 15 Die Tabellen 3 und 4 zeigen, daß das System bei Verwendung des cdc25C-CDE/CHR-Elementes ebenfalls sowohl eine deutliche Zelltypspezifität (3,9-fach) sowie Zellzyklusregulation (8,4-fach) aufweist.

Die gewebespezifische Expression eines Gal-NF-Y-Fusionsproteins, das über Gal4-DNA-Bindungsstellen stromaufwärts eines CDE/CHR-Elementes die Expression eines Gens sowohl gewebespezifisch als auch proliferationsabhängig steuert, konnte damit beispielhaft gezeigt werden. Dabei wurde bei Verwendung des melanozytenspezifischen Tyrosinase-Promotors und des cyclinA-CDE/CHR-Elementes eine >20-fache Zellzyklusregulation bei >50-facher Zelltypspezifität erzielt. Die Aktivität des Systems ist in proliferierenden Targetzellen mit der Aktivität des Wildtyp-cyclin A-Promotors vergleichbar und in nicht-proliferierenden Targetzellen und in Nicht-Targetzellen kaum höher als die des Leervektors pGL3basic.

30 Beispiel 3: *In vivo* Experimente

Um herauszufinden ob der Level der Transkription, der durch das erfindungsgemäße Promotorsystem erreicht wird, ausreichend ist, um einen biologischen Effekt zu erreichen, wurde ein *in vitro* TNF- $\alpha$  Cytolyseassay durchgeführt. Dieser Assay, welcher cytotoxische Effekte auf die TNF- $\alpha$  sensitive Zelllinie L 929 mißt, wurde mit dem Medium von MeWo-Zellen durchgeführt, die mit Aktivator-(Tyr-GN) und Effektor (Gal Cyc ATNF)-Konstrukten kotransfiziert worden waren. Zur Konstruktion von Gal Cyc ATNF wurde die Luziferase cDNA von Gal Cyc A ersetzt durch die TNF- $\alpha$  cDNA aus dem Plasmid pAS3 (erhalten von M. Clauss, Max Planck Institut, Bad Nauheim, Deutschland). pAS3 enthält die Maus TNF- $\alpha$  cDNA kloniert in die Pst I/Eco RI Restriktionsstelle des Vektors pBluescript II SK.

Um möglichst hohe Transfektionsraten beim TNF- $\alpha$ -Bioassay zu erhalten wurden MeWo-Zellen unter Benutzung von Lipofectin (Life Technologies) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Ein Mikrogramm von Gal Cyc ATNF und 1  $\mu$ g pUC19 oder Tyr-GN wurden mit 10  $\mu$ l Lipofectin in OptiMEM gemischt und die Zellen damit für 6 Stunden inkubiert.

Die MeWo-Zellen wurden mit Gal Cyc ATNF/pUC19 oder Gal Cyc ATNF/Tyr-GN in drei parallelen Ansätzen kotransfiziert. 24 Std. nach Transfektion wurde das Medium ersetzt und nach weiteren 24 Std. gesammelt. Die Kulturüberstände wurden auf TNF- $\alpha$ -Bioaktivität untersucht durch Bestimmung ihrer Cytotoxizität auf die transformierte Maus-Fibroblasten Zelllinie L 929. Solche L 929 Zellen wurden in Mikrotiterplatten bei einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Nach 16 Std. wurden serielle Verdünnungen von Maus TNF- $\alpha$  in konditioniertem Medium von nicht- transfizierten MeWo-Zellen und die Überstände der transfizierten Zellen und jeweils Actinomycin D zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml hinzugefügt. Nach 24 Std. wurden die übrig gebliebenen L 929 Zellen fixiert, mit Kristall-Violett gefärbt und der anhaftende Farbstoff mit einem ELISA-Meßgerät bei einer Wellenlänge  $\lambda = 450$  nm quantifiziert.

48 Std. nach der Transfektion war die Cytolyse im Bereich von 60 % (entsprechend ~ 1,0 ng/ml TNF- $\alpha$  im Überstand). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Überständen von Zellen, die mit dem Gal Cyc ATNF Effektor Konstrukt alleine transfiziert worden waren, nur ein vernachlässigbar kleiner Anteil von toten Zellen 5 (< 2 %). Diese Resultate zeigten, daß die Transkriptionsrate die durch das erfindungsgemäße Promotorsystem erreicht wird, zur Erzielung eines deutlichen biologischen Effekts geeignet ist.

Tabelle 1

Konstrukte	Luziferase-Aktivität (RLUs, SV40p = 1)		
	MeWo	3T3	PC-3
Basic	0.01	0.01	0.07
SV40p	1.00	1.00	1.00
Tyr	57.6	0.03	0.05
8GcycA	0.04	0.02	0.06
8GcycA+CMV-GN	3.39	0.42	1.35
8GcycA+Tyr-GN	2.92	0.04	0.05
8GcycA+Tyr-G	0.18	0.02	0.02

Tabelle 2

Konstrukte	Luziferase-Aktivität (RLUs, SV40p = 1)	
	MeWo proliferierend	MeWo G1
Basic	0.01	0.05
SV40p	1.00	1.00
Tyr	57.60	13.60
CycA	3.38	0.13
8GcycA	0.01	0.07
8GcycA+Tyr-GN	2.70	0.12
8GcycART7	0.04	0.05
8GcycART7+Tyr-GN	7.25	1.44

Tabelle 3

Konstrukte	Luziferase-Aktivität (RLUs, SV40p = 1)	
	MeWo	3T3
SV40p	1,00	1,00
5G25C	0,05	0,14
5G25C+CMV-GN	6,50	7,13
5G25C+Tyr-GN	5,46	1,39

Tabelle 4

Konstrukte	Luziferase-Aktivität (RLUs, SV40p = 1)	
	MeWo proliferierend	MeWo G1
SV40p	1,00	1,00
Cdc25C	1,08	0,11
5G25C	0,05	0,22
5G25C+Tyr-GN	5,46	0,65
5G25CRT7	0,00	0,17
5G25CRT7+Tyr-GN	3,98	2,58

Figurenlegende:

Figur 1 bis 4: Erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte

- 5    Figur 5:        Schematische Darstellung des RTA-Konstruktes und der Reporterkonstrukte zu I
- Figur 6:        Schematische Darstellung der Kontrollkonstrukte zu I. Fein: pGL3-Vektor von Promega; fett: Promotoren in der MCS von pGL3
- 10    Figur 7:        Schematische Darstellung der RTA-Konstrukte zu II, das Vektorgerüst stammt von pGL3 (Promega)
- Figur 8:        Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte zu II
- 15    Figur 9:        Schematische Darstellung der Kontrollkonstrukte zu II. Fein: pGL3-Vektor von Promega; fett: Promotoren in der MCS von pGL3

## Patentansprüche

1) Nukleinsäurekonstrukt, dadurch charakterisiert, daß es folgende Komponenten enthält:

5

– Komponente a): mindestens einen Promotor

– Komponente b): DNA kodierend für mindestens einen rekombinanten Transaktivator, dessen Transkription durch die Komponente a) aktiviert wird und der enthält:

10

• Komponente b1): DNA, kodierend für eine DNA-bindende Domäne

• Komponente b2): DNA, kodierend für eine Transaktivierungsdomäne, welche reich ist an Glutamin, Serin und Threonin

15

– Komponente c): mindestens eine DNA-Sequenz zur Bindung des Expressionsproduktes von Komponente b)

20

– Komponente d): mindestens einen minimalen Promotor, der das CDE-CHR-Element oder das E2F-BS-CHR Element enthält und mit seinem 5'-Ende an das 3'-Ende von Komponente c) gebunden ist.

– Komponente e): mindestens ein Effektorgen, dessen Transkription durch Bindung des Expressionsproduktes von Komponente b) an die Komponente c) aktiviert wird.

25

2) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1), dadurch charakterisiert, daß an das 5'-Ende der Komponente a) mindestens eine Komponente c) angefügt ist und das Expressionssystem selbst amplifizierend ist.

30

- 3) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) oder 2) enthaltend die Komponente b'), bei welcher
- die Komponente b1) gekoppelt ist an Komponente b3), welche für ein Protein A kodiert, welches an eine Kopplungssubstanz f) bindet und
  - die Komponente b2) gekoppelt ist an Komponente b4), welche für ein Protein B kodiert, welches ebenso an die Kopplungssubstanz f) bindet und
  - bei welchem die Kopplungssubstanz f) die Expressionsprodukte der Komponenten b1), b3), b4) und b2) zu einem funktionsfähigen rekombinanten Transaktivator verbindet.
- 4) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 3) enthaltend die Komponente b''), bei welcher die Komponenten b1) und b2) verbunden sind mit der Komponente b5), welche kodiert für mindestens ein Bindeprotein für ein zelluläres Regulatorprotein, wobei die Bindung des zellulären Regulatorproteins an das zugehörige Bindeprotein die Funktion des Transaktivators exprimiert von Komponente b'') inhibiert.
- 5) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 4), dadurch gekennzeichnet, daß mehrere gleiche oder unterschiedliche Effektorgene [Komponenten e), e'), e'')] durch eine IRES-Sequenz oder durch eine Aktivierungssequenz bestehend aus den Komponenten c) und d) miteinander verbunden sind.
- 6) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 4), dadurch gekennzeichnet, daß der Komponente b), b') oder b'') ein nukleäres Lokalisationssignal angefügt ist.
- 7) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 6), dadurch gekennzeichnet, daß ein in der Komponente a) vorliegende Promotor ausgewählt ist aus

- unspezifischen Promotorsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend den Promotor der RNA-Polymerase III oder der RNA-Polymerase II, CMV-Promotor und Enhancer, den SV40-Promotor
  - 5 – viralen Promotor- und Aktivatorsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend solche Sequenzen von HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV, HIV;
  - zellzykluspezifisch aktivierbaren Promotorsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend solche Sequenzen vom cdc25C-, Cyclin A-, cdc2- (cdk-1), Bmyb-, DHFR-, E2F-1-Gen oder Bindesequenzen für
  - 10 zellproliferationsabhängig auftretende oder aktivierte Transkriptionsfaktoren wie Monomere oder Multimere der Myc E-Box;
  - zellspezifisch aktivierbare Promotoren, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Promotoren, die zellspezifisch aktivierbar sind in Endothelzellen, Bindegewebszellen, Muskelzellen, Gliazellen, blutbildenden Zellen,
  - 15 Lymphozyten, Makrophagen, Synovialzellen, Leukämiezellen oder Tumorzellen, Zellen der Magen-Darmschleimhaut, der Niere, des Respirationsorgans der Geschlechtsorgane und der harnableitenden Wege;
  - metabolisch aktivierbaren Promotoren, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend durch Hypoxie induzierbare Enhancersequenzen.
  - 20
- 8) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente b1) ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend DNA-Bindedomänen entstammend dem Gal4-Protein, dem LexA-Protein, dem lac-Repressor Protein, dem Tetracyclin Repressorprotein oder
- 25 dem ZFHD1-Protein.
- 9) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 8), dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente b2) ausgewählt ist aus solchen Transaktivierungsdomänen, welche insgesamt mindestens 20x Glutamin, 10x
- 30 Serin und 10x Threonin enthalten.

10) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 9), bei welchem die Komponente b2) ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend die Transaktivierungsdomänen von Oct-2, SP1 und NFY-1.

5

11) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 3) bis 10), dadurch gekennzeichnet, daß

– in den Komponenten b3) oder b4) mindestens eine der die Kopplungsstruktur f) bindenden Proteine A und B ein rekombinanter Antikörper oder ein rekombinantes Antikörperfragment ist.

10

12) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11), dadurch gekennzeichnet, daß

– mindestens eines der die Kopplungssubstanz f) bindenden Proteine A und B ein einzelkettiges Fv-Fragment ist, enthaltend eine variable Kette und eine leichte Kette, die durch eine kurze Peptidsequenz kovalent verbunden sind.

15

13) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 3) bis 12), dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der die Kopplungssubstanz f) bindenden Proteine A und B die Bindungsdomäne eines in der Natur vorkommenden Bindeproteins für die jeweilige Komponente f) darstellt.

20

14) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 3) bis 13), dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungssubstanz f) ein Arzneimittel ist.

25

15) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 3) bis 13), dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungssubstanz f) eine Substanz ist, welche durch die Zellmembran in die Zelle eindringen kann.

30

- 16) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 14) oder 15), dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungssubstanz f) ausgewählt ist aus der Gruppe enthaltend Rapamycin, FK506, Cyclosporin A, Methotrexat, Folsäure, Retinoinsäure, Penicillin, 4-Hydroxy-Tamoxifen, Tamoxifen, Tetrazyklin oder ein Tetrazyklin-isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosidkonjugat.
- 5
- 17) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 4) bis 16) dadurch charakterisiert, daß die Bindesequenz [Komponente b5)] für ein zelluläres Regulatorprotein ein zelluläres Bindeprotein oder ein Teil dieses Bindeproteins ist.
- 10
- 18) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 17), dadurch charakterisiert, daß das zelluläre Bindeprotein oder ein Teil dieses Bindeproteins an ein zelluläres Regulatorprotein bindet, das ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend p53, pRb, p130, Max, MAD, VHL, cdk-4, MTS-1 (p16), WT-1, SMAD-2, DPC-4.
- 15
- 19) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 17), dadurch charakterisiert, daß die Komponente b5) ausgewählt ist aus einer Gruppe von zellulären Bindeproteinen umfassend E2F-1, -2, -3, -4, -5, Cyclin-D1, -D2, -D3 oder -C, Cyclin A, -E, Myc, Transkriptionsfaktor PU.1 oder Elf-1, Elongin-B, -C, p14, p15, p16, p18, p21, p27, p53, Myc, cdk-4, DPC-4 und SMAD-2.
- 20
- 20) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 17), dadurch charakterisiert, daß die Bindesequenz [Komponente b5)] für ein zelluläres Regulatorprotein ein virales Bindeprotein oder ein Teil dieses Bindeproteins ist.
- 25
- 21) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 20), dadurch charakterisiert, daß das virale Bindeprotein oder ein Teil dieses Bindeproteins an ein zelluläres Regulatorprotein bindet, das ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend p53, pRb (p110), NF $\kappa$ B, p130, CBF-1, Lyn-Tyrosinkinase, bak und bax.
- 30

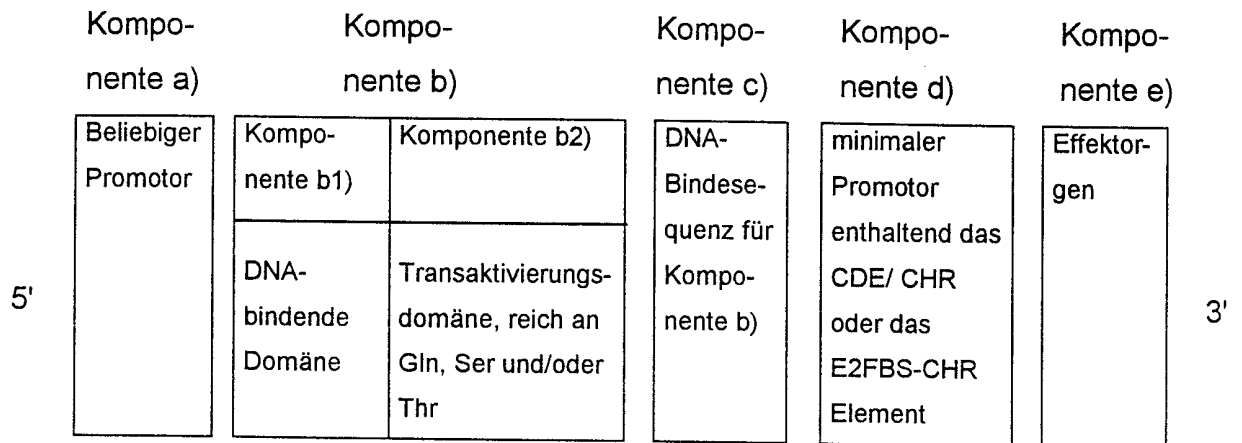
- 22) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 20), dadurch charakterisiert, daß die Komponente b5) ausgewählt ist aus einer Gruppe von viralen Bindeproteinen, umfassend IE 84 von CMV, E1B (55 kD) von AV, EBNA-5 von EBV, BHFR von EBV, E6 von HPV-16 oder -18, x Protein von HBV, T-Antigen von SV40, E1A von AV, EBNA-2 von EBV, EBNA-1 von EBV, E7 von HPV, Tax von HIV, LMP-1 von EBV, LMP-2A oder LMP-2B von EBV, E1B (16 kD) von AV, E1B (10 kD) von AV.
- 23) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 4), dadurch charakterisiert, daß die Bindesequenz [Komponente b5)] für ein zelluläres Regulatorprotein ein Antikörper oder ein Teil dieses Antikörpers ist.
- 24) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 23), dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz [Komponente c)] zur Bindung von Komponente b), b') oder b'') ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend die Bindesequenz für das Gal4-Protein, die Bindesequenz für das LexA-Protein, die Bindesequenz für das Lac I Repressorprotein, die Bindesequenz für den Tetrazyklin-Operator und die Bindesequenz für das ZFHD-1 Protein.
- 25) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 23), dadurch gekennzeichnet, daß der minimale Promotor (Komponente d)] enthaltend CDE-CHR entnommen ist aus einer Gruppe umfassend das cdc25C Gen, das cdc2 (cdk-1) Gen und das Cyclin A Gen.
- 26) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 23), dadurch gekennzeichnet, daß der minimale Promotor [Komponente d)] enthaltend E2F-BS-CHR entnommen ist dem Bmyb Gen.
- 27) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 20), dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Effektorgen (Komponente c) um ein Gen handelt, das für einen Wirkstoff kodiert, der ausgewählt ist aus der Gruppe

- enthaltend Cytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren, antiproliferativ oder zytostatisch oder apoptotisch wirkende Proteine, entzündungserregende oder immunsuppressive Proteine, Antikörper, Antikörperfragmente, Angiogeneseinhibitoren, Peptidhormone, Gerinnungsfaktoren, Gerinnungshemmer, fibrinolytische Proteine, auf den Blutkreislauf wirksame Peptide oder Proteine, Blutplasmae Proteine und Antigene von Infektionserregern oder von Zellen oder von Tumoren, wobei das ausgewählte Antigen eine Immunreaktion bewirkt.
- 5
- 10 28) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 26), dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Effektorgen um ein Gen handelt, das für ein Enzym kodiert, welches eine Vorstufe eines Pharmakons in ein Pharmakon spaltet.
- 15 29) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 26), dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Effektorgen um ein Gen handelt, das für ein Ligand-Wirkstoff-Fusionsprotein oder ein Ligand-Enzym-Fusionsprotein kodiert, wobei der Ligand ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend Cytokine, Wachstumsfaktoren, Antikörper, Antikörperfragmente, Peptidhormone, Mediatoren und Zelladhäsionsmoleküle.
- 20
- 30) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Nukleinsäure um DNS handelt.
- 25 31) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäurekonstrukt eingefügt ist in einen Vektor.
- 32) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 30), dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Plasmidvektor handelt.

- 33) Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 32), dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen viralen Vektor handelt.
- 5 34) Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 1) bis 33), dadurch gekennzeichnet, daß es äußerlich, peroral, intravesikal, nasal, intrabronchial oder in den Magen-Darm-Trakt verabreicht oder in ein Organ, in eine Körperhöhle, in die Muskulatur, subkutan oder in den Blutkreislauf injiziert wird zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.
- 10 35) Isolierte Zelle dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 1) bis 33) enthält.
- 15 36) Isolierte Zelle gemäß Anspruch 35), wobei diese Zelle ausgewählt ist aus einer Gruppe enthaltend Endothelzellen, Lymphozyten, Makrophagen, blutbildende Zellen, Fibroblasten, Muskelzellen, Leberzellen, Nierenzellen, Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes, der Luftwege, der harnableitenden Wege, der Geschlechtsorgane, der Haut, Gliazellen, Zellen des Nervensystems, Tumorzellen und Leukämiezellen.
- 20 37) Verwendung eines Nukleinsäurekonstruktes nach einem der Ansprüche 1) bis 34) oder einer Zelle nach Anspruch 33) zur Herstellung eines Heilmittels zur Behandlung einer Erkrankung ausgewählt aus der Gruppe enthaltend Infektionen, Tumore, Leukämien, Autoimmunerkrankungen, Allergien, Arthritiden, Entzündungen, Organabstoßungen, Transplantat gegen Wirt-  
25 Reaktionen, Blutgerinnungserkrankungen, Kreislaufkrankungen, Blutarmut, Hormonerkrankungen und ZNS-Schäden.
- 30 38) Verfahren zur Herstellung der Nukleinsäurekonstrukte nach einem der Ansprüche 1) bis 37), bei dem die einzelnen Komponenten schrittweise zusammenligiert werden.

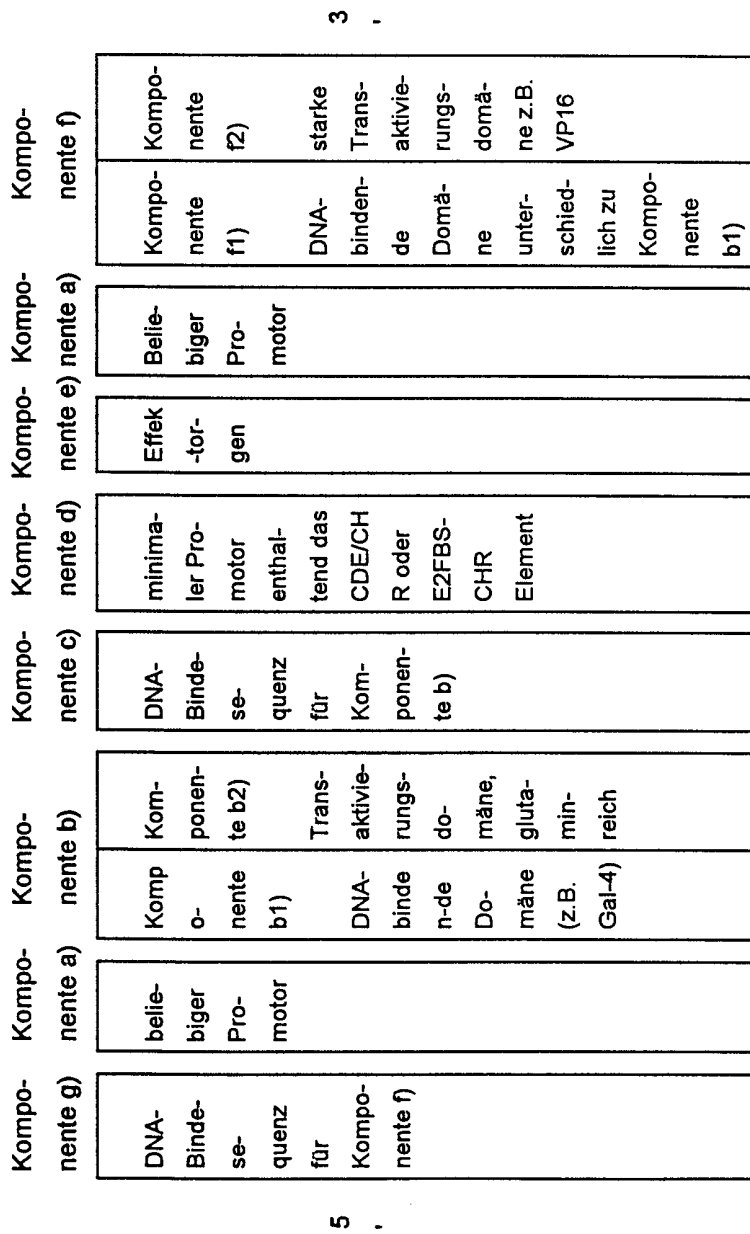
- 39) Verwendung einer Zelle nach einem der Ansprüche 35) oder 36) zur Herstellung eines Heilmittels zur Therapie von Erkrankungen gemäß Anspruch 32) dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Zelle äußerlich, intravesikal, nasal, intrabronchial, oral oder in den Magen-Darm-Trakt verabreicht oder in  
5 ein Organ, in eine Körperhöhle, in die Muskulatur, subkutan oder in den Blutkreislauf injiziert wird zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.

Figur 1

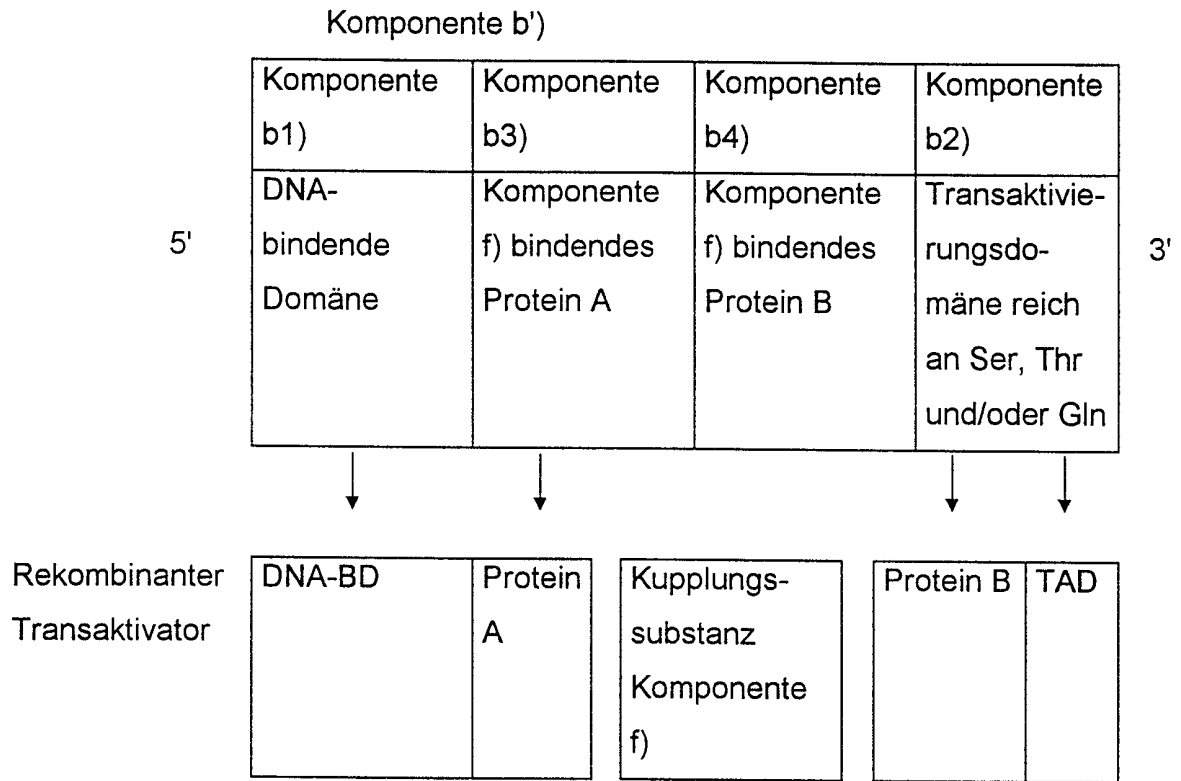




Figur 2/II



Figur 3



Figur 4

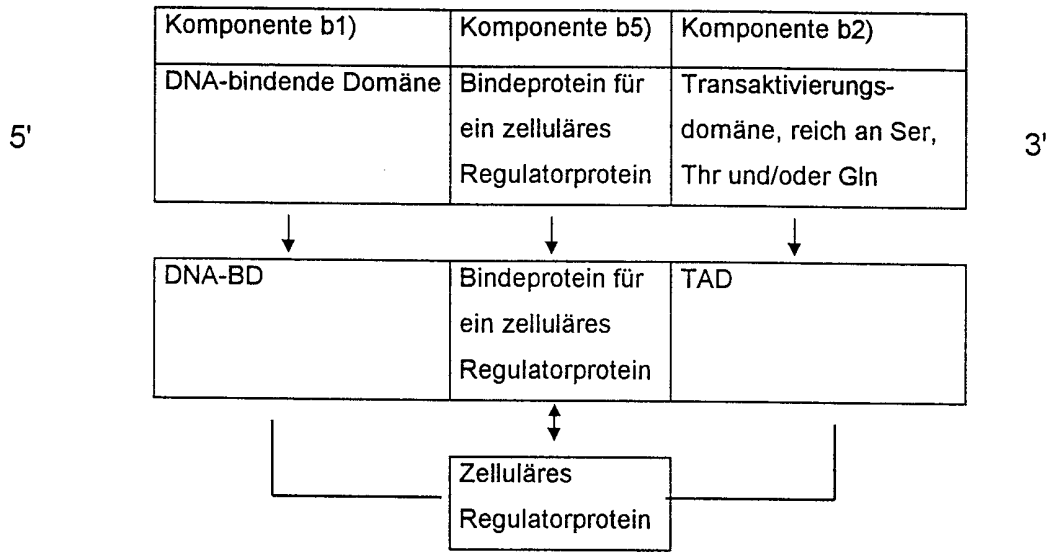


Fig 5a

RTA-Konstrukt:

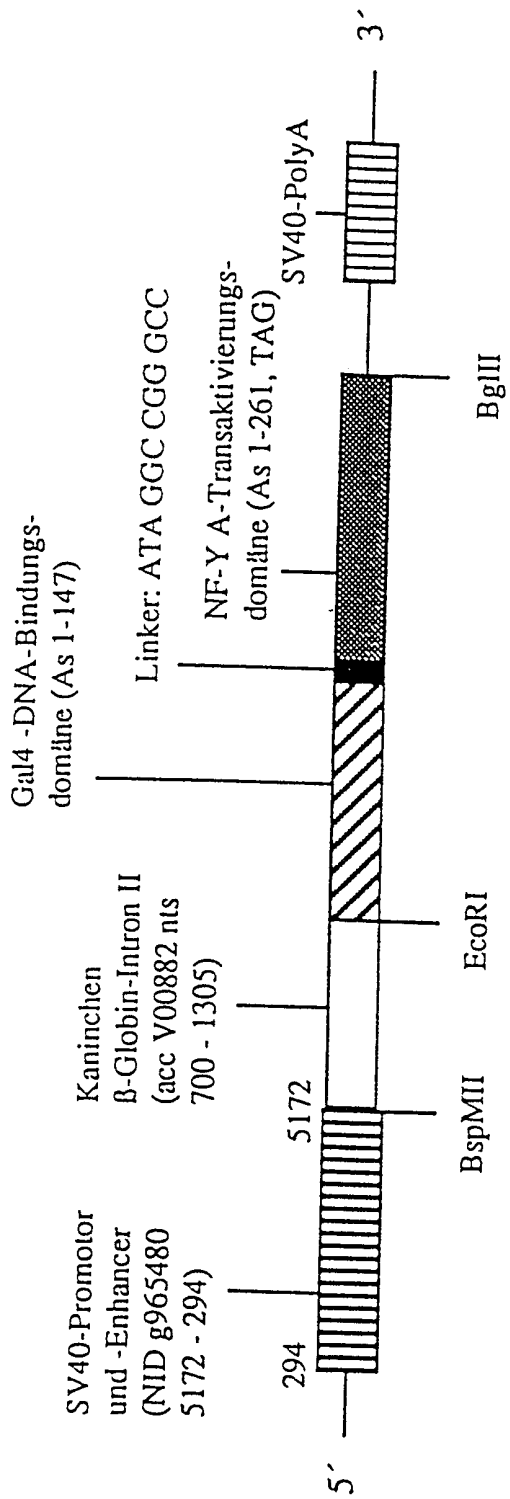


Fig 5b

Reporterkonstrukt 1:

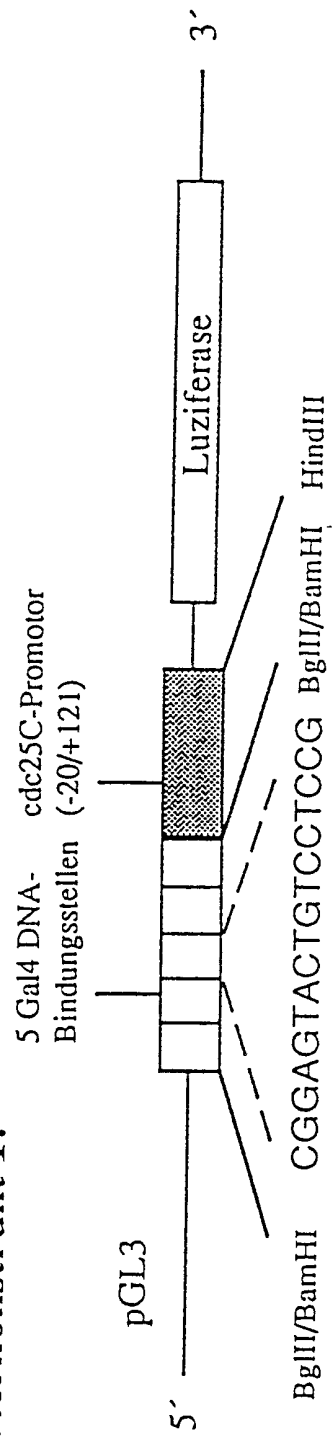


Fig 5c

Reporterkonstrukt 2:

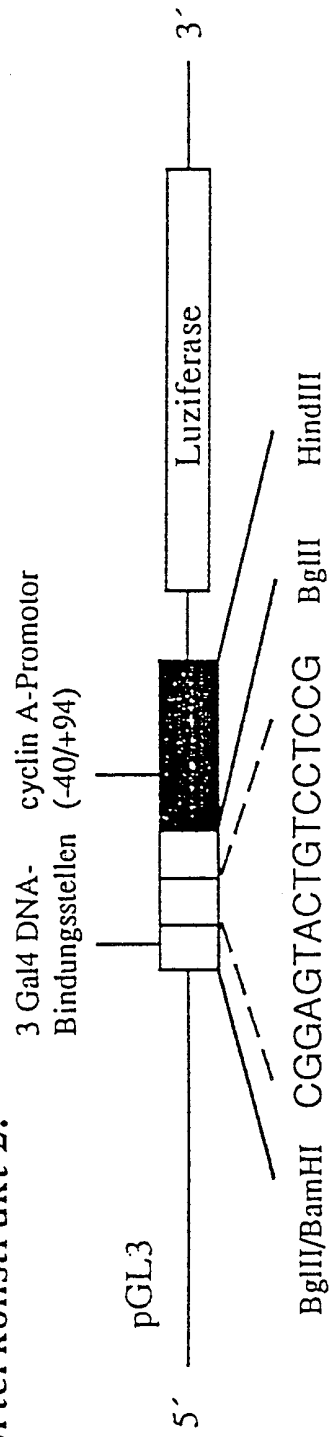


Fig 5d

Reporterkonstrukt 3:

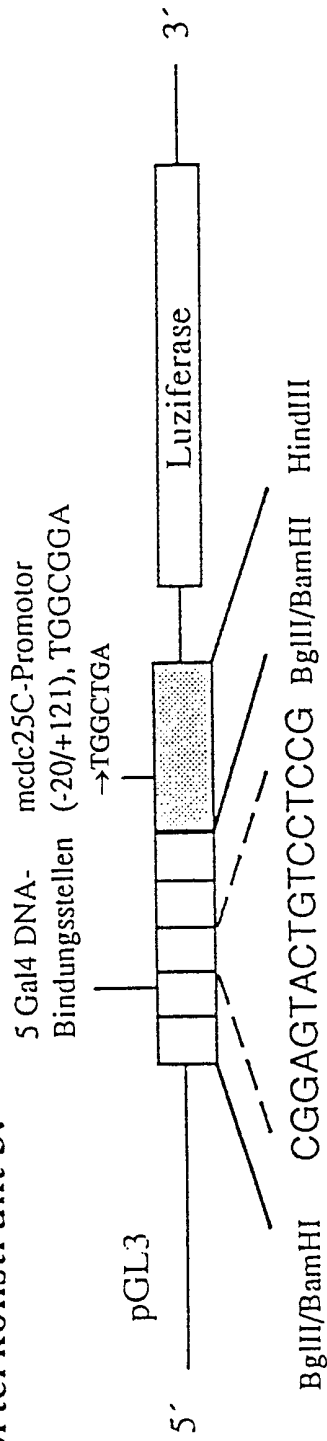


Fig 6a

Kontrollkonstrukt 1 = "pGL3promoter" (Promega)

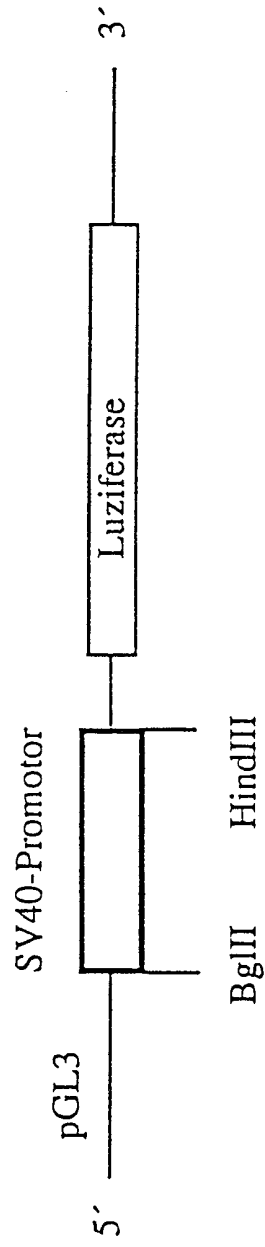


Fig 6b

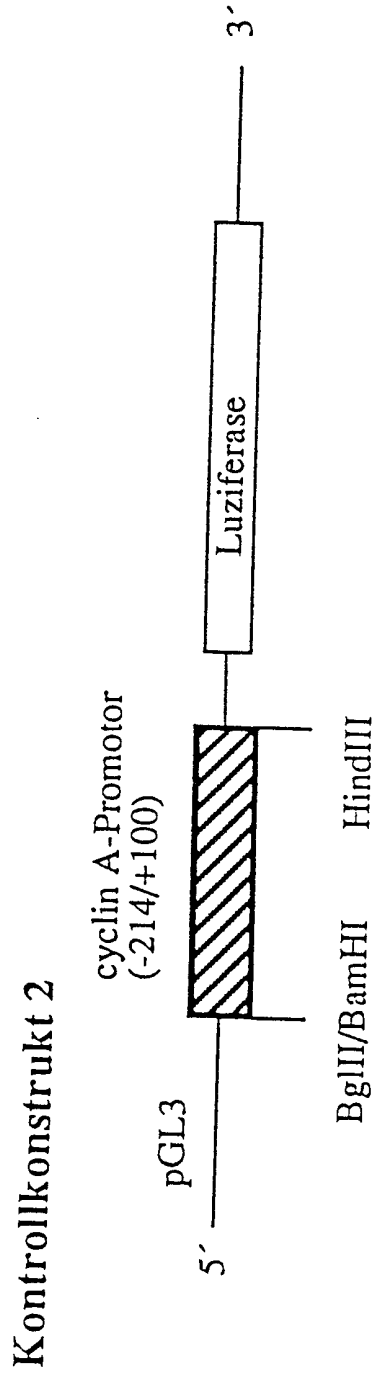


Fig 6c

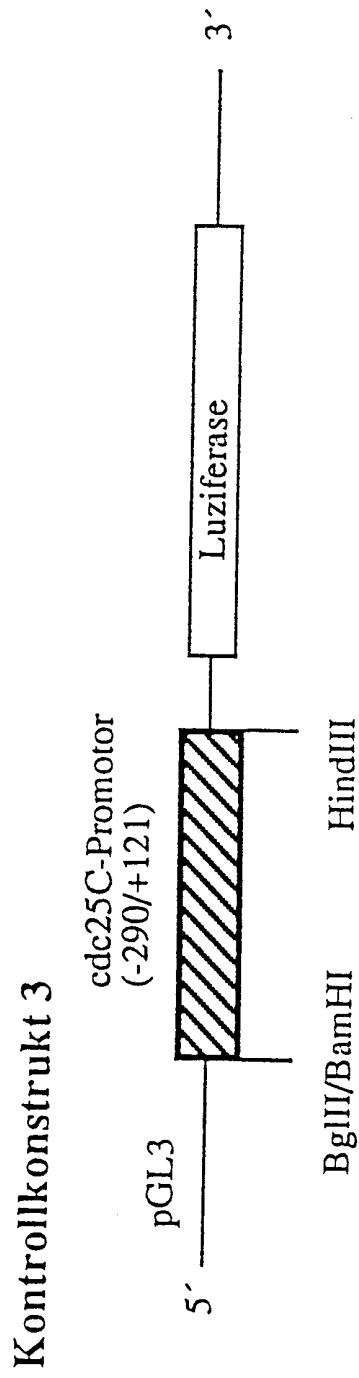


Fig 7a

CMV-GN:

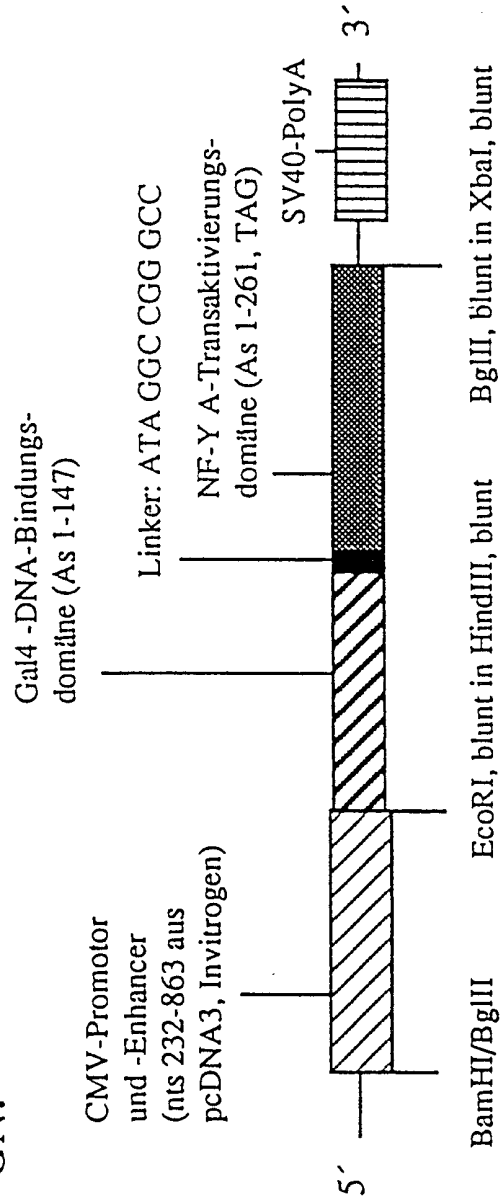


Fig 7b

Tyr-GN:

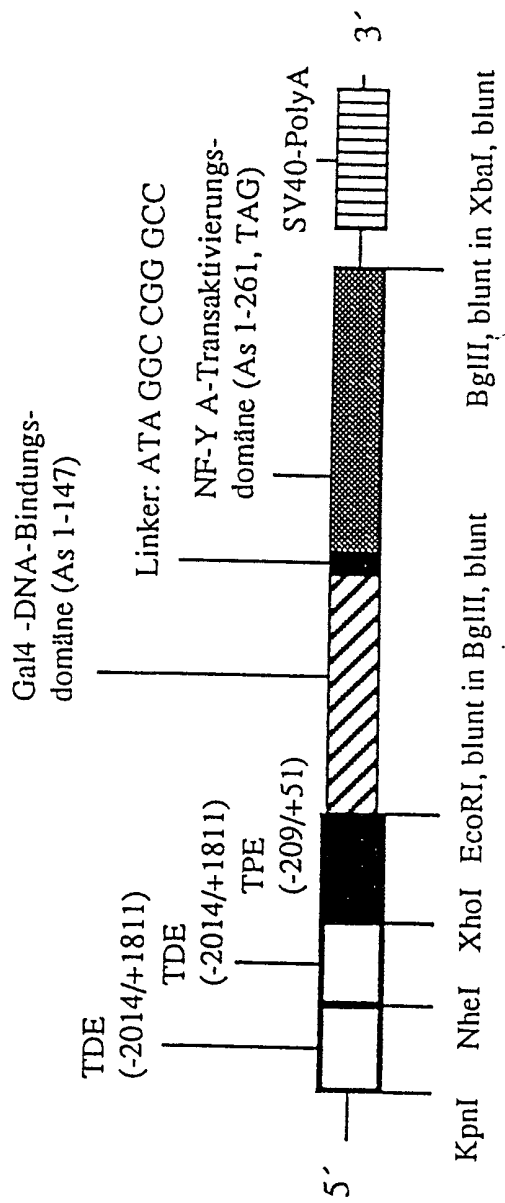


Fig 7c

Tyr-G:

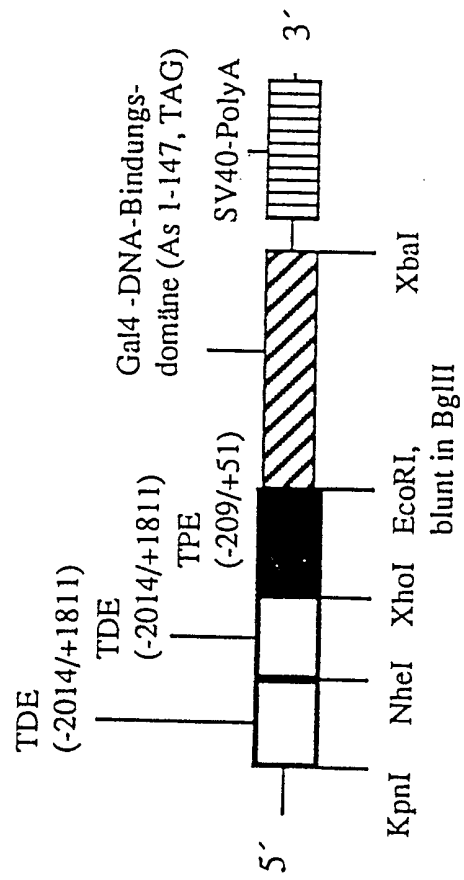


Fig 8a

8GCycA:

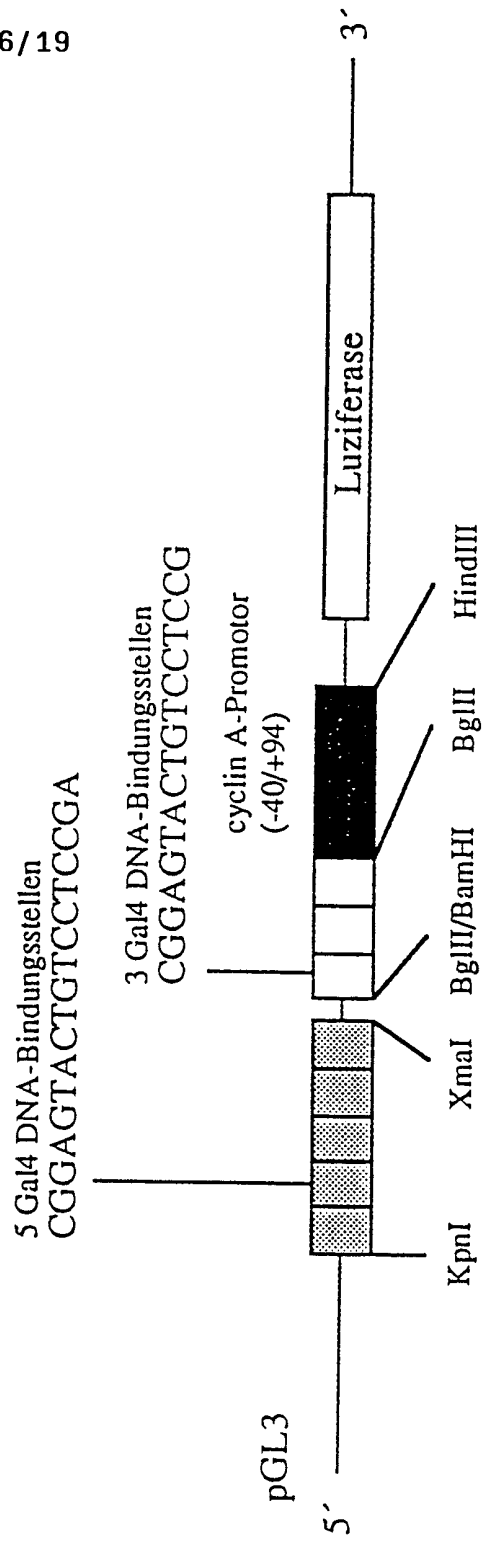


Fig 8b

8GCycART7:

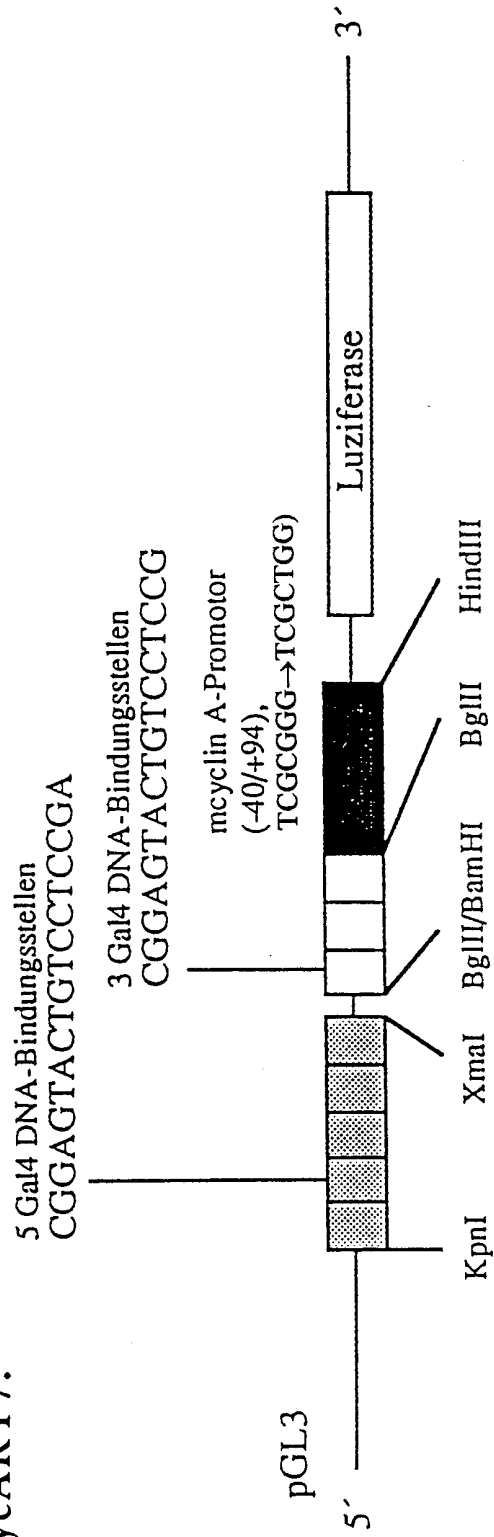


Fig 9a

basic = pGL3basic (Promega)

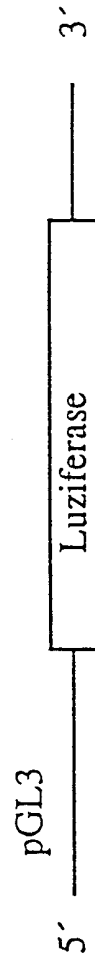
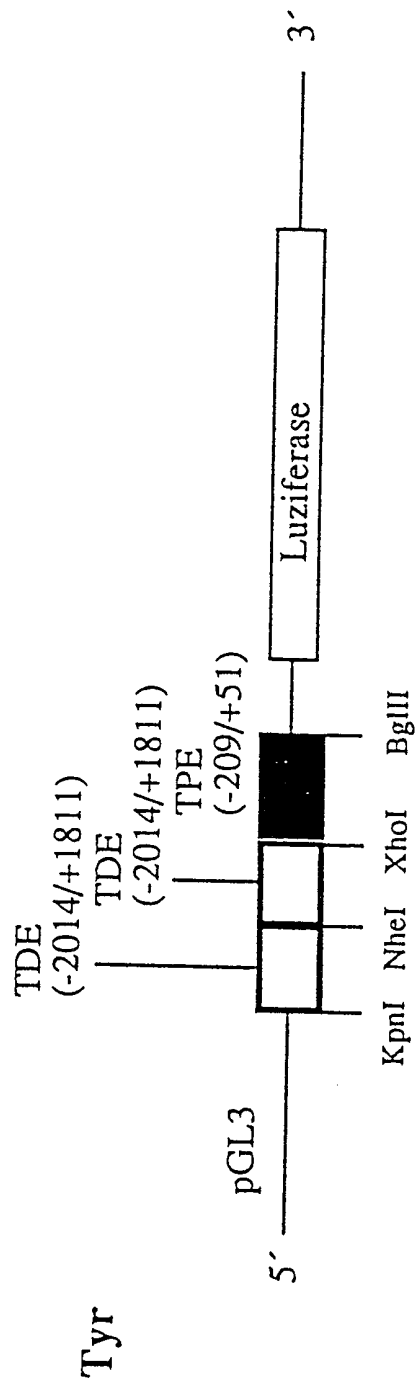


Fig 9b



## 1

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Frankfurt/M.
- (D) BUNDESLAND: -
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 65926
- (G) TELEFON: 069-305-3005
- (H) TELEFAX: 069-357175
- (I) TELEX: -

10

15

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Expressionssysteme enthaltend chimaere Promotoren mit Bindungsstellen für rekombinante Transkriptionsfaktoren

20

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

30

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Myc E-Box
- (B) LAGE:1..26

45

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGAAGCAGAC CACGTGGTCT GCTTCC

26

50

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

60

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Myc D E-Box

(B) LAGE:1..17

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AGCAGGTGTT GGGAGGC

17

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

15 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

20 (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: (-Myosin-Heavy Chain gene

(B) LAGE:1..41

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGCCGATGGG CAGATAGAGG GGGCCGATGG GCAGATAGAG G

41

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

35 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

40

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Gal 4-Bindestelle

(B) LAGE:1..17

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGGACAACCTG TTGACCG

17

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

55 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- (ix) MERKMAL:  
 5 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Gal 4-Bindestelle  
 (B) LAGE:1..17
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:  
 10 CGGAGGACTG TCCTCCG 17
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
- 1 15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 17 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 2 20 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- 2 25 (ix) MERKMAL:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Gal 4-Bindestelle  
 (B) LAGE:1..17
- 3 30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:  
 CGGAGTACTG TCCTCCG 17
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:
- 3 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 4 40 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- 4 45 (ix) MERKMAL:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Lex A-Bindestelle  
 (B) LAGE:1..20
- 5 50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:  
 TACTGTATGT ACATACAGTA 20
- 5 55 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:
- 6 60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## 4

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Lac Operator-Bindesequenz  
(B) LAGE:1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GAATTGTGAG GCTCACAATT C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: tet O-Bindesequenz  
(B) LAGE:1..42

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCGAGTTTAC CACTCCCTAT CAGTGATAGA GAAAAGTGAA AG

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: ZFH D-1-Bindesequenz  
(B) LAGE:1..12

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TAATGATGGG CG

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

5

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Linker

(B) LAGE:1..12

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ATAGGCCGGG CC

12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: onal Application No

PCT/EP 99/04527

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/85 C12N15/63 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DE 197 56 975 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 24 June 1999 (1999-06-24) page 11, line 49 - line 55; claims 34-39; figure 1 ---	1,4,17, 20,23
P,X	EP 0 922 768 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 16 June 1999 (1999-06-16) claims 1-34 ---	1,4, 17-23
Y	EP 0 848 061 A (HOECHST AG) 17 June 1998 (1998-06-17) cited in the application  the whole document ---	1-3, 5-12, 14-16, 24-39
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
° Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such a combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of drawing of the international search report	
8 December 1999	16/12/1999	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Hornig, H	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/EP 99/04527

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 06938 A (BEHRINGWERKE AG ;SEDLACEK HANS HARALD (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7 March 1996 (1996-03-07) cited in the application the whole document ---	1-3, 5-12, 14-16, 24-39
A	DE 196 39 103 A (HOECHST AG) 26 March 1998 (1998-03-26) page 6, line 30 - line 40; examples 1,2 ---	1-39
A	EP 0 790 313 A (HOECHST AG) 20 August 1997 (1997-08-20) cited in the application the whole document ---	1-39
A	WO 96 06943 A (PROLIFIX LTD ;BEHRINGWERKE AG (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7 March 1996 (1996-03-07) cited in the application the whole document ---	
A	WO 96 06941 A (BEHRINGWERKE AG ;SEDLACEK HANS HARALD (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7 March 1996 (1996-03-07) cited in the application the whole document ---	
A	WO 96 06940 A (BEHRINGWERKE AG ;SEDLACEK HANS HARALD (DE); BOSSLET KLAUS (DE); MU) 7 March 1996 (1996-03-07) cited in the application the whole document ---	
A	WO 96 06939 A (BEHRINGWERKE AG ;SEDLACEK HANS HARALD (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7 March 1996 (1996-03-07) cited in the application the whole document ---	
A	ZWICKER J ET AL: "CELL CYCLE REGULATION OF CDC25C TRANSCRIPTION IS MEDIATED BY THE PERIODIC REPRESSION OF THE GLUTAMINE-RICH ACTIVATORS NF-Y AND SP1" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 23, no. 19, page 3822-3830 XP002038968 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/04527

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU N ET AL: "CELL CYCLE-REGULATED REPRESSION OF B-MYB TRANSCRIPTION: COOPERATION OF AN E2F SITE WITH A CONTIGUOUS COREPRESSOR ELEMENT" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 15, page 2905-2910 XP002038969 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	
A	ZWICKER J ET AL: "Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression" TRENDS IN GENETICS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, vol. 13, no. 1, page 3-6 XP004015048 ISSN: 0168-9525 the whole document ---	
A	WO 96 40946 A (UNIV YALE ;SCHATZ DAVID G (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) the whole document ---	
A	WO 94 29442 A (BASF AG ;BUJARD HERMANN (DE); GOSSEN MANFRED (DE); VOSS JEFFREY W) 22 December 1994 (1994-12-22) the whole document ---	
A	WO 96 41865 A (ARIAD GENE THERAPEUTICS INC ;CLACKSON TIMOTHY (US); HOLT DENNIS A) 27 December 1996 (1996-12-27) the whole document -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/EP 99/04527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19756975 A	24-06-1999	AU 9720498 A	08-07-1999
		AU 9720598 A	08-07-1999
		CN 1227871 A	08-09-1999
		CN 1225367 A	11-08-1999
		CZ 9804223 A	14-07-1999
		CZ 9804225 A	14-07-1999
		EP 0926236 A	30-06-1999
		EP 0926237 A	30-06-1999
		HU 9802961 A	28-07-1999
		PL 330451 A	21-06-1999
		PL 330452 A	21-06-1999
EP 0922768 A	16-06-1999	DE 19751587 A	29-07-1999
		AU 9325698 A	10-06-1999
		CN 1221033 A	30-06-1999
		CZ 9803768 A	16-06-1999
EP 0848061 A	17-06-1998	DE 19651443 A	18-06-1998
		AU 4836297 A	18-06-1998
		CA 2224334 A	11-06-1998
		CN 1191898 A	02-09-1998
		CZ 9703977 A	17-06-1998
		HU 9702377 A	28-09-1998
		JP 11000176 A	06-01-1999
		PL 323657 A	22-06-1998
		WO 9606938 A	07-03-1996
AU 3387495 A	22-03-1996		
EP 0777739 A	11-06-1997		
JP 10507626 T	28-07-1998		
AU 711012 B	07-10-1999		
AU 3263995 A	22-03-1996		
AU 696593 B	17-09-1998		
AU 3473295 A	22-03-1996		
AU 690336 B	23-04-1998		
AU 3473395 A	22-03-1996		
AU 695458 B	13-08-1998		
AU 3518595 A	22-03-1996		
CA 2198080 A	07-03-1996		
CA 2198462 A	07-03-1996		
CA 2198472 A	07-03-1996		
CA 2198473 A	07-03-1996		
CA 2198474 A	07-03-1996		
CN 1158144 A	27-08-1997		
WO 9606939 A	07-03-1996		
WO 9606940 A	07-03-1996		
WO 9606941 A	07-03-1996		
EP 0802985 A	29-10-1997		
EP 0804601 A	05-11-1997		
EP 0807183 A	19-11-1997		
EP 0777740 A	11-06-1997		
FI 970674 A	21-04-1997		
FI 970768 A	24-02-1997		
WO 9606943 A	07-03-1996		
JP 10505234 T	26-05-1998		
JP 10506526 T	30-06-1998		
JP 10508188 T	18-08-1998		
US 5830880 A	03-11-1998		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9606938 A		NO 970756 A	26-02-1997
DE 19639103 A	26-03-1998	AU 3919997 A BR 9704857 A CA 2211008 A EP 0848063 A JP 10108687 A	26-03-1998 27-10-1998 24-03-1998 17-06-1998 28-04-1998
EP 0790313 A	20-08-1997	DE 19605274 A AU 1265097 A CA 2197286 A CZ 9700418 A HU 9700429 A JP 10004980 A US 5885833 A	14-08-1997 21-08-1997 14-08-1997 17-09-1997 28-10-1997 13-01-1998 23-03-1999
WO 9606943 A	07-03-1996	AU 711012 B AU 3263995 A AU 690733 B AU 3387495 A AU 696593 B AU 3473295 A AU 690336 B AU 3473395 A AU 695458 B AU 3518595 A CA 2198080 A CA 2198462 A CA 2198472 A CA 2198473 A CA 2198474 A CN 1158144 A WO 9606938 A WO 9606939 A WO 9606940 A WO 9606941 A EP 0802985 A EP 0777739 A EP 0804601 A EP 0807183 A EP 0777740 A FI 970674 A FI 970768 A JP 10507626 T JP 10505234 T JP 10506526 T JP 10508188 T US 5830880 A NO 970756 A	07-10-1999 22-03-1996 30-04-1998 22-03-1996 17-09-1998 22-03-1996 23-04-1998 22-03-1996 13-08-1998 22-03-1996 07-03-1996 07-03-1996 07-03-1996 07-03-1996 07-03-1996 27-08-1997 07-03-1996 07-03-1996 07-03-1996 07-03-1996 29-10-1997 11-06-1997 05-11-1997 19-11-1997 11-06-1997 21-04-1997 24-02-1997 28-07-1998 26-05-1998 30-06-1998 18-08-1998 03-11-1998 26-02-1997
WO 9606941 A	07-03-1996	DE 19524720 A AU 690336 B AU 3473395 A CA 2181022 A CA 2198462 A EP 0807183 A EP 0753580 A JP 9023889 A	16-01-1997 23-04-1998 22-03-1996 13-01-1997 07-03-1996 19-11-1997 15-01-1997 28-01-1997

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9606941	A	US 5854019	A 29-12-1998	
		AU 711012	B 07-10-1999	
		AU 3263995	A 22-03-1996	
		AU 690733	B 30-04-1998	
		AU 3387495	A 22-03-1996	
		AU 696593	B 17-09-1998	
		AU 3473295	A 22-03-1996	
		AU 695458	B 13-08-1998	
		AU 3518595	A 22-03-1996	
		CA 2198080	A 07-03-1996	
		CA 2198472	A 07-03-1996	
		CA 2198473	A 07-03-1996	
		CA 2198474	A 07-03-1996	
		CN 1158144	A 27-08-1997	
		WO 9606938	A 07-03-1996	
		WO 9606939	A 07-03-1996	
		WO 9606940	A 07-03-1996	
		EP 0802985	A 29-10-1997	
		EP 0777739	A 11-06-1997	
		EP 0804601	A 05-11-1997	
		EP 0777740	A 11-06-1997	
		FI 970674	A 21-04-1997	
		FI 970768	A 24-02-1997	
		WO 9606943	A 07-03-1996	
		JP 10507626	T 28-07-1998	
		JP 10505234	T 26-05-1998	
		JP 10506526	T 30-06-1998	
		JP 10508188	T 18-08-1998	
		US 5830880	A 03-11-1998	
		NO 970756	A 26-02-1997	
<hr/>				
WO 9606940	A	07-03-1996	AU 711012	B 07-10-1999
			AU 3263995	A 22-03-1996
			AU 690733	B 30-04-1998
			AU 3387495	A 22-03-1996
			AU 696593	B 17-09-1998
			AU 3473295	A 22-03-1996
			AU 690336	B 23-04-1998
			AU 3473395	A 22-03-1996
			AU 695458	B 13-08-1998
			AU 3518595	A 22-03-1996
			CA 2198080	A 07-03-1996
			CA 2198462	A 07-03-1996
			CA 2198472	A 07-03-1996
			CA 2198473	A 07-03-1996
			CA 2198474	A 07-03-1996
			CN 1158144	A 27-08-1997
			WO 9606938	A 07-03-1996
			WO 9606939	A 07-03-1996
			WO 9606941	A 07-03-1996
			EP 0802985	A 29-10-1997
			EP 0777739	A 11-06-1997
			EP 0804601	A 05-11-1997
			EP 0807183	A 19-11-1997
			EP 0777740	A 11-06-1997
			FI 970674	A 21-04-1997
			FI 970768	A 24-02-1997
			WO 9606943	A 07-03-1996

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9606940	A	JP 10507626	T 28-07-1998
		JP 10505234	T 26-05-1998
		JP 10506526	T 30-06-1998
		JP 10508188	T 18-08-1998
		US 5830880	A 03-11-1998
		NO 970756	A 26-02-1997
-----			
WO 9606939	A	07-03-1996	
		AU 711012	B 07-10-1999
		AU 3263995	A 22-03-1996
		AU 690733	B 30-04-1998
		AU 3387495	A 22-03-1996
		AU 696593	B 17-09-1998
		AU 3473295	A 22-03-1996
		AU 690336	B 23-04-1998
		AU 3473395	A 22-03-1996
		AU 695458	B 13-08-1998
		AU 3518595	A 22-03-1996
		CA 2198080	A 07-03-1996
		CA 2198462	A 07-03-1996
		CA 2198472	A 07-03-1996
		CA 2198473	A 07-03-1996
		CA 2198474	A 07-03-1996
		CN 1158144	A 27-08-1997
		WO 9606938	A 07-03-1996
		WO 9606940	A 07-03-1996
		WO 9606941	A 07-03-1996
		EP 0802985	A 29-10-1997
		EP 0777739	A 11-06-1997
		EP 0804601	A 05-11-1997
		EP 0807183	A 19-11-1997
		EP 0777740	A 11-06-1997
		FI 970674	A 21-04-1997
		FI 970768	A 24-02-1997
		WO 9606943	A 07-03-1996
JP 10507626	T 28-07-1998		
JP 10505234	T 26-05-1998		
JP 10506526	T 30-06-1998		
JP 10508188	T 18-08-1998		
US 5830880	A 03-11-1998		
NO 970756	A 26-02-1997		
-----			
WO 9640946	A	19-12-1996	
		US 5851796	A 22-12-1998
		AU 6274596	A 30-12-1996
		EP 0832254	A 01-04-1998
		JP 11507539	T 06-07-1999
-----			
WO 9429442	A	22-12-1994	
		AU 684524	B 18-12-1997
		AU 7108194	A 03-01-1995
		CA 2165162	A 22-12-1994
		EP 0705334	A 10-04-1996
		JP 9500526	T 21-01-1997
		US 5650298	A 22-07-1997
		US 5789156	A 04-08-1998
		US 5888981	A 30-03-1999
		US 5859310	A 12-01-1999
		US 5589362	A 31-12-1996
		US 5814618	A 29-09-1998
		US 5866755	A 02-02-1999

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9429442 A		US 5912411 A US 5922927 A	15-06-1999 13-07-1999
WO 9641865 A	27-12-1996	AU 6270696 A CA 2219080 A EP 0833894 A	09-01-1997 27-12-1996 08-04-1998

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04527

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C12N15/85 C12N15/63 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RESEARCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	DE 197 56 975 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 24. Juni 1999 (1999-06-24) Seite 11, Zeile 49 - Zeile 55; Ansprüche 34-39; Abbildung 1 ---	1,4,17, 20,23
P, X	EP 0 922 768 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 16. Juni 1999 (1999-06-16) Ansprüche 1-34 ---	1,4, 17-23
Y	EP 0 848 061 A (HOECHST AG) 17. Juni 1998 (1998-06-17) in der Anmeldung erwähnt  das ganze Dokument ---	1-3, 5-12, 14-16, 24-39
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  8. Dezember 1999		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  16/12/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Hornig, H

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04527

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 06938 A (BEHRINGWERKE AG ; SEDLACEK HANS HARALD (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7. März 1996 (1996-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-3, 5-12, 14-16, 24-39
A	DE 196 39 103 A (HOECHST AG) 26. März 1998 (1998-03-26) Seite 6, Zeile 30 - Zeile 40; Beispiele 1,2 ---	1-39
A	EP 0 790 313 A (HOECHST AG) 20. August 1997 (1997-08-20) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-39
A	WO 96 06943 A (PROLIFIX LTD ; BEHRINGWERKE AG (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7. März 1996 (1996-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	WO 96 06941 A (BEHRINGWERKE AG ; SEDLACEK HANS HARALD (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7. März 1996 (1996-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	WO 96 06940 A (BEHRINGWERKE AG ; SEDLACEK HANS HARALD (DE); BOSSLET KLAUS (DE); MU) 7. März 1996 (1996-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	WO 96 06939 A (BEHRINGWERKE AG ; SEDLACEK HANS HARALD (DE); MUELLER ROLF (DE)) 7. März 1996 (1996-03-07) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
A	ZWICKER J ET AL: "CELL CYCLE REGULATION OF CDC25C TRANSCRIPTION IS MEDIATED BY THE PERIODIC REPRESSION OF THE GLUTAMINE-RICH ACTIVATORS NF-Y AND SP1" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 23, Nr. 19, Seite 3822-3830 XP002038968 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>LIU N ET AL: "CELL CYCLE-REGULATED REPRESSION OF B-MYB TRANSCRIPTION: COOPERATION OF AN E2F SITE WITH A CONTIGUOUS COREPRESSOR ELEMENT" NUCLEIC ACIDS RESEARCH,GB,OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 15, Seite 2905-2910 XP002038969 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
A	<p>ZWICKER J ET AL: "Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression" TRENDS IN GENETICS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, Bd. 13, Nr. 1, Seite 3-6 XP004015048 ISSN: 0168-9525 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
A	<p>WO 96 40946 A (UNIV YALE ;SCHATZ DAVID G (US)) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
A	<p>WO 94 29442 A (BASF AG ;BUJARD HERMANN (DE); GOSSEN MANFRED (DE); VOSS JEFFREY W) 22. Dezember 1994 (1994-12-22) das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
A	<p>WO 96 41865 A (ARIAD GENE THERAPEUTICS INC ;CLACKSON TIMOTHY (US); HOLT DENNIS A) 27. Dezember 1996 (1996-12-27) das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter:  Sales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04527

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19756975 A	24-06-1999	AU 9720498 A	08-07-1999
		AU 9720598 A	08-07-1999
		CN 1227871 A	08-09-1999
		CN 1225367 A	11-08-1999
		CZ 9804223 A	14-07-1999
		CZ 9804225 A	14-07-1999
		EP 0926236 A	30-06-1999
		EP 0926237 A	30-06-1999
		HU 9802961 A	28-07-1999
		PL 330451 A	21-06-1999
		PL 330452 A	21-06-1999
EP 0922768 A	16-06-1999	DE 19751587 A	29-07-1999
		AU 9325698 A	10-06-1999
		CN 1221033 A	30-06-1999
		CZ 9803768 A	16-06-1999
EP 0848061 A	17-06-1998	DE 19651443 A	18-06-1998
		AU 4836297 A	18-06-1998
		CA 2224334 A	11-06-1998
		CN 1191898 A	02-09-1998
		CZ 9703977 A	17-06-1998
		HU 9702377 A	28-09-1998
		JP 11000176 A	06-01-1999
		PL 323657 A	22-06-1998
WO 9606938 A	07-03-1996	AU 690733 B	30-04-1998
		AU 3387495 A	22-03-1996
		EP 0777739 A	11-06-1997
		JP 10507626 T	28-07-1998
		AU 711012 B	07-10-1999
		AU 3263995 A	22-03-1996
		AU 696593 B	17-09-1998
		AU 3473295 A	22-03-1996
		AU 690336 B	23-04-1998
		AU 3473395 A	22-03-1996
		AU 695458 B	13-08-1998
		AU 3518595 A	22-03-1996
		CA 2198080 A	07-03-1996
		CA 2198462 A	07-03-1996
		CA 2198472 A	07-03-1996
		CA 2198473 A	07-03-1996
		CA 2198474 A	07-03-1996
		CN 1158144 A	27-08-1997
		WO 9606939 A	07-03-1996
		WO 9606940 A	07-03-1996
		WO 9606941 A	07-03-1996
		EP 0802985 A	29-10-1997
		EP 0804601 A	05-11-1997
		EP 0807183 A	19-11-1997
		EP 0777740 A	11-06-1997
		FI 970674 A	21-04-1997
		FI 970768 A	24-02-1997
		WO 9606943 A	07-03-1996
		JP 10505234 T	26-05-1998
		JP 10506526 T	30-06-1998
		JP 10508188 T	18-08-1998
		US 5830880 A	03-11-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04527

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9606938 A		NO 970756 A	26-02-1997
DE 19639103 A	26-03-1998	AU 3919997 A	26-03-1998
		BR 9704857 A	27-10-1998
		CA 2211008 A	24-03-1998
		EP 0848063 A	17-06-1998
		JP 10108687 A	28-04-1998
EP 0790313 A	20-08-1997	DE 19605274 A	14-08-1997
		AU 1265097 A	21-08-1997
		CA 2197286 A	14-08-1997
		CZ 9700418 A	17-09-1997
		HU 9700429 A	28-10-1997
		JP 10004980 A	13-01-1998
		US 5885833 A	23-03-1999
WO 9606943 A	07-03-1996	AU 711012 B	07-10-1999
		AU 3263995 A	22-03-1996
		AU 690733 B	30-04-1998
		AU 3387495 A	22-03-1996
		AU 696593 B	17-09-1998
		AU 3473295 A	22-03-1996
		AU 690336 B	23-04-1998
		AU 3473395 A	22-03-1996
		AU 695458 B	13-08-1998
		AU 3518595 A	22-03-1996
		CA 2198080 A	07-03-1996
		CA 2198462 A	07-03-1996
		CA 2198472 A	07-03-1996
		CA 2198473 A	07-03-1996
		CA 2198474 A	07-03-1996
		CN 1158144 A	27-08-1997
		WO 9606938 A	07-03-1996
		WO 9606939 A	07-03-1996
		WO 9606940 A	07-03-1996
		WO 9606941 A	07-03-1996
		EP 0802985 A	29-10-1997
		EP 0777739 A	11-06-1997
		EP 0804601 A	05-11-1997
		EP 0807183 A	19-11-1997
		EP 0777740 A	11-06-1997
		FI 970674 A	21-04-1997
		FI 970768 A	24-02-1997
		JP 10507626 T	28-07-1998
		JP 10505234 T	26-05-1998
		JP 10506526 T	30-06-1998
		JP 10508188 T	18-08-1998
		US 5830880 A	03-11-1998
		NO 970756 A	26-02-1997
WO 9606941 A	07-03-1996	DE 19524720 A	16-01-1997
		AU 690336 B	23-04-1998
		AU 3473395 A	22-03-1996
		CA 2181022 A	13-01-1997
		CA 2198462 A	07-03-1996
		EP 0807183 A	19-11-1997
		EP 0753580 A	15-01-1997
		JP 9023889 A	28-01-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 99/04527

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9606941 A		US 5854019 A	29-12-1998
		AU 711012 B	07-10-1999
		AU 3263995 A	22-03-1996
		AU 690733 B	30-04-1998
		AU 3387495 A	22-03-1996
		AU 696593 B	17-09-1998
		AU 3473295 A	22-03-1996
		AU 695458 B	13-08-1998
		AU 3518595 A	22-03-1996
		CA 2198080 A	07-03-1996
		CA 2198472 A	07-03-1996
		CA 2198473 A	07-03-1996
		CA 2198474 A	07-03-1996
		CN 1158144 A	27-08-1997
		WO 9606938 A	07-03-1996
		WO 9606939 A	07-03-1996
		WO 9606940 A	07-03-1996
		EP 0802985 A	29-10-1997
		EP 0777739 A	11-06-1997
		EP 0804601 A	05-11-1997
		EP 0777740 A	11-06-1997
		FI 970674 A	21-04-1997
		FI 970768 A	24-02-1997
		WO 9606943 A	07-03-1996
		JP 10507626 T	28-07-1998
		JP 10505234 T	26-05-1998
		JP 10506526 T	30-06-1998
		JP 10508188 T	18-08-1998
		US 5830880 A	03-11-1998
		NO 970756 A	26-02-1997
WO 9606940 A	07-03-1996	AU 711012 B	07-10-1999
		AU 3263995 A	22-03-1996
		AU 690733 B	30-04-1998
		AU 3387495 A	22-03-1996
		AU 696593 B	17-09-1998
		AU 3473295 A	22-03-1996
		AU 690336 B	23-04-1998
		AU 3473395 A	22-03-1996
		AU 695458 B	13-08-1998
		AU 3518595 A	22-03-1996
		CA 2198080 A	07-03-1996
		CA 2198462 A	07-03-1996
		CA 2198472 A	07-03-1996
		CA 2198473 A	07-03-1996
		CA 2198474 A	07-03-1996
		CN 1158144 A	27-08-1997
		WO 9606938 A	07-03-1996
		WO 9606939 A	07-03-1996
		WO 9606941 A	07-03-1996
		EP 0802985 A	29-10-1997
		EP 0777739 A	11-06-1997
		EP 0804601 A	05-11-1997
		EP 0807183 A	19-11-1997
		EP 0777740 A	11-06-1997
		FI 970674 A	21-04-1997
		FI 970768 A	24-02-1997
		WO 9606943 A	07-03-1996

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04527

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9606940 A		JP 10507626 T	28-07-1998
		JP 10505234 T	26-05-1998
		JP 10506526 T	30-06-1998
		JP 10508188 T	18-08-1998
		US 5830880 A	03-11-1998
		NO 970756 A	26-02-1997
WO 9606939 A	07-03-1996	AU 711012 B	07-10-1999
		AU 3263995 A	22-03-1996
		AU 690733 B	30-04-1998
		AU 3387495 A	22-03-1996
		AU 696593 B	17-09-1998
		AU 3473295 A	22-03-1996
		AU 690336 B	23-04-1998
		AU 3473395 A	22-03-1996
		AU 695458 B	13-08-1998
		AU 3518595 A	22-03-1996
		CA 2198080 A	07-03-1996
		CA 2198462 A	07-03-1996
		CA 2198472 A	07-03-1996
		CA 2198473 A	07-03-1996
		CA 2198474 A	07-03-1996
		CN 1158144 A	27-08-1997
		WO 9606938 A	07-03-1996
		WO 9606940 A	07-03-1996
		WO 9606941 A	07-03-1996
		EP 0802985 A	29-10-1997
		EP 0777739 A	11-06-1997
		EP 0804601 A	05-11-1997
		EP 0807183 A	19-11-1997
		EP 0777740 A	11-06-1997
		FI 970674 A	21-04-1997
		FI 970768 A	24-02-1997
		WO 9606943 A	07-03-1996
		JP 10507626 T	28-07-1998
		JP 10505234 T	26-05-1998
JP 10506526 T	30-06-1998		
JP 10508188 T	18-08-1998		
US 5830880 A	03-11-1998		
NO 970756 A	26-02-1997		
WO 9640946 A	19-12-1996	US 5851796 A	22-12-1998
		AU 6274596 A	30-12-1996
		EP 0832254 A	01-04-1998
		JP 11507539 T	06-07-1999
WO 9429442 A	22-12-1994	AU 684524 B	18-12-1997
		AU 7108194 A	03-01-1995
		CA 2165162 A	22-12-1994
		EP 0705334 A	10-04-1996
		JP 9500526 T	21-01-1997
		US 5650298 A	22-07-1997
		US 5789156 A	04-08-1998
		US 5888981 A	30-03-1999
		US 5859310 A	12-01-1999
		US 5589362 A	31-12-1996
		US 5814618 A	29-09-1998
		US 5866755 A	02-02-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/04527

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9429442 A		US 5912411 A US 5922927 A	15-06-1999 13-07-1999
WO 9641865 A	27-12-1996	AU 6270696 A CA 2219080 A EP 0833894 A	09-01-1997 27-12-1996 08-04-1998