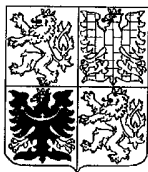


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/943608**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.09.2000**
(Věstník č. 9/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/IL98/00486**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/18195**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 1201

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/11

C 07 K 14/65

A 61 K 48/00

(71) Přihlašovatel:

YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM,
Jerusalem, IL;

(72) Původce:

Hochberg Abraham, Jerusalem, IL;
Ayesh Suhail, Jerusalem, IL;

(74) Zástupce:

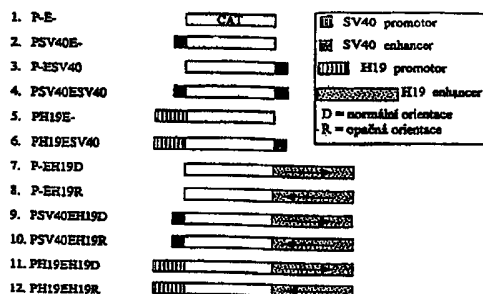
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob exprese heterologní sekvence v nádorové
buňce**

(57) Anotace:

Specifická exprese heterologních sekvencí v nádorových buňkách; jedná se zejména o geny kódující cytotoxické produkty pod kontrolou regulačních sekvencí. Zvláště výhodné promotory zahrnují regulační sekvence genu H19 promotor genu IGF-1, a P3 a P4 promotor genu IGF-2. Jsou popsány expresní konstrukty a způsoby podávání takovýchto expresních konstruktů, využitelných při léčbě rakoviny.



19.06.00

- 1 -

PV2000-1201

44767

Způsob exprese heterologní sekvence v nádorové buňce

Předkládaná přihláška částečně navazuje na spolupodanou přihlášku pořad. číslo 08/943,608 ze 3. října 1997, která je zde v úplnosti zahrnuta odkazem.

5 1. Oblast techniky

Vynález se týká oblasti nádorové buněčné biologie a léčby rakoviny. Konkrétně se vynález týká specifické exprese heterologních genů v nádorových buňkách, zejména genů kódujících cytotoxické produkty.

10 2. Dosavadní stav techniky

2.1 Gen H19

Gen H19 je jedním z mála genů, o nichž se ví, že jsou u člověka imprintovány (Hurst et al., 1996, Nature Genetics 12:234-237). Na samém začátku embryogeneze je H19 exprimován z obou
15 chromosomálních alel (DeGroot et al., 1994, Trophoblast 8:285-302). Krátce poté však dochází k umlčení otcovské alely a transkribuje se pouze alela zděděná od matky.

H19 je vysoce exprimován během embryogeneze a poprvé byl identifikován jako gen, který je v játrech koordinovaně regulován
20 společně s alfa-fetoproteinem účinkem *trans*-působícího lokusu *raf* (Pachnis et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5523-5527). H19 byl vedle toho nezávisle naklonován řadou laboratoří, které se zabývaly izolací genů exprimovaných během diferenciací tkání. Například Davis et al. (1987, Cell 51:987-1000) identifikovali myší
25 homolog H19 při vyhledávání genů aktivních v časných fázích diferenciací buněk C3H10T1/2. Pourier et al. (1991, Development 113:1105-1114) zjistili, že myší H19 se exprimuje při diferenciaci

kmenových buněk a v době implantace. Transkripce lidského H19 genu byla rovněž pozorována v diferencujících se cytotrofoblastech z lidské placenty (Rachmilewitz et al., 1992, Molec. Reprod. Dev. 32:196-202).

5 Zatímco v průběhu fetálního života dochází k transkripci H19 RNA v řadě různých embryonálních tkání, po narození je exprese H19 zastavena. Avšak ve svaly a játrech dospělých myší (Brunkow a Tilghman, 1991, Genes & Dev. 5:1092-1101) byla zjištěna určitá relativně nízká hladina transkripce H19. Postnatálně je H19 aktivován
10 rovněž v nádorových buňkách. Ariel et al. (1997, Molec. Pathol. 50:34-44) prokázali expresi H19 v řadě nádorů vzniklých v tkáních, ve kterých je H19 exprimován prenatalně. Dále tyto autoři zjistili H19 RNA v nádorech odvozených z neurálních tkání, zejména v astrocytomech a ganglioneuroblastomech, o nichž není známá asociace s expresí
15 H19. Vzhledem k velkému množství nádorů exprimujících H19 RNA tyto autoři uvažovali o možnosti, že H19 je onkofetální RNA a navrhli výzkum H19 jako nádorového markeru pro lidské neoplazie.

Lidský i myší H19 gen byl naklonován a sekvenován (Brannan et al., 1990, Molec. Cell. Biol. 10:28-36). Srovnání lidského a myšího
20 genu H19 ukázalo celkovou 77% identitu nukleotidové sekvence. Navzdory této mezidruhovému homologii na nukleotidové úrovni, aminokyselinové sekvence odvozené z otevřených čtecích rámců obou genů vykazovaly nízkou identitu (*Id.*). Dále, ačkoliv H19 RNA je transkribována RNA polymerasou II, dochází u ní k sestřihu a
25 polyadenylaci, zdá se, že není překládána. Namísto toho bylo zjištěno, že H19 RNA asociuje s 28S cytoplasmatickou RNA, což vedlo k úvahám, že H19 RNA by mohla působit jako RNA složka ribonukleoproteinového komplexu (*Id.*).

Skutečná fyziologická role H19 není zcela jasná. H19 může
30 působit jako dominantně letální gen; vysoká ektopická exprese H19 transgenu u myší je příčinou letality krátce před narozením (Brunkow

et al., *supra*). Tento časový úsek letality se shoduje s dobou, kdy nastává represe transkripce H19 genu. Na druhé straně však nebyl pozorován žádný defekt u myší nesoucích heterozygotní nebo homozygotní knockout H19 alely (alel) (Leighton et al., 1995, Nature 375:34-39). Knockout mateřské alely brání imprintingu geneticky vázaného a opačně imprintovaného IGF-2 genu; výsledné myši jsou při narození větší než jejich sourozenci z vrhu díky zvýšené prenatální expresi IGF-2 (*Id.*). Jelikož tyto dva opačně imprintované geny sdílejí *cis*-působící regulační sekvence, Leighton se spolupracovníky uvažovali o možnosti, že H19 by mohl hrát roli v imprintingu IGF-2 genu.

Produktu H19 genu je dále též přisuzována funkce nádorové supresorové RNA. Hao et al. (1993, Nature 365:764-767) popsali, že transfekce dvou embryonálních nádorových buněčných linií, RD a G401, DNA konstruktem exprimujícím H19, vedla k retardaci buněčného růstu, k morfologickým změnám a ke snížení tumorigenity v nude myších. Takováto nádorová supresorová aktivita je v souladu s pozorovanou letalitou ektopické exprese (Hao et al., *supra*), jakož i se zvětšenou velikostí myší majících knockout mateřské alely H19 (Leighton et al., *supra*). Představa, že H19 je nádorový supresor však zůstává kontroverzní. Některé výsledky nebyly údajně reprodukovány a případný jiný nádorový supresorový gen může existovat v těsné vazbě k H19 (Ariel et al., *supra*). Navrhovaná funkce H19 jako nádorového supresoru je také v rozporu s experimentálními údaji, podle kterých dochází k aktivaci H19 v širokém spektru nádorových buněk (viz například Lustig-Yariv et al., 1997, Oncogene 23:169-177).

2.2 Geny růstového faktoru podobného insulinu (Insulin-like Growth Factor, IGF)

IGF-2 je další imprintovaný gen, jehož exprese závisí na tom, z kterého rodiče pochází. Avšak na rozdíl od H19 je IGF-2 mateřsky

imprintován, jak u myši tak u lidí, a proto je exprimován z otcovské alely (Rainier et al., 1993, Nature 363:747-749). Lidský IGF-2 gen vykazuje komplikovaný transkripční profil. Existují čtyři IGF-2 promotory, jež jsou tkáňově a vývojově specificky aktivovány. Pouze tři
5 z promotorů, P2, P3 a P4 jsou imprintovány a jsou aktivní během fetálního vývoje a v rakovinných tkáních. Čtvrtý promotor, P1, není imprintován a je aktivován pouze v dospělých játrech a v choroidální pleteni (viz Holthuizen et al., 1993, Mol. Reprod. Dev. 35:391-393). P3 promotor IGF-2 genu snad hraje roli v progresi jaterní cirhózy
10 a hepatocelulárního karcinomu (Kim a Park, 1998, J. Korean Med. Sci. 13:171-178).

Ztráta imprintingu IGF-2 byla zjištěna v případě Wilmsova nádoru (Ogawa et al., 1993, Nature 363:749-751). Toto pozorování vedlo mnoho badatelů k představě, že ztráta imprintingu a bialelická
15 exprese imprintovaných genů může hrát roli v poruchách růstu a ve vývoji rakoviny (viz také Rainier et al., 1993, Nature 362:747-749; Glassman et al., 1996, Cancer Genet. Cytogenet. 89:69-73).

2.3 Nádorově specifická genová terapie

20 Regulační oblasti genů asociovaných s nádory se používají k cílené selektivní expresi sebevražedného genu v buňkách odvozených z nádorů. Například v hepatocelulárním karcinomu je indukována exprese alfa-fetoproteinu. Huber et al. (1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043) použili regulačních sekvencí genů
25 albuminu nebo alfa-fetoproteinu k cílené expresi thymidin kinasy viru varicella-zoster (VZV TK) v buňkách hepatomu. Hepatomové buňky infikované *in vitro* retrovirovým vektorem obsahujícím jeden z těchto expresních konstruktů exprimovaly VZV TK a staly se citlivé vůči normálně netoxickému 6-methoxypurin arabinonukleosidu (araM).
30 Kaneko et al. (1995, Cancer Res. 55:5283-5287) sestrojili adenovirový vektor exprimující HSV TK pod kontrolou regulačních sekvencí alfa-

fetoproteinu. Rekombinantní adenovirové částice obsahující tento vektor byly přímo injikovány do nádorů odvozených z hepatocelulárního karcinomu, vytvořených v bezthymových "nude" myších. Následné intraperitoneální injekce gancicloviru způsobily
5 regresi nádorů odvozených z hepatocelulárního karcinomu.

Osaki et al. (1994, Cancer Res. 54:5258-5261) transfekovali plicní karcinomové buňky A54 expresním vektorem, který obsahoval regulační sekvence genu pro antigen plicního embryonálního karcinomu spojené s kódující sekvencí thymidin kinasy viru Herpes
10 simplex (HSV TK). Transfekované buňky byly citlivé vůči gancicloviru. Navíc i růst nádorů v nude myších vyvolaný podkožní injekcí transfekovaných buněk byl inhibován opakovanými intraperitoneálními injekcemi gancicloviru. Nedávno však bylo zjištěno, že gen karcinoembryonálního antigenu je exprimován v normální střevní
15 sliznici, což omezuje použitelnost těchto regulačních sekvencí jakožto nádorově specifických regulačních oblastí (Osaka et al., *supra*). Přetrvává tedy potřeba vývoje vektorů pro genovou terapii, které by specificky exprimovaly genové produkty v nádorových buňkách.

3. Podstata vynálezu

20 Vynález se týká způsobů a prostředků pro indukci selektivní exprese heterologních genů v nádorových buňkách. Vynález se zejména týká polynukleotidů obsahujících regulační sekvence funkčně spojené s heterologními geny, jimiž se dá docílit nádorově specifická exprese heterologních genů. Konkrétněji, sekvence regulující
25 transkripci je odvozena z genomově imprintovaného genu, který je specificky exprimován v rakovinných buňkách, jako např. gen H19 nebo P3 a P4 promotory genu IGF-2, a heterologní gen kóduje cytotoxický protein nebo cytostatický genový produkt. V jiném provedení vynálezu je k heterolognímu genu funkčně připojený IGF-1
30 promotor tak, aby docházelo k nádorově specifické expresi genu.

Regulační sekvence budou řídit expresi v řadě různých rakovinných buněčných typů. Takovéto způsoby a prostředky jsou použitelné při léčbě mnoha různých typů rakoviny a hyperproliferačních stavů.

Jedním aspektem vynálezu jsou expresní vektory obsahující polynukleotidy zahrnující takovéto regulační oblasti, které jsou funkčně spojené s heterologními geny. Mezi obzvláště vhodné regulační oblasti patří regulační oblasti genu H19, tj. promotorové a enhancerové sekvence, IGF-2 promotory P3 a P4, a promotor IGF-1. H19 enhancer a jeho aktivní části mohou být použity v jakékoli kombinaci s H19 promotorem, IGF-1 promotorem, IGF-2 P3 promotorem nebo IGF-2 P4 promotorem. Vynález také zahrnuje hostitelské buňky obsahující takovéto vektory. V tomto ohledu může být expresní konstrukt obsahující heterologní gen pod kontrolou H19 promotoru a H19 enhanceru, nebo bez H19 enhanceru, zaveden do buňky společně s dalším konstruktem, který obsahuje heterologní gen pod kontrolou IGF-1 promotoru nebo IGF-2 P3 nebo P4 promotoru v kombinaci s H19 enhancerem. V jiném aspektu poskytuje vynález způsoby využití takovýchto vektorů k expresi heterologních genů v nádorových buňkách. Ještě jiným aspektem vynálezu je léčba rakoviny genovou terapií s využitím vektorů podle vynálezu.

4. Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1A-1C. Nukleotidová sekvence promotorové oblasti lidského H19. Obrázek ukazuje promotorovou oblast od nukleotidové pozice -837 do -7 (relativně k začátku transkripce) (SEQ ID NO:1)

Obrázek 2. Schéma vektorů použitých k expresi heterologního genu pod kontrolou regulačních sekvencí H19.

Obrázek 3A-3E. Regulační sekvence H19 řídí expresi heterologního genu (CAT) v liniích rakovinných buněk močového

měchýře. Specifická aktivita CAT (cpm/ μ g proteinu) je vynesena pro pět různých uvedených buněčných linií jako funkce vektoru použitého k transfekci. Obrázek 3A: HT-1376 buňky. Obrázek 3B: EJ28 buňky. Obrázek 3C: T24P buňky. Obrázek 3D: 1197 buňky. Obrázek 3E: UM-UC-3 buňky. Následující vektory jsou podrobněji popsány níže v části 6: (1) pCAT-basic; (2) pCAT-control; (3) pH19E; (4) pH19EH19D; a (5) pH19EH19R.

Obrázek 4A-4E. Promotory P3 a P4 IGF-2 řídí expresi heterologního genu (luciferasy) v liniích rakovinných buněk močového měchýře. Specifická aktivita luciferasy (jednotky/ μ g proteinu) je vynesena pro pět různých uvedených buněčných linií jako funkce IGF-2 promotoru použitého v transfekovaném konstruktu k aktivaci exprese luciferasy. Obrázek 4A: T24P buňky. Obrázek 4B: 1376 buňky. Obrázek 4C: UM-UC3 buňky. Obrázek 4D: 1197 buňky. Obrázek 4E: EJ28 buňky. Vektory jsou popsány podrobněji níže v části 10.

Obrázek 5. Nukleotidová sekvence promotorového fragmentu lidského H19 (SEQ ID NO:2).

Obrázek 6. Nukleotidová sekvence 0,9 kb enhancerového fragmentu H19 (SEQ ID NO:3).

Obrázek 7A a 7B. Nukleotidová sekvence 2 kb enhancerového fragmentu H19 (SEQ ID NO:4).

Obrázek 8A-8C. Nukleotidová sekvence 4 kb enhancerového fragmentu H19 (SEQ ID NO:5).

Obrázek 9A-9C. Exprese luciferasy v nádorových buňkách po transfekci s vektory obsahujícími různé kombinace H19 regulační oblasti a P4 promotoru. Obrázek 9A: 5637 buňky. Obrázek 9B: Huh7 buňky. Obrázek 9C: 293T buňky.

Obrázek 10A-10E. Exprese luciferasy v nádorových buňkách po transfekci s vektory obsahujícími H19 regulační oblasti. Obrázek

10A: 293T buňky. Obrázek 10B: T24P buňky. Obrázek 10C: Huh7 buňky. Obrázek 10D: 5637 buňky. Obrázek 10E: RT112 buňky.

5. Podrobný popis vynálezu

5 Vynález částečně vychází z objevu, že k cílené expresi
žádoucích kódujících sekvencí v rakovinných buňkách lze využít
regulačních oblastí z genomově imprintovaných genů, jež jsou
exprimovány v rakovinných buňkách. Konkrétně bylo zjištěno, že
exprese H19 je aktivována v širokém spektru karcinomů, jež zahrnují,
10 ale bez omezení, karcinom močového měchýře, hepatocelulární
karcinom, hepatoblastom, rhabdomyosarkom, ovariální karcinom,
cervikální karcinom, karcinom plic, karcinom prsu, karcinom
dlaždicových buněk na hlavě a krku, karcinom jícnu, karcinom štítné
žlázy, astrocytom, ganglioblastom a neuroblastom. Dále bylo zjištěno,
15 že v nádorových buňkách jsou specificky aktivovány rekombinantní
DNA konstrukty, jež obsahují oblasti H19 promotoru funkčně spojené
s heterologním genem, nebo promotor P3 nebo P4 genu IGF-2
funkčně spojený s heterologním genem, nebo konstrukty obsahující
takovýto promotor v kombinaci se spodním (downstream) H19
20 enhancerem. V jiném aspektu vynálezu se k řízení exprese
heterologního genu využívá IGF-1 promotor.

V jednom ze svých aspektů tedy vynález poskytuje způsoby
a prostředky pro změnu fenotypu rakovinných buněk nebo pro jejich
selektivní zabití. Tohoto cíle je dosaženo tím, že do buněk se vpraví
25 polynukleotid zahrnující regulační oblasti z genomově imprintovaných
genů, jež jsou exprimovány v rakovinných buňkách, funkčně spojené
s heterologním genem. Heterologní gen může kódovat například
cytostatikum nebo cytotoxické agens (např. toxin, antisense RNA nebo
ribozym).

Regulační oblasti genomově imprintovaných genů, jež jsou exprimovány v rakovinných buňkách zahrnují, ale bez omezení, H19 promotor a enhancer, a IGF-2 promotor P3 a P4.

Pro účely vynálezu zde popsaného, výraz "funkčně spojený" znamená, že nukleotidová sekvence je připojena k regulační sekvenci způsobem umožňujícím, aby exprese nukleotidové sekvence byla řízená regulační sekvencí.

"Heterologní" genová sekvence se týká, v bezprostředním smyslu, genové sekvence, jež normálně není funkčně spojená s regulačními sekvencemi genu H19. Obecně, heterologní genové sekvence zahrnují sekvence, jež kódují cytostatické nebo cytotoxické genové produkty.

Výraz "exprese", jak se zde užívá, se týká transkripce určité DNA, a dále sestřihu, opracování, stability a případně translace odpovídajícího mRNA transkriptu. V závislosti na struktuře vnesené molekuly DNA může být exprese přechodná nebo kontinuální.

5.1. Regulační sekvence genu H19, promotorů P3 a P4 genu IGF-2 a promotoru IGF-1

Níže jsou popsány regulační sekvence H19, jež mohou být použity k specifické aktivaci exprese heterologní kódující sekvence v nádorové buňce. Tyto H19 regulační sekvence zahrnují H19 promotorovou oblast nad genem (upstream) a/nebo spodní (downstream) H19 enhancerovou oblast. Nukleotidová sekvence jedné H19 promotorové oblasti je ukázána v obrázku 1A-1C (SEQ ID NO:1). Tato 830 bp dlouhá nukleotidová sekvence sahá od nukleotidové pozice -837 k pozici -7, počítáno od místa čepičky (jak popsali Brannan at al., *supra*). Konsenzní TATA sekvence se nachází mezi nukleotidy -27 a -35. Dvě konsenzní AP2 vazebná místa (shoda 8/9) se nacházejí přibližně -500 a -40 nukleotidů nad místem iniciace

transkripce. Jak je podrobněji diskutováno níže, předřazení přibližně 830 bp regulační oblasti před kódující sekvencí heterologního genu postačuje k expresi funkčně připojeného heterologního genu v rakovinných buňkách, jež také exprimují endogenní H19. Kromě
5 toho i další oblast promotoru H19, nacházející se mezi nukleotidy -819 až +14 (Obrázek 5, SEQ ID NO:2), postačuje k expresi funkčně připojeného heterologního genu v rakovinných buňkách.

Do konstruktů s H19 promotorem a heterologním genem může být případně přidána spodní enhancerová oblast lidského H19 genu,
10 aby se dosáhlo vyšší hladiny nádorově specifické exprese. Jak je zevrubněji popsáno níže a ilustrováno příkladem v části 6. tato spodní enhancerová oblast je obsažena v SacI restričním fragmentu sahajícím od +6kb k +11kb vzhledem k počátku transkripce. Jak se očekává od enhancerové sekvence i tento spodní enhancer působí
15 bez ohledu na orientaci, tzn. může být umístěn v opačné nebo stejné orientaci (vzhledem k orientaci H19 enhanceru v endogenním H19 genu) za kódující oblast heterologního genu pod kontrolou H19 promotoru. Fragmenty tohoto enhanceru, obsahující sekvence ukázané na Obr. 6, 7A, 7B a 8A-8C (SEQ ID NO:3-5), rovněž mohou
20 napomáhat genové expresi.

Expresi IGF-1 genu je spojována s rakovinou plic a s rakovinou prsu. IGF-1 promotor se nachází mezi nukleotidy 1 - 1630 v sekvenci lidského genu IGF-1 (přírůstkové číslo databáze Genbank M12659 M77496 a je zde zahrnut odkazem; Rotwein et al., 1986, J. Biol.
25 Chem. 261:4828-4832).

Při expresi IGF-2 genu se využívá jednoho ze čtyř různých promotorů. Tři z těchto promotorů jsou imprintovány a jsou exprimovány v embryonálních tkáních; promotor P1 je však aktivován pouze v dospělých tkáních (Sussenbach et al., 1992, Growth Reg.
30 2:1-9). P3 promotor hraje roli v hepatokarcinomu. Rovněž bylo zjištěno, že imprintovaný promotor P4 (nukleotidová sekvence -546 až

+102 genu IGF-2) a promotor P3 (nukleotidová sekvence -1229 až +140 genu IGF-2) jsou aktivovány v lidských rakovinných buňkách močového měchýře a mohou být využity k směřování exprese funkčně spojeného heterologního genu do nádorových buněk. Promotory P3 a P4 genu IGF-2 mohou být použity v kombinaci s H19 enhancerem nebo s jeho aktivními fragmenty.

Tyto regulační sekvence z genomově imprintovaných i neimprintovaných genů, jež jsou exprimovány v rakovinných buňkách, mohou být dále analyzovány, aby se stanovily minimální regulační sekvence nutné k dosažení žádoucí nádorově specifické exprese. Promotorová oblast může být například pozměněna adicemi, substitucemi nebo delecemi a testována na funkčnost v nádorově specifické expresi. Různé části spodního H19 enhanceru mohou být jednotlivě analyzovány co do schopnosti zvyšovat transkripci z H19 promotoru.

Změny v regulačních sekvencích lze provést pomocí řady chemických a enzymatických metod, které jsou dobře známy v oboru. Například úseky sekvencí vymezené restrikčními místy mohou být deletovány. Místně cílenou mutagenézou lze definovaným způsobem měnit sekvenci a/nebo vnášet do specifických úseků sekvence restrikční místa. Deleční mutanty mohou být generovány i s použitím DNA nukleas jako jsou Bal31 nebo ExoIII a S1 nukleasa. Progresivně větších delecí v regulačních sekvencích se dosahuje inkubací DNA s nukleasami po delší dobu (pro přehled technik používaných k mutagenéze, viz Ausubel et al., 1989, Current Protocols for Molecular Biology).

Pozměněné sekvence se vyhodnocují podle schopnosti aktivovat nádorově specifickou expresi heterologních kódujících sekvencí ve vhodných hostitelských buňkách, zejména v buňkách, které jsou odvozené z karcinomů exprimujících H-19 (např. buňky karcinomu močového měchýře, jako jeden příklad). Jakékoli

pozměněné regulační sekvence, jež mají zachovanou schopnost řídit nádorově specifickou expresi budou zahrnuty do rekombinantních expresních vektorů pro další využití, a spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

5 Pod kontrolou těchto regulačních sekvencí mohou být exprimovány mnohé různé heterologní geny, jako například geny kódující toxické genové produkty, potenciálně toxické genové produkty a genové produkty s antiproliferační nebo cytostatickou aktivitou. Mohou se exprimovat i markerové geny, včetně enzymů (např. CAT,
10 beta-galaktosidasa, luciferasa), fluorescenčních proteinů, jako je zelený fluorescenční protein, nebo antigenních markerů.

Cytotoxické genové produkty zahrnují, v širší definici, jak toxiny tak činitele indukující apoptosu. Pro účely vynálezu se kromě toho mezi cytotoxické genové produkty zahrnují enzymy metabolismu, které
15 konvertují prekursor na cytotoxický produkt. Příklady cytotoxických genových produktů, které mohou být podle vynálezu použity, zahrnují záškrťový toxin, toxin *Pseudomonas*, ricin, cholerový toxin, PE40 a nádorové supresorové geny jako jsou gen retinoblastomu a p53. Vedle toho mohou být použity sekvence kódující apoptické peptidy,
20 které indukují buněčnou apoptosu. Takovéto apoptické peptidy zahrnují A β peptid u Alzheimerovy choroby (viz LaFerla et al., 1995, Nat. Genet. 9:21-30), atriální natriuretický peptid (viz Wu et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:14860-14866), peptid podobný calcitoninu (viz Sakuta et al., 1996, J. Neuroimmunol. 67:103-109), jakož i další
25 známé nebo dosud neobjevené apoptické peptidy.

Mezi metabolické enzymy, které konvertují prekursory na cytotoxický produkt, patří thymidinkinasa (z viru herpes simplex nebo varicella zoster), cytosindeaminasa, nitroreduktasa, cytochrom P-450 2B1, thymidinfosforylase, purinnukleosidfosforylase, alkalická
30 fosfatasa, karboxypeptidasa A a G2, linamarasa, laktamasa

a xanthinoxidasa (viz Rigg a Sikora, August 1997, Mol. Med. Today, str.359-366).

Expresními konstrukty zde popsanými lze do rakovinných buněk vnášet i antisense, antigenní nebo aptamerní oligonukleotidy. V rakovinné buňce mohou být dále exprimovány ribozymy nebo jednořetězcové RNA s cílem inhibovat expresi konkrétních genů. Cílové geny pro zásah těmito antisense nebo ribozymovými molekulami jsou geny, jejichž produkty jsou nezbytné pro přežití buňky nebo pro udržení rakovinového fenotypu. Takovéto cílové geny zahrnují, ale bez omezení, cdk2, cdk8, cdk21, cdc25A, cyklinD1, cyklinE, cyklinA a cdk4.

Do buněk se například zavádějí vektory, které pod kontrolou regulačních sekvencí imprintovaných genů nebo pod kontrolou promotoru IGF-1, aktivních v rakovinných buňkách, exprimují antisense RNA molekuly nebo ribozymy specifické vůči transkriptům onkogenních forem p53, c-fos, c-jun, K-ras a/nebo Her2/neu, aby se zastavila exprese endogenních genů. Nádorové buňky, v nichž je exprimován H19 a které tedy mohou aktivovat H19 regulační sekvence (nebo které specificky aktivují promotory IGF-1, IGF-2 P3 nebo P4) mohou být specifickými terči pro expresi antisense RNA nebo ribozymové RNA.

Přístupy využívající antisense techniku zahrnují návrh oligonukleotidů (v tomto případě mRNA) komplementárních k cílové mRNA. Antisense oligonukleotidy se budou vázat ke komplementárním cílovým mRNA transkriptům a bránit jejich translaci. Absolutní komplementarita, byť výhodná, není nutná. Výraz sekvence "komplementární" k části RNA, jak se zde užívá, znamená sekvenci komplementární natolik, že je schopná hybridizovat k RNA a tvořit s ní stabilní duplex. Schopnost hybridizovat bude záviset jak na stupni komplementarity tak na délce antisense nukleové kyseliny. Obecně, čím delší je hybridizující nukleová kyselina, tím více nepárujících bazí

vůči RNA může obsahovat a přesto s ní může vytvářet stabilní duplex (nebo triplex, podle okolností). Osoba zběhlá v oboru může určit tolerovatelný stupeň nekomplementarity pomocí standardních postupů na stanovení teploty tání hybridizovaného komplexu.

5 V inhibici translace by měly být nejúčinnější oligonukleotidy, jež jsou komplementární k 5' konci cílové mRNA, např. k 5' nepřekládané sekvenci až po (a včetně) iniciační AUG kodon. V nedávné době se však prokázalo, že i sekvence komplementární k 3' nepřekládaným sekvencím molekul mRNA účinně inhibují translaci. Viz, obecně,
10 Wagner, 1994, Nature 372:333-335. Oligonukleotidy komplementární k 5'- nebo 3'- nepřekládaným nekódujícím oblastem transkriptů cílových genů mohou tedy být použity v tomto "antisense" přístupu k inhibici translace endogenních genů. Oligonukleotidy komplementární k 5' nepřekládané oblasti mRNA by měly zahrnovat komplement
15 iniciačního kodonu AUG. Antisense oligonukleotidy komplementární ke kódujícím oblastem mRNA jsou méně účinnými inhibitory translace, mohly by ale v souladu s vynálezem být použity. Antisense nukleové kyseliny, ať již mají hybridizovat k 5', 3' nebo kódující oblasti cílové mRNA, by měly mít délku alespoň šest nukleotidů, s výhodou od 6 do
20 asi 50 nukleotidů. Ve specifických aspektech je délka oligonukleotidu alespoň 10 nukleotidů, alespoň 17 nukleotidů, alespoň 25 nukleotidů nebo alespoň 50 nukleotidů.

Bez ohledu na volbu cílové sekvence je výhodné provést nejprve *in vitro* pokusy, aby se kvantitativně vyjádřila schopnost antisense
25 oligonukleotidu inhibovat genovou expresi. V těchto studiích by měly být i kontroly na rozlišení inhibice genu antisense oligonukleotidem od nespecifických biologických účinků oligonukleotidů. Je rovněž výhodné, aby se v těchto studiích porovnaly hladiny cílové RNA nebo proteinu s hladinami RNA nebo proteinu vnitřní kontroly.

30 Translaci cílové mRNA lze také bránit použitím molekul ribozymu navrženého tak, aby katalyticky štěpil příslušný cílový gen.

(Viz např. PCT International Publication WO90/11364, publikovanou 4.října 1990; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225). Je-li ribozym specifický pro genový transkript kódující protein, který je nezbytný pro růst rakovinné buňky, může takový ribozym vyvolat ztrátu fenotypu rakovinné buňky. K cílenému zničení molekul mRNA mohou 5 být použity ribozymy, které štěpí tyto mRNA ve specifických rozpoznávacích místech, avšak výhodnější je použití "hammerhead" ribozymů. Hammerhead ribozymy štěpí molekuly mRNA v místech diktovaných ohraničujícími oblastmi, jež tvoří komplementární páry 10 bazí s cílovou mRNA. Jediným požadavkem je, aby mRNA měla následující sekvenci dvou bazí: 5'-UG-3'. Konstrukce a produkce hammerhead ribozymů je dobře známá v oboru a je podrobněji popsána v práci Haseloff a Gerlach, 1988, Nature 334:585-591. Ribozym se s výhodou konstruuje tak, aby rozpoznávané štěpící místo 15 leželo blízko 5'konce cílové mRNA; tedy tak, aby se zvýšila účinnost a minimalizovala akumulace nefunkčních mRNA transkriptů.

Ribozymy pro použití podle vynálezu také zahrnují RNA endoribonukleasy (dále v textu "ribozymy Cechova typu"), jejichž prototyp se vyskytuje přirozeně v Tetrahymena thermophila (známé 20 jako IVS nebo L-19 IVS RNA), a které podrobně popsal Thomas Cech se spolupracovníky (Zaug et al., 1984, Science 224:574-578; Zaug a Cech, 1986, Science 231:470-475; Zaug et al., 1986, Nature 324:429-433; publikovaná Mezinárodní Patentová Přihláška WO 88/04300 University Patents Inc.; Been a Cech, 1986, Cell 47:207- 25 216). Ribozymy Cechova typu mají aktivní místo o osmi párech bazí, které hybridizuje k sekvenci cílové RNA, načež nastává štěpení cílové RNA. Vynález předpokládá použití těch ribozymů Cechova typu, jejichž 8 bp sekvence aktivního místa hybridizuje k sekvencím přítomným v cílových genech.

5.2 Aktivace genů v nádorových buňkách

Buňky, ve kterých dochází k reaktivaci exprese imprintovaného genu budou též schopné specificky aktivovat expresi heterologního genu z vektoru obsahujícího regulační oblasti takového imprintovaného genu funkčně spojené s heterologním genem.

5 Takovéto buňky, zejména nádorové buňky jsou vhodným terčem pro postupy genové terapie podle vynálezu. Exprese specifická pro H19 a IGF-2 P3 a P4 může být stanovena v nádorech i v buněčných liniích technikami analýzy RNA, *in situ* hybridizace a s použitím konstruktů obsahujících reporterové geny. Podobně mohou být zjištěny nádorové

10 buňky, v nichž je aktivována exprese IGF-1 genu, a při genové terapii využít IGF-1 promotor k aktivaci exprese heterologního genu.

Ve většině aplikací RNA analýzy se používá značená sonda, specificky hybridizující s transkriptem sledovaného genu, kterou lze připravit kteroukoli z technik dobře známých v oboru. Značená sonda

15 může obsahovat alespoň 15-30 bází komplementárních k H19 nukleotidové sekvenci, výhodněji obsahuje alespoň 50 až 150 bází komplementárních k H19 transkriptu. Obzvláště výhodnou hybridizační sondou pro H19 expresi je polynukleotid komplementární ke 3' konci H19 mRNA v úseku přibližně 800 nukleotidů nad polyadenylačním

20 místem až po poly A místo.

Ve specifickém provedení vynálezu, jež je níže ilustrováno příkladem, se značená antisense RNA sonda připravila *in vitro* s použitím T7 nebo T3 expresního plasmidu. H19 sondy se dají též značit s použitím náhodných primerů a značeného nukleotidu,

25 například se soupravou Prime-It (Stratagene, La Jolla, CA; katalog. č. 300392). Jinak lze připravit značenou sondu i pomocí PCR reakce s použitím cDNA klonu obsahujícím kódující oblast H19 a primerů navržených tak, aby se amplifikovala část kódující oblasti. Další možností je standardní reakce posunu jednořetězcového zlomu ("nick translation").

30

Vhodný způsob označení polynukleotidových sond zahrnuje nukleotidy obsahující radioaktivní izotopy (jako jsou ^{35}S a ^{32}P), fluorescentní, luminiscentní a barevné značky, a enzymové molekuly.

Značená sonda se *in situ* hybridizuje k buňce nebo k vzorku tkáně s použitím standardních technik, jak je popsáno níže příkladem a ve spolupodané US patentové přihlášce poř.č. 08/704,786, která je zde zahrnuta odkazem. Je-li k dispozici dostatečné množství příslušných buněk, lze stanovení hladiny exprese mRNA sledovaného genu provést standardní RNA analýzou (jako je např. northernová analýza, chránění před RNAsou, nebo extenze primeru).

Takovéto analýzy genové exprese je možné provádět též "in situ", tzn. přímo v tkáňových řezech (fixovaných a/nebo zmrazených) připravených ze vzorků tkání pacientů, odebraných při biopsiích nebo resekcích, takže není nutná purifikace nukleových kyselin. K těmto *in situ* postupům se mohou použít sondy a/nebo primery popsané výše. (Viz např. Nuovo, G.J., 1992, "PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications", Raven Press, NY).

Jinou možností jak určit, zda v buněčném typu nebo nádoru bude možná specifická aktivace expresních konstruktů obsahujících konkrétní regulační oblasti funkčně spojené s heterologním genem, je přímá transfekce takovýchto expresních konstruktů do buňky. Pro tyto účely je výhodné, aby heterologní gen byl markerový gen. Pozitivní výsledek testu na produkt markerového genu znamená, že buňka nebo buněčná linie jsou schopné aktivovat expresi z použitých regulačních oblastí.

Příklady typů nádorů s aktivovanou expresí H19, zjištěné pomocí shora uvedených technik, jsou:

A. Pevné nádory u dětí

1. Wilmsův nádor
2. Hepatoblastom

3. Embryonální rabdomyosarkom
- B. Nádory zárodečných buněk a trofoblastu
 1. Nádory zárodečných buněk testes
 2. Nezralý teratom vaječníku
 - 5 3. Sakrokokcygeální nádor
 4. Choriokarcinom
 5. Nádory trofoblastu přivráceného k placentě
- C. Epiteliální nádory u dospělých
 1. Karcinom močového měchýře
 - 10 2. Hepatocelulární karcinom
 3. Karcinom vaječníku
 4. Cervikální karcinom
 5. Karcinom plic
 6. Karcinom prsu
 - 15 7. Karcinom dlaždicových buněk na hlavě a krku
 8. Karcinom jícnu
 9. Karcinom štítné žlázy
- D. Neurogenní nádory
 1. Astrocytom
 - 20 2. Ganglioblastom
 3. Neuroblastom

Shora uvedené rakoviny jsou tedy léčitelné způsobem podle vynálezu. Vlastně jakýkoliv nádor, který aktivuje expresi H19 je možné léčit způsobem podle vynálezu.

- 25 Aplikací shora uvedených technik lze určit i nádory, které aktivují IGF-1 a promotory P3 a P4 genu IGF-2. Takovéto nádory jsou rovněž

léčitelné způsoby podle vynálezu. Například IGF-2 je aktivován v nádorech dětského věku, jako jsou Wilmsův nádor, rabdomyosarkomy, neuroblastomy a hepatoblastomy.

5 **5.3 Způsoby jak vnášet do hostitelských buněk polynukleotidy, jež jsou pod kontrolou regulačních sekvencí**

Vynález se rovněž vztahuje na hostitelské buňky transfekované polynukleotidy, jež obsahují regulační oblasti funkčně spojené
10 s heterologním genem. Takovéto hostitelské buňky se mohou udržovat v kultuře nebo mohou být součástí zvířete, s výhodou savce. Uvedené polynukleotidy se typicky ligují do kteréhokoli z široké škály vektorů, které se pak následně vnášejí do buněk s použitím zde
15 presentovaných postupů a materiálů. Takovéto vektory mohou být konstruovány s použitím dobře zavedených technik molekulární biologie (viz obecně, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, sv. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; a Current Protocols in Molecular Biology, 1989, John Wiley & Sons, všechny svazky tohoto manuálu a jejich pravidelné doplňky jsou
20 zde zahrnuty odkazem). V případech, kdy je požadována i translace, bude heterologní gen konstruován tak, aby obsahoval i vhodný 3' polyadenylační signál.

5.3.1 Kultivované buňky

25 Hostitelské buňky transfekované polynukleotidy obsahujícími regulační oblasti imprintovaného genu funkčně spojené s heterologním genem mohou být jakékoli prokaryotické nebo eukaryotické buňky. Ligace polynukleotidu do genového konstruktu, jako je vektor, a transformace nebo transfekce do hostitelských buněk, buď
30 eukaryotických (kvasinky, buňky ptačí, hmyzí nebo savčí) nebo

prokaryotických (bakteriální buňky), jsou standardní postupy široce používané v mikrobiálních technologiích nebo v kultivaci tkáňových kultur.

Vektory vhodné pro kultivaci předmětných polynukleotidů v bakteriálních buňkách, jako jsou *E. coli*, zahrnují plasmidy následujících typů: plasmidy odvozené od pBR322, plasmidy odvozené od pEMBL, plasmidy odvozené od pEX, plasmidy odvozené od pBTac, a plasmidy odvozené od pUC. V kvasinkách *S. cerevisiae* se jako užitečné klonovací a expresní vektory pro vnášení genetických konstruktů uplatňují plasmidy YEP24, YIP5, YEP51, pYES2 a YRP17 (viz například Broach et al., 1993 v *Experimental Manipulation of Gene Expression*, ed. M. Inouye, Academic Press, str. 83). Tyto vektory se mohou replikovat jak v *E. coli*, díky přítomnosti replikačního počátku ori z pBR322, tak i v kvasinkách, díky přítomnosti počátku replikace z kvasinkového 2 μ m plasmidu. Kromě toho mohou být použity markery resistance k antibiotikům, jako např. k ampicilinu.

Podobně i výhodné savčí vektory pro nukleotidy podle vynálezu obsahují prokaryotické sekvence, které umožňují namnožení vektoru v bakteriích. Takovéto vektory pro transfekci do savčích buněk se mohou konstruovat tak, aby se integrovaly do savčího chromosomu a získaly tak dlouhodobou stabilitu; pro tento účel mají připojený selektovatelný markerový gen. Pro transientní expresi je možné použít deriváty virů, jako jsou např. bovinní papillomavirus (BPV-1) nebo virus Epsteina-Barrové. Různé metody používané při přípravě plasmidů a jejich transformaci do hostitelských organismů jsou dobře známy v oboru. Další vhodné vektorové systémy, jakož i obecné postupy rekombinantní technologie uvádí Sambrook et al., *supra*.

Vynález rovněž zahrnuje využití polynukleotidů, obsahujících regulační oblast genu funkčně spojenou s heterologním genem, v genové terapii rakoviny a hyperproliferačních onemocnění. Pro účely genové terapie se mohou expresní konstrukty podle vynálezu podávat v jakémkoli biologicky účinném nosiči, např. jakémkoli přípravku nebo prostředku schopném účinně dopravit rekombinantní gen do buněk *in vivo*. Přístupy zahrnují inserci předmětného genu do virových vektorů, včetně rekombinantních retrovirů, adenoviru, adeno-asociovaného viru a viru herpes simplex-1, nebo do rekombinantních bakteriálních nebo eukaryotických plasmidů. Virové vektory transfekují buňky přímo; plasmidová DNA může být vpravena do buněk např. pomocí kationických polymerů, kationických liposomů (např. lipofectinu, derivátů cholesterolu jako D.D.A.B. a kationických fosofolipidů) nebo derivatizovaných (např. s protilátkou konjugovaných) konjugátů polylysinu, gramicidinu S, umělých virových obálek nebo jiných takovýchto nitrobuněčných nosičů, jakož i přímou injekcí holého genového konstruktů, elektroporací nebo CaPO_4 koprecipitací. Současný přehled pojednávající o přenosu genů a expresních systémech při genové terapii rakoviny podává Cooper, 1996, *Seminars in Oncology* 23:172-187.

Transduce vhodných cílových buněk je prvním důležitým krokem při genové terapii; je zřejmé, že volba konkrétního gen-vnášejičního systému bude záviset na faktorech jako jsou fenotyp uvažovaného cíle a způsob aplikace, např. místní nebo systémové. Je rovněž jasné, že konkrétní genové konstrukty poskytované pro *in vivo* transdukcii expresních konstruktů jsou použitelné i pro *in vitro* transdukcii buněk, jako např. pro použití v *ex vivo* tkáňových kulturách popsaných shora.

Výhodný způsob jak zavést do buňky *in vivo* nukleovou kyselinu je použít virový vektor obsahující nukleovou kyselinu, např. konkrétní cytotoxický gen pod kontrolou H19 regulačních sekvencí. Infekce buněk virovým vektorem je výhodná tím, že nukleová kyselina se

dostane do velké části použitých buněk. Další výhodou je, že molekuly, např. cDNA kódované virovým vektorem, jsou v těchto buňkách, do nichž se dostane virový vektor, účinně exprimovány. Vhodné vektory, jež mohou být vnášeny do buněk s použitím zde uvedených způsobů a prostředků zahrnují, ale bez omezení, vektory na bázi viru herpes simplex, adenoviru, adeno-asociovaného viru, retrovirů, viru pseudorabies, alfa-herpes viru, a podobně. Podrobný přehled virových vektorů, zejména virových vektorů vhodných k modifikaci nereplikujících se buněk, jakož i způsoby užití těchto vektorů v souvislosti s expresí požadovaných polynukleotidů, lze nalézt v knize "Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications", ed. Caplitt and Loewy, Academic Press, San Diego (1995).

Bylo prokázáno, že infekční spektrum virů a tedy i vektorů odvozených z virů lze omezit, modifikují-li se obalové proteiny na povrchu virové částice (viz např. publikace PCT WO93/25234 a WO94/06920). Strategie používané k modifikaci infekčního spektra retrovirových vektorů například zahrnují: připojení protilátek specifických vůči antigenům buněčného povrchu k virovému env proteinu (Roux et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9079-9083; Julan et al., 1992, J. Gen. Virol. 73:3251-3255; a Goud et al., 1983, Virology 163:251-254); nebo připojení ligandu buněčného povrchového receptoru k virovým env proteinům (Neda et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:14143-14146). Připojení může být formou chemického kovalentního přisíťování proteinu nebo jiné molekuly (např. laktosy, čímž se env protein převede na asialoglykoprotein), jakož i vytvořením fúzovaných proteinů (např. fúzované proteiny typu jednořetězcová protilátka/env). Touto technikou mohou být například nasměrovány rekombinantní viry na nádorové buňky tak, že k povrchu rekombinantního viru se připojí protilátky namířené proti nádorovým povrchovým proteinům nebo proti molekulám asociovaným s nádorem. Tato technika je použitelná nejen k omezení tropismu virových částic

na určité buněčné typy, ale i ke konverzi ektotropního vektoru na vektor amfotropní.

Výhodný virový gen-vnášející systém, užitečný v předkládaném vynálezu, využívá vektory odvozené z adenoviru. Genom adenoviru se dá modifikovat takovým způsobem, že kóduje a exprimuje požadovaný genový produkt, ale jeho schopnost replikace v normálním lytickém životním cyklu je inaktivována. Viz například Berkner et al., 1988, BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; a Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155. Vhodné adenovirové vektory odvozené z adenoviru kmene AD typu 5 d1324 nebo jiných adenovirových kmenů (např. Ad2, Ad3, Ad7 atd) jsou dobře známy osobám zběhlým v oboru. Výhoda rekombinantních adenovirů může za jistých okolností spočívat v tom, že jsou použitelné k infekci širokého spektra buněčných typů, včetně epitelu dýchacích cest (Rosenfeld et al., 1992, *supra*), endoteliálních buněk (Lemarchand et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486), hepatocytů (Herz a Gerard, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816) a svalových buněk (Quantin et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584). Dále, virové částice jsou relativně stálé, lze je purifikovat a koncentrovat a mohou být modifikovány za účelem ovlivnění spektra infekivity. Kromě toho, vnesená adenovirová DNA (a cizí DNA v ní obsažená) se neintegruje do genomu hostitelské buňky, nýbrž zůstává episomální, čímž se lze vyhnout potenciálním problémům, jež mohou nastat v důsledku inserční mutageneze v případech, kdy se vnesená DNA integruje do hostitelského genomu (např. retrovirová DNA). Dále, "volná" kapacita adenovirového genomu pro cizí DNA je v porovnání s jinými vektory pro vnášení genů velká (až 8 kb) (Berkner et al., *supra*; Haj-Ahmand a Graham, 1986, J. Virol. 57:267). Většina replikačně-defektních adenovirových vektorů v současnosti používaných, a proto předkládaným vynálezem upřednostňovaných, mají zcela nebo zčásti deletovány virové geny E1 a E3, ponechávají si však až 80% adenovirového genetického materiálu (viz např. Jones et

al., 1979, Cell 16:683; Berkner et al., *supra*; a Graham et al., v Methods in Molecular Biology, E. J. Murray, Ed. (Humana, Clifton NJ, 1991) sv. 7, str. 109-127).

Jiný virový vektorový systém použitelný k vnášení předmětných
 5 expresních konstruktů je adeno-asociovaný virus (AAV). Adeno-
 asociovaný virus je přirozeně se vyskytující defektní virus, který pro
 účinnou replikaci a produktivní životní cyklus vyžaduje jiný, pomocný
 virus, jako např. adenovirus nebo herpes virus. (Pro přehled viz
 Muzyczka et al., 1992, Curr. Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-
 10 129). Je též jedním z mála virů, jež mohou integrovat svoji DNA do
 nedělících se buněk, a který vykazuje vysokou frekvenci stálé
 integrace (viz například Flotte et al., 1992, Am. J. Respir. Cell. Mol.
 Biol. 7:349-354; Samulski et al., 1989, J. Virol. 63:3822-3828;
 a McLaughlin et al., 1989, J. Virol. 63:1963-1973). Vektory obsahující
 15 pouhých 300 bp AAV sekvence jsou schopné zabalení a mohou se
 integrovat. Místo pro exogenní DNA je omezeno na zhruba 4,5 kb.
 K zavedení DNA do buněk může být použit AAV vektor, který popisují
 Tratschin et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260. Pomocí AAV
 vektorů byly do buněk různých typů zavedeny mnohé různé nukleové
 20 kyseliny (viz například Hermonat et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci.
 USA 81:6466-6470; Tratschin et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 4:2072-
 2081; Wondisford et al., 1988, Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin et
 al., 1984, J. Virol. 51:611-619; a Flotte et al., 1993, J. Biol. Chem.
 268:3781-3790).

25 Vedle metod přenosu DNA pomocí virů, například uvedených
 shora, se pro řízenou expresi žádaného heterologního genu ve tkáni
 zvířete používají i nevirové metody. Většina nevirových metod přenosu
 genů využívá normálních mechanismů používaných savčími buňkami
 pro vylučování a intracelulární transport makromolekul. Ve výhodných
 30 provedeních vynálezu se uplatňují nevirové systémy vnášení genů,
 které k vylučování a pohlcení předmětných expresních konstruktů

terčovou buňkou využívají endocytosu. Příklady takovýchto gen-vnášejších systémů zahrnují systémy odvozené z liposomů, polylysinové konjugáty a umělé virové obaly.

Při klinickém použití mohou být terapeutické expresní konstrukty vnášeny do pacienta jakýmkoli z mnoha způsobů, jež jsou
5 dobře známy v oboru. Například, farmaceutický prostředek obsahující gen-vnášejší systém může být zaváděn systémově, např. nitrožilní injekcí, přičemž k specifické expresi konstruktu v cílových buňkách dochází převážně na základě specifity transfekce dané buněčnou
10 nebo tkáňově specifickou expresí, vyplývající z regulačních sekvencí předřazených heterolognímu genu, nebo z kombinace regulačních sekvencí s gen-vnášejším systémem namířeným na konkrétní typy buněk. V jiných provedeních je počáteční vnesení rekombinantního expresního konstruktu do zvířete omezenější, neboť je místně
15 lokalizováno. Gen-vnášejší systém může být například zaveden prostřednictvím katétru (viz US Patent 5,328,470) nebo stereotaktické injekce (např. Chen et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). Expresní konstrukt podle vynálezu může být pro genovou terapii vnesen též pomocí elektroporace s použitím technik popsanych
20 například v Dev et al., 1994, Cancer Treat. Rev. 20: 105-115.

Farmaceutický preparát konstrukt pro genovou terapii může v podstatě sestávat z gen-vnášejšího systému v přijatelném ředícím roztoku, nebo může obsahovat gen-vnášejší systém zakotvený v
matrici, odkud se pomalu uvolňuje. V případech, kdy rekombinantní
25 buňky mohou produkovat kompletní gen-vnášejší systém, např. retrovirové vektory, může farmaceutický prostředek zahrnovat jednu nebo více buněk, jež produkují gen-vnášejší systém.

5.3.3 Terapeutické použití a dávkování

Je zřejmé, že z hlediska lékaře nebo pacienta je žádoucí každé zabránění nebo zmírnění nepříznivých symptomů doprovázejících nádorové onemocnění (např. bolesti, citlivost, úbytek váhy a podobně). Dále je žádoucí jakékoli snížení nádorové masy nebo rychlosti růstu nádoru, jakož i zlepšení histopatologického obrazu nádoru. Pro účely této přihlášky se budou tedy zde používané výrazy "léčba", "terapeutické využití", nebo "lékařské využití" týkat jakýchkoli a všech využití nárokovaných prostředků, jež jakýmkoli způsobem napravují stav nemoci nebo symptomy, nebo jinak zamezují, brání, brzdí nebo obracejí postup choroby nebo jiných nežádoucích symptomů.

Účinné dávkování a postup při léčbě může být stanoven obvyklým způsobem, přičemž se začíná s nízkou dávkou u laboratorních zvířat, postupně se dávky zvyšují a sledují se účinky a současně se systematicky pozměňuje dávkovací schéma. Studie na zvířatech, s výhodou na savcích, se běžně používají ke stanovení nejvyšší tolerované dávky bioaktivního agens na kilogram hmotnosti. Osoby znalé oboru extrapolují dávky pro další druhy, včetně člověka tak, aby byly účinné a přitom netoxické.

Před zahájením zkoušek účinnosti na lidech se provádí klinické studie Fáze I na normálních jedincích k určení bezpečných dávek. Při určování optimální dávky pro daného jedince musí klinici vzít do úvahy četné faktory. Hlavní roli hrají toxicita a biologický poločas konkrétního heterologního genového produktu. Další faktory zahrnují hmotnost pacienta, jeho stáří, celkový stav, konkrétní nádorové onemocnění a jeho vážnost, přítomnost jiných použitých léků, *in vivo* aktivita genového produktu a podobně. Zkušební dávkování se zvolí na základě výsledků studií na zvířatech a údajů v klinické literatuře.

Například, typická lidská dávka adenovirového vektoru, který obsahuje regulační oblast H19 funkčně spojenou s heterologním

genem kódujícím cytotoxický produkt jako je např. thymidinkinasa, je od 1×10^7 pfu do 1×10^{10} pfu injikovaných denně, přímo do nádorové masy. Výhodnější denní dávka takového adenovirového vektoru injikovaného přímo do nádoru je mezi 1×10^8 pfu a 1×10^{10} pfu, v závislosti na velikosti nádoru. Samozřejmě, u adenovirového vektoru obsahujícího H19 regulační oblast funkčně spojenou s heterologním genem pro cytotoxický produkt s jinou mírou toxicity, budou tyto hodnoty příslušně upraveny. Podobné dávky se mohou použít jako doporučený výchozí bod v případě adenovirového vektoru obsahujícího IGF-2 promotor P4 funkčně spojený s heterologním genem, kódujícím cytotoxický produkt jako je např. thymidinkinasa.

Různé biochemické složky podle vynálezu mají mít s výhodou, zejména pro *in vivo* použití, vysokou čistotu a být v podstatě prosty potenciálně škodlivých kontaminujících látek a vyhovovat jakostním normám např. alespoň jakosti NF (National Food grade, tj. národní potravinové normě), obecně alespoň analytické jakosti, a s výhodou alespoň farmaceutické jakosti). Pokud musí být daná sloučenina před použitím nejdříve syntetizována, měl by výsledkem takovéto syntézy nebo následné purifikace s výhodou být produkt, jenž je v podstatě prost jakýchkoli potenciálně toxických látek, jež mohly být použity v průběhu syntetických nebo purifikačních postupů.

Pro použití k léčbě pacienta s rakovinou poskytuje vynález v jednom ze svých aspektů rovněž soupravu nebo balíček ve formě sterilně plněné lahvičky nebo ampule, jež obsahuje polynukleotidový vektor, který obsahuje H19 regulační oblast funkčně spojenou s heterologním genem kódujícím cytotoxický produkt, nebo buňku, jež uvolňuje takovýto vektor. V jednom provedení souprava obsahuje polynukleotidový vektor, který obsahuje H19 regulační oblast funkčně spojenou s heterologním genem kódujícím cytotoxický produkt, a to jako přípravek připravený k aplikaci, s jednou nebo více dávkami, přičemž součástí balení je návod k použití při léčbě rakoviny.

Alternativně, a podle jiného provedení vynálezu, balíček poskytuje sterilně plněnou lahvičku nebo ampuli obsahující buňku nebo buněčnou linii uvolňující takovýto vektor. Vektor-uvolňující buňky nebo buněčná linie by měly být skladovány a převáženy ve zmraženém stavu. Souprava může také obsahovat médium a reagentie potřebné ke kultivaci vektor-uvolňujících buněk nebo buněčné linie.

Po popisu vynálezu následují příklady, jež slouží k ilustraci a nijak neomezují.

Příklady provedení vynálezu

10

6. Příklad: Regulační sekvence H19 napomáhají expresi heterologního genu v nádorových buněčných liniích

15 Tato část popisuje konstrukci různých expresních vektorů obsahujících CAT reportérový gen umístěný pod kontrolou H19 regulačních sekvencí, a jejich přenos do několika různých linií rakovinných buněk močového měchýře.

6.1 Materiály a metody

6.1.1 Buněčné linie a transfekce

20 Linie rakovinných buněk močového měchýře HT-1376, EJ28, T24P, 1197 a UM-UC-3 byly získány z americké sbírky buněčných linií ATCC a byly udržovány podle doporučení ATCC.

25 Transientní transfekce byly prováděny postupem používajícím kalcium fosfátový precipitát. Precipitáty (obsahující 7 µg plasmidu) byly přidávány v 1 ml média k $0,3 \times 10^6$ buněk v 30 mm miskách. Po 16 hodinách bylo transfekční médium odstraněno a vyměněno za čerstvé médium. Buňky byly sklizeny 24-96 hodin po transfekci a CAT aktivita byla stanovena postupem používajícím extrakci butyryl-CoA do organické fáze (Sambrook et al., 1989). Alikvot horní organické fáze

(100 μ l) byl přenesen do scintilační lahvičky obsahující 3 ml scintilační kapaliny a byla změřena radioaktivita vzorku.

6.1.2 Konstrukce expresních vektorů

5 Plasmidy pCAT-basic (obsahující CAT reportérový gen, jemuž předchází mnohočetné klonovací místo), pCAT-promoter (obsahující CAT reportérový gen pod kontrolou SV40 promotoru), pCAT-enhancer (obsahující SV40 enhancer pod CAT reportérovým genem a mnohočetné klonovací místo pro inserci promotoru nad CAT
10 reportérovým genem) a pCAT-control (obsahující CAT reportérový gen pod kontrolou promotoru i enhanceru z SV40) jsou komerční produkty firmy Promega (Madison, WI).

Pro konstrukci plasmidu pH19E, obsahujícího CAT reportérový gen pod kontrolou H19 promotoru, byla nejprve promotorová oblast
15 H19 (SEQ ID NO:1) klonována do plasmidu pBluescript II SK⁺ (Promega). Polynukleotid obsahující H19 promotorovou sekvenci byl amplifikován z DNA lidské placenty s použitím následujícího páru primerů,

ESPCR21: CGGTTCCCCACTTCCCCAGTTT (SEQ ID NO:6) a
20 ESPCR22: CGGAAGTCGACAACCCTCACCAAAGGCCAAGGT (SEQ ID NO:7).

Konce PCR produktu byly zatupeny pomocí Klenowova enzymu a klonovány do EcoRV místa plasmidu pBluescriptII SK⁺. Správnost DNA insertu byla potvrzena přítomností štěpících míst pro restriční
25 enzymy PvuII, EcoRI a ApaI. Promotor byl orientován opačně vůči kódující oblasti lacZ vektoru. Promotorová oblast pak byla vyštěpena enzymy HindIII a PstI a výsledný 0,9 kb fragment byl klonován mezi HindIII-PstI místa plasmidu pCAT-basic, za vzniku pH19E.

Expresní plasmidy, které obsahují H19 enhancerovou oblast
30 v obou orientacích pod segmentem H19 promotor/CAT reportérový

gen, byly konstruovány následujícím způsobem: 5 kb SacI fragment obsahující H19 "spodní" enhancer (vymezený oblastí +6kb až +11kb vzhledem k začátku transkripce genu H19) byl klonován do SacI místa plasmidu pUC19. Tento enhancer pak byl vyštěpen jako fragment
5 EcoRI-HindIII a ligován mezi EcoRI-HindIII místa plasmidu pBluescript II SK⁺ za vzniku pBhH19En-Sa. Plasmid pBhH19En-Sa byl parciálně štěpen enzymem BamHI a 5 kb fragment obsahující H19 enhancer (a interní BamHI místo) byl klonován do BamHI místa plasmidu pH19E pod segment H19 promotor/CAT reportérový gen. Takto byly získány
10 plasmidy obsahující H19 enhancer v obou orientacích, přímé (pH19EH19D, direct) a opačné (pH19EH19R, reversní).

6.2 Výsledky a diskuse

15 Pět různých linií rakovinných buněk močového měchýře, HT-1376, EJ28, T24P, 1197 a UM-UC-3 bylo transfekováno plasmidem pCAT-basic (v Obr. 2 označeným P-E), plasmidem pCAT-control (v Obr. 2 označeným pSV40ESV40), plasmidem pH19E, plasmidem pH19EH19D a plasmidem pH19EH19R. Výsledky exprese pro každý
20 konstrukt jsou uvedeny v Obr. 3A-3E. V každé buněčné linii byla pozorována nejvyšší hladina CAT aktivity s plasmidem pCAT-control, který obsahuje jak SV40 enhancer, tak SV40 promotor. Tento konstrukt sloužil jako pozitivní kontrola, neboť regulační sekvence SV40 představují osvědčené prvky pro indukci genové exprese.
25 Avšak SV40 regulační sekvence nejsou ve své schopnosti indukovat genovou expresi specifické pro nádorové buňky. Buněčné linie transfekované plasmidem pH19E, který obsahuje CAT reportérový gen pod kontrolou H19 promotoru, rovněž vykazovaly expresi CAT významně zvýšenou nad pozadí. Hladina CAT aktivity indukované
30 H19 promotorem se pohybovala od pětinasobku v HT-1376 buněčné linii do desetinásobku v buněčné linii UM-UC-3. Přítomnost H19

enhanceru v konstruktech obsahujících H19 promotor/CAT reportérový gen dále zvýšila hladinu exprese v některých buněčných liniích. Například v liniích EJ28, T24P a 1197 enhancer H19 významně zvyšuje expresi konstruktu H19 promotor/CAT reportérový gen.
 5 Orientace enhanceru však dala v různých buněčných liniích odlišné výsledky. V buněčných liniích HT-1736 a UM-UC-3 pak enhancer měl na expresi malý nebo žádný účinek.

Výsledky ukázaly, že lidský H19 promotor aktivuje expresi funkčně spojeného heterologního reportérového genu v širokém
 10 spektru buněčných linií odvozených z karcinomu močového měchýře. V některých z těchto linií může expresi reportérového genu pod kontrolou H19 promotoru ještě dále zvýšit H19 enhancer.

7. Příklad: Gen toxinu pod kontrolou H19 regulačních sekvencí

15

7.1 Materiály a metody

Expresní konstrukty popsané shora v části 6 se modifikovaly tak, aby místo CAT exprimovaly toxický produkt nebo prekursor toxického produktu. Použitím standardních klonovacích postupů, jež
 20 jsou dobře známy v oboru, se například odstranily sekvence kódující produkt genu CAT a nahradily se sekvencí kódující thymidinkinasu viru herpes simplex (HSV-TK).

Expresní plasmidy H19/HSV-TK se transfekují do buněčných linií odvozených z karcinomu močového měchýře jak bylo popsáno
 25 v části 6. Po transfekci do linií rakovinných buněk močového měchýře, expresní plasmid H19/HSV-TK indukuje v přítomnosti gancicloviru cytotoxicitu specifickou pro rakovinné buňky močového měchýře.

8. Příklad: Expresce H19 v myším modelu chemicky indukovaného karcinomu močového měchýře

30

8.1 Materiály a metody

Sedmdesát samic myši kmene C3H/He (Charles River), 5
týdnů starých, bylo umístěno po 6 v klecích a ponecháno, aby se
5 adaptovaly na klimatizovanou místnost s 12 hodinovým cyklem
světlo/tma. Pokus byl zahájen v 8 týdnech věku, kdy byly myši
náhodně rozděleny do kontrolní (10 myši) a experimentální (60 myši)
skupiny. Experimentální skupina dostávala k pití *ad libitum* vodu
obsahující 0,05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamin (BBM) (Tokyo
10 Kasei Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japonsko). Myši kontrolní skupiny
dostávaly vodovodní vodu. Zvířata z obou skupin byla po 4, 8, 12, 16,
20 a 26 týdnech od začátku experimentu usmrcena a jejich močové
měchýře byly standardním postupem vyříznuty, fixovány a zality do
parafinu.

15 8.1.1 Příprava sondy

2,1 kb fragment obsahující kódující oblast myšního H19 byl
subklonován do plasmidu pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, CA)
za vazebná místa pro T7 a T3 RNA polymerasu. Po štěpení plasmidu
enzymem HindIII, byla z linearizované plasmidové DNA *in vitro*
20 připravena s použitím T7 RNA polymerasy (Boehringer Mannheim) a
Amersham RPN 2006 soupravy [³⁵S]-značená antisense H19 RNA.
Takto připravený transkript měl specifickou aktivitu 10⁷ cpm/μg. Jako
kontrolní sonda byla z EcoRI-linearizovaného templátu a s použitím T3
RNA polymerasy (Boehringer Mannheim) připravena sense H19 RNA.

25 8.1.2 In situ hybridizace

Parafinové řezy (5μm) tkání fixovaných formalinem byly
přichyceny na mikroskopická podložní skla potažená
3-aminopropyltriethoxylanem (Tespä, Sigma) a vysušeny přes noc při
37°C. Řezy byly zbaveny parafinu xylem, fixovány 4%
30 paraformaldehydem a poté enzymaticky opracovány proteinasou K

(Sigma). Skla byla acetylována, aby se snížila nespecifická vazba sondy, a nakonec dehydratována promytím vzestupnou ethanolovou řadou.

[³⁵S]-značené RNA sondy (o aktivitě 50 000 cpm/μl) byly hybridizovány jak popisuje Rangini et al., 1991, Mech. Dev. 35:13-24, s vynecháním thio-AMP kroku. Skla byla přiložena k filmu na 10 dnů a poté vybarvena hematoxylinem a eosinem. Skla byla prohlížena a fotografována pod mikroskopem Polyvar (Reichert Jung) ve světlém a tmavém poli. Kontroly zahrnovaly hybridizaci se sense RNA sondou a předhybridizační působení RNAsou. Vedle toho sloužily jako negativní kontroly řezy močových měchýřů z dospělých zdravých myší (které neexprimují H19) a jako pozitivní kontroly řezy z myších embryonálních močových měchýřů (které exprimují H19).

8.2 Výsledky a diskuse

Do 26 týdnů se u všech přežívajících myší experimentální skupiny vytvořily pohmatem zjistitelné nádory močového měchýře. V těchto chemicky indukovaných nádorech močového měchýře byla pozorována vysoká exprese H19. Naproti tomu žádná exprese H19 nebyla detegována v normálních dospělých močových měchýřích. Uvedený myší model chemicky indukované rakoviny močového měchýře tedy může být použit jako zvířecí model k průkazu nádorově specifické *in vivo* cytotoxicity genových konstruktů obsahujících regulační oblasti H19 funkčně spojené s genem toxinu.

9. Příklad: Genová terapie využívající H19 regulačních sekvencí k expresi heterologního genu v myším modelu karcinomu močového měchýře

Plasmidy exprimující H19/toxin nebo H19/prekursor toxinu se pro *in vivo* vnesení do myšího močového měchýře zabudují do

liposomů jak popisují Takashita et al., 1993, J. Clin. Invest. 93:652-651 (zahrnuto zde odkazem). Myši pro tento experiment mají chemicky indukované nádory močového měchýře jak popsáno shora v části 8.

5 Ve stručnosti, 50 μ g plasmidové DNA rozpuštěné v 500 μ l Optimenova bezsérového média (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) se přidalo k 250 μ l Lipofectaminu a 250 μ l vody. Směs se inkubovala 30 min při pokojové teplotě a pak se zředila v 10 ml vyváženého roztoku solí (BSS(-): 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6). Roztok se centrifugoval (30 min, 15 000 ot/min) a peleta obsahující liposomy resuspendovala v 1 ml BSS(-) obsahujícím 1 mM CaCl_2 . Myším s chemicky indukovanými nádory močového měchýře se pomocí katetru podalo přibližně 0,2 ml koncentrovaných liposomů. Kontrolní skupina myší s nádory močového měchýře obdržela liposomy bez DNA nebo s konstruktem, který pod kontrolou H19 regulačních sekvencí nesl irelevantní gen. V definovaných časových bodech byly myši z každé skupiny obětovány a močové měchýře vyříznuty, fixovány a zality do parafinu standardními postupy. Střídající se řezy byly zpracovány pro *in situ* hybridizaci, při které byla použita buď H19 sonda, popsaná shora, nebo sonda specifická pro kódující sekvenci genu toxinu z *Pseudomonas*. Kontrolní a experimentální skupiny byly kromě toho porovnány z hlediska velikosti, počtu a nekrosy nádorů. V nádorech močového měchýře myší z experimentální skupiny byla prokázána kolokalizace exprese toxinu *Pseudomonas* a H19. Kromě toho byly nádory močového měchýře myší experimentální skupiny menší a nekrotické ve srovnání s nádory myší kontrolní skupiny.

10. Příklad: Expresa v nádorových buněčných liniích řízená promotory P3 a P4 genu IGF-2

10.1 Materiály a metody

V tomto pokuse byly sestrojeny různé expresní konstrukty obsahující luciferasový reportérový gen umístěný pod kontrolou jednoho ze čtyř různých promotorů genu IGF-2 a ty byly vneseny do
5 několika různých linií rakovinných buněk močového měchýře. Sestrojeny byly následující konstrukty obsahující lidský IGF-2 promotor a gen luciferasy:

Plasmid	Nukleotidová sekvence IGF-2 genu	Promotor
Hup1	-980 až +54	Promotor 1
Hup2	-379 až +271	Promotor 2
Hup3	-1229 až +140	Promotor 3
Hup4	-546 až +102	Promotor 4

Sekvence IGF-2 promotoru jsou popsány v Sussenbach et al., 1992,
10 Growth Reg. 2:1-9, a jsou zde zahrnuty odkazem. Vektor s luciferasovým reportérovým genem je komerčně dostupný od firmy Promega, Madison, WI (katalogové č. E1641).

10.2 Výsledky a diskuse

15 Expresní plasmidy byly transfekovány do lidských linií rakovinných buněk močového měchýře HT-1376, EJ28, T24P, 1197 a UM-UC-3 jak bylo popsáno shora v části 6. Luciferasová aktivita byla stanovena s použitím komerčně dostupného kitu (Promega, Madison, WI, katalog.č. E1500). Výsledky uvedené v Obr. 4A-4E ukazují, že P4
20 promotor IGF-2 aktivuje expresi luciferasového reportérového genu v každé testované linii rakovinných buněk močového měchýře. V buněčné linii 1197 aktivoval expresi luciferasového reportérového

genu též P3 promotor IGF-2. V následujících experimentech bylo zjištěno, že P3 a P4 IGF-2 promotory aktivují expresi luciferasového genu v dalších nádorových buněčných liniích, včetně buněk choriokarcinomu a rhabdomyosarkomu.

5

11. Příklad: H19 promotor a IGF-2 promotor s H19 enhancerem napomáhají expresi heterologního genu

11.1 Materiály a metody

10 Čtyři luciferasové vektory, pGL3-Basic, pGL3-Promoter, pGL-Enhancer a pGL3-Control, byly získány od firmy Promega. Tyto vektory byly transfekovány do buněk s použitím řady různých transfekčních reagensů zahrnujících lipofetamin (Gibco/BRL), fugene (Boehringer), Perfect Transfection Kit s 8 různými lipidickými činidly
15 (Invitrogen), TFX-10, TFX-20 transfast (Promega) a kalcium fosfátový postup (Gorman et al., 1982, Mol. Cell. Biol. 2:1044-1051).

H19 promotor klonovaný do EcoRV místa plasmidu pBluescript II SK (pbh19p#1) je popsán v části 6.1, *supra*. H19 promotor byl vyštěpen restrikčními enzymy SmaI a HindIII a výsledný 0,9 kb
20 fragment byl vnesen do SmaI-HindIII míst vektoru pGL3-Basic za vzniku konstruktů Luc-pbh19.

H19 promotorová oblast pokrývající nukleotidy -818 až +14 byla amplifikována z plasmidu pbh19p#1 pomocí PCR s použitím primerů 5'-ATATGGTACCGACAACCCTCACCAAAG-3' (horní, SEQ ID
25 NO:8) a 5'-ATATAAGCTTCTTCTCCCTCACCCCTGCTC-3' (spodní, SEQ ID NO:9). Výsledný PCR produkt byl štěpen enzymy KpnI a HindIII a ligován do KpnI-HindIII míst vektoru pGL3-Basic za vzniku konstruktů Luc-PBH19. Tento H19 promotor získaný pomocí PCR byl sekvenován z obou řetězců na automatickém sekvenátoru (ABT Prism
30 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer). Nukleotidová sekvence H19

promotoru (SEQ ID NO:2), který byl generován pomocí PCR, je ukázána na Obr. 5.

5 kb spodní H19 enhancer, popsáný v části 6 shora, byl štěpen enzymem BamHI za vzniku dvou fragmentů o velikosti 4,1 kb a 0,9 kb na 3' konci. Insercí 0,9 kb BamHI fragmentu H19 enhanceru do BamHI místa plasmidu Luc-PBH19 vznikl konstrukt Luc-PBH19-0.9EH19 a insercí 4,1 kb BamHI fragmentu H19 enhanceru do BamHI místa plasmidu Luc-PBH19 vznikl konstrukt Luc-PBH19-4EH19. Enhancerové sekvence byly tímto klonováním umístěny pod sekvencí H19 promotor/luciferasový gen směrem k 3' konci.

BamHI enhancerový fragment o velikosti 0,9 kb byl ligován do BamHI místa vektoru pGL-Basic za vzniku vektoru Luc-0.9EH19. Z plasmidu pbh19p#1 byl enzymy KpnI a BamHI vyštěpen H19 promotor a poté ligován do KpnI-BglII míst konstrukt Luc-0.9EH19, čímž vznikl expresní konstrukt Luc-pbh19-0.9EH19, který obsahoval promotor popsáný v části 6 shora a 0,9 kb enhancer umístěný pod H19/Luc reportérovým genem.

Expresní vektory označené Hup-1, Hup-2, Hup-3 a Hup-4, které obsahují luciferasový gen pod kontrolou lidského IGF-2 promotoru P1, resp. P2, resp. P3, resp. P4, byly konstruovány jak je popsáno v Sussenbach et al., 1992, Growth Reg. 2:1-9. Z konstrukt Hup-4 byla pomocí primerů 5'-ACAGGTACCTCTAGAGTCGACCT-3' (horní, SEQ ID NO:10) a 5'-ATATAAGCTTGCTCCCATCCTGCA-3' (spodní, SEQ ID NO:11) amplifikována 512 bp oblast promotoru P4. Výsledný PCR produkt byl štěpen enzymy KpnI a HindIII a ligován do do KpnI-HindIII míst vektoru pGL3-Basic nesoucím reportérový gen, za vzniku vektoru Luc-P4.

Rovněž byly připraveny expresní vektory obsahující IGF-2 P4 promotor a H19 enhancer. Enhancerový 2 kb BamHI fragment odvozený z 4,1 kb fragmentu popsaného výše, byl klonován do BamHI místa konstrukt Luc-P4, čímž vznikl expresní vektor Luc-P4-2EH19.

Sekvence H19 enhancerových 0,9 kb, 2 kb a 4,1 kb fragmentů byly určeny automatickým DNA sekvenováním. Nukleotidová sekvence 0,9 kb enhanceru je ukázána na Obr. 6 (SEQ ID NO:3). Nukleotidová sekvence 2 kb enhanceru je ukázána na Obr. 7A a 7B (SEQ ID NO:4).
5 Nukleotidová sekvence 4,1 kb enhanceru je ukázána na Obr. 8A-8C (SEQ ID NO:5).

11.2 Výsledky a diskuse

K zavedení čtyř vektorů obsahujících luciferasový gen do buněčných linií bylo použito několika transfekčních protokolů, přičemž
10 u většiny buněčných linií poskytl nejvyšší účinnost transfekce postup využívající kalcium fosfátový preicipitát. Proto byl tento postup použit při následných transfekcích různých expresních vektorů. Navíc, zvyšování koncentrace plasmidové DNA nesnižovalo transfekční účinnost ani v koncentracích přesahujících plató.

15 Buněčná linie 5637 karcinomu močového měchýře, buněčná linie Huh7 hepatocelulárního karcinomu (HCC) a buněčná linie 293T ledvinného nádoru byla každá transfekována různými konstrukty obsahujícími luciferasový reportérový gen pod kontrolou promotoru H19 nebo IGF-2 P4 v kombinaci s H19 enhancerem.

20 Buňky transfekované plasmidy Luc-ph19 a Luc-PH19, které obsahují reportérový gen a H19 promotor, vykazovaly zvýšenou genovou expresi nad pozadí (Obr. 9A-9C). Konstrukt Luc-PH19 obsahující promotor získaný PCR amplifikací měl ve všech testovaných buněčných liniích vyšší aktivitu než konstrukt Luc-ph19.
25 Přidání 0,9 kb H19 enhancerového fragmentu do Luc-ph19 vektoru (Luc-ph19-0.9EH19) zvýšilo dále dvakrát, resp. čtyřikrát hladinu exprese v buněčných liniích 5637 a 293T.

IGF-2 P4 promotor rovněž zvýšil ve všech buněčných liniích expresi luciferasy nad pozadí. Přidání 2 kb H19 enhancerového
30 fragmentu do Luc-P4 expresního vektoru vedlo k zvýšení

P4 promotorové aktivity. Hladina indukce luciferasové aktivity 2 kb enhancerovým fragmentem se pohybovala v rozmezí dvojnásobku pro buněčnou linii 293T až šestinásobku pro buněčnou linii Huh7, zatímco v buněčné linii 5637 bylo zvýšení promotorové aktivity účinkem enhanceru pouze marginální.

Obrázek 10A-10E ukazuje expresi z konstruktu Luc-ph19-4EH19, který obsahuje jak H19 promotor získaný pomocí PCR amplifikace, tak 4,1 kb H19 enhancerový fragment. Enhancer výrazně zvyšuje aktivitu promotoru, a to v rozmezí 3-28 krát podle buněčné linie, s výjimkou buněčné linie 5637.

12. ULOŽENÍ KLONU

Následující plasmid byl deponován u American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, v souladu s podmínkami Budapešťské smlouvy o mezinárodním uznávání uložených mikroorganismů pro účely patentového řízení:

<u>Klon</u>	<u>ATCC přírůstk. číslo</u>	<u>Datum uložení</u>
pH19EH19	209322	2. října 1997

EKVIVALENTY

Předchozí písemná specifikace postačuje, aby osoba zběhlá v oboru mohla provádět vynález. Různé modifikace shora popsanych způsobů provádění vynálezu, které jsou zřejmé osobám zběhlým v oboru molekulární biologie, medicíny a příbuzných oborů, spadají do rozsahu následujících nároků.

Všechny publikace zde citované jsou zahrnuty v úplnosti odkazem.

<110> Yissim Research Development Company of The Hebrew University
of Jerusalem

<130> 9457-0014-228

<141> 1998-10-04

<151> 1998-10-01

<151> 1997-10-03

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> I

<211> 830

<212> DNA

<213> Homo sapien.

<400> 1						
ctgcaggggcc	ccaacaaccc	tcacccaaagg	ccaaggttgt	gacccagcgga	cccacagcgg	60
gggtggctggg	ggagtcgaaa	ctcgccagtc	tccactccac	tcccaaccgt	gggtgcccac	120
gcggggcctgg	gagagtcctgt	gaggccgcgc	acggcttgtc	agttagagtcg	gcccgcgagc	180
cgtaagcaca	gccccggcaac	atgcggctctt	cagacaggaa	agtggcgcgcg	aatgggaccg	240
gggtgcccag	cggtctgtggg	gaactctgtcc	tgcggaacac	gcgtgtgacga	gcacaagctc	300
gggtcaactgg	atggggaatcg	gcccggggggg	ctggcaccgc	gcccaccagg	gggttttgccg	360
caacttccctc	tgcctctcag	cacccacccc	ctactctcca	ggaacgtgag	gtctgagccg	420
tgatgggtggc	agggaaggggc	ctctctgtccc	atccgagtc	ccaggggacc	gcagctggcc	480
cccagccatg	tgcaaaagtat	ctcgaggggcg	ctggcaggca	gggagcagca	ggcatgggtgt	540
ccccctgagg	gagacagtgg	tctgggagggg	agaggtcctg	gacccctgagg	gaggtgatgg	600
ggcaatgcctc	agccctgtct	ccggatgccca	aaggagggggt	gcccgggaggc	cytcttttggga	660
gaattccagg	atgggtgtctg	gggtgagagag	acgtgtgtctg	gaactgtcca	ggcgagggt	720
ggggccctgcg	ggggccctcg	ggaggggccct	gctctgattg	gcccggcaggg	caggggcggg	780
aatctctggcg	ggccaccccca	gttagaaaaa	gcccgggcta	ggaccgagga		830

<210> 2

<211> 833

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 2						60
gacaacccctc	accaaggggc	aaggtgggtga	ccgacggacc	cacagcgggg	tggctggggg	120
agtcgaaaac	cgccagcttc	cactccactc	ccaacggtgg	tgcgccacgc	gggcctggga	180
gagtcctgtg	ggccgcccac	cgcttgtcag	tagagtgggc	cgcgagccg	taagcacagc	240
ccggcaacat	ggggtcttca	gacaggaaa	tggccgga	tgggacggg	gtgccacg	

19.05.00

gctgtgggga	ctctgtccctg	cggaaaaccgc	ggtgacgagc	acaagctcgg	tcaactggat	300
gggaatcggc	ctgggggggct	ggcacccggc	ccaccagggg	gtttgoggca	cttccctctg	360
ccccccagca	ccccacccct	actctccagg	aacgtgagtc	ctgagccgtg	atgggtggcag	420
gaagggggccc	tctgtgccat	ccgagtcccc	agggaaccgc	agctggcccc	cagccatgtg	480
caaagtatgt	gcagggcgct	ggcagggcagg	gagcagcagg	catggtgtcc	cctgagggga	540
gacagtgggc	tgggagggag	aagtccctggc	cctgagggag	gtgatggggc	aatgctcagg	600
cctgtctccg	gatgcccagg	gaggggtggc	gggaggccgt	ctttggagaa	ttccaggatg	660
ggtgtctggg	gagagagacg	tgtgtctggaa	ctgtccaggg	cggaggtggg	ccctgccccg	720
gcccccgga	ggggccctgct	ctgattggcc	ggcagggcag	gggccccgaat	tctggggcgg	780
gccaccccag	ttagaaaaag	ccccggctag	gaccgaggag	caggggtgagg	gag	833

<210> 3
<211> 877
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 3						60
caaggacatg	gaatttcgga	ccttctgtcc	ccaccctctc	tgtgagcct	aggaacctct	120
gagcagcagg	aaggccttgg	gtctagagcc	tagaaatgga	ccccacgtc	cacctgccc	180
gcctagaccc	ccagcattga	aggggtggta	gacttctgt	gagaggaagc	cactaagcgg	240
gatggacacc	atcgcccact	ccacccggcc	ctgcccagcc	ctgcccagtc	cagcccagtc	300
cagcccagcc	ctgccccttc	cagcccctgc	cagcccagct	catccctgcc	ctacccagcc	360
cagcccctgtc	ctgcccctgcc	cagcccagcc	cagcccagcc	ctgcccctgcc	ctgcccctgcc	420
cttcccagcc	ctgacccctc	cagcccctgc	cagcccagct	catccctgcc	ctacccagct	480
cagcccctgcc	ctgcccctgcc	ctgcccctgcc	cagcccctacc	cagcccagcc	ctgcccctgcc	540
ctgcccagct	cagcccctgcc	caccccagcc	cagcccagcc	cagcatgggt	tctctggatg	600
gtgagcacag	gcttgacctt	agaaagaggc	tggcaacgag	ggctgaggcc	accagggccac	660
tgggtgtctca	cgggtcagac	aagcccagag	cctgtctccc	tggccacgggt	cggggctgtc	720
accgcccagca	tgtgtgtggat	gtgcatggcc	tcagggctgc	tggctccagg	ctgccccgc	780
cctggctccc	gaggccaccc	ctcttatggc	atgaacctg	tggccacccc	acctctgagc	840
tgtcccagct	cctgcccgtc	gcacccctg	agcagccccc	tgtgtgtttc	atgggagtct	877
tagcaaggaa	ggggagctcg	aattccctgca	gccccgg			

<210> 4
<211> 1960
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 4						60
ccgggtaccg	agctcccagg	aagataaatg	atttccctcc	ctctagagat	gggggtggga	120
tctgagcact	cagagccaag	ggcgagtggt	gtccggggcg	gggcccctcc	cggcccctcc	180
aacatggggg	ccaggaggtc	agccccctca	cctggacccc	ggctgggtct	cagggaatgg	240
tctccccag	tggcccagct	tgttgtgtgt	ttcagatggg	tgtgcatggg	tgtgtgtgtg	300
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	gacaagcccc	agagagccaa	360
agacctgagt	ggagatcttg	tgaactctca	aaagggggat	tggaaaggtt	gagaaagagc	420
tgtgtgtcagc	cttgtctctc	cttaaggctg	tggtaaccac	actaggcata	gcataggcct	480
gcgcccctgc	cctccctccc	tcctccggcg	ctctcccttc	tcttctctcc	ccctctaccc	540
cgtccctctg	cctgctccct	gtgacacccg	tggccccctt	ccagggtctga	gggaagccag	600
cggggggccc	ttcctgaaag	cccacctgca	ggccggcttg	ctgggaaggg	gctgtctctg	660
cagaggctcc	cgcccgcctt	gcagccgttt	cctggaagca	gtcgctgtgg	gtattctgtt	720
ccttgtcagc	actgtgcttg	caaagaaagc	agacactgtg	ctccttgtcc	ttaggagagc	780
ccgctccatc	acccaacacc	tggctggaca	caggcgggag	gcccgggtcc	cggggagcgg	840
cgccgggctg	gggcccggac	attaaacaca	cacgggcgcc	aggcactgca	ggctccctcc	900
cctctctctg	cccagcgcc	ctgctcacag	gcacgtgcca	agcccttagg	ccaggaggcc	960
agcagtgggt	gcagaacaag	ctcctgggaa	gggggtgca	ggcggacccc	cggggagaa	1020
ggctggcagg	gctgtggggg	acgctgaccg	tgggccccac	gctgcagaaa	actggntgcc	

19.05.00

tggctggaag	atgggggaga	tgccaagcct	ctgaggcagc	acgagcaggg	tgcatggagg	1080
ccggggcgcg	gggaggctgc	actgcagcat	gcaccccaaa	gcccanaagg	agtggagacc	1140
aggccctgga	atcgagaagt	agaaaaggcg	cttggaggcc	tgggaaccgg	ctgacctcca	1200
acagagtggg	tctccagcct	ggctctgccc	tgcccgaggt	ccccccccct	cattaccagg	1260
cctagagcct	ccagtccccg	tgccccccag	cccagagggt	aacggcctca	ccctgggtcg	1320
tgggacagag	ggcacgttca	tcaagagtgg	ctcccaagg	acacgtggct	gtttgcagtt	1380
cacagggaag	attcgagata	aggagcctgt	tttcccagtg	ggcacggagc	cagcaggggg	1440
gctgtggggc	agcccagggt	gcaaggccag	gctgtggggc	tgagctgccc	ttggggcccca	1500
ctcccaggcc	tctcggggag	gtgggaggcg	ggaggcgcca	gttgacacgt	ggccccaggc	1560
gaggctctca	gccccagtcg	ctctccgggt	gggcagccca	agagggctct	gctgagccctc	1620
ccacatcttg	gactccatca	cccaacaact	taattaaggc	tgaatttcac	gtgtccctgtg	1680
acttgggtag	acaaaagccc	tgtccaaagg	ggcagccagc	ctaaggcagt	ggggacggcg	1740
tgggtggcg	gcgacggggg	agatggacaa	caggaccgag	gggtgtgggg	cgatggggga	1800
gatggacaac	aggaccgagg	gtgtgcgggc	gatgggggag	atggacaaca	ggaccgagg	1860
tgtgcgggac	acgcatgtca	ctcatgcacg	ccaatggggg	ggtggggagg	ctggggagca	1920
gacagactgg	gctgggctgg	gcggsaagga	cgggcagatg			1960

<210> 5
 <211> 4085
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

ccgggtaccg	agctcccagg	aagataaatg	atttccctct	ctctagagat	gggggtggga	60
tctgagcact	cagagccaag	ggcgagctgg	gtccggggcg	gggcccctct	cggccctccc	120
aacatggggg	ccaggaggct	agccctccaa	ccctggaccc	ggctgggtct	cagggaatgg	180
tctccccag	tgccccagct	tgcttctgtt	tccagatggg	tgtgcatggg	tgtgtgtgtg	240
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	gacaagcccc	agagagccaa	300
agacctgagt	ggagatcttg	tgacttctca	aaagggggat	tggaaagtcc	gagaaagagc	360
tgtgggcagc	cttgcctctc	cttaaggctg	tggttaaccac	actaggcata	gcataggcct	420
gcgccccgta	cctccctccc	tcctccggcg	ctctcccttc	tcttctctcc	ccctctaccc	480
cgctccctgg	cctgctcctg	gtgacaccgt	tgccccctct	ccagggtctga	gggaagccag	540
cggggggccc	ttcctgaaaag	cccacctgca	ggccggcttg	ctgggaagg	gctgctctcg	600
cagaggctcc	cgccccccct	gcagccgttt	cctgggaagca	gtcgctgtgg	gtattctgtt	660
ccttgtcagc	actgtgcttg	caaagaaaag	agacactgtg	ctccttctcc	ttagggagcc	720
ccgctccatc	accacaacac	tggtctggaca	caggcgggag	gcccgggtccg	cggggagcgg	780
cgcgggggctg	gggccggacc	attaaacaca	cacggggcgcc	aggcactgca	ggctcctcct	840
ccctccctcg	cccagcgccct	ctgctcacag	gcacgtgcca	agcccttagg	ccaggaggcc	900
agcagtgggt	gcagaacaag	ctcctgggaa	gggggtgag	ggcgagcccc	cggggagaaag	960
ggctggcagg	gctgtggggg	acgctgaccc	tgggccccac	gttgacagaaa	actggntggc	1020
tggctggaag	atgggggaga	tgccaagcct	ctgaggcagc	acgagcaggg	tgcatggagg	1080
ccggggcgcg	gggaggctgc	actgcagcat	gcaccccaaa	gcccanaagg	agtggagacc	1140
aggccctgga	atcgagaagt	agaaaaggcg	cttggaggcc	tgggaaccgg	ctgacctcca	1200
acagagtggg	gcccggccctg	gaggcaaaag	ggtgccccgg	gtccggccct	gcctggggga	1260
gctatgtgtc	atgggcaagc	cacaggatat	gtagccccgt	ctgagcctat	ggaccaggg	1320
cagggtctga	aggcaggggc	ggggagacag	cacgggggag	caaggagcag	agagggggcc	1380
tcaggctctc	ccaggaggaa	cattctcccg	acaggaggaa	gagacggccc	aggggtgact	1440
gtggggagcc	atggtggcag	ctgggtctgt	ggcagatggg	agagaggctg	gcgaggtgaa	1500
ggtgcagggg	tcagggtctc	ggggcccaca	tgcttctggg	agcaggcagg	cccagggtctc	1560
tccggcactc	cccactcccc	cttggctcat	aggtctgggc	caagggtggg	gtgggatgag	1620
caggagatgg	ggcccagggg	gcaagcaggg	ccccaaagac	atttagaaaa	accggtttat	1680
gcaggagcga	ttcagagcag	gcggcggtgc	tgggcggggg	cctgggagca	cagagaggca	1740
cacgtagggc	ccccgagggg	ctccccattg	gcccggcagt	acatcaccct	tgtgtcaaca	1800
gtgatgtctg	cagctccggc	cagccagggt	ttatggagcg	agaccagcc	cggcctgggc	1860
cctcactccc	caggcccaaca	cactagccca	ctgttcaggg	tccgggggtg	cggcatggcc	1920
tgggggtcct	ggcaccgctg	ctccctctgc	caccctaact	tcccggcatc	gcccgtgccc	1980

19.05.00

```

cctctgagcg tccccaacca gtaagtgtgg ggcccagcag gcctgcccgc ctccctctct 2040
tccccctctag agagaaaacgt ggaggtccctg gggctggggg cgctcatagc cctgtgacac 2100
aggtgcatgg ggtcaggggt cccagaatgg cccctgggaa ggacctcagc tgggcccggcg 2160
gctctagggt tcaggggtct gtctgcacag gggntagccc ctcccagacc tctgtgaagc 2220
cagtacgggc ctccccctccc tgcccctggt tctgtccggg gcttccctgga ctgcactgcg 2280
ggccactggt gagagggtgg acagggaagg gccgcccgtgg tgccctgtcc tgcccacctg 2340
gctgtgtggg cccctccaag tagggacaac ccttctgagg gcttgggggg accctggsgt 2400
tgccaggggc tcccagagcc ctgtgagccc ctgggggggtc tggcctgatg cccccctcca 2460
cgcccagggg cggctgtggc ccagaacccc agcttcccag caggccgggtg tgggtggtg 2520
acctcaggaga ggccctcgcc cactgagggg gccaccgacc tctgtcagac cacagagacc 2580
cccaaggagt ctgaaggctg gagaccgggg gctgggacca ggtgggactt tcccacggag 2640
ccgtccccag gccagctgg ggacacgtcc ccttctctc cagacacacc ctgctgcca 2700
ccaggacaca ccggccctgtt ggggtctctt ttaagtgtc tgccactctg aggtgactgt 2760
ccctttccaa agagggtttct ggggcccagg tgggatgctg cggcctgagc agggagatct 2820
gggcccagcagg gggctgggga ctgtctcctg gggaaaggaa cgctggggag cgtgtgtgct 2880
gacctcaggac catccaggga ggcccgtctg tggggcaagc gggaaaggag cggctggaga 2940
ggcttggccg cccccgccc cctccatt ccttagctcc atgctgtca acctctgtca 3000
cccagtgagt gatgtccagg gccctggaa aggtcacagc atgtttgagc ggggtgagag 3060
agaggggaaa ggcggggggc gggaaaagta cgtggaggaa gctttaggcc caaggaaagga 3120
gacagggttc tgggaggggag ggagccactg gggccgcccg gaaggctccct gcttgctgct 3180
gccaccaga accctcgcc cttagctagc ccccgagcc ccagcccttc tggcntgtgg 3240
ccctctcccc catccccagg tgtcctgtgc aaccaggcc tggacccaaa cctcctgccc 3300
ccctcctctc cctcctcacc ctcccaatgc agtggctccc agcctggctc tgccctgccc 3360
caggctcccc cccctcatta ccaggccctag agcctccagt cccgggtggc cccagcccga 3420
gggtgaacgg cctcaccctg ggtcgtggga cagagggcac gttcatcaag agtggctccc 3480
aaggggacac tggctgtttg cagttcacag gaagcattcg agataaggag cttgttttcc 3540
cagtgggcac ggagccagca ggggggctgt ggggcagccc aggggtgcaag gccaggctgt 3600
ggggctgcag ctgcccgggg ccccactccc aggccttttg gggagggtgg aggcgggagg 3660
cggcagctgc acagtggccc caggcgaggc tctcagcccc agtcgctctc cgggtgggca 3720
gcccagagg gctcggctga gcctcccac tctgggactc catcacccaa caacttaatt 3780
aaggctgaat ttcacgtgtc ctgtgacttg ggtagacaaa gccctgtcc aaaggggagc 3840
ccagcctaag gcagtgggga cggcgtgggt gggggcgac gggggagatg gacaacagga 3900
ccgaggggtg gggggcgatg ggggagatgg acaacaggac cgagggtgtg cgggcgatgg 3960
gggagatgga caacaggacc gaggggtgtg gggacacgca tgtcactcat gcacgccaat 4020
ggggggcggt ggaggctggg gagcagacag actgggctgg gctggggggg aaggacgggc 4080
agatg

```

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 6
 cggttccccca cttccccagt tt 22

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 7
 cggaggtcga caaccctcac caaaggccaa ggt 33

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA

19.08.00

<213> Homo sapien
<400> 8
atatgggtacc gacaacctc accaaag 27
<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Homo sapien
<400> 9
atataagctt cttctccctc accctgctc 29
<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapien
<400> 10
acaggtacct cttaggtcga cct 23
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapien
<400> 11
atataagctt gctcccatcc tgca 24

19.08.00

ŽV 2000-1201

44764

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob exprese heterologní sekvence v nádorové buňce,
v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e do nádorové buňky se
5 zavede polynukleotid obsahující regulační sekvenci funkčně
spojenou s heterologní sekvencí, jež kóduje cytotoxický genový
produkt, přičemž regulační sekvence je odvozena z genomově
imprintovaného genu, který je specificky exprimován v nádorové
buňce.
10
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e regulační sekvence je H19 regulační sekvence.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
15 t í m , ž e regulační sekvence je IGF-2 P4 promotor.
4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e regulační sekvence je IGF-2 P3 promotor.
- 20 5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e nádorová buňka je buňka nádoru močového
měchýře.
- 25 6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e buňka nádoru močového měchýře je vybrána ze
skupiny sestávající z Ht-1376, EJ28, T24P, 1197 a UM-UC-3.

7. Způsob podle nároku 2, vyznačující se tím, že H19 regulační sekvence jsou H19 promotor, H19 enhancer, nebo H19 promotor i H19 enhancer.
- 5 8. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že heterologní sekvence je vybrána ze skupiny sestávající z kódujících sekvencí pro β -galaktosidasu, difterický toxin, toxin *Pseudomonas*, ricin, cholery toxin, gen retinoblastomu, p53, thymidinkinasu viru herpes simplex,
- 10 thymidinkinasu viru varicella zoster, cytosindeaminasu, nitroreduktasu, cytochrom p-450 2B1, thymidinfosforylasu, purinnukleosidfosforylasu, alkalickou fosfatasu, karboxypeptidasu A a G2, linamarasu, β -laktamasu a xanthinoxidasu.
- 15 9. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že heterologní sekvence je antisense sekvence, jež specificky hybridizuje k sekvenci kódující gen vybraný ze skupiny zahrnující cdk2, cdk8, cdk21, cdc25A, cyklinD1, cyclinE,
- 20 cyclinA, cdk4, onkogenní formy p53, c-fos, c-jun, Kr-ras a Her2/neu.
10. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že heterologní sekvence kóduje ribozym, který specificky štěpí RNA kódovanou genem vybraným ze skupiny zahrnující cdk2, cdk8, cdk21, cdc25A, cyklinD1, cyclinE, cyclinA,
- 25 cdk4, onkogenní formy p53, c-fos, c-jun, Kr-ras a Her2/neu.
11. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že nádorová buňka je v pacientovi.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e
pacient má nádor vybraný ze skupiny zahrnující karcinom
močového měchýře, hepatocelulární karcinom, hepatoblastom,
5 rabsdomyosarkom, karcinom vaječníku, cervikální karcinom,
karcinom plic, karcinom prsu, karcinom dlaždicových buněk na
hlavě a krku, karcinom jícnu, karcinom štítné žlázy, astrocytom,
ganglioblastom a neuroblastom.
- 10 13. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e H19 promotor zahrnuje nukleotidy 1 až 830 sekvence
SEQ ID NO:1.
- 15 14. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e H19 promotor zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:2.
- 15 15. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e H19 enhancer zahrnuje sekvenci H19 enhanceru
klonovaného v plasmidu pH19EH19 (deposit č. 209322 v ATCC).
- 20 16. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:3.
- 25 17. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:4
18. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e
t í m , ž e H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:5.

19. Způsob podle nároku 7, vyznačující se tím, že umístění H19 enhanceru je 3' vzhledem k heterologní sekvenci.
- 5
20. Vektor pro expresi sekvence v nádorové buňce, kde vektor obsahuje polynukleotid, který obsahuje regulační sekvenci funkčně spojenou s heterologní sekvencí kódující cytotoxický genový produkt, přičemž regulační sekvence je z genomově imprintovaného genu, jenž je specificky exprimován
- 10
21. Vektor podle nároku 20, kde regulační sekvence je H19 regulační sekvence.
- 15
22. Vektor podle nároku 20 kde regulační sekvence je IGF-2 P4 promotor.
23. Vektor podle nároku 20, kde regulační sekvence je IGF-2 P3 promotor.
- 20
24. Vektor podle nároku 21, kde H19 regulační sekvence zahrnují H19 promotor a H19 enhancer a heterologní sekvence kóduje protein vybraný ze skupiny zahrnující β -galaktosidasu, difterický toxin, toxin *Pseudomonas*, ricin, cholerový toxin, gen retinoblastomu, p53, thymidinkinasu viru herpes simplex, thymidinkinasu viru varicella zoster, cytosindeaminasu, nitroreduktasu, cytochrom p-450 2B1, thymidinfosforylasu, purinnukleosidfosforylasu, alkalickou fosfatasu,
- 25

karboxypeptidasu A a G2, linamarasu, β -laktamasu a xanthinoxidasu.

25. Hostitelská buňka obsahující vektor podle nároku 20.

5

26. Způsob léčby pacienta s rakovinou, vyznačující se tím, že pacientovi je podáván polynukleotid kódující cytotoxický nebo cytostatický genový produkt funkčně spojený s regulační sekvencí odvozenou z genomově imprintovaného genu, který je specificky exprimován v rakovinných buňkách.

10

27. Způsob podle nároku 26, vyznačující se tím, že regulační sekvence je H19 regulační sekvence.

15 28. Způsob podle nároku 26, vyznačující se tím, že regulační sekvence je IGF-2 P4 promotor.

29. Způsob podle nároku 26, vyznačující se tím, že regulační sekvence je IGF-2 P3 promotor.

20

30. Způsob podle nároku 26, vyznačující se tím, že cytotoxický genový produkt je vybrán ze skupiny zahrnující difterický toxin, toxin Pseudomonas, ricin, cholerový toxin, gen retinoblastomu a p53.

25

31. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že H19 regulační sekvence jsou H19 promotor, H19 enhancer nebo H19 promotor spolu s H19 enhancerem.

32. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že H19 promotor zahrnuje nukleotidy 1 až 830 sekvence SEQ ID NO:1.
- 5
33. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že H19 promotor zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:2.
34. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že H19 enhancer zahrnuje sekvenci H19 enhanceru klonovaného v plasmidu pH19EH19 (deposit č. 209322 v ATCC).
- 10
35. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:3.
- 15
36. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:4.
37. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:5.
- 20
38. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že umístění H19 enhanceru je 3' vzhledem k heterologní sekvenci.
- 25
39. Způsob podle nároku 31, vyznačující se tím, že rakovina je vybrána ze skupiny zahrnující karcinom močového měchýře, hepatocelulární karcinom, hepatoblastom, rabdomyosarkom, karcinom vaječníku, cervikální karcinom,

karcinom plic, karcinom prsu, karcinom dlaždicových buněk na hlavě a krku, karcinom jícnu, karcinom štítné žlázy, astrocytom, ganglioblastom a neuroblastom.

- 5 40. Způsob exprese heterologní sekvence v nádorové buňce, vyznačující se tím, že do nádorové buňky se zavede polynukleotid obsahující IGF-1 promotor funkčně spojený s heterologní sekvencí, jež kóduje cytotoxický genový produkt.

10

41. Vektor pro expresi heterologní sekvence v nádorové buňce, kde vektor obsahuje polynukleotid, který obsahuje IGF-1 promotor funkčně spojený s heterologní sekvencí kódující cytotoxický genový produkt.

15

Zastupuje:

19.08.00

PV 2000-1201

44767

1/15

CTGCAGGGCCCCAACAACCCCTCACCAAAGGCCAAGGTGGTGACCGACGGACCCACAGCGG
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
GACGTCCCGGGGTTGTTGGGAGTGGTTTCCGGTTCACCACTGGCTGCCTGGGTGTGCGC
-837

GGTGGCTGGGGGAGTCGAAACTCGCCAGTCTCCACTCCACTCCCAACCGTGGTGCCCCAC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCACCGACCCCTCAGCTTTGAGCGGTGAGAGGTGAGGTGAGGGTTGGCACCACGGGGTG

GCGGGCCTGGGAGAGTCTGTGAGGCGCCACCGCTTGTCAGTAGAGTGCGCCGCGAGC
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
CGCCCGGACCCTCTCAGACACTCCGGCGGGTGGCGAACAGTCATCTACGCGGGCGCTCG

CGTAAGCACAGCCCGGCAACATGCGGTCTTCAGACAGGAAAGTGGCCGCGAATGGGACCG
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
GCATTGCTGTGCGGCGGTTGTACGCCAGAAGTCTGTCTTTACCGGCGCTTACCCTGGC

Obr. 1A

19.08.00

2/15

241 GGGTGGCCAGCGGCTGTGGGGACTCTGTCTGCGGAAACCGCGGTGACGAGCACAAGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCACAGGGTCGCGGACACCCCTGAGACAGGACGCTTTGGCGCCACTGCTCGTGTTCGAG

301 GGTCAACTGGATGGGAATCGGCCTGGGGGGCTGGCACCAGCGCCACCAGGGGGTTTGGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CCAGTTGACCTACCCTTAGCCGGACCCCCGACCGTGGCGCGGGTGGTCCCCAAACGCC

361 CACTTCCCTCTGCCCCCTCAGCACCCACCCCTACTCTCCAGGAACGTGAGGTCTGAGCCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GTGAAGGGAGACGGGGAGTCGTGGGGTGGGGATGAGAGGTCTTGCACTCCAGACTCGGC

421 TGATGGTGGCAGGAAGGGGCCCTCTGTGCCATCCGAGTCCCCAGGGACCCGCAGCTGGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
ACTACCACCGTCCTTCCCCGGGAGACACGGTAGGCTCAGGGGTCCCTGGGCGTCGACCGG

481 CCCAGCCATGTGCAAAGTATGTGCAGGGCGCTGGCAGGCAGGGAGCAGCAGGCATGGTGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GGGTGCGTACACGTTTCATACACGTCCCGGACCGTCCGTCCCTCGTCGTCCGTACCACA

541 CCCCTGAGGGGAGACAGTGGTCTGGGAGGGAGAGGTCTGGACCCTGAGGGAGGTGATGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GGGGACTCCCTCTGTCAACAGACCCCTCCCTCTCCAGGACCTGGGACTCCCTCCACTACC

Obr. 1B

19.08.00

3/15

601 GGCAATGCTCAGCCCTGTCTCCGGATGCCAAAGGAGGGGTGCGGGGAGGCCGTCTTTGGA
-----+-----+-----+-----+-----+ 650
CCGTTACGAGTCGGGACAGAGGCCCTACGGTTCTCTCCACGCCCTCCGGCAGAAACCT

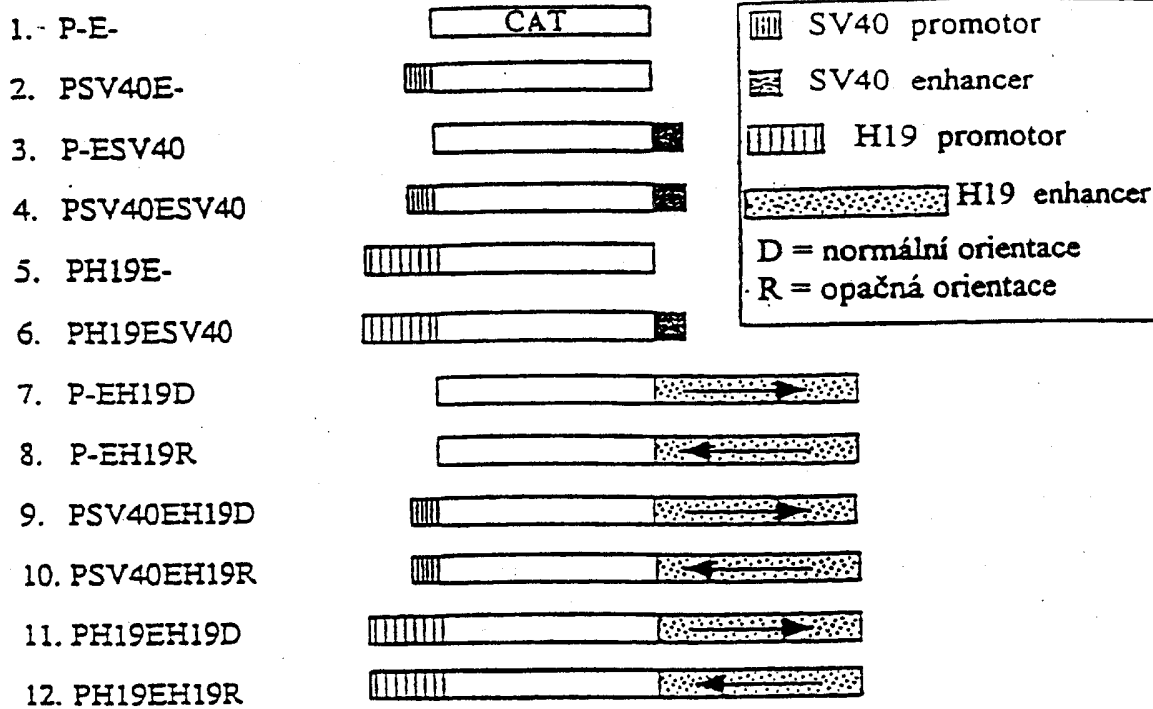
661 GAATTCAGGATGGGTGCTGGGTGAGAGAGACGTGTGCTGGAACGTCTCAGGGCGGAGGT
-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CTTAAGGTCCTACCCACGACCCACTCTCTCTGCACACGACGTTGACAGGTCCCGCCTCCA

721 GGGCCCTGCGGGGGCCCTCGGGAGGGCCCTGCTCTGATTGGCCGGCAGGGCAGGGCGGG
-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CCCGGGACGCCCCCGGGAGCCCTCCCGGGACGAGACTAACCGGCCGTCCCGTCCCCGCCC

781 AATTCTGGCGGGCCACCCAGTTAGAAAAAGCCCGGGCTAGGACCGAGGA
-----+-----+-----+-----+ 830
TTAAGACCGCCCGGTGGGGTCAATCTTTTCGGGCCCCGATCCTGGCTCCT
 | | |
 -35 -27 -7

Obr. 1C

4/15

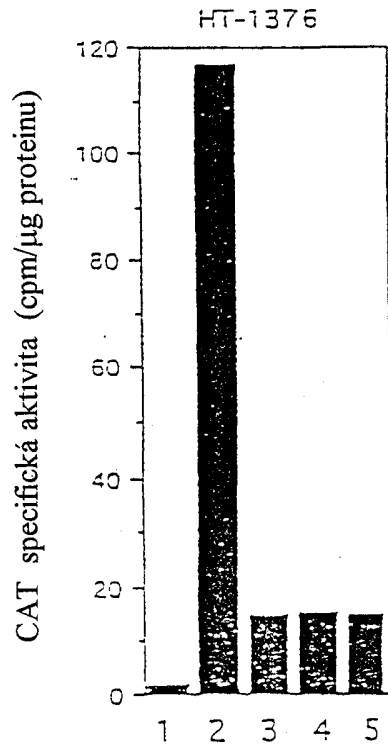


Schematické znázornění plasmidů obsahujících různé promotory a enhancery

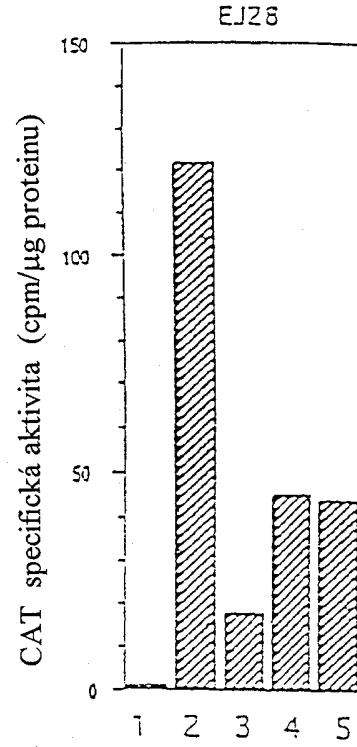
Obr. 2

5/15

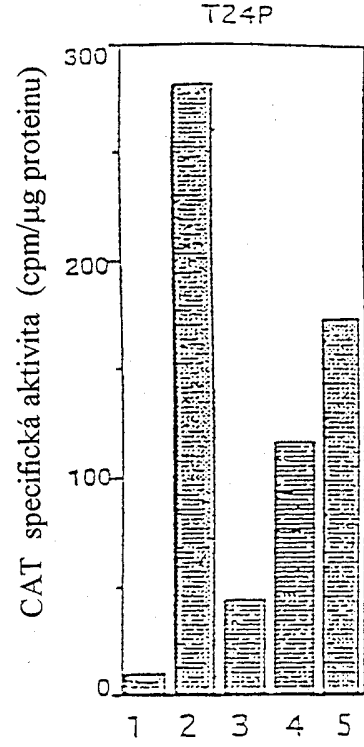
Obr. 3A



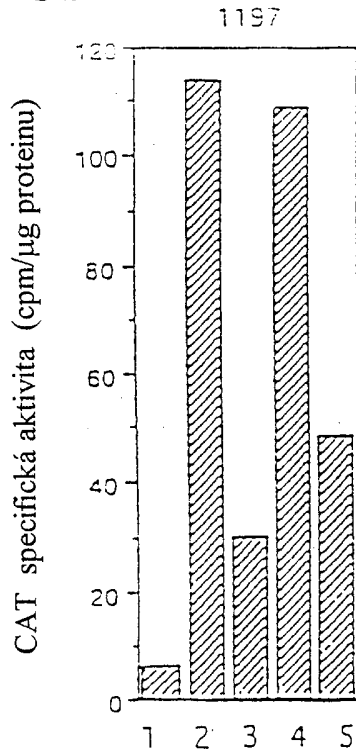
Obr. 3B



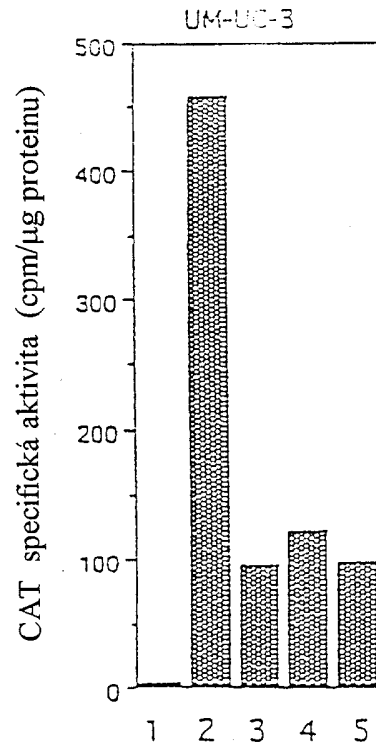
Obr. 3C



Obr. 3D



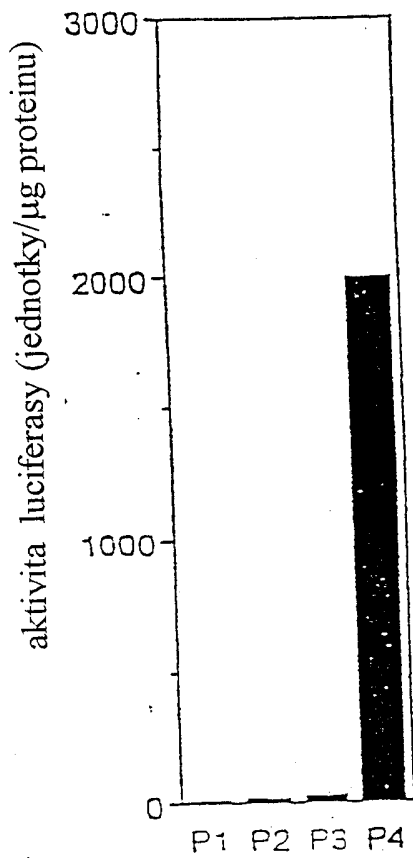
Obr. 3E



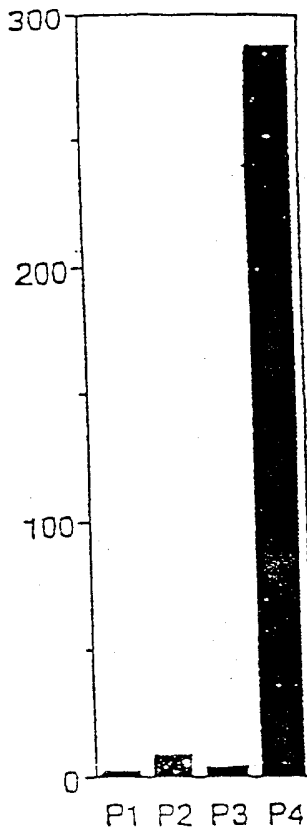
19.08.00

6/15

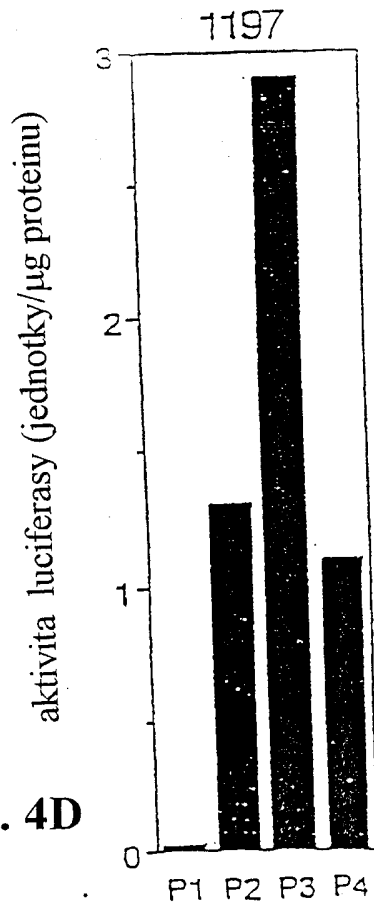
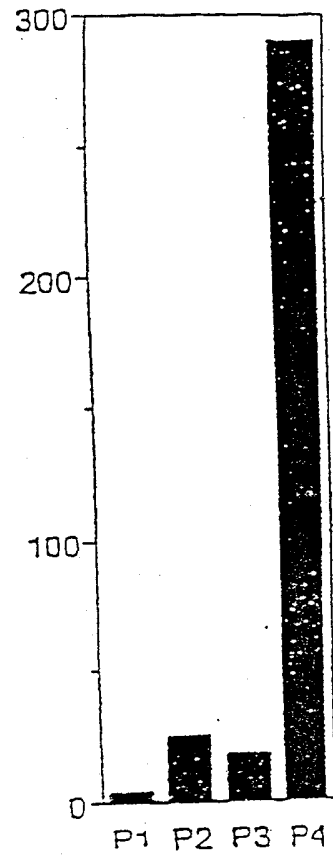
Obr. 4A T24P



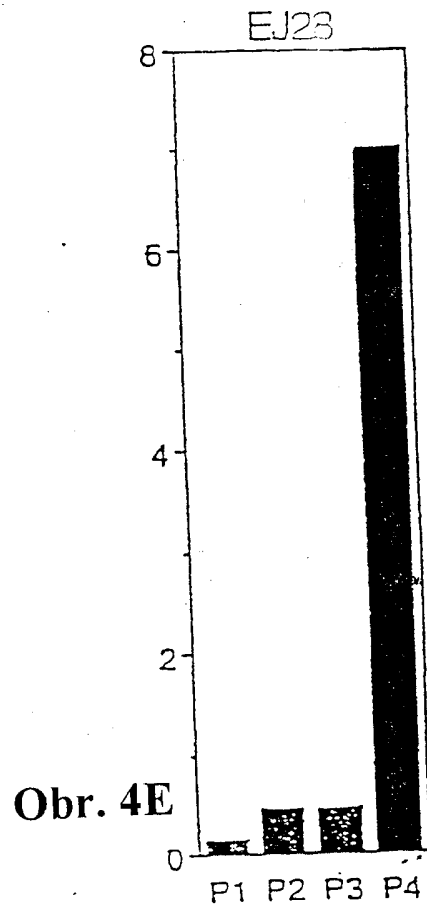
Obr. 4B 1376



Obr. 4C UM-UC 3



Obr. 4D



Obr. 4E

19.08.00

7 / 15

1 GACAACCCTC ACCAAGGGCC AAGGTGGTGA CCGACGGACC CACAGCGGGG
51 TGGCTGGGGG AGTCGAAACT CGCCAGTCTC CACTCCACTC CCAACCGTGG
101 TGCCCCACGC GGGCCTGGGA GAGTCTGTGA GGCCGCCAC CGCTTGTCAG
151 TAGAGTGCGC CCGCGAGCCG TAAGCACAGC CCGGCAACAT GCGGTCTTCA
201 GACAGGAAAG TGGCCGCGAA TGGGACCGGG GTGCCAGCG GCTGTGGGGA
251 CTCTGTCTG CGGAAACCGC GGTGACGAGC ACAAGCTCGG TCAACTGGAT
301 GGGAAATCGC CTGGGGGGCT GGCACCGCGC CCACCAGGGG GTTTGCGGCA
351 CTTCCCTCTG CCCCTCAGCA CCCCACCCCT ACTCTCCAGG AACGTGAGTT
401 CTGAGCCGTG ATGGTGGCAG GAAGGGGCCC TCTGTGCCAT CCGAGTCCCC
451 AGGGACCCGC AGCTGGCCCC CAGCCATGTG CAAAGTATGT GCAGGGCGCT
501 GGCAGGCAGG GAGCAGCAGG CATGGTGTCC CCTGAGGGGA GACAGTGGTC
551 TGGGAGGGAG AAGTCCTGGC CCTGAGGGAG GTGATGGGGC AATGCTCAGC
601 CCTGTCTCCG GATGCCAAAG GAGGGGTGCG GGGAGGCCGT CTTTGGAGAA
651 TTCCAGGATG GGTGCTGGGT GAGAGAGACG TGTGCTGGAA CTGTCCAGGG
701 CGGAGGTGGG CCCTGCGGGG GCCCTCGGGA GGGCCCTGCT CTGATTGGCC
751 GGCAGGGCAG GGGCGGGAAT TCTGGGCGGG GCCACCCAG TTAGAAAAAG
801 CCCGGGCTAG GACCGAGGAG CAGGGTGAGG GAG

Obr. 5

19.05.00

8/15

1 CAAGGACATG GAATTTGGA CTTCTGTCC CCACCCTCTC TGCTGAGCCT
51 AGGAACCTCT GAGCAGCAGG AAGGCCTTGG GTCTAGAGCC TAGAAATGGA
101 CCCCCACGTC CACCTGCCCC GCCTAGACCC CCAGCATTGA AGGCTGGTCA
151 GACTTCCTGT GAGAGGAAGC CACTAAGCGG GATGGACACC ATCGCCCACT
201 CCACCCGGCC CTGCCCAGCC CTGCCCAGTC CAGCCCAGTC CAGCCCAGCC
251 CTGCCCTTCC CAGCCCTGCC CAGCCCAGCT CATCCCTGCC CTACCCAGCC
301 CAGCCCTGTC CTGCCCTGCC CAGCCCAGCC CAGCCCAGCC CTGCCCTGCC
351 CTGCCCTGCC CTTCCCAGCC CTGACCTTCC CAGCCCTGCC CAGCCCAGCT
401 CATCCCTGCC CTACCCAGCT CAGCCCTGCC CTGCCCTGCC CTGCCCTGCC
451 CAGCCCTACC CAGCCCAGCC CTGCCCTGCC CTGCCAGCT CAGCCCTGCC
501 CACCCCAGCC CAGCCCAGCC CAGCATGGT TCTCTGGATG GTGAGCACAG
551 GCTTGACCTT AGAAAGAGGC TGGCAACGAG GGCTGAGGCC ACCAGGCCAC
601 TGGGTGCTCA CGGGTCAGAC AAGCCCAGAG CCTGCTCCCC TGCCACGGGT
651 CGGGGCTGTC ACCGCCAGCA TGCTGTGGAT GTGCATGGCC TCAGGGCTGC
701 TGGCTCCAGG CTGCCCCCGC CCTGGCTCCC GAGGCCACCC CTCTTATGCC
751 ATGAACCCTG TGCCACACCC ACCTCTGAGC TGTCCCCGCT CCTGCCGCT
801 GCACCCCCTG AGCAGCCCCC TGTGTGTTTC ATGGGAGTCT TAGCAAGGAA
851 GGGGAGCTCG AATTCCTGCA GCCCGGG

Obr. 6

19.05.00

9/15

1 CCGGGTACCG AGCTCCAGG AAGATAAATG ATTCCTCCT CTCTAGAGAT
51 GGGGCTGGGA TCTGAGCACT CAGAGCCAAG GCGCAGTGG GTCCGGGCGG
101 GGGCCTCCT CGGCCCTCCC AACATGGGGG CCAGGAGGTC AGCCCCTCAA
151 CCTGGACCCC GGCTGGGTCT CAGGGAATGG TCTCCCCCAG TGGCCAGCT
201 TGCTTGTGTT TTCAGATGGG TGTGCATGGG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
251 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGATGCT GACAAGCCCC AGAGAGCCAA
301 AGACCTGAGT GGAGATCTTG TGACTTCTCA AAAGGGGGAT TGGGAAGGTC
351 GAGAAAGAGC TGTGGTCAGC CTGCTCTCC CTTAAGGCTG TGGTAACCAC
401 ACTAGGCATA GCATAGGCTT GGGCCCCGTC CCTCCTTCCC TCCTCGGCG
451 CTCTCCTTTC TCTTTCTCC CCCTCTACC CGCTCCCTGG CCTGCTCTG
501 GTGACACCGT TGCCCCCTT CCAGGGCTGA GGAAGGCCAG CGGGGGCCCC
551 TTCCTGAAAG CCAAGCTGCA GCGCGGCTTG CTGGGAAGGG GCTGCTCTG
601 CAGAGGCTCC CGCCCCCTT GCAGCGGTTT CCGGAAGCA GTCGCTGTG
651 GTATTCTGTT CCTTGTCAEC ACTGTGCTTG CAAAGAAAGC AGACACTGTG
701 CTCTTGTCC TTAGGGAGCC CGCTCCATC ACCCAACACC TGGCTGGACA
751 CAGGCGGGAG GCGGGGTCC GGGGAAGCG GCGGGGCTG GGGCGGACC
801 ATTAACACA CACGGGCGCC AGGCACTGCA GGCTCCTCCT CCTCCTCCTG
851 CCCAGCGCCT CTGCTCACAG GCACGTGCA AGCCCTAGG CCAAGAGGCC
901 AGCAGTGGGT GCAGAACAG CTCCTGGGA GGGGGTGCA GGGGACCCC
951 CCGGGAAG GGCTGGCAG GCTGTGGGG ACGCTGACCG TGGGCCCCAC

Obr. 7A

19.05.00

10 / 15

1001 GTTGCAgAAA ACTGGNTGCC TGgCTGGAAG ATGGGGGAGA TGCCAAGCCT
1051 CTGAGGCAGC ACGAgCAGGG TGCATGGAGG CCGGGGCGCG GGGAGGCTGC
1101 ACTGCAGCAT GCACCCCAA GCCCANAGGG AGTGGAgACC AGGCCCTGGA
1151 ATCgAGAAGT AgAAAGGCGG CTTGGAGGCC TCGGAACCGG CTGACCTCCA
1201 ACAGAgTGGG TCTCCAGCCT GgcTCTGCCC TGCCGCAGGT CCCCTCCCcT
1251 CATTACCAGG CCTAGAGCCT CCAGTCCCGG TGGCCCCCAG CCcGAGGGTG
1301 AACGGCCTCA CCCTGGGTcG TGGGACAGAG GGCACGTTCA TCAAGAGTGG
1351 CTCCCAAGGG ACAcGTGGCT GTTTGCAGTT CACAGGAAGC ATTcGAGATA
1401 AGGAGcTTGT TTTCCCACTG GGCACGGAGC CAGCAGGGGG GCTGTGGGGC
1451 AGCCCAGGGT GCAAGGcCAG GcTGTGGGGC TGCAGcTGCc TTGGGCCCCA
1501 CTCCCAGGCC TTTGCGGGAG GTGGGAGGCG gGAGGCGGCA GCTGCACAGT
1551 GGCCCCAGGC GAGGCTCTCA GCCCCAGTGG CTCTCCGGGT GGGCAGCCCA
1601 AGAGGGTCTG GCTGAGCCTC CCACATCTGG GACTCCATCA CCCAACAAC
1651 TAATTAAGGC TGAATTTAC GTGTCCTGTG ACTTGGGTAG ACAAAGCCCC
1701 TGTCCAAAGG GGCAGCCAGC CTAAGGCAGT GGGGACGGCG TGGGTGGCGG
1751 GCGACGGGGG AGA.TGGACAA CAGGACCGAG GGTGTGCGGG CGATGGGGGA
1801 GATGGACAAC AGGACCGAGG GTGTGCGGGC GATGGGGGAG ATGGACAACA
1851 GGACCGAGGG TGTGCGGGAC ACGCATGTCA CTCATGCACG CCAATGGGGG
1901 GCGTGGGAGG CTGGGGAGCA GACAGACTGG GCTGGGCTGG GCGGGAAGGA
1951 CGGGCAGATG

Obr. 7B

19.08.00

11/15

1 CCGGGTACCG AGCTCCCAGG AAGATAAATG ATTCCTCCT CTCTAGAGAT
51 GGGGGTGGGA TCTGAGCACT CAGAGCCAAG GCGCAGTGG GTCCGGGCGG
101 GGGCCCTCCT CGGCCCTCCC AACATGGGGG CCAGGAGGTC AGCCCCCTAA
151 CCTGGACCCC GGCTGGGTCT CAGGGAATGG TCTCCCCCAG TGGCCCAGCT
201 TGCTTGTGTT TTCAGATGGG TGTGCATGGG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
251 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGATGCCT GACAAGCCCC AGAGAGCCAA
301 AGACCTGAGT GGA_gATCTTG TGA_gCTTCTCA AAAGGGGGAT TGAAGGTTT
351 GAGAAAGAGC TGTGGTCAGC CTTGCTCTCC CTTAAGGCTG TGGTAACCAC
401 ACTAGGCATA GCATAGGCCT GCGCCCCGTC CCTCCTTCCC TCCTCCGCGC
451 CTCTCCTTTC TCTTTCTCCC CCCTCTACCC CGCTCCCTGG CCTGCTCCTG
501 GTGACACCGT TGGCCCCCTT CCAGGGCTGA GGAAGCCAG CGGGGGCCCC
551 TTCCTGAAAG CCCACCTGCA GGCCGGCTTG CTGGGAAGGG GCTGCTCTCG
601 CA_gAGGCTCC CGCCCGCCCT GCAGCCGTTT CCTG_gAAGCA GTCGCTGTGG
651 GTATTCTGTT CTTGTCAGC ACTGTGCTTG CAA_gAAAGC AgACACTGTG
701 CTCCTTGTC TTAGGGAGCC CCGCTCCATC ACCCAACACC TGGCTGGACA
751 CAGGCGGGAG GCCGGGTCCG CGGGGAgCGG CGCGGGGCTG GGGCCGGACC
801 ATTAAACACA CACGGGCGCC AGGCACTGCA GGCTCCTCCT CCTCCTCCTG
851 CCCAGCGCCT CTGCTCACAG GCACGTGCCA AgCCCCTAGG CCA_gAgGCC
901 AgCA_gTGGGT GCAG_gACAAG CTCCTGGGAA GGGGGTGCA_g GGcGGACCCC
951 CGGGGAgAAG GGCTGGCAGG GCTGTGGGGG ACGCTGACCG TGGGCCCCAC
1001 GTTGCA_gAAA ACTGGNTGCC TG_gCTGG_gAG ATGGGGGAGA TGCCAAGCCT
1051 CTGAGGCAGC ACGAgCAGGG TGCATGGAGG CCGGGGCGCG GGGAGGCTGC
1101 ACTGCAGCAT GCACCCCAAA GCCCANAGGG AGTGGAgACC AGGCCCTGGA
1151 ATC_gAGAAGT AgAAAGGCGG CTTGGAGGCC TCGGAACCGG CTGACCTCCA
1201 ACAGAgTGGG GCCGGCCCTG GAGGCAAAGA GGTGCCCGGG GTCCGGCCCT
1251 GCCTGGGGGA GCTATGTGTC ATGGGCAAGC CACAGGATAT GT_gAGCCCGCT
1301 CTG_gCCTAT GGACCCAgGG CAGGGCTGCA AGGCAGGGCA GGGGAGACAG
1351 CACGGGGGAG CAAGGAGCAG AGAGGGGGCC TCAGGCTCTC CCAGGAGGAA
1401 CATTCTCCCG ACAGGAGGAA GAGACGGCCC AGGGGTGACT GTGGGGAGCC
1451 ATGGTGGCAG CTGGGGTCGT GGCAGATGGG AGAGAGGCTG GCGAGGTGAA
1501 GGTGCAGGGG TCAGGGCTCT GGGGCCCA TGCCTGTGGG AGCAGGCAGG

Obr. 8A

19.08.00

12/15

1551 CCCAGGGCTC TCCGCCACTC CCCACTCCCG CTGGGCTCAT AGGCTGGGCC
 1601 CAAGGGTGGG GTGGGATGAG CAGGAGATGG GECCAGGGG GCAAGCAGGG
 1651 CCCCAAAGAC ATTTAGAAAA ACCGGTTTAT GCAGGCAGCA TTCAGAGCAG
 1701 GCGGCGTGCG TGGCGGGGGC CCTGGGAGCA CAGAGAGGCA CACGTAGGGC
 1751 CCCCAGGGG CTCCCCATTG GCCGGCAGTG ACATCACCCC TGTGTCAACA
 1801 GTGATGTCTG CAGCTCCGGC CAGCCAGGGT TTATGGAGCG AGACCCAGCC
 1851 CGGCCTGGGC CCTCACTCCC CAGGCCACA CACTAGCCA CTGTTCAGGG
 1901 TCCGGGTGG CGGCATGGCC TGGGGTCTT GGCACCGCTG CTCCTCTGCC
 1951 CACCCTAACT TCCCGCATG GCGGCTGCCC CCTCTGAGCG TCCCAACCA
 2001 GTAAGTGTGG GGCCAGCAG gCCTGcGTC CTCcTCcTCT TCCCCTcTAG
 2051 AGAGAAACGT GGAGGTCTG GGGCTGGGG CGCTCATAGC CcTGTGACAC
 2101 AGGTGCATGG GGTcAGGGT CCCAGAATGG CCCCTGGGAA GGACCTCAGC
 2151 TGGGCCGGCG GCTcTAGGCT TCAGGGGTCT GTCTGCACAG GGGNTAGCCC
 2201 CTCCCAGACC TCTGTGAAGC CAGTACGGC CTCCCCTCCC TGCCCCGTGC
 2251 TCTGTCCGGT GCTTCCTGSA CTGCACTGG GGCACCTGGT GAGAGGGTGG
 2301 ACAGGGAAGG GCGCGGTGG TGCTGTTC TGCCACCTG GCTGTGTGGT
 2351 CCCCTCCAAG TAGGGACAAC CCTTCTGAGG GCTTGGGGC ACCCTGGGGT
 2401 TGCCAGGGCC TCCAGAGCC CTGTGAGCCC CTGGGGGGTC TGGCCTGATG
 2451 CCCCCCTCCA CGTCCAGGGC CGGCTGTGGC CCAGAACCCC AGCTTCCCAG
 2501 CAGGCCGGTG TGCGGTGGTG ACCCAGGAGA GGCCTCGCCT CCACTGAGGG
 2551 GCCACCGACC TCTGTcAGAC CACAGAGACC CCCAAGGAgt cTGAAGGCTG
 2601 GAGACCCGGG GCTGGGACCA GGTGGGAcTT TCCCACGGAG CCGTCCCCAG
 2651 GCCCAGCTGG GGACAcGTCC CCcTTcTcTC CAGACACACC CTGcTGCCA
 2701 CCAGGACACA CCGGCCTGTT GGGGTcTcT TTTAAGTGCT TGCCACTCTG
 2751 AGGTGAcTGT CCCTTTCCAA AGAGGTTTcT GGGGCCCAGG TGGAAtGCGT
 2801 CGGCCTGAGC AGGAGGATcT GGGCCGCCAG GGGCTGGGA CTGTcTCCTG
 2851 GGGAAGGAAG CGCCTGGGAG CGTGTGTGCT GACCCAGGAC CATCCAGGGA
 2901 GGCCCGTcTG TGGGGCAAGC GGAAGGGAG CGGCTGGAGA GGCTTGGCCG
 2951 CCCCCGCCCT GCCTCCATT CTTAGcTCC ATGCCTGTCA ACCTcTGTCa

Obr. 8B

19.06.00

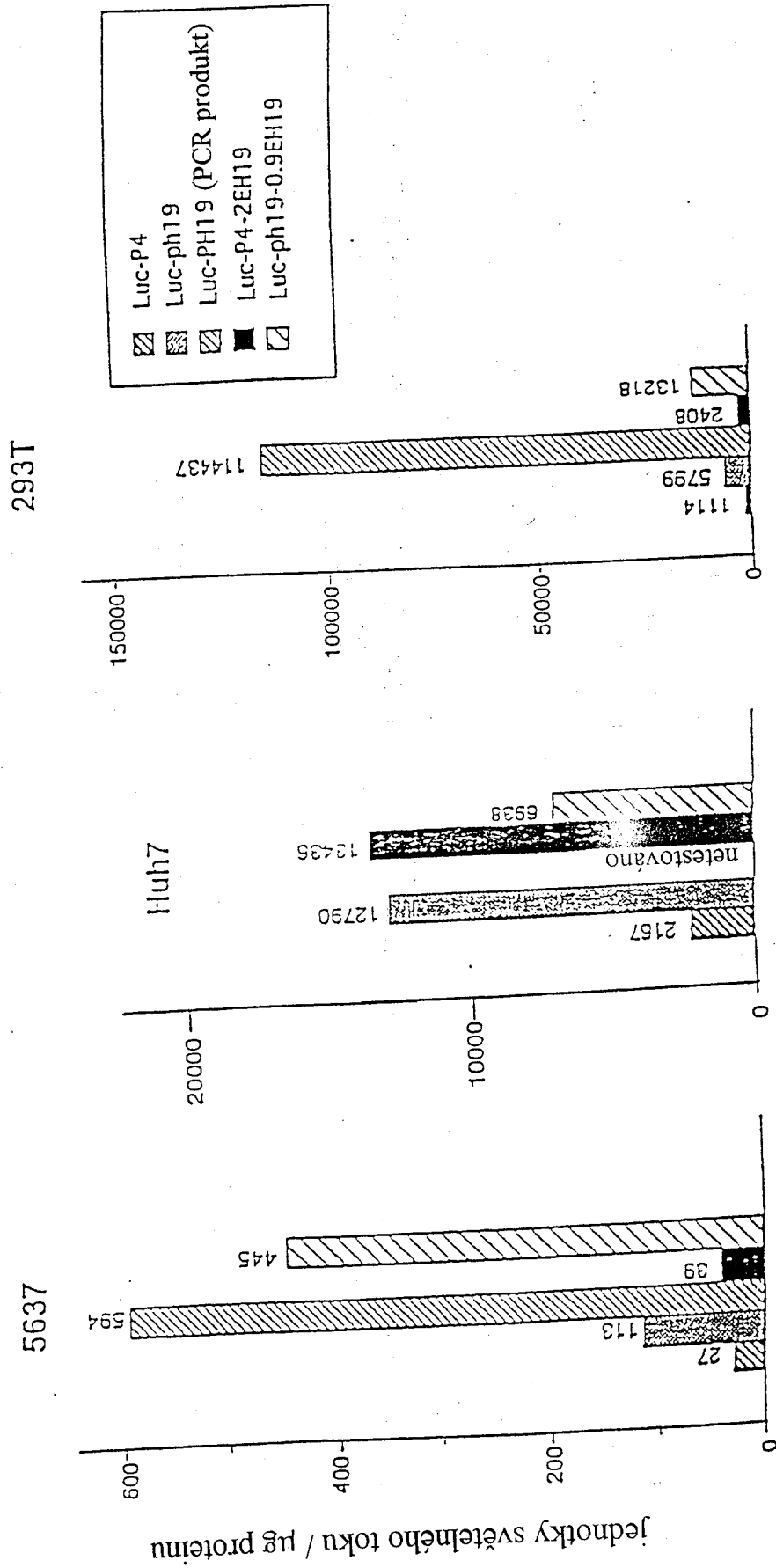
13/15

3001 CCCAGTGAGT GATGTCCAGG GGCCCTGGAA AGGTCACAGC ATGTTTGAGC
3051 GGGGTGAGAG AGAGGGGAAA GCGGGGGCG GGGAAAAGTA cGTGGAGGAA
3101 GCTTTAGGCC CAAGGAAGGA GACAGGGTtc TGGGAGGGAG GGAGCCACTG
3151 GGGCCGCCGG GAAGGTCCCT GCTTGCTGCT GCCACCCAGA ACCCTCGCCT
3201 cTTAGcTAGC CCCcGCAGCC CCAGCcTTTc TGGCNTGTGg CCCTCTCCCC
3251 CATCCCCAGG TGTCcTgTGC AACCAGGCcT TGGACCCAAA CCCTCcTGCC
3301 CCCTCcTCTC CCTCCTCACC CTCCCAATGC AGTGGTCTCC AGCCTGgTC
3351 TGCCCTGCCG CAGGTCCCCT CCCcTCATTA CCAGGCCTAG AGCCTCCAGT
3401 CCCGGTGGCC CCCAGCCcGA GGGTGAACGG CCTCACCCCTG GGTcGTGGGA
3451 CAGAGGGCAC GTTCATCAAG AGTGGCTCCC AAGGGACAcg TGGCTGTTTG
3501 CAGTTCACAG GAAGCATTcG AGATAAGGAG cTTGTTTTCC CAGTGGGCAc
3551 GGAGCCAGCA GGGGGGCTGT GGGGCAGCCC AGGGTGCAAG GcCAGGcTGT
3601 GGGGCTGCAG cTGCcTTGGG CCCCACTCCC AGGCCTTTGC GGGAGGTGGG
3651 AGGCGgGAGG CGGCAGCTGC ACAGTGGCCC CAGGcGAGGC TCTCAGCCCC
3701 AGTCGCTCTC CGGGTGGGCA GCCCAAGAGG GTCTGGCTGA GCCTCCCACA
3751 TCTGGGACTC CATCACCCAA CAACTTAATT AAGGCTGAAT TTCACGTGTC
3801 CTGTGACTTG GGTAGACAAA GCCCCTGTCC AAAGGGGCAG CCAGCCTAAG
3851 GCAGTGGGA CGGCGTGGGT GCGGGCGAC GGGGGAGATG GACAACAGGA
3901 CCGAGGGTGT GCGGGCGATG GGGGAGATGG ACAACAGGAC CGAGGGTGTG
3951 CGGGCGATGG GGGAGATGGA CAACAGGACC GAGGGTGTGC GGGACACGCA
4001 TGTCATCAT GCACGCCAAT GGGGGGCGTG GGAGGCTGGG GAGCAGACAG
4051 ACTGGGCTGG GCTGGGCGGG AAGGACGGGC AGATG

Obr. 8C

19.06.00

14/15



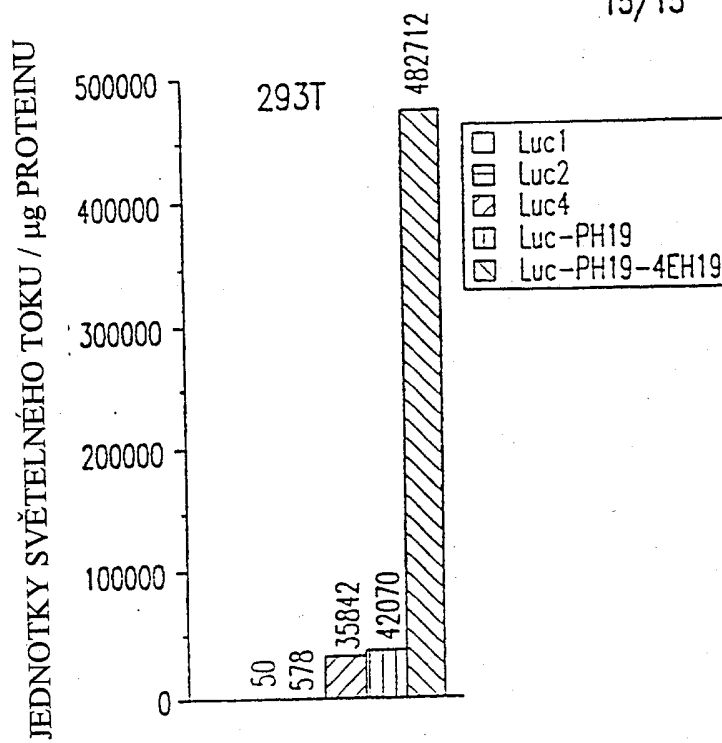
Obr. 9C

Obr. 9B

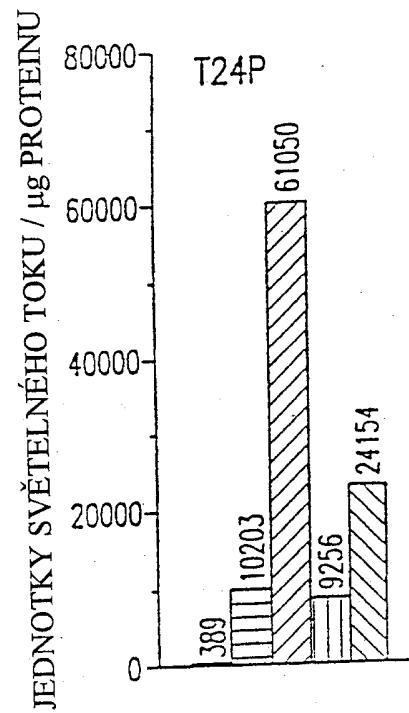
Obr. 9A

19.08.00

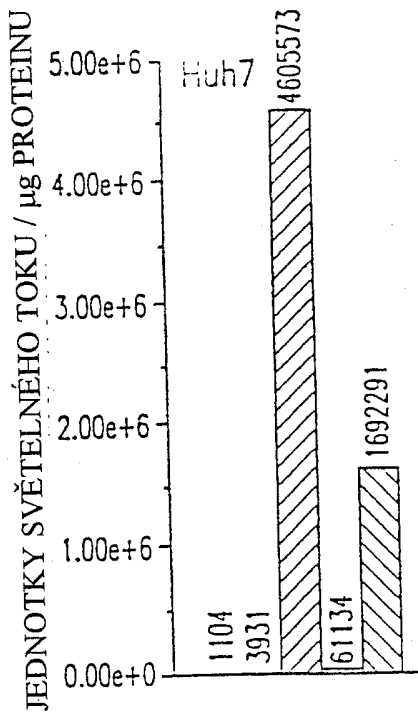
15/15



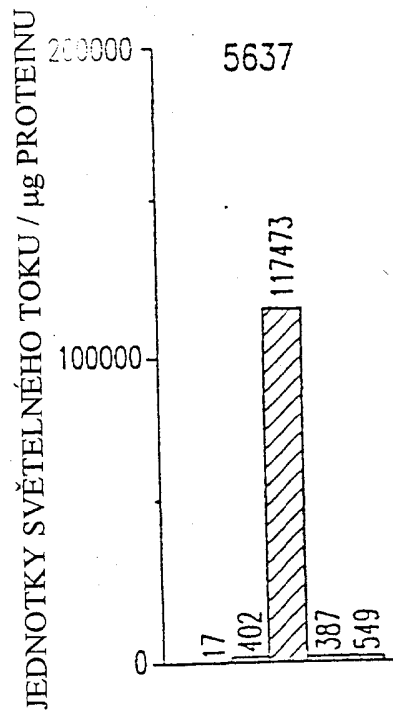
Obr. 10A



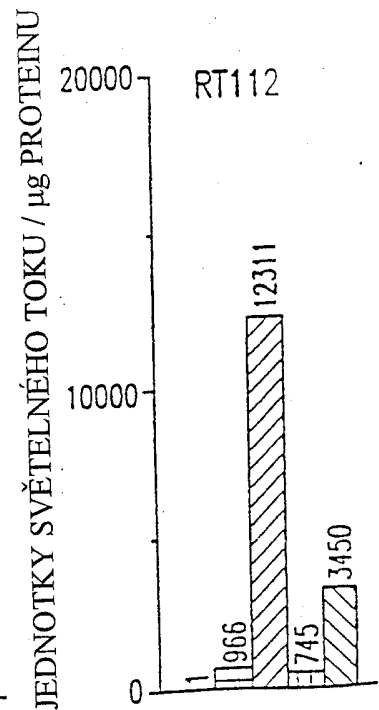
Obr. 10B



Obr. 10C



Obr. 10D



Obr. 10E