

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

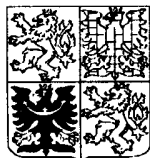
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

630-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02. 09. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.09.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9510331**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**
(Věstník č. 6/98)

(86) PCT číslo: **PCT/FR96/01340**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/09343**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/17
A 61 K 39/395
A 61 K 31/70
C 12 N 15/63

(71) Přihlášovatel:

RHONE-POULENC RORER S. A., Antony,
FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
LA RECHERCHE MEDICALE, Paris, FR;

(72) Původce:

Tocque Brano, Courbevoie, FR;
Dubs-Poterszman Marie-Christine,
Wolfisheim, FR;
Wasylyk Bohdan, Illkirsch, FR;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

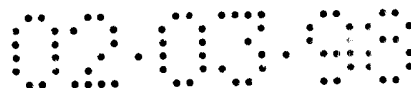
(54) Název přihlášky vynálezu:

Antagonisti onkogenní aktivity proteinu
Mdm2 a jejich použití v léčení rakovin

(57) Anotace:

Použití sloučeniny schopné alespoň částečně
antagonizovat onkogenní aktivitu proteinu
Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice
určené zejména pro léčení rakovin v sou-
vislosti s p53 nul. Dále je uveden virální vek-
tor obsahující sekvenci nukleové kyseliny kó-
dující sloučeninu schopnou alespoň částečně
inhibovat onkogenní aktivitu proteinu Mdm2
a odpovídající farmaceutická kompozice.

CZ 630-98 A3



175 739/HK

Antagonisti onkogenⁿí aktivity proteinu M~~dm~~2 a jejich použití v léčení rakovin

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových metod léčení hyperproliferativních patologií (rakovin, restenóz, atd.) a odpovídajících farmaceutických kompozic.

Dosavadní stav techniky

Velký počet rakovin je způsoben úplně nebo zčásti genetickými anomáliemi, které se projevují buď silnou expresí jednoho nebo více genů nebo/a expresí jednoho mutovaného genu nebo mutovaných genů nebo genů nenormálních. Například exprese onkogenů generuje ve většině případů rakovinu. Jedná se o onkogen genu geneticky určeného, jehož produkt exprese narušuje biologickou funkci normálních buněk, iniciující tak nově vytvořený stav. V současné době byl identifikován a částečně charakterizován velký počet onkogenů, zejména geny ras, myc, fos, erb, neu, raf, src, fms, jun a abl, jejichž mutované formy odpovídají poruchám proliferčních buněk.

V souvislosti s normálními buňkami, proliferace těchto onkogenů je pravděpodobně potlačena alespoň zčásti vytvořením genu řečeného supresoru tumorů jako p53 a Rb. Nicméně určité jevy mohou porušit tento mechanismus buněčné autoregulace a upřednostnit tak vývoj nově vytvořeného stavu. Jeden z těchto dějů spočívá v mutacích na úrovni genů supresorů tumorů. Tímto způsobem takto mutovaná forma delecí nebo/a mutací genu p53 je zahrnuta do vývoje většiny lidských rakovin (Baker et coll., Science 244 (1989) 217) a inaktivní formy genu Rb byly prokázány v případě různých nádorů zejména v retinoblastomech nebo v rakovinách mesenchimu jako např. osteosarkomy.

Protein p53 je nukleární fosfoprotein 53kD, který je exprimován ve většině normálních tkání. Je zahrnut do řízení buněčného cyklu (Mercer et al. Critic Rev. Eucar. Gene Express, 2, 251, 1992), transkripční regulace (Fields et al.,

Sciences (1990) 249, 1046), replikace DNA (Wilcoq and Lane, (1991), Nature 349, 4290 a Bargonnetti et al., (1992) Cell 65 1083) a indukce apoptózy (Shaw et al., (1992) P.N.A.S.USA 89, 4495). Každá buněčná expozice k činitelům schopným například poškodit DNA iniciuje kaskádu buněčné signalizace, která vede k posttranskripční modifikaci proteinu p53 a k transkripční aktivaci proteinem p53 určitého počtu genů, jako jsou např. gadd45 (growth arrest and DNA damage) (Kastan et coll. Cell, 71, 587-597, 1992), p21 WAF/CIP (ElDeiry et coll, Cancer Res., 54, 1169-1174, 1994) nebo také mdm2 (mouse double minute) (Barak et coll., EMBO J., 12, 461-468, 1993).

Z toho jasně vyplývá, že vyjasnění různých biologických funkcí souboru implikovaných proteinů zejména ve způsobu buněčné signalizace, jejich způsobu fungování a jejich charakteristických znaků je hlavní zájem pro porozumění karcinogeneze a upřesnění terapeutických účinných metod řízených proti rakovině.

Podstata vynálezu

Předložený vynález zapadá přesně do této souvislosti uváděje novou funkci proteinu Mdm2.

Protein Mdm2 je fosfoprotein o molekulové hmotnosti 90 kD, exprimovaný od genu mdm-2 (murine double minute 2). Tento gen mdm2 byl klonován na počátku v živelné tumorální buňce BALB/c 3T3 a bylo konstatováno, že silná exprese zvyšuje silně tumorální schopnost (Cahilly-Snyder et coll. Somat. Cell. Mol. Genet., 13, 235-244, 1987, Fakharzadeh et coll, EMBO J. 10, 1565-1569, 1991). Komplex Mdm2/p53 byl identifikován ve více buněčných liniích obsahujících divoký protein p53 i mutované proteiny p53 (Martinez et coll., Genes Dev., 5, 151-159, 1991). Mimo jiné bylo ukázáno, že Mdm2 inhibuje transkripční aktivitu proteinu p53 na promotoru stejně jako aktivitu svalové kreatin-kinasy indikující, že Mdm2 může regulovat aktivitu proteinu p53 (Momand et coll., Cell, 69, 1237-1245, 1992, Oliner et coll. Nature, 362,

857-860, 1993).

Vzhledem k souboru výsledků protein Mdm2 je tedy v současné době zejména uznán jako modulátor aktivit proteinu p53. Když divoké proteiny p53 nebo mutované proteiny vyvolávají komplexy inhibuje jejich transkripční aktivitu a přispívá tímto způsobem k deregulaci buněčné proliferace. Následkem toho využití těchto informací po stránce terapeutické spočívá hlavně v hledání prostředků pro zabránění této blokaci proteinu p53 proteinem Mdm2.

Předkladatel prokázal, že tento protein Mdm2 má charakter čistě onkogenní totiž úplně odlišný od onkogenního charakteru spojeného s jeho komplexní formou s proteinem p53. Protein Mdm2 rozvíjí onkogenní vlastnosti v souvislosti s proteinem p53 nul. Pro podpoření tohoto objevu a to, že onkogenní vlastnosti Mdm-2 jsou nezávislé na proteinu p53 a že zejména nevyplývají z inhibice transaktivační aktivity divokého proteinu p53, jsme pozorovali, že mutant proteinu p53 (p53 (14-19), Lin et al., Genes Dev., 1994, 8, 1235-1246), který má zachované své transaktivační vlastnosti, ale který již neinteraguje s Mdm-2, je neschopný blokovat onkogenní vlastnosti Mdm-2. Je zejména pozorováno, že Mdm-2 zejména oblast 1-134 Mdm-2, je schopný odblokovat zastavení buněčného cyklu v G1 indukovatelného silnou expresí p107. Mdm-2 se jeví jako důležitý regulátor faktorů obsažených v řízení buněčného cyklu jiných než p53.

Předložený vynález vyplývá částečně z prokázání, že proteinová sekvence 1-134 identifikované sekvence SEQ ID N°1 proteinu Mdm-2 je dostatečná pro vyjádření onkogenního potenciálu výše uvedeného proteinu.

Předložený vynález yplývá také z prokázání, že je možné určit tento onkogenní charakter proteinu Mdm2 za použití sloučenin, které jsou schopné s ním interagovat. Předložený vynález popisuje také účinné systémy zejména dovolující

odevzdání in vivo, přímo do tumorů, takovýchto sloučenin a tedy boj proti vývoji rakovin. Předložený vynález předkládá také nové přístupy účinné zejména pro léčení tumorů zejména v souvislosti s p53 nul, například pro léčení adenokarcinomů tračníku, rakoviny štítné žlázy, karcinomy plic, rakoviny prsu, rakoviny plic, rakoviny žaludku, rakoviny jícnu, lymphomy B, rakoviny ovarií, rakoviny močového měchýře, glioblastomy atd.

První předmět vynálezu spočívá tak v použití sloučeniny schopné antagonizovat zejména onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin v souvislosti s p53 nul.

Ve smyslu předloženého vynálezu se chápe rakovinou v souvislosti s p53 nul, rakovina, kde protein p53 bude neschopný vykonávat své funkce supresorového genu tumoru jakoukoliv modifikací nebo jakýmkoliv jiným mechanismem než fixací Mdm-2 na P53, fixací zabraňující proteinu p53 hrát svou roli supresoru tumoru a umožňující buňkám zabránit růstu, který je řízený proteinem p53. Mezi těmito modifikacemi nebo mechanismy blokujícími aktivitu supresoru tumoru p53 se mohou citovat například genetické poruchy genu p53 (bodové mutace, delece atd.), interakce s jinými proteiny než Mdm-2, velmi rychlá proteolytická degradace proteinu p53 spojená s přítomností proteinu E6 viru lidských papilomů vysoce nebezpečných jako jsou HPV-16 a HPV-18 atd.

Ve smyslu předloženého vynálezu onkogenní aktivita proteinu Mdm2 může být dosažena podle dvou metod.

Je přednostně uskutečněna, když zasahuje přímo na úrovni oblasti 1-134 proteinu. Každý protein schopný se vázat k této oblasti bude mít antagonistickou úlohu vůči onkogenním vlastnostem proteinu Mdm2.

Nicméně účinek inhibitoru může zejména být dosažen interakcí sloučeniny se sousední oblastí, jako například

oblast 135-491 proteinu mdm2, vyjádřené na sekvenci SEQ ID N°1 nebo sekvencí C-konce vyjádřené na sekvenci SEQ ID N°1. Podle toho předložený vynález se týká mimo jiné použití každé sloučeniny takové, která neintraguje s touto oblastí přímo a je nicméně schopná určit onkogenní vlastnost.

Podle zvláštního způsobu předložený vynález se týká použití sloučeniny schopné se vázat na úrovni oblasti 1-134 sekvence vyjádřené SEQ ID N°1 proteinu Mdm2 z pohledu přípravy farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin v souvislosti s p53 nul.

Ze sloučenin schopných interagovat přímo na úrovni oblasti 1-134 proteinu Mdm2, se může citovat zejména scFV specificky řízený proti této oblasti.

ScFv jsou molekuly mající vazebné vlastnosti srovnatelné s molekulami protilátek a jsou intracelulárně aktivní. Jedná se zejména o molekuly tvořené peptidem odpovídajícím vazebnému místu variabilní oblasti lehkého řetězce protilátek znovu spojených peptidovou spojkou k peptidu odpovídajícím vazebnému místu variabilní oblasti těžkého řetězce protilátky. Předkladatelem je ukázáno, že ScFv mohou být produkovány in vivo přenosem genu (viz přihláška vynálezu WO 94/29446).

Může se zejména jednat o peptidy nebo proteiny již známé pro svou schopnost se specificky vázat s oblastí 1-134 proteinu Mdm2 jako například s celkem nebo částí vazebné domény proteinu p53 se sekvencí SEQ ID N°1 a zejména o celek nebo část jednoho z peptidů 1-52, 1-41 a 6-41 sekvence p53 vyjádřené SEQ ID N°2 (Oliner et al., Nature, 1993, 362, 857-860) nebo jednodušeji o celek nebo část peptidu 16-25 (Lane et al., Phil. Trans. R. Soc. London B., 1995, 347, 83-87) nebo o stejné peptidy 18-23 lidského proteinu p53 nebo myšího nebo také o blízké peptidy odvozené od peptidů již dříve citovaných, ve kterých kritická rezidua pro interakci s

Mdm-2 by byla zachována (Picksley et al., Oncogene, 1994, 9, 2523-2529).

Může se zejména prokázat podle předloženého vynálezu sloučeniny se vážou k sousedním oblastem oblasti 1-134 Mdm2 vyjádřené SEQ ID N°1 a částí tohoto spojení určující onkogenní aktivitu proteinu Mdm2. Z tohoto titulu se mohou uvést sloučeniny interagující na úrovni oblasti C-konce výše uvedeného proteinu jako například transkripční faktory TFII, TBP a TaF250 stejně jako proteiny interagující na úrovni oblasti 135-491 Mdm2 vyjádřené SEQ ID N°1, jako například proteiny L5 (ribosomální protein) a Rb (retinoblastomový protein) a transkripční faktor E2F (řízený Rb).

Jiný předmět předloženého vynálezu se týká zejména použití scFV specificky řízeného proti této oblasti 1-134 sekvence vyjádřené SEQ ID N°1 proteinu Mdm2 z pohledu přípravy farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin.

Ve smyslu vynálezu se rozumí, že soubor interakcí citovaných výše určuje důsledně onkogenní charakter Mdm2. Mimoto tyto proteiny mohou být použity úplně nebo zčásti v případech, kde je prokázána jejich aktivní část oproti vazebným doménám s proteinem Mdm2, a že tato interakce vede k chorobě onkogenního charakteru.

V rámci předloženého vynálezu tyto sloučeniny mohou být použity takové jaké jsou nebo výhodně ve formě genetických konstrukcí, umožňujících jejich expresi in vivo.

Způsob provedení předloženého vynálezu zejména výhodný spočívá v prokázání nukleové sekvence kódující sloučeniny schopné antagonizovat alespoň částečně onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin v souvislosti s p53 nul.

Z této perspektivy nukleové kyseliny použité v rámci vynálezu mohou být různých typů. Jedná se zejména:

- o antimediatorové nukleové kyseliny
- o oligoribonukleotidy schopné fixovat přímo jednu z oblastí proteinu Mdm2 a inhibovat jeho onkogenní aktivitu (oligonukleotidový ligand)
- o nukleové kyseliny kódující celek nebo část peptidů nebo proteinů schopných se oligomerizovat s jednou z oblastí Mdm2 a inhibovat jeho onkogenní aktivitu
- o nukleové kyseliny kódující intracelulární protilátky (například různé fragmenty jediného řetězce pocházejícího z protilátek) řízené proti oblasti 1-134 sekvence SEQ ID N°1 proteinu Mdm2.

Podle zvláštního způsobu předloženého vynálezu nukleová kyselina je antimediatorová nukleová kyselina. Tato antimediatorová kyselina je DNA kódující komplementární RNA nukleové kyseliny kódující protein Mdm2 a je schopná blokovat jeho transkripci nebo/a jeho translaci (antimediatorová RNA) nebo ribozym.

Později byl prokázán nový typ nukleových kyselin schopných regulovat expresi cílového genu. Tyto nukleové kyseliny se nehybridují s buněčnou mRNA, ale přímo s dvouvláknovou genomickou DNA. Tyto nové přístupy založené na prokázání, že určité nukleové kyseliny jsou schopné specificky interagovat ve velkém pruhu dvoušroubovice DNA na úrovni oligopurin-oligopyrimidinové sekvence, totiž na úrovni oblastí majících oligopurinové sekvence na vlákně a oligopyrimidinové sekvence na komplementárním vlákně a tam tvoří trojšroubovici. Base třetího vlákna (oligonukleotid) tvoří vodíkové vazby (Hognessovy vazby nebo Hognessovy inverze) s puriny párů basí - párování basí Watsonovo-Crickovo. Nukleové kyseliny byly popsány zejména Pr. Hélène v Anti-Cancer drug design 6 (1991) 569.

Antimediatorové nukleové kyseliny podle předloženého

vynálezu mohou být sekvencí DNA kódující antimediatorovou RNA nebo ribozymy. Antimediatorové RNA takto vytvořené mohou interagovat s mRNA nebo cílovou genomickou DNA a tvořit s ní dvouvláknový nebo třívláknový helix. Může se zejména jednat o antimediatorové sekvence (oligonukleotidy), případně chemicky modifikované, schopné interagovat přímo s genem nebo cílovou RNA.

Vždy podle upřednostňovaného způsobu uvedení předloženého vynálezu nukleová kyselina je antimediatorový oligonukleotid takový, jaký byl již definován, případně chemicky modifikovaný. Může se jednat zejména o oligonukleotidy, jejichž fosfodiesterový skelet byl modifikován chemicky, například fosfonátové oligonukleotidy, fosfotriesterové, fosforamidátové a fosforthiolátové, které jsou popsány například v přihlášce vynálezu WO94/08003. Může se jednat zejména o oligonukleotidy alfa nebo konjugované oligonukleotidy s činitely jako jsou akrylátové sloučeniny.

Ve smyslu předloženého vynálezu se jedná o oligonukleotidové ligandy, oligoribonukleotidy nebo oligodeoxyribonukleotidy schopné se specificky vázat k proteinu Mdm-2, aby inhiboval svou onkogenní funkci. Takovéto nukleotidy mohou být například prokázány technikami "vývoj in vitro" jako například technikou SELEX (Edgington, Bio/technology, 1992, 10, 137-140, Brevets US 5, 270, 163 a WO 91/198113).

Všeobecně tyto nukleové kyseliny mohou být lidského původu, zvířecího, rostlinného, bakteriálního, virového, syntetického atd. Mohou být získány všemi odborníky známými technikami a zejména chemickou syntézou nebo také smíšenými metodami zahrnujícími modifikaci chemickou nebo enzymovou sekvencí získaných tříděním bank.

Jak je naznačeno dále, mohou být včleněny do vektorů, jako například plazmidových vektorů, virových nebo

chemických. Mohou být zejména podávány jako takové ve formě DNA podle technik popsanych v přihlášce vynálezu WO 90/11092 nebo ve formě komplexu například ve formě komplexu s DEAE-dextranem (Pagano et al., J. Virol. 1 (1967) 891), s nukleárními proteiny (Kaneda et al., Science 234 (1989) 375) s lipidy nebo kationickými polymery (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413) nebo ve formě lipozomů (Fraley et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 10431) atd.

Sekvence použitá v rámci předloženého vynálezu tvoří část vektoru. Použití takového vektoru umožňuje vskutku zlepšení podávání nukleové kyseliny do buněk k ošetření a také umožňuje zvýšit jejich stabilitu v uvedených buňkách a tím umožňuje získat trvalý terapeutický účinek. Je možné vložit více sekvencí nukleové kyseliny do stejného vektoru tím se zvýší také účinnost léčení.

Použitý vektor může být různého původu, tím okamžikem, co je schopný transformovat zvířecí buňky, zvláště rakovinové lidské buňky. V upřednostňovaném způsobu uvedení vynálezu se používá virový vektor, který může být vybrán mezi adenoviry, retroviry, viry AAV nebo viry Herpes.

Z tohoto pohledu předložený vynález má také pro předmět každého virového vektoru obsaženou, vloženou do svého genomu, nukleovou kyselinu kódující sloučeninu schopnou antagonistovat alespoň částečně onkogenní vlastnost proteinu Mdm2.

Předložený vynález se týká každého rekombinantního viru obsahujícího sekvenci nukleových kyselin kódujících sloučeninu schopnou se vázat k proteinu Mdm2 tak, aby vytvořil svůj onkogenní potenciál. V této souvislosti sekvence nukleových kyselin mohou kódovat jeden z peptidů, proteinů nebo transkripčních faktorů předem identifikovaných.

Tato sekvence nukleových kyselin kóduje scFv nebo peptid schopný interagovat na úrovni domény 1-134 (SEQ ID

N°1) proteinu Mdm2.

Výhodně viry použité v rámci vynálezu jsou přednostně defektivní, tudíž jsou neschopné se replikovat autonomním způsobem v infikované buňce. Všeobecně, genom defektních virů použitých v rámci předloženého vynálezu je tedy zbaven alespoň sekvencí nezbytných k replikaci výše uvedeného viru v infikované buňce. Tyto oblasti mohou být buď vyloučeny (úplně nebo zčásti), nebo učiněny nefunkční, nebo substituované jinými sekvencemi, zejména sekvencí kódující sloučeniny, které mají antagonistickou roli na onkogenní vlastnosti proteinu Mdm2. Defektní virus nicméně zachovává sekvence svého genomu, které jsou nezbytné k enkapsidaci virových částic.

Jedná se zejména o adenoviry, různé serotypy, jejichž struktura a vlastnosti se tak trochu mění, a které byly charakterizovány. Mezi těmito serotypy se přednostně používají v rámci předloženého vynálezu lidské adenoviry typu 2 nebo 5 (Ad2 nebo Ad5) nebo adenoviry zvířecího původu. V rámci předloženého vynálezu se mohou uvést adenoviry původu psího, hovězího, myšího (například: Mavl, Beard et al., Virology 75 (1990) 81) ovčího, prasečího, ptačího nebo také opičího (například: SAV). Adenovirus zvířecího původu je adenovirus psi zejména adenovirus CAV2 (souche manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800) například). V rámci předloženého vynálezu se přednostně používá adenovirus lidského původu nebo psího původu nebo jejich směs.

Defektní adenoviry podle předloženého vynálezu zahrnují ITR, sekvenci umožňující enkapsidaci a sekvenci kódující modulátor. V genomu adenoviru podle vynálezu gen E1 a alespoň jeden z genů E2, E4, L1-L5 jsou nefunkční. Uvažovaný virový gen může být zbaven nefunkčnosti všemi odborníky známými technikami a zejména totální supresí, substitucí, částečnou delecí nebo adicí jedné nebo více basí v určitém nebo určitých genech. Takové modifikace mohou být dosaženy in

vitro (na izolované DNA) nebo in situ například prostřednictvím technik genetického oboru nebo zase léčením prostřednictvím mutagenních agentů.

Rekombinantní defektní adenoviry podle předloženého vynálezu mohou být připraveny všemi odborníky známými technikami (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573, Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Zvláště mohou být připraveny obecnou rekombinací mezi adenovirem a plasmidem nesoucím mezi jiným sekvencí DNA kódující inhibitor ETS. Obecná rekombinace nastává po kotransfekci řečeného adenoviru a plazmidu v linii přizpůsobených buněk. Použitá buněčná linie musí přednostně (i) být transformovatelná výše uvedenými elementy a (ii) obsahovat sekvence schopné doplnit část genomu defektního adenoviru zejména v integrované formě, aby se zabránilo nebezpečí rekombinace. Jako příklad linie se může zmínit lidská ledvinová embrionární linie 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), která obsahuje zejména zahrnutou ve svém genomu levou část genomu adenoviru Ad5 (12%). Strategie konstrukce vektorů řízených adenoviry byly také popsány v přihláškách vynálezů n°FR 93 05954 a FR 93 08596.

Adenoviry, které jsou rozmnoženy, jsou získány a purifikovány podle klasických technik molekulární biologie, jak je naznačeno v příkladech.

Co se týče virů AAV, jedná se o viry DNA velikosti relativně malé, které se začleňují do genomu buněk, které jsou infikované, stabilně a regiospecificky. Jsou schopné infikovat široké spektrum buněk bez toho, aby měly vliv na indukci růstu, morfologii nebo diferenciaci buněk. Nezdá se, že jsou zahrnuty do patologií u lidí. Genom AAV byl klonován, sekvenován a charakterizován. Obsahuje okolo 47000 basí, a obsahuje na každém konci oblast obrácené repetice (ITR) se 145 basemi, sloužící jako původce replikace pro virus. Zbytek genomu je rozdělen na dvě hlavní části nesoucí enkapsidační

funkce: na levou část genomu, která obsahuje gen rep implikovaný do virové replikace a exprese virových genů a pravou část genomu, která obsahuje gen cap kódující kapsidové proteiny viru.

Použití vektorů odvozených od AAV pro přenos genů in vitro a in vivo bylo popsáno v literatuře (viz zejména WO 91/18088, WO 93/09239, US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Tyto přihlášky vynálezu popisují různé konstrukce odvozené od AAV, ve kterých geny rep nebo/a cap jsou deletovány a nahrazeny genem zájmu a popisuje jejich použití pro přenos in vitro (na buňkách v kultuře) nebo in vivo (přímo do organismu) výše uvedeného genu zájmu. Rekombinantní defektní AAV podle předloženého vynálezu mohou být připraveny kotransfekcí v buněčné linii infikované pomocným lidským virem (například adenovirem) plazmidu obsahujícího sekvenci kódující inhibitor ETS lemovaný dvěma oblastmi obrácené repetice (ITR) AAV a plazmidu nesoucího geny enkapsidace (geny rep a cap) AAV. Rekombinantní produkty AAV jsou pak purifikovány klasickými technikami.

Co se týče virů Herpes a retrovirů, konstrukce rekombinantních vektorů byla široce popsána v literatuře: viz zejména Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203, EP 453242, EP 178220, Bernstein et al., Genet. Eng. 7 (1985) 235, McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, atd. Zejména retroviry jsou integrované viry selektivně infikující buňky ve fázi dělení. Tvoří tak vektory zájmu pro rakovinové aplikace. Genom retrovirů zahrnuje zejména dvě LTR, sekvenci enkapsidace a tři kódované oblasti (gag, pol a env). V rekombinantních vektorech odvozených od retrovirů, geny gag, pol a env jsou všeobecně deletovány zčásti nebo úplně a nahrazeny heterologní sekvencí nukleové kyseliny zájmu. Tyto vektory mohou být vytvořeny od různých typů retrovirů takových, jako jsou zejména MoMuLv ("murine moloney leukemia virus", ještě nazvané MoMLV), MSV ("murine moloney sarcoma

virus"), HaSV ("harvey sarcoma virus"), SNV ("spleen necrosis virus") RSV ("rous sarcoma virus") nebo také Friendův virus.

Pro vytvoření rekombinantních retrovirů obsahujících sekvenci zájmu je všeobecně konstruován plazmid obsahující zejména LTR, sekvenci enkapsidace a uvedenou sekvenci zájmu, potom použit pro transfekci buněčné linie enkapsidace schopné přenést retrovirální vadné funkce do plazmidu. Všeobecně linie enkapsidace jsou tak schopné exprimovat geny gag, pol a env. Takovéto linie enkapsidace byly popsány ve vedlejších oborech, zejména linie PA317 (US 4,861,719), linie PsiCRIP (WO 90/02806) a linie GP+envAm-12 (WO 89/07150). Jinak rekombinantní retroviry mohou zahrnovat modifikace na úrovni LTR za účelem zrušení transkripční aktivity stejně jako rozsáhlou sekvenci enkapsidace obsahující část genu gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Rekombinantní retrovirální produkty jsou pak purifikovány klasickými technikami.

Ve vektorech vynálezu sekvence kódující sloučeninu, která má antagonistické vlastnosti vůči onkogenním vlastnostem Mdm2 je umístěn pod kontrolou signálů umožňujících svou expresi v tumorálních buňkách. Přednostně se jedná o signály heterologní exprese, tudíž o různé signály přirozeně odpovědné za expresi inhibitoru. Může se jednat zejména o sekvence odpovědné za expresi jiných proteinů nebo syntetické sekvence. Zejména se může jednat o sekvence promotoru eukaryontních genů nebo virových genů. Například se jedná o sekvence promotoru pocházející z genomu buňky, která se požaduje infikovat. Stejně se může jednat o sekvence promotoru vzniklého z genomu viru, tam obsahuje použitý virus. V tomto ohledu se mohou citovat například promotory E1A, MLP, CMV, LTR-RSV atd. Mimoto tyto sekvence exprese mohou být modifikovány adicí aktivačních sekvencí, sekvencí regulačních nebo sekvencí umožňujících expresi tkáňově specifickou. Může být zajímavé použití zejména signálů

exprese specificky aktivních nebo většinově aktivních v tumorálních buňkách tak, aby sekvence DNA byla nejen exprimovaná, ale i produkovala svým účinkem virus, který efektivně infikoval tumorální buňku.

Ve způsobu realizace se vynález týká rekombinantního defektního viru obsahujícího sekvenci cDNA kódující sloučeninu mající antagonistické vlastnosti na onkogenní charakter Mdm2 pod řízením virového promotoru, vybraného s výhodou mezi LTR-RSV a promotorem CMV.

Vždy v upřednostňovaném způsobu vynález se týká defektního rekombinantního viru obsahujícího sekvenci DNA kódující sloučeninu, která má antagonistické vlastnosti na onkogenní charakter Mdm2 pod řízením promotoru, který umožní většinovou expresi v tumorálních buňkách.

Exprese je považována jako většinová ve smyslu vynálezu i v tom případě, kdyby zbytková exprese byla pozorována v jiných buněčných typech, úrovně exprese jsou vyšší v tumorálních buňkách.

Předložený vynález se týká zejména nukleové sekvence kódující intracelulární protilátky nebo také scFV řízené proti oblasti 1-134 sekvence proteinu Mdm2 vyjádřené sekvencí SEQ ID N°1 pro přípravu farmaceutické kompozice určené všeobecně k léčení rakoviny.

Týká se také každé farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu schopnou inhibovat onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 nebo sekvenci nukleových kyselin kódujících takovouto sloučeninu. Podle způsobu realizace vynálezu tato kompozice zahrnuje jeden nebo více rekombinantních defektních virů takových, jaké byly dříve popsány. Tyto farmaceutické kompozice mohou být sestaveny z pohledu způsobu podávání: topikálně, orálně, parenterálně, intranasálně, intravenózně, intramuskulárně, podkožně, intraokulárně, intradermálně atd. Farmaceutické kompozice vynálezu přednostně obsahují

farmaceutické vehikulum vhodné pro injikovatelnou formulaci, především pro injikování přímo do tumoru pacienta. Může se jednat zejména o sterilní roztoky, izotonické roztoky nebo kompozice suché, zejména lyofilizované, které přidáním podle okolnosti sterilované vody nebo fyziologického séra umožňují konstituci injikovatelných roztoků. Injekce přímo do tumoru pacienta je výhodná, protože umožní soustředit terapeutický účinek přímo na úrovni postižené tkáně.

Dávky použitých rekombinantních defektních virů pro injikaci mohou být přizpůsobeny vzhledem k různým parametrům, zejména vzhledem k virovým vektorům, ke způsobu použitého podávání, k určité patologii nebo také délky zkoumaného ošetření. Všeobecně jsou rekombinantní adenoviry podle vynálezu formulovány a podávány ve formě dávek obsahující mezi 10^4 a 10^{14} pfu/ml, výhodněji 10^6 až 10^{10} pfu/ml. Termín pfu ("plaque forming unit") odpovídá infekční schopnosti roztoku virů a je určen infekcí vhodné buněčné kultury a počtem plaků infikovaných buněk po 48 hodinách. Techniky určení titru virového roztoku jsou dobře popsány v literatuře. Co se týče retrovirů, kompozice podle vynálezu mohou obsahovat přímo produkované buňky z pohledu jejich implantace.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu jsou zejména výhodné pro neutralizaci onkogenní aktivity proteinů Mdm2 a proto pro modulování proliferace určitých buněčných typů.

Zejména tyto kompozice jsou přijatelné pro léčení rakovin souvisejících s p53 nul jako například následující rakoviny: adenokarcinomů tračniku, rakoviny štítné žlázy, karcinomy plic, rakoviny prsu, rakoviny plic, rakoviny žaludku, rakoviny jícnu, lymphomy B, rakoviny ovarií, rakoviny močového měchýře, glioblastomy atd.

Předložený vynález je výhodně použit in vivo pro destrukci hyperproliferativních buněk (v proliferaci

nenormální). Je tak aplikovatelný pro destrukci tumorálních buněk nebo buněk hladkého svalstva vaskulární stěny (restenóza).

Následující obrázky a příklady blíže ilustrují vynález, aniž by však v jakémkoliv směru omezovaly jeho rozsah.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Znázornění proteinů Mdm2 A až F

Obrázek 2: Graf transfekce buněk Saos-2 s plazmidy exprimujícími různé proteiny Mdm-2

Obrázek 3: Schematické znázornění inhibice transformačních vlastností Mdm2 různými p53

Obrázek 4: Účinek silné exprese Mdm2 na buněčný cyklus

Obrázek 5: Účinek silné exprese Mdm2 na buněčný cyklus

Všeobecné techniky molekulární biologie

Metody klasicky používané v molekulární biologii jako je preparativní extrakce plazmidové DNA, odstředování plazmidové DNA v gradientu chloridu cesnatého, elektroforéza na agarosovém nebo akrylamidovém gelu, purifikace fragmentů DNA elektroelucí, extrakce proteinů fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu, srážení DNA v prostředí salinu ethanolem nebo isopropanolem, transformace v *Escherichia coli* atd. jsou odborníky dobře známé metody a jsou obsáhle popsány v odborné literatuře (Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982, Ausubel F.M. et al. (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987).

Za účelem vytvoření vazeb fragmenty DNA mohou být separovány podle jejich velikosti elektroforézou na agarosovém gelu nebo akrylamidovém gelu, extrahovány fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu, sráženy ethanolem, potom inkubovány v přítomnosti DNA-ligasy fágu T4 (Biolabs) podle doporučení dodavatele.

Doplňování vyčnívajících 5'konců může být provedeno

Klenowovým fragmentem DNA Polymerasy I Escherichia coli (Biolabs) podle doporučení dodavatele. Destrukce vyčnívajících 3'konců se provádí v přítomnosti DNA Polymerasy I fágu T4 (Biolabs) použité podle doporučení výrobce. Destrukce vyčnívajícího 5'konce se provádí působením nukleasy S1.

Mutagenese in vitro usměrňovaná syntetickými oligonukleotidy může být provedena podle metody vyvinuté Taylorem a kol. (Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764) za použití soupravy distribuované Amersham.

Enzymová amplifikace fragmentů DNA technikou řečenou PCR (Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R. K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354, Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350) může být provedena za použití "DNA thermal cycler" (Parkin Elmer Cetus) podle doporučení výrobce. Amplifikace genomické DNA se provádí zejména za následujících podmínek: 5 minut při teplotě 100°C, 30 jednominutových cyklů při teplotě 95°C, 2 minuty při teplotě 58°C, potom 3 minuty při teplotě 72°C prostřednictvím vhodných sond. Produkty amplifikace se analyzují elektroforézou na gelu.

Ověření nukleotidových sekvencí může být provedeno metodou podle Sangera a kol. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467) za použití soupravy distribuované Amersham.

Materiál a metody

1. Použité konstrukce

- plazmid pBKCMV je uvedený na trh Stratagenem a obsahuje gen rezistentní k neomycinu

- plazmidy pC53C1N3 a p53-4.2.N3 kódující divoký p53 a p53 R273H pocházejí od A. Levine (Hinds et al., Cell Growth

and Diff. (1990), 1, 571).

- plazmid pBKp53(R273H) obsahuje lidský minigen p53. Je získán od pD53-4.2.N3.

- plazmid pBKMdm2 byl získán klonováním v pBKCMV kazety, kódování spočívající v nevyjádřené oblasti konce sekvence kódující souvislý β -globin sekvence kódující mdm2.

- plazmid pGKhygro exprimuje gen resistantní k hydromycinu (Nature (1990) 348, 649-651).

- plazmid pCMVNeoBam umožňující expresi genu rezistentního k neomycinu (Hinds et al. (1990) Cell. Growth and Diff., 1, 571-580).

- plazmidy pCMVp107 a pCMVCD20 umožňující expresi proteinu p107 a označení povrchu CD20 (Zhu et al. (1993) Genes and Development, 7, 1111-1125).

- plazmidy pCMVE2F-4 a pCMVE2F-5 umožňující expresi proteinů E2F-4 a E2F-5 (Sardet et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sc., 92, 2403-2407).

- plazmidy pLexA, pLexA(6-41), pLexA(16-25) umožňující expresi DNA vazebné oblasti LexA (aa 1 až 87) volné nebo fixované s p53(6-41) nebo p53(16-25). pLexA(6-41) a pLexA(16-25) byly získány od plazmidu pLexApolyII vytvořeného LGME (Strasbourg).

- plazmidy eukariontní exprese p107: (p107(385-1068), p107(1-781) a p107(781-1068) (Zhu et al., EMBO J. 14 (1995) 1904).

- plazmid pSGK1HAp107 umožňuje expresi in vitro a in vivo p107. p107 je v souvislosti se sekvencí Kozak a epitop HA je exprimován ve fúzi k C-konci p107.

- plazmidy pBC-MDM2 a pBC-MDM2(1-134) byly získány klonováním MDM2 a MDM2(1-134) v pBC (Chatton et al.,

Biotechniques 18 (1995) 142).

- plazmidy pGex-MDM2 a pGex-MDM2(1-177) byly získány klonováním MDM2 a MDM2(1-177) v pGex.

2. Metoda:

Expres p53 je určena Westernem Blottingem na buněčném extraktu pomocí monoklonálních protilátek D01.

Expres mRNA kódující protein Mdm2 je určena semikvantitativní RT-PCR. Nepřítomnost kontaminace DNA je ověřena PCR.

Příklad 1: Prokázání transformovaných vlastností mdm2

Buňky Saos-2 jsou transfektovány buď plazmidem pBKMDM2, srovnávacím plazmidem pBKp53 (R273H) nebo srovnávacím plazmidem p53 negativním pBKCMV, potom vybrány na základě rezistence ke Geneticinu 418(G418).

V prvním pokuse, byly vybrány klony individuálně a rozmnoženy tak, že ve druhém pokuse neizolované klony byly umístěny do kultivační agarové půdy soft.

10^4 buněk bylo naočkováno dvojmo do 0,375% soft agaru. Po 24 hodinách se určil celkový počet kolonií s více než 50 buňkami a stejně i počet buněk každé kolonie (velikost kolonií). Každá udaná hodnota odpovídá průměru čtyř dvojmo provedených pokusů. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce I. Klony v pokusu n°1 odpovídající mdm2 jsou identifikovány jako M1 až M6, klony proteinu p53 (R273H) jako p53-1 až p53-6 a klony kontrolní jako Co1 až Co5.

Jak bylo očekáváno Co1 a Co4 neexprimují transfektovaný mdm2 a Co1-3 neexprimují protein p53.

Tabulka I:

			růst na kultivačním médiu agar soft, kolonie (velikost)	exprese	
				MDM2	P53
pokus 1 (izolované klony)	MDM2	M1	634 (100-600)	+	ND
		M2	594 (100-600)	++	ND
		M3	460 (100-600)	+	ND
		M4	310 (50-500)	++	ND
		M5	57 (50-200)	+/-	ND
		M6	23 (50)	+	ND
	kontrola	Co1	97 (50-200)	-	-
		Co2	68 (50-200)	ND	-
		Co3	35 (50-100)	ND	-
		Co4	11 (50)	-	ND
		Co5	4 (50)	ND	ND
	p53R (273)H	p53-1	190 (50-600)	ND	+++
		p53-2	137 (50-300)	ND	+++ +
		p53-3	88 (50-200)	ND	+++
		p53-4	53 (50-200)	ND	+++
		p53-5	47 (50-200)	ND	++
		p53-6	38 (50-100)	ND	+
pokus 2	MDM2	M-P1	395 (100-1000)	++	ND
	kontrola	Co-P1	21 (50-200)	ND	ND
		Co-P2	18 (50-200)	ND	ND

Tabulka I-pokračování:

			růst na kultivačním médium agar soft, kolonie (velikost)	exprese	
				MDM2	P53
pokus 3	MDM2	M-P1	255 (50-300)	ND	ND
		M-P2	220 (50-300)	ND	ND
	kontrola	Co-P1	110 (50-200)	ND	ND
		Co-P2	110 (50-200)	ND	ND
		Co-P3	100 (50-100)	ND	ND
		Co-P4	75 (50-100)	ND	ND

Příklad 2: Oblast N-konce Mdm2 (1-134) sekvence ID N°1 je nezbytná a dostatečná pro stimulaci růstu buněk Saos-2 na agaru soft.

Buňky Saos-2 jsou transfektovány buď s plazmidy pBKCV, které vyjadřují zároveň rezistenci neo a proteiny mdm-2 A až F popsané na Obrázku 1, anebo se srovnávacím plazmidem pBKCMV, potom vybrány na základě rezistence k G418. Zbylé buňky jsou shromážděny, amplifikovány a testovány pro tvorbu kolonií na agaru soft. Výsledky na Obrázku 2 jsou vyjádřeny počtem vytvořených kolonií na agaru soft vztažených k počtu mdm-2 (A). Tyto výsledky pocházejí ze dvou reprezentativních nezávislých pokusů transfekce, ve kterých mezi 3 a 7 jamkou byly testovány různé buňky, podle konstrukce. Jasně se ukázalo, že oblast N-konce mdm-2 má onkogenní vlastnosti. Nejúčinnější konstrukce odpovídá úplnému proteinu.

Pokus 3: Reverze onkogenních vlastností Mdm-2 divokým proteinem p53, mutantů proteinu p53 a fragmentů proteinu p53.

Část buněk Saos-2 transformovaných Mdm-2 je

kotransfektována s plazmidem pGKhygro a nebo pC53C1N3 (p53) pC53-4.2N3 p53(R(273)H, p53 (1-52), pLexA(6-41), pLexA(16-25), pLexA, p53(L14Q,F19S), p53(L22Q,W23S), nebo pCMVNeoBam, potom vybrána na základě rezistence k hydromycinu v přítomnosti G418. 10 0000 buněk pocházejících z 3 až 5 jamek nezávislých rezistentních buněk jsou zaočkovány dvojmo na agar soft (0,375%). Po 25 dnech kultivace byly sečteny kolonie, které obsahují alespoň 50 buněk. Obrázek 3 ukazuje výsledky reprezentativního pokusu a schematicky vyjadřuje různé testované p53 pro inhibici transformačních vlastností Mdm-2. Z tohoto pokusu vyplývá, že samotné konstrukce umožňují expresi proteinů schopných se vázat s proteinem mdm-2 případně s p53, p53 R273H, p53(1-52), LexA(6-41), LexA(16-25) inhibují onkogenní vlastnosti Mdm-2. Naproti tomu dvojnásobní mutanti, kteří jsou uvedeni, kteří ztratili svou schopnost vázat mdm-2 (Lin et al., Gene Dev., 1994, 8, 1235-1246) nemají účinek inhibitoru. Skutečnost, že mutant p53(14-19), který má zachované transaktivační vlastnosti divokého proteinu p53 neinhibuje transformaci proteinem Mdm-2 potvrzuje, že onkogenní vlastnosti proteinu Mdm-2 jsou nezávislé na inhibici transaktivačních vlastností proteinu p53 proteinem Mdm-2.

Příklad 4: Mdm-2 inhibuje blokaci G1 buněčného cyklu indukovaného p107 v buňkách Saos-2

Buňky Saos-2 jsou kotransfektovány se třemi typy plazmidů, (i) plazmidem pro expresi CD-20 (pCDVCD20, 2 µg, kódující značení povrchu buňky CD-20), (ii) plazmidem (9 µg) exprese typu CMV (promotor cytomegaloviru) bez kódované sekvence nebo kódujícím Mdm-2 (PBKCMVMdm2), oblast 1-134 Mdm-2 (PBKCMVdm2(1-134), E2F-4 nebo E2F-5 (pCMVE2F-4, pCMVE2F-5) a (iii) vektorem exprese p107 (pCMVp107, 9 µg). Buňky jsou pak zpracovány pro analýzu FACScan, jak popsal Zhu et al., Gene Dev., 1993, 7, 1111-1125). Výsledky

reprezentativního pokusu jsou uvedeny na Obrázku 4. Je jasné ukázáno, že v nepřítomnosti silně exprimovaného p107 exprese Mdm-2 nebo jeho oblasti 1-134 nemá vliv na buněčný cyklus. Naproti tomu exprese Mdm-2 a jeho oblastí 1-134 je schopná zrušit zastavení buněčného cyklu G1 indukovaného p107. Tento příklad jasně ukazuje, že Mdm-2 není jen inhibitor transaktivační aktivity proteinu p53, ale také pozitivní regulátor buněčného cyklu schopný inhibovat implikované faktory v řízení tohoto cyklu.

V podobném pokuse buňky Saos-2 byly kotransfektovány s 1 μ g p107(385-1068), 8 μ g pCMVNéoBam, 1 μ g pXJMDM2, 8 μ g pXJ41 a 2 μ g pCMVCD20. Výsledky reprezentativního pokusu jsou vyznačeny na Obrázku 5. Ukazují, že exprese MDM2 může ukončit blokaci G1 indukovanou p107 a mutantem delece p107(385-1068), který je schopný interagovat s MDM2.

Příklad 5: MDM2 interaguje in vitro a in vivo s p107

Tento příklad ukazuje fyzikální interakci mezi MDM2 a p107 in vitro a in vivo. Tyto výsledky jsou korelovány s aktivitou MDM2 na úrovni buněčného cyklu (příklad 4).

5.1. In vitro

p107 značený S35 in vitro je uveden v kontakt s proteinem GST-MDM2 (vektor pGex-MDM2) nebo GST-MDM2(1-177) (vektor pGex-MDM2(1-177)), které jsou imobilizovány na kuličkách glutathion sepharosy. P107 vázaný k MDM2 je potom detekován na polyakrylamidovém gelu autoradiograficky. Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce II.

5.2. In vivo

Buňky Cos jsou kotransfektovány s plazmidem pBC-MDM2 nebo pBC-MDM2(1-134), které exprimují proteinovou fúzi GTS-MDM2 nebo GST-MDM2(1-134) s plazmidem exprese p107 nebo

mutantem p107. Komplexy proteinů GST-MDM2-p107 pocházející z buněčných extraktů jsou izolovány na kuličkách glutathion sepharosy a proteiny p107 jsou detekovány pomocí Western blot s polyklonální protilátkou anti-p107 (santa Cruz p107-C18). Získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce II.

Tabulka II:

	p107	p107 (385-1068)	p107(1-781)	p107 (385-1068)
In Vivo				
GST-MDM2	+	+	+	+
GST-MDM2(1-134)	+	nd	nd	nd
In Vitro				
GST-MDM2	+	nd	nd	nd
GST-MDM2(1-177)	+	nd	nd	nd

Výsledky ukazují přítomnost interakce protein-protein mezi MDM2 a p107 in vitro, ale i v buňce. Oblast MDM2 nezbytná pro buněčnou transformaci (1-134) je oblast, která interaguje s p107. Tato oblast byla lokalizována, *jak bylo nalezeno*, zejména v části "kapsové oblasti", oblasti "A" a oblasti "mezerník".

Seznam sekvencí

(1) Všeobecné informace:

(i) podavatel:

(A) Jméno: RHONE-POULENC RORER S.A.

(B) Ulice: 20, Raymond ARON

(C) Město: ANTONY

(E) Země: Francie

(F) Směrovací číslo: 92165

(G) Telefon: 40.91.69.22

(H) Fax: (1) 40.91.72.96

(ii) podavatel:

(A) Jméno: INSTITUT DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

(B) Ulice: 101, Rue de Tolbiac

(C) Město: Paříž Cedex 13

(E) Země: Francie

(F) Směrovací číslo: 75654

(G) Telefon: 44.23.60.61.

(H) Fax: 45.85.68.56.

(ii) název vynálezu: Antagonisti onkogení
aktivity proteinu MDM2 a jejich použití v léčení rakovin

(iii) počet sekvencí: 2

(iv) způsob luštění počítačem:

(A) Typ nosiče: tape

(B) počítač: IBM PC kompatibilní

(C) systém využití: PC-DOS/MS-DOS

(D) logika: PatentIn Relase #1.0, Version
#1.30 (OEB)

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 1:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1476 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetická: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1476

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 1:

ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT GTA CCT ACT GAT GGT GCT GTA	42
Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Pro Thr Asp Gly Ala Val	
1 5 10	
ACC ACC TCA CAG ATT CCA GCT TCG GAA CAA GAG ACC CTG GTT	84
Thr Thr Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr Leu Val	
15 20 25	
AGA CCA AAG CCA TTG CTT TTG AAG TTA TTA AAG TCT GTT GGT	126
Arg Pro Lys Pro Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly	
30 35 40	
GCA CAA AAA GAC ACT TAT ACT ATG AAA GAG GTT CTT TTT TAT	168
Ala Gln Lys Asp Thr Tyr Thr Met Lys Glu Val Leu Phe Tyr	
45 50 55	

CTT GGC TAG TAT ATT ATG ACT AAA CGA TTA TAT GAT GAG AAG	210
Leu Gly Gln Tyr Ile Met Thr Lys Arg Leu Tyr Asp Glu Lys	
60 65 70	
CAA CAA CAT ATT GTA TAT TGT TCA AAT GAT CTT CTA GGA GAT	252
Gln Gln His Ile Val Tyr Cys Ser Asn Asp Leu Leu Gly Asp	
75 80	
TTG TTT GGC GTG CCA AGC TTC TCT GTG AAA GAG CAC AGG AAA	294
Leu Phe Gly Val Pro Ser Phe Ser Val Lys Glu His Arg Lys	
85 90 95	
ATA TAT ACC ATG ATC TAC AGG AAC TTG GTA GTA GTC AAT CAG	336
Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn Leu Val Val Val Asn Gln	
100 105 110	
CAG GAA TCA TCG TAC TCA GGT ACA TCT GTG AGT GAG AAC AGG	378
Gln Glu Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser Val Ser Glu Asn Arg	
115 120 125	
TGT CAC CTT GAA GGT GGG AGT GAT CAA AAG GAC CTT CTA CAA	420
Cys His Leu Glu Gly Gly Ser Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln	
130 135 140	
GAG CTT CAG GAA GAG AAA CCT TCA TCT TCA CAT TTG GTT TCT	462
Glu Leu Gln Glu Glu Lys Pro Ser Ser Ser His Leu Val Ser	
145 150	
AGA CCA TCT ACC TCA TCT AGA AGG AGA GCA ATT AGT GAT ACA	504
Arg Pro Ser Thr Ser Ser Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr	
155 160 165	
GAA GAA AAT TCA GAT GAA TTA TCT GGT GAA CGA CAA AGA AAA	546
Glu Glu Asn Ser Asp Glu Leu Ser Gly Glu Arg Gln Arg Lys	
170 175 180	
CGC CAC AAA TCT GAT AGT ATT TCC CTT TCC TTT GAT GAA AGC	588
Arg His Lys Ser Asp Ser Ile Ser Leu Ser Phe Asp Glu Ser	
185 190 195	
CTG GCT CTG TGT GTA ATA AGG GAG ATA TGT TGT GAA AGA AGT	630
Leu Ala Leu Cys Val Ile Arg Glu Ile Cys Cys Glu Arg Ser	
200 205 210	

AGT AGC AGT GAA TCT ACA GGG ACG CCA TCG AAT CCG GAT CTT	672
Ser Ser Ser Glu Ser Thr Gly Thr Pro Ser Asn Pro Asp Leu	
215 220	
GAT GCT GGT GTA AGT GAA CAT TCA GGT GAT TGG TTG GAT CAG	714
Asp Ala Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp Trp Leu Asp Gln	
225 230 235	
GAT TCA GTT TCA GAT CAG TTT AGT GTA GAA CCC GAA GTT GAA	756
Asp Ser Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu	
240 245 250	
TCT CTC GAC TCA GAA GAT TAT AGC CTT AGT GAA GAA GGA CAA	798
Ser Leu Asp Ser Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Glu Glu Gly Gln	
255 260 265	
GAA CTC CTA GAT GAA GAT GAT GAG GTA TAT CAA GTT ACT GTG	840
Glu Leu Ser Asp Glu Asp Asp Glu Val Tyr Gln Val Thr Val	
270 275 280	
TAT CAG GCA GGG GAG AGT GAT ACA GAT TCA TTT GAA GAA GAT	882
Tyr Gln Ala Gly Glu Ser Asp Thr Asp Ser Phe Glu Glu Asp	
285 290	
CCT GAA ATT TCC TTA GCT GAC TAT TGG AAA TGC ACT TCA TGC	924
Pro Glu Ile Ser Leu Ala Asp Tyr Trp Lys Cys Thr Ser Cys	
295 300 305	
AAT GAA ATG AAT CCC CCC CTT CCA TCA CAT TGC AAC AGA TGT	966
Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser His Cys Asn Arg Cys	
310 315 320	
TGG GCC CTT CGT GAG AAT TGG CTT CCT GAA GAT AAA GGG AAA	1008
Trp Ala Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Glu Asp Lys Gly Lys	
325 330 335	
GAT AAA GGG GAA ATC TCT GAG AAA GCC AAA CTG GAA AAC TCA	1050
Asp Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu Asn Ser	
340 345 350	
ACA CCA GCT GAA GAG GGC TTT GAT GTT CCT GAT TGT AAA AAA	1092
Thr Gln Ala Glu Glu Gly Phe Asp Val Pro Asp Cys Lys Lys	
355 360	

ACT	ATA	GTG	AAT	GAT	TTC	AGA	GAG	TCA	TGT	GTT	GAG	GAA	AAT	1134
Thr	Ile	Val	Asn	Asp	Ser	Arg	Glu	Ser	Cys	Val	Glu	Glu	Asn	
365					370					375				
GAT	GAT	AAA	ATT	ACA	CAA	GCT	TCA	CAA	TCA	CAA	GAA	AGT	GAA	1176
Asp	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Gln	Glu	Ser	Glu	
380					385					390				
GAC	TAT	TCT	CAG	CCA	TCA	ACT	TCT	AGT	AGC	ATT	ATT	TAT	AGC	1218
Asp	Tyr	Ser	Gln	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Ile	Tyr	Ser	
	395					400					405			
AGC	CAA	GAA	GAT	GTG	AAA	GAG	TTT	GAA	AGG	GAA	GAA	ACC	CAA	1260
Ser	Gln	Glu	Asp	Val	Lys	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	
		410					415					420		
GAC	AAA	GAA	GAG	AGT	GTG	GAA	TCT	AGT	TTG	CCC	CTT	AAT	GTC	1302
Asp	Lys	Glu	Glu	Ser	Val	Glu	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala	
			425					430						
ATT	GAA	CCT	TGT	GTG	ATT	TGT	CAA	GGT	CGA	CCT	AAA	AAT	GGT	1344
Ile	Glu	Pro	Cys	Val	Ile	Cys	Gln	Gly	Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	
435					440					445				
TGC	ATT	GTC	CAT	GGC	AAA	ACA	GGA	CAT	CTT	ATG	GCC	TGC	TGG	1386
Cys	Ile	Val	His	Gly	Lys	Thr	Gly	His	Leu	Met	Ala	Cys	Phe	
	450					455				460				
ACA	TGT	GCA	AAG	AAG	CTA	AAG	AAA	AGG	AAT	AAG	CCC	TGC	CCA	1428
Thr	Cys	Ala	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Arg	Asn	Lys	Pro	Cys	Pro	
	465					470				475				
GTA	TGT	AGA	CAA	CCA	ATT	CAA	ATG	ATT	GTG	CTA	ACT	TAT	TTC	1470
Val	Cys	Arg	Gln	Pro	Ile	Gln	Met	Ile	Val	Leu	Thr	Tyr	Phe	
		480					485				490			
CCC	TAG													1476
Pro	*													

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 2:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1182 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetická: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

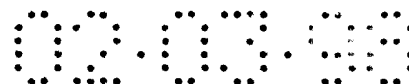
(B) umístění: 1...1182

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 2:

ATG GAG GAG CCG CAG TCA GAT CCT AGC GTC GAG CCC CCT CTG	42
Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu	
1 5 10	
AGT CAG GAA ACA TTT TCA GAC CTA TGG AAA CTA CTT CCT GAA	84
Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu	
15 20 25	
AAC AAC GTT CTG TCC CCC TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GAT	126
Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp	
30 35 40	
TTG ATG CTG TCC CCG GAC GAT ATT GAA CAA TGG TTC ACT GAA	168
Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu	
45 50 55	
GAC CCA GGT CCA GAT GAA GCT CCC AGA ATG CCA GAG GCT GCT	210
Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala	
60 65 70	
CCC CCC GTG GCC CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC	252
Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala	
75 80	

CCT	GCA	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	CCA	TCT	TCT	GTC	CCT	294
Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	
85					90				95					
TCC	CAG	AAA	ACC	TAC	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	336
Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	
100					105				110					
TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	378
Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	
115					120				125					
TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	GTC	AAG	ACC	420
Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	Leu	Ala	Lys	Thr	
			130					135				140		
TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	CCC	GGC	462
Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	
			145					150						
ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATG	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	504
Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	
155					160				165					
ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	546
Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	
170					175				180					
TCA	GAT	AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	588
Ser	Asp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	
185					190				195					
GTG	GAA	GGA	AAT	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	630
Val	Glu	Gly	Asn	Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	
			200					205				210		
ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT	GAT	CCG	CCT	GAG	672
Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	
			215					220						
GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAT	TAC	ATG	TGT	714
Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	
225					230				235					

AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC	756
Asn Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu	
240 245 250	
ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA CTG GGA	798
Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly	
255 260 265	
CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA	840
Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg	
270 275 280	
GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG	882
Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys Gly Glu	
285 290	
CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG	924
Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu	
295 300 305	
CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCC CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA	966
Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro	
310 315 320	
CTG GAT GGA GAA TAT TTC ACC CTT GAG ATC CGT GGG CGT GAG	1088
Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu	
325 330 335	
CGC TTC GAG ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC	1050
Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu	
340 345 350	
AAG GAT GCC CAG GCT GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT	1092
Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala	
355 360	
CAC TCC AGC CAC CTG AAG TCC AAA AAG GGT CAG TCT ACC TCC	1134
His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser	
365 370 375	
CGC CAT AAA AAA CTC ATG TTC AAG ACA GAA GGG CCT GAC TCA	1176
Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser	
380 385 390	
GAC TGA	1182
Asp *	



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití sloučeniny schopné antagonizovat alespoň částečně onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin v souvislosti s p53 nul.

2. Použití podle nároku 1 sloučeniny schopné se vázat na úrovní domény 1-134 sekvence proteinu Mdm2 vyjádřené SEQ ID N°1.

3. Použití podle jednoho z nároků 1 nebo 2 v y z n a -
č e n é t í m, že sloučenina je scFV řízená proti doméně 1-134 výše uvedeného proteinu Mdm2.

4. Použití podle jednoho z nároků 1 nebo 2 v y z n a -
č e n é t í m, že sloučenina je vyjádřena částečně nebo úplně peptidy 1-52, 1-41, 6-41, 16-25, 18-23 sekvence vyjádřené SEQ ID N°2 nebo jejich deriváty.

5. Použití podle nároku 1 sloučeniny schopné se vázat k doméně sousední doméně 1-134 vyjádřené SEQ ID N°1 proteinu Mdm2 a určující část tohoto spojení onkogenní aktivitu výše uvedeného proteinu.

6. Použití podle nároku 1 nebo 5 v y z n a č e n é
t í m, že sloučenina interaguje s oblastí C-konce proteinu Mdm2.

7. Použití podle nároků 1,5 nebo 6 v y z n a č e n é
t í m, že se jedná o transkripční faktor vybraný mezi TFII,

TBP a TAF250.

8. Použití podle nároku 1 nebo 5 v y z n a č e n é t í m, že sloučenina interaguje s oblastí 135-491 proteinu Mdm2.

9. Použití podle nároku 1,5 nebo 8 v y z n a č e n é t í m, že se jedná částečně nebo úplně o protein vybraný mezi proteiny Rb, L5 a transkripčním faktorem E2F.

10. Použití scFV řízeného proti oblasti 1-134 proteinu Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin.

11. Použití nukleové kyseliny kódující sloučeninu schopnou antagonizovat onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice určené k léčení rakovin v souvislosti s p53 nul.

12. Použití podle nároku 11 v y z n a č e n é t í m, že se jedná o:

- antimediatorové nukleové kyseliny
- oligonukleotidové ligandy schopné se fixovat přímo k oblasti proteinu Mdm2 a inhibovat jeho onkogenní aktivitu
- nukleové kyseliny kódující částečně nebo úplně peptidy nebo proteiny schopné oligomerizovat s jednou z oblastí Mdm2 a inhibovat jeho onkogenní aktivitu
- nukleové kyseliny kódující intracelulární protilátky řízené proti oblasti 1-134 sekvence proteinu Mdm2 vyjádřené

SEQ ID N°1.

13. Použití podle nároku 12 v y z n a č e n é t í m, že antimediatorová nukleová kyselina je DNA kódující komplementární RNA nukleové kyseliny kódující protein Mdm2 a je schopná blokovat jeho transkripci nebo/a jeho translaci (antimediatorová RNA) nebo ribozym.

14. Použití podle jednoho z nároků 11 až 13 v y z n a č e n é t í m, že nukleová kyselina je použita ve formě komplexu s DEAE-dextranem, s nukleárními proteiny nebo s lipidy nebo s kationickými polymery ve formě lipozomů nebo jako taková.

15. Použití podle jednoho z nároků 11 až 13 v y z n a č e n é t í m, že nukleová kyselina tvoří část vektoru.

16. Použití podle nároku 15 v y z n a č e n é t í m, že nukleová kyselina tvoří část virového vektoru vybraného mezi adenoviry, retroviry a viry AAV.

17. Virový vektor obsahující sekvenci nukleové kyseliny kódující sloučeninu schopnou inhibovat alespoň částečně onkogenní aktivitu proteinu Mdm2.

18. Virový vektor podle nároku 17 v y z n a č e n ý t í m, že sekvence nukleové kyseliny kóduje csFv nebo peptid schopný interagovat na úrovni domény 1-134 (SEQ ID N°1) proteinu Mdm2.

19. Virový vektor podle nároku 17 nebo 18 v y z n a-
č e n ý t í m, že je vybrán mezi adenoviry, retroviry a viry
AAV.

20. Virový vektor podle nároků 17 až 19 v y z n a č e-
n ý t í m, že se jedná o adenovirus nebo retrovirus.

21. Farmaceutická kompozice obsahující sloučeninu
schopnou inhibovat onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 takovou,
jak je definováno v nárocích 1 až 11.

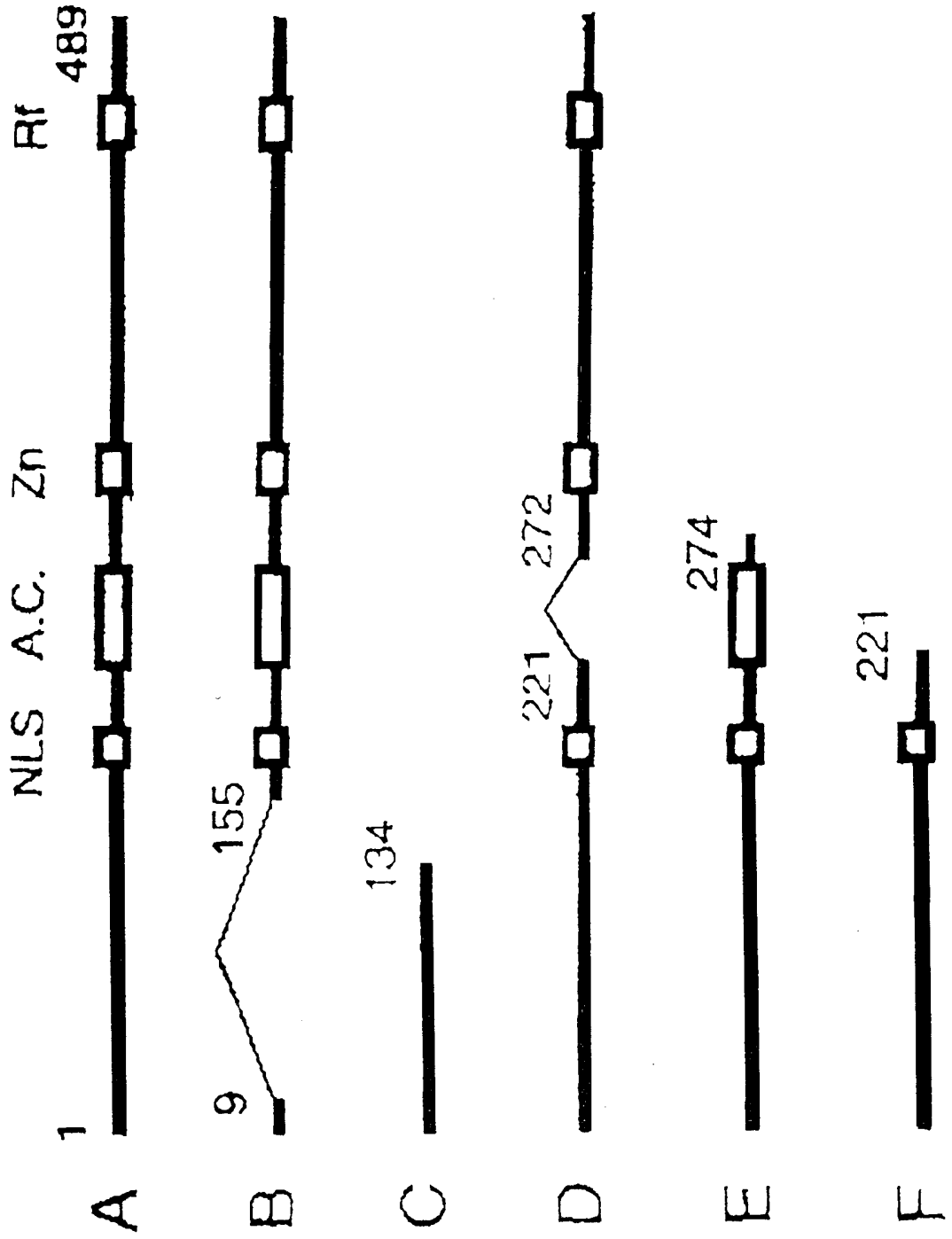
22. Farmaceutická kompozice obsahující sekvenci
nukleových kyselin kódující sloučeninu schopnou inhibovat
onkogenní aktivitu proteinu Mdm2 tak, jak je definováno v
nároku 12 nebo 13.

23. Farmaceutická kompozice podle nároku 22 v y z n a-
č e n á t í m, že obsahuje alespoň virový vektor podle
jednoho z nároků 14 až 20.

24. Kompozice podle nároku 23 vytvořená za účelem
intratumorálního podávání.

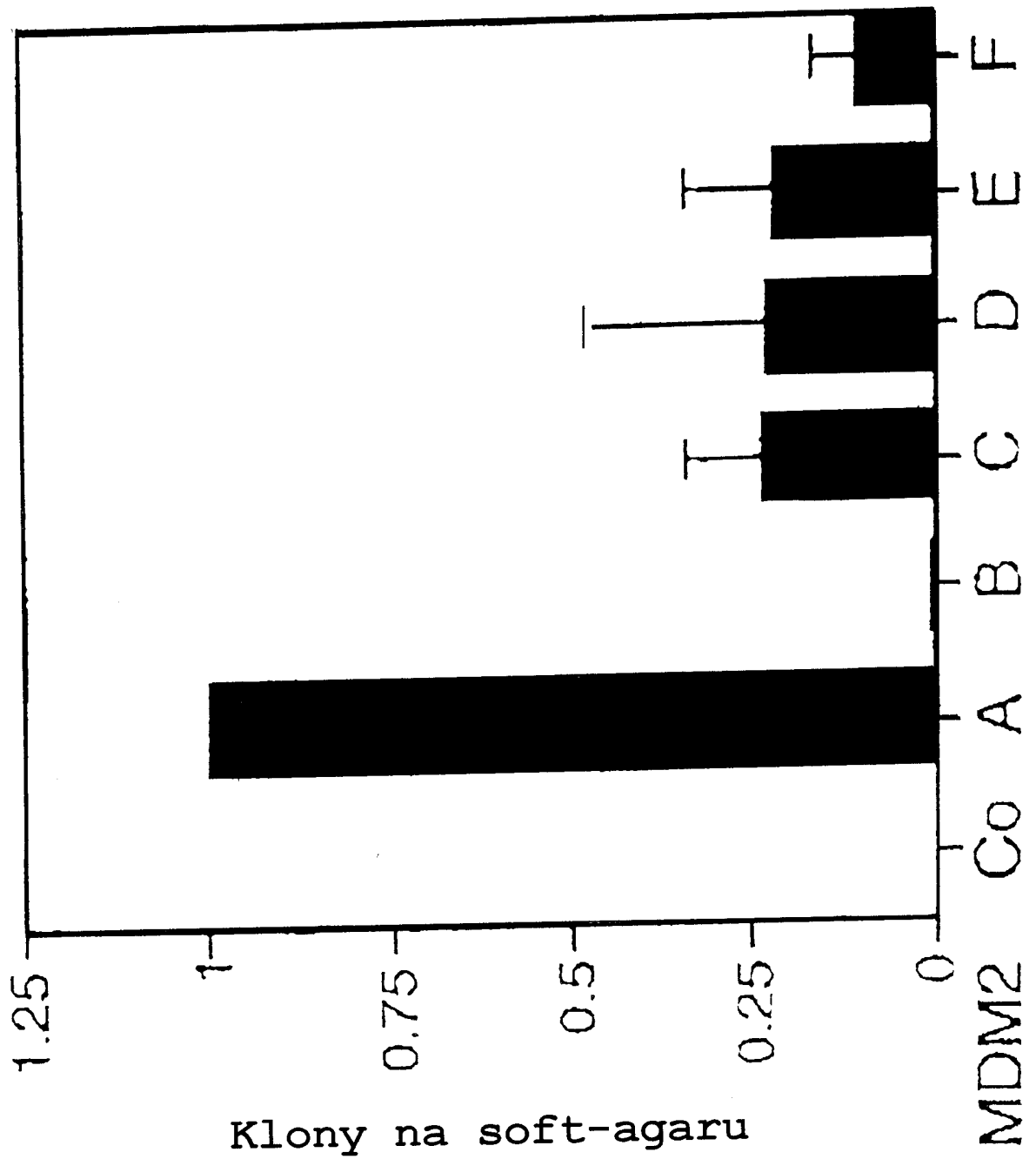
25. Použití nukleové sekvence kódující intracelulární
protilátky řízené proti doméně 1-134 (SEQ ID N°1) proteinu
Mdm2 pro přípravu farmaceutické kompozice určené k léčení
rakoviny.

1/5

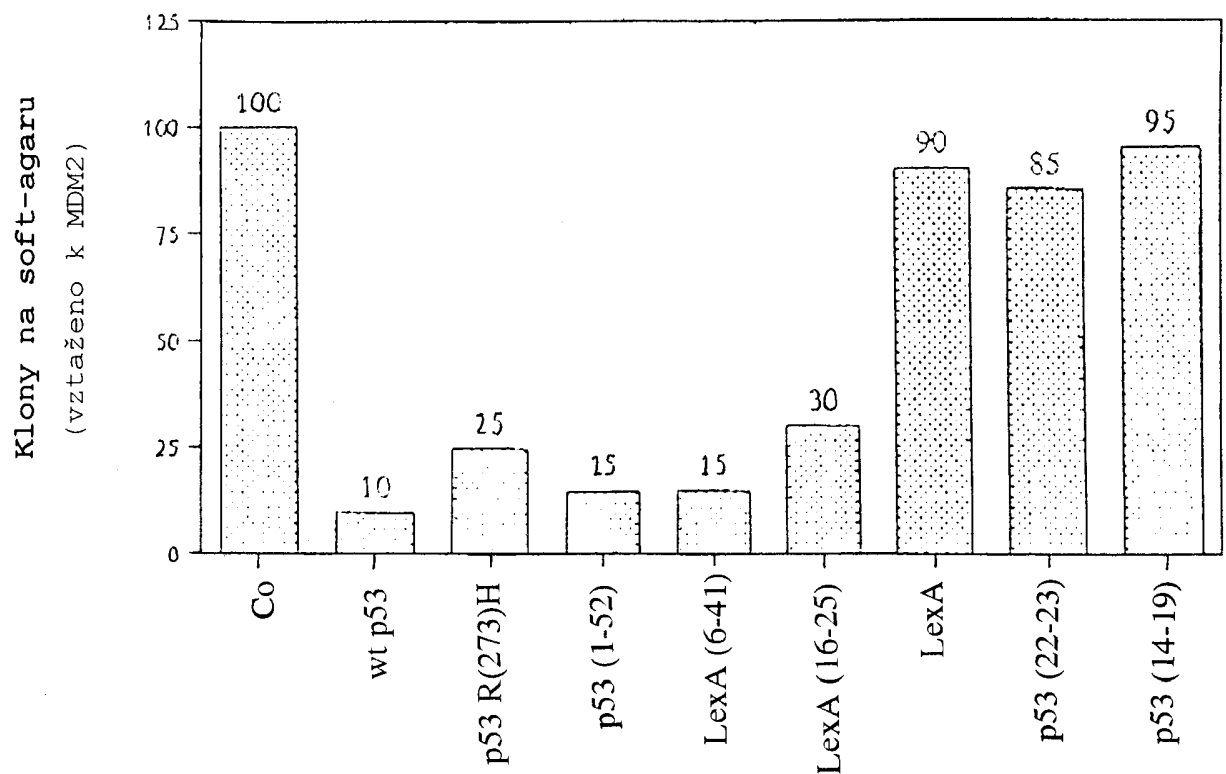
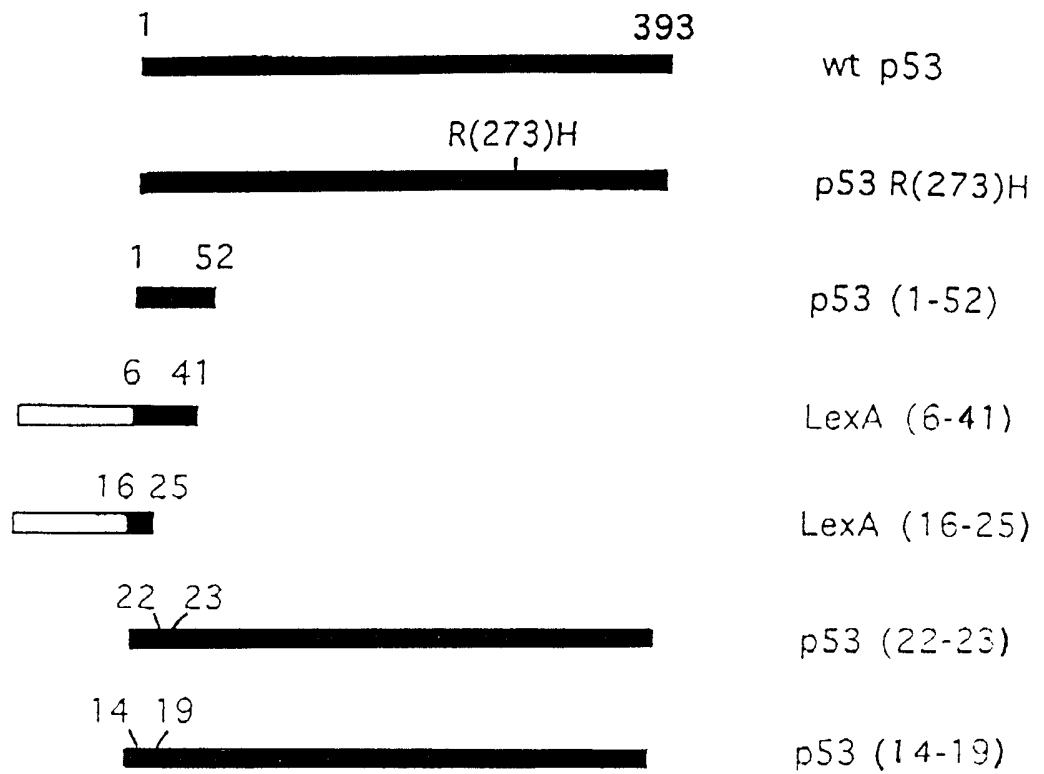


Obr. 1

2/5

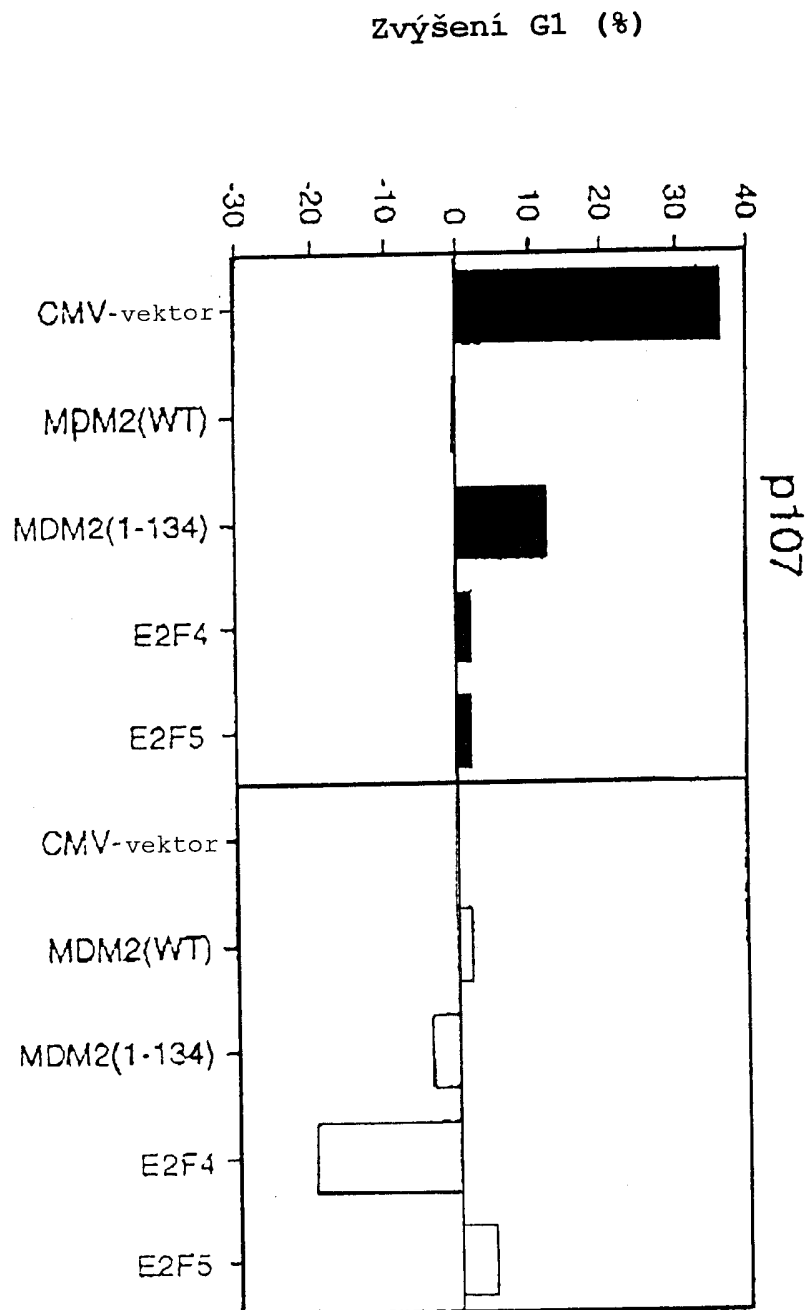


Obr. 2

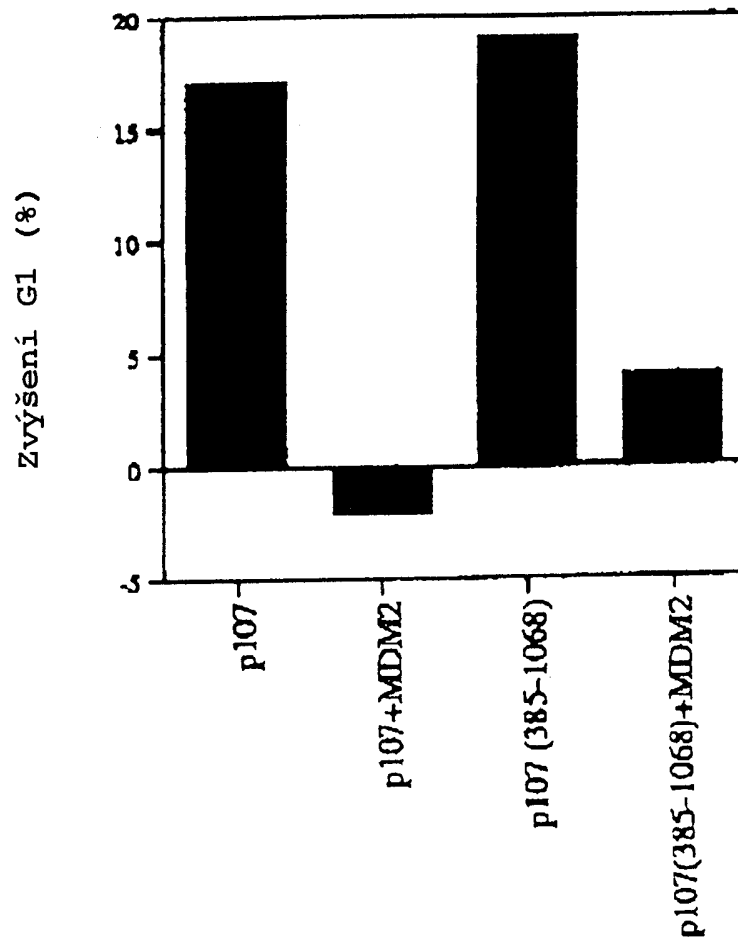


Obr. 3

4/5



Obr. 4



Obr. 5