

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 -4565

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.04.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.06.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/050206**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/07641**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/57658**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 39/12

A 61 K 39/245

A 61 K 39/25

A 61 P 31/22

(71) Přihlašovatel:

THE GENERAL HOSPITAL
CORPORATION, Boston, MA, US;

(72) Původce:

Seed Brian, Boston, MA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kompaktní replikony viru Epstein-barr

(57) Anotace:

Toto řešení v podstatě popisuje sekvence nukleových kyselin, které podporují epizomální replikaci v savčích buňkách. Tyto sekvence nukleových kyselin zahrnují za a) deletovanou sekvenci OriP a za b) deletovanou sekvenci EBNA 1 operativně napojenou na promotor.

CZ 1999 - 4565 A3

Kompaktní replikony viru Epstein-barr

Oblast techniky

Epstein-barr virus (EBV) je lidský oparový virus s latentní fází, který je používán v genové terapii vektorů.

Dosavadní stav techniky

Epstein-barr virus (EBV) je lidský oparový virus s latentní fází charakterizovaný stabilní epizomální propagací cirkulární formy virové DNA. Pro latentní replikaci fází jsou požadovány dva přerušované prvky DNA, cis-actingový zdroj replikace OriP a Epstein-barr nukleární antigen 1 (EBNA 1), samotný virově kodovaný protein pro replikaci (Yates et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 3806-10, 1984; Yates et al., Nature 313: 812-5, 1985. Většina EBV vektorů jsou velmi velké vektory jako 10 kb nebo více (bez inzertu), vzhledem k velké velikosti EBNA 1 a OriP segmentů. Velikost většiny existujících EBV EBNA 1 a OriP segmentů byla interferována s rozvojem zlepšené exprese vektorů a tvorbou kompaktní genové exprese a stálostí kazet, které mohou být uloženy v jiných vehikulech dodávajících geny jako jsou retroviry nebo adenoviry.

Podstata vynálezu

Tento vynález v podstatě označuje sekvence nukleových kyselin které podporují epizomální replikaci v savčích buňkách. Tyto sekvence nukleových kyselin zahrnují za a) deletovanou sekvenci OriP a za b) deletovanou sekvenci EBNA 1 operativně napojenou na promotor a sekvence nukleových kyselin má délku alespoň menší než 3 kb výhodně menší než 2 kb a nejvýhodněji menší než 1.8

kb.

Ve výhodných provedeních sekvenci OriP zahrnuje přibližně zbytky 1-495 SEQ ID NO: 1, sekvence EBNA 1 zahrnuje přibližně zbytky 627-1718 SEQ ID NO: 1, a sekvence nukleových kyselin dále zahrnují sekvenci shodnou polyadenylaci (například přibližně sekvenci SEQ ID NO: 2) a promotorem je virový promotor.

Ve spojených ohledech tento vynález uvádí vektory a buňky (například savčí buňky a výhodněji lidské buňky), které zahrnují tyto sekvence nukleových kyselin.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 popisuje sekvenci zkrácený EBV OriP a kazetu EBNA 1.

Obrázek 2 popisuje sekvenci kompaktní syntetické dvousměrné polyadenylace, která může být použita v konjukci s kompaktním EBV replikonem.

Příklad provedení vynálezu

Příklad 1

Po rozsáhlé deleci a mutagenezi byla zjištěna možnost vložit cis- a trans-actingové funkce nezbytné pro epizomální replikaci EBV do fragmentu o délce alespoň 2 kb. Ve zvláštním případě ukázkový fragment o délce 1748 párů bází, který reaguje jako kompaktní EBV replikon je ukázán na obrázku 1 (SEQ ID NO: 1). Tento fragment obsahuje všechny sekvence potřebné pro účinnou expresi proteinu EBNA-1 s výjimkou sekvence shodné polyadenylaci. Fragment je Bgl12 až BamH1 segment, který obsahuje prvek OriP mezi zbytky 1 a 495, modifikovaný promotor z thymidin kinázového genu viru Herplex simplex 1 mezi zbytky 496 až 616 a kodující sekvenci pro vypuštěný a modifikovaný EBNA 1 gen mezi zbytky 627 a 1718. Plasmidové vektory založené na této sekvenci replikují jako epizomy v jádru transfektovaných buněk nehlodavčího původu (Yates et al., 1985, viz výše).

Aby byla celkově minimalizována délka sekvence, fragment uvedený výše byl označen, aby mohl být vložen do proti směru exprese genu sekvence

dvousměrné polyadenylace ve vhodném vektoru.

Příklad sekvence kompaktní syntetické dvousměrné polyadenylace je ukázán na obrázku 2 (SEQ ID NO: 2).

Průmyslové použití

Kompaktní replikony viru Epstein-barr (EBV) nalézají použití v genové terapii vektorů například ve vehikulech dodávajících geny jako jsou expresní vektory. Ostatní provedení jsou uvnitř nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sekvence nukleové kyseliny která podporuje epizomální replikaci v savčí buňce, přičemž uvedená sekvence nukleové kyseliny obsahuje za a) sekvenci OriP a za b) sekvenci EBNA 1 operativně napojenou na promotor, sekvence nukleové kyseliny má délku menší než 3 kb .
2. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 1, kde uvedená sekvence nukleové kyseliny má délku menší než 2 kb .
3. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 1, kde uvedená sekvence nukleové kyseliny má délku menší než 1,8 kb .
4. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 1, kde sekvence OriP obsahuje přibližně zbytky 1-495 SEQ ID NO: 1.
5. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 1, kde sekvence EBNA 1 obsahuje přibližně zbytky 627-1718 SEQ ID NO: 1.
6. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 1, kde uvedená sekvence nukleové kyseliny dále obsahuje sekvenci shodnou polyadenylaci.
7. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 5, kde uvedená sekvence shodné polyadenylace obsahuje přibližně sekvenci SEQ ID NO: 2.
8. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 1, kde uvedeným promotorem je virový promotor.
9. Vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 1, kde uvedený vektor je schopný replikování jako episom v jádru transfektované buňky.
10. Buňka obsahující sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 1.

27.12.99

1999-4565

1 AGATCTCCTT GGGAGGTGGC GGCATATGCA AAGGATAGCA CTCCCCTCT
51 ACTACTGGGT ATCATATGCT GACTGTATAT GCATGAGGAT AGCATATGCT
101 ACCCGGATAC AGATTAGGAT AGCATATACT ACCCAGATAT AGATTAGGAT
151 AGCATATGCT ACCCAGATAT AGATTAGGAT AGCCTATGCT ACCCAGATAT
201 AAATTAGGAT AGCATATACT ACCCAGATAT AGATTAGGAT AGCATATGCT
251 ACCCAGATAT AGATTAGGAT AGCCTATGCT ACCCAGATAT AGATTAGGAT
301 AGCATATGCT ACCCAGATAT AGATTAGGAT AGCATATGCT ATCCAGATCG
351 CTGTTCCCTA GGACCCTTTT ACTAACCTA ATTCGATAGC ATATGCTTCC
401 CGTTGGGTAA CATATGCTAT TGAATTAGGG TTAGTCTGGA TAGTATATAC
451 TACTACCCGG GAAGCATATG CTACCCGTTT AGGGTTAATA AGGGGGATCT
501 CCCC GCCCAG CGTCTTGTCA TTGGCGAACT CGAACACGCA GATGCAGTCG
551 GGGCGGCGCG GTCCAGGTC CACTTCGCAT ATTAAGGTGA CACGCGGGC
601 CTCGAACACA GCTGCAGGCC GCCATCATGG CACATGGACG AGGACGGGGA
651 AGAGGACGAG GACGAGGAGG CGGAAGACCA GGAGCCCCGG GCGGCTCAGG
701 ATCAGGGCCA AGACATAGAG ATGGTGTCCG GAGACCCCAA AAACGTCCAA
751 GTTGCAATTGG CTGCAAAGGG ACCCACGGTG GAACAGGAGC AGGAGCAGGA
801 GCGGGAGGGG CAGGAGCAGG AGGTGGAGGC CGGGTTCGAG GAGGCAGTGG
851 AGGCCGGGGT CGAGGAGGTA GTGGAGGCCG GGGTCGAGGA GGTAGTGGAG
901 GCCCGGGGG TAGAGGACGT GAAAGAGCCA GGGGGGAAG TCGTAAAAGA
951 GCCAGGGGGA GAGGTCGTGG ACGTGGAGAA AAGAGGCCCA GGAGTCCCAG
1001 TAGTCAGTCA TCATCATCCG GGTCTCCACC GCGCAGGCCC CCTCCAGGTA

FIG. 1

27.12.99

1999-4565

2/3

1051 GAAGGCCATT TTTCCACCCT GTAGGGGAAG CCGATTATTT TGAATACCAC
1101 CAAGAAGGCG GCCCAGATGG TGAGCCTGAC GTGCCCCCGC GCAGCGGGGG
1151 TCAGGGTGAT GGAGGCAGGC GCAAAAAGG AGGGTGGTTT GGAAAGCATC
1201 GTGGTCAAGG AGGTTCCAAC CCGAAATTTG AGAACATTGC AGAAGGTTTA
1251 AGAGCTCTCC TGGCTAGGAG TCACGTAGAA AGGACTACCG ACGAAGGAAC
1301 TTGGGTCGCC GGTGTGTTCG TATATGGAGG TAGTAAGACC TCCCTTTACA
1351 ACCTAAGGCG AGGAACTGCC CTGCTATTG CACAATGTCG TCTTACACCA
1401 TTGAGTCGTC TCCCCTTTGG AATGGCCCCT GGACCCGGCC CACAACCTGG
1451 CCCGCTAAGG GAGTCCATTG TCTGTTATTT CATGGTCTTT TTACAAACTC
1501 ATATATTTGC TGAGGTTTTG AAGGATGCGA TTAAGGACCT TGTATGACA
1551 AAGCCCCTC CTACCTGCAA TATCAGGGTG ACTGTGTGCA GCTTTGACGA
1601 TGGAGTAGAT TTGCCTCCCT GGTTTCCACC TATGGTGGAA GGGGCTGCCG
1651 CGGAGGTGA TGACGGAGAT GACGGAGATG AAGGAGGTGA TGGAGATGAG
1701 GGTGAGGAAG GGCAGGAGTG ATGTAAGTTG TTAGGAGACG ATGGATCC

FIG. 1
(SEQ ID NO: 1)

27.12.99

1999-4565

3/3

1 GGATCCAAA ATAAATAAA ATAAAATTA AAAAAAAGT GTTGTGTCAC
51 ACAAAAACC AACACACATT TTTTTTGT TTTATAAACC CTTTATTGTT
101 AAC

FIG. 2
(SEQ ID NO: 2)