PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-2906**
(22) Přihlášeno: **14.01.1999**
(30) Právo přednosti: **12.02.1998 FR 1998/1715**
(40) Zveřejněno: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)
(47) Uděleno: **13.11.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **29.12.2008**
(Věstník č. 52/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/FR1999/000061**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/041396**

(11) Číslo dokumentu:
299 915
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 97/13866, WO 96/27665.
Bessis, A. et al.: „The neuron-restrictive silencer element: A dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain", PNAS USA 94, 5906-5911,1997; Schoenherr, C.J. and D.J. Anderson: „The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes", Science, 267(5202), 1360-1363, 1995; Martinou, J.C. et al.: „Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia", Neuron, 13 (4), 1017-1030, 1994; Nishiyama, S. et al.: „The silencer of mouse Pgk-2 consists of two discrete DNA elements that individually have no effect", Gene 141 (2), 261-266, 1994

(73) Majitel patentu:
AVENTIS PHARMA S. A., Antony, FR

(72) Původce:
Kiefer Hélene, Bitches, FR
Mallet Jacques, Paris, FR
Millecamps Stéphanie, Roncq, FR

(74) Zástupce:
ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
Rekombinantní nukleová kyselina obsahující negativní regulační elementy pro nervově specifickou expresi transgenu a její použití

(57) Anotace:
Řešení se týká nových konstruktu a zpusobu řízení exprese nukleových kyselin, zejména konstruktů obsahujících sekvence NRSE, kterými lze dosáhnout cílené exprese transgenu v nervových buňkách in vivo nebo ex vivo. Řešení je zejména vhodné pro aplikace přenosu genu in vivo, např. pro účely genové terapie nebo vědeckého výzkumu.

CZ 299915 B6

Rekombinantní nukleová kyselina obsahující negativní regulační elementy pro nervově specifickou expresi transgenu a její použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nové rekombinantní nukleové kyseliny, konstruktů a vektorů, obsahujících tyto konstrukty, které umožňují regulovat expresi nukleových kyselin. Konkrétně se vynález týká nových způsobů, konstruktů a vektorů, které umožňují dosáhnout cílené exprese transgenu v nervových buňkách *in vivo* nebo *ex vivo*. Vynález je zejména vhodný pro aplikace, kde se gen přenáší *in vivo*, např. při léčebném nebo výzkumném použití.

Dosavadní stav techniky

Genová terapie *in vivo* nebo *ex vivo* umožňuje lokální a účinný přenos genů (transgenů) kódujících požadované faktory, a to zejména do nervového systému hostitele. V tomto ohledu byla úspěšně použita řada vektorů pro přenos různých transgenů do nervových buněk *in vivo* nebo *ex vivo*. Mezi těmito vektory lze uvést zejména virové vektory typu adenoviru, AAV nebo HSV, některé nevirové vektory typu kationtových polymerů (např. polyetylenimin). Tyto vektory umožnily účinně a trvale přenést geny do buněk nervového systému *in vivo* (WO 94/08026, WO 93/09239 a WO 96/02655). Možnost uskutečnit takový přenos genů skýtá široké pole aplikací, zejména v oblasti medicíny. Tyto vektory lze užít pro genovou terapii *in vivo* nebo *ex vivo*. V současné době jsou v běhu klinické studie týkající se přenosu trofických faktorů do nervových buněk. Tyto vektory lze také užít pro vytvoření transgenních zvířat, která umožní testování sloučenin, nebo pro různé značící studie nebo studie biologické dostupnosti. Ve všech těchto aplikacích, i když se zdá, že je dosaženo účinného a trvalého přenosu, je nezbytná potřeba regulovat expresi transgenů. Byly již popsány různé systémy, které se pokoušely omezit expresi transgenu výlučně na určitou tkáň, např. pomocí tzv. „tkáňové specifických" promotorů nebo komplexních chimérických systémů, které vyžadovaly použití několika konstruktů a/nebo regulačních faktor. Jako příklad tkáňové specifického promotoru lze zmínit konkrétně promotor gliového fibrilárního kyselého proteinu, který je zejména aktivní v gliových nervových buňkách. Avšak regulační systémy, které jsou v současnosti dostupné, trpí některými nevýhodami, zejména tím, že jejich síla a/nebo selektivita nejsou vždy dostatečné. Takže u valné většiny známých systémů je dobré selektivity dosaženo na úkor síly promotoru a je tudíž obtížné dosáhnout exprese, která je současně dostatečně silná, stálá a specifická.

Předkládaný vynález poskytuje konstrukty a vektory obsahující tyto konstrukty, které umožňují odstranit nevýhody dosavadního stavu techniky. Předkládaný vynález popisuje chimérický promotor, který umožňuje neuronově zacílenou expresi. Vynález využívá negativní regulační elementy, které zabraňují expresi genu v jiných buňkách než nervových buňkách. Konstrukty tohoto typu vykazují řadu výhod ve srovnání se systémy dosavadního stavu. Na jedné straně, jelikož represorové sekvence a všudypřítomné (tj. nespecifické) promotory jsou často krátké a dobře charakterizované, je možné je snadno kombinovat s dalšími regulačními elementy. Na druhé straně, tyto regulační elementy lze teoreticky kombinovat s jakýmkoliv všudypřítomným (ubikvitárním) promotorem a tudíž představují vtipný systém, který dovoluje dosáhnout nervově specifické exprese požadovaného transgenu jednoduchým způsobem, dokonce i tehdy, když použitý vektor nemá žádný nebo má jen malý tropismus pro nervové buňky. Velký počet studií popisuje *cis* sekvence, které potlačují transkripci neuronových genů v jiných než nervových buňkách. Jeden typ sekvence s touto vlastností je element NRSE („neurone restrictive silencer element", neuronový element restriktivního umlčení), označovaný také RE–1s (represorový element 1). NRSE je krátká sekvence, přibližné velikosti 21 bp, která byla nalezena v poloze proti směru transkripce („upstream") několika neuronových genů: např. genu SCG10 [1], genu pro sodíkový kanál II [2] a synapsin I [3]. Kromě toho analogické sekvence byly nalezeny proti směru transkripce velkého počtu neuronových genů, i když jejich funkce nebyla dosud vždy prokázána [4].

Tyto sekvence NRSE reprimují (potlačují) expresi genů v jiných než nervových buňkách tím, že váží specifické transkripční faktory, tj. protein NRSF („neurone restrictive silencer factor", neuronový restriktivní umlčovací faktor), nazývaný také REST (RE–1, „silencing transcription factor", RE–1 faktor umlčení transkripce), který je přítomen výlučně v jiných buňkách než nervových [5]. Tento protein patří k rodině transkripčních faktorů se „zinkovými prsty". V průběhu vývoje zasahuje, aby inhiboval represi neuronových genů v ostatních buňkách kromě nervových, a i v dospělosti se podílí na udržování této represe. Výzkumné skupiny, které charakterizovaly přítomnost sekvencí NRSE proti směru transkripce neuronových genů také ověřily schopnost těchto sekvencí snižovat expresi reportérového genu po transfekci jiných buněk než nervových. Aby se toto ověřilo, kombinovala se sekvence NRSE s minimálním heterologním promotorem, což je promotor, který dovoluje pouze bazální transkripci. Tak např. když byla sekvence NRSE kalciového kanálu II umístěna proti směru transkripce promotoru thymidinkinázy, exprese reportérového genu se snížila na polovinu v buňkách jiných než nervových [9]. A podobně také dvě kopie sekvence NRSE synapsinu I kombinované s minimálním promotorem c fos snížily expresi v buňkách jiných než nervových o 75 % [3]. Kromě toho přítomnost sekvence NRSE také umožnila to, že aktivita promotoru SV 40 byla regulována v buňkách jiných než nervových [10].

Avšak sekvence NRSE nebyly nikdy užity k řízení exprese silného všudypřítomného (nespecifického) promotoru, ani nebyly využity z hlediska genové terapie. Takže dosud nebylo ukázáno, zda tyto sekvence jsou schopny potlačit expresi, která je indukována silným promotorem. Podobně také nebylo dosud nikdy ukázáno, jestli jsou tyto sekvence aktivní *in vivo*, když jsou umístěny do chimérického prostředí. Obecně řečeno, dosud nebylo prokázáno, zda tyto sekvence jsou aktivní *in vivo*, když se zkombinují s heterologním promotorem.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká rekombinantních nukleových kyselin, které dovolují nervově specifickou expresi genů. Vynález se také týká vektorů, které obsahují takové nukleové kyseliny, zejména virového původu, a také buněk, které obsahují tyto nukleové kyseliny a/nebo vektory. Vynález se také týká specifických chimérických promotorů, které jsou schopny exprimovat geny specificky v nervovém systému *in vivo*. Vynález se dále týká farmaceutických kompozic, které obsahují tyto elementy a jejich použití pro přenos genů.

Prvním aspektem předkládaného vynálezu je rekombinantní nukleová kyselina, která obsahuje:

- ubikvitární promotor
- jednu nebo několik sekvencí NRSE, a
- terapeutický gen.

Konstrukty podle vynálezu tudíž obsahují úsek pro represi, v jiných buňkách než neuronech, aktivní expresi terapeutického genu, který je indukován promotorem. Tento represorový úsek se skládá z jednoho nebo několika motivů NRSE.

Motiv NRSE, který se užívá podle předkládaného vynálezu, výhodně obsahuje následující sekvenci velikosti 21 bp nebo alespoň její část:

TTCAGCACCACGGAGAGTGCC (sekvence id. č. 1)

Tato sekvence odpovídá sekvenci NRSE genu SCG10 [2]. Nicméně je jasné, že motiv NRSE použitý podle předkládaného vynálezu může obsahovat i nějaké variace ve srovnání s touto sekvencí, pokud si uchovává výše uvedené represorové vlastnosti. Sekvence typu NRSE vykazující určitý stupeň variability byly nalezeny v různých genech, jak bylo popsáno v publikovaném článku Schoenherr et al. [4], který je plně zahrnut formou odkazu. Na základě pozorovaných variant

byla identifikována kanonická sekvence NRSE, která odpovídá sekvenci, se kterou se lze nejčastěji setkat. Jde o následující sekvenci:

TTCAGCACCACGGACAGCGCC (sekvence id. č. 2).

Výhodné varianty sekvence podle předkládaného vynálezu obsahují substituce týkající se 1 až 5 párů bází v sekvenci id. č. 2. Výhodněji jsou to varianty týkající se 1 až 3 párů bází. Nejvýhodněji se varianty týkají zbytků 1, 2, 10, 11, 15, 18, 19 a/nebo 20 výše uvedené sekvence. Substituce mohou odpovídat deleci nebo nahrazení báze jakoukoliv jinou bází. Takže motiv NRSE je představován obecně celou následující sekvencí nebo její částí:

NNCAGCACCNNGGANAGNNNC (sekvence id. č. 3),

kde N znamená bázi vybranou ze A, T, C a G. Specifické příklady motivů NRSE, které lze užít podle předkládaného vynálezu, jsou následující:

TTCAGCACCACGGACAGCGCC (sekvence id. č. 2)

TTCAGCACCACGGAGAGTGCC (sekvence id. č. 4)

TTCAGCACCGCGGACAGTGCC (sekvence id. č. 5)

TTCAGCACCTCGGACAGCATC (sekvence id. č. 6)

TTCAGCACCGCGGAGAGCGTC (sekvence id. č. 7)

TCCAGCACCGTGGACAGAGCC (sekvence id. č. 8)

TTCAGCACCGAGGACGGCGGA (sekvence id. č. 9)

ATCAGCACCACGGACAGCGGC (sekvence id. č. 10)

TTCAGCACCTAGGACAGAGGC (sekvence id. č. 11)

Kromě toho tyto motivy mohou obsahovat, na jednom z konců nebo na obou koncích, další báze, které neinterferují s výše popsanou represorovou aktivitou. Konkrétně tyto další báze mohou obsahovat restrikční místa, neutrální sekvence nebo sekvence pocházející z klonovacích kroků a obsahující např. úseky plazmidu nebo vektoru, nebo sekvence, které obklopují motiv NRSE v původním genu.

Tyto různé motivy lze připravit jakýmkoliv způsobem pro přípravu nukleových kyselin odborníkovi známým. Takže je lze např. připravit postupem automatizované syntézy užitím komerčně dostupného automatického syntetizátoru nukleových kyselin. Také je lze získat screeningem DNA knihoven, např. hybridizací se specifickými sondami nebo vazbou na specifické NRSF faktory. Kromě toho jakákoliv varianta sekvence id. č. 1 může být identifikována v DNA knihovně metodou vyhledávání homologie.

Jakmile je motiv NRSE syntetizován, může být funkčně testován. První test zejména obsahuje stanovení schopnosti daného motivu vázat NRSF faktor. To lze provádět různými způsoby, např. experimenty s retardací migrace v gelu, jak to bylo popsáno v publikacích Mori et al. [2] nebo Schoenherr et al. [5], které jsou zahrnuty formou odkazu. Pak se stanoví schopnost motivu reprimovat expresi, a to tak, že se tento motiv vloží do plazmidu, který obsahuje reportérový gen (chloramfenikolacetyltransferáza, luciferáza, lacZ, atd.) řízený promotorem, a porovnají se hladiny exprese reportérového genu v nervových buňkách a jiných než nervových buňkách. Tento postup je např. popsán v publikaci Schoenherr et al. [4, 5] a také v příkladech. Výhodně je motiv považován za funkční pokud poskytuje expresi reportérového genu v nervových buňkách a jiných než nervových buňkách lišící se alespoň o 40 %. Výhodněji je rozdíl v expresi alespoň 50 %, nejvýhodněji alespoň 60 %.

Jak již bylo uvedeno výše, nukleová kyselina podle vynálezu obsahuje jeden nebo několik motivů NRSE, které byly definovány výše. Pokud je přítomno několik motivů, tentýž stejný motiv se

může opakovat několikrát nebo je přítomno několik variant. Výhodně konstrukty podle vynálezu obsahují jeden motiv, který se opakuje několikrát. Konstrukty mohou obsahovat až 50 motivů. Výhodně je jeden motiv opakován 2 až 20 x, výhodně 3 až 15 x. Jak je ilustrováno v příkladech, výhodné výsledky byly získány, když byl motiv opakován 3, 6 nebo 12 x, a zvláště významné výsledky byly získány, když byl motiv opakován 6 a 12x.

Motivy NRSE se vkládají do konstruktů v jakémkoliv netranskribovaném nebo netranslatovaném úseku nebo v intronu. Výhodně se vkládají do nekódujících úseků 5'– konce a ještě výhodněji do proximálního úseku promotoru. Navíc, jelikož je aktivita těchto motivů nezávislá na jejich orientaci, je možné je vložit v orientaci souhlasné se směrem transkripce nebo v opačné. A nakonec, když se použije několik motivů, jsou výhodně uspořádány do tandemu, v jednom a témže úseku konstruktu. Avšak je jasné, že mohou být také vloženy do různých úseků.

Druhý element, který je součástí molekuly nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu, je promotor, který umožňuje, aby byl transgen exprimován v požadované buňce. Výhodným promotorem je promotor, který je aktivní v nervových buňkách nebo tkáních, a zvláště eukaryotický promotor. Promotor může být např. ubikvitární, tj. všudypřítomný, nespecifický promotor, tj. promotor, který je funkční ve většině typů buněk. Výhodnější je eukaryotický ubikvitární promotor.

Promotor je buďto autologní, tj. promotor, který pochází ze stejného biologického druhu jako buňka, v níž má dojít k expresi, nebo je to promotor xenogenní, který pochází z jiného druhu. K výhodným příkladům všudypřítomného eukaryotického promotoru patří silné promotory jako je promotor genu fosfoglycerátkinázy 1 (PGK). Tzv. silným promotorem je míněn jakýkoliv promotor, jehož aktivita je srovnatelná s aktivitou virového promotoru. V eukaryotických organismech je PGK enzym účastnící se glykolýzy. U myši promotor tohoto genu velikosti přibližně 500 bp obsahuje tzv. zesilovací úsek („enhancer") (–440/–120) a promotorový úsek (–120/+80), který obsahuje několik iniciačních míst transkripce [6]. Účinnost promotoru PGK byla ověřena v předchozích experimentech jak *in vitro* tak *in vivo* [7, 8].

V jednom výhodném provedení se vynález týká nukleové kyseliny, která obsahuje promotor PGK a jednu nebo několik sekvencí NRSE. Jak je ilustrováno v příkladech, tento typ konstruktu umožňuje nasměrovat nervově specifickou expresi transgenu. Vynález se dále týká chimérického promotoru, který obsahuje silný ubikvitární promotor a jednu nebo několik sekvencí NRSE. Vynález ukazuje, že tyto sekvence NRSE lze užít účinně k represi aktivity silného promotoru, a to i v podmínkách *in vivo*. To tudíž umožňuje využít tyto nové promotory v celé řadě aplikací. Specifický chimérický promotor podle předkládaného vynálezu je představován promotorem xNRSE–PGK, kde x je celé číslo od 1 do 50, výhodně od 1 do 20.

Příkladem dalších ubikvitárních eukaryotických promotorů, které lze užít v předkládaném vynálezu, jsou promotory, které řídí expresi genů obligatorního buněčného metabolismu (to jsou geny základního metabolismu zvané „domestic" nebo „housekeeping" geny, které kódují proteiny nezbytné pro funkce společné všem buňkám, jako je např. dýchání). Příklady těchto genů jsou geny enzymů zúčastněných v Krebsově cyklu, v buněčném dýchání nebo transkripci a replikaci jiných genů. Specifickým příkladem promotoru, který lze zmínit, je promotor genu α1–antitrypsinu, β–aktinu, vimentinu, aldolázy A nebo Ef1α (elongační faktor).

Promotor, který lze užít podle předkládaného vynálezu může být také eukaryotický promotor neurospecifického typu, což ještě zlepší specifitu pro nervové buňky. Příkladem takového promotoru, který lze zmínit, je promotor genu NSE (enoláza specifická pro neurony), NF (neurofilamenta), TH (tyrosin hydroxyláza), DAT (přenašeč dopaminu), CHAT (cholinacetyltransferáza), DBH (dopamin–β–hydroxyláza), TPH (tryptofanhydroxyláza) a GAD (dehydrogenáza kyseliny glutamové), obecněji řečeno všechny promotory genů pro enzymy syntézy nebo transportu nervových přenašečů (neurotransmiterů, neuromediátorů) nebo promotory genů, jejichž exprese je specifická pro dané typy nebo subtypy nervových nebo gliových buněk.

Nakonec vynález také zahrnuje užití virových promotorů, např. CMV (cytomegalovirus), RSV (virus Rousova sarkomu), TK (thymidinkináza), SV40 (opičí virus) a LTR (dlouhá koncová repetice).

Kromě toho obsahuje nukleová kyselina podle předkládaného vynálezu terapeutický gen. Terapeutický gen znamená ve smyslu předkládaného vynálezu jakoukoliv nukleovou kyselinu, která obsahuje alespoň jeden otevřený čtecí rámec, který kóduje RNA terapeutického nebo vakcinačního polypeptidu. Nukleová kyselina je komplementární, genomová, syntetická nebo semisyntetická DNA. Může být různého původu, ze savců, rostlin, virů nebo může jít o umělou sekvenci. Transkripční nebo translační produkt vykazuje terapeutické nebo vakcinační vlastnosti. Specifickým příkladem jsou enzymy, růstové faktory (zejména trofické faktory), neurotransmitery nebo jejich prekurzory, toxické faktory (thymidinkináza apod.), protilátky nebo fragmenty protilátek atd.

Vynález se také týká užití konstruktů podle vynálezu k nasměrování exprese jednoho několika genů kódujících RNA nebo protein, který je třeba exprimovat v neuronu, aniž by došlo k jeho expresi v jiných buňkách, k vytvoření zvířecích modelů nebo pro účely substituční nebo supresivní, etiologické nebo symptomatické léčby. Mohou to být geny např. z rodiny trofických faktorů jako neurotrofiny (NGF, BDNF, NT3, NT4–5, GMF atd.), rodiny růstových faktorů (jako fibroblastový růstový faktor, FGFa a FGFb), rodiny vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), epidermálního růstového faktoru (EGF) a superrodiny TGFβ, včetně rodin GDNF/neurturin a TGFβ.

Mohou to být také geny, které kódují cytokiny, např. CNTF, LIF, onkostatin M nebo kardiotrofin 1, nebo proteiny rodiny interleukinů.

Mohou to být také geny, které kódují receptory těchto mnoha různých faktorů nebo které kódují transkripční faktory, které regulují expresi různých faktorů. Také to mohou být geny, které kódují enzymy syntézy nebo degradace různých neurotransmiterů a neuropeptidů nebo jejich prekurzorů, nebo kofaktory, které jsou nezbytné pro jejich syntézu nebo katabolismus, nebo jiné transkripční faktory, které regulují expresi těchto proteinů, také může jít o geny kódující receptory neurotransmiterů/neuropeptidů (nebo jejich podjednotky) a nebo proteiny, které se účastní v dráze signální transdukce.

Dalšími zajímavými geny z hlediska předkládaného vynálezu jsou zejména geny kódující antioxidanty, např. SOD (superoxidismutáza), GPX (glutathionperoxidáza), katalázu nebo enzymy buněčného dýchání, enzymy zúčastněné v buněčném cyklu jako je např. p21, nebo jiné proteinové inhibitory dependentních kináz, a také geny související s apoptózou jako jsou ICE, Bc12, BAX, atd.

Obecně řečeno, jakýkoliv gen, jeho anomální exprese způsobuje poruchu nervového systému, může být exprimován v konstruktu podle předkládaného vynálezu, jako např. geny, jejichž mutace je přímou příčinou nemoci nebo geny, jejichž produkty se podílejí na stejné metabolické dráze. Geny mohou také být toxické geny pro protinádorovou terapii (např. thymidinkináza nebo cytosindeamináza), geny pro antisense RNA nebo ribozymy, a nebo reportérové geny pro vývojové studie nebo pro výzkum kinetiky a biologické dostupnosti, jako je gen β–galakatosidázy, luciferázy nebo zeleného fluorescenčního proteinu GFP („green fluorescent protein"). Také to mohou být geny, které jsou součástí systému podmíněné rekombinace v nervovém systému pro vytvoření zvířecího modelu, jako jsou např. transgenní zvířata, včetně systému podmíněného vyřazení genu („knockout").

Je zřejmé, že odborník je schopen uzpůsobit požadovaný gen očekávanému použití.

V nukleové kyselině podle předkládaného vynálezu jsou jednotlivé elementy uspořádány tak, že promotor řídí expresi terapeutického genu a sekvence NRSE (jedna nebo několik) řídí aktivitu promotoru. Obecně je tedy gen umístěn po směru transkripce („downstream") od promotoru a ve shodné fázi s promotorem. Dále regulační úsek je obecně umístěn proti směru transkripce („upstream") od promotoru, ačkoliv to není pro aktivitu nezbytné, jak bylo již zmíněno výše. Vzdálenost mezi regulačním úsekem (sekvence NRSE) a promotorem je proměnlivá v závislosti na povaze použité sekvence a počtu opakování motivu NRSE. Výhodně jsou regulační sekvence umístěny ve vzdálenosti menší než 2 kb od promotoru, výhodněji ve vzdálenosti menší než 1 kb od promotoru.

V jednom výhodném provedení vynálezu jsou sekvence NRSE kombinovány s regulačním systémem, aby byla jemně řízena exprese nukleové kyseliny v buňce. Lze uvést zvláště regulační systém užívající na jedné straně tetracyklinem kontrolovaný transaktivátor tTA a na druhé straně promotor senzitivní k tTA, které byly popsány např. v patentové přihlášce FR 98/140080, která je formou odkazu součástí předkládaného přihlášky. Stručně shrnuto, nukleová kyselina se skládá z prvního úseku, který obsahuje nukleovou kyselinu kódující systém tetracyklinem–regulovaného transaktivátoru (tTA) řízený promotorem, který je senzitivní k tTA. Tento senzitivní promotor může být jakýkoliv promotor, dokonce i silný promotor, jehož aktivita se zvyšuje v přítomnosti transaktivátoru. Ze strukturního hlediska tento promotor obsahuje ve své sekvenci nebo ve funkční vzdálenosti od své sekvence alespoň jedno místo pro navázání faktoru tTA (operátorový úsek, Op). Výhodně jsou tyto dva úseky odděleny. Při realizaci vynálezu je možné sekvence NRSE umístit proti směru transkripce od tTA–senzitivního promotoru, ačkoliv to není podmínkou jejich aktivity, včetně polohy mezi dvěma výše popsanými úseky. Toto výhodné provedení předkládaného vynálezu umožňuje dosáhnout současně nejen regulace exprese nukleové kyseliny tetracyklinem, ale také tkáňové specifičnosti exprese, zejména pro nervové buňky, což umožňuje sekvence NRSE. Kromě toho tato jemná regulace promotor zajišťuje pozoruhodnou účinnost a spolehlivost exprese transgenu, jak je to potřebné pro genovou terapii.

Předkládaný vynález se také týká vektorů, které obsahují nukleové kyseliny definované v předchozím popisu. Jelikož tyto vektor jsou výhodně schopny transdukovat savčí buňky, a konkrétně lidské nervové buňky, není nutné, aby měly zvláštní tropismus pro uvedené buňky, takže vynález výhodně umožňuje použít jakýkoliv typ vektoru. Může to být plazmidový vektor (plazmid, episom, umělý chromosom atd.) neb virový vektor. Z virových vektorů jsou výhodné např. vektory odvozené z adenovirů, AAV a herpetických virů, jejichž tropismus pro nervovou tkáň a nervové buňky byl již důkladně dokumentován ve stavu techniky. Lze zmínit i jiné viry, jako jsou např. retroviry nebo rhabdoviry. Příklady uvedené v této přihlášce ukazují, že aktivita sekvencí NRSE, které byly vloženy do virových vektorů, je významná. Takže zcela neočekávaně bylo zjištěno, že když byly sekvence NRSE, a sice 6 a 12 sekvencí, vloženy do virového vektoru (adenovirus), snížily expresi transgenu v buňkách jiných než nervových o 91 a 98 % *in vitro* a o 90 a 96 % *in vivo*. Tyto výsledky demonstrují, že je možné podle tohoto jednoduchého systému díky regulačním sekvencím exprimovat požadované nukleové kyseliny specificky v nervových buňkách, aniž by došlo k expresi v ostatních buňkách. Kromě toho sekvence NRSE vykazují značné výhody, neboť vzhledem ke své malé velikosti jsou zvláště vhodné pro regulaci exprese genů, které jsou vloženy do vektoru, kde je omezený prostor pro vložení regulačních sekvencí. Navíc je možné kombinovat tyto sekvence s jinými regulačními systémy v jednom a témže vektoru.

Předkládaný vynález se zvláště týká také rekombinantního defektního viru, který obsahuje požadovanou nukleovou kyselinu pod kontrolou expresních sekvencí, přičemž tyto expresní sekvence obsahují promotor a jednu nebo několik sekvencí NRSE.

Obecně rekombinantní virus podle předkládaného vynálezu je defektní, tzn. není schopen autonomní replikace v buňce. Produkce defektních rekombinantních virů je odborníkům známa, pro ilustraci lze uvést např. publikace Graham, F. a Prevec, L. (In: Methods in Molecular Biology (1991) Murray E. J. (ed.), The Human Press Inc., Clifton, NJ, kapitola 11, str. 109–128). Každý

z těchto virů může být připraven v enkapsidační buněčné linii, která obsahuje funkci deficitní ve viru. Takové buněčné linie byly popsány v odborné literatuře (např. linie 293 a její deriváty).

V jednom provedení vynálezu je defektní rekombinantní virus adenovirus. Byly charakterizovány různé sérotypy tohoto viru, jejichž struktura a vlastnosti jsou poněkud rozdílné. Podle předkládaného vynálezu je výhodné užití sérotypů 2 nebo 5 lidského adenoviru (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenovirů zvířecího původu (viz přihláška WO94/26914). Adenoviry zvířecího původu, které mohou být užity podle předkládaného vynálezu jsou např. psí, hovězí nebo myší adenoviry (např. Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 1981), nebo adenoviry ovcí, prasat, ptáků nebo opic (např. SAV). Výhodné adenoviry zvířecího původu jsou psí adenoviry, výhodněji adenoviry CAV2 (např. kmen Manhattan nebo A26/61 (ATCC VR–800)). Podle předkládaného vynálezu je výhodné užití adenovirů lidského nebo psího původu nebo sníženého původu.

Výhodně adenovirus podle předkládaného vynálezu obsahuje sekvence ITR, enkapsidační sekvenci a nukleovou kyselinu podle vynálezu. Ještě výhodněji je alespoň úsek E1 nefunkční v genomu adenoviru podle předkládaného vynálezu. Tento gen je možné učinit nefunkčním kterýmkoliv v oboru známým způsobem, zejména úplnou delecí, nahrazením, částečnou delecí a adicí jedné nebo několika bází. Takové modifikace lze provést *in vitro* (s izolovanou DNA) nebo *in situ*, např. S využitím metod genového inženýrství a nebo pomocí působení mutagenů. Mohou být modifikovány i jiné úseky, zejména E3 ((WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) a L5 (WO95/02697). Ve výhodném provedení vynálezu obsahuje adenovirus podle vynálezu deleci v úseku E1 a E4. V jiném výhodném provedení obsahuje deleci v úseku E1, do které je vložen úsek E4 a požadovaná nukleová kyselina podle vynálezu (viz FR94 13355). Rekombinantní adenovirus může být také adenovirus, který je defektní např. v úseku E1 a/nebo E2 a/nebo E4. Ve viru podle předkládaného vynálezu je delece v úseku E1 výhodně v úseku nukleotidu 455 až nukleotidu 3329 v případě sekvence adenoviru Ad5.

Defektní rekombinantní adenoviry podle předkládaného vynálezu mohou být připraveny jakýmkoliv způsobem odborníkům známým (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Mohou být připraveny zejména např. například homologní rekombinací mezi defektním virem a plazmidem nesoucím, kromě jiného, sekvenci nukleové kyseliny podle vynálezu nebo požadovanou nukleovou kyselinu pod kontrolou expresní sekvence obsahující promotor a jednu nebo několik sekvencí NRSE. K homologní rekombinaci dojde v důsledku kotransfekce uvedeného adenoviru a plazmidu do vhodné buněčné linie. Vhodná buněčná linie, která se může použít, výhodně musí I) být transformovatelná uvedenými prvky a II) obsahovat sekvence, které jsou schopny komplementovat část genomu replikačně defektního adenoviru, výhodně v integrované formě, aby se zabránilo riziku rekombinace. Příkladem buněčné linie, která se může užít, je linie lidských buněk 293 z embryonální ledviny (Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 1977, 59), která obsahuje levou část genomu adenoviru Ad5 (12%) integrovanou do svého genomu, nebo buněčná linie schopná komplementovat funkce E1 a E4, která je popsána např. v patentových přihláškách WO94/26914 a WO95/02697, nebo v publikaci Yeh et al., J. Virol. 70 (1996) 559.

Viry se poté namnoží, izolují a purifikují běžnými metodami molekulární biologie, které jsou odborníkovi známy.

V jiném výhodném provedení předkládaného vynálezu defektní rekombinantní virus je AAV. Adenoasociované viry (AAV) jsou DNA viry relativně malé velikosti, které se trvale a místně–specificky integrují do genomu buněk, které infikují. Jsou schopné infikovat široké spektrum buněk, aniž by měly jakýkoliv vliv na růst, morfologii nebo diferenciaci buněk. Kromě toho se nepodílejí na žádné lidské nemoci. Genom AAV byl klonován, sekvencován a charakterizován. Obsahuje přibližně 4700 bází a na každém konci obsahuje úsek invertované koncové repetice (ITR) velikosti 143 bází, který slouží jako počátek replikace viru. Zbytek genomu je rozdělen do dvou esenciálních částí, které nesou enkapsidační funkce: levá část genomu, obsahu-

jící gen rep, který se účastní virové replikace a exprese virových genů, a pravá část genomu, která obsahuje gen cap, který kóduje proteiny virové kapsidy.

Použití vektorů odvozených z AAV pro přenos genů *in vitro* a *in vivo* bylo popsáno v patentové literatuře (viz zejména WO 91/18088; WO 93/092939; US 4 797 368, US 5 139 941, EP 488 528). Tyto dokumenty popisují různé konstrukty odvozené z AAV, ve kterých byly geny rep a/nebo cap deletovány a nahrazeny požadovanými geny, a jejich použití pro přenos požadovaných genů *in vitro* (do buněk v kulturách) nebo *in vivo* (přímo do organismu). Defektní rekombinantní AAV podle vynálezu jsou defektní v celém nebo části úseku Rep a/nebo Cap. Lze je připravit kotransfekcí plazmidů obsahujících sekvence nukleové kyseliny, nebo kombinaci sekvencí nukleové kyseliny podle vynálezu obklopené úseky invertovaných koncových repetic (ITR) a AAV a plazmidu nesoucího enkapsidační geny AAV (cap a rep) do buněk, které jsou infikovány pomocným lidským virem (helper virus), např. adenovirem. Příkladem buněčné linie, kterou lze použít, je buněčná linie 293. Jiné produkční systémy jsou popsány např. v patentových přihláškách WO95/14771, WO95/13365, WO95/13392 a WO95/06743. Rekombinantní AAV takto připravené se pak standardním způsobem purifikují.

V dalším výhodném provedení vynálezu je defektní rekombinantní virus retrovirus, rhabdovirus nebo HSV. Konstrukce rekombinantních vektorů založených na retrovirech a herpetických virech byla popsána v odborné literatuře, zejména v Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP 178220, Bernstein et al., Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689. Retroviry jsou integrující se viry, které selektivně infikují dělící se buňky. Představují proto zajímavé vektory pro nádorové aplikace. Genom retrovirů nutně obsahuje dva úseky LTR, enkapsidační sekvence a tři kódující úseky, gag, pol a env. V rekombinantních vektorech odvozených z retrovirů jsou geny gag, pol a env buďto z části, nebo zcela deletovány a nahrazeny požadovanou sekvencí heterologní nukleové kyseliny. Tyto vektory lze připravit z retrovirů různých typů, jako je např. zejména MoMuLV („Moloney murine leukaemia virus", Moloneyho myší leukemický virus, také označovaný MoMLV), MSV („Moloney murine sarcoma virus", Moloneyho myší sarkomový virus), HaSV („Harvey sarcoma virus", virus Harveyho sarkomu), SNV („spleen necrosis virus", virus nekrózy sleziny), RSV (Rous sarcoma virus, virus Rousova sarkomu) nebo Friendův virus.

Pro konstrukci rekombinantních retrovirů podle předkládaného vynálezu, které obsahují nukleovou kyselinu podle vynálezu nebo požadovanou nukleovou kyselinu pod kontrolou expresní sekvence obsahující promotor a jednu nebo několik sekvencí NRSE, připraví se plazmid obsahující zejména oba úseky LTR, enkapsidační sekvence a požadovanou nukleovou kyselinu, a pak se transfekuje do tzv. enkapsidační buněčné linie, která je schopná v trans doplnit retrovirové funkce, které chybí v plazmidu. Takové enkapsidační linie byly popsány v dosavadním stavu techniky, zejména např. linie PA317 (viz US 4 861 719), linie PsiCRIP (viz WO90/02806), a linie GP+envAM-12 (viz WO89/07150). Obecně tyto enkapsidační linie jsou schopny exprimovat geny gag, pol a env. Kromě toho rekombinantní retroviry mohou obsahovat změny v úsecích LTR, které vedou k supresi transkripční aktivity a nebo rozšířené enkapsidační sekvence, které obsahují část genu gag (Bender et al., J. Virol 61 (1987) 1639). Takto připravené rekombinantní retroviry se pak purifikují standardními postupy.

Předkládaný vynález demonstruje možnost použít sekvence NRSE pro regulaci genové exprese *in vivo*. Výsledky pokusů uvedených v příkladech této přihlášky ukázaly, že tyto sekvence jsou *in vivo* vždy aktivní a umožňují expresi transgenu v nervových buňkách aniž by byla exprimovány v buňkách jiného typu.

Předkládaný vynález dále ukazuje, že sekvence NRSE jsou také schopny, v závislosti na jejich uspořádání (a počtu kopií) účinně regulovat aktivitu silného promotoru, což skýtá četné možnosti výhodného použití. Získané výsledky překvapivě ukázaly, že aktivita sekvencí NRSE je zesílena, když jsou tyto sekvence vloženy do vektoru virového původu. Konstrukt takového typu tedy kombinuje zvláště výhodné vlastnosti jako je účinnost přenosu a selektivita exprese.

Předkládaný vynález se také týká jakýchkoliv buněk, které obsahují nukleovou kyselinu podle vynálezu, nebo vektor či virus, které byly definovány výše. Výhodně se jedná o lidské nervové buňky. Může to být buňka, která pochází z trvalé buněčné linie nebo buňka pocházející z primární kultury. Buňky se mohou užít např. k produkci polypeptidů nebo k testování aktivity genů. Také je lze využít v buněčné terapii, kdy se buňky implantují nebo injikují subjektu.

Předkládaný vynález se také týká farmaceutických kompozic nebo farmaceutických přípravků, které obsahují nukleovou kyselinu nebo vektor nebo virus nebo buňku podle předkládaného vynálezu a excipient. Pro použití podle předkládaného vynálezu jsou výhodně nukleové kyseliny, vektory nebo buňky kombinovány s jedním nebo několika farmaceuticky přijatelnými excipienty, aby mohly být podávány způsobem topickým, zejména stereotaktickým perorálním, parenterálním, intranazálním, intravenózním, intramuskulárním, subkutánním, intraokulárním, transdermálním atd. Nukleové kyseliny, vektory nebo buňky podle vynálezu jsou výhodně užívány v injikovatelné formě. Tato injikovatelná forma je výhodně zejména sterilní isotonický solný roztok (dihydrogen– nebo hydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, hořečnatý, draselný nebo vápenatý, nebo směsi těchto solí), nebo jsou to suché, výhodně lyofilizované přípravky, které umožňují po přidání sterilní vody nebo fyziologického roztoku rekonstituovat injikovatelný roztok.

Ve výhodném provedení se přípravek podle předkládaného vynálezu podává intramuskulárně, výhodně intramuskulární injekcí. Důvodem je, že intramuskulární injekce zcela překvapivě umožňuje dosáhnout podstatného terapeutického účinku díky zpětnému transportu produktu terapeutického genu tvořeného ve svalech. Takže tyto produkty, které odpovídají nukleovým kyselinám podle vynálezu nebo jsou odvozeny z vektorů podle vynálezu, jsou absorbovány na úrovni nervosvalové ploténky (motorického zakončení) a zpětným přenosem prostřednictvím axonu se dostávají do buněčného těla motorických neuronů. Tento způsob podávání má navíc výhodu, že zabraňuje nežádoucím důsledkům ektopické exprese terapeutických genů při léčení neurologických nemocí. Pokud se užije tato metoda, je možné okamžitě infikovat specificky nervové buňky, aniž by došlo k expresi v injikovaném svalu nebo exkreci produktů do krevního oběhu. Takže tato metoda nepochybně překonává všechny nedostatky dosavadních terapií způsobované zejména nedostatečným přístupem neurotofických faktorů k motorickým neuronům, velmi krátkým poločasem těchto proteinů a škodlivými vedlejšími účinky, ke kterým docházelo při systémovém podávání těchto produktů. Navíc vzhledem ke snadnému přístupu k místu, které má být injikováno, lze tuto metodu výhodně užít pro jakoukoliv nemoc neuronů nebo motorických neuronů.

Množství jednotlivých elementů lze nastavit kompetentním odborníkem ve shodě s předpokládanou aplikací a zejména s místem podávání, počtem injekcí, genem, který má být exprimován a očekávanou dobou léčení.

Předkládaný vynález se také týká použití, pro přípravu přípravku pro přenos požadované nukleové kyseliny a její expresi v tkáni nebo nervové buňce, konstruktu, který obsahuje:

- ubikvitární promotor
- jednu nebo několik sekvencí NRSE, a
- nukleovou kyselinu

uspořádané tak, že exprese nukleové kyseliny je řízena promotorem a aktivita promotoru je řízena uvedenou sekvencí nebo sekvencemi NRSE.

Použití nukleové kyseliny podle vynálezu k přenosu genů *in vitro* a *in vivo*, např. při genové terapii, umožňuje omezit ektopickou expresi požadovaných transgenů a zaměřit terapeutický účinek specificky na populaci nervových buněk. Zabrání se tím škodlivým, ke kterým by mohlo dojít v důsledku difúze transgenu do organismu. Tento systém může být užit při léčení mnohých poškození, degenerativních nebo traumatických, míchy nebo jiných nemocí centrálních nebo

periferních nervů nebo neuropsychiatrické nervové nemoci, při kterých je specificky ovlivněna populace neuronů. V základní neurologii lze tento systém využít k objasnění původu (gliového nebo neuronového) příznaků pozorovaných *in vivo* nebo *in vitro*.

Předkládaný vynález se dále také týká použití, pro přípravu přípravku pro léčení nemocí motorických neuronů intramuskulárním podáváním požadované nukleové kyseliny do nervové tkáně nebo nervových buněk, který obsahuje konstrukt, který obsahuje:

- ubikvitární promotor
- jednu nebo několik sekvencí NRSE, a

nukleovou kyselinu

uspořádané tak, že exprese nukleové kyseliny je řízena promotorem a aktivita promotoru je řízena uvedenou sekvencí nebo sekvencemi NRSE.

Předkládaný vynález se dále týká použití výše definovaných vektorů, které obsahují požadovanou nukleovou kyselinu pod kontrolou expresních sekvencí, kdy tyto sekvence obsahují promotor a jednu nebo několik sekvencí NRSE.

Použití virových vektorů je založeno na přirozené transfekční schopnosti virů (tj. schopnosti infikovat buňku). Bylo prokázáno, že tyto vektory jsou zvláště účinné při transfekci. Vektory podle vynálezu se tedy použijí k přenosu požadovaných genů a jejich expresi v nervových buňkách, *in vivo*, *in vitro* nebo *ex vivo*, a to zejména pro účely genové terapie. K expresi požadované nukleové kyseliny, která je zejména pod kontrolou jedné nebo několika sekvencí NRSE, dochází specificky v nervových buňkách, přičemž ektopická exprese je omezena. Tyto vektory jsou proto vhodné k léčení a/nebo prevenci různých nemocí centrálního nebo periferního nervstva nebo neuropsychiatrických nervových nemocí, které ovlivňují nervové buňky, zejména neurodegenerativních onemocnění a různých nemocí míchy. Jako příklady takových nemocí lze uvést zejména Alzheimerovou nemoc, Parkinsonovu nemoc, ataxii míchy a Huntingtonovu nemoc.

Vektory podle vynálezu lze užít zejména k prevenci a/nebo léčení nemocí motorických neuronů jako je např. amyotrofní laterální skleróza, amyotrofie míchy typu I (Werdnig–Hoffmannova nemoc) a typu II a III (Kugelberg–Welanderova nemoc) a amyotrofie míšních uzlin (např. Kennedyho nemoc).

Vektory podle vynálezu jsou zejména vhodné pro léčení a/nebo prevenci těchto nemocí intramuskulárním podáváním. Jak již bylo vysvětleno výše, tento způsob umožňuje dosáhnout motorických neuronů prostřednictvím zpětného transportu.

Přesněji, předkládaný vynález se týká použití, pro přípravu přípravku pro přenos požadované nukleové kyseliny a její expresi v nervové tkáni nebo nervových buňkách, který obsahuje vektor definovaný výše, který obsahuje konstrukt, kde

- ubikvitární promotor
- jedna nebo několik sekvencí NRSE, a
- nukleová kyselina

jsou uspořádané tak, že exprese nukleové kyseliny je řízena promotorem a aktivita promotoru je řízena uvedenou sekvencí nebo sekvencemi NRSE.

Dále se předkládaný vynález také týká použití, pro přípravu přípravku k léčení nemocí motorických neuronů intramuskulárním podáváním požadované nukleové kyseliny do nervové tkáně nebo nervových buněk, který obsahuje vektor definovaný výše, který obsahuje konstrukt, kde

- ubikvitární promotor
- jedna nebo několik sekvencí NRSE, a
- nukleová kyselina

jsou uspořádané tak, že exprese nukleové kyseliny je řízena promotorem a aktivita promotoru je řízena uvedenou sekvencí nebo sekvencemi NRSE.

Dále se předkládaný vynález týká způsobu regulace exprese genu *in vivo*, přičemž tento způsob obsahuje vložení sekvencí NRSE do místa proti směru transkripce („upstream") od požadovaného genu a *in vivo* podání výsledného konstruktu a/nebo vektoru obsahujícího tento konstrukt.

Předkládaný vynález bude dále podrobněji popsán formou následujících příkladů, které jsou ilustrativní a vynález nijak neomezují. V těchto příkladech se nejdříve popisuje klonování zvětšujícího se počtu sekvencí NRSE do místa „upstream" od promotoru genu PGK v plazmidu obsahujícím luciferázový reportérový gen a následnou selekci konstruktu, u kterých je exprese luciferázy snížena, když jsou transfekovány jiné buňky než neurony. Pak byly připraveny odpovídající adenovirové konstrukty a testovány *in vitro* tím, že se infikovaly buněčné linie a primární kultury, a také *in vivo* poté, co byly myši intramuskulárně injikovány rekombinantním adenovirem. Uvedené výsledky demonstrují výhody nukleové kyseliny podle vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: Schematické znázornění plazmidů, které nesou chimérický promotor podle předkládaného vynálezu.

Obr. 2: Studie funkční kapacity plazmidů, která byla provedena transfekční plazmidů do nervových (PC12, obr. 2B) a jiných buněk (3T3, obr. 2A) a pak měřením luciferázové aktivity.

Obr. 3: Studie funkční kapacity defektního rekombinantního viru *in vitro*, kdy se měřila luciferázová aktivita a po injekcích:

- do jiných než nervových buněk (fibroblasty 373 potkana, obr. 2A)
- nervových buněk (feochromocytom PC12 potkana, obr. 3B)
- primární kultury jiných než nervových buněk, neonatálních ledvinných buněk potkana (obr. 3B),
- primární kultury nervových buněk, neonatálních horních krčních nervových ganglií (obr. 3D),
- primární kultury jiných než nervových buněk, primární kultury astrocytů pocházejících z embrya potkana (obr. 3E),

  primární kultury nervových buněk, infekce primární kultury kortikálních neuronů z embrya potkana (obr. 3F).

Obr. 4: Studie funkční kapacity defektního rekombinantního viru *in vivo*, kdy myš byla injikována intramuskulárně a pak byla měřena luciferázová aktivita.

Obr. 5: Studie funkční kapacity defektního rekombinantního viru *in vivo*, kdy myš byla injikována intramuskulárně do svalu jazyka a pak byla měřena luciferázová aktivita.

Obr. 5A: Měření aktivity luciferázy ve svalu jazyka 8. a 35. den.

Obr. 5B: Měření aktivity luciferázy v buňkách nervového systému (prodloužená mícha) 8 a 35. den.

Příklady provedení vynálezu

Materiály a metody použité v následujících příkladech

Buněčné linie a primární kultury

Buňky získané z linie feochromocytomu potkana (PC12) byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Gibco) obsahujícím 15 % telecího fetálního séra (FCS) (Boehringer). Buňky získané z linie fibroblastů 3T3 potkana byly kultivovány v Eaglcho médiu modifikovaném Dulbeccem (DMEM) s přídavkem 10 % telecího fetálního séra. Kultury buněk horních krčních nervových uzlin (SCG) získaných z novorozených potkanů Wistar (Iffa–Credo) starých 1 až 2 dny, kdy buňky byly disociovány pomocí 3 mg/ml dispázy (Boehringer) a pak naneseny na destičky, které byly předem potaženy kolagenem získaným z ocasu potkana. Buňky byly kultivovány v 0,5 ml Leibovitzova média L–15 (Gibco), které bylo pufrováno bikarbonátem a obsahovalo různé faktory včetně 70 ng/ml NGF (nervový růstový faktor), 5% sérum dospělého potkana a 10μM cytosinarabinofuranosid.

Primární kultury ledvinných buněk byly připraveny tak, že ledvinná tkáň z novorozených potkanů Wistar (Iffa–Credo) starých 1 až 2 dny byla disociována trypsinem. Buňky pak byly přeneseny na destičky do 10 % FCS, aby se umožnilo jejich dělení až do okamžiku použití k infekci.

Kultury kortikálních buněk byly získány z embryí potkanů kmene E17 Sprague–Dawley (Iffa–Credo). Buňky byly získány pitvou a mechanicky disociovány a pak byly kultivovány v médiu DMEM obsahujícím transferin 100 μg/ml, inzulín 25 μg/ml, putrescin 10 μg/ml, selenit sodný 5 ng/ml, progesteron 6,3 ng/ml a 2mM glutamin (Sigma).

Primární kultury astrocytů byly odvozeny z kortikální tkáně embryí potkanů (E17, Sprague–Dawley) a kultivovány v médiu DMEM obsahujícím 10 % FCS a v atmosféře 10% CO_2/90% vzduch.

Experimenty *in vitro*

Pro experimenty s přechodnou expresí byl milion buněk transfekován elektroporací pomocí systému firmy Bio–rad, při 960 μF a 190 V v případě buněk PC12, nebo 250 V v případě buněk 3T3, a sice 6 μg každého z testovaných plazmidů, 7 μg plazmidu Bluescript (Stratagene) a 2 μg kontrolního vektoru pCAT (Promega), který kóduje chloramfenikolacetyltransferázu (CAT), což umožnilo monitorování transfekce.

Buněčné kultury byly transfekovány tak, že kultivační médium bylo nahrazeno médiem bez séra, které obsahovalo virovou suspenzi s MOI přibližně 200 pfu (plaky tvořící jednotky) a inkubovaly se 45 minut. Pro každý konstrukt (plazmid nebo adenovirus) byly stanoveny 3 hodnoty luciferázové aktivity ze 3 různých jamek. Pro každý virový konstrukt se infekční experimenty opakovaly dvakrát vždy s užitím jiného zásobního roztoku viru.

48 hodin po elektroporaci nebo infekci byly buňky sklizeny do 200 μl lyzovacího pufru následujícího složení: 25mM Tris/fosfát, pH 7,8, 0,08mM luciferin; 0,1mM ATP, 8mM $MgCl_2$, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 15% glycerol a 1% Triton. Luciferázová aktivita byla měřena luminometrem LUMAT LB9501 (Berthold). V případě transfekovaných buněk byl k lyzovacímu pufru přidán 1% hovězí sérový albumin (BSA) a aktivita byla standardizována na základě aktivi-

ty CAT, která byla měřena kapalinovou scintilační metodou. V případě rekombinantních adenovirů byla luciferázová aktivita standardizována pomocí koncentrace proteinu v buněčném extraktu, která byla stanovena pomocí systému Bio–rad (Bio–Rad Laboratories).

Experimenty *in vivo*

Samci myši kmene C57B16 (Charles River) ve stáří 6 měsíců byly podrobeni anestezi směsí Rompun (Bayer)/Ketamine (UVA) a konstrukt Ad–NRSE PGK Luc byl pomalu injikován (2.5 µl/ml) do jazyku (10^9 pfu/4x2.5 µl) a do lýtkového svalu v dávce 2.10^9 pfu/sval (30 µl). Myši byly v období od 7. do 35. dne po infekci utraceny pentobarbitalem (Sanofi). Byly vyjmuty prodloužená mícha, jazyk a látkový sval pro měření aktivity luciferázy. Prodloužená mícha byla disociována mechanicky ve 200 µl lyzovacího pufru. Sval a jazyk byly disociovány pomocí polytronu DIAX 900 (Heidolph) v 1 a 2 ml lyzovacího pufru (v uvedeném pořadí).

Příklad 1

Konstrukce chimérických promotorů a plazmidových vektorů

Cílem tohoto příkladu je popsat přípravu chimérických promotorů a konstrukci plazmidových vektorů, které obsahují právě tyto promotory.

Plazmid pPGK–Luc obsahuje gen Luc pod kontrolou všudypřítomného eukaryotického promotoru PGK. Pro získání plazmidu pPGK–Luc byl fragment velikosti 500 bp myšího promotoru PGK vložen do komerčního plazmidu pUT 103 (CAYLA FRANCE), který obsahuje luciferázový reportérový gen fúzovaný se zeocinem a polyadenylační sekvencí SV40 v časné konfiguraci (PolyA).

V dalším kroku byla vložena jedna nebo dvě, tři, šest a dvanáct kopií sekvence NRSE z genu SCG10 (TTCAGCACCACGGAGAGTGCC, sekvence id. č. 1) [2] v antiparalelní konfiguraci do polohy proti směru transkripce (upstream) od promotoru PGK. Pro tento účel byl zkonstruován fragment velikosti 26 bp obsahující sekvenci NRSE obklopenou dvěma místy MluI, a sice hybridizací dvou odpovídajících oligonukleotidů. Tento fragment byl vložen v jedné nebo několika kopiích do MluI místa pPGK–Luc, čímž vznikly plazmidy obsahující 1, 2 a 3 kopie NRSE sekvence. Plazmid obsahující 6 sekvencí NRSE byl získán z plazmidu obsahujícího 3 kopie (pNRSE3–PGK–Luc) následující strategií: fragment BamHI/XhoI obsahující 3 kopie NRSE byl vyjmut z pNRSE3–PGK Luc a vložen do místa XhoI v pNRSE3–PGK–Luc, čímž vznikl p6NRSE–PGK–Luc. Podobně byl plazmid obsahující 12 kopií NRSE připraven z plazmidu obsahujícího 6 kopií (p6NRSE–PGK–Luc) tak, že do p6NRSE–PGK–Luc byly vloženy dvě kopie fragmentu BamHI/XhoI.

Nakonec expresní kazeta „PGK(s nebo NRSE)–Luc–PolyA" z různých plazmidů popsaných výše byla vložena do ITR levé části adenoviru (invertovaná terminální repetice, replikační počátek) a sekvenci kódující polypeptid IX (virový kapsidový protein) kyvadlového plazmidu, který může být užit ke konstrukci defektních rekombinantních virů (obr. 1).

Je jasné, že stejný postup lze užít ke konstrukci dalších plazmidů, které obsahují 1 až 50 kopií motivu NRSE kombinovaných s ubikvitárním promotorem odlišným od PGK, pod jehož kontrolu lze vložit jakýkoliv transgen.

Příklad 2

Funkční analýza provedená transfekcí buněčných linií

Cílem tohoto příkladu bylo ukázat, že plazmidové konstrukty obsahující chimérický promotor se sekvencí NRSE jsou funkční a umožňují buněčnou expresi požadovaného genu.

Plazmidové konstrukty popsané v příkladu 1 byly testovány přechodnou transfekcí (elektroporací) linie nervových buněk PC12 (feochromocytom potkana) a 3T3 (fibroblasty potkana). Výsledné hodnoty luciferázové aktivity byly standardizovány vzhledem k aktivitě CAT (chloramfenikoltransferázy), která byla měřena v roztoku obsahujícím 125mM tris–fosfát, pH 7,8, 125μM chloramfenikol a 0,12μM radioaktivně značený acetylkoenzym A. Test byl proveden, po inkubaci ve 37 °C po 1 hodinu, po přidání scintilační kapaliny Econofluor pomocí počítače KONTRON. Hodnoty luciferázové aktivity byly stanoveny pro každý plazmidový konstrukt, a získané průměrné hodnoty a střední chyby jsou uvedeny na obr. 2.

Získané výsledky ukázaly, že konstrukty obsahující 6 a 12 kopií NRSE byly schopny snížit expresi luciferázy o 66 a 82 % v buňkách jiných než nervových (3T3), což je snížení exprese řádu téměř logaritmu ve srovnání konstruktem pPGK–Luc. Výsledky také ukázaly, že přítomnost motivu NRSE v nervových buňkách PC12 nesnižuje expresi luciferázy a ve skutečnosti je dokonce schopni ji zvýšit. Statisticky významné zvýšení v rozsahu 25 % mezi bylo pozorováno při srovnání p12NRSE–PGK–Luc a pPGK–Luc.

Výsledky tedy prokázaly, že plazmidové konstrukty obsahující chimérický promotor se sekvencemi NRSE jsou funkční a dovolují buněčnou expresi požadovaného genu výlučně v nervových buňkách, zatímco exprese genu je v jiných než nervových buňkách významně inhibována.

Příklad 3

Konstrukce defektních rekombinantních virů

Cílem tohoto příkladu je popsat přípravu chimérického promotoru a konstrukci virových vektorů, které obsahují konkrétně tyto promotory.

K provedení této studie *in vitro* a *in vivo* byly připraveny tři odpovídající adenovirové konstrukty: Ad–PGK–Luc, Ad–6NRSE–PCK–Luc a AD–12NRSE–PGK–Luc. Tyto rekombinantní viry byly zkonstruovány pomocí odborníkovi známých technik, a to tak, že se kotransfekoval kyvadlový plazmid popsaný v příkladu 1 a defektní genom adenoviru typu 5 do enkapsidační linie (buňky 293). Kyvadlový plazmid byl nejdříve linearizován restrikčním štěpením v místě FspI a pak byl kotransfekován společně s dlouhým fragmentem adenoviru štěpeného ClaI do buněk 293 metodou kalciumfosfátové precipitace DNA.

Enkapsidované rekombinantní genomy pak byly purifikovány standardními postupy, zejména plakovou purifikační technikou. Integrovaný fragment byl pak ověřen analýzou restrikčních fragmentů a pomocí PCR. Byl připraven virový zásobní roztok namnožením rekombinantního adenoviru na buňkách 293 a pak ultracentrifugací zejména na gradientu chloridu cesného, a purifikací na purifikační koloně se Sephadexem G25M (Pharmacia). Virové titry byly stanoveny měřením optické hustoty a dodatečně byly ověřeny plakovou metodou. Všechny zásobní roztoky viru měly titr přibližně 2 x 10^8 pfu/μl.

Příklad 4

Funkční analýza *in vitro*

Cílem tohoto příkladu bylo ukázat, že virové konstrukty uvedené v příkladu 3, které obsahují chimerický promotor se sekvencemi NRSE, jsou funkční a umoznují řídit promotor v různých typech buněk.

Tři adenoviry zkonstruované v příkladu 3 byly testovány *in vitro* tak, že byly infikovány buněčné linie a primární kultury dávkami 20 a 200 pfu/buňka. Měření byla provedena s 50 µl supernatantu, jak bylo popsáno výše, a standardizována vzhledem k množství celkového proteinu, který byl stanoven pomocí soupravy Bio–rad ke stanovení proteinu (Bio–Rad). Pro každý adenovirus byly stanoveny 3 hodnoty aktivity luciferázy v různých jamkách. Získané průměrné hodnoty a střední chyby jsou uvedeny na obr. 3 pro buněčné linie a na obr. 4 pro primární kultury.

Když byly užity rekombinantní adenoviry Ad–6NRSE–PGK–Luc a Ad 12NRSE–PGK–Luc, exprese luciferázového reportérového genu byla snížena o 97 a 99 %, v uvedeném pořadí, v buněčné linii jiných než nervových buněk (fibroblasty 3T3).

V linii nervových buněk PC12 byla pozorovaná luciferázová aktivita dvou adenovirů obsahujících sekvence NRSE vyšší než u adenoviru Ad–PGK–Luc. Podobně také luciferázová aktivita získaná se 3 adenovirovými konstrukty je podobná po infekci primárních kultur buněk horních krčních ganglií (SCG) z novorozených potkanů (jednofaktorová globální analýza rozptylu ANOVA neukázala žádný významný rozdíl mezi skupinami). Na druhé straně exprese luciferázy byla snížena o 91 až 98 % po infekci primárních kultur ledvinných buněk z novorozených potkanů konstrukty rekombinantních adenovirů Ad–6NRSE–PGK–Luc a Ad–12NRSE–PGK–Luc, což je pokles v řádu 2 logaritmů exprese řízené PGK v přítomnosti 12 kopií NRSE.

Když byly tři konstrukty užity k infekci astrocytů a nervových buněk získaných z kortexu 17denních embryí potkana, ukázalo se, jak se dalo čekat, velmi významné snížení luciferázové aktivity (10 x) u astrocytů v případě konstruktů obsahujících 6 nebo 12 sekvencí NRSE (obr. 3E), což potvrdilo předchozí výsledky. Jak se také očekávalo, luciferázová aktivita všech třech výše zmíněných virových konstruktů byla srovnatelná v buňkách kortexu (obr. 3F).

Tyto výsledky jsou zejména překvapující a pozoruhodné, neboť demonstrují, že (I) chimérické promotory podle předkládaného vynálezu jsou funkční v primárních kulturách, (II) promotory jsou funkční ve virovém kontextu a (III) represorová aktivita je vyšší v adenovirovém kontextu než v odpovídajícím plazmidovém vektoru (srovnej obr. 2 a 3).

Takže tento příklad ukázal, že virové konstrukty obsahující chimérický promotor, který obsahuje sekvence NRSE, jsou funkční a umožňují buněčnou expresi požadovaného genu výlučně v nervových buňkách, zatímco v jiných než nervových buňkách je exprese významně inhibována.

Příklad 5

Funkční analýza *in vivo*

Cílem tohoto příkladu bylo ukázat, že virové konstrukty popsané v příkladu 3 obsahující chimérický promotor, který obsahuje sekvence NRSE, jsou funkční a dovolují kontrolu promotoru *in vivo*.

Vzhledem k velmi povzbudivým výsledkům v příkladu 4 byla aktivita konstruktů podle předkládaného vynálezu testována *in vivo* měřením exprese luciferázy po intramuskulární injekci (lýtkový sval a sval jazyku) těchto 3 rekombinantních adenovirů do myší.

5.1. Injekce do lýtkového svalu

Každý adenovirový konstrukt byl injikován ve 3 stadiích do pravého lýtkového svalu / myši v dávce 2 x 10^9 pfu/sval a objemu 30 µl. Injikovaný sval byl vyjmut 7 dnů po injekci a disociován v 1 ml pufru, aby bylo možné stanovit luciferázovou aktivitu, která byla měřena ve 150 µl supernatantu. Průměrné hodnoty a střední chyby získané ze 7 měření, vztažené k hodnotě celkového proteinu, jsou uvedeny na obr. 5.

Výsledky ukazují, že když byly užity rekombinantní adenoviry Ad 6NRSE–PGK–Luc a Ad–12NRSE–PGK–Luc, exprese luciferázy byla snížena o 90 a 96 % jeden týden po injekcích.

Exprese luciferázy po intramuskulární injekci Ad–12NRSE–PGK Luc a Ad–PGK–Luc byla u myší porovnávána v delším časovém období. Když byl užit konstrukt Ad–12NRSE–PGK Luc, aktivita byla vždy snížena jeden měsíc (95 %) a tři měsíce (91 %) po injekcích.

5.2. Injekce do svalu jazyka

Bylo využito zpětného transportu, aby bylo možné srovnat expresi dvou konstruktů Ad–PGK–Luc and Ad–12NRSE–PGK–Luc v prodloužené míše a ve svalu jazyka u myší injikovaných intramuskulárně do jazyka.

Srovnatelně s výsledky již získanými, luciferázové aktivity dvou konstruktů v nervovém systému byly podobné jeden týden po podání (obr. 5B). Naopak, luciferázová aktivita byla snížena o 90 % ve svalu injikovaném konstruktem Ad–12NRSE–PGK–Luc ve srovnání se svalem injikovaným konstruktem Ad–PGK–Luc (obr. 5A). Tato represe se udržuje nejméně 35 dní po infekci. Je zajímavé, že i přes to, že hladina exprese po 35 dnech je nižší než hladina 8 dnů po infekci, rozdíly v expresi mezi uvedenými virovými konstrukty zůstávají velmi významné.

Uvedené výsledky tedy znovu potvrdily, že konstrukty podle předkládaného vynálezu jsou funkční *in vivo* a demonstrovaly represní účinek, který byl dokonce větší než účinek pozorovaný *in vitro* po transfekci plazmidu do buněk jiných než nervových.

Výsledky dále prokázaly vysokou účinnost konstruktů podle předkládaného vynálezu *in vivo* ve směrování exprese požadovaného genu do nervových buněk. Použití vynálezu v genové terapii umožňuje omezit ektopickou expresi požadovaného transgenu a zabránit tak škodlivým vedlejším účinkům, které mohou vznikat v důsledku difúze transgenu v organismu.

CITOVANÁ LITERATURA

[1] Mori N., Stein R., Sigmund O. and Anderson D. J. Neurone, 4: 583–594 (1990)

[2] Mori N., Schoenherr C., Vandenbergh D. J. and Anderson D. J. Neurone, 9: 45–54 (1992)

[3] Li L., Suzuki T., Mori N. and Greencard P. PNAS USA, 90: 1460–1464 (1993)

[4] Schoenherr C. J., Paquette A. J. and Anderson D. J. PNAS USA, 93: 9981–9886 (1996)

[5] Schoenherr C. J. and Anderson D. J. Science, 267: 1360–1363 (1995)

[6] McBurney, Sutherland, Adra, Leclair, Rudnicki, Jardine Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 20: 5755–5761 (1991)

[7] Moullier P., Marechal V., Danos O. and Heard J. M. Transplantation, 56: 427–432 (1993)

[8] McDonald R. J., Lukason M. J., Raabe O. G., Canfield D. R., Burr E. A., Kaplan J. M., Wadsworth S. C. and St George J. A. Hum. Gene Ther., 8: 411–422 (1997)

[9] Maue R. A., Kraner S. D., Goodman R. H. and Mandel G. Neurone, 4: 223–231 (1990)

[10] Bessis A., Champtiaux N., Chatelin L. and Changeux J. P. PNAS USA, 94: 5906–5911 (1997).

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 1: Sekvence motivu NRSE

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 1:

TTCAGCACCA CGGAGAGTGC C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 2: kanonická sekvence motivu NRSE

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 2:

TTCAGCACCA CGGACAGCGC C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 3: Obecná sekvence motivu NRSE

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 3:

NNCAGCACCN NGGANAGNNN C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 4:

TTCAGCACCA CGGAGAGTGC C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 5:

TTCAGCACCG CGGACAGTGC C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 6:

TTCAGCACCT CGGACAGCAT C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI–SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 7:

TTCAGCACCG CGGAGAGCGT C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 8:

TCCAGCACCG TGGACAGAGC C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 9:

TTCAGCACCG AGGACGGCGG A 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 10:

ATCAGCACCA CGGACAGCGG C 21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S ID. Č. 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází
(B) TYP: nukleotidy
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: Ne

(iv) ANTI-SENSE: Ne

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1...21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 11:

TTCAGCACCT AGGACAGAGG C 21

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantní nukleová kyselina, která obsahuje:

- ubikvitární promotor,
- jednu nebo několik sekvencí neuronového elementu restriktivního umlčení (NRSE) a
- terapeutický gen

uspořádané tak, že exprese terapeutického genu je řízena ubikvitárním promotorem a přitom aktivita tohoto promotoru je řízena sekvencí (sekvencemi) NRSE,

přičemž sekvence NRSE obsahuje celou nebo část sekvence id. č. 3, ve které N je A, G, C nebo T,

nebo obsahuje část nebo celou sekvenci vybranou ze skupiny obsahující sekvence id. č. 1, 2 a 4 až 11,

nebo varianty těchto sekvencí.

2. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 1, kde promotor je silný promotor.

3. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 2, kde promotor je promotor z genů základního metabolismu.

4. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 3, kde promotor je vybrán ze skupiny obsahující promotory genu PGK, Ef1α, β–aktinu, vimentinu, adolázy A a α1–antitrypsinu.

5. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 1, která obsahuje 1 až 20, výhodně 3 až 15, sekvence NRSE.

6. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 5, která obsahuje 3, 6 nebo 12 sekvencí NRSE.

7. Rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z předchozích nároků, která obsahuje několikrát se opakující sekvenci NRSE, jak je vymezena v nároku 1.

8. Rekombinantní nukleová kyselina podle kteréhokoliv z předchozích nároků, kde sekvence NRSE je umístěna/jsou umístěny proti směru transkripce od promotoru.

9. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 1, kde terapeutický gen je nukleová kyselina, která obsahuje otevřený čtecí rámec kódující RNA nebo terapeutický nebo vakcinační polypeptid.

10. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 9, kde terapeutický gen je nukleová kyselina, která obsahuje otevřený čtecí rámec kódující trofický faktor.

11. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 9, kde terapeutický gen je nukleová kyselina, která obsahuje otevřený čtecí rámec kódující antioxidant.

12. Rekombinantní nukleová kyselina podle nároku 1, která kromě sekvencí NRSE obsahuje regulační elementy.

13. Regulační element podle nároku 12, kterým je systém tetracyklinového operátoru/represoru.

14. Vektor, který obsahuje nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12.

15. Vektor podle nároku 14, který je virový vektor.

16. Defektní rekombinantní virus, který obsahuje nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12.

17. Virus podle nároku 16, který je adenovirus.

18. Virus podle nároku 16, který je AAV.

19. Virus podle nároku 16, který je retrovirus.

20. Virus podle nároku 16, který je rhabdovirus.

21. Buňky, které obsahují nukleovou kyselinu podle nároku 1 nebo vektor podle nároku 14 nebo virus podle nároku 16.

22. Buňky podle nároku 21, které jsou savčí nervové buňky.

23. Použití nukleové kyseliny podle nároku 1 pro výrobu přípravku pro přenos nukleových kyselin a jejich expresi v nervových buňkách nebo tkáni.

24. Použití nukleové kyseliny podle nároku 1 pro výrobu přípravku pro léčení nemocí motorických neuronů intramuskulárním podáváním nukleové kyseliny do nervové tkáně nebo buněk.

25. Použití defektního rekombinantního viru podle nároku 16 pro přípravu farmaceutické kompozice pro přenos nukleových kyselin pro nervově specifickou expresi.

26. Použití podle nároku 25 k přenosu genu a jeho expresi v nervových buňkách *in vitro* a *ex vivo*.

27. Použití vektoru podle nároku 14 pro výrobu přípravku pro přenos nukleové kyseliny a její expresi v nervové tkáni nebo buňkách.

28. Použití vektoru podle nároku 14 pro výrobu přípravku pro léčení nemocí motorických neuronů intramuskulárním podáváním nukleové kyseliny do nervové tkáně nebo buněk.

29. Použití podle nároku 27 nebo 28, kdy vektor je virus.

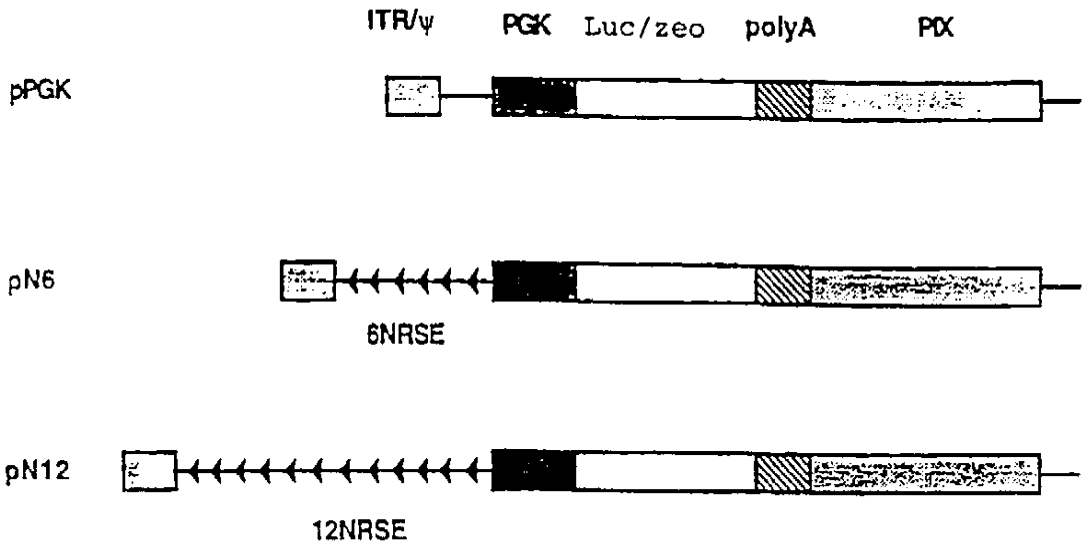
30. Farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje nukleovou kyselinu podle nároku 1 nebo vektor podle nároku 14 nebo virus podle nároku 16.

31. Přípravek podle nároku 30, **vyznačující se tím**, že je formulován pro intramuskulární podávání, výhodně pro podávání intramuskulární injekcí.

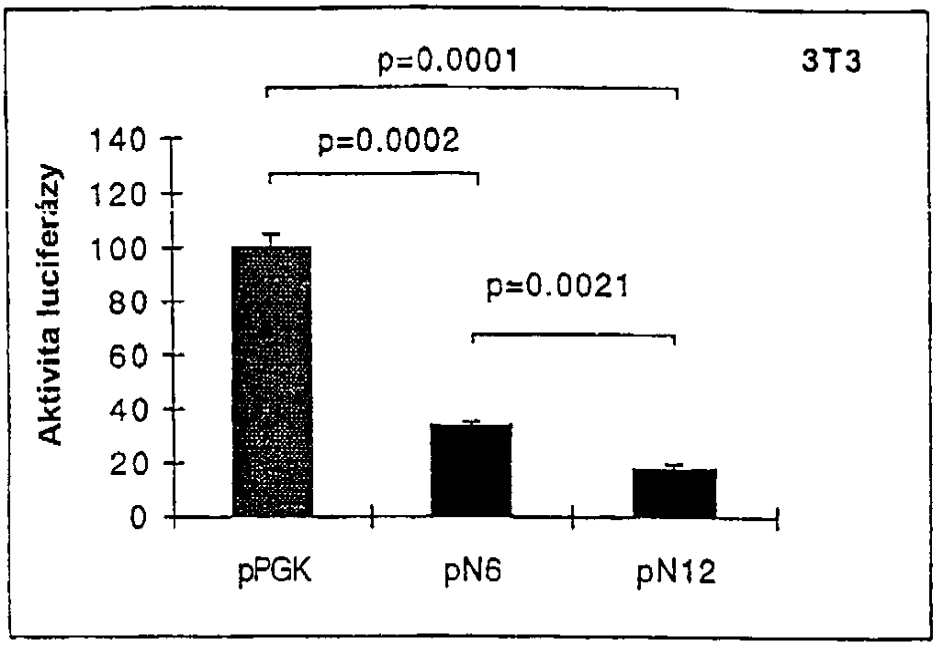
32. Chimérický promotor, který obsahuje ubikvitární promotor a jednu nebo několik sekvencí neuronového elementu restriktivního umlčení (NRSE).

33. Chimérický promotor podle nároku 32, kterým je promotor xNRSE–PGK, kde x je celé číslo od 1 do 50.

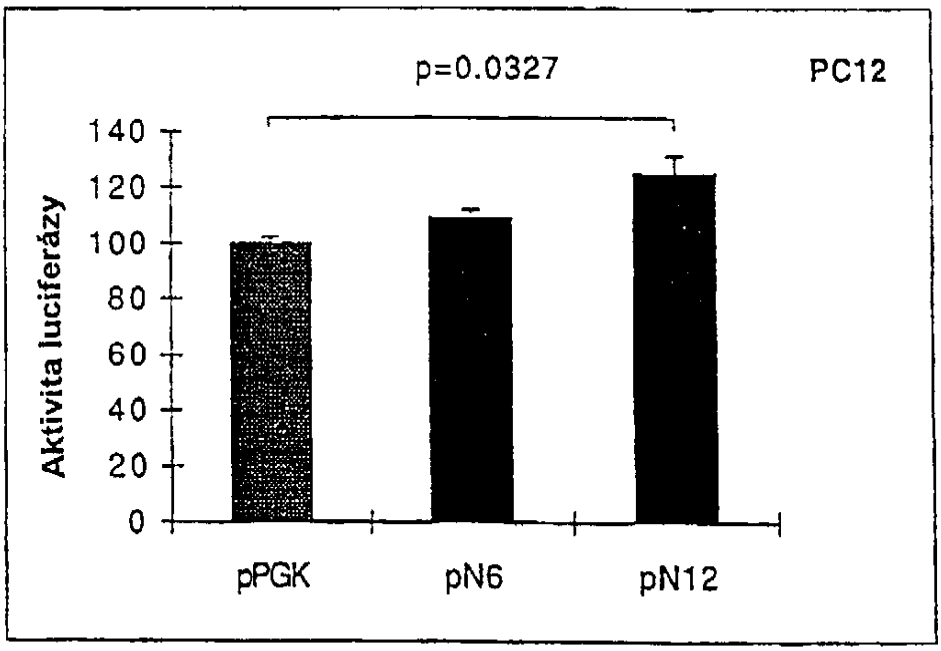
7 výkresů



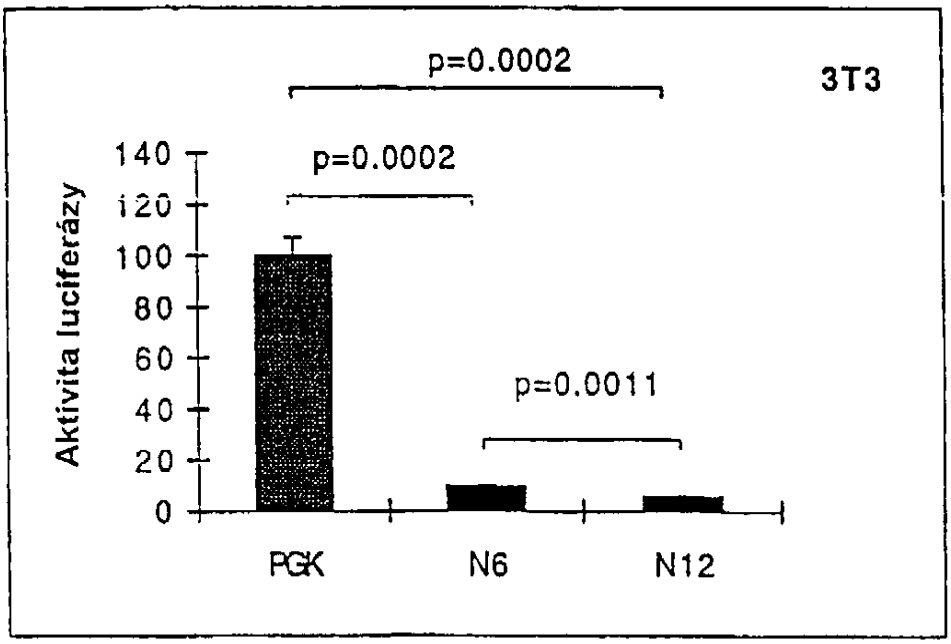
Obr. 1


p=0.0001
3T3
p=0.0002
p=0.0021
Aktivita luciferázy
140
120
100
80
60
40
20
0
pPGK
pN6
pN12

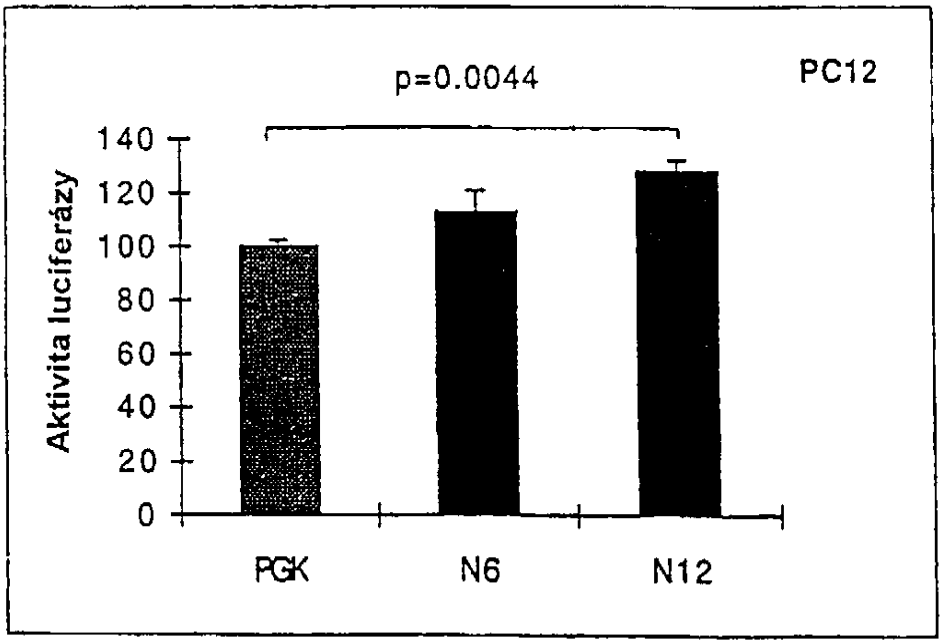
Obr. 2A


p=0.0327
PC12
Aktivita luciferázy
140
120
100
80
60
40
20
0
pPGK
pN6
pN12

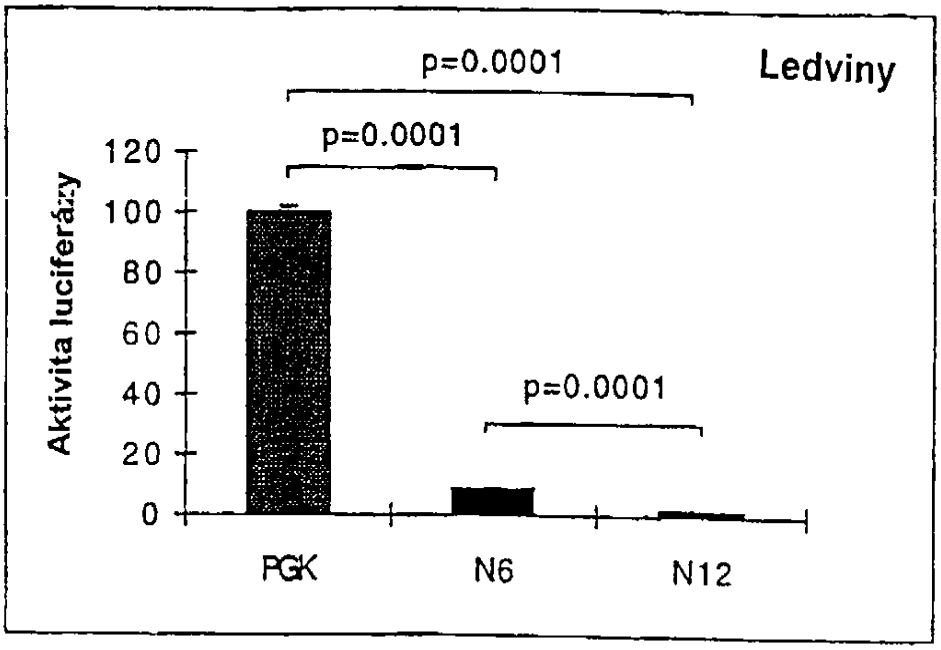
Obr. 2B


p=0.0002
3T3
p=0.0002
140
120
100
80
60
40
20
0
Aktivita luciferázy
p=0.0011
PGK
N6
N12

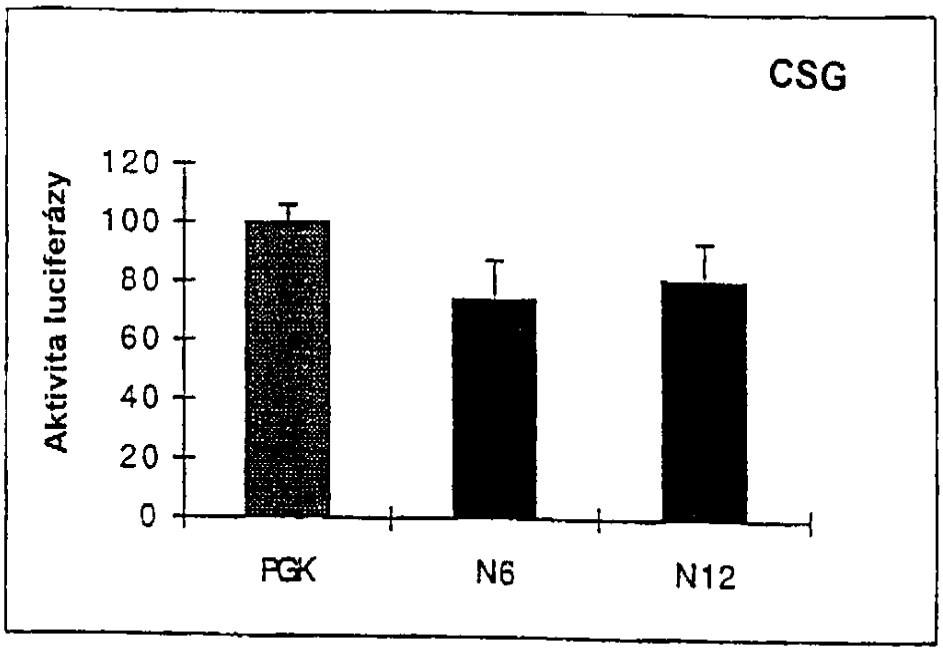
Obr. 3A


p=0.0044
PC12
140
120
100
80
60
40
20
0
Aktivita luciferázy
PGK
N6
N12

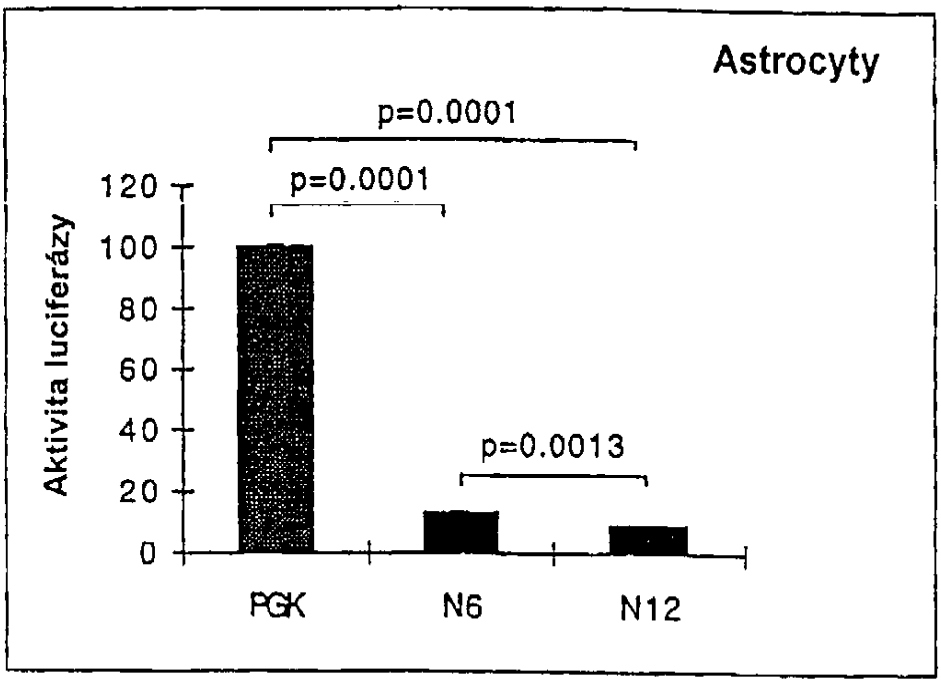
Obr. 3B


Ledviny
p=0.0001
p=0.0001
p=0.0001
Aktivita luciferázy
120
100
80
60
40
20
0
PGK
N6
N12

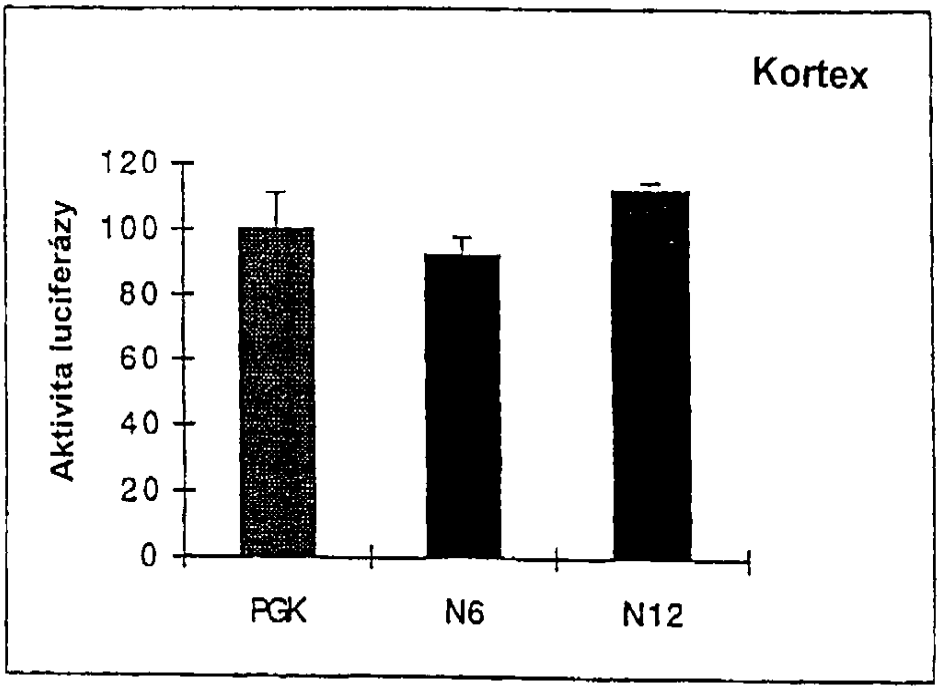
Obr. 3C


CSG
Aktivita luciferázy
120
100
80
60
40
20
0
PGK
N6
N12

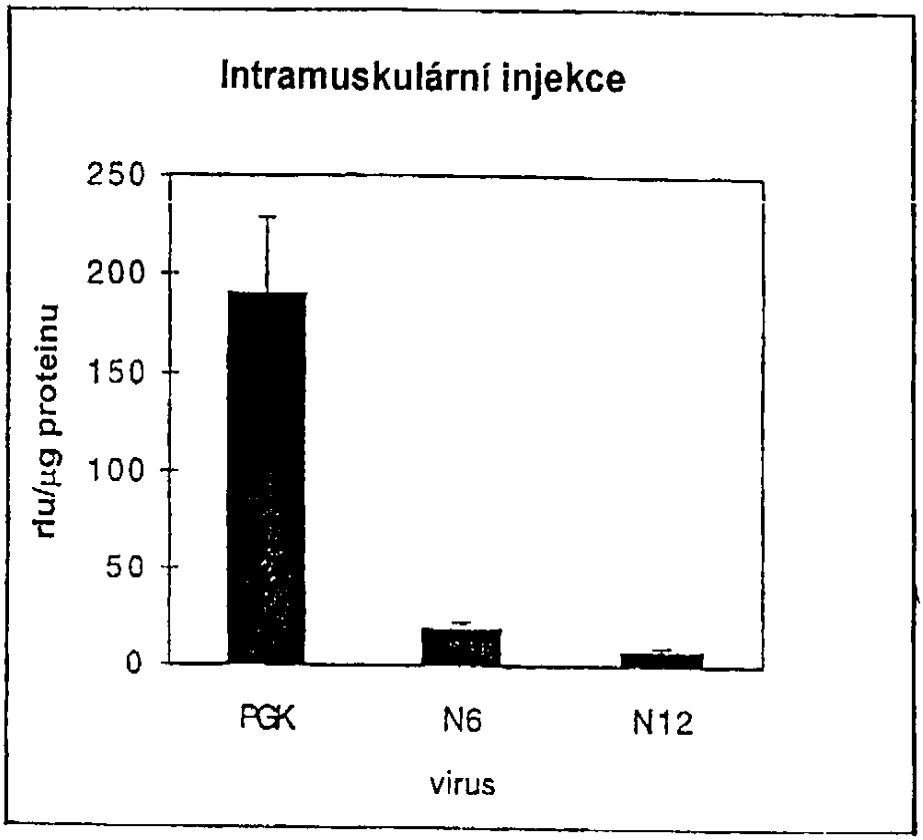
Obr. 3D


Astrocyty
p=0.0001
p=0.0001
p=0.0013
Aktivita luciferázy
120
100
80
60
40
20
0
PGK
N6
N12

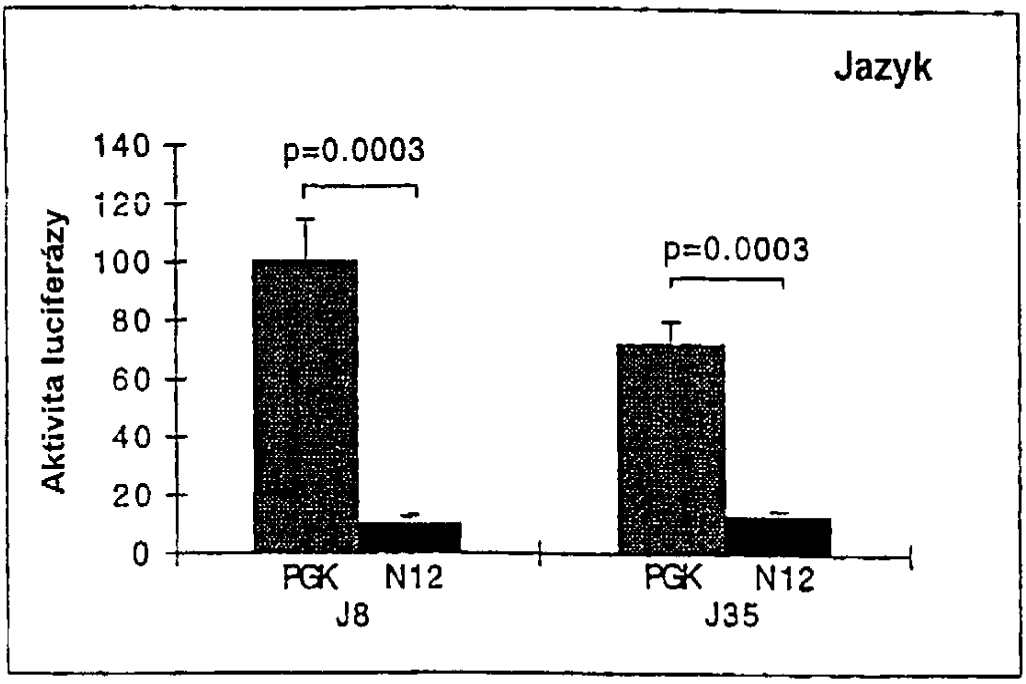
Obr. 3E


Kortex
Aktivita luciferázy
120
100
80
60
40
20
0
PGK
N6
N12

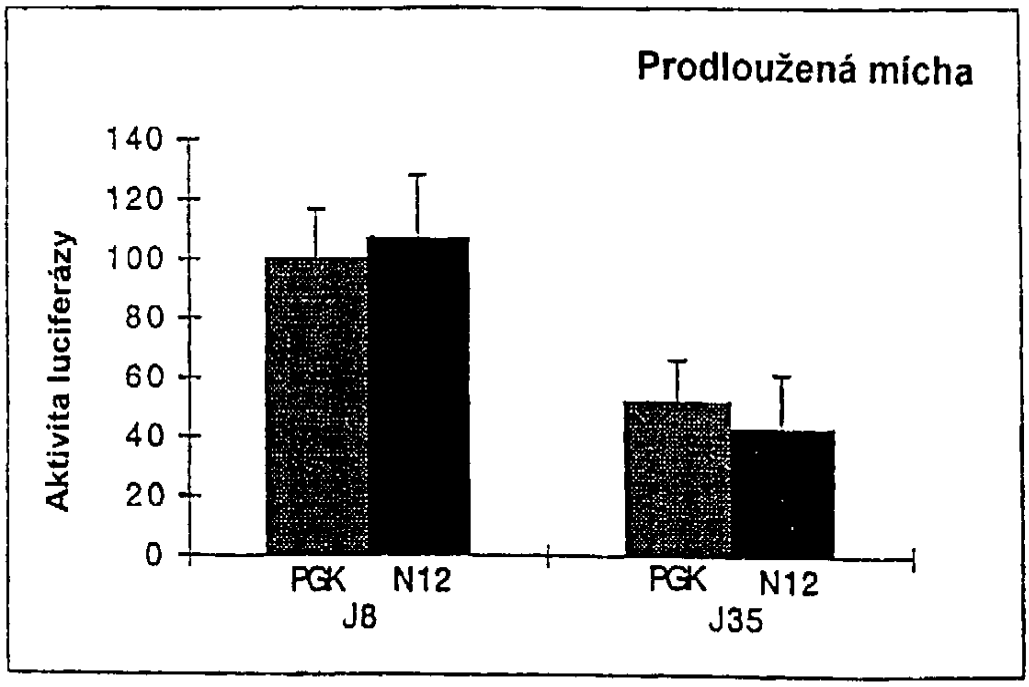
Obr. 3F


Intramuskulární injekce
250
200
150
100
50
0
rlu/µg proteinu
PGK
N6
N12
virus

Obr. 4



Obr. 5A



Obr. 5B

Konec dokumentu