

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 694

(13) Druh dokumentu:

B6

(51) Int. Cl. : ⁷

C 12 N 15/11

C 07 K 14/65

A 61 K 48/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-1201**
(22) Přihlášeno: **04.10.1998**
(30) Právo přednosti: **03.10.1997 US 1997/943608**
(40) Zveřejněno: **13.09.2000**
(Věstník č. 09/2000)
(47) Uděleno: **29.12.04**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.02.2005**
(Věstník č. 2/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/IL1998/000486**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/018195**

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

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

(74) Zástupce:

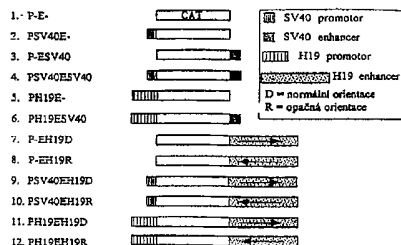
JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Polynukleotid, vektor, buňka a farmaceutický
prostředek**

(57) Anotace:

Řešení se týká specifické exprese heterologních sekvencí v nádorových buňkách; jedná se zejména o geny kódující cytotoxické produkty pod kontrolou regulačních sekvencí, kterými jsou promotory zahrnující regulační sekvence genu H19. Dále poskytuje expresní konstrukty, vektory a prostředky pro podávání takovýchto expresních konstruktů, přičemž prostředky jsou využitelné při léčbě rakoviny.



Schematické znázornění plasmidů obsahujících různé promotory a enhancery

CZ 294694 B6

Polynukleotid, vektor, buňka a farmaceutický prostředek

Oblast techniky

5

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

Dosavadní stav techniky

Gen H19

15

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 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.

20

H19 je vysoce exprimován během embryogeneze a poprvé byl identifikován jako gen, který je v játrech koordinovaně regulován 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 diferenciace tkání. Například Davis et al. (1987, *Cell* 51:987–1000) identifikovali myší homolog

25

H19 při vyhledávání genů aktivních v časných fázích diferenciace 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 diferencujícím se cytotrofoblastech z lidské placenty (Rachmilewitz et al., 1992, *Molec. Reprod. Dev.* 32:196–202).

30

Zatímco v průběhu fetálního života dochází k transkripci H19 RNA v řadě různých embryonálních tkání, po narození je exprese H19 zastavena. Avšak ve stavu v játrech dospělých myší (Brunkow a Tilgman, 1991, *Genes & Dev.* 5:1092–1101) byla zjištěna určitá relativně nízká hladina transkripce H19. Postnatálně je H19 aktivován 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 prenatálně. Dále tyto autoři zjistili H19 RNA v nádorech odvozených z neurálních tkání, zejména v astrocytomech a ganglioneuroblastomech, o nichž není známa asociace s expresí 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.

40

Lidský i myší H19 gen byl naklonován a sekvenován (Brannan et al., 1990, *Molec. Cell. Biol.* 10:28–36). Srovnání lidského a myšího 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 polymerázou II, dochází u ní k sestřihu a polyadenylaci, zdá se, že není překládána. Namísto toho bylo zjištěno, že H19 RNA asociuje s 28S cytoplazmatickou RNA, což vedlo k úvahám, že H19 RNA by mohla působit jako RNA složka ribonukleoproteinového komplexu (*Id.*).

50

Skutečná fyziologická role H19 není zcela jasná. H19 může 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). Knoc-

55

kout 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 sekven-

5 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 morfolo-

10

15

Geny růstového faktoru podobného inzulinu (Inzulin-like Growth Factor, IGF)

20

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 myší, 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 speci-

25

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 biale-

30

35

Nádorově specifická genová terapie

Regulační oblasti genů asociovaných s nádory se používají k cílené selektivní expresi sebevra-

40

45

50

Osaki et al. (1994, Cancer Res. 54:5258–5861) transfekovali plicní karcinomové buňky A54 expresním vektorem, který obsahoval regulační sekven-

55

podkožní injekcí transfekovaných buněk byl inhibován opakovanými intraperitoneálními injekcemi gancicloviru. Nedávno však bylo zjištěno, že gen karcinoembryonálního antigenu je exprimován v normální střevní 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.

Podstata vynálezu

Vynález se týká 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 transkripci je odvozena z genomově imprintovaného genu, který je specificky exprimován v rakovinných buňkách a kterých je gen H19, a heterologní gen kóduje cytotoxický protein nebo cytostatický genový produkt. Regulační sekvence budou řídit expresi v řadě různých rakovinných buněčných typů. Takovéto prostředky jsou použitelné při léčbě mnoha různých typů rakoviny a hyperproliferačních stavů.

Jedním aspektem vynálezu jsou expresní vektory obsahující polynukleotidy zahrnující takovéto regulační oblasti genu H19, tj. promotorové a enhancerové sekvence, které jsou funkčně spojené s heterologními geny. H19 enhancer a jeho aktivní části mohou být použity v jakékoli kombinaci s H19 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. V jiném aspektu poskytuje vynález použité takovýchto vektorů k expresi heterologních genů v nádorových buňkách. Ještě jiným aspektem vynálezu je využití vektorů podle vynálezu pro léčbu rakoviny genovou terapií.

Podrobný popis vynálezu

Vynález částečně vychází z objevu, že k cílené expresi žádoucích kódujících sekvencí v rakovinných buňkách lze využít regulační oblasti z genomově imprintovaných genů, jež jsou exprimovány v rakovinných buňkách. Konkrétně bylo zjištěno, že exprese H19 je aktivována v širokém spektru karcinomů, jež zahrnují, 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, že v nádorových buňkách jsou specificky aktivovány rekombinantní DNA konstrukty, jež obsahují oblasti H19 promotoru funkčně spojené s heterologním genem, nebo konstrukty obsahující takovýto promotor v kombinaci se spodním (downstream) H19 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 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 RAN nebo ribozym).

Regulační oblasti genomově imprintovaných genů, jež jsou exprimovány v rakovinných buňkách zahrnují H19 promotor a enhancer.

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

- 5 „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.

- 10 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.

Regulační sekvence genu H19

- 15 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
20 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 (shora 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 toho i další oblast promotoru H19, nacházejí se mezi
25 nukleotidy –819 až +14 (Obrázek 5, SEQ ID NO:2), postačuje k expresi funkčně připojeného heterologního genu v rakovinných buňkách.

- 30 Do konstruktů s H19 promotorem a heterologním genem může být případně přidána spodní enhancerová oblast lidského H19 genu, 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 bez ohledu na orientaci, tzn. může být umístěn v opačné nebo stejné orientaci (vzhledem k orientaci H19
35 enhanceru v endogenním H19 genu) za kódující oblast heterologního genu pod kontrolou H19 promotoru. Fragmenty tohoto enhanceru, obsahují sekvence ukázané na Obr. 6, 7A, 7B a 8A–8C (SEQ ID NO: 3–5), rovněž mohou napomáhat genové expresi.

- 40 Tyto regulační sekvence z genově imprintovaných a 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
45 schopnosti zvyšovat transkripci z H19 promotoru.

- 50 Změny v regulačních sekvencích lze provést pomocí řady chemických a enzymatických metod, které jsou dobře známy z oboru. Například úseky sekvencí vymezené restričními místy mohou být deletovány. Místně cílenou mutagenézou lze definovaným způsobem měnit sekvenci a/nebo vnášet do specifických úseků sekvence restriční místa. Deleční mutanty mohou být generovány i s použitím DNA nuleas 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.

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, 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 konvertují prekursor na cytotoxický produkt. Příklady cytotoxických genových produktů, které mohou být podle vynálezu použity, zahrnují záškrťový toxin, toxin *Pseudomonas*, ricin, cholera toxin, PE40 a nádorové supresorové geny jako jsou gen retinoblastomu a p53. Vedle toho mohou být použity sekvence kódující apoptické peptidy, které indukují buněčnou apoptosu. Takové 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 známé nebo dosud neobjevené apoptické peptidy.

Mezi metabolické enzymy, které konvertují prekursor na cytotoxický produkt, patří thymidin-kináza (z viru herpes simplex nebo variace zoster), cytosindeaminasa, nitroreduktasa, cytochrom P-450 2B1, thymidinofosforylaza, purinnukleosidofosforylaza, alkalická fosfatasa, karboxypeptidasa A a G2, linamarasa, laktamasa a xanthinoxidasa (viz Regg a Sikora, August 1997, Mol. Med. Today, str. 359–366).

Expresními konstrukty zde popsány 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 rakovinného fenotypu. Takové cílené 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 mohou být specifickými terci pro expresi antisense RNA nebo ribozymové RNA.

Přístupy využívají antisense techniku zahrnující 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, čímž delší je hybridizující nukleová kyselina, tím více nepárujících bází vůči RNA může obsahovat a přesto s ní může vytvářet stabilní duplex (nebo triplex, podle okolností). Osoba zblhlá v oboru může určit tolerovatelný stupeň nekomplementarity pomocí standardních postupů na stanovení teploty tání hybridizovaného komplexu.

- 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, 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 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 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 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 porovnály hladiny cílové RNA nebo proteinu s hladinami RNA nebo proteinu vnitřní kontroly.
- Translace cílové mRNA lze také bránit použitím molekul ribozymu navrženého tak, aby katalycky 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 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 bází s cílovou mRNA. Jediným požadavkem je, aby mRNA měla následující sekvenci dvou bází: 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 štěpicí místo 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 „ribozomy Cechova typu“), jejichž prototyp se vyskytuje přirozeně v *Tetrahymena thermophila* (známé jak oIVS nebo L-1í IVS RNA), a které podrobně popsal Thomas Cech se spolu-pracovníky (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 Příhláška Wo 88/04300 University patents Inc.; Been a Cech, 1986, *Cell* 47:207–216). Ribozymy Cechova typu mají aktivní místo o osmi párech bází, 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.
- 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. Takovéto buňky, zejména nádorové buňky jsou vhodným terčem pro postupy genové terapie podle vynálezu. Exprese specifická pro H19 může být stanovena v nádorech i v buněčných liniích technikami analýzy RNA, *in situ* hybridizace a s použitím konstruktů obsahujících reporterové geny.

Ve většině aplikací RNA analýzy se používá značená sonda, specificky hybridizující s transkrip-
tem sledovaného genu, kterou lze připravit kteroukoli z technik dobře známých v oboru. Znače-
ná sonda může obsahovat alespoň 15 až 30 bází komplementárních k H19 nukleotidové sekvenci,
výhodněji obsahuje alespoň 50 až 150 bází komplementárních k H19 transkriptu. Obzvláště
5 výhodnou hybridizační sondou je H19 expresi je polynukleotid komplementární ke 3' konci H19
mRNA v úseku přibližně 800 nukleotidů nad polyadenylačním místem až po poly A místo.

Ve specifickém provedení vynálezu, jež je níže ilustrováno příkladem, se značená natisense RNA
sonda připravila *in vitro* s použitím T7 nebo T3 expresního plazmidu. H19 sondy se dají též zna-
10 čit s použitím náhodných primerů a značeného nukleotidu, 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“).

15 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.

20 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).

25 Takovéto analýzy genové exprese je možné provádět též „in situ“, tzn. přímo v tkáňových řezech
(fixovaných a/nebo zmražených) připravených ze vzorků tkání pacientů, odebraných při biop-
siích 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
30 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 výhod-
35 né, 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 regulač-
ních oblastí.

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

40

A. Pevná nádory u dětí

1. Wilmsův nádor
2. Hepatoblastom
- 45 3. Embryonální rabdomyosarkom

B. Nádory zárodečných buněk a trofoblastu

1. Nádory zárodečných buněk testes
- 50 2. Nezralý teratom vaječníku
3. Sakrokokcygeální nádor
4. Choriokarcinom
5. Nádory trofoblastu přivráceného k placentě

C. Epiteliální nádory u dospělých

1. Karcinom močového měchýře
2. Hepatocelulární karcinom
- 5 3. Karcinom vaječníku
4. Cervikální karcinom
5. Karcinom plic
6. Karcinom prsu
7. Karcinom dlaždicových buněk na hlavě a krku
- 10 8. Karcinom jícnu
9. Karcinom štítné žlázy

D. Neurogenní nádory

- 15 1. Astrocytom
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.

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

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 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 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 zde zahrnuty odkazem). V případech, kdy je požadována i translace, bude heterologní gen konstruován tak, aby obsahoval i vhodný 3' polyadenylační signál.

Kultivované buňky

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 konstruktů, jako je vektor a transformace nebo transfekce do hostitelských buněk, buď 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 plazmidy následujících typů: plazmidy odvozené od pBR322, plazmidy odvozené od pEMBL, plazmidy odvozené od pEX, plazmidy odvozené od pBTac, a plazmidy odvozené od pUC. V kvasinkách *S. cerevisiae* se jako užitečné klonovací a expresní vektory pro vnášení genetických konstruktů uplatňují plazmidy YEP24, YIP5, YEP51, pYES2 a YRP17 (viz napřík-

lad 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 2µm plazmidu. 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 derivátů virů, jako jsou např. bovinní papillomavirus (BPV-1) nebo viru Sepsteina-Barrové. Různé metody používané při přípravě plazmidů a jejich transformaci do hostitelských organismů jsou dobře známy v oboru. Další vhodné vektorové systémy, jakož i obecné postupy rekombinantních technologií uvádí Sambrook et al., *supra*.

Genová terapie

Vynález rovněž zahrnuje využití polynukleotidů, obsahujících regulačních oblastí 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, adenoasociovaného viru a viru herpes simplex-1, nebo do rekombinantních bakteriálních nebo eukaryotických plazmidů. Virové vektory transfekují buňky přímo; plazmidová DNA může být vpravena do buněk např. pomocí kationických polymerů, kationických liposomů (např. lipofectinu, derivátů cholesterolu jako D.D.A.B a kationických fosfolipidů) nebo derivatizovaných (např. s protilátkou konjugovaných) konjugátů polylysinu, gramicidinu S, umělých virových obálek nebo jiných takovýchtonitrobuněčných nosičů, jakož i přímou injekcí holého genového konstruktů, elektroporací nebo CaPO₄ konprecipitací. 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-vnášečského 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* transfukci expresních konstruktů jsou použitelné i pro *in vivo* transdukcí buněk, jako např. pro použití v *ex vivo* tkáňových kulturách popsanych 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; Junal et al., 1992, J. Gen. Virol. 73:3251–255; a Gould 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 přisítování proteinu
 5 nebo jiné molekuly (např. laktosy, čímž se env protein převede na asialoglykoprotein), jakož i vytvořením fúzaných proteinů (např. fúzané 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
 10 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 překládaném 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 např. Berkner et al., 1988, Bio Techniques 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
 20 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 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 infekitivity. 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 mutagenese 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.,
 30 *supra*; Haj–Ahmand a Graham, 1986, J. Virol. 57:267). Většina replikačně–defektních adenovirových vektorů v současnosti používaných, a proto předkládaných 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)s v. 7, str. 109–127).

Jiný virový vektorový systém použitelný k vnášení předmětných expresních vektorů je adeno–asociovaný virus (AAV). Adenoasociovaný 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. 158–97–129). 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 pouhých 300 bp AAV
 45 sekvenze 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 Transchin et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:3251–3260. Pomocí AAV vektorů byly do buněk různých typů zavedeny mnohé různé nukleové kyseliny (viz například Hermonat et al., 1984, proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466–6470; Transchin et al., 1985, Mol. Cell. Bio. 4:2072–2081; Windisford et al., 1988, Mol. Endocrinol. 2:32–39; Transchin et al., 1984; J. Virol. 51:611–619; Flotte et al., 1993, J. Biol. Chem. 268–3781–3790).

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
 55 metod přenosu genů využívá normálních mechanismů používaných savčími buňkami pro vychy-

távání a intracelulární transport makromolekul. Ve výhodných provedeních vynálezu se uplatňují neviróvé systémy vnášení genů, které k vychytání a pohlcení předmětných expresních konstruktů terčovou buňkou využívají endocytosu. Příklady takovýchto gen-vnášejících systémů zahrnují systémy odvozené z liposomů, polylysinové konjugáty a umělé virové obaly.

5

Při klinickém použití mohou být terapeutické expresní konstrukty vnášeny do pacienta jakýmkoli z mnoha způsobů, jež jsou dobře známy v oboru. Například, farmaceutický prostředek obsahující gen-vnášející systém může být zaváděn systémově, např. nitrožilní injekcí, přičemž k specifické expresi konstruktu v cílových buňkách dochází převážně na základě specifity transfekce dané buněčnou nebo tkáňově specifickou expresí, vyplývající z regulačních sekvencí předřazených heterolognímu genu, nebo z kombinace regulačních sekvencí s gen-vnášejícím systémem namířeným na konkrétní typy buněk. V jiných provedeních je počáteční vnesení rekombinantního expresního konstruktu do zvířete omezenější, neboť je místně lokalizováno. Gen-vnášející systém může být například zaveden prostřednictvím katétru (viz Patent US 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 popsaných například v Dev et al., 1994, Cancer Treat. Rev. 20: 105–115.

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

25 Terapeutické použití a dávkování

Je zřejmé, že z hlediska 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 hmotnosti nebo rychlosti růstu nádoru, jakož i zlepšení histopatologického obrazu nádoru. Pro účely této přihlášky se budou tedy zde používané výrazy „lčba“, „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.

35

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.

40

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.

45

Například, typická lidská dávka adenovirového vektoru, který obsahuje regulační oblast H19 funkčně spojenou s heterologním genem kódujícím cytotoxický produkt jako je např. thymidin-kináza, je od 1×10^7 pfu do 1×10^{10} pfu injikovaných denně, přímo do nádorové hmotnosti. 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

50

55

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. thymidinkináza.

Různé biochemické složky podle vynálezu mají mít s výhodou, zejména pro *in vivo* použití, vysokou čistotu a být v podstatě prosty potenciálně škodlivých kontinuujících 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, jež je v podstatě prost jakýchkoli potenciálně toxic-
kých 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 buňky nebo buněčnou linii uvolňující takovýto vektor. Vektor-uvolňující buňky nebo buněčná linie by měla být skladována a převáženy ve zmraženém stavu. Souprava může také obsahovat médium a reagenty potřebné ke kultivaci vektor-uvolňujících buněk nebo buněčné linie.

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/μg 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/μg 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).

- 5 Obrázek 9A–9C. Expres 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.

- 10 Obrázek 10A–10E. Expres 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: ET 112 buňky.

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

15

Příklady provedení vynálezu

Regulační sekvence H19 napomáhají expresi heterologního genu v nádorových buněčných liniích

- 20 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.

Materiály a metody

25

Buněčné linie a transfekce

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.

30

- Transientní transfekce byly prováděny postupem používajícím kalcium fosfátový precipitát. Precipitáty (obsahující 7 µg plazmidu) byly přidány 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 až 96 hodin po transfekci a CAT aktivita byla stanovena postupem používajícím extrakci butyryl–CoA do organické fáze (Sambrook et al., 1989). Alikvotní horní organické fáze (100 µl) byl přenesen do scintilační lahvičky obsahující 3 ml scintilační kapaliny a byl změřena radioaktivita vzorku.

35

Konstrukce expresních vektorů

40

- Plazmidy 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 reportérovým gelem) a pCAT–control (obsahující CAT reportérový gen pod kontrolou promotoru i enhanceru z SV40) jsou komerční produkty firmy Promega (Madison, WI).

45

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

50

ESPCR21: CGGTTCCCCACTTCCCCAGTTT (SEQ ID NO:6) a

55

ESPCR22: CGGAAGTCGACAACCCTCACCAAAGGCCAAGGT (SEQ ID NO:7).

Konec PCR produktu byly zatupeny pomocí Klenowova enzymu a klonovány do EcoRV místa plazmidu pBluescriptIIISK+. Správnost DNA insertu byla potvrzena přítomností štěpicích míst pro restriční 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 plazmidu pCAT–basic, za vzniku pH19E.

Expresní plazmidy, které obsahují H19 enzancerovou oblast 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 plazmidu pUC19. Tento enhancer pak byl vyštěpen jako fragment EcoRI–HindII a ligován mezi EcoRI–HindIII místa plazmidu pBuescript II SK⁺ za vzniku pBhH19En–Sa. Plazmid pBhH19En–Sa byl parciálně štěpen enzymem BamHI a 5 kb fragment obsahující H19 enhancer (a interní BamHI místo) byl klonován do BamHI místa plazmidu pH19E pod segment H19 promotor/CAT reportérový gen. Takto byly získány plazmidy obsahující H19 enhancer v obou orientacích, přímé (pH19EH19D, direct) a opačné (pH19EH19R, reversní).

Výsledky a diskuse

Pět různých linií rakovinných buněk močového měchýře. HT–1376, EJ28, T24P, 1197 a UM–UC–3 bylo transfekováno plazmidem pCAT–Basic (v Obr. 2 označeným P–E), plazmidem pCAT–control (v Obr. 2 označeným pSV40ESV40), plazmidem pH19E, plazmidem pH19EH19D a plazmidem pH19EH19R. Výsledky exprese pro každý konstrukt jsou uvedeny v Obr. 3A–3E. V každé buněčné linii byla pozorována nejvyšší hladina CAT aktivity s plazmidem 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. Avšak SV40 regulační sekvence nejsou ve své schopnosti indukovat genovou expresi specifické pro nádorové buňky. Buněčné linie transfekované plazmidem pH19E, který obsahuje CAT reportérový gen pod kontrolou H19 promotoru, rovněž vykazovaly expresi CAT významně zvýšenou nad pozadí. Hladina CAT aktivity indukované 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 konstruktů H19 promotor/CAT reportérový gen, Orientace enhanceru však dala v různých buněčných liniích odlišné výsledky. V buněčných liniích HT–1376 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 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.

Gen toxinu pod kontrolou H19 regulačních sekvencí

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 jsou dobře známy v oboru, se například odstranily sekvence kódující produkt genu CAT a nahradily se sekvencí kódující thymidinkinázu viru herpes simplex (HSV–TK).

Expresní plazmidy H1/HSV–TK se transfekují do buněčných linií odvozených z karcinomu močového měchýře jak bylo popsáno v části 6. Po transfekci do linií rakovinných buněk močo-

vého měchýře, expresní plazmid H19/HSV-TK indukuje v přítomnosti gancicloviru cytotoxicitu specifickou pro rakovinné buňky močového měchýře.

Expres H19 v myším modelu indukovaného karcinomu močového měchýře

Materiály a metody

Sedmdesát samic myší kmene C3H/HE (Charles River), 5 týdnů starých, bylo umístěno po 6 v klecích a ponecháno, aby se 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 myší) a experimentální (60 myší) skupiny. Experimentální skupina dostávala k pití *ad libitum* vodu obsahující 0,05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamin (BBM) (Tokyo 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.

Příprava sondy

2,1 kb fragmentu obsahující kódující oblast myšího H19 byl subklonován do plazmidu pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, CA) za vazebná místa pro T7 a T3 RNA polymerasu. Po štěpení plazmidu enzymem HindIII, byla z linearizované plazmidové DNA *in vitro* připravena s použitím T7 RNA polymerasy (Boehringer Mannheim) a Amersham RPN 2006 soupravy [³⁵S]-značená antisense H19 RNA. Takto připravený traskript 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.

In situ hybridizace

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

Výsledky a diskuse

Do 26 týdnů se u všech přežívajících myší experimentální skupiny vytvořily pohmatem zjiitelné 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.

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

- 5 Plazmidy exprimující H19/toxin nebo H19/prekurzor toxinu se pro *in vivo* vnesení do myšího močového měchýře zabudují do liposomů jak popisují Takashita et al., 1993, J. Clin. Invert. 93:652–651 (zahrnuto zde odkazem). Myši pro tento experiment mají chemicky indukované nádory močového měchýře jak popsáno shora v části 8.
- 10 Ve stručnosti, 50 µg plazmidové DNA rozpuštěné v 500 µl Optimenova bezsérového média (BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) se přidalo k 250 µl Lipofectaminu a 250 µl vody. Směs se inkubovala 30 min při pokojové teplotě a pak se zředila v 10 ml vyváženého roztoku soli (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
- 15 1 mM CaCl₂. Myším s chemicky indukovanými nádory močového měchýře se pomocí katétru podalo přibližně 0,2 ml koncentrovaných liposomů. Kontrolní skupina myši 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.
- 20 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 myši z experimentální skupiny byla prokázána kolokalizace exprese toxinu *Pseudomonas* a H19. Kromě toho byly nádory močového měchýře myši
- 25 experimentální skupiny menší a nekrotické ve srovnání s nádory myši kontrolní skupiny.

H19 promotor a IGF–2 promotor s H19 enhancerem napomáhají expresi heterologního genu

Materiály a metody

- 30 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), fucose (Boehringer), Perfect Transfection Kit s 8 různými lipidickými činidly (Invitrogen), TFX–10, TFX–20 transfast (Promega) a kalcium fosfátový postup (Gorman et al., 1982, Mol. Cell. Biol. 2:1044–1051).

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

- 45 H19 promotorová oblast pokrývající nukleotidy –818 až +14 byla amplifikována z plazmidu pbh19p#1 pomocí PCR s použitím primerů 5′–ATATGGTACCGACAACCCTCACCAAAG–3′ (horní, SEQ ID NO:8) a 5′–ATATAAGCTTCTTCTCCCTCACCTGCTC–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 konstruktu Luc–PBH19. Tento H19 promotor získaný pomocí PCR byl sekvenován z obou řetězců na automatickém sekvenátoru (ABT Prism 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer). Nukleotidová sekvence H19 promotoru (SEQ ID NO:2), který byl generován pomocí PCR, je ukázána na Obr. 5.

- 50 5 kb spodní H19 enhancer, popsaný 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 plazmidu Luc–PBH19 vznikl konstrukt LUC–PBH19–0,9EH19 a insercí 4,1 kb BamHI fragmentu H19 enhanceru do BamHI místa plazmidu Luc–PBH19 vznikl konstrukt Luc–

PBH19–4EH19. Enhancerové sekvence byly tímto klonováním umístěny pod sekvencí H19 promotor/luciferasový gen směrem k 3' konci.

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

10 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'–ATATAAG–CTTGCTCCCATCCTGCA–3' (spodní, SEQ ID NO:11) amplifikována 512 bp oblast promotoru P4. Výsledný PCR produkt byl štěpen enzymy KpnI a HindIII a ligován do KpnI–HindIII míst
15 vektoru pGL3–Basic nesoucím reportérovým 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
20 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). Nukleotidová sekvence 4,1 kb enhanceru je ukázána na Obr. 8A–8C (SEQ ID NO:5).
25

Výsledky a diskuse

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

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

40 Buňky transfekované plazmidy 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. 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.
45

IGF–2 P4 promotor rovněž zvýšil ve všech buněčných liniích expresi luciferasy nad pozadí. Přidání 2 kb H19 enhancerového 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 šestnásobku pro buněčnou linii Huh7, zatímco v buněčné linii 5637 bylo zvýšení promotorové aktivity účinkem enhanceru pouze marginální.
50

55 Obrázek 10A–10E ukazuje expresi z konstrukt 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 až 28 krát podle buněčné linie, s výjimkou buněčné linie 5637.

Uložení klonu

5

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

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

10

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.

15

Všechny publikace zde citované jsou zahrnuty v úplnosti odkazem.

SEZNAM SEKVENCÍ

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

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR INDUCING TUMOR-SPECIFIC
CYTOTOXICITY

<130> 9457-0014-228

<140> PCT/IL98/00486

<141> 1998-10-04

<150> US 09/165,240

<151> 1998-10-01

<150> US 08/943,608

<151> 1997-10-03

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 830

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

ctgtcaggggct	ccaaacaaaccc	ccaccaaagg	ccagggttct	gaacgaacgga	cccacagcgg	60
gggtggctgggg	ggagtcgaaa	ctcgccagtc	ttccatccca	ttccaacccg	gggtgcccac	120
ggggggccgggg	gagagctctt	ggggccggcc	accgtctctc	agttagagtg	gcccgcgagc	180
cgtaacgcaaca	gcccggcaca	atggggctct	cgacacagga	agtgggccgc	aatgggaccc	240
gggtggcccg	cggtctgtgg	gactctgtcc	tgctggaaaa	gctgtgacga	gcacaagctc	300
gggtcaaacctg	atggggaatc	gcccgggggg	ctggcaccgc	gcccacccag	gggttttggg	360
cactttccctc	tgcccccctc	caccccaccc	ctactctcca	ggaaacgtgag	gtcttgagcc	420
tgatgggtggg	agggaaaggg	ccctctgtcc	atccgagtc	ccaggggacc	gcagcttgcc	480
cccagcccatg	tgcaaaagat	gtccaggggg	ctggcaggca	gggagcagca	ggcatggtgt	540
ccccctgaggg	gagacagctg	ctcgggaggg	agaggtctct	gacccctgag	gaggtgatgg	600
ggcaatgctc	agccctgtct	ctggatgcca	aaggaggggt	gctgggaggg	cgtctctgga	660
gaatttcagg	atgggtgtct	ggtagagag	acgtgtgctg	gaactgtcca	gggcccaggt	720
gggcccctgg	ggggccctct	ggagggccct	gctcttgatt	gcccgcaggg	caggggtcgg	780
aaattctggcg	ggccacccca	gttagaaaaa	gcccgggcta	ggaccgagga		830

<210> 2

<211> 833

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 2

gacaacccctc	accaaggggc	aaggtgggtga	ctgacggacc	cacagcgggg	tggcttgggg	60
agtcgaaaaat	ctccagctct	cactccactc	ccaaacgttg	tgccccacgc	gggcttggga	120
gagttctgtga	ggccggccac	cgcttctcag	tagagtgggc	ccgcgagccg	taagcacagc	180
ccggcaacat	gggtctctca	gacaggaaag	tggcctggga	tgggacccgg	gtgccacgg	240

gctctggggga	ctccctccctg	cggaaaacggc	ggctgacgagc	acaagctccgg	tcaaacgggat	300
gggaaatcggc	ctgggggggct	ggcaccgggac	ccaccaggggc	gtctcggggca	cttccctctcg	360
cccccacgcca	cccccacccct	actctccaggg	aaagtggagtc	ctggagccgctg	atggctggcag	420
gaaggggccct	tctgtgcccct	ccgagctccct	agggaacccgc	agctgggcccc	cagccactctg	480
tcaaagtatct	gcaaggggcct	ggcaggccagg	gagcagccagg	catggctgtcc	cttgaggggga	540
gacagctggcc	tggggaggggg	aaatccctggc	cttgaggggag	gtgatgggggc	aatgctcagc	600
cttctctcccg	gatatccaaa	gaggggctggc	gggaggccgct	cttctggagaa	ttccagggatg	660
ggctgctgggt	gagagagagc	tgtctctggaa	ctctccagggt	cggaagctggg	ccctgctgggg	720
gccccctggga	gggcccctggc	ctgactgggct	ggcaggccagg	gggagggaat	tctgggggggg	780
ggcaccctccg	ctagaaaaaag	ccgggggctag	gacctgaggag	cagggtcgagg	gag	833

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

<400> 3						
caaggacatg	gaattctggga	ctttctgtctc	ccaccctcttc	tgttgagccct	aggaaacctct	60
gagcagccag	aaggccctggg	gtcttagagcc	tagaaatggga	cccccaagctc	cacctgcccc	120
gcttagaccc	ccagccattga	agggctggctc	gacttctctgt	gagagcgaagc	caactaagcgg	180
gatggacacc	atcgctccacc	ccaccctggcc	ctggccaggcc	ctggccaggctc	cagccccagctc	240
cagcccaagcc	ctgcccctctc	cagcccctggc	cagcccaggcc	catcccctggc	ctaccccagcc	300
cagccctgttc	ccgcccctggc	cagcccaggcc	cagcccaggcc	ctggcccctggc	ctgcccctggc	360
cttcccaggcc	ctgacctcttc	cagcccctggc	cagcccaggcc	catcccctggc	ctaccccagcc	420
cagccctgttc	ctgcccctggc	ctggcccctggc	cagcccctggc	cagcccaggcc	ctgcccctggc	480
ctgcccaggcc	cagcccctggc	cagcccaggcc	cagcccaggcc	cagccatggct	tctctgggatg	540
gtttagccacc	gctctgacccc	aggaaatgggc	tggccaaatgg	ggctctaggcc	accagggccac	600
tgggtctggca	ccgggtccagac	aaagcccaggc	cttggcccctc	ctggccagggtc	ctggggctcttc	660
acctgtccagc	ctgctgtgggt	gtgctatggct	tcaagggtctg	tggctccaggc	ctgcccctggc	720
ccctggctctc	gaggccctccc	ctcttctcttc	atgaaatctgt	tggcccaagcc	acctctggagc	780
tgtctctggct	cttggctggct	gcaacctcttc	aggagctccct	tgtgtgtcttc	atggggagctct	840
tagccaaaggaa	ggggagctctg	aatctccctga	gccccggg			877

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

<400> 4						
ccgggtacccg	agctcccccag	aaagataaaatg	attctctctct	ctcttagagat	gggggtgggga	60
tcttagccacc	cagagcccaag	ggggcagctgg	gtccgggtggg	gggcccctccc	cggtccctccc	120
aaacatggggg	ccagggaggtc	agcccctccaa	ccgggacccc	gggtgggtctc	cagggaatggg	180
tctcccccag	tggccccagc	tgtctgtgtct	tccagatggg	tgtgcatggg	tgtgtctgttg	240
tgtgtgtgttg	tgtgtgtgttg	tgtgtgtgttg	tgtgtgtgttg	gacaaagcccc	agagagccaa	300
agaccctgagt	ggagatctctg	tgaactctcca	aaagggggac	tggaaaggttc	gagaaagagc	360
tgtgtgtcagc	cttggctcttc	ctttaaaggctg	tgttaaaccac	actagggcata	gcataggctcc	420
gggcccctggc	ccctccctctc	tccctccgggc	ctccccccttc	tcttctctccc	ccctctacccc	480
cggtccctctg	ccctgtctctg	gtgacacccgt	tggcccccctt	ccaggggctga	gggaagccag	540
cggggggcccc	ttctctgaaa	cccaacctgca	ggccgggtctg	ccgggaaaggg	gctgtctctg	600
cagaggtctcc	cgccctggcccc	gcagcctgtct	ccgggaaagca	gtcgctgttgg	gtattctgtct	660
cttctgtcagc	acctgtgtctg	caaaggaaggc	agacactgttg	ctccctgtctc	ttaggggagcc	720
ccgtctccacc	accccaaccac	tggctctggca	caggctgggag	ggccgggtccg	cggggagcggg	780
cgccggggctg	gggtctgggac	atttaaacaca	caagggtctcc	aggcaactgca	ggctccctctc	840
ccctccctctg	cccaagccccc	ctgctccacag	gcagctgtcca	agcccctaggg	ccaggagggcc	900
agcagctgggt	gcagaaacaa	ctccctgggaa	ggccgtctcag	ggctggacccc	cggggagagag	960
ggctctggcag	gctgtctgggg	acgctgacccg	tgggcccacac	gtctgacagaa	actgggtctcc	1020

tggctggaaag	atggggggaga	tggcaagccct	ctgaggcaggc	acgagcagggt	tgcacggagg	1080
cggggggggcg	gggagggcgcc	actggcagcat	gcaccccaaa	gcccanaagg	aggggagacc	1140
agggccctggga	atcggagaaat	agaaaaggccg	cttgggaggcc	tgggaaccgg	ctgacctcca	1200
acagagtggg	tctccagccct	ggctctggccc	tggcgagggt	ccctccccc	cattacccagg	1260
cctagagccct	ccagtcctggg	tggccccccag	cccgaggggg	aaaggcccca	ccctggggctg	1320
tggggacagag	ggcacggtcca	tcaagagtggt	ctcccaagggt	acacgctgggt	gttttgaggtc	1380
caacaggaaagc	atccggagata	aggagccctgt	tctccagctg	ggcacgggagc	caggcaggggg	1440
gctgtgggggc	agccccagggt	gcaaggccag	gctgtggggc	tggcagctggc	tggggcccca	1500
ctcccaaggcc	tctgggggag	gtgggagggt	ggagggtggca	gctgtcagct	ggcccccaggc	1560
gaggtctctca	gccccagctcg	ctctccgggtg	gggcagccca	agagggtctg	gctgagccctc	1620
ccacatctctg	gacctccatca	cccaaacact	caacttaagg	tgaattctcc	gtgtccctgtg	1680
acttgggttag	acaaaagcccc	tgtccaaagg	ggcagccagc	ctaaaggcagc	gggggacggcg	1740
tgggttgccgg	gggacggggg	agatgggacaa	caggacccag	gggtgtgggg	cgatgggggga	1800
gactggacaa	aggacccggg	gtgtgggggg	gctgggggag	atgggacaaa	ggaccggagg	1860
tgtggggggac	acggcatgtca	ctcatgcaag	ccaatggggg	gctggggagg	ctggggagcca	1920
gacagacccg	gctggggctgg	gggggaaagg	ggggcagatg			1960

<210> 5

<211> 4085

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 5

ccgggtaccg	agctccaggg	aagataaaag	acctccccc	ctctagagaa	gggggtgggg	60
tcttagacac	cagagccaaag	gggtgagtggt	gtccgggggg	ggggccccc	ggggccccc	120
aaacatgggg	ccaggaggtc	agccctccaa	cttgggaccc	gggtgggggt	cagggaatgg	180
tctcccccag	tggccccagct	tgcctgtgtgt	ttcagatggg	tgtgcaagg	tgtgtgtgtg	240
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	gacaaagcc	agagagccaa	300
agacccgagt	ggagatctctg	tgaatctcaa	aaaaggggga	tggaaaggttc	gagaaaagagc	360
tgtgtgtgtg	cttggccctcc	ctcaaggctg	tggtaacccc	actaggtcata	gcataggccct	420
ggcccccctg	cccccctccc	tccctccggc	cccccctccc	tccctccccc	ccctctaccc	480
ggctccccc	ccctgtccctg	gtgacacccg	tggccccccc	ccagggtcga	gggaagccag	540
gggggggtccc	tctctgaaag	ccacacctga	gggtgggtctg	ccgggaaagg	gctgcccctcg	600
caggaggtccc	ggcccccctcc	gcagccgtct	cttgggaaag	gtcgtctgtg	gtattcctgt	660
ccctctgtag	actgtgtgtg	caaaagaaag	agacacctgt	ctccctgtcc	ctaggggagcc	720
ccgctccaccc	acccaaacac	tggctgggaca	caggccgggag	gcccgggtccg	gggggagccgg	780
cgggggggtcg	gggcccgggac	attcaaacaca	cagggggtg	aggccactgca	ggctccctccc	840
ccctccctccg	cccagccccc	ctgctccacg	gcacgtgtcca	agccctctagg	ccaggagcccc	900
agcagtggggt	gcagaaacaa	ctccctgggaa	gggggtgtcag	gggtgacccc	gggggagaaag	960
ggctgggcaag	gtgtgtgggg	acgtccgaccc	tgggccccac	gtctgagaaa	actgggtggc	1020
tggctgggaa	atgggggagga	tgcacaaagcc	ctgagggcagc	acgagccagg	tgcattggagg	1080
ccgggggtcg	gggaggtctgc	actgcagcat	gcaccccaaa	gcccanaagg	agtgggagacc	1140
agggccctgg	atcggagaaat	agaaaaggccg	cttgggaggcc	tgggaaccgg	ctgacctcca	1200
acagagtggg	gcccggccctg	gaggcaaaag	gtgtccccc	gtccggccct	gctgggggga	1260
gctatgtgtc	atggggcaagc	cacaggtatct	gtagccctgt	ctgagccctat	ggacccaggg	1320
cagggtctgca	aggcaggggca	ggggagacag	caagggggag	caaggagccag	agaggggggcc	1380
tcagggtctcc	ccaggagggaa	cattctccctg	acaggagggaa	gagacgtcccc	aggggttgact	1440
gtggggagcc	atgggtggcag	ccgggggtcgt	ggcagatggg	agagaggtctg	gctgaggtgaa	1500
gtgtcagggg	tcagggtctct	ggggcccaaca	tgtctgtggg	agcaggcagg	cccagggtctc	1560
tccggccaccc	cccaactcccg	cttgggtccat	aggtctgggg	caagggtggg	gtgggagtag	1620
caggagatgg	ggccccagggg	gcaagcagggt	ccccaaagac	atttagaaaa	accggcttat	1680
gcaggccagca	tccagagcag	gggggtgtcg	tggggggggc	cttgggagca	cagagagggca	1740
caaggtaggcc	ccccgagggg	ctcccccctg	gggggaggtg	acatcacccc	tgtgtcaaca	1800
gtcagtgctcg	cagctcccgcc	cagccaggggt	ttatgggagc	agacccagcc	gggcttgggg	1860
ccctcactccc	caggcccaaca	caactagccca	ctgttcaggg	tccgggggtgg	cggtcatggcc	1920
tgggggtcccc	ggcaacccctg	ctccctctggc	caacctaaac	tcccggcatac	gcccgtggccc	1980

cctctgaggg	cccccaacca	gtaagtgtgg	ggcccgagag	gcctggcgcc	ctctctctct	2040
ccccctctag	agagaaacgt	ggaggttctt	gggtgggggg	cgctcacagc	ctcttgacac	2100
aggtgcatgg	ggtcagggtt	cccaagaatg	ccccggggaa	ggacctcagc	tggtccggcg	2160
gctctagggt	tcagggttct	gtctgcacag	gggttagccc	ctcccgagcc	tctgtgaagc	2220
cagtacgggg	ctccccctcc	tgccccgtgc	tctgtccggg	gcttctggga	ctgcactgct	2280
ggccacctgt	gagaggggtg	acaggggaag	gcccgcgtgg	tgctcttccc	tgccacacct	2340
gctgtgtgtg	ccccctccaag	taggggacaac	ccctcttgag	gcttgggggg	acctctgggt	2400
tgccaggggc	tcccagagcc	ctgtgagccc	ctgggggggt	tggtctgatg	ccccctccca	2460
cttccagggt	ctgtctgtgg	ccagaacccc	agcttcccg	caggctgggt	tgctgtgtgt	2520
acctcaggaga	ggctctgtcc	ccacttgagg	gccaaccgac	tctgtcagac	cacagagacc	2580
cccaaggagc	ctgaagggtg	gagaccgggt	gctggggacca	ggtgggactt	tcccacggag	2640
cgttcccgag	gcccagctgg	ggacacgtcc	cccttctctc	cagacacacc	ctgcttgcca	2700
ccaggacaca	ccggcctgtt	gggggtctct	tttaagtgtc	tgccactctg	aggtgactgt	2760
ccccctccaa	agaggtttct	ggggcccgag	tggtatgctt	gggtctgagc	aggaggtacc	2820
gggtccggcag	gggtctgggg	ctgtctctct	gggaaaggaa	ggtctggggg	cggtgtgtgt	2880
gacctcaggac	catccaggga	ggccctgtct	tggtggcaag	gggaaggagg	cggtctggaga	2940
ggcttggggc	cccccggtcc	gcttcccatc	ctttagctcc	atgcccctca	acctctgtca	3000
ccagtgaggt	gatgtccagg	ggccctggaa	aggtccacagc	atgttctgagc	gggttgagag	3060
agaggggaaa	ggcgggggcg	gggaaaagta	gttgaggaaa	gcttttaggt	caaggaaagg	3120
gacagggttc	tggtggggag	ggagctactg	gggtcgccgg	gaaggtcccc	gcttgcctgt	3180
gccaacccaga	acctctggct	cttagctagc	ccccgcagcc	ccagctcttc	tggtctgtgt	3240
ccccctcccc	catcccccag	tgctctgtgt	aaccaggctt	tggaacccaaa	ccccctgtgc	3300
ccccctctct	cttccccacc	cccccaatgc	agtggtctcc	agctctggct	tgccccgtgc	3360
caggctccct	ccctctcatt	ccaggcttag	agcttccagt	ccccgtggcc	cccagcccca	3420
gggtgaacgg	cttccacccc	ggtctgtggg	cagagggtcac	gttcatcaag	agtggtctcc	3480
aagggaacac	tggtctgtgt	cagctccacg	gaagcatctg	agataaggag	cttgttcttc	3540
cagtggggcac	ggagccagca	gggggtgtgt	gggtcgagcc	aggttgcaag	gccaagctgt	3600
gggtctgcag	ctgtctgtgt	ccccactccc	aggtcttctg	gggaagggtg	aggcggggag	3660
cggtcagctg	acagtggccc	cagggttagg	tctcagcccc	agtcgtcttc	cggttggtga	3720
gcccacagag	gcttgggtga	gcttcccaaa	tctgggaact	catcaccaaa	caacttaatt	3780
aaggctgaac	ttcaagctgc	ctgtgaacct	ggttagacaaa	gccccctgtc	aaaggggcag	3840
ccagcttaag	gcagtgggga	cggtctgtgt	ggcggtggac	gggtgagatg	gacaacaggga	3900
ccgaggtgtg	ctgggtgagc	gggtgagatg	acaaacaggac	cgaggtgtgt	cggtgcatgt	3960
gggagatgga	caacaggacc	gaggtctgtc	gggaacagca	tgtaactcac	gcacgccaat	4020
gggtgtgtgt	ggaggtctgt	gagcagacag	actgggtctg	gctgggtgtg	aaaggacgggc	4080
agatg						4085

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

<400> 6
 cgggttcccca cttccccagt tt 22

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

<400> 7
 cgggaagtcca caaccctcac caaaggccaa ggt 33

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

```

<213> Homo sapien
<400> 8
atatggtacc 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
acaggtacc ctagagtcga cct      23

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 11
atataagctt gctcccatcc tcca      24

```

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polynukleotid, obsahující regulační sekvenci H19 funkčně spojenou s heterologní sekvencí, 10
jež kóduje cytotoxický genový produkt, pro použití pro expresi heterologní sekvence v nádorové buňce.
2. Polynukleotid podle nároku 1, kde H19 regulační sekvence je zvolena ze skupiny H19 15
promotor, H19 enhancer, nebo H19 promotor i H19 enhancer.
3. Polynukleotid podle nároku 1, kde heterologní sekvence je vybrána ze skupiny sestávající 20
z kódujících sekvencí pro β -galaktosidasu, difterický toxin, toxin *Pseudomonas*, ricin, cholerový toxin, gen retinoblastomu, p53, thymidinkinázu viru herpes simplex, thymidinkinázu viru vari-
cella zoster, cytosindeaminasu, nitroreduktasu, cytochrom p-450 2B1, thymidinfosforylasu, 25
purinnukleosidfosforylasu, alkalickou fosfatasu, karboxypeptidasu A a G2, linamarasu, β -laktama-
masu a xanthinoxidasu.
4. Polynukleotid podle nároku 1, kde heterologní sekvence je antisense sekvence, jež specificky 25
hybridizuje k sekvenci kódující gen vybraný ze skupiny zahrnující cdk2, cdk8, cdk21, cdc25A, cyklinD1, cyclinD1, cyclinE, cyclinA, cdk4, onkogenní formy p53, c-fos, c-jun, Kr-ras a Her2/neu.
5. Polynukleotid podle nároku 1, kde heterologní sekvence kóduje ribozym, který specificky 30
štěpí RNA kódovanou genem vybraným ze skupiny zahrnující cdk2, cdk8, cdk21, cdc25A, cyklinD1, cyclinE, cyclinA, cdk4, onkogenní formy p53, c-fos, c-jun, Kr-ras a Her2/neu.

6. Polynukleotid podle nároku 2, kde H19 promotor zahrnuje nukleotidy 1 až 830 sekvence SEQ ID NO:1.
7. Polynukleotid podle nároku 2, kde H19 promotor zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:2.
8. Polynukleotid podle nároku 2, kde H19 enhancer zahrnuje sekvenci H19 enhanceru klonovaného v plazmidu pH19EH19 uloženém pod č. 209322 a ATCC.
9. Polynukleotid podle nároku 2, kde H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:3.
10. Polynukleotid podle nároku 2, kde H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:4.
11. Polynukleotid podle nároku 2, kde H19 enhancer zahrnuje sekvenci SEQ ID NO:5.
12. Polynukleotid podle nároku 2, kde umístění H19 enhanceru je 3' vzhledem k heterologní sekvenci.
13. Vektor pro expresi sekvence v nádorové buňce, kde vektor obsahuje polynukleotid, podle nároku 1.
14. Vektor podle nároku 13, 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, cholery toxin, gen retinoblastomu, p53, thymidinkinázu viru herpes simplex, thymidinkinázu viru varicella zoster, cytosindeaminasu, nitroreduktasu, cytochrom p-450 2B1, thymidinofosforylasu, purinnukleosidfosforylasu, alkalickou fosfatasu, karboxypeptidasu A a G2, linamarasu, β -laktamasu a xanthinoxidasu.
15. Hostitelská buňka obsahující vektor podle nároku 14.
16. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a jako účinnou složku polynukleotid podle některého z nároků 1 až 12.
17. Farmaceutický prostředek podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že cytotoxický genový produkt je vybrán ze skupiny zahrnující difterický toxin, toxin *Pseudomonas*, ricin, cholery toxin, gen retinoblastomu a p53.
18. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a jako účinnou složku vektor podle nároku 13 nebo 14.
19. Použití polynukleotidu podle některého z nároků 1 až 12 pro výrobu farmaceutického prostředku pro expresi sekvence v rakovinné buňce.
20. Použití vektoru podle některého z nároků 13 a 14 pro výrobu farmaceutického prostředku pro expresi sekvence v rakovinné buňce.
21. Použití podle některého z nároku 19 nebo 20, kde nádorová buňka je v pacientovi.
22. Použití podle některého z nároku 19 nebo 20, kde 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, astromyom, ganglioblastom aneuroblastom.

23. Použití podle nároku 22, kde nádorová buňka je buňka nádoru močového měchýře.

24. Použití podle nároku 23, kde buňka nádoru močového měchýře je vybrána ze skupiny sestávající z Ht-1376, EJ28, T24P, 1197 a Um-UC-3.

5

15 výkresů

10

1 CTGCAGGGCCCCAACAACCTCACCAAAGGCCAAGGTGGTGACCGACGGACCCACAGCGG 60
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACGTCCCGGGGTGTTGGGAGTGGTTTCCGGTTCACCACTGGCTGCCTGGGTGTGCGC
 |
 -837

61 GGTGGCTGGGGGAGTCGAACTCGCCAGTCTCCACTCCACTCCCAACCGTGGTGCCCCAC 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCACCGACCCCTCAGCTTTGAGCGGTGAGAGGTGAGGTGAGGGTTGGCACCACGGGGTG

121 GCGGGCTGGGAGAGTCTGTGAGGCGGCCACCGCTTGTGAGTAGAGTGCGCCCGGAGC 180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGCCCGGACCTCTCAGACACTCCGGCGGGTGGCGAACAGTCATCTACGCGGGCGCTCG

181 CGTAAGCACAGCCCGCAACATGCGGTCTTCAGACAGGAAAGTGGCCGCGAATGGGACCG 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCATTCTGTGCGGGCCGTTGTACGCCAGAAGTCTGTCTTTACCGGCGCTTACCCTGGC

Obr. 1A

241 GGGTGGCCAGCGGCTGTGGGACTCTGTCTGCGGAAACCGCGGTGACGAGCACAAGCTC 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCACGGGTGCGCGACACCCCTGAGACAGGACGCCCTTGGCGCCA CTGCTCGTGTTCGAG

301 GGTCAACTGGATGGGAATCGGCCTGGGGGGCTGGCACCGCGCCCAACAGGGGTTTGCGG 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAGTTGACCTACCTTAGCGGACCCCCGACCGTGGCGGGGTGGTCCCCCAAACGCC

361 CACTTCCCTCTGCCCCCAGCACCCCACTACTCTCCAGGAACGTGAGGTCTGAGCCG 420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGAAGGGGAGACGGGGAGTCTGCGGGTGGGGATGAGAGGTCTTGCACTCCAGACTCGGC

421 TGATGGTGGCAGGAAGGGGCCCTCTGTGCCATCCGAGTCCCCAGGGACCCGCAGCTGGCC 480
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTACCAACCGTCCTTCCCCGGGAGACACGGTAGGCTCAGGGGTCCCTGGGCGTCGACCGG

481 CCCAGCCATGTGCAAAATATGTGCAGGGCGCTGGCAGGCAGGGAGCAGCAGGCATGGTGT 540
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGGTGGGTACACGTTTCATACACGTCCCGCGACCGTCCGTCCCTCGTCGTCCGTACCACA

541 CCCCTGAGGGGAGACAGTGGTCTGGGAGGGAGAGGTCTGGACCCCTGAGGGAGGTGATGG 600
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGGGACTCCCCCTCTGTCAACAGACCCCTCCCTCTCCAGGACCTGGGACTCCCTCCACTACC

Obr. 1B

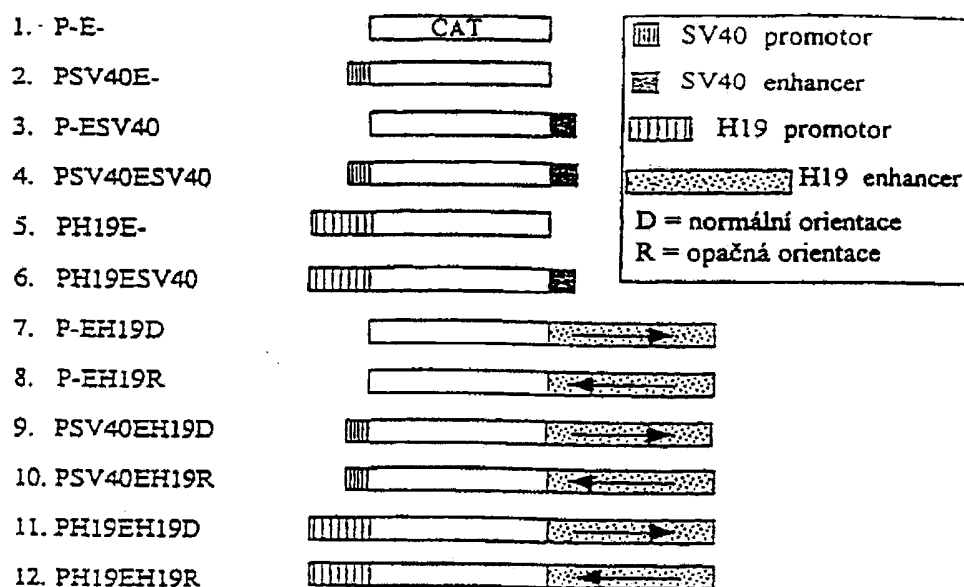
601 GGCAATGCTCAGCCCTGTCTCCGGATGCCAAAGGAGGGGTGCGGGGAGGCCGTCTTTGGA 660
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGTTACGAGTCGGGACAGAGGCCCTACGGTTTCTCTCCACGCCCCCTCCGGCAGAAACCT

661 GAATTCCAGGATGGGTGCTGGGTGAGAGAGACGTGTGCTGGAACTGTCCAGGGCGGAGGT 720
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTAAGGTCTTACCCACGACCCACTCTCTGCAACGACCTTGACAGGTCCCGCCTCCA

721 GGGCCCTGCGGGGGCCCTCGGGAGGGCCCTGCTCTGATTGGCCGGCAGGGCAGGGGCGGG 780
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGGACGCCCCCGGGAGCCCTCCCGGGACGAGACTAACCGGCCGTCCCGTCCCCGCCC

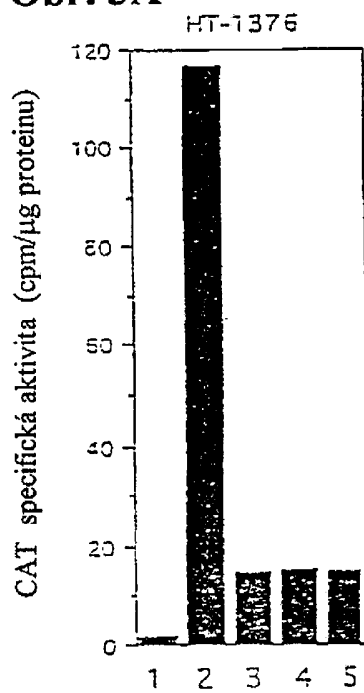
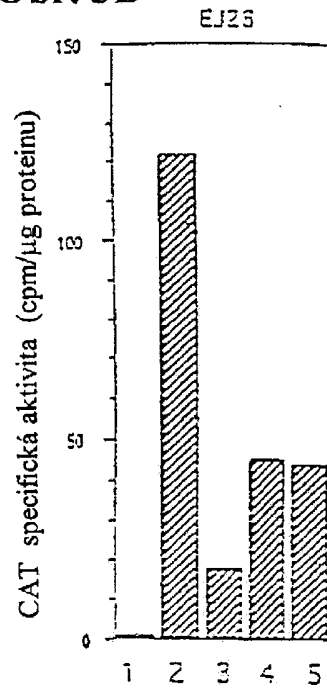
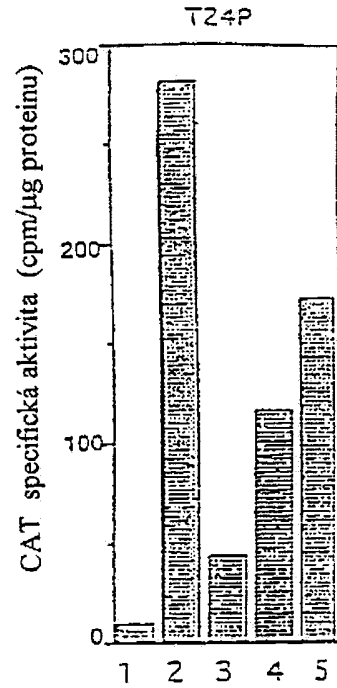
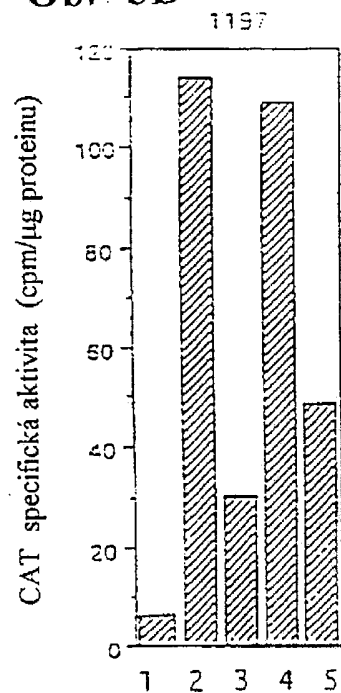
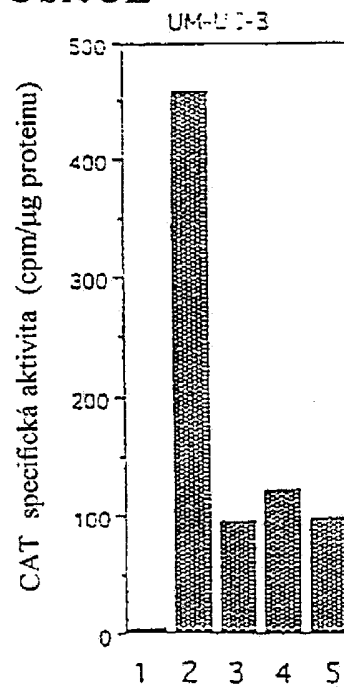
781 AATTCTGGCGGGCCACCCAGTTAGAAAAAGCCCGGGCTAGGACCGAGGA 830
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTAAGACCGCCCGGTGGGGTCAATCTTTTCGGGCCCCGATCCTGGCTCCT
 | | |
 -35 -27 -7

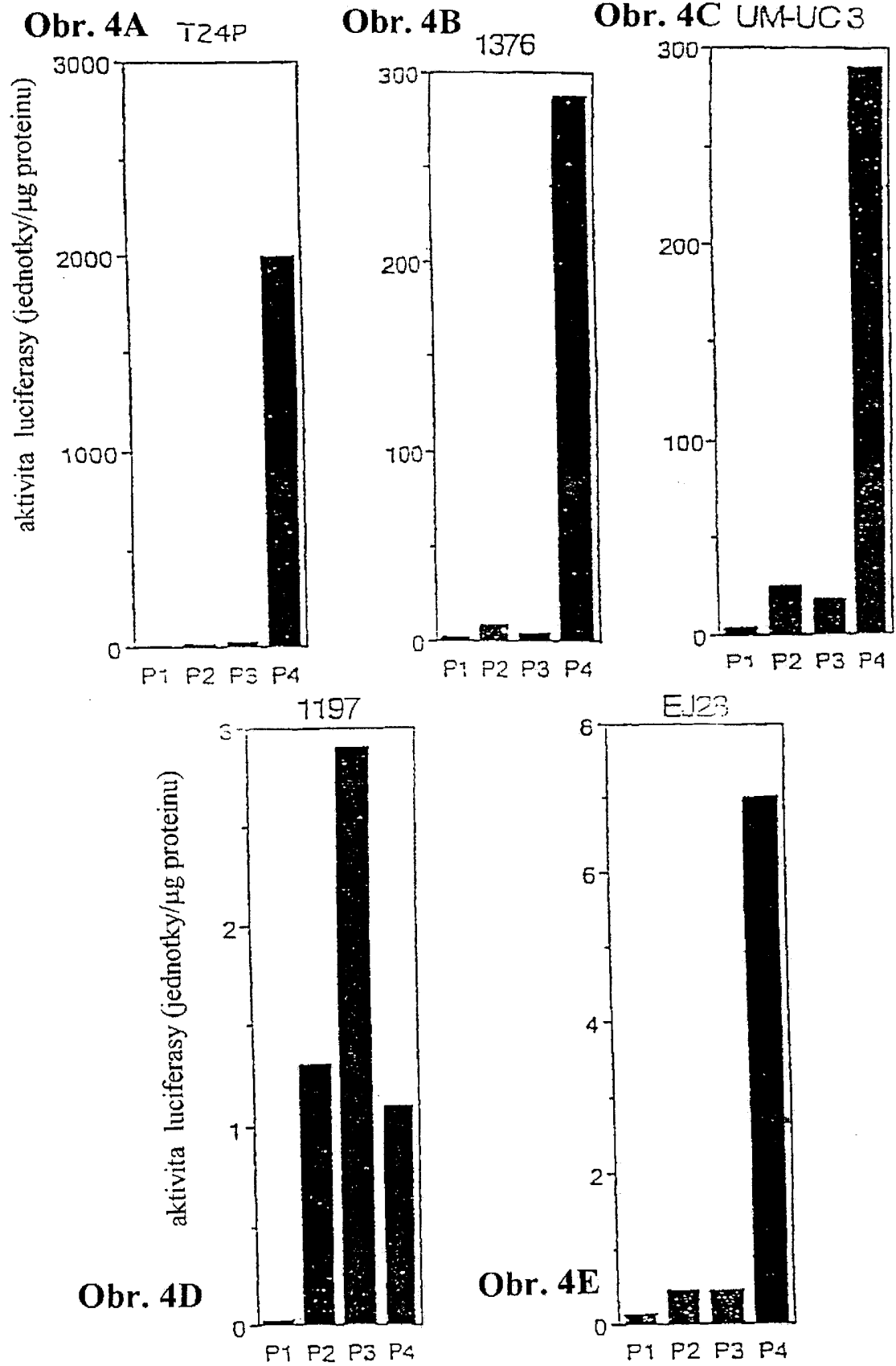
Obr. 1C



Schematické znázornění plasmidů obsahujících různé promotory a enhancery

Obr. 2

Obr. 3A**Obr. 3B****Obr. 3C****Obr. 3D****Obr. 3E**



1 GACAACCCCTC ACCAAGGGCC AAGGTGGTGA CCGACGGACC CACAGCGGGG
51 TGGCTGGGGG AGTCGAAACT CGCCAGTCTC CACTCCACTC CCAACCGTGG
101 TGCCCCACGC GGGCCTGGGA GAGTCTGTGA GGCCGCCAC CGCTTGTCAG
151 TAGAGTECGC CCGGAGCCG TAAGCACAGC CCGCAACAT GCGGTCTTCA
201 GACAGGAAAG TGGCCGCGAA TGGGACCGGG GTGCCAGCG GCTGTGGGA
251 CTCTGTCCTG CGGAAACCGC GGTGACGAGC ACAAGCTCGG TCAACTGGAT
301 GGGAAATCGG CTGGGGGGCT GGCACCGCGC CCACCAGGGG GTTTGCGGCA
351 CTTCCCTCTG CCCCTCAGCA CCCACCCCT ACTCTCCAGG AACGTGAGTT
401 CTGAGCCGTG ATGGTGGCAG GAAGGGGCGC TCTGTGCCAT CCGAGTCCCC
451 AGGGACCGGC AGCTGGCCCC CAGCCATGTG CAAAGTATGT GCAGGGCGCT
501 GGCAGGCAGG GAGCAGCAGG CATGGTGTCC CCTGAGGGGA GACAGTGSTC
551 TGGGAGGGA GAGTCTCTGG CCTGAGGAG GTGATGGGGC AATGCTCAGC
601 CCTGTCTCCG GATGCCAAAG GAGGGGTGG GGGAGGCCGT CTTGGAGAA
651 TTCCAGGATG GGTGCTGGGT GAGAGAGACG TGTGCTEGAA CTGTCCAGGG
701 CGGAGGTGGG CCTGCGGGG GCCCTCGGA GGGCCCTGCT CTGATTGGCC
751 GGCAGGGCAG GGGCGGGAAT TCTGGCGGG GCCACCCAG TTAGAAAAAG
801 CCGGGCTAG GACCGAGGAG CAGGGTGAGG GAG

Obr. 5

1 CAAGGACATG GAATTTTCGGA CCTTCTGTCC CCACCCTCTC TGCTGAGCCT
 51 AGGAACCTCT GAGCAGCAGG AAGGCCTTGG GTCTAGAGCC TAGAAATGGA
 101 CCCCCACGTC CACCTGCCCA 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 CTGCCAGCC CTGACCTTCC CAGCCCTGCC CAGCCCAGCT
 401 CATCCCTGCC CTACCCAGCT CAGCCCTGCC CTGCCCTGCC CTGCCCTGCC
 451 CAGCCCTACC CAGCCCAGCC CTGCCCTGCC CTGCCAGCT CAGCCCTGCC
 501 CACCCCAGCC CAGCCCAGCC CAGCATGCTT TCTCTGGATG GTGAGCAGAG
 551 GCTTGACCTT AGAAAGAGGC TGGCAAGCAG GCTGAGGCC ACCAGGCCAC
 601 TGGGTGCTCA CGGGTCAGAC AAGCCCAGAG CCTGCTCCCC TGCCACGGGT
 651 CGGGGCTGTC ACCGCCAGCA TGCTGTGGAT GTGCATGCCC TCAGGGCTGC
 701 TGGCTCCAGG CTGCCCCCGC CCTGGCTCCC GAGGCCACCC CTCTTATGCC
 751 ATGAACCCCTG TGCCACACCC ACCTCTGAGC TGTCCCCGCT CCTGCCGCCT
 801 GCACCCCTG AGCAGCCCCC TGTGTGTTTC ATGGGAGTCT TAGCAAGGAA
 851 GGGGAGCTCG AATTCCTGCA GCCCCGGG

Obr. 6

1 CCGGGTACCG AGCTCCAGG AAGATAAATG ATTTCTCTCT CTCTAGAGAT
 51 GGGGTTGGGA TCTGAGCACT CAGAGCCAAG GGCGCAGTGG GTCCGGGGCG
 101 GGGCCCTCCT CGGCCCTCCC AACATGGGG CCAGGAGGTC AGCCCCCAA
 151 CCTGACCCCC GCGTGGTCT CAGGGAATGG TCTCCCCAG TGGCCAGCT
 201 TGCTTGTTT TTCAGATGGG TGTGCATGG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
 251 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGATGCT GACAAGCCCC AGAGAGCCAA
 301 AGACCTGAGT GGAGATCTTG TGACTTCTCA AAAGGGGGAT TGGAAAGTTC
 351 GAGAAAGAGC TGTGGTCAEC CTTGCTCTCC CTTAAGGCTG TGGTAACCAC
 401 ACTAGGCATA GCATAGGCTT GCGCCCCGTC CCTCCTTCCC TCCTCCGCGC
 451 CTCTCCTTTC TCTTTCTCC CCTCTACCG CGCTCCCTGG CCTGCTCTG
 501 GTGACACCGT TGGCCCCCTT CCAGGGGTGA GGGAAAGCCAG CGGGGGCCCC
 551 TTCCTGAAAG GCGACCTGCA GGGCGGCTTG GTGGGAAGGG GCTGCTCTAG
 601 CAGAGGCTCC CGCCCGCCTT GCAGCCGTTT CCTGgAAGCA GTGCTGTGG
 651 GTATTCTGTT CCTTGTCAC ACTGTGCTTG CAAAgAAAGC AgACACTGTG
 701 CTCCTTGCTC TTAGGGAGGC CGGCTCCATC ACCCAACACC TGGCTGGACA
 751 CAGCGCGGAG GCGGGGTCCG CGGGGAgCGG CGCGGGGCTG GGGCCGACC
 801 ATTAAACACA CACGGGCGCC AGGCACTGCA GGCTCCTCCT CCTCCTCCTG
 851 CCCAGCGCCT CTGCTCACAG GCACGTGCCA AgCCCCTAGG CCAGgAgGCC
 901 AgCAgTGGGT GCAGAACAAg CTCCTGGGAA GGGGGTGCAg GgGGACCCC
 951 CCGGGAgAAG GGCTGECAGG GCTGTGGGgG ACGCTGACCG TGGGCCCCAC

Obr. 7A

1001 GTTGCAGAAA ACTGGNTGCC TG₃CTGGAAG ATGGGGGAGA TGCCAAGCCT
 1051 CTGAGGCAGC ACGAgCAGGG TGCATGGAGG CCGGGGCCCG GGGAGGCTGC
 1101 ACTGCAGCAT GCACCCCAA GCCCANAGGG AGTGGAgACC AGGCCCTGGA
 1151 ATC₅AGAAGT AgAAAGGCGG CTTGGAGGCC TCGGAACCGG CTGACCTCCA
 1201 ACAGAgTGGG TCTCCAGCCT GgcTCTGCCC TGCCGCAGGT CCCCTCCCcT
 1251 CATTACCAGG CCTAGAGCCT CCAGTCCCGG TGGCCCCCAG CCcGAGGGTG
 1301 AACGGCCTCA CCCTGGGTcG TGGACAGAG GGCACGTTCA TCAAGAGTGG
 1351 CTCCCAAGGG ACAcGTGGCT GTTTGCAGTT CACAGGAAGC ATTcGAGATA
 1401 AGGAGcTTGT TTTCCAGTG GGCACGGAGC CAGCAGGGGG GCTGTGGGGC
 1451 AGCCCAGGGT GCAAGGcCAG GcTGTGGGGC TGCAGcTGc TTGGGCCCCA
 1501 CTCCCAGGCC TTTGCGGGAG GTGGGAGGCG gGAGGCGGCA GCTGCACAGT
 1551 GGCCCCAGGC G-₃GCTCTCA GCCCCA₃TGG CTCTCCGGGT GGCCAGCCCA
 1601 AGAGGGTCTG GCTGAGCCTC CCACATCTGG GACTCCATCA CCCAACA₂ACT
 1651 TAATTAAGGC TGAATTTTCA₂ GTGTCTGTG ACTTGGGTAG ACAAAGCCCC
 1701 TGTCCAAAGG GGCAGCCAGC CTAAGGCAGT GGGGACGGCG TGGGTGGCGG
 1751 GCGACGGGGG AGATGGACAA CAGGACCGAG GGTGTCCGGG CGATGGGGGA
 1801 GATGGACAAC AGGACCGAGG GTGTGCGGGC GATGGGGGAG ATGGACAACA
 1851 GGACCGAGGG TGTGCGGGAC ACGCATGTCA CTCATGCACG CCAATGGGGG
 1901 GCGTGGGAGG CTGGGSAGCA GACAGACTGG GCTGGGCTGG GCGGGAAGGA
 1951 CGGGCAGATG

Obr. 7B

1 CCGGGTACCG AGCTCCCAGG AAGATAAATG ATTTCTCTCT CTCTAGAGAT
 51 GGGGGTGGGA TCTGAGCACT CAGAGCCAAG GCGCAGTGG GTCCGGGCGG
 101 GGGCCCTCCT CGGCCCTCCC AACATGGGGG CCAGGAGGTC AGCCCTCAA
 151 CCTGGACCCC GGCTGGGTCT CAGGGAATGG TCTCCCCAG TGGCCAGCT
 201 TGCTTGTGTT TTCAGATGGG TGTGCATGGG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
 251 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGATGCCT GACAAGCCCC AGAGAGCCAA
 301 AGACCTGAGT GGAgATCTTG TGA~~CTT~~CTCA AAAGGGGGAT TGGAAGGTTT
 351 GAGAAAGAGC TGTGGTCAGC CTTGCTCTCC CTTAAGGCTG TGGTAACCAC
 401 ACTAGGCATA GCATAGGCCT GCGCCCCGTC CCTCCTTCCC TCCTCCGCGC
 451 CTCTCCTTTC TCTTCTCCC CCTCTACCC CGCTCCCTGG CCTGCTCCTG
 501 GTGACACCGT TGGCCCCCTT CCAGGGCTGA GGAAGCCAG CGGGGGCCCC
 551 TTCCTGAAAG CCCACCTGCA GGCCGGCTTG CTGGGAAGGG GCTGCTCTCG
 601 CA~~g~~AGGCTCC CGCCCGCCT GCAGCGG~~TT~~ CTG~~g~~AAGCA GTCGCTGTGG
 651 GTATTCTGTT CTTGTGAGC ACTGTGCTTG CAAAgAAAGC AgACACTGTG
 701 CTCCTTGTCC TTAGGGAGCC CCGCTCCATC ACCCAACACC TGGCTGGACA
 751 CAGGCGGGAG GCGGGTCCG CGGGGAgCGG CGCGGGCTG GGGCCGACC
 801 ATTAAACACA CACGGGGGCC AGGCACTGCA GGCTCCTCCT CCTCCTCCTG
 851 CCCAGCGCCT CTGCTCAGAG GCACGTGCCA AgCCCCTAGG CCAGgAgGCC
 901 AgCAgTGGGT GCAGAACAAg CTCCTGGGAA GGGGGTGCAg GGcGGACCCC
 951 CGGGGAgAAG GGCTGGCAGG GCTGTGGGGG ACGCTGACCG TGGGCCCCAC
 1001 GTTGCAgAAA ACTGGNTGCC TGgCTGGAAg ATGGGGGAGA TGCCAAGCCT
 1051 CTGAGGCAGC ACGAgCAGGG TGCATGGAGG CCGGGGCGCG GGGAGGCTGC
 1101 ACTGCAGCAT GCACCCCAA GCCCANAGGG AGTGGAgACC AGGCCCTGGA
 1151 ATCgAGAAGT AgAAAGGCGG CTGGAGGCC TCGGAACCGG CTGACCTCCA
 1201 ACAGAgTGGG GCCGGCCCTG GAGGCAAAGA GGTGCCCGGG GTCCGGCCCT
 1251 GCCTGGGGGA GCTATGTGTC ATGGGCAAGC CACAGGATAT GTagCCCGCT
 1301 CTGagCCTAT GGACCCagGG CAGGGCTGCA AGGCAGGGCA GGGGAGACAG
 1351 CACGGGGGAG CAAGGAGCAG AGAGGGGGCC TCAGGCTCTC CCAGGAGGAA
 1401 CATTCTCCCG ACAGGAGGAA GAGACGGCCC AGGGGTGACT GTGGGGAGCC
 1451 ATGGTEGCAG CTGGGGTCGT GGCAGATGGG AGAGAGGCTG GCGAGGTGAA
 1501 GGTGCAGGGG TCAGGGCTCT GGGGCCCA CA TGCTGTGGG AGCAGGCAGG

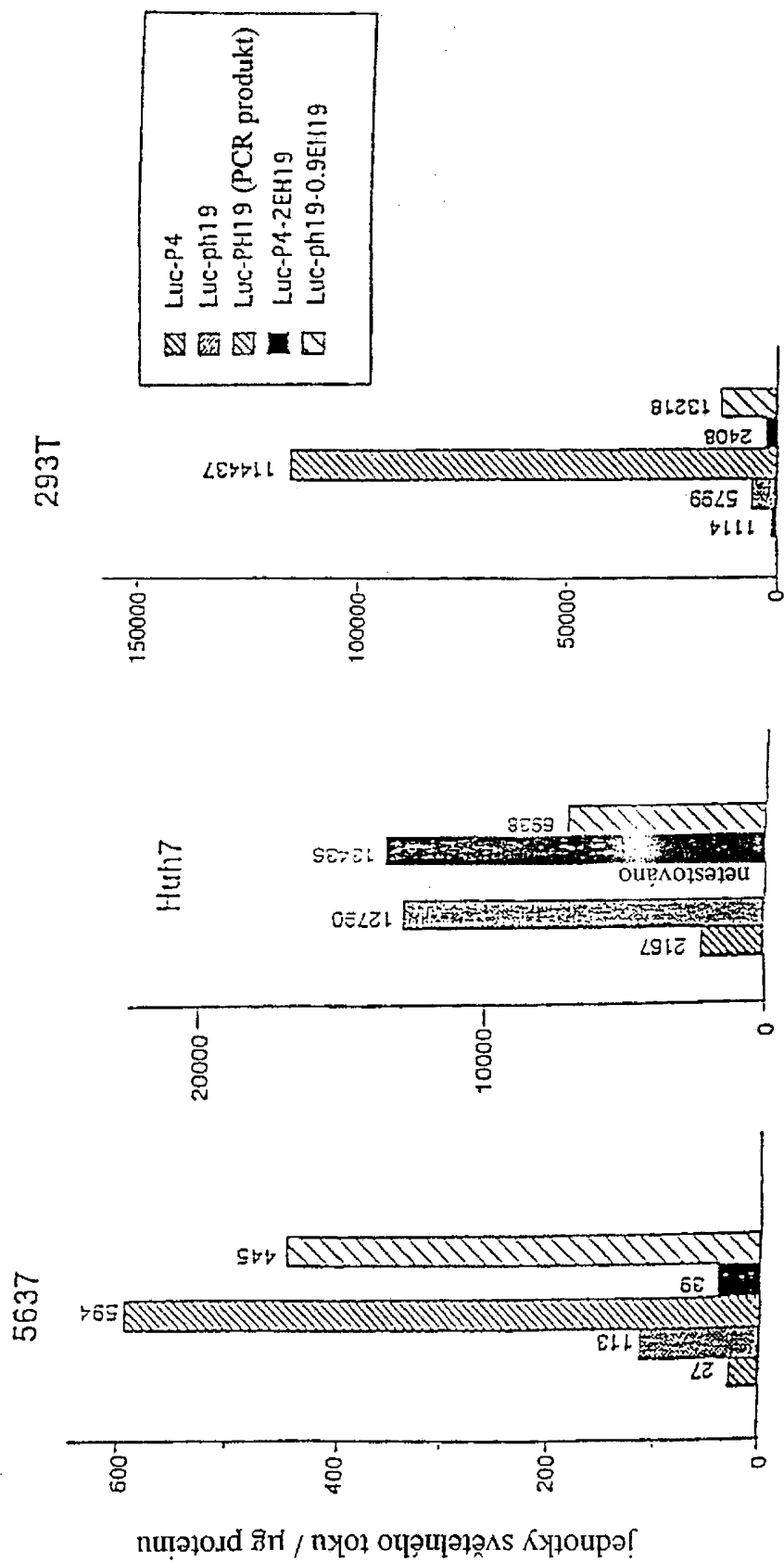
Obr. 8A

1551 CCCAGGGCTC TCCGCCACTC CCCACTCCCG CTTGGCTCAT AGGCTGGGCC
 1601 CAAGGGTGGG GTGGGATGAG CAGGAGATGG GGGCCAGGGG GCAAGCAGGG
 1651 CCCCAAAGAC ATTTAGAAAA ACCGGTTTAT GCAGGCAGCA TTCAGAGCAG
 1701 GCGGCGTGCG TGGCGGGGGC CTTGGGAGCA CAGAGAGGCA CACGTAGGGC
 1751 CCCCAGGGGG CTCCCCATTG GCGGCAGTG ACATCACCCC TGTGTCAACA
 1801 GTGATGTCTG CAGCTCCGGC CAGCCAGGGT TTATGGAGCG AGACCCAGCC
 1851 CGGCCTGGGC CCTCACTCCC CAGGCCACCA CACTAGCCCA CTGTTCAAGG
 1901 TCCGGGGTGG CGGCATGCC TGGGGGTCTT GGCACCGCTG CTCCTCTGCC
 1951 CACCCTAACT TCCCGGCATG GCGGCTGCCC CCTCTGAGCG TCCCCAACCA
 2001 GTAAGTGTGG GGGCCAGCAG gCCTGCcGTC CTCcTCcTCT TCCCCTcTAG
 2051 AGAGAAACGT GGAGGTCTTG GGGCTGGGGG CGCTCATAGC CcTGTGACAC
 2101 AGGTGCATGG GGTCAAGGGT CCCAGAATGG CCCCTGGGAA GGACCTCAGC
 2151 TGGGCGGGCG GCTcTAGGCT TCAGGGGTCT GTCTGCACAG GGGNTAGCCC
 2201 CTCCCAGACC TCTGTGAAGC CAGTACGGGC CTCCCCTCCC TGCCCCGTGC
 2251 TCTGTCCGGT GCTTCTGGA CTGCACTGCG GGCCACTGCT GAGAGGGTGG
 2301 ACAGGGAAGG GCGGCGGTGG TGCTGTTCG TCCCCACCTG GCTGTGTGGT
 2351 CCCCTCCAAG TAGGGACAAC CCTTCTGAGG GCTTGGGGGC ACCCTGGGGT
 2401 TGCCAGGGCC TCCAGAGCC CTGTGAGCCC CTGGGGGGTC TGGCCTGATG
 2451 CCCCCCTCCA CGTCCAGGGC CGGCTGTGGC CCAGAACCCC AGCTTCCCAG
 2501 CAGGCCGGTG TCGGTGGTG ACCCAGGAGA GGCCTCGCCT CCACTGAGGG
 2551 GCCACCGACC TCTGTGAGC CACAGAGACC CCAAGGAgt cTGAAGGCTG
 2601 GAGACCCGGG GCTGGGACCA GGTGGGAcTT TCCCACGGAG CCGTCCCCAG
 2651 GCCCAGCTGG GGACAcGTCC CCcTTcTcTC CAGACACACC CTGCcTGCCA
 2701 CCAGGACACA CCGGCCTGTT GGGGGTcTcT TTTAAGTGCT TGCCACTCTG
 2751 AGGTGAcTGT CCCTTTCCAA AGAGGTTTcT GGGGGCCAGG TGGGAcGCGT
 2801 CGGCCTGAGC AGGAGGATcT GGGCCGCCAG GGGCTGGGGA CTGTcTCCTG
 2851 GGGAAAGGAAG CGCCTGGGAG CGTGTGTGCT GACCCAGGAC CATCCAGGGA
 2901 GGCCCGTcTG TGGGGCAAGC GGAAGGGAG CGGCTGGAGA GGCTTGGCCG
 2951 CCCCCGCCCT GCCTCCcATT CCTTAGcTCC ATGCCTGTCA ACCTcGTCA

Obr. 8B

3001 CCCAGTGAGT GATGTCCAGG GGCCTGGAA AGGTACAGC ATGTTTGAGC
 3051 GGGGTGAGAG AGAGGGGAAA GGCGGGGGCG 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 AGCCTGgCtC
 3351 TGCCCTGCCG CAGGTCCCT CCCcTCATTA CCAGGCCTAG AGCCTCCAGT
 3401 CCCGGTGGCC CCCAGCCcGA GGGTGAACGG CCTCACCTG 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 GCCTCCACAC
 3751 TCTGGGACTC CATCACCCAA CAACTTAATT AAGGCTGAAT TTCACGTGTC
 3801 CTGTGACTTG GGTAGACAAA GCCCCTGTCC AAAGGGGCAG CCAGCCTAAG
 3851 GCAGTGGGGA CGGCGTGGGT GGCGGGCGAC GGGGGAGATG GACAACAGGA
 3901 CCGAGGGTGT GCGGGCGATG GGGGAGATGG ACAACAGGAC CGAGGGTGTG
 3951 CCGGCGATGG GGGAGATGGA CAACAGGACC GAGGGTGTGC GGGACACGCA
 4001 TGTCACCTCAT GCACGCCAAT GGGGGGCGTG GGAGGCTGGG GAGCAGACAG
 4051 ACTGGGCTGG GCTGGGCGGG AAGGACGGGC AGATG

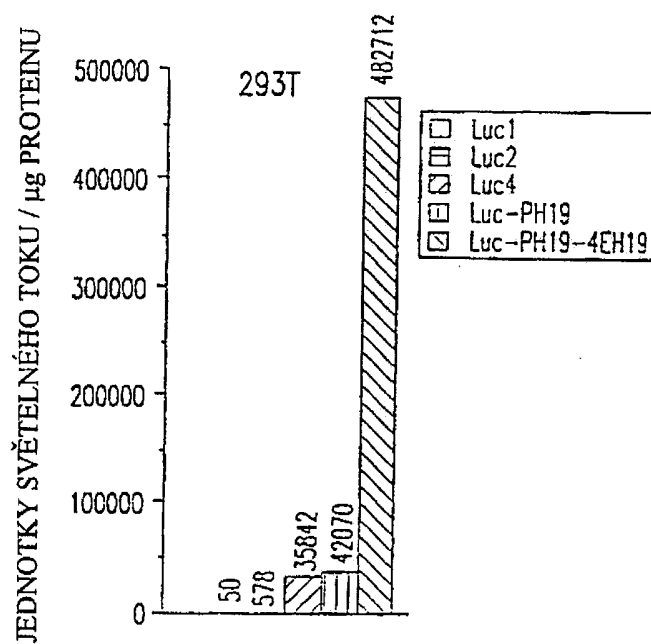
Obr. 8C



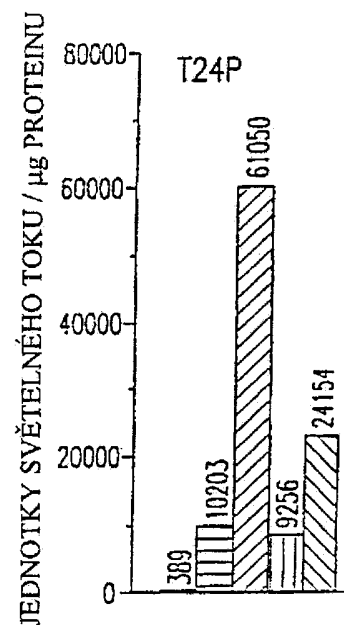
Obr. 9C

Obr. 9B

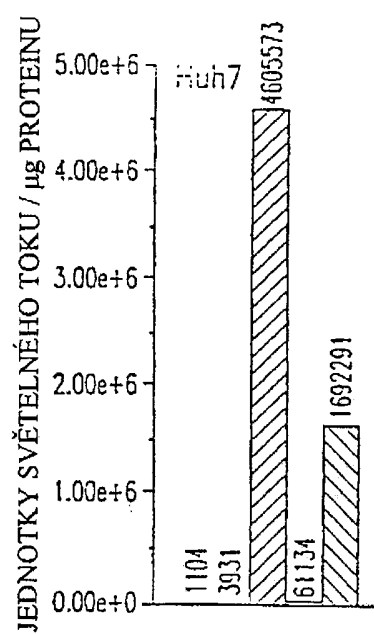
Obr. 9A



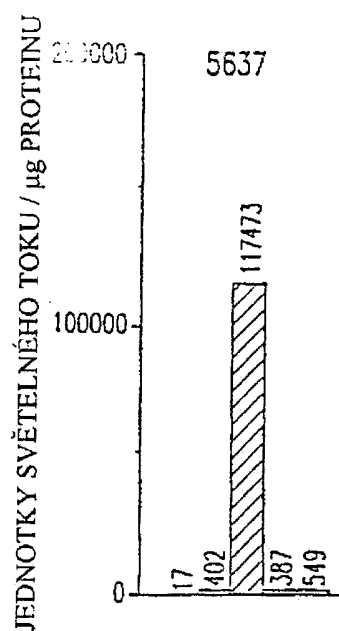
Obr. 10A



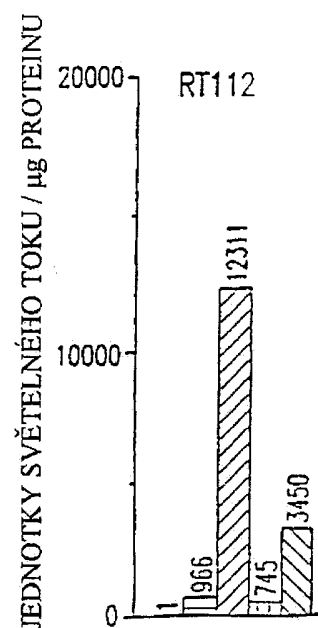
Obr. 10B



Obr. 10C



Obr. 10D



Obr. 10E

Konec dokumentu
