

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 142

(13) Druh dokumentu: **A3**

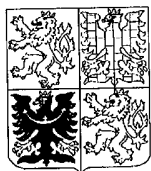
(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/12

A 61 K 48/00

A 61 K 38/17

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.07.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.07.1998 12.09.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9814989 1998/9819826**

(33) Země priority: **GB GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.06.2001**
(Věstník č. 6/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/GB99/02199**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/03014**

(71) Přihlašovatel:

GLAXO GROUP LIMITED, Greenford, GB;

(72) Původce:

Braddock Martin, Stevenage, GB;

Campbell Callum Jeffrey, Stevenage, GB;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Použití molekuly nukleové kyseliny

(57) Anotace:

Řešení se týká použití polypeptidu NAB1 nebo NAB2, nebo jeho biologicky účinného fragmentu, a molekul nukleové kyseliny kódujících tyto polypeptidy, zvláště při genové terapii, při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení poruch buněčné proliferace souvisejících s hojením poranění u savců včetně člověka.

Použití molekuly nukleové kyseliny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká použití technik genové terapie při
léčení poranění. Zvláště se týká nového použití polynukleotidů
5 kódujících transkripční represorové proteiny NAB1 nebo NAB2 při
oslabující regulaci (down-regulation) poruch buněčné proliferace, které
zpomalují hojení kůže, pro prevenci tvorby hypertrofických a keloidních
jizev, lupénky, inhibici restenózy po perkutánní transluminální
koronární angioplastice, modulaci kalcifikace cévní stěny a inhibici
10 buněčné proliferace při rakovině.

Dosavadní stav techniky

Hojení kůže zahrnuje širokou řadu buněčných, molekulárních,
fyziologických a biochemických dějů. V průběhu procesu hojení migrují
15 buňky do míst poranění, kde proliferují a syntetizují složky
extracelulární matrice s cílem rekonstituovat tkáň, která je blízce
podobná neporaněné původní tkáni. Tento proces je řízen mediátory
sekrenovanými z buněk na okrajích poranění, jako je růstový faktor
odvozený z destiček (platelet derived growth factor, PDGF),
20 epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF),
transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta,
TGF beta) a jiné cytokiny. Prospěšné účinky těchto látek na buňky byly
ukázány jak *in vitro*, tak i *in vivo* (shrnutí je provedeno v Moulin, Eur. J.
Cell Biol. 68; 1 - 7, 1995), včetně prospěšných účinků podávání PDGF
25 v krysích modelech diabetu (Brown a další, J. Surg. Res. 56; 562 -
570, 1994).

V průběhu posledních pěti let bylo ukázáno, že četné růstové
faktory urychlují proliferaci buněk *in vitro* a napomáhají hojení

poranění na zvířecích modelech. Největší pozornost v souvislosti s opravou poranění, diferenciací a produkcí matrice byla věnována faktoru TGF beta. Faktor TGF beta podávaný buď místně nebo systémově urychluje ve zvířecích modelech rychlost reparace kožních poranění (Ashcroft a další, *Nature Medicine*, 3; 1209 - 1215, 1997; Sporn a Roberts, *J. Cell Biol.*, 119; 1017 - 1021, 1997; Beck a další, *J. Clin. Invest.* 92; 2841 - 2849, 1993). Podobně se uvádí, že faktor PDGF podporuje reepitelializaci a revaskularizaci ischemické tkáně a zvířat s diabetem (Uhl a další, *Langenbecks Archiv für Chirurgie-Supplement-Kongressband* 114; 705 - 708, 1997, shrnuto v Dirks a Bloemers, *Mol. Biol. Reports* 22; 1 - 24, 1996).

Transkripční faktor Egr-1 (early growth response gene) je potenciální regulátor více než třiceti genů a má úlohu při proliferaci buněk, jejich vývoji a diferenciaci (přehledné zpracování v Liu a další, *Crit. Rev. Oncogenesis* 7; 101 - 125, 1996; Khachigian a Collins, *Circ. Res.* 81; 457 - 461, 1997). Egr-1 je indukován po poranění do vaskulárního endothelia (například Khachigian a další, *Science*; 271, 1427 - 1431, 1996) a zaměřuje se na aktivaci transkripce početných genů včetně EGF, růstového faktoru A odvozeného z destiček (PDGF-A), růstového faktoru bazálních fibroblastů (basic fibroblast growth factor, bFGF), indukci PDGF-A, růstového faktoru B odvozeného z destiček (PDGF-B), TGF beta, bFGF, uro-plasminogenového aktivátoru (u-PA), tkáňového faktoru a růstového faktoru-2 podobného inzulinu (insulin-like growth factor-2, IGF-2). Blokáda faktoru TGF beta indukovatelného Egr-1 může nalézt použití při prevenci tvorby jizev. Protilátky proti TGF beta snižují tvorbu jizev u řezných poranění u hlodavců (Shah a další, *J. Cell Science*; 107, 1137 - 1157; Shah a další, *Lancet*; 339, 213 - 214, 1992).

Transkripční komplex, který zprostředkovává indukci cévního endotheliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor, VEGF), je přímo závislý na AP2 a nikoliv Egr-1 (Gille a další, *EMBO J* 16; 750 - 759, 1997). Faktor PDGF B však vykonává zesilující řízení

exprese VEGF (Finkenzeller, Oncogene 15; 669 - 676, 1997). Transkripce mRNA VEGF je zesilována řadou faktorů včetně PDGF B, bFGF, keratinocytového růstového faktoru (keratinocyte growth factor, KGF), EGF, tumorového nekrozního faktoru (tumour necrosis factor, 5 TNF) alfa a TGF beta1. U zvířecích modelů se ukázalo, že pasivace kovových stentů podporovaná VEGF inhibuje tvorbu neointimy, urychluje reendothelializaci a zvyšuje vazomotorickou aktivitu (Asahara a další, Circulation; 94, 3291 - 3302).

Uvádí se, že k expresi VEGF dochází při hojení poranění a 10 apsoriatické pokožky, což jsou oba případy, při kterých dochází k zesilující regulaci TGF alfa a jeho ligandu EGFr. Exprese EGF indukuje Egr-1 (Iwami a další, Am. J. Physiol. 270; H2100 - 2107, 1996; Fang a další, Calcified Tissue International 57; 450 - 455, 1995; J. Neuroscience Res. 36; 58 - 65, 1993). V současnosti existují 15 neuveřejněné důkazy, že Egr-1 může aktivovat expresi intracelulární adhezní molekuly-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) u B lymfocytů stimulovaných esterem forbolu (Maltzman a další, Mol. Cell. Biol. 16; 2283 - 2294, 1996) a může aktivovat expresi TNF alfa v důsledku přítomnosti vazebného místa Egr-1 v promotoru TNF alfa 20 (Kramer a další, Biochim. Biophys. Acta 1219; 413 - 421, 1994). Nakonec, myši bez Egr-1 jsou neplodné a mají nedostatek luteinizačního hormonu (LH) (Lee a další, 273; 1219 - 1221, 1996), což ukazuje na to, že promotor LH může být také cílem pro aktivaci Egr-1. Cévní kalcifikace je aktivně regulovaný proces podobný tvorbě 25 kostí, který zahrnuje buňky a faktory, o kterých je známo, že jsou důležité při regulaci metabolismu kostí (přehledně zpracováno v Dermer a další, Trends Cardiovasc. Med. 4; 45 - 49, 1994). Regulátory tvorby osteoblastů a/nebo osteoklastů mohou modulovat stupeň kalcifikace cévní stěny. Proteiny skupiny NAB, NAB1 a NAB2 30 (NGFI-A binding corepressors) interagují s konzervovanou doménou R1 *trans*-aktivátorů Egr-1 a Egr-2 (Svaren a další, EMBO J., 17; 6010 - 6019, 1998). Již dříve bylo ukázáno, že NAB2 bude reprimovat

diferenciaci buněk PC12 indukovanou NGF (Qu, Z. a další, J. Cell Biol. 142; 1075 - 1082, 1998) a aktivaci bazálního FGF vyvolanou Egr-1 (Svaren a další, EMBO J., 17; 6010 - 6019, 1998).

Jedním z problémů souvisejících s léčením poranění je tvorba
5 hypertrofických a keloidních jizev. To je extrémně nežádoucí, zvláště
po chirurgických zákrocích z kosmetických důvodů. Fibróza tkáně
(například jak se používá u ledviny, jater nebo kůže) se projevuje
akumulací extracelulární matrice. Neregulovaná tvorba extracelulární
matrice, která podporuje vývoj fibrózy tkáně, je alespoň zčásti řízena
10 v principu celou řadou růstových faktorů, ale neomezených na TGF
beta (Muir Eur. J. Plast. Surg. 21; 1 - 7, 1998), isoformy PDGF (Katou
a další, J. Pathol. 186; 201 - 208, 1998, Heldin a další, v The
molecular and cellular biology of wound repair, Clark, ed.; 249 - 264,
1996 Plenum Press) a VEGF (Jones a další, Frontiers in Bioscience 4;
15 D303 - 309, 1999). Terapie, která by snížila, ale neodstranila expresi
růstových faktorů v místě poranění, by měla významný vliv na hojení
tkáně s redukovánými jizvami a zlepšení kvality života.

Mezinárodní patentová přihláška PCT GB 99/01722 popisuje
použití transkripčního faktoru Egr-1 při podpoře hojení ran. Autoři
20 předkládaného vynálezu nyní zjistili, že podávání polynukleotidu
kódujícího represor transkripce NAB1 nebo NAB2: (a) reprimuje
aktivaci růstových faktorů podmíněnou Egr-1 *in vitro*; (b) reprimuje
bazální hladiny exprese genů růstového faktoru *in vitro*; a (c) v místě
poranění u hlodavců a jeho následné expresi snižuje expresi TGF- β 1,
25 ale ne TGF- β 3, a má použití pro snížení tvorby jizev při hojení
(například Shah a další, J. Cell Science 107; 1137 - 1157, 1994).

Proto zpomaluje oslabující regulace Egr-1 proces hojení a
snižuje výskyt tvorby hypertrofických a keloidních jizev a lupénky.
Oslabující regulace Egr-1 může být také použitelná při léčení jiných
30 poruch spojených s hojením ran, jako je restenóza po perkutánní

transluminální koronární angioplastice, modulace kalcifikace cévních stěn a inhibice proliferace buněk při rakovině.

Podstata vynálezu

5 Podle jednoho provedení vynálezu se tedy poskytuje použití molekuly nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky účinný fragment při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení poruch buněčné proliferace spojených s léčením poranění u savců, včetně člověka.

10 Podle dalšího provedení vynálezu se poskytuje způsob léčení poruch buněčné proliferace spojených s léčením poranění u savců, včetně člověka, který zahrnuje podávání molekuly nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky účinný fragment.

15 Podle dalšího provedení poskytuje vynález molekulu nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2, nebo jeho biologicky účinný fragment, pro použití při léčení poruch buněčné proliferace, spojených s léčením poranění.

20 V dalším provedení se vynález zaměřuje na použití kombinace molekuly nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 a další molekuly obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB2.

25 Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu jsou poruchy proliferace buněk spojené s hojením poranění zvoleny z tvorby hypertrofických a keloidních jizev, psoriázy, restenózy po perkutánní transluminální koronární angioplastice, kalcifikace cévní stěny a proliferace buněk při rakovině. Ve zvláště výhodném provedení předkládaného vynálezu je poruchou proliferace buněk tvorba hypertrofických a keloidních jizev.

Předkládaný vynález se tedy týká terapeutického použití polynukleotidů kódujících NAB1 nebo NAB2 při procesech hojení poranění. Vynález se také týká terapeutického použití samotných NAB1 nebo NAB2 při procesu hojení ran, jak bude podrobněji popsáno
5 dále.

Předkládaný vynález se týká použití polypeptidů NAB1 nebo NAB2 a sekvencí nukleových kyselin kódujících polypeptidy NAB1 nebo NAB2 jakéhokoli původu nebo druhu. Sekvence lidské DNA je uvedena v Genové bance (Genbank) pod přístupovým číslem U47007,
10 přičemž tato sekvence kóduje jaderný protein o délce 486 aminokyselin. Krysí NAB1 je jaderný protein o délce 570 aminokyselin a popisuje se v PNAS USA 92, 1995, str. 6873 - 6877. Sekvence DNA krysí je uvedena v Genové bance pod přístupovým číslem U17253.

Sekvence myšího a lidského proteinu NAB2 se popisují
15 v Molecular and Cellular Biology, 1996, 16, 3545 - 3553. Sekvence lidské DNA je uvedena v Genové bance pod přístupovým číslem U48361.

Odkazy na polypeptidy a polynukleotidy NAB1 nebo NAB popisované dále jsou obecně použitelné na sekvence jakéhokoli
20 původu, zvláště lidské sekvence popsané výše. Jak bude popsáno dále, termín NAB1 nebo NAB2 zahrnuje také varianty, fragmenty a analogy NAB1 nebo NAB2.

Následující ilustrativní vysvětlení se poskytují proto, aby se usnadnilo porozumění některých termínů používaných v přihlášce.
25 Vysvětlení jsou poskytována pro pohodlí a nejsou pro vynález omezující.

Biologicky účinné fragmenty NAB1 nebo NAB2, na které se odkazuje, jsou ty fragmenty, které mají reprimující účinky na transkripci Egr-1.

Genetický element obecně znamená polynukleotid obsahující oblast kódující polypeptid nebo oblast polynukleotidu, která řídí replikaci, transkripci nebo translaci nebo další procesy důležité pro expresi polypeptidu v hostitelské buňce, nebo polynukleotid obsahující
5 jak oblast kódující polypeptid, tak i oblast operativně spojenou s oblastí regulující expresi. Genetické elementy mohou být obsaženy uvnitř vektoru, který se replikuje jako episomální element; tj. jako molekula fyzicky nezávislá na genomu hostitelské buňky. Genetické elementy mohou být obsaženy uvnitř plasmidů. Genetické elementy
10 mohou být také obsaženy uvnitř genomu hostitelské buňky; ne v jejich přirozeném stavu, ale po manipulaci jako je izolace, klonování a zavedení do hostitelské buňky, mj. ve formě vyčištěné DNA nebo ve vektoru.

Hostitelská buňka je buňka, která byla transformována nebo
15 transfekována, nebo je schopná transformace nebo transfekce exogenní polynukleotidovou sekvencí.

Identita je, jak je v oboru známo, vztah mezi dvěma nebo více polypeptidovými sekvencemi, nebo dvěma nebo více polynukleotidovými sekvencemi, tak jak se zjistí porovnáním sekvencí.
20 V oboru znamená identita také stupeň příbuznosti sekvencí mezi polypeptidovými nebo polynukleotidovými sekvencemi, která se zjistí porovnáním mezi řetězci těchto sekvencí. Identitu je možno snadno vypočítat (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and*
25 *Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, část I, Griffin, A. M., a Griffin H. G., ed., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; a *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. a Devereux, J., ed., M.
30 Stockton Press, New York, 1991). Existuje řada způsobů pro měření identity mezi dvěma polynukleotidy nebo dvěma polypeptidy a tento termín je odborníkům v oboru dobře znám (*Sequence Analysis in*

Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. a Devereux, J., ed., M. Stockton Press, New York, 1991; a Carillo, H., a Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Mezi metody běžně používané pro určení identity
5 mezi sekvencemi patří bez omezení metody popsané v Carillo, H., a Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Výhodné způsoby pro stanovení identity jsou navržené tak, aby poskytovaly nejvyšší souhlas mezi testovanými sekvencemi. Metody pro určení identity jsou zakódovány v počítačových programech. Mezi výhodné programové
10 metody pro určení identity mezi dvěma sekvencemi patří bez omezení programový balík GCG program package (Devereux, J., a další, *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN a FASTA (Atschul, S. F. a další, *J. Molec. Biol.* 215: 403 (1990)).

Izolovaný znamená změněný „rukou člověka“ z přirozeného
15 stavu; tj. jestliže se látka vyskytuje v přírodě, byla změněna nebo vyjmuta z původního prostředí, nebo obojí. Například v přírodě se vyskytující polynukleotid nebo polypeptid, který je přirozeně přítomen v živém organismu ve svém přirozeném stavu není „izolovaný“, ale stejný polynukleotid nebo polypeptid oddělený od koexistujících
20 materiálů svého přirozeného stavu je v rámci termínu používaného v předkládané přihlášce „izolovaný“. Jako součást následné izolace mohou být polynukleotidy spojeny za vytvoření jiných polynukleotidů, jako jsou DNA, může být provedena mutageneze, mohou být vytvořeny fuzní proteiny a může být například provedena propagace nebo
25 exprese v hostitelské buňce. Izolované polynukleotidy, ať už samostatné nebo spojené s jinými polynukleotidovými sekvencemi, jako například ve formě vektorů, mohou být zavedeny do hostitelských buněk, do kultury nebo do celého organismu. Zavedeny do hostitelských buněk v kultuře nebo v celých organismech mohou být
30 tyto DNA stále izolovány ve smyslu termínu používaného v přihlášce, protože nejsou ve své přirozeně se vyskytující formě nebo prostředí, nejde v těchto případech o přirozeně se vyskytující směsi

a polynukleotidy nebo polypeptidy zůstávají stále izolovány ve významu zde používaného termínu.

Polynukleotid (polynukleotidy) obecně označují jakýkoli polyribonukleotid nebo polydeoxyribonukleotid, kterým může být

5 nemodifikovaná RNA nebo DNA nebo modifikovaná RNA nebo DNA, nebo cDNA. Tak například polynukleotidy ve významu používaném v této přihlášce označují mj. jednořetězcovou a dvojřetězcovou DNA, DNA, která je směsí jedno- a dvojřetězcových oblastí nebo jedno-, dvoj- a trojřetězcových oblastí, jedno- a dvojřetězcovou RNA a RNA,

10 která je směsí jedno- a dvojřetězcových oblastí, hybridní molekuly obsahující DNA a RNA, které mohou být jednořetězcové, nebo typičtěji dvojřetězcové nebo trojřetězcové, nebo směsí jedno- a dvojřetězcových oblastí. Navíc znamená polynukleotid ve smyslu použití v předkládané přihlášce trojřetězcové oblasti obsahující RNA

15 nebo DNA nebo jak RNA, tak i DNA. Řetězce v těchto oblastech mohou pocházet ze stejné molekuly nebo z různých molekul. Oblasti mohou obsahovat jednu nebo více molekul ve své úplnosti, ale typicky obsahují pouze určitou část některé z molekul. Jedna z molekul oblasti trojitě šroubovice je často oligonukleotid. Jak se zde používá, termín

20 polynukleotid zahrnuje molekuly DNA nebo molekuly RNA jak bylo popsáno výše, které obsahují jednu nebo více modifikovaných bází. Tak například molekuly DNA nebo RNA s kostrami modifikovanými pro dosažení stability nebo z jiných důvodů, jsou ve smyslu zde používané terminologie „polynukleotidy“. Navíc jsou ve smyslu zde používané

25 terminologie polynukleotidy také například molekuly DNA nebo RNA obsahující neobvyklé báze jako je inosin nebo modifikované báze jako jsou tritylované báze. Je zřejmé, že DNA a RNA mohou být vystaveny celé řadě modifikací, které slouží mnoha různým účelům známým odborníkům v oboru. Termín polynukleotid, jak se zde používá,

30 zahrnuje takové chemicky, enzymaticky nebo metabolicky modifikované formy polynukleotidů, stejně jako chemické formy DNA a RNA charakteristické pro viry a buňky, včetně mj. jednoduchých

a komplexních buněk. Termín polynukleotidy zahrnuje i krátké polynukleotidy, které se často označují jako oligonukleotidy.

Polypeptidy znamenají, jak se zde používá, všechny polypeptidy popisované níže. Základní struktura polypeptidů je dobře známá a byla popsána v nesčetných učebnicích a jiných publikacích v oboru. V této souvislosti se zde tento termín používá pro označení jakéhokoli peptidu nebo proteinu, obsahujících dvě nebo více aminokyselin vzájemně spojených v lineárním řetězci peptidovými vazbami. Jak se zde používá, tento termín označuje jak krátké řetězce, které se v oboru často označují jako peptidy, oligopeptidy a oligomery, tak i dlouhé řetězce, které se obecně v oboru označují jako proteiny, a jichž existuje mnoho typů. Bude zřejmé, že polypeptidy často obsahují aminokyseliny jiné než je dvacet aminokyselin, které jsou běžně označovány jako vyskytující se v přírodě, a že mnoho aminokyselin včetně koncových aminokyselin může být modifikováno v daném polypeptidu buď přírodními cestami, jako je úprava (processing) a jiné posttranslační modifikace, ale také technikami chemické modifikace, které jsou v oboru dobře známy. I běžné modifikace, ke kterým dochází v přírodě u polypeptidů, jsou příliš početné pro uvedení jejich vyčerpávajícího seznamu, ale popisují se v základních textech a podrobnějších monografiích, stejně jako objemné výzkumné literatuře, a jsou dobře známy odborníkům v oboru.

Mezi známé modifikace, které mohou být v polypeptidech pro použití v předkládaném vynálezu přítomné, je možno pro ilustraci uvést například acetylaci, acylaci, ADP-ribosylaci, amidaci, kovalentní navázání flavinu, kovalentní navázání hemové skupiny, kovalentní navázání nukleotidu nebo nukleotidového derivátu, kovalentní navázání lipidu nebo lipidového derivátu, kovalentní navázání fosfatidylinositolu, zesítnění, cyklizaci, tvorbu disulfidových vazeb, demethylaci, tvorbu kovalentního zesítnění, tvorbu cystinu, tvorbu pyroglutamátu, formylaci, gama-karboxylaci, glykosylaci, vytvoření

ukotvení GPI, hydroxylaci, jodaci, methylaci, myristoleaci, oxidaci, proteolytické zpracování, fosforylaci, prenylaci, racemizaci, selenoylaci, sulfataci, adici aminokyselin na proteiny zprostředkovanou transferovou RNA jako je arginylace a ubikvitinace. Tyto modifikace
5 jsou odborníkům v oboru dobře známé a byly podobně popsány ve vědecké literatuře. Několik zvláště běžných úprav jako je glykosylace, navázání lipidů, sulfatace, gama-karboxylace zbytků kyseliny glutamové, hydroxylace a ADP-ribosylace, se popisuje v nejzákladnějších textech, jako například PROTEINS - STRUCTURE
10 AND MOLECULAR PROPERTIES, 2. vyd., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993). Na toto téma existuje mnoho podrobných souhrnných prací, jako například Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, str. 1 - 12, v POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF
15 PROTEINS, B. C. Johnson, ed., Academic Press, New York (1983); Seifter a další, *Meth. Enzymol.* 182: 626 - 646 (1990) a Rattan a další, *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48 - 62 (1992). Bude zřejmé, že jak je v oboru známo a jak je uvedeno výše, polypeptidy nejsou vždy úplně lineární.
20 Polypeptidy mohou být například obecně upraveny jako důsledek posttranslačních událostí, včetně v přírodě se vyskytujícího zpracování a událostí, které jsou prováděny umělou manipulací, která se nevyskytuje v přírodě. Stejně tak je možno zahrnout cirkulární, rozvětvené a rozvětvené cirkulární polypeptidy syntetizované
25 netranslačním přirozeným způsobem i zcela syntetickými způsoby. Modifikace se mohou vyskytovat kdekoli v polypeptidu včetně základního řetězce polypeptidu, vedlejších řetězců aminokyselin, a aminových nebo karboxylových konců. Blokování aminové nebo karboxylové skupiny nebo obou těchto skupin v polypeptidu kovalentní
30 modifikací je u syntetických i přírodních polypeptidů běžné a takové modifikace mohou být přítomny i v polypeptidech podle předkládaného vynálezu. Například aminokoncový zbytek polypeptidů vytvořených

v *E. coli* nebo jiných buňkách, bude před proteolytickým zpracováním téměř vždy N-formylmethionin. V průběhu posttranslační modifikace peptidu může dojít k odštěpení methioninového zbytku na NH₂-konci. Předkládaný vynález tedy zahrnuje jak použití varianty proteinu podle
5 vynálezu s obsahem aminokoncového methioninu, tak i varianty bez methioninu. Modifikace, ke kterým u polypeptidu dojde, budou často záviset na způsobu jeho přípravy. V případě polypeptidů vyrobených expresí klonovaného genu například v hostiteli bude povaha a rozsah modifikací z velké části záviset na posttranslační modifikační
10 schopnosti hostitelské buňky a modifikačních signálech přítomných v aminokyselinové sekvenci polypeptidu. Jak je například dobře známo, glykosylace často neprobíhá u bakteriálních hostitelů jako je například *E. coli*. Jestliže je tedy požadována glykosylace, polypeptid by měl být exprimován v glykosylujícím hostiteli, obecně
15 v eukaryotické buňce. Hmyzí buňky často provádějí stejné posttranslační glykosylace jako savčí buňky a z toho důvodu byly pro účinnou expresi savčích proteinů s mimo jiné přirozeným spektrem glykosylace vyvinuty expresní systém založené na hmyzích buňkách. Podobné předpoklady platí pro další modifikace. Bude zřejmé, že na
20 různých místech daného polypeptidu může být stejný typ modifikace přítomen ve stejném nebo různém rozsahu. Daný polypeptid může také obsahovat mnoho typů modifikací. Jak se zde používá, termín polypeptid obecně zahrnuje všechny tyto modifikace, zvláště takové, které jsou přítomny u polypeptidů syntetizovaných rekombinantním
25 způsobem expresí polynukleotidu v hostitelské buňce.

Varianta (varianty) polynukleotidů nebo polypeptidů označují ve smyslu předkládaného vynálezu polynukleotidy nebo polypeptidy, které se liší od referenčního polynukleotidu, popřípadě polypeptidu. Varianty v tomto smyslu se podrobněji popisují dále a na jiných místech popisu.
30 (1) Polynukleotid, který má odlišnou nukleotidovou sekvenci od dalšího, referenčního polynukleotidu. Obecně jsou rozdíly omezeny, takže nukleotidové sekvence referenčního řetězce a varianty jsou

celkově úzce podobné, a v mnoha oblastech identické. Jak se uvádí dále, změny v nukleotidové sekvenci varianty se nemusí projevovat navenek (mohou být mlčící, silent). To znamená, že nemusí měnit sekvenci aminokyselin kódovanou tímto polynukleotidem. Jestliže jsou
5 změny omezeny na „mlčící změny“ tohoto typu, varianta bude kódovat polypeptid se stejnou sekvencí aminokyselin jako má referenční řetězec. Jak je uvedeno dále, změny v nukleotidové sekvenci varianty mohou měnit aminokyselinovou sekvenci polypeptidu kódovaného referenčním polynukleotidem. Tyto změny nukleotidů mohou vést
10 k substitucím, adicím, delecím, fúzím a zkrácením polypeptidu kódovaného referenční sekvencí, jak bude diskutováno dále.

(2) Polypeptid, který má odlišnou aminokyselinovou sekvenci od jiného, referenčního polypeptidu. Obecně jsou rozdíly omezeny, takže sekvence referenčního řetězce a varianty jsou celkově blízce příbuzné
15 a v mnoha oblastech identické. Varianta a referenční polypeptid se mohou lišit v aminokyselinové sekvenci jednou nebo více substitucemi, adicemi, delecemi, fúzemi a zkráceními, přičemž tyto změny mohou být přítomny v jakékoli kombinaci.

Předkládaný vynález se týká terapeutických použití molekul
20 nukleových kyselin obsahujících sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo jejich kombinaci. Vynález se také týká terapeutických použití fragmentů této polynukleotidové sekvence, která kóduje biologicky aktivní fragmenty polypeptidu NAB1 nebo NAB2 nebo varianty polynukleotidové sekvence, která kóduje v důsledku
25 degenerace genetického kódu funkční, tj. biologicky aktivní fragmenty NAB1 nebo NAB2, a funkčně ekvivalentních alelických variant a příbuzných sekvencí modifikovaných jednoduchou nebo vícečetnou substitucí, adicí a/nebo delecí bází, které kódují polypeptidy s aktivitou NAB1 nebo NAB2.

30 Varianty mohou být získány standardními metodami klonování známými odborníkům v oboru.

Polynukleotidy kódující represorové proteiny transkripce NAB1 nebo NAB2 mohou být ve formě DNA, cDNA nebo RNA, jako například mRNA získané klonováním nebo vyrobené metodami chemické syntézy. DNA může být jednořetězcová nebo dvojřetězcová.

5 Jednořetězcová DNA může být kódující nebo „sense“ řetězec nebo nekódující nebo „anti-sense“ řetězec. Pro terapeutické použití je polynukleotid ve formě schopné exprese na funkční represorový protein transkripce NAB1 nebo NAB2 v místě poranění u pacienta. Polynukleotidy mohou být také použity pro výrobu polypeptidu NAB1

10 nebo NAB2 *in vitro* pro podávání v dalším terapeutickém provedení vynálezu, které bude podrobněji popsáno dále.

Polynukleotidy podle předkládaného vynálezu, které kódují polypeptid NAB1 nebo NAB2 mohou zahrnovat bez omezení kódující sekvenci polypeptidu NAB1 nebo NAB2 nebo jejich biologicky

15 aktivních fragmentů. Polynukleotid může být tedy poskytován spolu s dodatečnými, nekódujícími sekvencemi včetně například bez omezení s nekódujícími 5' a 3' sekvencemi, jako jsou přepisované, nepřekládané sekvence, které mají úlohu při transkripci (například včetně terminačních signálů), při vazbě ribosomů, prvky stability

20 mRNA a další kódující sekvence, které kódují dodatečné aminokyseliny, jako například aminokyseliny poskytující další funkce. Polynukleotidy podle vynálezu také bez omezení zahrnují polynukleotidy obsahující strukturní gen pro NAB1 nebo NAB2 a s ním přirozeně asociované genetické prvky.

25 Podle předcházející definice zahrnuje termín „polynukleotid kódující polypeptid“ v rámci předkládaného vynálezu polynukleotidy, které obsahují sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2. Tento termín zahrnuje polynukleotidy, které obsahují jedinou souvislou oblast nebo nesouvislé oblasti kódující polypeptid (například přerušené

30 integrovanou fágovou nebo inzerční sekvencí nebo editováním) spolu s dalšími oblastmi, které také mohou obsahovat kódující a/nebo nekódující sekvence.

Předkládaný vynález se dále týká variant výše popisovaných polynukleotidů, které kódují fragmenty, analogy a deriváty polypeptidu. Varianta polynukleotidu může být varianta, která se vyskytuje v přírodě, jako je v přírodě se vyskytují alelická varianta, nebo může jít
5 o variantu, o které je známo, že se v přírodě nevyskytuje. Tyto varianty, které se nevyskytují v přírodě, mohou být vyrobeny technikami mutagenese včetně způsobů použitých na polynukleotidy, buňky nebo organismy.

Mezi varianty v tomto ohledu patří varianty, které se liší od výše
10 uvedených polynukleotidů substitucemi, delecemi nebo adicemi nukleotidů. Mezi substituce, delece nebo adice mohou patřit změny jednoho nebo více nukleotidů. Varianty mohou být změněny v kódujících nebo nekódujících oblastech, nebo v obou. Změny v kódujících oblastech mohou vytvořit konzervativní nebo
15 nekonzervativní substituce, delece nebo adice aminokyselin.

Další výhodná provedení vynálezu tvoří polynukleotidy, které mají alespoň 70% identitu po celé jejich délce s polynukleotidem kódujícím polypeptidy s aminokyselinovou sekvencí popsanou výše, a polynukleotidy, které jsou s těmito polynukleotidy komplementární.
20 Alternativně jsou nejvýhodnější polynukleotidy, které obsahují oblast s alespoň 80% identitou po celé délce s polynukleotidem kódujícím polypeptid podle předkládaného vynálezu. V tomto smyslu jsou zvláště výhodné polynukleotidy, které mají po celé délce alespoň 90% identitu s referenčními sekvencemi, přičemž ještě výhodnější je identita
25 alespoň 95 %. Navíc jsou mezi řetězci s alespoň 95% identitou výhodnější řetězce s alespoň 97% identitou a mezi řetězci s alespoň 98% identitou jsou výhodné řetězce s alespoň 99% identitou, přičemž identita alespoň 99 % je nejvýhodnější.

Výhodná provedení v tomto ohledu jsou navíc polynukleotidy,
30 které kódují polypeptidy, jež si zachovávají v podstatě stejnou biologickou funkci nebo aktivitu jako zralý (maturní) polypeptid NAB1

nebo NAB2 kódovaný sekvencemi DNA popsány výše (přístupová čísla v Genové bance U47007 a U48361).

Předkládaný vynález se dále týká polynukleotidů, které s výše popisovanými sekvencemi hybridizují. V tomto smyslu se předkládaný
5 vynález týká zvláště polynukleotidů, které hybridizují za stringentních podmínek s výše uvedenými polynukleotidy. Jak se zde používá, termín „stringentní podmínky“ znamená, že k hybridizaci dojde, pokud je identita mezi sekvencemi alespoň 95 %, a s výhodou alespoň 97 %. S výhodou kódují sekvenční, které tímto způsobem hybridizují se
10 sekvencí podle vynálezu, polypeptid s biologickou aktivitou NAB1 nebo NAB2.

Polynukleotidy mohou kódovat polypeptid, který je maturním proteinem plus další amino- nebo karboxykoncové aminokyseliny. Tyto dodatečné sekvenční mohou mít úlohu například v tom, že prodlužují
15 nebo zkracují poločas proteinu nebo mohou umožnit manipulaci s proteinem z důvodů testování nebo produkce nebo z jiných důvodů. Obecně dochází *in vivo* k tomu, že dodatečné aminokyseliny mohou být buněčnými enzymy ze zralého proteinu odštěpeny.

Polynukleotidy pro použití při genové terapii podle vynálezu
20 mohou být poskytovány samostatně nebo jako část vektoru, jako například expresního vektoru, které jsou v oboru dobře známy.

Polynukleotid kódující NAB1 nebo NAB2 může být terapeuticky použit při způsobu podle vynálezu ve formě genové terapie, při které se polynukleotid podává do místa poranění nebo jiných tkání v případě
25 potřeby hojení v takové formě, která je schopná řídit produkci NAB1 nebo NAB2 nebo jejich biologicky účinného fragmentu *in situ*.

S výhodou se při genové terapii polynukleotid podává tak, že se exprimuje v léčeném pacientovi například ve formě rekombinantní molekuly DNA obsahující polynukleotid kódující NAB1 nebo NAB2
30 operativně připojený k sekvenci nukleové kyseliny, která řídí expresi, jako je tomu u expresního vektoru. Takový vektor bude tedy zahrnovat

vhodné signály řídící transkripci, včetně promotorové oblasti schopné exprimovat kódující sekvenci, kde uvedený promotor může fungovat v léčeném subjektu. V případě genetické terapie člověka je s výhodou promotor, přičemž tento termín nezahrnuje pouze sekvenci nutnou pro navedení RNA polymerázy do místa zahájení transkripce, ale také v případě potřeby další funkční nebo řídící sekvence včetně zesilujících sekvencí (enhancerů), lidská promotorová sekvence pocházející z lidského genu, nebo z genu, který se typicky exprimuje v lidech, jako je promotor lidského CMV. Mezi známými eukaryotickými promotory, vhodnými z tohoto hlediska, jsou časný promotor CMV (CMV immediate early promoter), thymidinkinázový promotor HSV (HSV thymidine kinase promoter), časný a pozdní promotory SV40, promotory retrovirálních LTR, jako jsou promotory viru Rousova sarkomu (RSV) a metalothioneinové promotory, jako je myší metalothionein-I promotor.

Polynukleotidová sekvence a řídící sekvence transkripce mohou být naklonovány do replikovatelného plasmidového vektoru založeného na komerčně dostupných plasmidech, jako je pBR322, nebo mohou být konstruovány z dostupných plasmidů rutinním použitím známých způsobů.

Vektor může také zahrnovat signály pro řízení transkripce umístěné ve směru 3' vzhledem ke kódující sekvenci NAB1 nebo NAB2, a také polyadenylační signály, které rozpoznává léčený subjekt, jako jsou například odpovídající virové sekvence, v případě léčení člověka například viru SV40. Mohou být také použity další známé sekvence pro řízení transkripce.

Expresní vektory mohou také obsahovat volitelné markery, jako například pro rezistenci vůči antibiotikům, které umožňují pomnožování vektorů.

Expresní vektory schopné syntetizovat NAB1 nebo NAB2 *in situ* mohou být do poranění zaváděny přímo fyzikálními metodami. Mezi

příklady tohoto místního podání patří aplikace „nahého“ vektoru nukleové kyseliny ve vhodném vehikulu, například v roztoku ve farmaceuticky přijatelné pomocné látce, jako je fyziologický roztok s fosfátovým pufrem (PBS) nebo podávání vektoru fyzikálními
5 metodami, jako je bombardování částicemi, známé také jako technologie „gene gun“ v oboru známými způsoby, například jak se popisuje v US patentu No. 5371015, kde se inertní částice jako jsou kuličky zlata potažené vektorem urychlují na dostatečné rychlosti pro umožnění proniknutí do povrchu v místě poranění, například kožních
10 buněk, pomocí vystřelení za vysokého tlaku z vhodného zařízení.

Další fyzikální metody podávání DNA přímo příjemci zahrnují ultrazvuk, elektrostimulaci a elektroporaci.

Sekvence nukleových kyselin kódující NAB1 nebo NAB2 pro použití při terapii podle vynálezu může být také podávána
15 prostřednictvím dodávacích vektorů (delivery vectors). Sem patří virové dodávací vektory, jako jsou adenovirové nebo retrovirové dodávací vektory známé v oboru.

Další neviróvé dodávací vektory zahrnují lipidové dodávací vektory, včetně liposomových dodávacích prostředků známých
20 v oboru.

Sekvence nukleové kyseliny kódující NAB1 nebo NAB2 může být také do místa poranění podávána prostřednictvím transformovaných hostitelských buněk. Mezi tyto buňky patří buňky sklizené ze subjektu, do kterého se v oboru známými metodami genového přenosu zavede
25 sekvence nukleové kyseliny, s následným růstem transformovaných buněk v kultuře a jejich přenesení (grafting) do pacienta.

Expresní konstrukty jako například konstrukty popisované výše mohou být při terapii podle předkládaného vynálezu mohou být použity řadou způsobů. Mohou být tedy přímo podány do místa poranění
30 pacienta nebo mohou být použity pro výrobu samotného rekombinantního polypeptidu NAB1 nebo NAB2, který potom může být

podán do místa poranění, jak bude podrobněji diskutováno dále. Vynález se tako týká hostitelských buněk, které jsou upraveny metodami genetického inženýrství pomocí konstruktů, které obsahují polynukleotid nebo polynukleotidy NAB1 nebo NAB2 podle
5 předkládaného vynálezu nebo výše definované genetické prvky a použití těchto vektorů a buněk při způsobech léčení. Tyto konstrukty mohou být použity jako takové při terapeutických metodách nebo mohou být použity pro přípravu polypeptidu NAB1 nebo NAB2 pro použití při terapeutických metodách, jak bude podrobněji popsáno
10 dále.

Vektorem může být například plasmidový vektor, jednořetězcový nebo dvojřetězcový fágový vektor, jednořetězcový nebo dvojřetězcový virový vektor RNA nebo DNA, v závislosti na tom, zda má být vektor podáván přímo do místa poranění (tj. pro syntézu NAB1 nebo NAB2 *in situ*), nebo zda má být použit pro syntézu rekombinantních NAB1 nebo NAB2. Výchozí plasmidy popisované v předkládaném vynálezu jsou
15 buď komerčně dostupné, veřejně dostupné nebo mohou být vytvořeny z dostupných plasmidů rutinním použitím známých publikovaných postupů. Mnoho plasmidů a jiných klonovacích a expresních vektorů, které mohou být podle předkládaného vynálezu použity, je dobře
20 známo a jsou snadno dostupné odborníkům v oboru.

Vektory pro expresi polypeptidu NAB1 nebo NAB2 pro použití podle předkládaného vynálezu obecně obsahují *cis*-působící řídicí oblasti účinné pro expresi v hostiteli operativně připojené
25 k exprimovanému polynukleotidu. Vhodné *trans*-působící faktory jsou buď dodávány hostitelem, komplementujícím vektorem nebo samotným vektorem po zavedení do hostitele.

V některých provedeních v této souvislosti vektory poskytují specifickou expresi. Pro produkci rekombinantních NAB1 nebo NAB2
30 může být touto specifickou expresí indukovatelná exprese nebo exprese pouze v některých typech buněk nebo exprese jak

indukovatelná, tak i buněčně specifická. Zvláště výhodné mezi indukovatelnými vektory jsou ty vektory, které mohou být indukovány pro expresi faktory prostředí, kterými je možno snadno manipulovat, jako je teplota a doplňky výživy. Řada vektorů vhodných pro použití
5 v tomto provedení vynálezu obsahuje konstitutivní a inducibilní expresní vektory pro použití v prokaryotických a eukaryotických hostitelích, přičemž tyto vektory jsou dobře známé a běžně používané odborníky v oboru.

Pro expresi NAB1 nebo NAB2 podle předkládaného vynálezu
10 může být použita široká škála expresních vektorů. Mezi tyto vektory mj. patří chromosomální, episomální a z virů odvozené vektory, například vektory odvozené z bakteriálních plasmidů, bakteriofágů, transposonů, kvasinkových episomů, z inzerčních prvků, z kvasinkových chromosomálních prvků, z virů jako jsou bakuloviry,
15 papovaviry jako je SV40, viry vakcinie, adenoviry, viry planých neštovic, viry pseudorabies a retroviry, a vektory odvozené z jejich kombinací, jako jsou vektory odvozené z plasmidových a bakteriofágových genetických prvků, jako jsou kosmidy a fágmidy, přičemž všechny tyto prvky mohou být použity pro expresi podle tohoto
20 provedení předkládaného vynálezu. Z tohoto hlediska může být pro expresi obecně použit jakýkoli vektor vhodný pro udržování, rozmnožování nebo expresi polynukleotidů s cílem exprimovat polypeptid v hostiteli.

Vhodná sekvence DNA může být do vektoru zavedena jakoukoli
25 z dobře známých rutinních metod, jako jsou například metody uváděné v Sambrook a další, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2. vyd.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Sekvence nukleové kyseliny v expresním vektoru je operativně
30 napojena do vhodné sekvence nebo sekvencí řídících expresi, včetně například promotoru pro přímou transkripci mRNA. Zástupci těchto

promotorů bez omezení zahrnují PL promotor fágu lambda, lac, trp a tac promotory *E. coli* pro rekombinantní expresi a časné a pozdní promotory SV40 a promotory retrovirálních LTR pro expresi *in situ*.

Expresní konstrukty budou obecně obsahovat místa pro
5 zahájení transkripce a ukončení transkripce, a v přepisované oblasti vazebné místo pro ribosomy pro umožnění translace. Kódující část zralých transkriptů exprimovaných konstrukty bude obsahovat místo iniciace translace AUG na začátku a terminační kodon vhodně umístěný na konci polypeptidu určeného ke translaci.

10 Konstrukty mohou navíc obsahovat řídicí oblasti, které řídí a připravují expresi. Podle mnoha běžně používaných postupů budou takové oblasti obecně fungovat řízením transkripce, jako jsou transkripční faktory, vazebná místa pro represor a terminátory.

Vektory pro propagaci a expresi budou obecně zahrnovat
15 volitelné markery a amplifikační oblasti, jako jsou například oblasti uváděné v Sambrook a další, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2. vyd.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Mezi reprezentativní příklady vhodných hostitelů pro
20 rekombinantní expresi NAB1 nebo NAB2 patří bakteriální buňky jako jsou streptokoky, stafylokoky, *E. coli*, streptomycety a buňky *Bacillus subtilis*; houbové buňky jako jsou kvasinkové buňky a buňky *Aspergillus*; hmyzí buňky jako jsou buňky *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sf9; živočišné buňky jako buňky CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK,
25 293 a buňky Bowesova melanomu; a rostlinné buňky.

Jako příklady je možno uvést následující komerčně dostupné vektory. Mezi vektory výhodné pro použití v bakteriích patří pQE70, pQE60 a pQE-9, dostupné u firmy Qiagen; vektory pBS, vektory Phagescript, Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, dostupné
30 u firmy Stratagene; a vektory ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 dostupné u firmy Pharmacia, a vektor pBR322 (ATCC 37017).

Mezi výhodné eukaryotické vektory patří pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 a pSG firmy Stratagene; a pSVK3, pBPV, pMSG a pSVL firmy Pharmacia. Tyto vektory mohou být použity jak pro rekombinantní expresi, tak i pro expresi *in situ*, a uvádějí se výhradně pro ilustraci mnoha komerčně dostupných a známých vektorů, které jsou k dispozici odborníkům v oboru pro použití podle některého z provedení předkládaného vynálezu. Bude zřejmé, že pro tato provedení vynálezu může být použit jakýkoli další plasmid nebo vektor vhodný například pro zavádění, udržování, rozmnožování nebo expresi polynukleotidu nebo polypeptidu podle vynálezu v hostitelské buňce.

Mezi příklady vektorů pro použití v rámci předkládaného vynálezu patří expresní vektory, ve kterých je sekvence cDNA NAB1 nebo NAB2 vložena do plasmidu, přičemž exprese genu se odvozuje od lidského časného enhanceru-promotoru cytomegaloviru (Foecking a Hofstetter, Cell, 45, 101 - 105, 1986). Tyto expresní plasmidy mohou obsahovat signály pro úpravu SV40 RNA, jako jsou signály pro polyadenylaci a terminaci. Expresní konstrukty, které používají promotor CMV, a které jsou komerčně dostupné, jsou pCDM8, pcDNA1 a deriváty, pcDNA3 a deriváty (Invitrogen). Mohou být také použity další expresní vektory, jako pSVK3 a pSVL, které obsahují promotor SV40 a štěpicí místo mRNA a polyadenylační signály SV40 (pSVK3) a signály pro zpracování SV40 VP1 (pSVL; vektory firmy Pharmacia).

Promotorové oblasti mohou být zvoleny z jakéhokoli požadovaného genu použitím vektorů, které obsahují reporterovou transkripční jednotku bez přítomné promotorové oblasti, jako je transkripční jednotka chloramfenikolacetyltransferázy („CAT“) umístěná ve směru exprese od restrikčního místa nebo míst pro zavádění možného fragmentu promotoru; tj. fragmentu, který může obsahovat promotor. Jak je známo, zavedení fragmentu obsahujícího promotor do vektoru v restrikčním místě proti směru exprese (upstream) genu *cat* umožní vytvoření aktivity CAT, která může být

detekována standardními testy na CAT. Vektory vhodné k tomuto účelu jsou dobře známé a snadno dostupné, jako například pKK232-8 a pCM7. Promotory pro expresi polynukleotidů podle předkládaného vynálezu zahrnují nejen známé a snadno dostupné promotory, ale také
5 promotory, které mohou být snadno získány výše uváděnými způsoby s použitím reporterového genu; pro expresi *in situ* by takový promotor měl být rozpoznán léčeným subjektem.

Mezi známé prokaryotické promotory vhodné pro expresi polynukleotidů a polypeptidů podle předkládaného vynálezu patří *E.*
10 *coli* promotory *lacI* a *lacZ*, promotory T3 a T7, promotor *gpt*, promotory *lambda* PR, PL a promotor *trp*.

Rekombinantní expresní vektory budou zahrnovat například počátky replikace, promotor odvozený s výhodou z genu s vysokou expresí pro přímou transkripci strukturní sekvence umístěné ve směru
15 exprese a volitelný marker pro umožnění izolace buněk obsahujících vektor pro expozici vektoru.

Polynukleotidy podle vynálezu kódující heterologní strukturní sekvenci polypeptidu podle vynálezu budou obecně vloženy do vektoru použitím standardních metod, takže budou operativně spojeny
20 s promotorem exprese. Polynukleotid bude umístěn tak, že místo zahájení transkripce bude umístěno ve směru 5' vzhledem k vazebnému místu ribosomu. Vazebné místo ribosomu bude ve směru 5' vzhledem ke kodonu AUG, který zahajuje translaci exprimovaného polypeptidu.

25 Obecně nebudou existovat žádné jiné otevřené čtecí rámce, které začínají iniciačním kodonem, obvykle AUG, a leží mezi vazebným místem pro ribosom a iniciačním kodonem. Bude také obecně existovat stop-kodon translace v místě konce polypeptidu a v konstruktech pro použití u eukaryotických hostitelů bude také
30 přítomen polyadenylační signál. Signál ukončení transkripce, který

musí být umístěn na 3' konci přepisované oblasti, může být v polynukleotidovém konstruktu zahrnut také.

Pro sekreci překládaného proteinu do lumen endoplasmatického retikula, do periplasmatického prostoru nebo do extracelulárního prostředí, mohou být při rekombinantní syntéze do exprimovaného polypeptidu vloženy vhodné sekreční signály. Tyto signály mohou být vzhledem k polypeptidu endogenní nebo může jít o heterologní signály.

Polypeptid může být exprimován v modifikované formě, jako je fúzní protein, a může obsahovat nejen sekreční signály, ale také další heterologní funkční oblasti. Tak například pro zlepšení stability a přetrvávání v hostitelské buňce, v průběhu purifikace nebo v průběhu následné manipulace a skladování, může být na N- nebo C-konec polypeptidu přidána například oblast dalších aminokyselin, zvláště nabitých aminokyselin. Do polypeptidu může být také přidána oblast umožňující purifikaci. Tyto oblasti mohou být před konečnou přípravou polypeptidu odstraněny. Přidání peptidových skupin do polypeptidů pro umožnění sekrece nebo exkrece, pro zlepšení stability nebo pro umožnění purifikace jsou příklady běžných a rutinně v oboru používaných úprav. Výhodný fúzní protein obsahuje leterologní oblast pro imunoglobulin, která je použitelná pro solubilizaci nebo purifikaci polypeptidů. Buňky se potom typicky sklídí centrifugací, rozbijí fyzikálními nebo chemickými prostředky a získaný surový extrakt se uchová pro další purifikaci.

Mikrobiální buňky používané pro expresi proteinů mohou být rozbíjeny jakoukoli běžnou metodou, včetně cyklů mražení-tání, sonikace, mechanického drcení nebo použití lysačních činidel, přičemž všechny tyto způsoby jsou odborníkům v oboru dobře známy.

Savčí expresní vektory mohou obsahovat počátek replikace, vhodný promotor a zesilující sekvenci a také jakékoli nezbytné vazebné místo pro ribosomy, polyadenylační oblasti, donorová

a akceptorová místa pro štěpení, sekvence pro terminaci transkripce a za 5'-koncem umístěné nepřepisované sekvence, které jsou nutné pro expresi.

Pro přípravu polypeptidů NAB1 nebo NAB2 pro použití v rámci
5 předkládaného vynálezu mohou být použity hostitelské buňky
upravené metodami genetického inženýrství. Zavedení polynukleotidů
do hostitelské buňky může být dosaženo transfekcí s použitím
fosforečnanu vápenatého, transfekcí zprostředkovanou DEAE-
textranem, transvekcí, mikroinjekcí, kationtovou transfekcí
10 zprostředkovanou lipidy, elektroporací, transdukcí, vnášením pomocí
škrábání, balistickým zaváděním, infekcí nebo dalšími způsoby. Tyto
metody se popisují v mnoha standardních laboratorních manuálech,
jako Davis a další, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,
(1986) a Sambrook a další, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY
15 MANUAL, 2. vyd.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
Harbor, N.Y. (1989).

Zralé proteiny mohou být exprimovány v hostitelských buňkách
včetně savčích buněk jako jsou CHO, kvasinkové buňky, bakteriální
buňky nebo jiné buňky za řízení odpovídajícími promotory. Pro
20 produkci takových proteinů použitím RNA odvozených z konstruktů
DNA podle předkládaného vynálezu mohou být také použity
bezbuněčné translační systémy. Vhodné klonovací a expresní vektory
pro použití s prokaryotickými a eukaryotickými hostitelskými buňkami
se popisují v manuálu Sambrook a další, MOLECULAR CLONING, A
25 LABORATORY MANUAL, 2. vyd.; Cold Spring Harbor Laboratory
Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Polypeptid může být z rekombinantních buněčných kultur
izolován a purifikován v oboru známými metodami včetně srážení
síranem amonným nebo ethanolem, extrakce kyselinou,
30 chromatografie na aniontovém nebo kationtovém iontoměniči,
chromatografie na fosfocelulóze, chromatografie s využitím

hydrofobních interakcí, afinitní chromatografie, chromatografie na hydroxylapatitu a lecitinové chromatografie. Pro purifikaci se nejvýhodněji bude používat vysoce účinná kapalinová chromatografie. Pro regeneraci aktivní konformace polypeptidu, pokud je takový polypeptid v průběhu izolace a/nebo purifikace denaturován, mohou
5 být použity dobře známé způsoby znovuospořádání (refoldingu).

Pro terapii může být polynukleotid kódující NAB1 nebo NAB2, například ve formě rekombinantního vektoru, čištěn v oboru známými způsoby, jako například chromatografií na koloně, jak se popisuje
10 v Sambrook a další, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2. vyd.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Jak je uvedeno výše, polypeptid NAB1 nebo NAB2 může být podáván v místě poranění buď ve formě nukleové kyseliny kódující NAB1 nebo NAB2, která se v samotném místě poranění přepisuje
15 a překládá na NAB1 nebo NAB2, tedy jako genová terapie, nebo může být přímo podáván protein pro represi transkripce.

Podle dalšího provedení vynálezu se tedy poskytuje použití polypeptidu NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky aktivního fragmentu při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení poruch
20 buněčné proliferace u savce včetně člověka.

Podle dalšího provedení vynálezu se poskytuje způsob léčení poruch buněčné proliferace u savce včetně člověka, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství polypeptidu NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky aktivního fragmentu savci. Z jiného
25 hlediska vynález poskytuje použití polypeptidu NAB1 nebo NAB2 nebo jejich biologicky aktivního fragmentu při léčení poranění a hojení ran.

Jak se zde používá, termín „polypeptid NAB1 nebo NAB2“ zahrnuje přírodním způsobem i rekombinantním způsobem vyráběný NAB1 nebo NAB2, přírodní, syntetické a biologicky aktivní analogy
30 nebo varianty polypeptidů nebo jejich deriváty, nebo jejich biologicky

aktivní fragmenty a varianty, včetně derivátů a analogů těchto fragmentů.

Proteinové produkty NAB1 nebo NAB2 včetně biologicky aktivních fragmentů NAB1 nebo NAB2 mohou být vytvářeny a/nebo
5 izolovány obecnými v oboru známými způsoby.

NAB1 nebo NAB2 a jejich výše uvedené fragmenty a deriváty pro použití při léčení podle vynálezu mohou být v oboru známými způsoby extrahovány z přírodních zdrojů. Mezi tyto metody patří purifikace sekvenčně specifické afinitní chromatografie DNA použitím
10 metod popisovaných například v Briggs a další, Science 234, 47 - 52, 1986, použitím oligonukleotidu vázajícího se na DNA, který rozpoznává NAB1 nebo NAB2. Polypeptid může být také připraven metodami technologie rekombinantní DNA, které jsou známy v oboru
15 jak bylo uvedeno výše, například expresí popisovaných konstruktů v hostitelských buňkách. Polypeptidy podle vynálezu mohou být také alternativně vyráběny synteticky použitím běžných syntezátorů peptidů.

Vynález se tako týká použití fragmentů, analogů a derivátů NAB1 nebo NAB2. Termín „fragment“, „derivát“ a „analog“ znamená
20 polypeptid, který si zachovává v podstatě stejnou biologickou funkci nebo aktivitu jako tento polypeptid. Analog tedy bude zahrnovat pro protein, který může být aktivován odštěpením proproteinové části za získání aktivního zralého (maturního) polypeptidu.

Fragment, derivát nebo analog polypeptidu může být
25 (i) polypeptid, ve kterém je jeden nebo více aminokyselinových zbytků substituován konzervovaným nebo nekonzervovaným aminokyselinovým zbytkem (s výhodou konzervovaným aminokyselinovým zbytkem) a takový substituovaný aminokyselinový zbytek může nebo nemusí být zbytek kódovaný genetickým kódem,
30 nebo (ii) polypeptid, ve kterém jeden nebo více aminokyselinových zbytků obsahuje skupinu substituentů, nebo (iii) polypeptid, ve kterém

je maturní polypeptid fuzován s další sloučeninou, jako je například sloučenina poskytující zvýšení poločasu polypeptidu (například polyethylenglykol), nebo (iv) polypeptid, ve kterém jsou se zralým polypeptidem fuzovány další aminokyseliny, jako je úvodní nebo
5 sekreční sekvence nebo sekvence, která se používá pro purifikaci zralého polypeptidu nebo pro proteinové sekvence. Tyto fragmenty, deriváty a analogy jsou považovány za spadající do rámce znalostí odborníků v oboru.

Mezi výhodné varianty patří takové varianty, které se od
10 přírodně se vyskytujících NAB1 nebo NAB2 liší konzervativními substitucemi aminokyselin. Substitucemi jsou takové záměny, které nahradí danou aminokyselinu v polypeptidu jinou aminokyselinou podobných vlastností. Typicky jsou konzervativními substitucemi takové náhrady, při kterých se zamění alifatické aminokyseliny Ala,
15 Val, Leu a Ile jedna za druhou; vzájemná výměna hydroxylových zbytků Ser a Thr, výměna zbytků kyselin Asp a Glu, substituce mezi amidovými zbytky Asn a Gln, záměna bazických zbytků Lys a Arg a záměny mezi aromatickými zbytky Phe, Tyr.

Z tohoto hlediska jsou dále zvláště výhodné varianty, analogy,
20 deriváty a fragmenty, a varianty, analogy a deriváty těchto fragmentů, které mají aminokyselinovou sekvenci polypeptidu, ve které byla provedena substituce, delece nebo adice v několika, několika málo, 5 až 10, 1 až 5, 1 až 3, 2, 1 nebo žádném zbytku aminokyselin, a to v jakékoli kombinaci. Mezi těmito substitucemi jsou zvláště výhodné
25 „mlčící“ substituce, adice nebo delece, které nemění vlastnosti a aktivity polypeptidu podle předkládaného vynálezu. V této souvislosti jsou zvláště výhodné konzervativní substituce.

Zvláště výhodné fragmenty jsou biologicky aktivní fragmenty, tj. fragmenty, které si zachovávají schopnost hojit poranění výchozího
30 polypeptidu.

Polypeptidy a polynukleotidy podle předkládaného vynálezu se s výhodou poskytují v izolované formě, a zvláště ve formě vyčištěné do homogenity.

Polypeptidy NAB1 nebo NAB2 pro použití v předkládaném
5 vynálezu zahrnují polypeptid NAB1 nebo NAB2 stejně jako polypeptidy, které mají alespoň 70% identitu, s výhodou alespoň 80% identitu a výhodněji alespoň 90% identitu a ještě výhodněji 95% podobnost (ještě výhodněji alespoň 95% identitu) s výše popsányými polypeptidovými sekvencemi, a obsahují také části těchto polypeptidů,
10 kde taková část polypeptidu obecně obsahuje alespoň 30 aminokyselin a výhodněji alespoň 50 aminokyselin.

Fragmenty nebo části polypeptidů podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro výrobu odpovídajícího polypeptidu s úplnou délkou metodou peptidové syntézy; proto mohou být
15 fragmenty použity jako meziprodukty pro výrobu polypeptidů s úplnou délkou. Fragmenty nebo části polynukleotidů podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro syntézu polynukleotidů podle předkládaného vynálezu s úplnou délkou.

Vynález se tako týká použití fragmentů polypeptidu NAB1 nebo
20 NAB2 definovaných výše a fragmentů nebo variant a jejich derivátů.

V této souvislosti je fragmentem polypeptid, který má zcela stejnou sekvenci aminokyselin jako část, ale ne jako úplná aminokyselinová sekvence polypeptidů NAB1 nebo NAB2 nebo jejich variant nebo derivátů.

25 Tyto fragmenty mohou být „volné“ (free-standing), tj. nevystupovat jako část dalších aminokyselin nebo polypeptidů nebo s nimi nebýt fúzovány, nebo mohou být součástí delšího polypeptidu, jehož část nebo oblast tvoří. Jestliže jsou fragmenty obsaženy uvnitř delšího polypeptidu, tyto fragmenty diskutované v rámci
30 předkládaného vynálezu tvoří nejvýhodněji jedinou spojitou oblast. V rámci jednoho delšího polypeptidu však může být obsaženo několik

fragmentů. Například určitá výhodná provedení se týkají fragmentu nebo polypeptidu podle předkládaného vynálezu, obsažených uvnitř prekurzorového polypeptidu navrženého pro expresi v hostitelské buňce, a obsahujícího heterologní pre- a propolypeptidové oblasti
5 fúzované s aminokoncem fragmentu a další oblast fúzovanou s karboxylovým koncem fragmentu. Proto se fragmenty v jednom provedení zde zamýšleného významu týkají části nebo částí fúzního peptidu nebo fúzního proteinu odvozených od polypeptidu podle předkládaného vynálezu.

10 V tomto provedení vynálezu jsou výhodné také fragmenty charakterizované strukturními nebo funkčními vlastnostmi polypeptidu podle předkládaného vynálezu. Mezi výhodná provedení vynálezu v tomto smyslu patří fragmenty, které obsahují alfa-šroubovice a oblasti vytvářející alfa-šroubovici, beta-list a oblasti vytvářející beta-
15 list, otočku (turn) a oblasti vytvářející otočku, svinutí a oblasti vytvářející svinutí, hydrofilní oblasti, hydrofobní oblasti, alfa-amfipatické oblasti, beta-amfipatické oblasti, pružné oblasti, oblasti vytvářející povrch, oblasti pro vazbu na substrát a oblasti s vysokým antigenním indexem polypeptidu podle předkládaného vynálezu a
20 kombinace těchto fragmentů.

Výhodné oblasti jsou takové, které zprostředkují aktivity polypeptidu podle předkládaného vynálezu. V tomto ohledu jsou nejvýhodnější fragmenty, které mají chemickou, biologickou nebo jinou aktivitu polypeptidu podle vynálezu, včetně fragmentů s podobnou
25 aktivitou nebo zlepšenou aktivitou nebo se sníženou nežádoucí aktivitou. Další výhodné polypeptidové fragmenty jsou fragmenty, které zahrnují nebo obsahují antigenní nebo imunogenní determinanty živočicha, zvláště člověka.

Bude zřejmé, že vynález se mj. týká také polynukleotidů
30 kódujících výše uvedené fragmenty, polynukleotidů, které hybridizují s polynukleotidy kódujícími fragmenty, zvláště těch, které hybridizují

za stringentních podmínek, a polynukleotidů jako jsou primery PCR pro amplifikaci polynukleotidů kódujících tyto fragmenty. Výhodné polynukleotidy jsou v tomto smyslu ty, které odpovídají výhodným fragmentům uváděným výše.

- 5 V dalších provedeních předkládaného vynálezu jsou zahrnuty biologicky, profylakticky, klinicky nebo terapeuticky použitelné varianty, analogy nebo deriváty nebo fragmenty, včetně fragmentů variant, analogů a derivátů a směsí obsahujících tyto fragmenty. Biologicky aktivní varianty, analogy nebo fragmenty spadají rovněž do
10 rámce předkládaného vynálezu.

Vynález se tako týká prostředků obsahujících polynukleotidy nebo polypeptidy diskutované výše. Proto mohou být polynukleotidy nebo polypeptidy podle předkládaného vynálezu použity v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo nosiči.

- 15 Mezi tyto nosiče patří bez omezení fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, dextróza, voda, glycerol, ethanol a jejich kombinace.

- Polypeptidy a polynukleotidy mohou být v předkládaném vynálezu použity samostatně nebo spolu s jinými sloučeninami, jako
20 jsou například terapeuticky účinné látky.

Farmaceutické prostředky mohou být podávány jakýmkoli účinným běžným způsobem, který umožňuje zacílení do míst poranění včetně například místního, intravenózního, intramuskulárního, intranasálního nebo intradermálního podávání.

- 25 Při léčení nebo prevenci může být účinná látka podávána jednotlivci jako směs pro injekce, například ve formě sterilní vodné disperze, s výhodou isotonické.

- Alternativně může být prostředek formulován pro místní podávání například ve formě mastí, krémů, mlék, očních mastí, očních
30 kapek, ušních kapek, ústních vod, impregnovaných obvazů a nití

a aerosolů, a může obsahovat vhodná běžná aditiva, včetně například ochranných látek, rozpouštědel napomáhajících penetraci léčiva a zvláčňujících látek v mastích a krémech. Takové formulace pro místní podávání mohou také obsahovat kompatibilní nosiče, například
5 základy mastí nebo krémů, a ethanol nebo oleylalkohol v případě mlék. Tyto nosiče mohou tvořit od přibližně 1 % hmotnostního do přibližně 98 % hmotnostních prostředku; obvykleji budou tvořit až do přibližně 80 % hmotnostních prostředku.

Pro podávání savcům a zvláště člověku se očekává, že denní
10 dávka účinné látky bude od 0,01 mg/kg do 10 mg/kg, typicky přibližně 1 mg/kg. V každém případě určí skutečnou dávku, která bude pro jednotlivce nejvhodnější, a která se bude lišit podle věku, hmotnosti a reakce konkrétního pacienta, ošetřující lékař. Výše uvedené dávky jsou příklady průměrného dávkování. Mohou však být i jednotlivé
15 případy, ve kterých jsou oprávněna vyšší nebo nižší rozmezí dávek, přičemž tyto případy rovněž spadají do rozsahu předkládaného vynálezu. Dávka zvolená zkušeným odborníkem bude mít v konečném důsledku funkci snížení buněčné proliferace, aniž by zabránila hojení ran.

20 V dalším provedení se poskytuje farmaceutický prostředek obsahující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo molekulu nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči.

Terapeutická výhoda použití represorových proteinů transkripce
25 při léčení poranění je v deaktivaci většího počtu cílových genů, které podporují urychlené hojení. NAB1 nebo NAB2 se přirozeně aktivuje jako odpověď na poranění, a výhodou je také zesílení přirozené odpovědi. Léčení je založené na DNA a poskytuje spolehlivý a reprodukovatelný dodávací systém.

30 Tam, kde se při léčení podle předkládaného vynálezu používá polynukleotid NAB1 nebo NAB2, může být použit jako část expresního

konstrukt, například ve formě expresního vektoru. Při takové metodě se konstrukt zavádí do místa poranění, kde se NAB1 nebo NAB2 produkuje *in situ*. Použité konstrukty mohou být standardní vektory a/nebo systémy pro dodávání genů jako jsou liposomy, dodávací systémy zprostředkované receptory a virové vektory.

Předkládaný vynález je vhodný pro všechny aspekty léčení poranění včetně vředů na končetinách při diabetu a periferních arteriálních okluzivních onemocnění, pooperačního ztvorby žizev, popálenin, lupénky, inhibice restenózy po perkutánní transluminální koronární angioplastice, modulace kalcifikace cévní stěny a inhibice buněčné proliferace při rakovině.

Jak se popisuje výše, polypeptidy nebo nukleové kyseliny NAB1 nebo NAB2 podle předkládaného vynálezu mohou být podávány místně do místa poškození tkáně jakýmkoli vhodným způsobem, například topickým podáváním. Výhodným způsobem pro dodávání produktů nukleových kyselin je použití technologie nastřelování (gene gun), při které se izolovaná molekula nukleové kyseliny Egr-1, například ve formě cDNA nebo v expresním vektoru, imobilizuje na částicích zlata a přímo nastřeluje do místa poranění. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu se tedy poskytuje použití molekuly nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 při metodě gene gun pro léčení poruch proliferace buněk spojených s hojením poranění. Dále se poskytuje prostředek vhodný pro léčení metodou gene gun zahrnující sekvenci kódující NAB1 nebo NAB2 imobilizovanou na částicích zlata.

Předkládaný vynález bude nyní popsán na následujících neomezujících příkladech s odkazy na přiložené obrázky.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1a) - 1d) ukazuje represí aktivace PDGF-AB, TGF β , HGF a VEGF zprostředkované Egr-1.

Obr. 2 popisuje trans-represi produkce HGF v HVSMC
5 zprostředkované Egr-1 působením NAB2.

Obr. 3 popisuje vliv NAB2 na angiogenezi vyvolanou Egr-1.

Obr. 4a popisuje vliv transfekce NAB2 na kontrakci přímého
řezného poranění 7 dní po poranění.

Obr. 4b popisuje vliv transfekce NAB2 na hladiny růstových
10 faktorů v epidermis řezných poranění u krysy po 7 dnech.

Obr. 4c popisuje vliv transfekce NAB2 na hladiny růstových
faktorů v granulační tkáni řezných poranění u krysy po 7 dnech.

Obr. 4d popisuje vliv transfekce NAB2 na angiogenezi u řezných
poranění u krysy po 7 dnech.

15

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Použití NAB2 pro represí transaktivace růstových faktorů zprostředkované Egr-1

20 1.1 Metody

Lidské buňky cévního hladkého svalstva (HVSMC; Clonetics)
byly kultivovány podle doporučení výrobce. Buňky byly pro transfekci
kultivovány v šestijamkových mikrotitračních destičkách (Costar).
Expresní plasmid obsahující cDNA NAB2 odvozenou z lidského
25 cytomegalovirového promotoru (hCMV; Svaren a další, Mol. Cell. Biol.,
16; 3545 - 3553, 1996) byl transfekován spolu s expresním plasmidem
obsahujícím cDNA Egr-1 (Houston a další, Arterioscler. Thromb. Vasc.
Biol., 19; 281 - 289, 1999) do buněk HVSMC v poměrech uvedených

v obrázcích, použitím materiálu FUGENE (Boehringer Mannheim). Pro všechny experimenty byl použit poměr 3 : 1 (objem/hmotnost) FUGENE : DNA a transfekce byla normalizována použitím β -galaktosidázového expresního plasmidu řízeného CMV. Sekrenované
5 růstové faktory byly detekovány v tkáňovém médiu metodou ELISA (R&D Systems) s použitím vhodných kontrol.

1.2 Výsledky

Obr. 1a) až 1d) ukazují represi aktivace PDGF-AB, TGF β , HGF,
10 popřípadě VEGF zprostředkované Egr-1. 6 μ g expresního plasmidu Egr-1 bylo kotransfekováno buď samostatně (obr. 1a, obr. 1b a obr. 1d), nebo s 500, 100 nebo 25 ng NAB2 (obr. 1a a obr. 1d). Pro PDGF-AB, TGF β a VEGF došlo k malému nárůstu množství detekovaného sekrenovaného růstového faktoru při samostatné transfekci Egr-1. Při
15 kotransfekci s NAB2 došlo k úplnému odstranění odpovědi PDGF-AB na aktivaci Egr-1 a snížení bazální exprese, které vedlo k pětinasobnému snížení celkové produkce PDGF-AB (obr. 1a). Transfekce NAB2 úplně zastavila odpověď TGF β na aktivaci Egr-1 a způsobila 30% snížení produkce celkového TGF β (viz obr. 1b).
20 Použitím koncentrací DNA uvedených na obrázku způsobila transfekce Egr-1 50% zvýšení produkce HGF, které bylo částečně blokováno kotransfekcí s nízkou dávkou NAB2 a úplně blokováno vyšší dávkou (obr. 1c). Vyšší účinky bylo možno pozorovat jeden den po transfekci, ačkoli inhibiční účinky NAB2 byly zřejmé ve dnech 2 a 3. Transfekce
25 NAB2 stejně jako PDGF-AB a TGF β blokovala aktivaci VEGF zprostředkovanou Egr-1 a způsobila 40% snížení celkového množství vytvořeného VEGF (obr. 1d).

1.3 Závěr

Tyto údaje ukazují, že supresor Egr-1, NAB2, může blokovat aktivaci růstového faktoru zprostředkovanou Egr-1, ke které dochází v místech akutního poranění.

5

Příklad 2

Použití NAB2 pro represi bazálních hladin růstových faktorů

2.1 Metody

10 Kultivace buněk, transfekce a detekce růstových faktorů byla prováděna podle popisu v části 1.1 výše. Expresní vektor NAB2 byl transfekován při konečných koncentracích 0, 250, 500, 1000 nebo 3000 ng.

2.2 Výsledky

15 Jak je ukánáno na obr. 2a) transfekce NAB2 do HVSMC způsobila drastické snížení produkce PDGF-AB. Při nejvyšší dávce NAB2 bylo pozorováno desetinásobné snížení koncentrace PDGF-AB.

2.3 Závěr

20 Tato data ukazují, že supresor Egr-1 může snížit bazální hladinu růstových faktorů produkovaných oběma promotory PDGF-AB.

Příklad 3

Použití NAB pro represi indukce angiogeneze *in vitro*

3.1 Metody

25

Expresní konxstrukty NAB2 (standardního typu (wild type) a dominantně negativní) odvozené z promotoru hCMV byly popsány

(Svaren a další, EMBO J. 17; 6010 - 6019, 1998). Autoři předkládané přihlášky ukázali, že transfekce transkripčního faktoru Egr-1 při expresi z promotoru hCMV podporovala angiogenezi (patentová přihláška PG3412). Při těchto experimentech byla DNA transfekována
5 do kitu pro výzkum angiogeneze podle instrukcí výrobce (TCS Biologicals). Protein VEGF (2 ng/ml) byl použit jako pozitivní kontrola a suramin (20 μ M) jako inhibitor angiogeneze. DNA CMV Egr-1 byla transfekována v množství 0,5 μ g na jamku v triplicátech v 24-jamkové mikrotitrační destičce s použitím činidla Mirus Transit (Cambridge
10 Biosciences) v poměru 2 : 1 objem/hmotnost DNA. Pro testování schopnosti NAB2 reprimovat angiogenezi zprostředkovanou Egr-1 bylo kotransfekováno 0,5 mg Egr-1 DNA s 10, 25 nebo 100 ng na jamku expresního plasmidu NAB2 v nepřítomnosti nebo v přítomnosti 100 ng NAB2 - dominantně negativního expresního plasmidu. Po 11 dnech
15 společné kultivace byla zjištěna míra angiogeneze barvením buněk na zjištění přítomnosti endoteliálního buněčného markeru PECAM-1 a vizualizací použitím substrátu BCIP/NBT.

Reprezentativní obrázky tvorby tubulů s použitím všech čtyř dávek expresního plasmidu Egr-1 spolu s VEGF (pozitivní kontrola)
20 a suraminem (negativní kontrola) byly zachyceny a zpracovány obrazovou analýzou použitím obrazového analyzátoru Quantimet 600 a přiloženého softwaru.

3.2 Výsledky

25 Bylo ukázáno, že Egr-1 DNA má proangiogenní účinky (mezinárodní patentová přihláška No. PCT GB 99/01722, sloupec 4, obr. 3a). Jak je ukázáno na obr. 3a), kotransfekce s NAB2 poskytla snížení schopnosti Egr-1 indukovat angiogenezi závislé na dávce, které bylo odstraněno kotransfekcí s NAB2 - dominantně negativním
30 expresním plasmidem.

3.3 Závěr

NAB2 může být použit pro blokování angiogeneze na pozadí akutního poranění, jehož příkladem je indukce růstového faktoru působením Egr-1.

Příklad 4

Použití NAB2 pro snížení tvorby jizev na modelu řezného poranění u hlodavce

4.1 Metody

4.1.1 Vliv transfekce NAB2 použitím technologie gene gun na hladiny růstových faktorů řezných poranění u krysy

Transfekce NAB2 do řezných poranění krysy působila proti tvorbě jizev přímým potlačením exprese klíčových růstových faktorů pro tvorbu jizev, totiž TGF β 1. V tomto experimentu byla cDNA NAB2 transfekována do řezných poranění krysy použitím technologie Biorad gene gun a s použitím rutinních histologických a imunocytochemických postupů byly testovány vlivy na hojení a hladiny růstových faktorů.

4.1.2 Přenos genů zprostředkovaný částicemi

Osm samců krys Sprague Dawley o hmotnosti ~250 g bylo anestetizováno isofloranem ve směsi v poměru 2 : 1 kyslík/oxid dusný. Byla připravena dvě místa pro transfekci (5 cm od báze lebky, 1,5 cm na každé straně střední čáry) a dvě kontrolní místa (8 cm od báze lebky, 1,5 cm na každé straně střední čáry) na zádech krysy nejprve sevřením svorkou a potom oholením žiletkou. Jedna transfekce byla prováděna v každém místě transfekce urychlením komplexů plasmid/zlato buď s NAB2 nebo Egr-1 (pozitivní kontrola pro aktivaci růstového faktoru) do kůže při tlaku 350 psi (2,41 MPa). Typicky bylo

do místa transfekce dodáno 0,5 až 1,5 µg DNA. V kontrolním místě byly do kůže urychleny částice zlata (bez DNA) při tlaku 350 psi (2,41 MPa); druhé kontrolní místo bylo ponecháno intaktní. Místa transfekce a kontrolní místa byla u každého dalšího zvířete otáčena ve směru hodinových ručiček, aby se vyrovnaly časové rozdíly v hojení ran.

4.1.3 Model hojení řezného poranění

24 hodin po transfekci byla zvířata anestetizována a paralelně s páteří byl proveden přímý řez o délce 1 cm v plné tloušťce kůže s použitím skalpelu přesně v místě transfekce. Zvířata byla ponechána zotavit po anestézii a poranění byla ponechána hojit bez šití. Sedm dní po poranění bylo všech osm zvířat usmrceno a místa poranění byla vyříznuta a použita pro rutinní histologické a imunohistochemické testy.

4.1.4 Histologická analýza

Každá rána v určitém časovém období po vyříznutí byla horizontálně rozříznuta na dva díly. Jedna polovina byla vložena do 4% paraformaldehydu na 24 hod a zpracována na voskovou histologii. 5 mm řezy z každé rány byly vytvořeny použitím mikrotomu a řezy byly obarveny podle van Geisona. Řezy byly pozorovány světelnou mikroskopií a byl zjišťován vliv NAB2 na hojení.

4.1.5 Imunohistochemické vyšetření

Po zmrazení v OCT byla druhá polovina každého poranění rozříznuta na 7 mm použitím kryostatu. Dva řezy z každé rány byly fixovány v chladném acetonu a bylo provedeno fluorescenční imunobarvení s primárními protilátkami proti Egr-1, PDGF, TGFβ1, TGFβ3 a vWF použitím následujícího protokolu.

1. Promytí řezů PBS.
2. Aplikace 30 ml primární protilátky 1 hod.
3. Promytí 3 x 5 min v PBS.
4. Aplikace 30 ml sekundární protilátky (FITC přímo navázaná)
45 min.
5. Promytí 3 x 5 min v PBS.
6. Upevnění řezů pomocí vodného přípravku.

Ihned po imunologickém barvení byl každý řez umístěn pod fluorescenční mikroskop a při stonásobném zvětšení byla zachycena oblast poranění. Obraz byl potom integrován a rozlišovací úroveň byla nastavena tak, aby bylo minimalizováno pozadí. Obrazovou analýzou byly měřeny plocha a intenzita zbarvení a výsledky byly graficky vyneseny.

4.2 Výsledky

4.2.1 Vliv NAB2 na hojení řezného poranění u krysy

4.2.1.1 Kontrakce poranění a histologická analýza poranění po sedmi dnech

Podle obr. 4a) došlo ke kontrakci poranění ošetřených NAB2 v podobné šířce jako u poranění transfekovaných Egr-1 a kontrolních poranění, přičemž histologicky byla ukázána podobná zralost granulační tkáně.

Závěr

Dodání NAB2 nezhoršuje rychlost hojení v modelu hojení řezného poranění u hlodavce.

4.2.1.2 Profily růstových faktorů

Na zmražených kryořezech kožní tkáně v místě poranění bylo prováděno imunologické barvení na Egr-1, TGF β 1, TGF β 3 a PDGF-AB a použitím obrazové analýzy byla měřena intenzita zbarvení pro každý
5 růstový faktor. V místě poranění byla provedena dvě rozdílná imunohistochemická měření. Řezy byly vyšetřovány na expresi růstového faktoru jak v epidermis ihned po poranění, tak i v místě poranění (granulační tkáň).

10 a) Pozitivní barvení na růstové faktory v epidermis

Jak je ukázáno v obr. 4b), sedm dnů po poranění snižovala transfekce NAB2 významným způsobem expresi TGF β 1 v epidermis ve srovnání s Egr-1 a kontrolou samostatného zlata. Ve srovnání s nemanipulovanou kontrolou snižovala transfekce NAB2 expresi
15 TGF β 1 v epidermis, zatímco jak Egr-1, tak i dodání zlata aktivovaly produkci TGF β 1. Transfekce NAB2 zvýšila hladiny TGF β 3 v epidermis ve srovnání jak se samotným zlatem, tak i s nemanipulovanými kontrolami. Transfekce NAB2 neměnila významným způsobem epidermální expresi Egr-1 a PDGF.

20

b) Pozitivní barvení na růstové faktory v granulační tkáni

Jak je ukázáno v obr. 4c), sedm dnů po poranění neměla transfekce NAB2 žádný vliv na hladiny Egr-1, PDGF-AB a TGF β 1 v granulační tkáni. NAB2 však zvyšoval hladiny TGF β 3 v granulační
25 tkáni ve srovnání jak se samotným zlatem, tak i s nemanipulovanými kontrolami.

Závěr

Transfekce NAB2 řezných poranění snižovala hladiny TGFβ1 v epidermis a zvyšovala hladiny TGFβ3 v epidermis a granulační tkáni sedm dnů po poranění. TGFβ1 je známá látka podporující vytváření jizev, zatímco TGFβ3 působí proti tvorbě jizev (Shah a další, J. Cell Science 107; 1137 - 1157, 1994). Proto může mít dodání NAB2 vlastnosti potlačující tvorbu jizev.

4.2.2 Vliv NAB2 na angiogenezi

Sedm dnů po poranění byly řezy kůže barveny a hodnoceny na expresi vWF použitím imunohistochemie a analýzy obrazu. Angiogeneze byla kvantifikována použitím imunologického barvení von Willebrandova faktoru na kryořezech tkání a analýzy obrazu pro měření oblasti pozitivního barvení v místě poranění. Jak je ukázáno na obr. 4d), sedm dnů po poranění obsahovala místa transfekovaná NAB2 méně krevních cév ve srovnání s kontrolou (poranění ošetřená zlatem). Egr-1 tedy podporoval angiogenezi *in vivo*, což podporovalo zjištění *in vitro* v příkladu 3.

Závěr

NAB2 blokoval aktivaci angiogeneze *in vivo* stimulovanou Egr-1, čímž byla podpořena úloha NAB2 jako represoru aktivace růstového faktoru akutním podnětem, například jako je aktivace produkce růstového faktoru prostřednictvím Egr-1.

Zastupuje:

12001

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití molekuly nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky aktivní fragment při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení poruch buněčné proliferace spojené s hojením poranění u savce, zvláště člověka.
5
2. Použití podle nároku 1, kde polypeptidem NAB1 nebo NAB2 je lidský polypeptid NAB1 nebo NAB2.
10
3. Použití podle některého z nároků 1 nebo 2, kde poruchami buněčné proliferace spojené s hojením poranění, jsou tvorba hypertrofických a keloidních jizev.
15
4. Použití podle některého z nároků 1 až 3, kde molekula nukleové kyseliny je operativně navázána k sekvenci nukleové kyseliny řídící expresi.
20
5. Použití podle některého z nároků 1 až 4, kde molekula nukleové kyseliny má identitu alespoň 70 % nebo 80 % nebo 90 % nebo 95 % po celé své délce s polynukleotidovou sekvencí NAB1 nebo NAB2.
25
6. Použití podle některého z nároků 1 až 5, které zahrnuje kombinaci molekul nukleové kyseliny obsahující sekvence

kódující jak polypeptid NAB1, tak i polypeptid NAB2, nebo jejich biologicky aktivní fragmenty.

- 5 7. Použití podle některého z nároků 1 až 5, kde molekula nukleové kyseliny obsahuje sekvenci kódující polypepti NAB2 nebo jeho biologicky aktivní fragment.
- 10 8. Použití podle některého z nároků 1 až 7, kde molekula nukleové kyseliny je uspořádána pro podávání savci fyzikálními metodami.
9. Použití podle nároku 8, kde molekula nukleové kyseliny je uspořádána pro podávání savci bombardováním částicemi.
- 15 10. Použití podle nároku 9, kde molekula nukleové kyseliny je imobilizována na částicích zlata.
11. Použití podle nároku 8, kde molekula nukleové kyseliny je uspořádána pro podávání mikrovyséváním.
- 20 12. Použití podle některého z nároků 1 až 7, kde molekulou nukleové kyseliny je vektor.
- 25 13. Použití podle některého z nároků 1 až 7, kde molekula nukleové kyseliny je v buňce.

14. Molekula nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky aktivní fragment, pro použití v genové terapii.
- 5 15. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje molekulu nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující polypeptid NAB1 nebo NAB2 nebo jeho biologicky aktivní fragment spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči.
- 10 16. Způsob léčení poruch buněčné proliferace spojených s hojením poranění u savce včetně člověka, kde tento způsob zahrnuje podávání molekuly nukleové kyseliny obsahující sekvenci polypeptidu NAB1 nebo NAB2, nebo jeho biologicky aktivního fragmentu, savci.
- 15 17. Použití polypeptidu NAB1 nebo NAB2, nebo jeho biologicky aktivního fragmentu, při výrobě farmaceutického prostředku pro léčení poruch buněčné proliferace souvisejících s hojením poranění u savce včetně člověka.
- 20 18. Použití podle nároku 17, kde polypeptid NAB1 nebo NAB2, nebo jeho biologicky aktivní fragment, se získávají přírodním, syntetickým nebo rekombinantním způsobem.
- 25 19. Použití podle nároku 17 nebo 18, kde polypeptidem NAB1 nebo NAB2 je lidský polypeptid NAB1 nebo NAB2.

20. Použití podle některého z nároků 17 až 19, kde polypeptid je z alespoň 70 % nebo 80 % nebo 90 % nebo 95 % identický po celé své délce s polynukleotidovou sekvencí NAB1 nebo NAB2.
- 5 21. Způsob léčení poruch buněčné proliferace souvisejících s hojením poranění u savce včetně člověka, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství polypeptidu NAB1 nebo NAB2, nebo jeho biologicky aktivního fragmentu, savci.
- 10 22. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje polypeptid NAB1 a/nebo NAB2, nebo jeho biologicky aktivní fragment spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči.

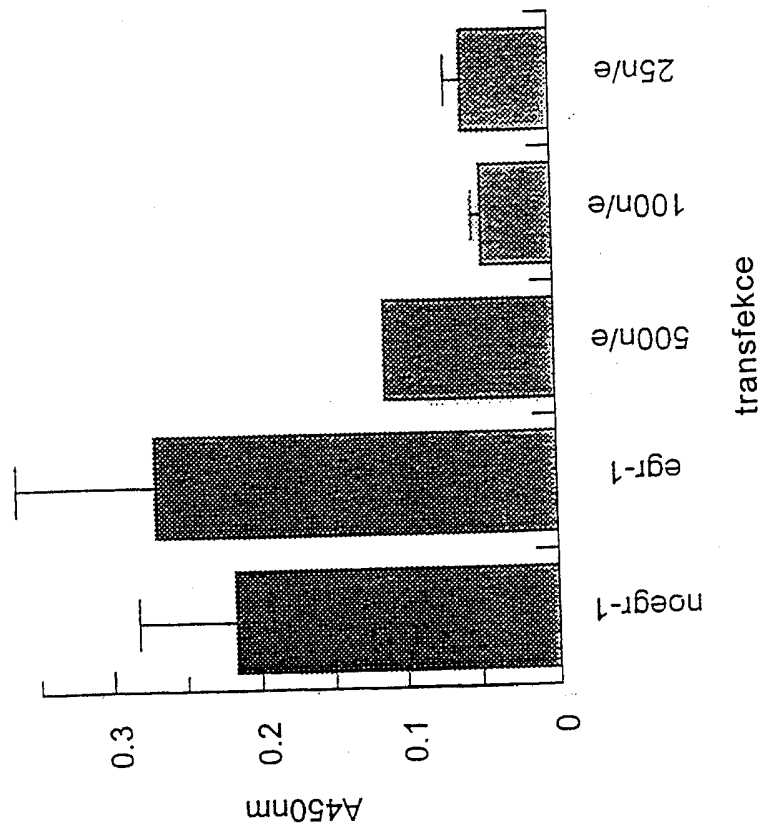
Zastupuje:

14.02.01

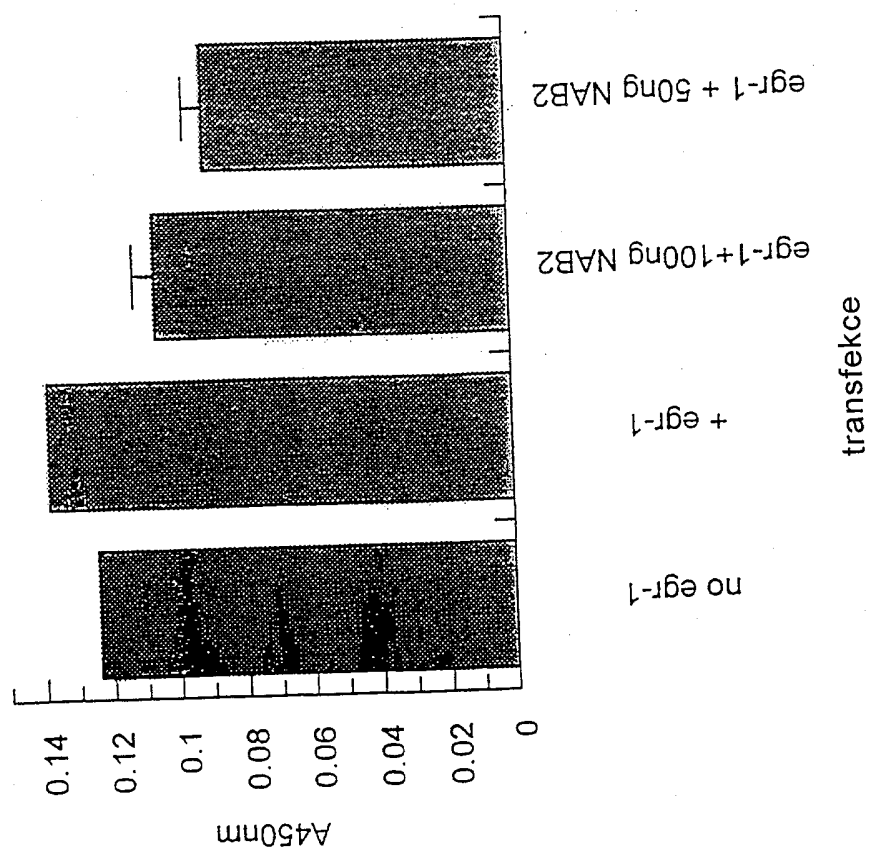
1 / 10

PV 2001-142

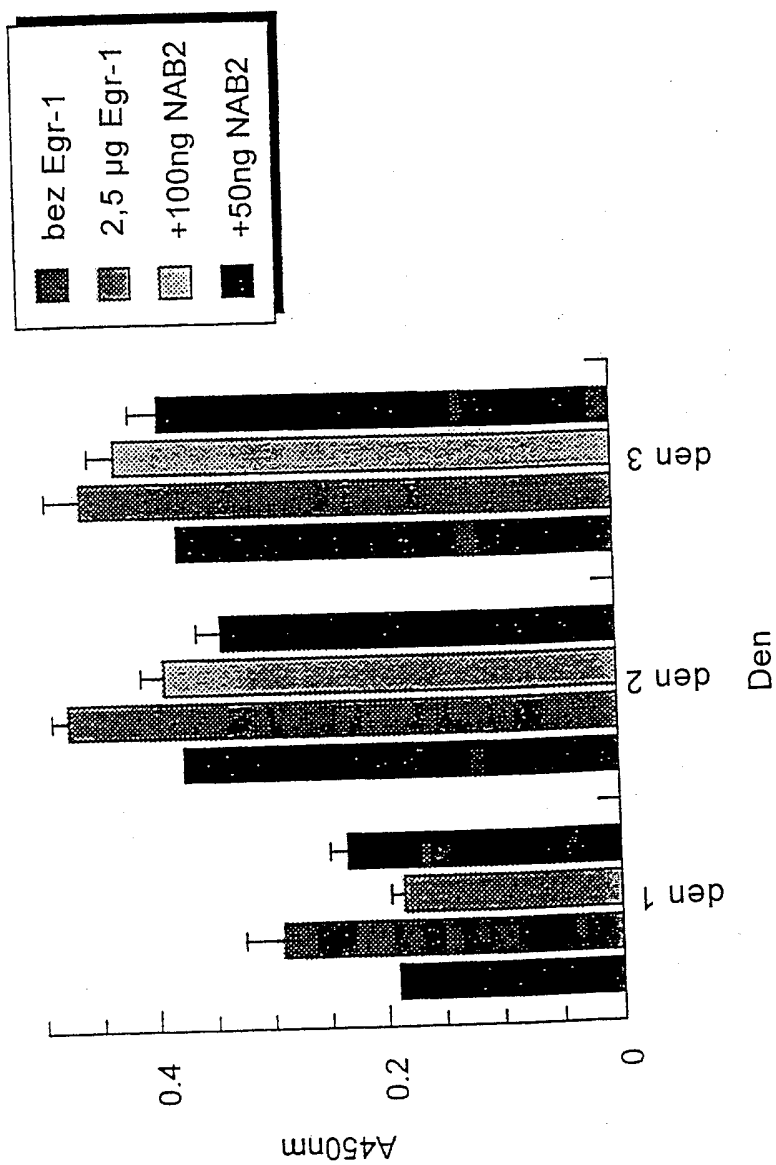
Obr. 1 a)
Trans-represe produkce PDGF-AB v HVSMC zprostředkované Egr-1
působením NAB2



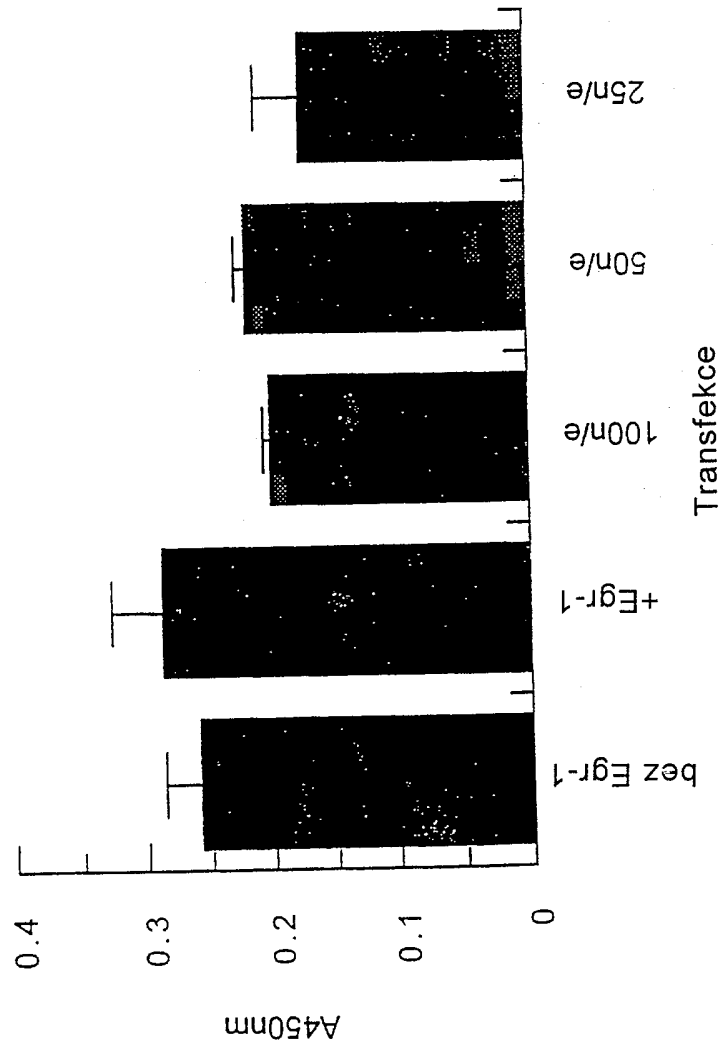
Obr. 1 b)
 Trans-represe produkce $TGF\beta$ v HVSMC zprostředkované Egr-1
 působením NAB2



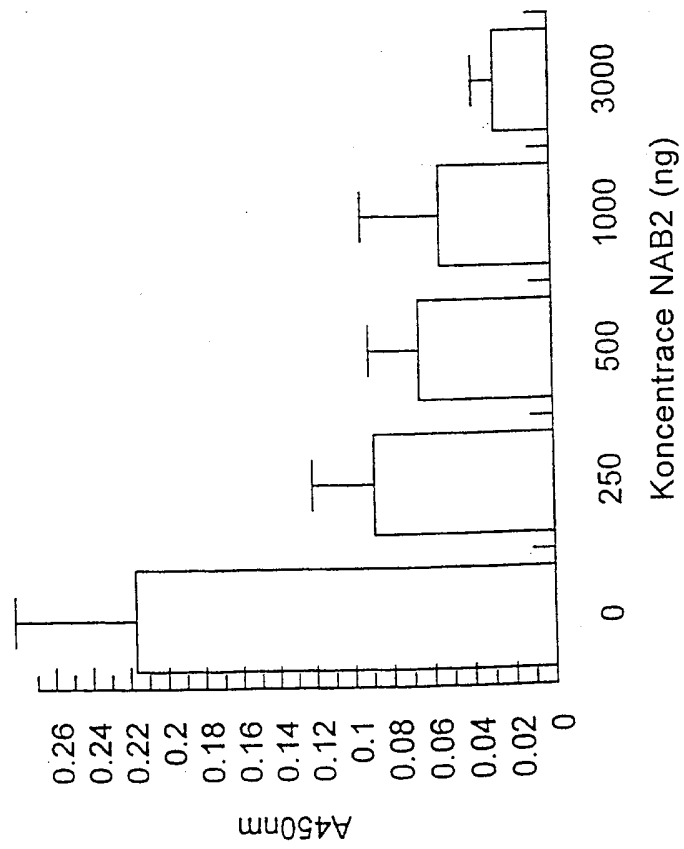
Obr. 1 c)
Trans-represe produkce HGF v HVSMC zprostředkované Egr-1
působením NAB2



Obr. 1 d)
Trans-represe produkce VEGF v HVSMC zprostředkované Egr-1
působením NAB2

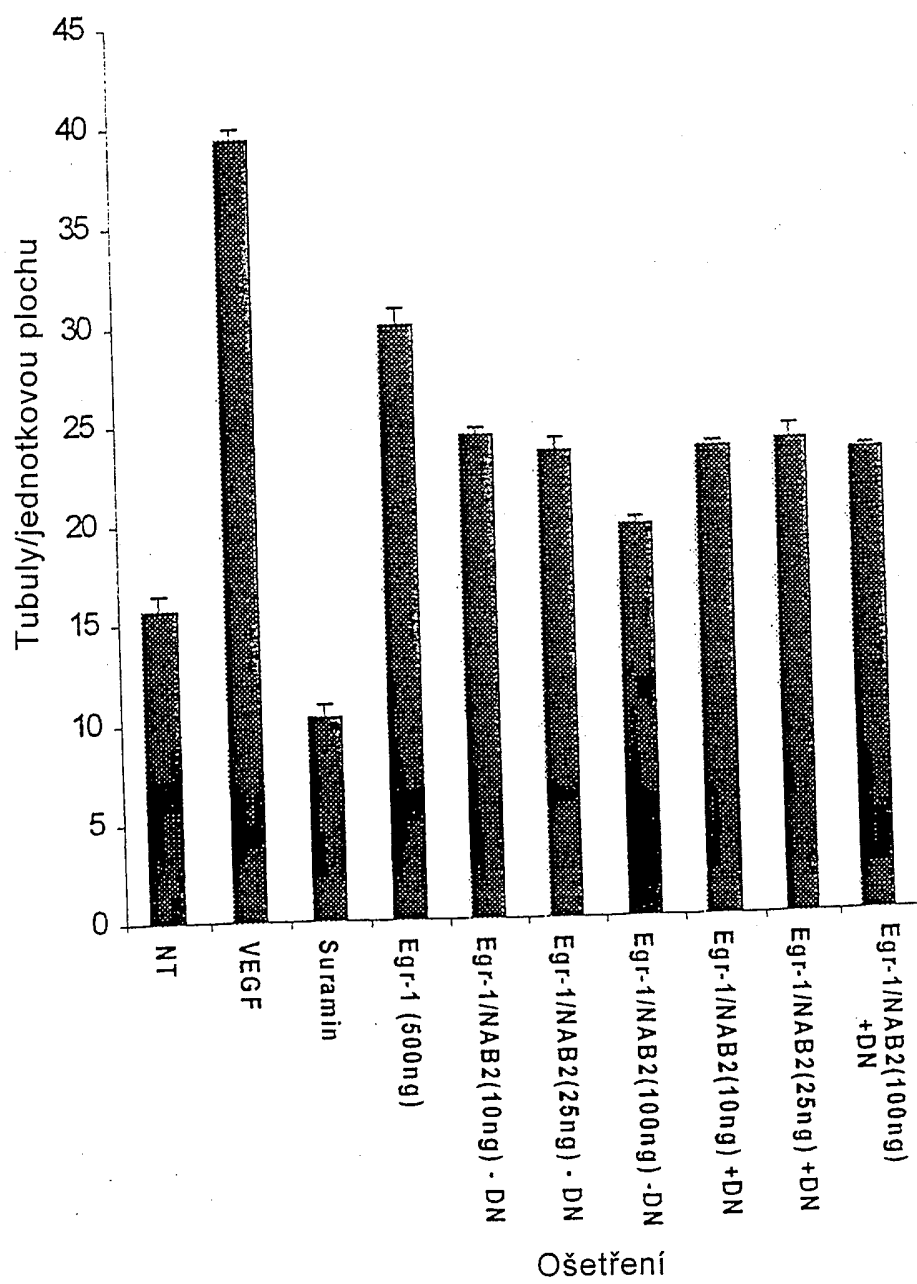


Obr. 2
Trans-represe endogenní produkce PDGF B v HVSMC působením
NAB2

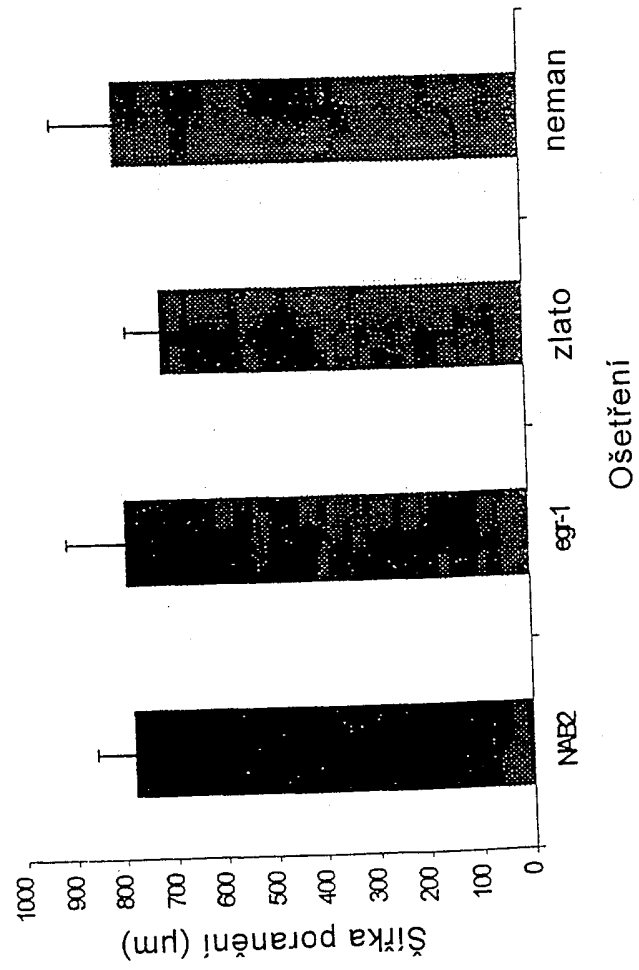


Obr. 3 a)

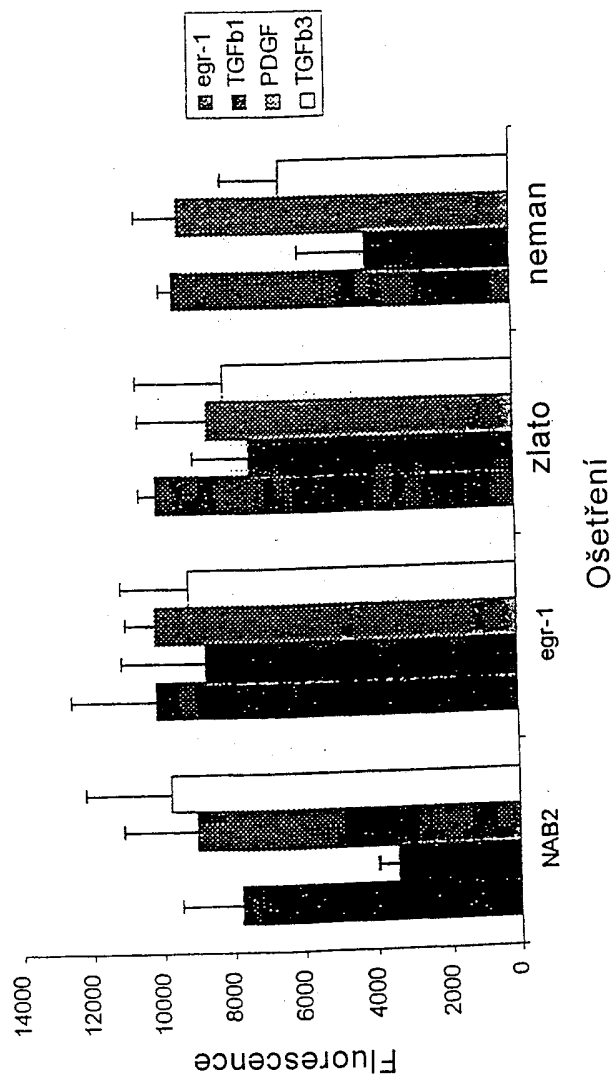
Vliv NAB2 na angiogenezi vyvolanou Egr-1



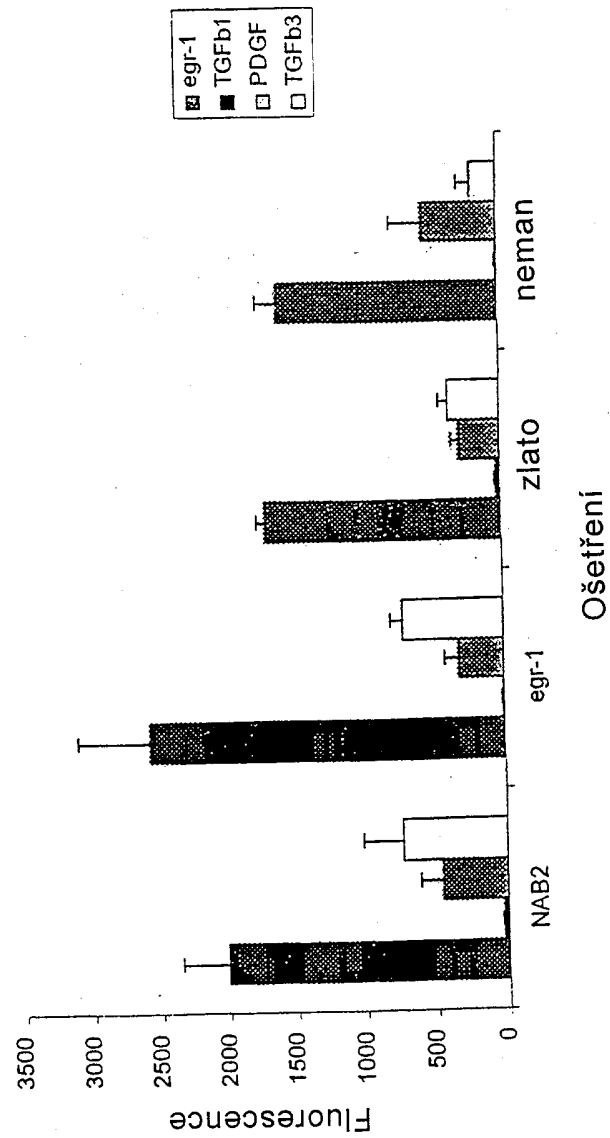
Obr. 4 a)
Vliv transfekce NAB2 na kontrakci přímého řezného poranění 7 dní po poranění



Obr. 4 b)
Vliv transfekce NAB2 na hladiny růstových faktorů v epidermis řezných poranění u krysy po 7 dnech



Obr. 4 c)
Vliv transfekce NAB2 na hladiny růstových faktorů v granulační tkáni
řezných poranění u krysy po 7 dnech



Obr. 4 d)
Vliv transfekce NAB2 na angiogenezi u řezných poranění u krysy po
7 dnech

