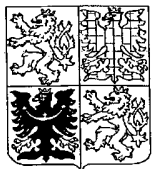


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 27.02.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 28.02.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/039266

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 16.02.2000
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: PCT/US98/03911

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/37901

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3061

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/12

C 12 P 19/34

C 07 H 21/04

A 61 K 31/70

A 61 P 19/02

(71) Přihlašovatel:

BOEHRINGER INGELHEIM
PHARMACEUTICALS, INC., Ridgefield, CT, US;

(72) Původce:

Tatake Revati J., Sandy Hook, CT, US;
Marlin Steven D., Sandy Hook, CT, US;
Barton Randall W., Farmington, CT, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdenka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Chimérní gen

(57) Anotace:

Terapeutické indukce apoptózy u aktivovaných zánětlivých buněk nebo buněk v místě zánětu lze dosáhnout zavedením do těchto buněk chimérního genu obsahujícího gen indukující apoptózu řízený promotorem inducibilního genu aktivovaného při zánětu a zesilující oblast promotoru, čímž se dosáhne selektivního působení na zánětlivé buňky. V jednom provedení obsahuje chimérní gen alespoň jednu zesilující oblast promotoru TNF α připojenou k funkční kopii minimálního TNF α a dále připojenou k alespoň jedné kopii genu indukujícího apoptózu, přičemž exprese genu je řízena promotorem TNF α . Připojení může být přímé, ve větší nebo menší vzdálenosti nebo kombinované. Příklady genů indukujících apoptózu jsou například kaspáza 3, kaspáza 4, kaspáza 5, granzym B. Chimérní gen TNFp-AIG se exprimuje s výhodou pouze u těch buněk, které produkují zánětlivý cytokin, TNF α . Navíc také sekvstruje chimérní gen TNFp-AIG inducibilní transkripční faktory TNFp, čímž snižuje endogenní produkci TNF α . Způsob výroby a použití chimérních genů způsobujících samovolně řízenou apoptózu a farmaceutických prostředků s jejich obsahem pro léčení zánětlivých onemocnění.

Chimérní gen

Oblast techniky

Vynález se týká terapeutické indukce apoptózy u zánětlivých buněk zavedením genu, který indukuje apoptózu (naprogramovanou smrt buňky nebo nenekrotickou smrt buňky) do těchto buněk. Gen indukující apoptózu (Apoptosis-Inducing Gene, bude také označován jako AIG) je řízen promotorem $\text{TNF}\alpha$ (TNFp) nebo jiným inducibilním genem aktivovaným při zánětu. V jednom provedení se apoptóza selektivně indukuje u těch buněk, které jsou schopné produkovat $\text{TNF}\alpha$. Gen TNFp-AIG nebo jiný chimérní gen může být pohodlně zaveden *in vivo* použitím běžných technik genové terapie. V provedení, kde chimérním genem je TNFp-AIG je exprimován pouze u těch buněk, které produkují zánětlivý cytokin $\text{TNF}\alpha$. Navíc, protože chimérní gen TNFp-AIG obsahuje prvky promotoru $\text{TNF}\alpha$, sekvestruje také inducibilní, TNFp-selektivní transkripční faktory. Tato sekvestrace vede ke snížení endogenní produkce $\text{TNF}\alpha$. Předkládaný vynález se týká zvláště genu TNFp-AIG a podobných genových konstruktů, buněk obsahujících chimérní geny, způsobů indukce apoptózy u buněk transfekovaných chimérními geny, farmaceutických prostředků obsahujících chimérní geny, způsobů selekce *in vitro* variant somatických buněk neprodukujících $\text{TNF}\alpha$ mezi populací buněk produkujících $\text{TNF}\alpha$ apod., a způsobu identifikace dominantně negativních/dominantně supresivních genů odpovědných za inhibici produkce $\text{TNF}\alpha$.

25

Dosavadní stav techniky

Při mnoha zánětlivých stavech se v nadbytku produkují cytokiny jako IL-1, IL-10, GM-CSF a $\text{TNF}\alpha$ jako důsledek masivní agregace

a akumulace zánětlivých buněk (Brennan F. M. a další, *British Medical Bulletin* 1995, 51/2, 368 - 384). Regulace způsobující nadměrnou produkci a/nebo nedostatečná regulace cytokinů v zánětlivé tkáni může být přímo nebo nepřímo odpovědná za vypuknutí chronických zánětlivých onemocnění. Například nejvýznamnější patologické změny při revmatoidní artritidě (RA) se vyskytují v místě lokálního zánětu (například synoviální klouby). Proto je pravděpodobné, že cytokiny produkované v synoviálních kloubech pacientů s revmatoidní artritidou mají důležitou úlohu při postupu onemocnění. Předpokládá se, že za devastující destrukce chrupavky a erozi kostí, které charakterizují revmatoidní artritidu, jsou z těchto cytokinů odpovědné IL-1 a $\text{TNF}\alpha$ (Dayer J. M. a další, *J. Exp. Med.*, 1985, 162, 1208 - 1215; Gowen M. a další, *Nature*, 1983, 306, 378 - 380). Přítomnost nadbytečných množství IL-1 a $\text{TNF}\alpha$ v synoviálních kloubech podle výzkumů urychluje vývoj kolagenem indukované artritidy u hlodavců (Brennan F. M. a další, *Clin. Exp. Immunol.* 1994, 97/1, 1 - 3). Nadměrná množství $\text{TNF}\alpha$ a IL-1 se vytvářejí v synoviální tkáni u řady typů buněk ve spojení chrupavka - pannus včetně buněk makrofágové linie, synoviocytů podobných makrofágům, aktivovaných T-buněk a možná i synoviocytů podobných fibroblastům (Chu C. Q. a další, *Arthritis & Rheumatism*, 1991, 34, 1125 - 1132; Deleuran B. W. a další, *Arthritis & Rheumatism*, 1992, 35, 1170 - 1178).

Navíc k výše popsaným účinkům při zánětech hraje $\text{TNF}\alpha$ všudypřítomnou a klíčovou úlohu v řadě událostí předcházejících zánětům, jako je indukce aktivity IL-1 v monocytech. Ve skutečnosti se ukázalo, že neutralizační protilátky proti $\text{TNF}\alpha$ snižují celkovou produkci IL-1 (Portillo a další, *Immunol.*, 1989, 66, 170 - 175; Brennan F. M. a další, *British Medical Bulletin*, 1995, 51/2, 368 - 384). Další prospěšnou vlastností navíc k blokování účinku zánětlivého cytokinu $\text{TNF}\alpha$ je snížení produkce stejně destruktivního mediátoru předcházejícího zánětům, IL-1. Navíc je dobře známo, že $\text{TNF}\alpha$ je

aktivátor transkripce jiných genů souvisejících se záněty. Například přítomnost $\text{TNF}\alpha$ stimuluje produkci jiných cytokinů (jako GM-CSF) a receptorů buněčného povrchu včetně HLA antigenů třídy II a adhezních molekul (Alvaro-Garcia J. M. a další, *J. Exp. Med.*, 1989, 146, 865 - 875), což vede k trvalé tvorbě aktivovaných T-buněk a neutrofilů, které způsobují synoviální zánět a hyperplasii a nakonec zvýšenou destrukci chrupavky a kosti (Allen J. B., *J. Exp. Med.*, 1990, 171, 231).

Konvenční terapie zaměřená proti zánětlivým onemocněním směřuje typicky proti symptomatickému zánětu. Tyto terapie poskytují pouze dočasné zmírnění, aniž by výrazně oddálily postup nemoci. Naopak způsoby léčení, jejichž cílem je $\text{TNF}\alpha$ a další faktory indukované při zánětlivém procesu jsou pravděpodobně slibnější. Například u zvířecích modelů artritidy indukované kolagenem protilátka proti $\text{TNF}\alpha$ a rozpustná chimérická molekula $\text{TNF}\alpha$ receptor-IgG účinně snižovaly otok tlapky, postižení kloubů a destrukci chrupavky a kosti (Williams R. O., a další, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89, 9784 - 9788). Pokusy na lidech s použitím jak humanizovaných protilátek proti $\text{TNF}\alpha$ a chimérních molekul receptor $\text{TNF}\alpha$ -IgG poskytly dramatické výsledky (Elliot M. J. a další, *Arthritis and Rheumatism*, 1993, 36, 1681 - 1690; Elliot M. J. a další, *Lancet*, 343, 1105 - 1110). Ačkoliv se zdá, že léčení těmito antagonisty $\text{TNF}\alpha$ je dobře snášeno, vede také ke tvorbě protilátek proti rekombinantním proteinům. Tyto způsoby léčení tedy nemusí být vhodné pro dlouhodobé léčení a nedosáhne se s nimi opravdového potlačení nemoci. Aby bylo dosaženo skutečné změny postupu onemocnění, $\text{TNF}\alpha$ musí být trvalým cílem s využitím způsobů léčení zaměřených na $\text{TNF}\alpha$. Takový terapeutický protokol je s uvedenými biologickými prostředky nepraktický a bylo by obtížné provádět dlouhodobé podávání.

Další možností léčení je chirurgické odstranění zaníceného synovia (Herold N. a Schroder H. A., *Acta Orthop. Scand.*, 1995, 66,

252 - 254; Ogilvie-Harris D. J. a Weisleder L., *Arthroscopy*, 1995, 11, 91 - 95), chemicky (Cruz-Esteban C. a Wilke W. S., *Bailliere's Clinical Rheumatol.*, 1995, 9, 787 - 801) nebo radiačně indukovaná synovektomie (Cruz-Esteban C. a Wilke W. S., *Bailliere's Clinical Rheumatol.*, 1995, 9, 787 - 801). Výsledky po artroskopické chirurgické synovektomii jsou dobré a vykazují zlepšení od předoperačního k pooperačnímu stavu. Nechirurgická synovektomie se provádí použitím různých chemických činidel jako je kyselina osmiová, alkylační činidla jako je Mechlorethamin (nitrogen mustard, Mustargen®) a thiotepa, methotrexát. Nechirurgické způsoby provádění synovektomie (včetně chemických a radiačních) jsou však komplikované, poskytují pouze krátkodobou úlevu a pouze místní snížení synoviální hyperplasie. Navíc je většina nechirurgických alternativ potenciálně teratogenních. Chemické poškození postižené tkáně při nechirurgické synovektomii stejně jako chirurgicky indukované poškození tkáně navíc často způsobuje zánětlivé odezvy na tato poškození samotná. Nakonec je třeba uvést, že tyto postupy přinášejí rizika vedlejších účinků běžně související s konvenční farmaceutickou terapií a invazivními chirurgickými postupy včetně vysokých nákladů a nepohodlí hospitalizace a rehabilitace.

Existuje tedy stále potřeba účinných léčebných postupů zánětlivých onemocnění obecně a revmatoidní artritidy zvláště.

Podstata vynálezu

Tento vynález umožňuje předcházet nevýhodám spojeným s dosavadními způsoby léčby zánětlivých onemocnění použitím nového přístupu k léčbě. Podle jednoho provedení předkládaného vynálezu se v zánětlivých buňkách produkujících TNF α selektivně indukuje apoptóza, což způsobí destrukci těchto buněk bez související zánětlivé reakce.

Jedním předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí způsobu léčení, který zahrnuje krok zavedení chimérního genu obsahujícího samoregulující gen indukující apoptózu (AIG). Produkce AIG je řízena promotorem jako je promotor $TNF\alpha$ (TNFp; viz obr. 1 a 2) a s výhodou zesilující sekvencí promotoru. Proto je exprimován ve všech a pouze v těch buňkách, které jsou schopné produkovat $TNF\alpha$.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí TNFp-AIG a podobných chimérních genových konstruktů, způsobu jejich výroby, způsobů jejich použití a prostředků s jejich obsahem.

Dalším předmětem vynálezu je způsob indukce apoptózy u buněk transfekovaných chimérním genem TNFp-AIG, způsob selekce variant somatických buněk neprodukujících $TNF\alpha$ *in vitro* v populaci, způsob identifikace dominantních/negativních genů odpovědných za vytvoření populace buněk neprodukujících $TNF\alpha$ a způsob identifikace produktů odpovědných za regulaci tvorby $TNF\alpha$ (obr. 10).

Tyto a další předměty budou zřejmé osobám s běžnými znalostmi v oboru na základě následujícího podrobného popisu vynálezu.

Tento vynález je založen na důkaze, že apoptóza zánětlivých buněk určitých zánětlivých onemocnění je terapeuticky prospěšná. Vynález se konkrétně týká genovou terapií samovolně řízené apoptózy. Podrobněji řečeno, při provedení vynálezu je připojen chimérní gen obsahující alespoň jednu zesilující sekvenci promotoru připojenou na alespoň jednu funkční kopii minimálního promotoru, kde promotorem je gen nebo kombinace genů aktivovaných v zánětlivých buňkách nebo v buňkách přítomných v místě zánětu, na alespoň jednu kopii genu indukujícího apoptózu (AIG) takovým způsobem, že exprese genu indukujícího apoptózu je řízena promotorem, a tím je zaměřena proti zánětlivým buňkám. Příklady promotorů inducibilních genů aktivovaných při zánětu jsou bez omezení cytokiny, interleukiny

a jejich receptory, molekuly buněčné adheze a jejich ligandy, chemokiny a jejich receptory, enzymy předcházející zánětu apod. Chiménní geny podle vynálezu obsahují zesilující sekvenci (enhancer), promotor a prvky AIG v přímém, vzdálenějším nebo bližším uspořádání a jejich kombinace. Jak je uvedeno výše a jak bude podrobněji popisováno dále, v některých provedeních se pro maximální účinek používá větší počet kopií zesilující sekvence, promotoru a/nebo AIG.

Aby bylo možno lépe porozumět předkládanému vynálezu, je uveden následující podrobný popis pouze pro účely ilustrace s důrazem na chiménní geny obsahující alespoň jednu zesilující sekvenci promotoru $TNF\alpha$ připojenou na alespoň jednu funkční kopii minimálního promotoru $TNF\alpha$ a dále připojenou k alespoň jedné kopii AIG. Ačkoliv následující příklady používají také těchto typů konstrukcí, odborníkům v oboru bude zřejmé, že základní popisované konstrukty mohou být měněny pro získání jiných provedení, která používají produkty, způsoby, metody a prostředky podle vynálezu s jinými promotory zahrnující indukibilní geny aktivované při zánětu jako jsou typy genů uvedených výše, které mají podobné funkce využitelné jako cílové buňky v místě infekce.

Například mezi cytokiny a interleukiny použitelné jako promotory při konstrukty chiménních genů podle vynálezu patří bez omezení $TNF\alpha$, $TNF\beta$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-2$, $IL-6$, $IL-9$, GM-CSF, interferon γ apod. a jejich funkční fragmenty a směsi. Mezi molekuly buněčné adheze a jejich ligandy patří bez omezení selektiny, integriny a členy třídy imunoglobulinů, jako je ICAM-1, V-CAM apod. a jejich funkční fragmenty a varianty a směsi. Mezi chemokiny a jejich receptory bez omezení patří látky ze skupiny C-X-C a C-C, jako jsou MIP-1 α , MIP-1 β , MCP1-4, RANTES, Mig, NAP2, IP10, Gro α - γ apod. a jejich funkční fragmenty a varianty a směsi. Enzymy předcházející zánětům jsou bez omezení COX-2, iNOS, fosfolipázy, proteázy (včetně metaloproteáz matrix) apod. a jejich funkční fragmenty a směsi.

Pro objasnění následující diskuse příkladů chimérních genů TNFp-AIG podle vynálezu jsou dále uvedeny následující sekvence:

5 SEQ ID No. 1 je nukleotidová sekvence odpovídající úplné, referenční sekvenci promotoru lidského TNF α publikovaná v (Takashiba S., a další, *Gene*, 1993, 131, 307 - 308). Číslo nukleotidů používaná v této přihlášce se týkají číslování uvedené sekvence.

10 SEQ ID No. 2 je sekvence promotoru nativního TNF α genu, který se používal v rámci předkládaného vynálezu (-1077 nukleotidů od místa počátku transkripce, TSS). Existuje několik odlišností v sekvenci TNFp u SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 2. Tyto rozdíly mezi nukleotidovými sekvencemi promotoru TNF α byly popsány (Takashiba S. a další, *Gene*, 1993, 131, 307 - 308).

15 SEQ ID No. 3 je nativní sekvence minimálního promotoru TNF α (nukleotidy -120 až -TSS, která obsahuje alespoň jeden zesilující prvek (místo k^o; viz Pauli, U., *Crit. Rev. in Eucaryotic Gene Expression*, 1994, 4, 323 - 344; Rhoades K. L., a další, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 22102 - 22107; a Takashiba S. a další, *Gene*, 1993, 131, 307 - 308).

20 SEQ ID No. 4 je chimérní gen TNFp120 AIG.1 (obsahující -120 TNFp řídící expresi varianty genu CPP32 s odstraněnou prodoménou (kaspáza 3, publikováno v Tewari M. a další, *Cell*, 1995, 81 (5), 801 - 809, s variací V239A).

SEQ ID No. 5 je chimérní gen TNFp706 AIG.1 (obsahující úsek -706TNFp řídící expresi genu CPP32 s odstraněnou prodoménou).

25 SEQ ID No. 6 je TNFp1005 AIG.1 (obsahující úsek -1005 TNFp řídící expresi genu CPP 32 s odstraněnou prodoménou).

SEQ ID No. 7 je chimérní gen TNFp120 AIG.2 (obsahující úsek -120 TNFp řídící expresi genu Ty/x s vypuštěnou prodoménou). (Sekvence Ty (kaspáza 5) a Tx (kaspáza 4) jsou publikovány v článku

Faucheu, C. a další, *Eur. J. Biochem.*, 236, 207 - 213, 1996; Faucheu, C., a další, *EMBO J.*, 14, 1914 - 1922, 1995.)

SEQ ID No. 8 je chimérní gen TNFp706 AIG.2 (obsahující úsek -706TNFp řídící expresi genu Ty/x s vypuštěnou prodomeňou.

5 SEQ ID No. 9 je gen TNFp1005 AIG.1 (obsahující oblast -1005TNFp řídící expresi genu Ty/x s odstraněnou prodomeňou).

SEQ ID No. 10 je zesilující oblast 1 (ER1) promotoru TNF α obsahující nukleotidy -1005 až -905.

10 SEQ ID No. 11 je zesilující oblast 2 (ER2) promotoru TNF α obsahující nukleotidy -706 až -517.

SEQ ID No. 12 je další z vícenásobných klonovacích míst (MCS) vytvořených genetickým inženýrstvím proti směru exprese minimálního promotoru TNF α -120 v konstruktu -120pGL3.

15 SEQ ID No. 13 je 3' nepřekládaná oblast (3'UTR) genu TNF α (Nedwin, G. E. a další, *Nucleic Acid Research*, 1985, 13, 6361 - 6373).

Prvky promotoru TNF α pro přípravu chimérního genu konstruktů podle tohoto vynálezu jsou zvoleny z prvků, které jsou schopny indukovat expresi terapeutického genu řízeného promotorem TNF α . Tyto prvky promotoru budou dále označovány jako „inducibilní cis prvky“, „cis inducibilní prvky“ nebo „zesilující prvky“ promotoru TNF α .

25 Zesilující prvky mohou být fyzikálně připojeny k sekvenci minimálního promotoru nebo odděleny od minimálního promotoru propojovací (linkerovou) sekvencí, která může nebo nemusí mít jedinečná štěpicí místa. Jak je tedy souhrnně uvedeno výše, zesilující prvky mohou být připojeny přímo, ve větší nebo menší vzdálenosti nebo v jakékoliv kombinaci těchto prvků k chimérním genům podle vynálezu. Ty se typicky konstruuji proti směru exprese promotoru. Příklady zesilujících prvků TNF α se uvádějí v SEQ ID No. 10 a SEQ ID No. 11; je možno použít funkčních částí nebo variant a jejich

kombinací. Mezi výhodné genové konstrukty podle předkládaného vynálezu patří konstrukty, které obsahují vícečetné kopie zesilujících prvků, tj. dvě nebo více kopií. Některá provedení mají přibližně 2 až 25, přesněji 2 až 10 a ještě přesněji 2 až 5 kopií.

- 5 Termíny „promotor TNF“, „promotor TNF α “, a „TNFp“ se používají zaměnitelně. Pokud není uvedeno jinak, označují tyto termíny celé nukleotidové sekvence odpovídající nativní minimální promotorové sekvenci TNF α připojené na jeden nebo více ve směru exprese umístěných zesilujících prvků (buď přirozeně přítomných, tj. nativních, 10 nebo vložených metodami genetického inženýrství v laboratořích). Příklady zahrnují bez omezení SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2 a SEQ ID No. 3 a jejich funkční části, varianty a směsi. Mnoho funkčních částí a variant těchto sekvencí TNF α a jiných zde popisovaných sekvencí sdílí sekvenční homologii alespoň přibližně 80 % a v některých 15 případech více než 90 % s jejich nativními a metodami genetického inženýrství získanými protějšky, které jsou však známy odborníkům v oboru a definovány v zde uvedených odkazech.

- V chimérních genech a zde popisovaných způsobech mohou být použity jakékoliv geny indukující apoptózu. Genem indukujícím 20 apoptózu využitelným v chimérních terapeutických genech podle předkládaného vynálezu může být gen stejný nebo odlišný od typu genu indukujícího apoptózu přítomného v nativní sekvenci zánětlivých buněk produkujících TNF α (pokud tyto buňky apoptický gen přirozeně obsahují). Výhodné AIG jsou bez omezení geny ze skupiny rodiny 25 ICE/CED3 proteáz indukujících apoptózu (jako je kaspáza-1 (ICE), hICE, ICE-LAP45, Mch2 α), kaspáza-2 (ICH1), kaspáza-3 (CPP32, Yama, Apopain), kaspáza-4 (TX, ICH2, ICE rel II), kaspáza-5 (ICE rel III, TY), kaspáza-6 (Mch-2), kaspáza-7 (Mch-3, ICE-LAP3, CMH-1), kaspáza-8 (MACH, FLICE, Mch-5), kaspáza-9 (ICE-LAP6, Mch6) 30 a kaspáza-10 (Mch4), geny z rodiny granzymů (jako je granzym A a granzym B), ligand Fas (FasL) a jejich funkční části, varianty

a směsi. Některá provedení používají kaspázu 3, kaspázu 4, kaspázu 5, granzym B a jejich funkční části, varianty a směsi. S výjimkou FasL tyto geny při nadměrné expresi po transfekci indukují apoptózu u transfekovaných buněk (Miura M. a další, *Cell*, 1993, 75, 653 - 660; Chinnayan A. M., a další, *Cell*, 1995, 81, 505 - 512; Los a další, *Nature*, 1995, 375, 81; Muzio a další, *Cell*, 1996, 85, 817 - 827).

V případě FasL je apoptóza indukována (buď autokrinním nebo parakrinním způsobem) pouze u těch buněk, které exprimují Fas. Proto konstrukt chimérického genu TNFp-FasL poskytuje druhou úroveň selektivity. Další výhodou chimérického genu TNFp-FasL je selektivní cílení těch buněk v synoviu, které neexprimují TNF α (a tím neřídí expresi genu indukujícího apoptózu), ale exprimují na svém povrchu Fas. V tomto případě bude FasL exprimován buňkami, které jsou schopny produkovat TNF α , jako jsou aktivované makrofágy a T-buňky.

15 Tyto buňky pak budou indukovat apoptózu u buněk exprimujících Fas, jako jsou rizikové aktivované T-buňky a synoviocyty exprimující Fas.

Předkládaný vynález poskytuje novou léčebnou metodu zahrnující krok zavedení chimérického genu obsahujícího gen indukující apoptózu (AIG) řízený promotorem TNF α (TNFp) do buněk savce.

20 Příklady chimérických genů podle vynálezu se uvádějí jako SEQ ID No. 4, 5, 6, 7, 8 a 9; je také možno použít funkčních částí nebo variant těchto genů. Aniž by si autoři přáli být vázáni teorií, jako důsledek řízení prostřednictvím TNFp se AIG exprimuje pouze v těch buňkách, které produkují zánětlivý cytokin TNF α . Proto budou jakékoli buňky

25 exprimující TNF α samodestruktivní, zatímco buňky, které TNF α neexprimují, zůstanou neovlivněné. Tohoto způsobu může být s výhodou použito pro zacílení jakýchkoli buněk produkujících TNF α (jako jsou aktivované makrofágy, aktivované T-buňky a synoviocyty podobné makrofágům a možná i synoviocyty podobné fibroblastům)

30 bez ohledu na typ buněk. Buňka produkující TNF α , která je cílem, může být samozřejmě buňka, která normálně nese nebo exprimuje

nebo nenese a neexprimuje gen pro apoptózu ve své přirozené, nezměněné formě. Proto je možno použitím chimérních genů a způsobů podle vynálezu vysoce selektivním způsobem zničit buněčné zdroje $\text{TNF}\alpha$.

- 5 Další výhodou použití chimérního genu TNFp-AIG podle předkládaného vynálezu je skutečnost, že TNFp sekvstruje transkripční faktory potřebné pro endogenní TNFp , což vede ke snížení endogenní tvorby $\text{TNF}\alpha$. V jednom výhodném provedení je TNFp přítomen v buňkách, které jsou terapeutickým cílem, ve
10 značném nadbytku. To může být dosaženo zavedením vícečetných kopií transfekovaného genu do buňky. Alternativně může obsahovat chimérní gen TNFp-AIG podle předkládaného vynálezu vícečetné kopie inducibilních prvků cis promotoru $\text{TNF}\alpha$. Jak je uvedeno výše, vícečetné kopie „inducibilních zesilujících prvků“ genu TNFp jsou
15 přítomny v některých provedeních chimérních genů TNFp-AIG podle předkládaného vynálezu. Zavedením vícečetných kopií inducibilních prvků cis konstrukt TNFp jsou exogenně zavedenou sekvencí sekvestrovány transkripční faktory nutné pro produkci $\text{TNF}\alpha$ v transfekovaných buňkách. Tento výhodný chimérní konstrukt TNFp-AIG je charakterizován zvýšenou účinností při soutěžení o TNFp -
20 specifické transkripční faktory ve srovnání s chimérními geny podle předpokládaného vynálezu, které obsahují pouze jediný zesilující prvek připojený k TNFp . Tento „inducibilní superpromotor“ zkonstruovaný uvedeným způsobem je schopný (1) efektivněji soutěžit
25 o inducibilní transkripční faktory specifické pro $\text{TNF}\alpha$ a (2) řídit expresi genu indukujícího apoptózu zvýšeným způsobem působením mnohočetných zesilujících prvků.

Ukázalo se například, že u pacientů s revmatoidní artritidou je klinicky prospěšná synovektomie, tj. odstranění synoviální tkáně. Na
30 rozdíl od konvenčních a chirurgických postupů synovektomie je způsob léčení zaměřený na buňky popisované v předkládaném vynálezu

zaměřen pouze na buňky produkující $\text{TNF}\alpha$. Výhodou tedy je, že zavedení a exprese chimérního genu TNFp-AIG a následná indukce apoptózy neindukuje zánětlivou odpověď. Způsoby podle vynálezu jsou tedy poměrně selektivní a vedou k minimálnímu poškození tkáně a zmenšení zánětu.

Produkty a způsoby popisované v předkládaném vynálezu jsou využitelné také pro léčení jiných zánětlivých onemocnění. Mezi tato zánětlivá onemocnění patří bez omezení roztroušená skleróza, syndrom Guillain-Barre, Crohnova nemoc, ulcerativní kolitida, lupénka, onemocnění způsobené reakcí hostitele na štěp, lupus erythematosus, diabetes mellitus závislá na inzulinu, psoriatická artritida, sarkoidóza, pneumonitida z přecitlivělosti, ankylózní spondylitida a příbuzné spondyloartropatie, Reiterův syndrom a systémová skleróza. Vynález tedy zahrnuje způsoby léčení zánětlivého onemocnění u pacienta

indukcí apoptózy u zánětlivých buněk nebo buněk v místě zánětu u pacienta zavedením alespoň jednoho chimérního genu podle vynálezu do buněk. Toho se typicky dosahuje přípravou farmaceutického prostředku obsahujícího alespoň jeden chimérní gen podle vynálezu a typicky farmaceuticky přijatelný nosič a podávání prostředku pacientovi standardními způsoby. V některých provedeních se farmaceutický prostředek podává přímo do místa zánětu s použitím místních, intravenózních, intraperitoneálních a podobných způsobů. Další způsoby budou diskutovány dále.

Navíc k terapeutickým indikacím mohou být geny a buňky podle předkládaného vynálezu použity v řadě metod systematického prohledávání (screeningu) a selekce. U jedné takové metody je možno provádět selekci *in vitro* variant somatických buněk neprodukujících $\text{TNF}\alpha$ v rámci populace buněk produkujících $\text{TNF}\alpha$ zavedením chimérního genu TNFp-AIG do buněčné populace produkující $\text{TNF}\alpha$. Buňky produkující $\text{TNF}\alpha$ podléhají apoptóze. Buňky, které $\text{TNF}\alpha$ neprodukují, přežijí. Selektce těchto variant buněk obsahujících fenotyp

pro přežití je snadnou cestou pro identifikaci buněk, které $\text{TNF}\alpha$ neprodukují. Takový způsob selekce může být použit pro určení exprese genů, které působí in-trans pro řízení aktivity promotoru $\text{TNF}\alpha$ a tím snižují produkci $\text{TNF}\alpha$. Tyto geny jsou charakterizovány

5 dominantními negativními (DN)/dominantními supresivními geny v jiných systémech (Behrends S a další, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 21109 - 21113; Zhang S a další, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 23934 - 23936; Watowich S. S., a další, *Mol. Cell Biol.*, 1994, 14/6, 3535 - 3549).

10 Při další metodě *in vitro* může být použit chimérní gen TNFp-AIG podle předkládaného vynálezu pro identifikaci dominantních negativních genů odpovědných za tvorbu populace buněk neprodukujících $\text{TNF}\alpha$. Podle této metody se zavede do buněk produkujících $\text{TNF}\alpha$ chimérní gen TNFp-AIG podle předkládaného

15 vynálezu. Kromě přítomnosti dominantního negativního genu by měly tyto buňky po aktivaci podléhat apoptóze. Proto je možno vyvodit, že přežívající varianty mají dominantní negativní gen schopný regulovat tvorbu $\text{TNF}\alpha$ směrem ke snížení. Tento dominantní negativní gen může být snadno identifikován vytvořením knihovny cDNA

20 a transfekováním buněčných linií (například Jurkat a THP-1). Tyto buňky jsou buď stabilní transfektanty nebo buňky TNFp-AIG transfekované inducibilním chimérickým genem TNFp-AIG nebo genem TNFp-luciferáza a bude prováděna jejich selekce na fenotyp vedoucí k přežití po aktivaci *in vitro*; fenotyp vedoucí k přežití ukazuje

25 na vliv genů DN. V buňkách transfekovaných genem TNFp-luciferáza bude ukazovat na vliv genů DN snížení aktivity luciferázy. Dominantní negativní geny identifikované s použitím tohoto protokolu mohou být použity samy jako budoucí terapeutické prostředky. Tyto geny budou kandidáty na genovou terapii vedoucí ke snížení produkce $\text{TNF}\alpha$.

30 Metody využívané pro přenos genů jsou uspořádány do dvou širokých kategorií:

1. Přímý přístup: Transdukce terapeutického genu *in situ* do cílových buněk jako jsou synoviocyty s použitím vhodného vektoru jako nosiče terapeutického genu. Vektor obsahující terapeutický gen se vstříkne přímo do postižené oblasti (například artritického kloubu).

5 2. Nepřímý přístup: Transfekce terapeutického genu *ex vivo* do cílových buněk jako jsou synoviocyty. V tomto přístupu se z kloubů vyjme synovium, synoviocyty se izolují a kultivují *in vitro*. Buňky kultivované *in vitro* se transfekují terapeutickým genem a geneticky modifikované synoviocyty se transplantují zpět do synovia.

10 Pro přenos *in vivo* bylo testováno několik vektorů na jejich schopnost dodat gen do buňky (Nita, a další, *Arthritis & Rheumatism*, 1996, 39/5, 820 - 828). Mezi vektory používanými pro genovou terapii jsou nejrozvinutější vektory odvozené od retrovirů. Jsou schopny vnášet genetický materiál do hostitelského genomu a produkovat

15 stabilní transfektanty. Tyto vektory jsou však neschopné infikovat buňky, které se nedělí, a protože jsou vloženy do genomu hostitele, nelze vyloučit možnost inzerční mutagenese. Ve srovnání s těmito vektory infikují vektory odvozené z adenovirů buňky, které se nedělí i

20 buňky, které se dělí a vkládají DNA epizomálně. Nevýhoda vektorů založených na adenovirech spočívá v tom, že tyto vektory pokračují v produkci virových proteinů v infikovaných buňkách, čímž se tyto buňky stávají potenciálně antigenní. Třetí typ vektorů založený na virech je odvozený z virů Herpes simplex (HSV), který je schopen rovněž infikovat dělící se buňky i buňky, které se nedělí.

25 Mezi nevirovými vektorovými systémy byly testovány kationtové lipozomy a čistá plazmidová DNA. Lipozomy jsou v nejpokročilejším stupni vývoje, ačkoliv některé typy buněk jako jsou buňky svalů a kůže, přijmou a exprimují čistou plazmidovou DNA.

30 Je také možný systém vnášení genů zprostředkovaný částicemi (Rakhmievich, a další, *PNAS*, 1996, 93, 6291), přičemž tento přístup je do budoucnosti poměrně slibný.

Pro vnášení chimérních genů podle vynálezu do genu „*in vivo*“ mohou být použity následující protokoly:

(1) Nita, a další, *Arthritis & Rheumatism*, 1996, 39/5, 820 - 823

5 Experimenty na králících *in vivo*:

Každý vektor se nastříkne intraartikulárně do jednoho kolenního kloubu. Pro virové vektory se do jednoho kloubu nastříkne mezi 10^8 a 10^9 částic suspendovaných v 0,5 ml fyziologického roztoku.

10 Do jednoho kolenního kloubu se nastříknou komplexy lipozom - DNA (200 nmol DC-Chol v komplexu s 20 μ g DNA/ml) v 1 ml fyziologického roztoku.

(2) *Methods in Molecular Medicine: Gene Therapy Protocols*, Paul Robbins, ed., 1997, Barr a další, str. 205 - 212

15 Vnášení vektoru založeného na adenoviru do hepatocytů: hepatocyty krysy 1×10^{11} PFU na 100 g hmotnosti zvířete.

U psů (12 - 17 kg) se promývá portální žíla přibližně $1,5 \times 10^{11}$ PFU/kg, což poskytne jednu kopii genomu adenoviru na diploidní kopii hostitelské DNA.

20 U králíků (2 - 4 kg) poskytne $1,5 \times 10^{13}$ částic viru ($1,5 \times 10^{11}$ PFU) 100 % transdukci hepatocytů; 4×10^{12} částic viru poskytne 50 - 75 % transdukci.

Yang N. S., a další, 281 - 296.

25 Vnášení genu prostřednictvím částic zlata: transfekce kožní tkáně savce množstvím 0,1, 0,5, 1,0 a 2,5 μ g DNA/mg částic poskytuje lineární úměrnost s úrovní transgenní exprese.

Nabel, a další, 297 - 305.

Vnášení genu prostřednictvím lipozomů u lidí:

Protokol 1: 15 nmol lipozomů DC-Chol/Dope kombinovaných s 1 µg DNA v 0,7 ml. 0,2 ml výše uvedené směsi se nastříkne do melanomové uzliny pacienta. Pro vnášení katétrem se do tepny
5 nastříkne 0,6 ml roztoku.

Protokol 2: 15 nmol lipozomů DMRIE/Dope kombinovaných s 5 µg DNA v 1,0 ml.

Pro přímé intratumorové injekce se používají rozmezí koncentrací DNA od 3 µg v komplexu s 4,5 nM DMRIE/Dope do 300 µg
10 v komplexu s 450 nM DMRIE/Dope.

(3) Roessler, a další, 369 - 374

Přenos genu do synovia:

Používá se rozmezí dávek 10^9 - 10^{12} částic adenoviru
15 obsahujících terapeutický gen na jeden kloub. Optimální dávka pro případné konkrétní řady experimentů musí být určena empiricky a závisí jak na vlastnostech použité rekombinantní genomické kostry adenoviru, tak i na exprimovaném cizím genu.

V případě nepřímého přístupu byla vyvinuta řada způsobů
20 včetně použití transfekce založené na kationtovém lipidu nebo kationtovém polymeru a elektroporace.

Jakákoliv z výše uváděných technik může být změněna, aby vyhovovala konkrétním potřebám odborníka v oboru. Tyto modifikace spadají do rámce znalostí odborníků s obvyklou zkušeností v oboru
25 a nevyžadují nadměrného rozsahu experimentů. Tyto varianty jsou tedy v rámci vynálezu zřejmé.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 se schematické znázornění chimérních genů podle předkládaného vynálezu. Gen indukující apoptózu (AIG) může být jakýkoliv z uvedených genů, přičemž na tyto geny není omezen, viz
5 kaspázy 1 až 10, granzym B, ligand Fas a další.

Obr. 2 je schematické znázornění výsledků genové terapie s použitím chimérních genů TNFp-AIG podle předkládaného vynálezu.

Obr. 3 je souhrnné znázornění delečních konstruktů použitých pro identifikaci inducibilních prvků cis promotoru $TNF\alpha$ s využitím
10 exprese luciferázového genu (Luc) jako reporterového systému.

Obr. 4 (a a b) ukazuje souhrn výsledků dosažených s použitím konstruktů popsaných v obr. 3. Tranzientní exprese konstruktů byla zjišťována u dvou různých buněčných linií produkujících $TNF\alpha$, viz Jurkat (obr. 4a) a THP-1 (obr. 4b). Histogramy v obou obrázcích
15 ukazují index stimulace jako měřítko inducibility aktivačních prostředků jako je PMA (obr. 4a) nebo LPS (obr. 4b) pro jednotlivé experimenty. Čára proložená u každého obrázku ukazuje střední míru inducibility jako průměr ze čtyř až šesti experimentů.

Obr. 5 ke schéma přípravy TNFp-AIG s použitím vybraných
20 nativních prvků promotoru $TNF\alpha$ a genů AIG s odstraněnou prodomeňou (použitými AIG jsou kaspáza a kaspáza 4/5).

Obr. 6 (a, b a c) ukazuje souhrn výsledků z reprezentativních experimentů prováděných pro zjištění exprese chimérních genů TNFp-AIG. Apoptóza u tranzientně transfekovaných buněk Jurkat (obr. 6a
25 a 6b) a THP-1 (obr. 6c) byla testována testem Cell Death Elisa (test CDE). Ve všech třech obrázcích znázorňují vzestupně šrafované histogramy řízení transfekce, přičemž na buňky působilo transfekční činidlo v nepřítomnosti DNA. Histogramy šrafované sestupně znázorňují prvky TNFp řízenou expresi luciferázového genu a prázdné
30 histogramy znázorňují expresi řízenou stejnými prvky TNFp buď AIG.1

nebo AIG.2. Čísla v závorkách nad prázdnými histogramy udávají faktor obohacení (poměr apoptózy indukované TNFp-AIG k apoptóze indukované kontrolním vektorem TNFpLuc.

Obr. 7 (a a b) je diagram znázorňující chimérní gen TNFp-AIG podle předkládaného vynálezu obsahující mnohočetné kopie inducibilních prvků cis promotoru $\text{TNF}\alpha$, který zase řídí expresi AIG (obr. 7a). Na obr. 7b je ukázán diagram chimérního genu TNFp-AIG obsahující mnohočetné kopie inducibilních prvků cis promotoru $\text{TNF}\alpha$, řídící expresi AIG, přičemž ve směru exprese je 3'-nepřekládaná oblast genu $\text{TNF}\alpha$ (TNF3' UTR). 3'UTR genu $\text{TNF}\alpha$ se předpokládá při regulaci inducibilní exprese $\text{TNF}\alpha$ (Han, J., a další, *J. Immunology*, 1991, 146, 1843 - 1843, Crawford, E. K., a další, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 21120 - 21137, a obr. 9).

Obr. 8 (a a b) jsou schémata přípravy chimérních konstruktů superpromotor $\text{TNF}\alpha$ -AIG.

Obr. 9 znázorňuje souhrn výsledků dvou experimentů s cílem ukázat regulační účinek TNF3'UTR na inducibilní expresi luciferázového reporterového genu. Tranzientní transfekce byla prováděna ve fibroblastové buněčné linii. Tečkované histogramy znázorňují inducibilitu TNFpLuc v nepřítomnosti TNF3'UTR a prázdné histogramy znázorňují inducibilitu TNFpLuc v přítomnosti TNF3'UTR. Podobných výsledků se dosahuje u buněk Jurkat.

Obr. 10 je diagram znázorňující selekci variant somatických buněk neprodukujících $\text{TNF}\alpha$ uvnitř populace buněk produkujících $\text{TNF}\alpha$ a identifikaci dominantních negativních supresivních genů odpovědných za inhibici tvorby $\text{TNF}\alpha$.

Příklady provedení vynálezu

Pro lepší porozumění předkládanému vynálezu se uvádějí následující příklady. Tyto příklady jsou pro účel ilustrace některých výhodných provedení předkládaného vynálezu a nemají být
5 považovány za jakýmkoli způsobem omezující rozsah vynálezu.

Příklad 1

Příprava konstruktů TNFp-AIG

Pro konstrukci chimérního genu AIG, jehož exprese je řízena
10 zesilujícími prvky cis promotoru TNF, buď ve formě jedné kopie nebo více kopií stejné oblasti nebo různých oblastí, byla provedena identifikace zajímavých oblastí odpovědných za optimální inducibilní expresi reporterového genu.

15 Selekce prvků promotoru TNF- α pro konstrukci chimérního genu

Oblasti promotoru TNF- α se amplifikují polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s použitím primerů obsahujících různé deleční konstrukty promotoru TNF- α (obr. 3). Oblasti identifikované jinými
20 výzkumníky v různých jiných buněčných systémech se používají jako reference (Rhoades, a další, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 22102 - 22107; Leitman, a další, *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12, 1352 - 1356; Pauli U., *Crit. Reviews Eukaryotic Gene Expression*, 1994, 4, 323 - 344). Geny amplifikované PCR se potom klonují proti směru exprese reporterového genu jako je luciferáza do komerčně dostupného
25 vektoru bez promotoru. Tyto konstrukty se testují na schopnost konstitutivní a inducibilní exprese v různých buněčných liniích jako je Jurkat (T-lymfoblastoid), U973 (myelomonocytová), THP-1 (monocytová), bí fibroblastech a lidských synoviocytech kultivovaných in vitro. Identifikace oblastí odpovědných za inducibilní expresi
30 reporterového genu je primárně založena na výsledcích získaných

pomocí dvou buněčných linií produkujících $\text{TNF}\alpha$ jako Jurkat (po stimulaci PMA) a THP-1 (po stimulaci LPS), obr. 4a a b. Tyto buňky se tranzientně transfekují použitím známých způsobů a komerčně dostupných činidel, jako je například DEAE dextran a Superfect. Prvky

5 cis promotoru $\text{TNF-}\alpha$, které jsou odpovědné za inducibilní expresi reporterového genu, se potom používají pro konstrukci chimérních genů TNFp-AIG .

Konstrukce chimérních genů TNFp-AIG

10 Z popisovaných genů indukujících apoptózu jsou výhodné následující geny:

i) cysteinová proteáza - CPP32 (známá také jako Yama, apopain nebo kaspáza 3) a

ii) cysteinová proteáza Tx/Ty (kaspáza 4/kaspáza 5)

15 Geny AIG se používají jako zkrácené geny s odstraněnou prodoménou s cílem potenciálně potlačit autokatalýzu kaspáz. To je nezbytné pro konverzi inaktivní kaspázy na aktivní formu.

CPP32 s odstraněnou prodoménou se amplifikuje použitím primerů odpovídajících kodonům 29 - 36 a 271 - 278 (278 je stop

20 kodon). Zkrácená forma CPP32 se zde označuje jako „ αCPP32 “ nebo „AIG.1“.

Pro amplifikaci PCR Ty s odstraněnou prodoménou se syntetizují primery odpovídající sekvencím v genu Ty. Všechny dosud objevené kaspázy jsou homologické s jinými členy rodiny kaspáz.

25 Primer 3' odpovídající kodonům 359 - 365 (kodon 365 je stop kodon) má 100 % sekvenční homologii s kodony 372 - 378 (kodon 378 je stop kodon) v genu Tx. 5' primer odpovídající kodonům 81 - 87 genu Ty však nemá 100 % homologii s odpovídající oblastí genu Tx (kodony 94 - 100 genu Tx). Zbytek 87 (alanin) v genu Ty se liší od zbytku 100

30 (glycin) genu Tx. Produkt amplifikovaný PCR vytvořený z cDNA

připravené z aktivovaných lidských lymfocytů periferní krve obsahuje sekvenci Tx v důsledku zjevně vyššího relativního zastoupení transkriptů Tx. Proto zkrácená forma genu AIG vytvořená s použitím syntetických oligonukleotidových primerů odpovídajících sekvencím v genu Ty samozřejmě zachovává sekvence v Tx, i když jsou obklopeny sekvencemi Ty primerů. Sekvence Ty použitých primerů se také shodují se sekvencí Tx kromě jednoho kodonu. Gen používaný v předkládaném vynálezu se tedy shoduje se zkráceným genem Tx se změněným G na A v poloze 100. Tento gen se zde označuje jako „ΔTy/x“ nebo „AIG.2“.

AIG.1 a AIG.2 se vkládají po směru exprese promotoru $TNF\alpha$ náhradou luciferázového reporterového genu v delečních konstruktech (-120, -706 a -1005) promotoru $TNF\alpha$ (obr. 5). Tyto konstrukty se testují na indukci apoptózy po stimulaci tranzientně infikovaných buněk Jurkat a THP-1 (obr. 6a, b a c).

Konstrukce chimérických genů superpromotor $TNF\alpha$ -AIG

Pomocí PCR se amplifikují dvě široké výhodné oblasti ER1(-1005 až -905) (SEQ ID No. 10) a ER2(-706 až -517) (SEQ ID No. 11) promotoru $TNF\alpha$ obsahující prvky odpovědné za inducibilní expresi výše popsaného reporterového genu (obr. 4a a 4b), které se ligují proti směru exprese za minimální nativní promotor (-120 až TSS, SEQ ID No. 3), buď jako jediná kopie nebo jako více kopií. Ještě dvě další oblasti (-234 až -120) a (-234 až -65) promotoru $TNF\alpha$ jsou také identifikovány jako potenciální zesilující oblast 3 (ER3) a zesilující oblast 4 (ER4), které mohou být použity v chimérických konstruktech s použitím dále popisovaných strategií. Superpromotor obsahuje větší množství (2 až 10) kazet výše uvedených oblastí obsahujících prvky inducibilního promotoru (obr. 7). To se dosahuje amplifikací PCR potřebných oblastí s použitím primerů syntetizovaných s restričními místy vloženými na 5'-konec každého primeru. Tato jedinečná

restrikční místa obklopují amplifikovaný genový produkt, kterého je zapotřebí. S výhodou se gen AIG amplifikovaný PCR klonuje po směru exprese vzhledem k TNF (superpromotor, nahrazuje luciferázový reporterový gen v původním popisovaném konstrukt) (obr. 5) pro
 5 nativní promotor $\text{TNF}\alpha$.

Schémata konstrukce superpromotoru $\text{TNF}\alpha$ a linkerových sekvencí představujících jedinečná restrikční místa (tato restrikční místa nejsou ve vybraných úsecích promotoru $\text{TNF}\alpha$ a v příslušném AIG přítomna) pro účinnou směrovou inzerci se uvádějí níže a jsou
 10 znázorněna v obr. 8:

Schéma 1:

Krok 1: Vložení minimálního promotoru $\text{TNF}\alpha$ (-120 až TSS) do základního (bez promotoru) luciferázového vektoru pGL3 (Promega):

15 Prvky základního vektoru pGL3, které se používají pro konstrukci chimérního genu TNFp-AIG , jsou uvedeny dále.

—KpnI.SacI.MluI.NheI.SmaI.XhoI.BglII.HindIII.[luciferáza].XbaI—

Minimální promotor se amplifikuje PCR použitím primerů
 20 obsahujících štěpicí místa XhoI a BglII.HindIII tak, že místo XhoI je na 5' konci a místa BglII.HindIII jsou na 3' konci amplifikovaného produktu. Tento fragment se vloží do polylinkeru základního vektoru pGL3 použitím stejných restrikčních míst. Tento konstrukt se označuje jako „konstrukt A1“ a má následující strukturu:

25

—KpnI.SacI.MluI.NheISmaIXhoI.(-120 až TSSBglII).HindIII.[luciferáza]
 .XbaI—

Krok 2: Zesilující fragment (ER1 nebo ER2) se amplifikuje PCR použitím primeru obsahujícího několik restrikčních míst. Získaný fragment bude obsahovat restrikční místa KpnI.AatII.BssHII na 5' konci a místa NsiI.SpeI.MluI na 3' konci v následujícím uspořádání:

5 5'KpnI.AatII.BssHII.(ER1 nebo ER2).NsiI.SpeI.MluI 3'.

Fragment se vloží do „konstrukt A1“ vytvořeného v kroku 1 pomocí restrikčních míst KpnI a MluI. Tento konstrukt se označuje jako „konstrukt B1“ a má následující strukturu:

10 —KpnI.AatII.BssHII.(ER1 nebo ER2).NsiI.SpeI.MluI.NheI.SmaI.XhoI
(-120 až TSS BglII).HindIII.[luciferáza].XbaI—

Krok 3: Zesilující fragment $\text{TNF}\alpha$ (ER1 nebo ER2) se amplifikuje použitím primerů obsahujících restrikční místa AatII a
15 BssHII pro vytvoření následujícího produktu PCR:

5'AatII.(ER1 nebo ER2).BssHII 3'.

Tento fragment se klonuje do „konstrukt B1“ pomocí stejných restrikčních míst. Tento konstrukt se označuje jako „konstrukt C1“ a má následující strukturu:

20 —KpnI.AatII.(ER1 nebo ER2).BssHII.(ER1 nebo ER2).NsiI.SpeI.
MluI.NheI.SmaI.XhoI (-120 až TSS BglII).HindIII.[luciferáza].XbaI—

Krok 4: Zesilující fragment $\text{TNF}\alpha$ (ER1 nebo ER2) se amplifikuje použitím primerů obsahujících restrikční místa NsiI a SpeI
25 pro vytvoření následujícího produktu PCR:

5'NsiI.(ER1 nebo ER2).SpeI 3'.

Tento fragment se bude klonovat do „konstruktu C1“ pomocí stejných restrikčních míst. Tento konstrukt se označuje jako „konstrukt D1“ a má následující strukturu:

5 —KpnI.AatII.(ER1 nebo ER2).BssHII.(ER1 nebo ER2.NsiI.SpeI.
MluI.NheI.SmaI.XhoI (-120 až TSS BglII).HindIII.[luciferáza].XbaI—

Krok 5: Kódující oblasti AIG.1 nebo AIG.2 (s výhodou, ale bez omezení na AIG.1 a AIG.2; je možno použít jakéhokoli uvedeného
10 AIG) se amplifikují PCR použitím primerů obsahujících restrikční místa BglII a XbaI za vytvoření následujícího fragmentu:

5'BglII.(AIG.1 nebo AIG.2).XbaI 3".

Fragment se vloží do „konstrukt D1“ použitím stejných
15 restrikčních míst. Výsledný konstrukt se označuje jako „konstrukt E1“
a má následující strukturu:

—KpnI.AatII.(ER1 nebo ER2).BssHII.(ER1 nebo ER2.NsiI.(ER1 nebo
ER2).SpeI.MluI.NheI.SmaI.XhoI(-120 až TSS.BglII)[AIG.1 nebo AIG.2].
XbaI—

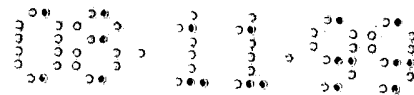
20 Alternativně může být schéma 2 následující:

Schéma 2

Krok 1: Stejný jako ve schématu 1, vzniká následující „konstrukt
A1“:

25

KpnI.SacI.MluI.NheI.SmaI.XhoI.(-120 až TSS BglII).HindIII.[luciferáza]
.XbaI



Krok 2: Vložení dalšího MCS.

Syntetizují se dva komplementární oligonukleotidy (5'-fosforylované) použitím komerčních zdrojů za získání
—NheI.SacII.EcoRV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.PvuII.XhoI— Tyto

5 oligonukleotidy se teplotně hybridizují a potom klonují do míst NheI a XhoI „konstrukt A1“. Získaný konstrukt se označuje jako „konstrukt B2“ a má následující strukturu:

10 —KpnI.SacI.MluI.NheI.SacII.EcoRV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.PvuII.XhoI.
(-120 až TSS BgIII).HindIII.[luciferáza].XbaI—

Krok 3: Zesilující fragment $TNF\alpha$ (ER1 nebo ER2) se amplifikuje pomocí primerů obsahujících restrikční místa SpeI.PvuII na 5'-konci a XhoI na 3'-konci za vytvoření následujícího produktu PCR:

15 5'SpeI.PvuII.(ER1 nebo ER2).XhoI 3'. Tento fragment se klonuje do „konstrukt B2“ použitím restrikčních míst SpeI a XhoI. Uvedený konstrukt se označuje jako „konstrukt C2“ a má následující strukturu:

20 —KpnI.SacI.MluI.NheI.SacII.EcoRV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.PvuII.(ER1 nebo ER2).XhoI.(-120 až TSS BgIII).HindIII.[luciferáza].XbaI—

Krok 4: Zesilující fragment $TNF\alpha$ (ER1 nebo ER2) se amplifikuje použitím primerů s restrikčními místy AvrII.SpeI na 5'-konci a PvuII na 3'-konci za vytvoření produktu PCR: 5' AvrII.SpeI.(ER1 nebo ER2). PvuII 3'. Tento fragment se klonuje do „konstrukt C2“ použitím restrikčních míst AvrII a PvuII. Tento konstrukt se označuje jako „konstrukt D2“ a má následující strukturu:

25

—KpnI.SacI.MluI.NheI.SacII.EcoRV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.(ER1 nebo ER2)PvuII.(ER1 nebo ER2)XhoI.(-120 až TSS BglII).HindIII. [luciferáza].XbaI—

Tak je možno použitím této strategie přidat postupně alespoň
5 sedm kopií zesilujících oblastí (ER1, ER2 nebo ER3, jednotlivě nebo v kombinaci) použitím dalšího restrikčního místa proti směru exprese vzhledem k předcházejícímu restrikčnímu místu při amplifikaci PCR zesilujících oblastí podle výběru.

Jakmile se přidá požadovaný počet kopií zesilujících oblastí,
10 vloží se AIG po směru exprese vzhledem k superpromotoru, jak se popisuje v kroku 5 schématu 1.

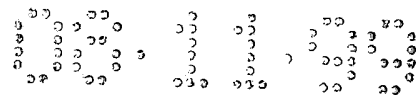
Inducibilní exprese chimérního genu TNFp-AIG se testuje
tranzientní transfekcí výše uvedených buněčných linií. Exprese genu TNFp-AIG se měří detekcí apoptózy transfekovaných buněk,
15 testováním proteinů exprimovaných AIG pomocí westernového přenosu použitím komerčně dostupných protilátek a měřením aktivity proteázy pomocí komerčně dostupného, dobře popsaneého specifického syntetického tetrapeptidového substrátu.

Inducibilní exprese chimérního genu TNFp-FasL se testuje
20 tranzientní transfekcí stejných buněčných linií. Exprese FasL na povrchu buněk transfekovaných buňkami se kvantitativně stanoví použitím vazby protilátky proti FasL při detekci nepřímou imunofluorescencí a měřením indukce apoptózy Fas-pozitivních buněk.

25

Regulace exprese reporterového genu řízeného TNFp

3' nepřekládaná oblast genu TNF α má důležitou úlohu při regulaci biosyntézy TNF α . Účastní se translační exprese genu TNF α v normálních, neaktivovaných stavech. Je důležité, že tyto prvky
30 dovolují derepresi, jestliže jsou buňky produkující TNF α aktivovány



vnějšími podněty (Han, J. a další, *J. immunology*, 1991, 146, 1843 - 1848; Crawford, F. K., a další, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 22383 - 22390).

5 Připravují se genetické konstrukty, ve kterých je celá 3' nepřekládaná oblast (SEQ ID No. 13) vložena ve směru translace vzhledem k luciferázovému genu řízenému delečními fragmenty, výše, -120, -706 a -1005 promotoru TNF α . Výsledky tranzientní exprese těchto konstruktů jsou souhrnně uvedeny v obr. 9.

10 Příklad 2

Protokoly testů

Metody in vitro

Stanovení luciferázy: aktivita luciferázy se stanoví pomocí komerčně dostupných činidel (Promega).

15

Genová exprese AIG.1 a AIG.2:

a) westernové přenosy transfekovaných buněčných lyzátů se vyvíjejí protilátkou proti CPP32 a protilátkou proti PRAP. Protilátka proti PRAP detekuje jak hydrolyzované, tak i nehydrolyzované
20 produkty PRAP působením CPP32.

b) stanovení enzymu CPP32: tento test detekuje enzymatickou reakci CPP32 a rozpad kolorimetrického nebo fluorogenního substrátu. Pro stanovení se používá komerčně dostupného kitu (Clonotech, Pharmingen).

25 c) apoptóza transfekovaných buněk: apoptóza transfekovaných buněk působením AIG.1 a AIG.2 se stanovuje barvením jader propidiumjodidem (Krishan, A., *J. Cell Biol.*, 66, 1994, 188 - 193), a komerčně dostupným kitem Cell Death Elisa (Boehringer, Mannheim).

Modely na zvířatech

Králičí model artritidy indukované IL-1 (Pettipher E. T., a další, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, 83, 8749 - 8753): IL-1 se nastříkne do
5 kolenních kloubů novozélandských bílých králíků. Intraartikulární injekce IL-1 způsobí infiltraci leukocytů závislou na dávce do kloubního prostoru a ztrátu proteoglykanu z artikulární chrupavky.

Artritida indukovaná antigenem: Intraartikulární injekce antigenu (vaječný albumin) do kolenních kloubů indukuje akumulaci leukocytů
10 a degradaci chrupavky, která silně připomíná revmatoidní artritidu u lidí. Otok kloubu po injekci přetrvával 14 dnů.

Model lidských synoviocytů na scid-myši (Hourí, J. M., a další, *Current Opinions in Rheumatol.*, 1995, 7, 201 - 205; Sack, U., a další, *J. Autoimmunity*, 1995, 9, 51 - 58; Geiler, T., a další, *Arthritis &*
15 *Rheumatism*, 1994, 37, 1664 - 1671): nedávno byly vyvinuty modely artritidy, u kterých se implantuje čerstvá synoviální tkáň pacientů s revmatoidní artritidou s normální lidskou chrupavkou do myši scid buď podkožně, nebo do ledvinového pouzdra (Geiler T. a další, *Arthritis & Rheumatism*, 1989, 37, 1664 - 1671) nebo do kolenních
20 kloubů (Sack, U., a další, *J. Autoimmunity*, 1995, 9, 51 - 58). Implantáty rostou způsobem podobným artritidě včetně tvorby tkáně pannus s vysokou hustotou buněk, erozí kosti a chrupavky, vyvinutím vícejaderných obřích buněk a invazí synoviálních fibroblastů do chrupavky.

25 Nepřímá metoda: synoviocyty se transfekují in vitro terapeutickým genem a transplantují zpět králíkům. U těchto králíků se indukuje artritida nastříknutím IL-1 a stanovuje se exprese terapeutického genu po aktivaci. Exprese chimérního genu indukovaná aktivací indukuje u transplantovaných buněk apoptózu.

Přímá metoda: intraartikulární injekce chimérních genů. Je možno použít jakéhokoli výše popsaného způsobu vložení genů včetně čisté plazmidové DNA a vložení pomocí kationtových lipozomů. Pro použití dodávání genů pomocí virálních vektorů se chimérní geny klonují do vhodných vektorů. Tyto vektory se potom modifikují delecí eukaryontního promotoru přítomného v uvedených vektorech. Potom je možno provést intraartikulární injekci terapeutických genů vložených do vhodných vektorů pro zjištění terapeutických i preventivních účinků.

10 Příklad 3

Selekce variant somatických buněk neprodukujících TNF- α

Buňky (THP-1, Jurkat) se stabilně transfekují *in vitro* chimérním genem TNFp-AIG. Po několika cyklech stimulace, které indukují apoptózu u buněk exprimujících gen TNFp-AIG, se oddělí buňky, které přežily. Z těchto buněk se vytvoří knihovna cDNA, která se použije pro funkční klonování (Legerski, R. a Peterson, C., *Nature*, 1992, 359, 70 - 73; Jaattela, M., a další, *Oncogene*, 1995, 10, 2297 - 2305).

Příklad 4

20 Identifikace a charakterizace dominantních negativních (DN) genů

Buňky THP-1 a Jurkat stabilně transfekované TNFp-AIG se opakovanými cykly stimulují pro aktivaci exprese TNFp-AIG. Ty buňky, které neexprimují negativní regulační geny, podléhají apoptóze, zatímco buňky exprimující dominantní negativní geny přežívají. U těchto buněk, které přežívají, působí produkty genu DN in-trans s promotorem TNF α , čímž se inhibují jeho aktivace pro přepis AIG, což nakonec vede k fenotypu vhodnému pro přežití. Z těchto buněk se zkonstruuje knihovna cDNA použitím polyadenylované mRNA. Geny DN, které zachraňují buňky THP-1 nebo Jurkat transfekované TNFp-AIG od apoptózy, se identifikují funkčním klonováním, jak se popisuje

pro další geny (Legerski, R. a Peterson, C., *Nature*, 1992, 359, 70 - 73; Jaattela, M., a další, *Oncogene*, 1995, 10, 2297 - 2305).

Výše uvedený popis je uveden pro poučení osob s obvyklou znalostí v oboru, jak lze provádět předkládaný vynález, a nemá
5 podrobně uvádět všechny modifikace a variace předkládaného vynálezu, které budou odborníkům v oboru po přečtení tohoto popisu zřejmé. Předpokládá se však, že všechny tato zřejmé modifikace a variace budou spadat do rámce předkládaného vynálezu, který je
definován následujícími nároky. Nároky mají pokrývat nárokové složky a kroky v jakémkoli pořadí, které je účinné pro splnění
10 zamýšlených cílů, pokud ze souvislosti specificky nevyplývá opak.

Uváděné citace jsou zařazeny ve svém celku odkazem.

VÝPIS SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) ŽADATEL: Revati J. Tatake, Steven D. Marlin a Randall
W. Barton

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Samovolně řízená apoptóza zánětlivých
buněk dosažená genovou terapií

(iii) POČET SEKVENCÍ: 13

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

(A) JMÉNO: Boehringer Ingelheim Corporation

(B) ULICE: 900 Ridgebury Road, P.O.Box 368

(C) MĚSTO: Ridgefield

(D) STÁT: Connecticut

(E) ZEMĚ: USA

(F) PSČ: 06877-0368

(v) POČÍTAČOVÁ FORMA:

(A) TYP MÉDIA: disketa 3,5", 1,44 Mb

(B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní

(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: MS-DOS

(D) SOFTWARE: Textový procesor

(vi) ÚDAJE O PŘEDKLÁDANÉ PŘIHLÁŠCE

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:

(B) DATUM PODÁNÍ:

(C) ZAŘAZENÍ DO TŘÍDĚNÍ:

(vii) ÚDAJE O PŘEDCHOZÍCH PŘIHLÁŠKÁCH:

(A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY: 60/038,266

(B) DATUM PODÁNÍ: 28. února 1997

(viii) INFORMACE O ZÁSTUPCI:

(A) Jméno: Robert P. Raymond

(B) REGISTRAČNÍ ČÍSLO: 25089

(C) REFERENČNÍ ČÍSLO: 9/121PCT

(ix) TELEKOMUNIKAČNÍ INFORMACE:

(A) TELEFON: 203-798-4865

(B) TELEFAX: 203-791-6183

(2) INFORMACE PRO SEQ ID NO:1:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1178

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Referenční promotor lidského TNF α

(x) INFORMACE O ZVEŘEJNĚNÍ:

15 (A) AUTOŘI: Takashiba, S., a další

(C) ČASOPIS: Gene

(D) DÍL: 131

(E) STRANY: 307 - 308

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:1:

GGGGAAGCAA	AGGAGAAGCT	GAGAAGATGA	AGGAAAAGTC	AGGGTCTGGA	50
GGGGCGGGGG	TCAGGGAGCT	CCTGGGAGAT	ATGGCCACAT	GTAGCGGCTC	100
TGAGGAATGG	GTTACAGGAG	ACCTCTGGGG	AGATGTGACC	ACAGCAATGG	150
GTAGGAGAAT	GTCCAGGGCT	ATGGAAGTCG	AGTATCGGGG	ACCCCCCTT	200
AACGAAGACA	GGGCCATGTA	GAGGGCCCCA	GGGAGTGAAA	GAGCCTCCAG	250
GACCTCCAGG	TATGGAATAC	AGGGGACGTT	TAAGAAGATA	TGGCCACACA	300
CTGGGGCCCT	GAGAAGTGAG	AGCTTCATGA	AAAAAATCAG	GGACCCACAGA	350
GTTCCCTTGGA	AGCCAAGACT	GAAACCAGCA	TTATGAGTCT	CCGGGTCAGA	400
ATGAAAGAAG	AAGGCCTGCC	CCAGTGGTCT	GTGAATTCCC	GGGGGTGATT	450
TCACTCCCCG	GGCTGTCCCA	GGCTTGTCCT	TGCTACCCCC	ACCCAGCCTT	500
TCCTGAGGCC	TCAAGCTGCC	ACCAAGCCCC	CAGCTCCTTC	TCCCCGCAGA	550
CCCAAACACA	GGCCTCAGGA	CTCAACACAG	CTTTTCCCTC	CAACCCCGTT	600
TTCTCTCCCT	CAAGGACTCA	GCTTTCTGAA	GCCCCCTCCA	GTTCTAGTTC	650
TATCTTTTTT	CTGCATCCTG	TCTGGAAGTT	AGAAGGAAAC	AGACCACAGA	700
CCTGGTCCCC	AAAAGAAATG	GAGGCAATAG	GTTTTGAGGG	GCATGGGGAC	750
GGGGTTCAGC	CTCCAGGGTC	CTACACACAA	ATCAGTCAGT	GGCCCAGAAG	800
ACCCCCCTCG	GAATCGGAGC	AGGGAGGATG	GGGAGTGTGA	GGGGTATCCT	850
TGATGCTTGT	GTGTCCCCAA	CTTTCCAAAT	NCCCCGCCCC	GCGATGGAGA	900
AGAAACCGAG	ACAGAAGGTG	CAGGGCCCAC	TACCGCTTCC	TCCAGATGAG	950
CTTATGGGTT	TCTCCACCAA	GGAAGTTTTT	CGCTGGTTGA	ATGATTCTTT	1000
CCCCGCCCTC	CTCTCGCCCC	AGGGACATAT	AAAGGCAGTT	GTTGGCACAC	1050
CCAGCCAGCA	GACGCTCCCT	CAGCAAGGAC	AGCAGAGGAC	CAGCTAAGAG	1100
GGAGAGAAGC	AACTGCAGAC	CCCCCCTGAA	AACAACCCTC	AGACGCCACA	1150
TCCCTTGACA	AGCTGCCAGG	CAGGTTCT			1178

(3) INFORMACE PRO SEQ ID NO:2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 1096
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

- 10 (A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

- (A) NÁZEV/KLÍČ: Gen lidského promotoru TNF α

(x) INFORMACE O ZVEŘEJNĚNÍ:

- (A) AUTOŘI: Takashiba, S., a další
 (C) ČASOPIS: Gene
 (D) DÍL: 131
 (E) STRANY: 307 - 308

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:2:

GAGGCCGCCA	GACTGCTGCA	GGGGAAGCAA	AGGAGAAGCT	GAGAAGATGA	50
AGGAAAAGTC	AGGGTCTGGA	GGGGCGGGGG	TCAGGGAGCT	CCTGGGAGAT	100
ATGGCCACAT	GTAGCGGCTC	TGAGGAATGG	GTTACAGGAG	ACCTCTGGGG	150
AGATGTGACC	ACAGCAATGG	GTAGGAGAAT	GTCCAGGGCT	ATGGAAGTCG	200
AGTATGGGGA	CCCCCCTTA	ACGAAGACAG	GGCCATGTAG	AGGGCCCCAG	250
GGAGTGAAAG	AGCCTCCAGG	ACCTCCAGGT	ATGGAATACA	GGGGACGTTT	300
AAGAAGATAT	GGCCACACAC	TGGGGCCCTG	AGAAGTGAGA	GCTTCATGAA	350
AAAAATCAGG	GACCCACAGG	TTCCTTGGA	GCCAAGACTG	AAACCAGCAT	400
TATGAGTCTC	CGGGTCAGAA	TGAAAGAAGA	AGGCCTGCCC	CAGTGGGGTC	450
TGTGAATTCC	CGGGGGTGAT	TTCCTCCCC	GGGGCTGTCC	CAGGCTTGTC	500
CCTGCTACCC	CCACCCAGCC	TTTCTGAGG	CCTCAAGCCT	GCCACCAAGC	550
CCCCAGCTCC	TTCTCCCCGC	AGGGACCCAA	ACACAGGCCT	CAGGACTCAA	600
CACAGCTTTT	CCCTCCAACC	CCGTTTTCTC	TCCCTCAAGG	ACTCAGCTTT	650
CTGAAGCCCC	TCCCAGTTCT	AGTTCTATCT	TTTTCTGCA	TCCTGTCTGG	700
AAGTTAGAAG	GAAACAGACC	ACAGACCTGG	TCCCCAAAAG	AAATGGAGGC	750
AATAGGTTTT	GAGGGGCATG	GGGACGGGGT	TCAGCCTCCA	GGGTCTTACA	800
CACAAATCAG	TCAGTGGCCC	AGAAGACCCC	CCTCGGAATC	GGAGCAGGGA	850
GGATGGGGAG	TGTGAGGGGT	ATCCTTGATG	CTTGTGTGTC	CCCAACTTTC	900
CAAATCCCCG	CCCCCGCGAT	GGAGAAGAAA	CCGAGACAGA	AGGTGCAGGG	950
CCCACTACCG	CTTCCTCCAG	ATGAGCTCAT	GGGTTTCTCC	ACCAAGGAAG	1000
TTTTCCGCTG	GTTGAATGAT	TCTTTCCCCG	CCCTCCTCTC	GCCCCAGGGA	1050
CATATAAAGG	CAGTTGTTGG	CACACCCAGC	CAGCAGACGC	TCCCTC	1096

(4) INFORMACE PRO SEQ ID NO:3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 139

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Nativní minimální promotor TNF α

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:3:

CCGCTTCCTC	CAGATGAGCT	CATGGGTTTC	TCCACCAAGG	AAGTTTTC	50
CTGGTTGAAT	GATTCTTTCC	CCGCCCTCCT	CTCGCCCCAG	GGACATATAA	100
AGGCAGTTGT	ATGGCACACC	CGCCAGCAGA	CGCTCCCTC		139

15

(5) INFORMACE PRO SEQ ID NO:4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 904

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Chimérní gen TNFp120 AIG.1

(D) DALŠÍ INFORMACE: Zbytky 1 až 139 obsahují

sekvenci promotoru; zbytky 140

až 151 obsahují sekvenci linkeru a zbylé

zbytky obsahují sekvenci AIG.1

25

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:4:

30

CCGCTTCCTC	CAGATGAGCT	CATGGGTTTC	TCCACCAAGG	AAGTTTTCCG	50
CTGGTTGAAT	GATTCTTTCC	CCGCCCTCCT	CTCGCCCCAG	GGACATATAA	100
AGGCAGTTGT	TGGCACACCC	AGCCAGCAGA	CGCTCCCTCA	GCAGATCCAC	150
CATGTCTGGA	ATATCCCTGG	ACAACAGTTA	TAAAATGGAT	TATCCTGAGA	200
TGGGTTTATG	TATAATAATT	AATAATAAGA	ATTTTCATTA	AAGCACTGGA	250
ATGACATCTC	GGTCTGGTAC	AGATGTCGAT	GCAGCAAACC	TCAGGGAAAC	300
ATTCAGAAAC	TTGAAATATG	AAGTCAGGAA	TAAAAATGAT	CTTACACGTG	350
AAGAAATTGT	GGAATTGATG	CGTGATGTTT	CTAAAGAAGA	TCACAGCAAA	400
AGGAGCAGTT	TTGTTTGTGT	GCTTCTGAGC	CATGGTGAAG	AAGGAATAAT	450
TTTTGGAACA	AATGGACCTG	TTGACCTGAA	AAAAATAACA	AACTTTTTTCA	500
GAGGGGATCG	TTGTAGAAGT	CTAACTGGAA	AACCCAAACT	TTTCATTATT	550
CAGGCCTGCC	GTGGTACAGA	ACTGGACTGT	GGCATTGAGA	CAGACAGTGG	600
TGTTGATGAT	GACATGGCGT	GTCATAAAAT	ACCAGTGGAG	GCCGACTTCT	650
TGTATGCATA	CTCCACAGCA	CCTGGTTATT	ATTCTTGGCG	AAATTCAAAG	700
GATGGCTCCT	GGTTCATCCA	GTCGCTTTGT	GCCATGCTGA	AACAGTATGC	750
CGACAAGCTT	GAATTTATGC	ACATTCTTAC	CCGGGCTAAC	CGAAAGGTGG	800
CAACAGAATT	TGAGTCCTTT	TCCTTTGACG	CTACTTTTCA	TGCAAAGAAA	850
CAGATTCCAT	GTATTGTTTC	CATGCTCACA	AAAGAACTCT	ATTTTTATCA	900
CTAA					904

(6) INFORMACE PRO SEQ ID NO:5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1490

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Chimérní gen TNFp706 AIG.1

(D) DALŠÍ INFORMACE: Zbytky 1 až 724 obsahují
sekvenci promotoru; zbytky 725 až 736
obsahují sekvenci linkeru a ostatní zbytky
obsahují sekvenci AIG.1

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:5:

TCCTTGGAAG	CCAAGACTGA	AACCAGCATT	ATGAGTCTCC	GGGTCAGAAT	50
GAAAGAAGAA	GGCCTGCCCC	AGTGGGGTCT	GTGAATTCCC	GGGGGTGATT	100
TCACTCCCCG	GGGCTGTCCC	AGGCTTGTCC	CTGCTACCCC	CACCCAGCCT	150
TTCCTGAGGC	TCAAGCCTGC	CACCAAGCCC	CCAGCTCCTT	CTCCCCGCAG	200
GGACCCAAAC	ACAGGCCTCA	GGACTCAACA	CAGCTTTTCC	CTCCAACCCC	250
GTTTTCTCTC	CCTCAAGGAC	TCAGCTTTCT	GAAGCCCCTC	CCAGTTCTAG	300
TTCTATCTTT	TTCCTGCATC	CTGTCTGGAA	GTTAGAAGGA	AACAGACCAC	350
AGACCTGGTC	CCCAAAAGAA	ATGGAGGCAA	TAGGTTTTGA	GGGGCATGGG	400
GACGGGGTTC	AGCCTCCAGG	GTCCTACACA	CAAATCAGTC	AGTGGCCCAG	450
AAGACCCCCC	TCGGAATCGG	AGCAGGGAGG	ATGGGGAGTG	TGAGGGGTAT	500
CCTTGATGCT	TGTGTGTCCC	CAACTTTCCA	AATCCCCGCC	CCCGCGATGG	550
AGAAGAAACC	GAGACAGAAG	GTGCAGGGCC	CACTACCGCT	TCCTCCAGAT	600
GAGCTCATGG	GTTTCTCCAC	CAAGGAAGTT	TTCCGCTGGT	TGAATGATTC	650
TTTCCCCGCC	CTCCTCTCGC	CCCAGGGACA	TATAAAGGCA	GTTGTTGGCA	700
CACCCAGCCA	GCAGACGCTC	CCTCAGCAGA	TCCACCATGT	CTGGAATATC	750
CCTGGACAAC	AGTTATAAAA	TGGATTATCC	TGAGATGGGT	TTATGTATAA	800
TAATTAATAA	TAAGAATTTT	CATAAAAGCA	CTGGAATGAC	ATCTCGGTCT	850
GGTACAGATG	TCGATGCAGC	AAACCTCAGG	GAAACATTCA	GAAACTTGAA	900
ATATGAAGTC	AGGAATAAAA	ATGATCTTAC	ACGTGAAGAA	ATTGTGGAAT	950
TGATGCGTGA	TGTTTCTAAA	GAAGATCACA	GCAAAAGGAG	CAGTTTTGTT	1000
TGTGTGCTTC	TGAGCCATGG	TGAAGAAGGA	ATAATTTTGT	GAACAAATGG	1050
ACCTGTTGAC	CTGAAAAAAA	TAACAAACTT	TTTCAGAGGG	GATCGTTGTA	1100
GAAGTCTAAC	TGGAAAACCC	AAACTTTTCA	TTATTTCAGGC	CTGCCGTGGT	1150
ACAGAACTGG	ACTGTGGCAT	TGAGACAGAC	AGTGGTGTGT	ATGATGACAT	1200
GGCGTGTCAT	AAAATACCAG	TGGAGGCCGA	CTTCTTGAT	GCATACTCCA	1250
CAGCACCTGG	TTATTATTCT	TGGCGAAATT	CAAAGGATGG	CTCCTGGTTC	1300
ATCCAGTCGC	TTTGTGCCAT	TGCTGAAACA	GTATGCCGAC	AAGCTTGAAT	1350
TTATGCACAT	TCTTACCCGG	GCTAACCGAA	AGGTGGCAAC	AGAATTTGAG	1400
TCCTTTTCCT	TTGACGCTAC	TTTTCATGCA	AAGAAACAGA	TTCCATGTAT	1450
TGTTTCCATG	CTCACAAAAG	AACTCTATTT	TTATCACTAA		1490

(7) INFORMACE PRO SEQ ID NO:6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1789

20

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

25

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Chimérní gen TNFp1005 AIG.1

(D) DALŠÍ INFORMACE: Zbytky 1 až 1023 obsahují
sekvenci promotoru; zbytky 1024 až 1036

obsahují sekvenci linkeru a ostatní zbytky

obsahují sekvenci AIG.1

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:6:

GGCGGGGGTC	AGGGAGCTCC	TGGGAGATAT	GGCCACATGT	AGCGGCTCTG	50
AGGAATGGGT	TACAGGAGAC	CTCTGGGGAG	ATGTGACCAC	AGCAATGGGT	100
AGGAGAATGT	CCAGGGCTAT	GGAAGTCGAG	TATGGGGACC	CCCCCTTAAC	150
GAAGACAGGG	CCATGTAGAG	GGCCCCAGGG	AGTGAAAGAG	CCTCCAGGAC	200
CTCCAGGTAT	GGAATACAGG	GGACGTTTAA	GAAGATATGG	CCACACACTG	250
GGGCCCTGAG	AAGTGAGAGC	TTCATGAAAA	AAATCAGGGA	CCCCAGAGTT	300
CCTTGGAAGC	CAAGACTGAA	ACCAGCATT	TGAGTCTCCG	GGTCAGAATG	350
AAAGAAGAAG	GCCTGCCCCA	GTGGGGTCTG	TGAATTCCCG	GGGGTGATTT	400
CACTCCCCGG	GGCTGTCCCA	GGCTTGTCCT	TGCTACCCCC	ACCCAGCCTT	450
TCCTGAGGCC	TCAAGCCTGC	CACCAAGCCC	CCAGCTCCTT	CTCCCCGCAG	500
GGACCCAAAC	ACAGGCCCTCA	GGACTCAACA	CAGCTTTTCC	CTCCAACCCC	550
GTTTTCTCTC	CCTCAAGGAC	TCAGCTTTCT	GAAGCCCCCTC	CCAGTTCTAG	600
TTCTATCTTT	TTCCTGCATC	CTGTCTGGAA	GTTAGAAGGA	AACAGACCAC	650
AGACCTGGTC	CCCAAAAGAA	ATGGAGGCAA	TAGGTTTTGA	GGGGCATGGG	700
GACGGGGTTC	AGCCTCCAGG	GTCCTACACA	CAAATCAGTC	AGTGGCCCAG	750
AAGACCCCCC	TCGGAATCGG	AGCAGGGAGG	ATGGGGAGTG	TGAGGGGTAT	800
CCTTGATGCT	TGTGTGTCCC	CAACTTTCCA	AATCCCCGEC	CCCGCGATGG	850
AGAAGAAACC	GAGACAGAAG	GTGCAGGGCC	CACTACCGCT	TCCTCCAGAT	900
GAGCTCATGG	GTTTCTCCAC	CAAGGAAGTT	TTCCGCTGGT	TGAATGATTC	950
TTTCCCCGCC	CTCCTCTCGC	CCCAGGGACA	TATAAAGGCA	GTTGTTGGCA	1000
CACCCAGCCA	GCAGACGCTC	CCTCAGCAGA	TCCACCATGT	CTGGAATATC	1050
CCTGGACAAC	AGTTATAAAA	TGGATTATCC	TGAGATGGGT	TTATGTATAA	1100
TAATTAATAA	TAAGAATTTT	CATAAAAGCA	CTGGAATGAC	ATCTCGGTCT	1150
GGTACAGATG	TCGATGCAGC	AAACCTCAGG	GAAACATTCA	GAAACTTGAA	1200
ATATGAAGTC	AGGAATAAAA	ATGATCTTAC	ACGTGAAGAA	ATTGTGGAAT	1250
TGATGCGTGA	TGTTTCTAAA	GAAGATCACA	GCAAAAGGAG	CAGTTTTGTT	1300
TGTGTGCTTC	TGAGCCATGG	TGAAGAAGGA	ATAATTTTTC	GAACAAATGG	1350
ACCTGTTGAC	CTGAAAAAAA	TAACAAACTT	TTTCAGAGGG	GATCGTTGTA	1400
GAAGTCTAAC	TGGAAAACCC	AAACTTTTCA	TTATTCAGGC	CTGCCGTGGT	1450
ACAGAACTGG	ACTGTGGCAT	TGAGACAGAC	AGTGGTGTG	ATGATGACAT	1500
GGCGTGTCAT	AAAATACCAG	TGGAGGCCGA	CTTCTTGAT	GCATACTCCA	1550
CAGCACCTGG	TTATTATTCT	TGGCGAAATT	CAAAGGATGG	CTCCTGGTTC	1600
ATCCAGTCGC	TTTGTGCCAT	GCTGAAACAG	TATGCCGACA	AGCTTGAATT	1650
TATGCACATT	CTTACCCGGG	CTAACCGAAA	GGTGGCAACA	GAATTTGAGT	1700
CCTTTTCCTT	TGACGCTACT	TTTCATGCAA	AGAAACAGAT	TCCATGTATT	1750
GTTTCCATGC	TCACAAAAGA	ACTCTATTTT	TATCACTAA		1789

(8) INFORMACE PRO SEQ ID NO:7:

25

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1008

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

5

(A) PÓPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Chimérní gen TNFp120 AIG.2

(D) DALŠÍ INFORMACE: Zbytky 1 až 138 obsahují

sekvenci promotoru; zbytky 139 až 150

10

obsahují sekvenci linkeru a ostatní zbytky

obsahují sekvenci AIG.2

(xi) PÓPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:7:

CCGCTTCCTC	CAGATGAGCT	CATGGGTTTC	TCCACCAAGG	AAGTTTTCCG	50
CTGGTTGAAT	GATTCTTTCC	CGCCCTCCT	CTCGCCCCAG	GGACATATAA	100
AGGCAGTTGT	TGGCACACCC	AGCCAGCAGA	GCTCCCTCAG	CAGATCCACC	150
ATGGCTGGAC	CACCTGAGTC	AGCAGAATCT	ACAGATGCCC	TCAAGCTTTG	200
TCCTCATGAA	GAATTCCTGA	GACTATGTAA	AGAAAGAGCT	GAAGAGATCT	250
ACCCAATAAA	GGAGAGAAAC	AACCGCACAC	GCCTGGCTCT	CATCATATGC	300
AATACAGAGT	TTGACCATCT	GCCTCCGAGG	AATGGAGCTG	ACTTTGACAT	350
CACAGGGATG	AAGGAGCTAC	TTGAGGGTCT	GGACTATAGT	GATAGTGTAG	400
AAGAGAATCT	GACAGCCAGG	GATATGGAGT	CAGCGCTGAG	GGCATTGCT	450
ACCAGACCAG	AGCACAAGTC	CTCTGACAGC	ACATTCTTGG	TACTCATGTC	500
TCATGGCATC	CTGGAGGGAA	TCTGCCGAAC	TGTGCATGAT	GAGAAAAAAC	550
CAGATGTGCT	GCTTTATGAC	ACCATCTTCC	AGATATTCAA	CAACCGCAAC	600
TGCCTCAGTC	TGAAGGACAA	ACCCAAGGTC	ATCATTGTCC	AGGCCTGCAG	650
AGGTGCAAAC	CGTGGGGAAC	TGTGGGTCAG	AGACTCTCCA	GCATCCTTGG	700
AAGTGGCCTC	TTCACAGTCA	TCTGAGAACC	TGGAGGAAGA	TGCTGTTTAC	750
AAGACCEACG	TGGAGAAGGA	CTTCATTGCT	TTCTGCTCTT	CAACGCCACA	800
CAACGTGTCC	TGGAGAGACA	GCACAATGGG	CTCTATCTTC	ATCACACAAC	850
TCATCACATG	CTTCCAGAAA	TATTCTTGGT	GCTGCCACCT	AGAGGAAGTA	900
TTTCGGAAGG	TACAGCAATC	ATTTGAAACT	CCAAGGGCCA	AAGCTCAAAT	950
GCCCAACATA	GAACGACTGT	CCATGACAAG	ATATTTCTAC	CTCTTTCCTG	1000
GCAATTGA					1008

25

(9) INFORMACE PRO SEQ ID NO:8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1587

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

5

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Chimérní gen TNFp706·AIG.2

(D) DALŠÍ INFORMACE: Zbytky 1 až 724 obsahují

sekvenci promotoru; zbytky 725 až 736

obsahují sekvenci linkeru a ostatní zbytky

10

obsahují sekvenci AIG.2.

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:8:

TCCTTGGAAG	CCAAGACTGA	AACCAGCATT	ATGAGTCTCC	GGGTCAGAAT	50
GAAAGAAGAA	GGCCTGCCCC	AGTGGGGTCT	GTGAATTCCC	GGGGGTGATT	100
TTCTCTCCCG	GGGCTGTCCC	AGGCTTGTCC	CTGCTACCCC	CACCCAGCCT	150
TTCCTGAGGC	CTCAAGCCTG	CCACCAAGCC	CCCAGCTCCT	TCTCCCCGCA	200
GGGACCCAAA	CACAGGCCTC	AGGACTCAAC	ACAGCTTTTC	CCTCCAACCC	250
CGTTTTCTCT	CCCTCAAGGA	CTCAGCTTTC	TGAAGCCCCT	CCCAGTTCTA	300
GTTCTATCTT	TTTCCTGCAT	CCTGTCTGGA	AGTTAGAAGG	AAACAGACCA	350
CAGACCTGGT	CCCCAAAAGA	AATGGAGGCA	ATAGGTTTTG	AGGGGCATGG	400
GGACGGGGTT	CAGCCTCCAG	GGTCCTACAC	ACAAATCAGT	CAGTGGCCCA	450
AAGACCCCCC	TCGGAATCGG	AGCAGGGAGG	ATGGGGAGTG	TGAGGGGTAT	500
CCTTGATGCT	TGTGTGTCCC	CAACTTTCCA	AATCCCCGCC	CCCGCGATGG	550
AGAAGAAACC	GAGACAGAAG	GTGCAGGGCC	CACTACCGCT	TCCTCCAGAT	600
GAGCTCATGG	GTTTCTCCAC	CAAGGAAGTT	TTCCGCTGGT	TGAATGATTC	650
TTTCCCCGCC	CTCCTCTCGC	CCCAGGGACA	TATAAAGGCA	GTTGTTGGCA	700
CACCCAGCCA	GCAGACGCTC	CCTCAGCAGA	TCCACCATGG	CTGGACCACC	750
TGAGTCAGCA	GAATCTACAG	ATGCCCTCAA	GCTTTGTCTT	CATGAAGAAT	800
TCCTGAGACT	ATGTAAAGAA	AGAGCTGAAG	AGATCTACCC	AATAAAGGAG	850
AGAAACAACC	GCACACGCCT	GGCTCTCATC	ATATGCAATA	CAGAGTTTGA	900
CCATCTGCCT	CCGAGGAATG	GAGCTGACTT	GACATCACAG	GATGAAGGAG	950
TACTTGAGGG	TCTGGACTAT	GTGTAGATGT	GAAGAGAATC	GACAGCCAGG	1000
ATATGGAGTC	AGCGCTGAGG	GCATTTGCTA	CCAGACCAGA	GCACAAGTCC	1050
TCTGACAGCA	CATTCTTGGT	ACTCATGTCT	CATGGCATCC	TGGAGGGAAT	1100
CTGCGGAACT	GTGCATGATG	AGAAAAAACC	AGATGTGCTG	CTTTATGACA	1150
CCATCTTCCA	GATATTCAAC	AACCGCAACT	GCCTCAGTCT	GAAGGACAAA	1200
CCCAAGGTCA	TCATTGTCCA	GGCCTGCAGA	GGTGCAAACC	GTGGGGAACT	1250
GTGGGTCAGA	GACTCTCCAG	CATCCTTGGA	AGTGGCCTCT	TCACAGTCAT	1300
CTGAGAACCT	GGAGGAAGAT	GCTGTTTACA	AGACCCACGT	GGAGAAGGAC	1350
TTCATTGCTT	TCTGCTCTTC	AACGCCACAC	AACGTGTCTT	GGAGAGACAG	1400
CACAATGGGC	TCTATCTTCA	TCACACAAC	CATCACATGC	TTCCAGAAAT	1450
ATTCTTGGTG	CTGCCACCTA	GAGGAAGTAT	TTCGGAAGGT	ACAGCAATCA	1500
TTTGAAACTC	CAAGGGCCAA	AGCTCAAATG	CCCACCATAG	AACGACTGTC	1550
CATGACAAGA	TATTTCTACC	TCTTTCCTGG	CAATTGA		1587

5 (10) INFORMACE PRO SEQ ID NO:9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1894

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

10

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Chimérní-gen-TNFp1005-AIG.2

15

(D) DALŠÍ INFORMACE: Zbytky 1 až 1024 obsahují
sekvenci promotoru; zbytky 1025 až 1036
obsahují sekvenci linkeru a ostatní zbytky
obsahují sekvenci AIG.2

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:9:

GGCGGGGGTTC	AGGGAGCTCC	TGGGAGATAT	GGCCACATGT	AGCGGCTCTG	50
AGGAATGGGT	TACAGGAGAC	CTCTGGGGAG	ATGTGACCAC	AGCAATGGGT	100
AGGAGAATGT	CCAGGGCTAT	GGAAGTCGAG	TATGGGGACC	CCCCCTTAAC	150
GAAGACAGGG	CCATGTAGAG	GGCCCCAGGG	AGTGAAAGAG	CCTCCAGGAC	200
CTCCAGGTAT	GGAATACAGG	GGACGTTTAA	GAAGATATGG	CCACACACTG	250
GGGCCCTGAG	AAGTGAGAGC	TTCATGAAAA	AAATCAGGGA	CCCCAGAGTT	300
CCTTGGAAGC	CAAGACTGAA	ACCAGCATT	TGAGTCTCCG	GGTCAGAATG	350
AAAGAAGAAG	GCCTGCCCCA	GTGGGGTCTG	TGAATTCCCG	GGGGTGATTT	400
CACTCCCCGG	GGCTGTCCCA	GGCTTGTCCT	TGCTACCCCC	ACCCAGCCTT	450
TCCTGAGGCC	TCAAGCCTGC	CACCAAGCCC	CCAGCTCCTT	CTCCCCGCAG	500
GGACCCAAAC	ACAGGCCTCA	GGACTCAACA	CAGCTTTTCC	CTCCAACCCC	550
GTTTTCTCTC	CCTCAAGGAC	TCAGCTTTCT	GAAGCCCCCTC	CCAGTTCTAG	600
TTCTATCTTT	TTCCTGCATC	CTGTCTGGAA	GTTAGAAGGA	AACAGACCAC	650
AGACCTGGTC	CCCAAAAGAA	ATGGAGGCAA	TAGGTTTTGA	GGGGCATGGG	700
GACGGGGTTC	AGCCTCCAGG	GTCCTACACA	CAAATCAGTC	AGTGGCCCAG	750
AAGACCCCCC	TCGGAATCGG	AGCAGGGAGG	ATGGGGAGTG	TGAGGGGTAT	800
CCTTGATGCT	TGTGTGTCCC	CAACTTTCCA	AATCCCCGCC	CCCGCGATGG	850
AGAAGAAACC	GAGACAGAAG	GTGCAGGGCC	CACTACCGCT	TCCTCCAGAT	900
GAGCTCATGG	GTTTCTCCAC	CAAGGAAGTT	TTCCGCTGGT	TGAATGATTC	950

TTTCCCCGCC	CTCCTCTCGC	CCCAGGGACA	TATAAAGGCA	GTTGTTGGCA	1000
CACCCAGCCA	GCAGACGCTC	CCTCAGCAGA	TCCACCATGG	CTGGACCACC	1050
TGAGTCAGCA	GAATCTACAG	ATGCCCTCAA	GCTTTGTCCT	CATGAAGAAT	1100
TCCTGAGACT	ATGTAAAGAA	AGAGCTGAAG	AGATCTACCC	AATAAAGGAG	1150
AGAAACAACC	GCACACGCCT	GGCTCTCATC	ATATGCAATA	CAGAGTTTGA	1200
CCATCTGCCT	CCGAGGAATG	GAGCTGACTT	TGACATCACA	GGGATGAAGG	1250
AGCTACTTGA	GGGTCTGGAC	TATAGTGTAG	ATGTAGAAGA	GAATCTGACA	1300
GCCAGGGATA	TGGAGTCAGC	GCTGAGGGCA	TTTGCTACCA	GACCAGAGCA	1350
CAAGTCC'TCT	GACAGCACAT	TCTTGGTACT	CATGTCTCAT	GGCATCCTGG	1400
AGGGAATCTG	CGGAAC'TGTG	CATGATGAGA	AAAAACCAGA	TGTGCTGCTT	1450
TATGACACCA	TCTTCCAGAT	ATTCAACAAC	CGCAACTGCC	TCAGTCTGAA	1500
GGACAAACCC	AAGGTCATCA	TTGTCCAGGC	CTGCAGAGGT	GCAAACCGTG	1550
GGGAACTGTG	GGTCAGAGAC	TCTCCAGCAT	CCTTGGAAGT	GGCCTCTTCA	1600
CAGTCATCTG	AGAACCTGGA	GGAAGATGCT	GTTTACAAGA	CCCACGTGGA	1650
GAAGGACTTC	ATTGCTTTCT	GCTCTTCAAC	GCCACACAAC	GTGTCTTGGA	1700
GAGACAGCAC	AATGGGCTCT	ATCTTCATCA	CACAACTCAT	CACATGCTTC	1750
CAGAAATATT	CTTGGTGCTG	CCACCTAGAG	GAAGTATTTT	GGAAGGTACA	1800
GCAATCATTT	GAAACTCCAA	GGGCCAAAGC	TCAAATGCCC	ACCATAGAAC	1850
GACTGTCCAT	GACAAGATAT	TTCTACCTCT	TTCTGGCAA	TTGA	1894

(11) INFORMACE PRO SEQ ID NO:10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

15

(A) DÉLKA: 123

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

20

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Zesilující oblast 1 (ER1) promotoru

TNF α

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:10:

GGGGCGGGGG	TCAGGGAGCT	CCTGGGAGAT	ATGGCCACAT	GTAGCGGCTC	50
TGAGGAATGG	GTTACAGGAG	ACCTCTGGGG	AGATGTGACC	ACAGCAATGG	100
GTAGGAGAAT	GTCCAGGGCT	ATG			123

(12) INFORMACE PRO SEQ ID NO:11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 190
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

- 10 (A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

- (A) NÁZEV/KLÍČ: Zesilující oblast 2 (ER2) promotoru
 TNF α

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:11:

TCCTTGGAAG	CCAAGACTGA	AACCAGCATT	ATGAGTCTCC	GGGTCAGAAT	50
GAAAGAAGAA	GGCCTGCCCC	AGTGGGGTCT	GTGAATTCCC	GGGGGTGATT	100
TCACTCCCCG	GGGCTGTCCC	AGGCTTGTCC	CTGCTACCCC	CACCCAGCCT	150
TTCCTGAGGC	CTCAAGCCTG	CCACCAAGCC	CCCAGCTCCT		190

20

(13) INFORMACE PRO SEQ ID NO:12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 25 (A) DÉLKA: 223
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY:

- (A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Vícenásobná klonovací místa

(D) JINÉ INFORMACE: Vícenásobná klonovací místa

získaná genetickým inženýrstvím vložená proti
směru exprese vzhledem k minimálnímu
promotoru TNF α v konstrukt -120pGL3

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:12:

GGTACCGAGC	TCTTACGCGT	GCTAGCCGCG	GATATCTTAA	GACGTCCTAG	50
GACTAGTCAG	CTGCTCGAGC	CGCTTCCTCC	AGATGAGCTC	ATGGGTTTCT	100
CCACCAAGGA	AGTTTTCCGC	TGGTTGAATG	ATTCTTTCCC	CGCCCTCCTC	150
TCGCCCCAGG	GACATATAAA	GGCAGTTGTT	GGCACACCCA	GCCAGCAGAC	200
GCTCCCTCAG	CAGATCTAAG	CTT			223

(14) INFORMACE PRO SEQ ID NO:13:

15

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 787

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP ŘETĚZCE: jednoduchý

(D) TOPOLOGIE: lineární

20

(ii) TYP MOLEKULY:

(A) POPIS: DNA

(ix) VLASTNOST:

(A) NÁZEV/KLÍČ: Nepřekládaná oblast TNF α

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:13:

25

TCTAGAGGAG	GACGAACATC	CAACCTTCCC	AAACGCCTCC	CCTGCCCCAA	50
TCCCTTTATT	ACCCCCTCCT	TCAGACACCC	TCAACCTCTT	CTGGCTCAAA	100
AAGAGAATTG	GGGGCTTAGG	GTCGGAACCC	AAGCTTAGAA	CTTTAAGCAA	150
CAAGACCACC	ACTTCGAAAC	CTGGGATTCA	GGAATGTGTG	GCCTGCACAG	200

TGAAGTGCTG	GCAACCACTA	AGAATTCAAA	CTGGGGCCTC	CAGAACTCAC	250
TGGGGCCTAC	AGCTTTGATC	CCTGACATCT	GGAATCTGGA	GACCAGGGAG	300
CCTTTGGTTC	TGGCCAGAAT	GCTGCAGGAC	TTGAGAAGAC	CTCACCTAGA	350
AATTGACACA	AGTGGACCTT	AGGCCTTCCT	CTCTCCAGAT	GTTTCCAGAC	400
TTCCTTGAGA	CACGGAGCCC	AGCCCTCCCC	ATGGAGCCAG	CTCCCTCTAT	450
TTATGTTTGC	ACTTGTGATT	ATTTATTATT	TATTTATTAT	TTATTTATTT	500
ACAGATGAAT	GTATTTATTT	GGGAGACCGG	GGTATCCTGG	GGGACCCAAT	550
GTAGGAGCTG	CCTTGGCTCA	GACATGTTTT	CCGTGAAAAC	GGAGCTGAAC	600
AATAGGCTGT	TCCCATGTAG	CCCCCTGGCC	TCTGTGCCTT	CTTTTGATTA	650
TGTTTTTTAA	AATATTTATC	TGATTAAGTT	GTCTAAACAA	TGCTGATTTG	700
GTGACCAACT	GTCACTCATT	GCTGAGCCTC	TGCTCCCCAG	GGGAGTTGTG	750
TCTGTAATCG	CCCTACTATT	CAGTGGCGAG	ATCTAGA		787

Zastupuje:

08.11.99

PV 2061-99

~~46227~~

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Chiménní gen, který obsahuje alespoň jednu zesilující oblast promotoru $\text{TNF}\alpha$ připojenou k funkční kopii minimálního promotoru $\text{TNF}\alpha$ a dále připojenou k alespoň jedné kopii genu indukujícího apoptózu, přičemž exprese genu indukujícího apoptózu je řízena promotorem $\text{TNF}\alpha$.
- 10 2. Gen podle nároku 1, kde připojení zesilující oblasti k promotoru a promotoru ke genu indukujícímu apoptózu je zvoleno ze skupiny přímé připojení, připojení ve větší vzdálenosti, připojení v menší vzdálenosti a jejich kombinace.
- 15 3. Gen podle nároku 1, který obsahuje dvě nebo více kopií zesilujících oblastí promotoru $\text{TNF}\alpha$.
- 20 4. Gen podle nároku 1, ve kterém je zesilující oblastí promotoru $\text{TNF}\alpha$ SEQ ID No. 10 nebo SEQ ID No. 11 nebo jejich funkční části nebo varianty.
- 25 5. Gen podle nároku 1, ve kterém je promotor $\text{TNF}\alpha$ zvolený ze skupiny SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 a jejich funkčních částí nebo variant.
6. Gen podle nároku 1, kde gen indukující apoptózu je zvolený ze skupiny kaspáza 1, kaspáza 2, kaspáza 3, kaspáza 4, kaspáza 5, kaspáza 6, kaspáza 7, kaspáza 8, kaspáza 9,

kaspáza 10, granzym A, granzym B, ligand Fas, a jejich funkčních částí, variant a směsí.

- 5 7. Gen podle nároku 6, kde gen indukující apoptózu je zvolený ze skupiny kaspáza 3, kaspáza 4, kaspáza 5, granzym B, a jejich funkčních částí, variant a směsí.
- 10 8. Gen podle nároku 1 zvolený ze skupiny SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9 a jeho funkční části nebo varianty.
- 15 9. Gen podle nároku 1 zvolený ze skupiny SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9 a jeho funkční části nebo varianty, kde 3' nepřekládaná oblast genu $TNF\alpha$ je vložena ve směru exprese vzhledem ke genu indukujícímu apoptózu.
- 20 10. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje gen podle nároku 1.
11. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje gen podle nároku 9.
- 25 12. Chiménní gen podle nároku 1 pro použití jako léčivo pro léčení zánětlivých onemocnění zavedením do buněk pacienta indukci apoptózy u zánětlivých buněk nebo u buněk v místě zánětu.

13. Použití podle nároku 12, kde indukce apoptózy neindukuje zánětlivou odpověď u pacienta.

14. Použití podle nároku 12, kde zánětlivou buňkou je buňka produkující $\text{TNF}\alpha$.

15. Použití podle nároku 12, kde zánětlivým onemocněním je onemocnění zvolené ze skupiny revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, syndrom Guillain-Barre, Crohnova choroba, ulcerativní kolitida, lupénka, onemocnění způsobené odmítnutím štěpu hostitelem, lupus erythematosus, diabetes mellitus závislá na inzulinu, psoriatická artritida, sarkoidóza, pneumonitida z přecitlivělosti, ankylózní spondylitida, Reiterův syndrom a systémová skleróza.

16. Použití podle nároku 15, kde zánětlivým onemocněním je revmatoidní artritida.

17. Chimérní gen obsahující dvě až deset kazet zesilující oblasti promotoru $\text{TNF}\alpha$ připojených k alespoň jedné kopii minimálního promotoru $\text{TNF}\alpha$ a alespoň jedné kopii genu indukujícího apoptózu zvoleného ze skupiny kaspáza 3, kaspáza 4, kaspáza 5, granzym B a jejich funkčních částí, variant a směsí, kde exprese genu indukujícího apoptózu je řízena promotorem TNF .

18. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e obsahuje gen podle nároku 17.

19. Chimérní gen podle nároku 17 pro použití jako léčivo pro indukci apoptózy v zánětlivé buňce produkující $\text{TNF}\alpha$ zavedením do buňky

5

20. Chimérní gen podle nároku 17 pro použití jako léčivo pro léčení zánětlivého onemocnění zavedením do buněk pacienta indukci apoptózy u zánětlivých buněk nebo buněk v místě zánětu, aniž by došlo k indukci zánětlivé odpovědi u pacienta.

10

21. Způsob konstrukce chimérního genu, obsahujícího alespoň jednu zesilující oblast promotoru $\text{TNF}\alpha$ připojenou k funkční kopii minimálního promotoru $\text{TNF}\alpha$ a dále k alespoň jedné kopii

15

genu indukujícího apoptózu, přičemž exprese genu indukujícího apoptózu je řízena promotorem $\text{TNF}\alpha$, vyznačující se tím, že zahrnuje kroky

a) polymerázovou řetězovou reakcí se amplifikuje promotor $\text{TNF}\alpha$ s použitím primerů obsahujících deleční konstrukty promotoru $\text{TNF}\alpha$;

20

b) geny amplifikované PCR získané v kroku a) se klonují proti směru exprese vzhledem k reporterovému genu;

c) konstrukty získané v kroku b) se testují na jejich konstitutivní a indukibilní expresi v alespoň jedné buněčné linii produkující $\text{TNF}\alpha$;

25

d) vybere se promotor $\text{TNF}\alpha$ odpovědný za indukibilní expresi reporteru v buněčné linii; a buď

e) se provede amplifikace PCR oblastí promotoru $\text{TNF}\alpha$, které zvyšují expresi reporteru, pro získání zesilující oblasti,

a provede se vložení alespoň jedné kopie zesilující oblasti proti směru exprese vzhledem k promotoru; nebo

5 f) se vloží alespoň jedna kopie genu indukujícího apoptózu s odstraněnou prodoménou po směru exprese vzhledem k promotoru $TNF\alpha$ náhradou reporterového genu delečními konstrukty genu indukujícího apoptózu pro získání chimérního genu, nebo

10 g) se provede pomocí PCR amplifikace 3' nepřekládané oblasti $TNF\alpha$ a vloží se ve směru exprese vzhledem k reporterovému genu, nebo se použije jakákoliv z kombinací uvedených způsobů.

15 22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e proti směru exprese vzhledem k promotoru se vloží dvě
nebo více kopií zesilujících oblasti.

23. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e jako reporterový gen se použije luciferáza.

20 24. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e se použije zesilující oblasti obsahující SEQ ID No. 10
nebo SEQ ID No. 11.

25 25. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e gen indukující apoptózu s odstraněnou prodoménou se
volí ze skupiny kaspáza 3, kaspáza 4, kaspáza 5, granzym B
a jejich funkční části a varianty.

26. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e se vytvoří gen zvolený ze skupiny SEQ ID No. 4, SEQ ID
No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID
No. 9 a jejich funkčních částí nebo variant.

5

27. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
ž e jako buněčných linií pro testování konstruktů se použije
buněčných linií zvolených ze skupiny T lymfoblastoid,
myelomonocytická buňka, monocytická buňka, fibroblast
a kultivované lidské synoviocyty.

10

28. Chimérní gen, obsahující

a) alespoň jednu zesilující oblast promotoru připojenou
k funkční kopii minimálního promotoru za předpokladu, že
promotorem je gen nebo kombinace genů aktivovaných
v zánětlivých buňkách nebo v buňkách v místě zánětu, a

15

b) dále připojený k alespoň jedné kopii genu indukujícího
apoptózu, kde exprese genu indukujícího apoptózu je řízena
promotorem a promotor je zvolený ze skupiny cytokiny,
interleukiny a jejich receptory, molekuly buněčné adheze
a jejich ligandy, chemokiny a jejich receptory, enzymy
předcházející zánětu a jejich směsi.

20

29. Gen podle nároku 28, kde promotor je zvolený ze skupiny
TNF β , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, interferon γ
a jejich funkční části, varianty a směsi.

25

30. Gen podle nároku 28, kde promotor je zvolený ze skupiny selektiny, integriny, ICAM-1, V-CAM, jejich funkční části, varianty a směsi.
- 5 31. Gen podle nároku 28, kde promotor je zvolený ze skupiny MIP-1 α , MIP-1 β , MCP1-4, RANTES, Mig, NAP2, IP10, Gro α - γ , jejich funkční části, varianty a směsi.
- 10 32. Gen podle nároku 28, kde promotor je zvolený ze skupiny COX-2, iNOS, fosfolipázy, proteázy, jejich funkční části, varianty a směsi.
- 15 33. Gen podle nároku 28, kde připojení zesilující oblasti k promotoru a promotoru ke genu indukujícímu apoptózu je zvoleno ze skupiny přímé připojení, připojení ve větší vzdálenosti, připojení v menší vzdálenosti a jejich kombinace.

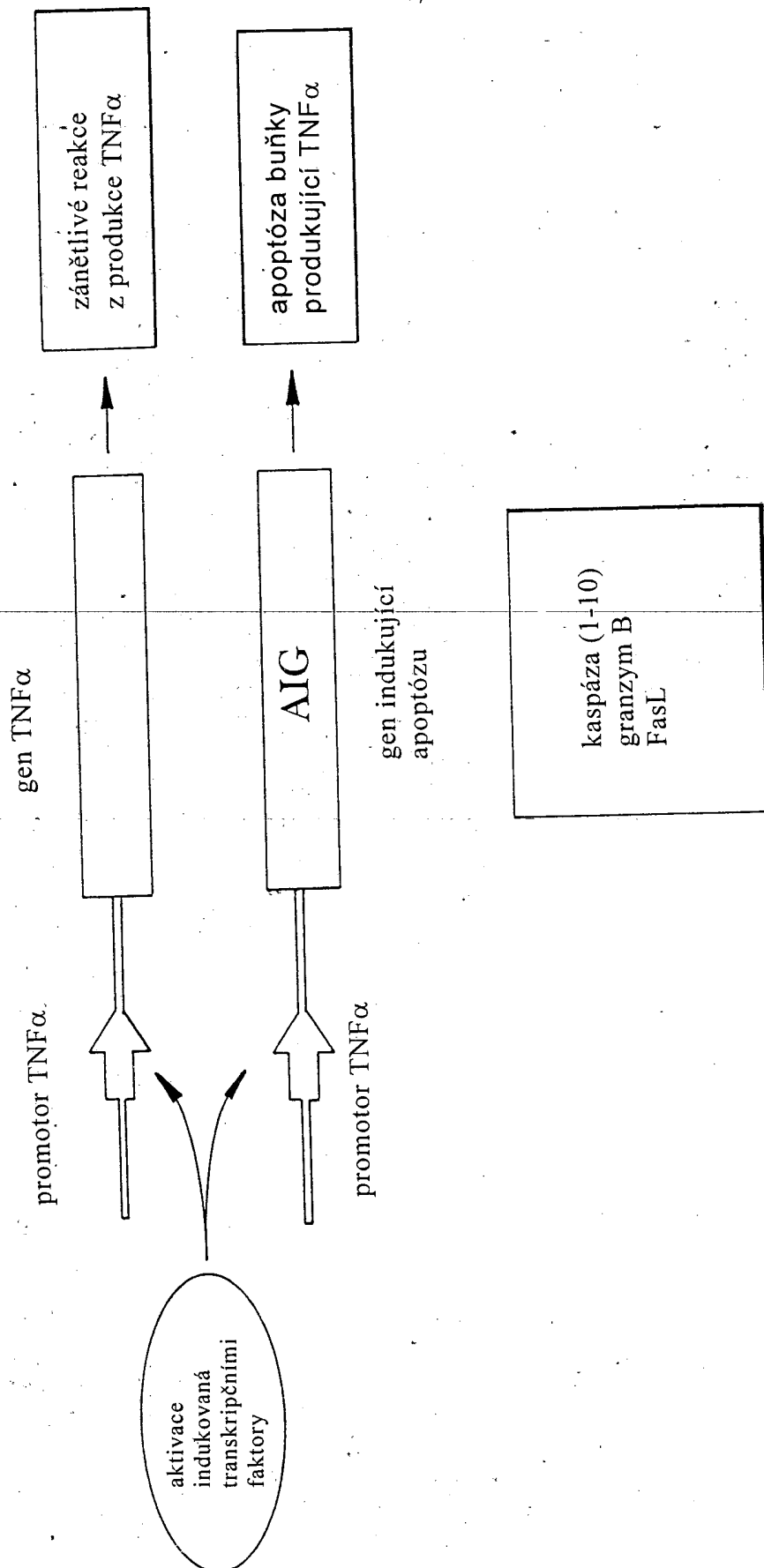
Zastupuje:

08.11.99

PV3061-99

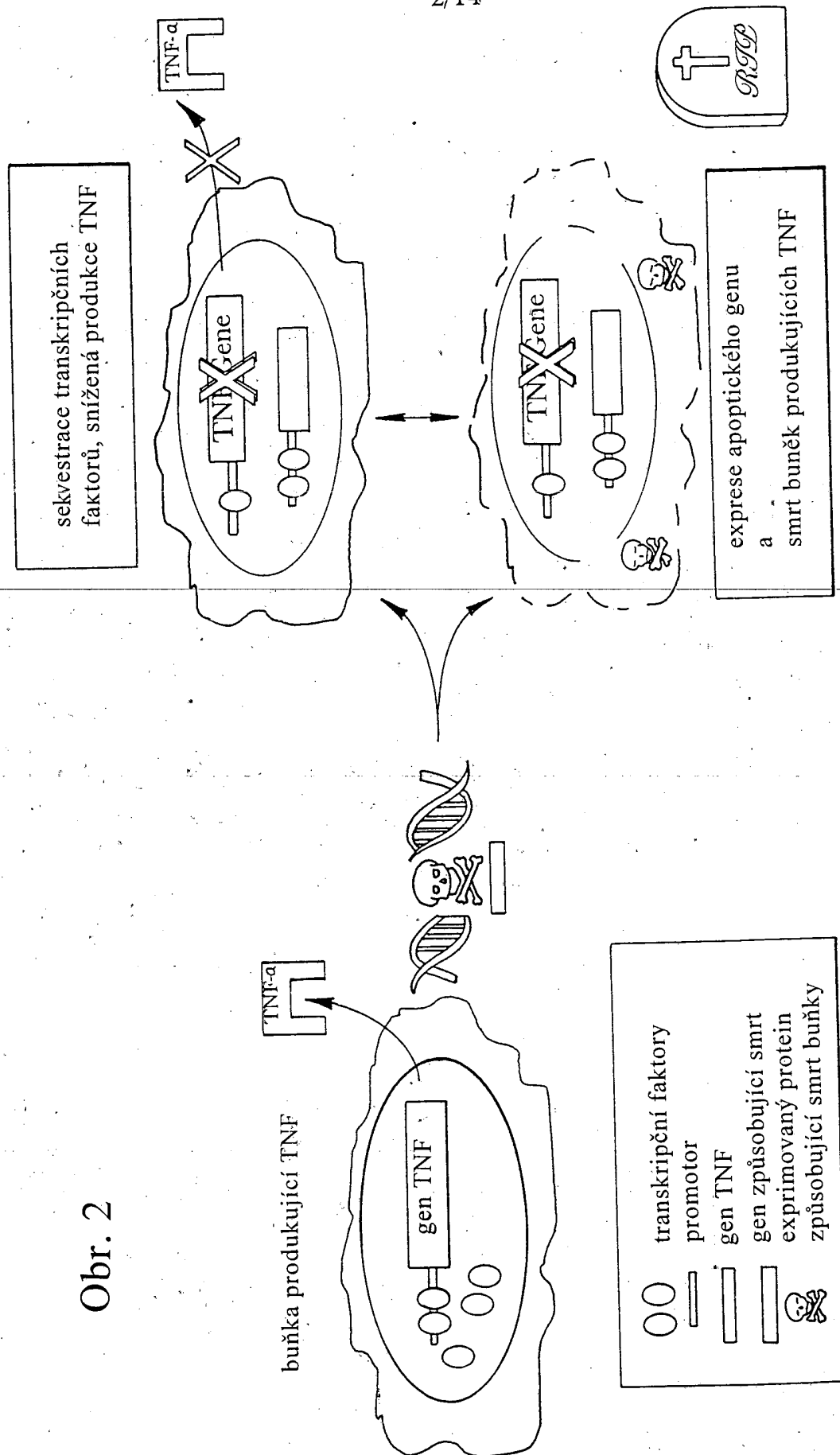
4624

1/14



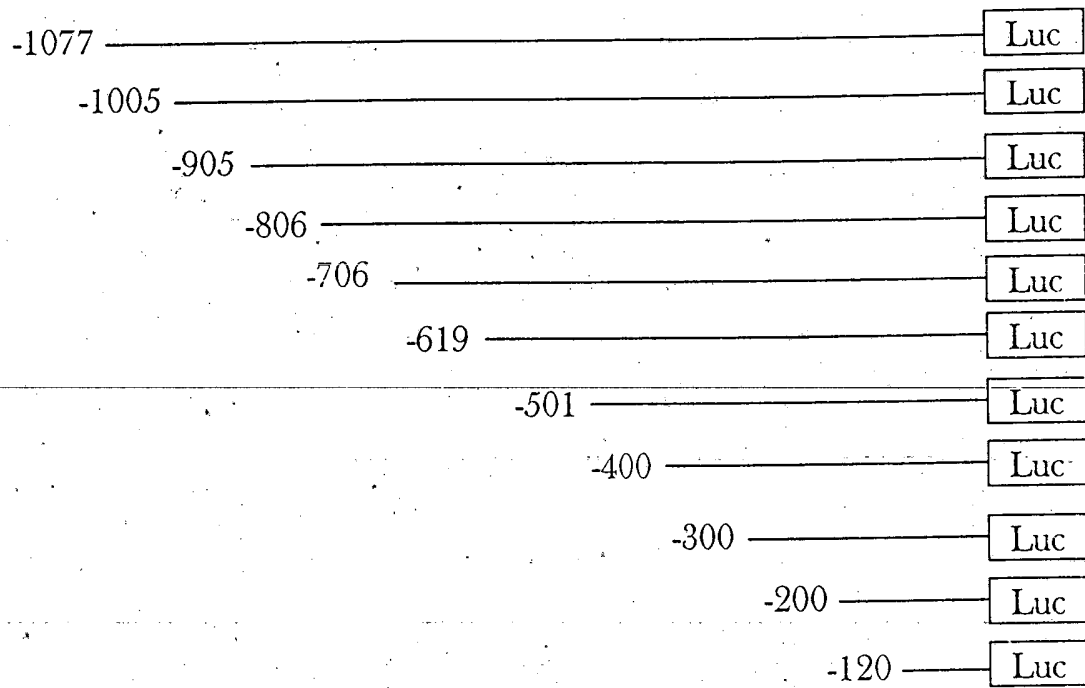
Obr. 1

Obr. 2



08.11.99

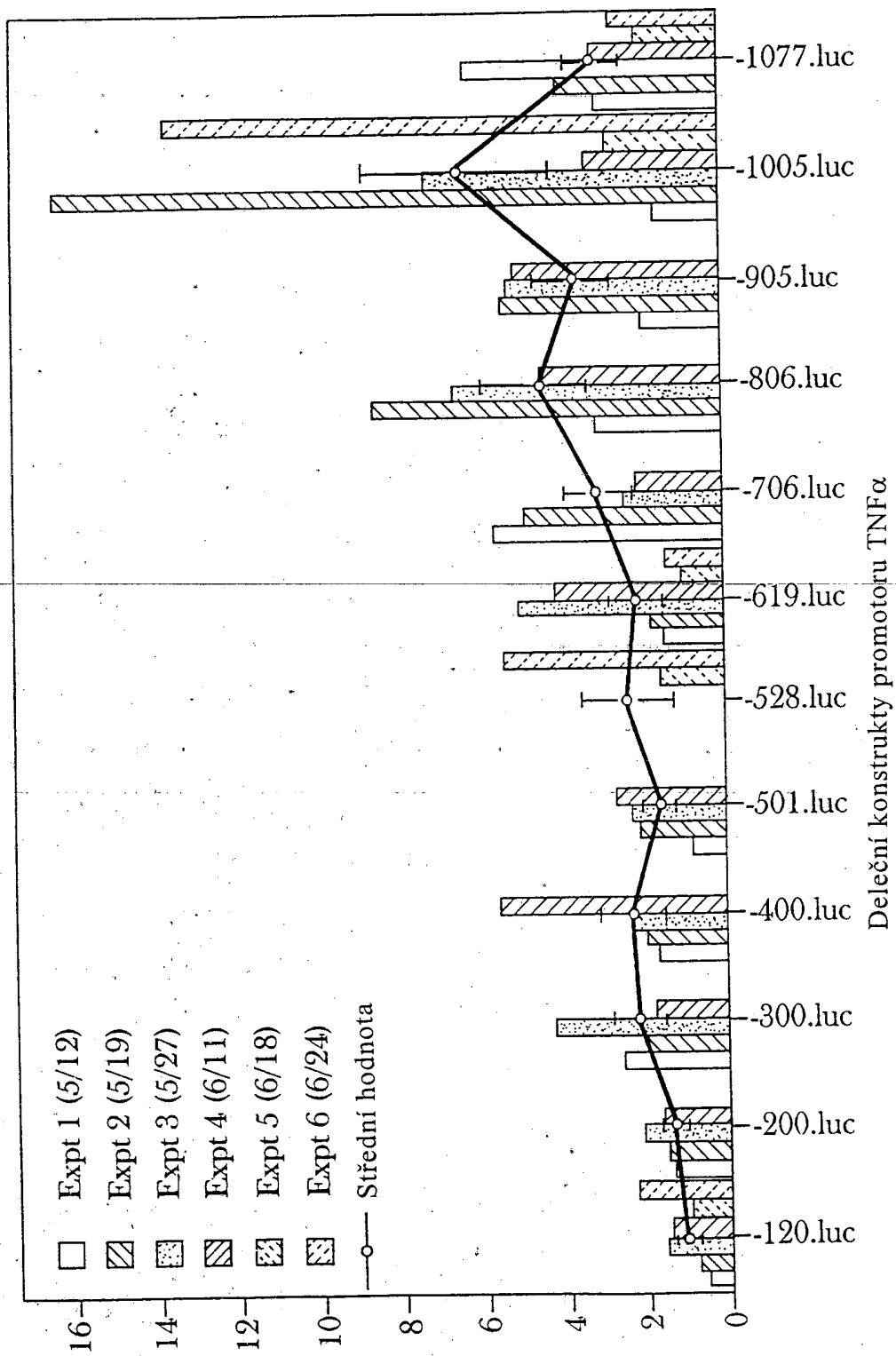
3/14



Obr. 3

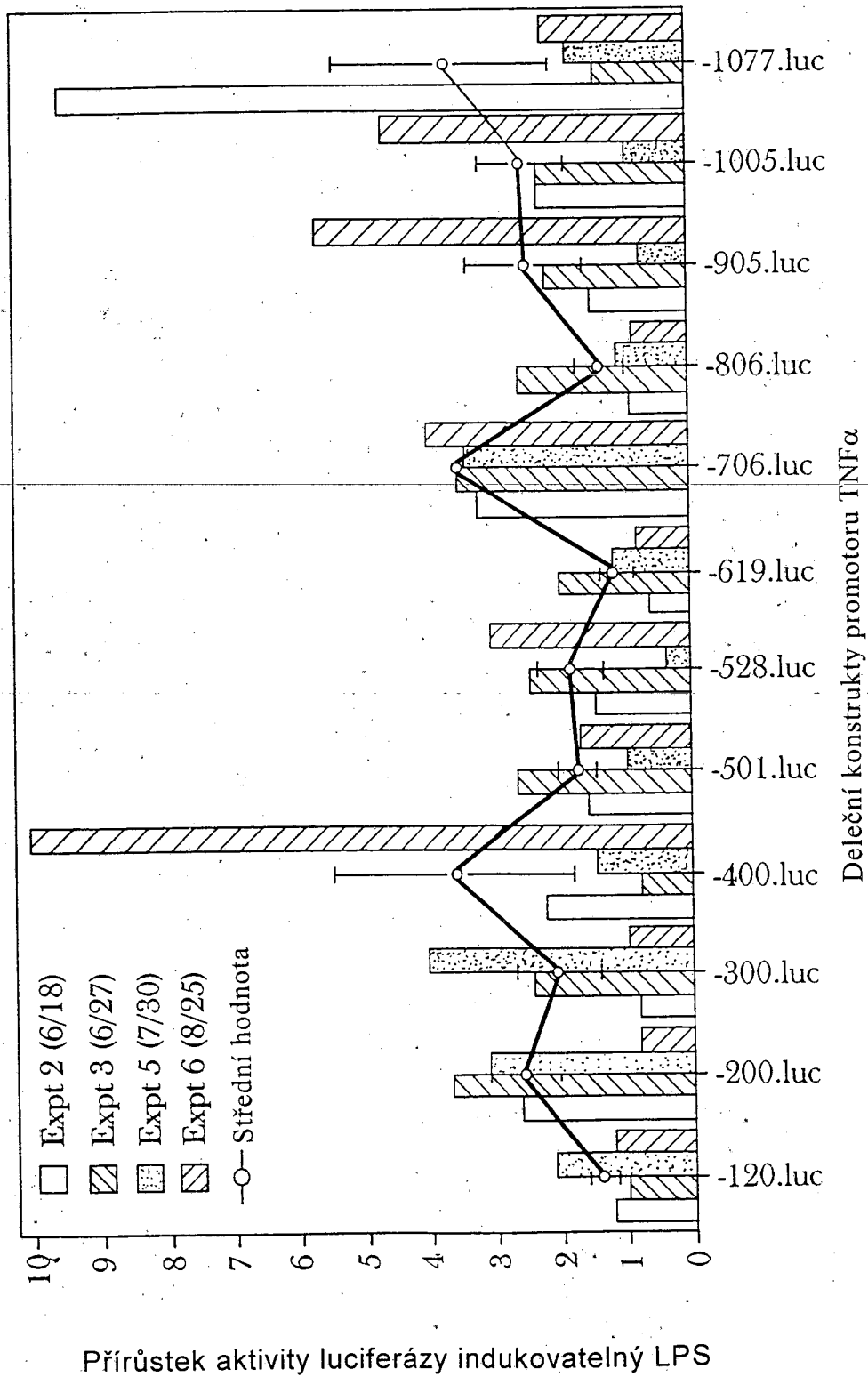
08.11.99

4/14



Obr. 4a

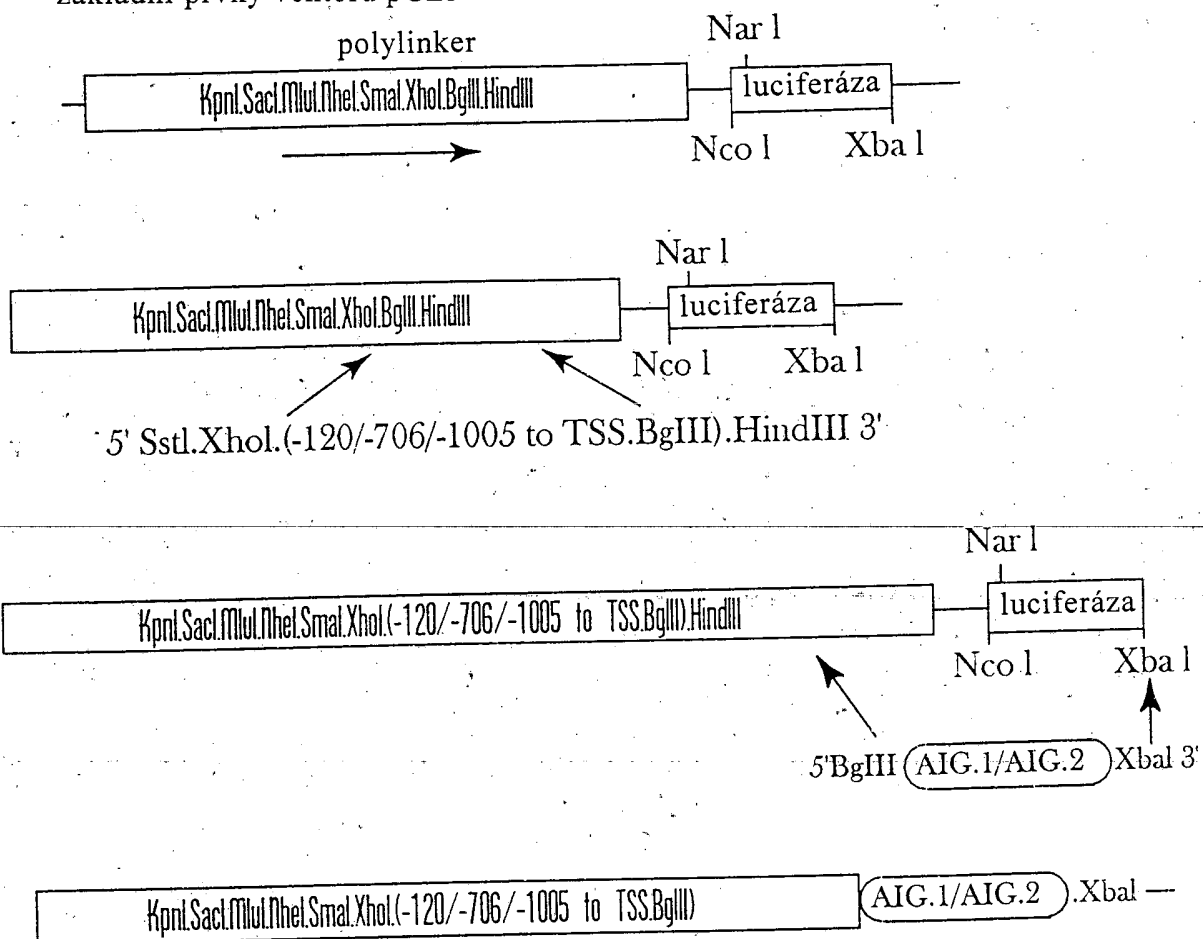
5/14



Obr. 4b

6/14

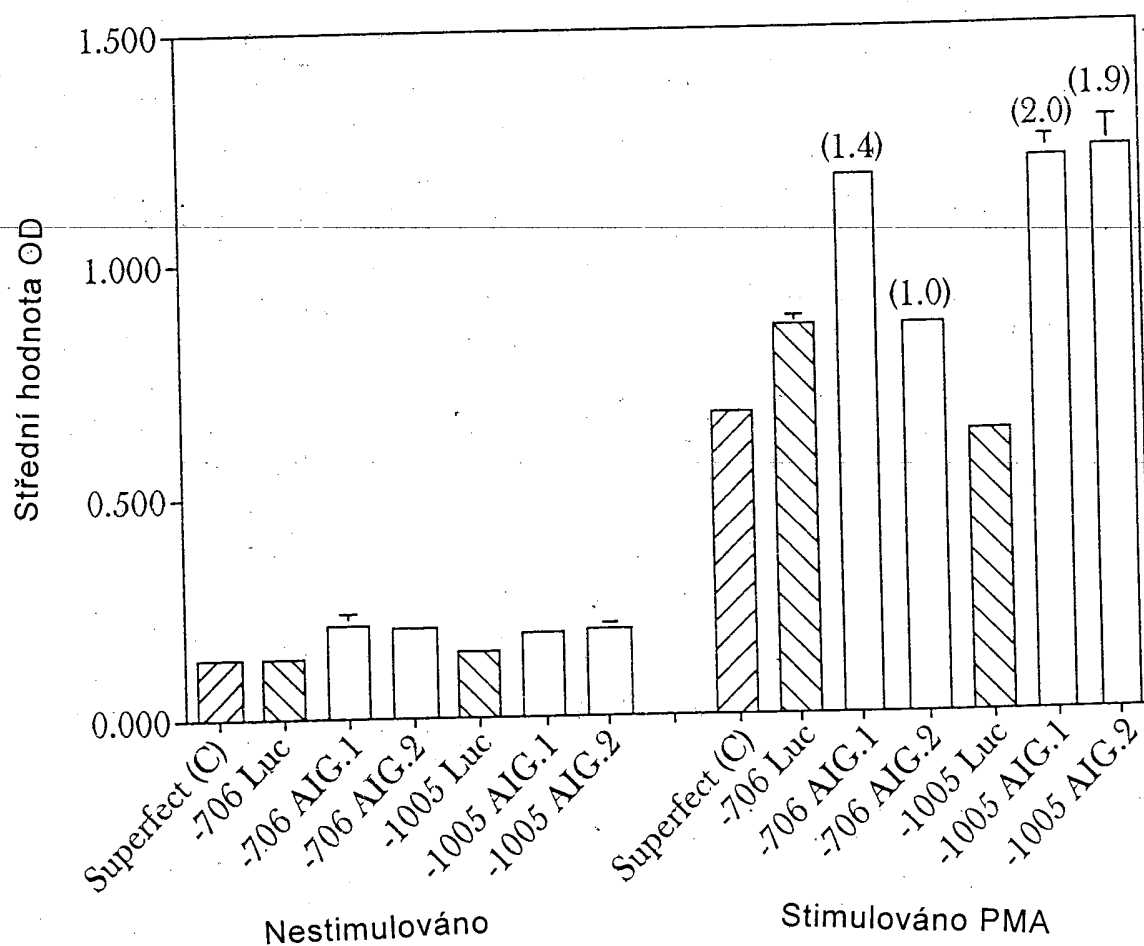
základní prvky vektoru pGL3



Obr. 5

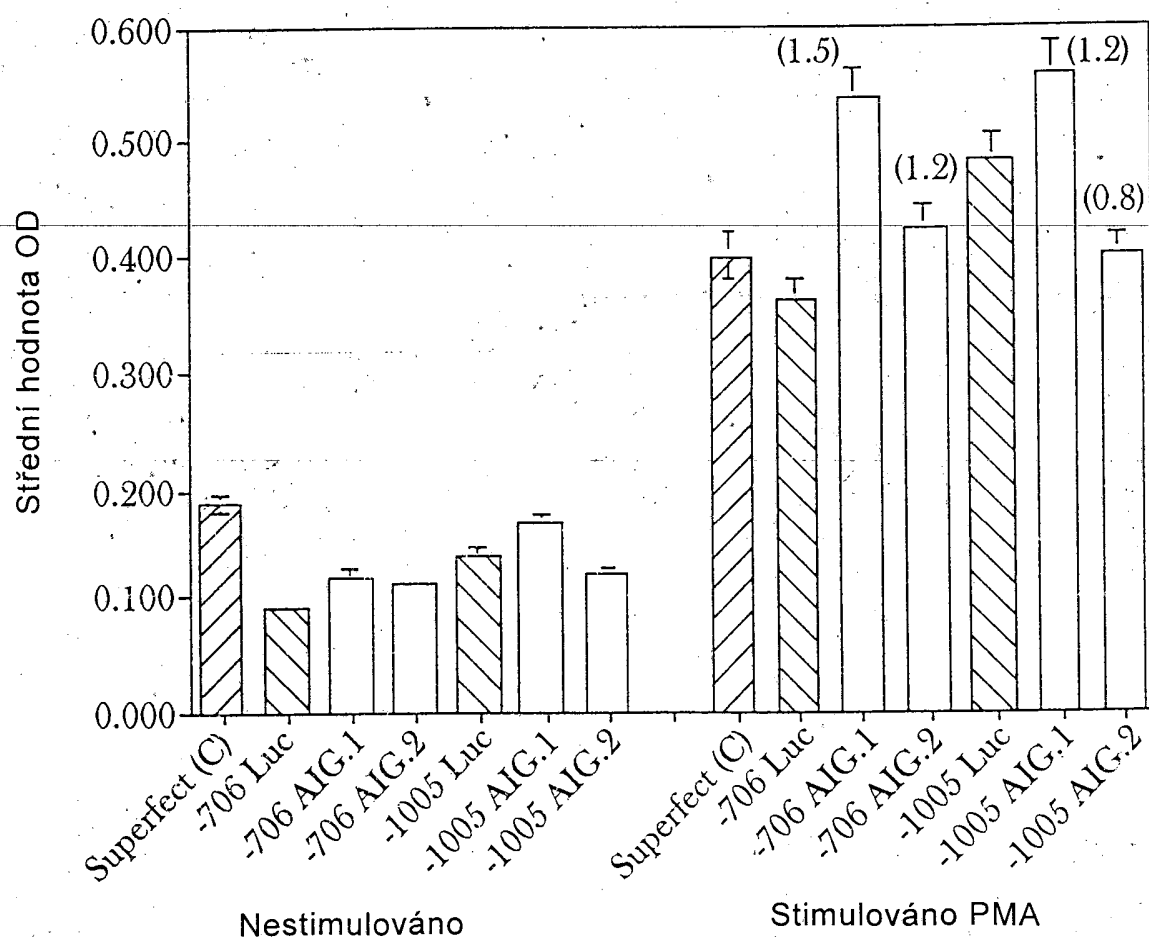
08.11.99

7/14



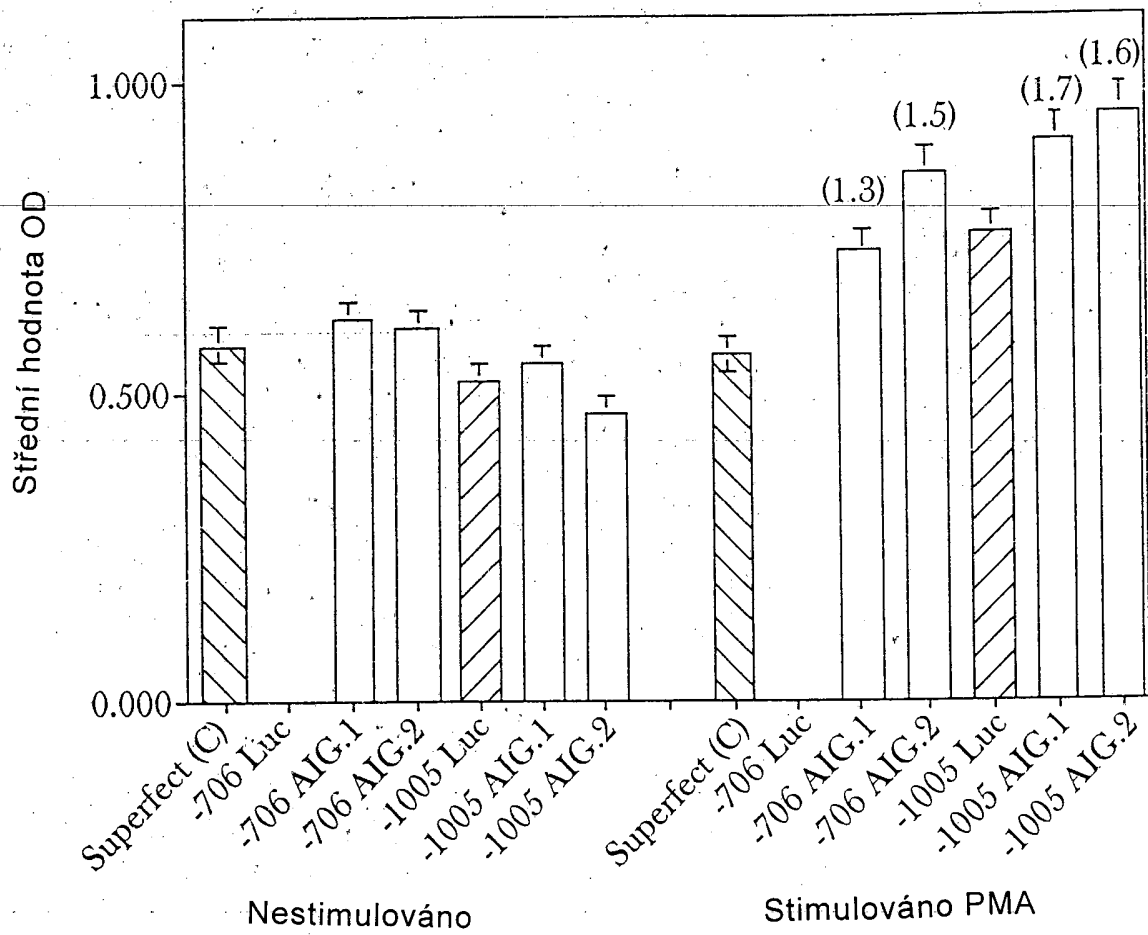
Obr. 6a

8/14



Obr. 6b

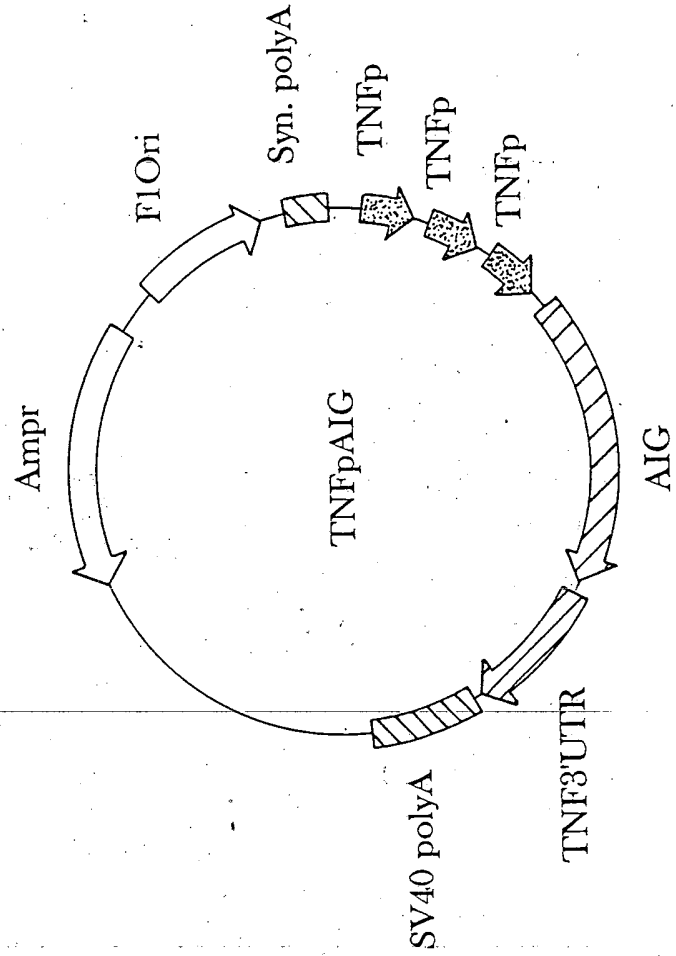
9/14



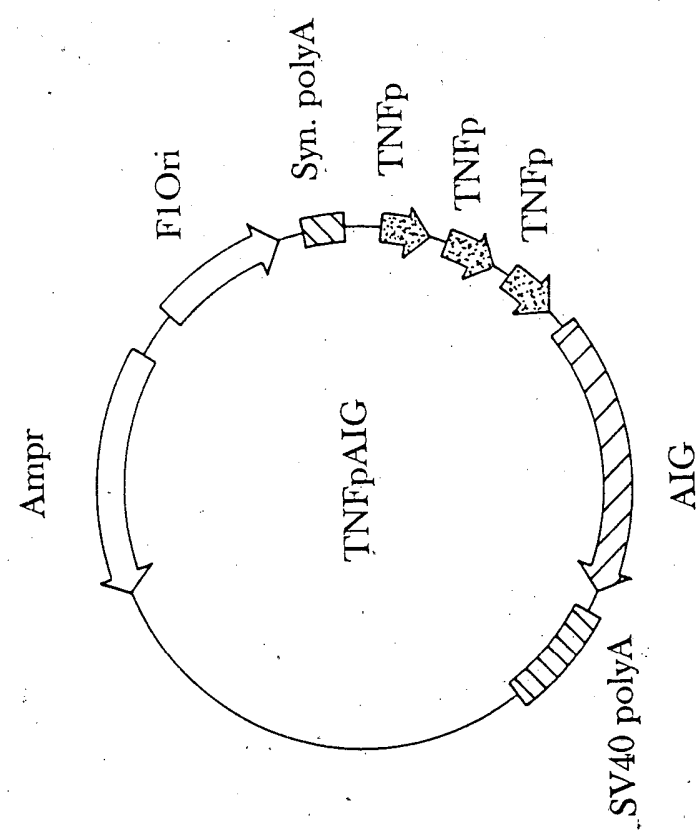
Obr. 6c

03.11.99

10/14

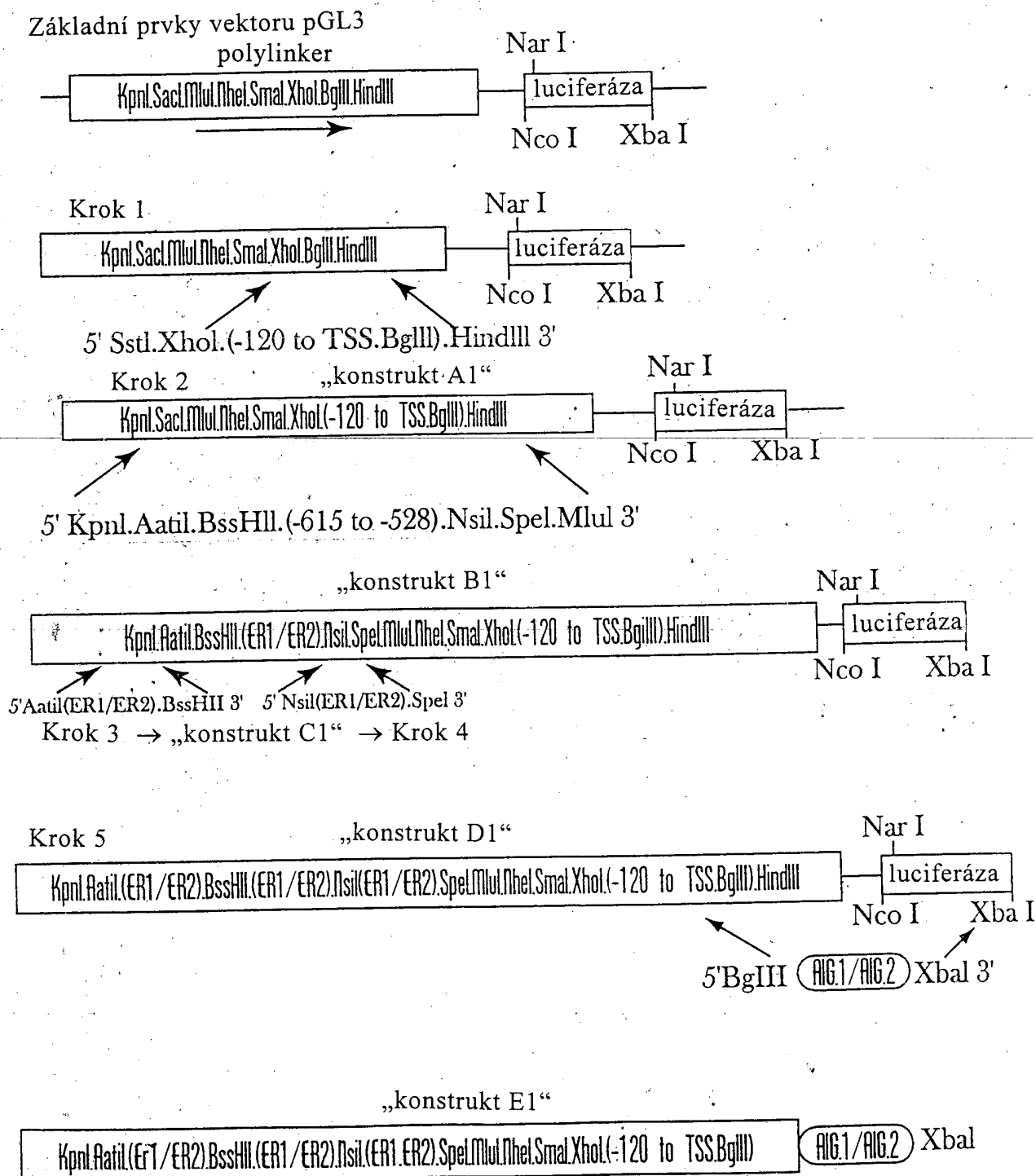


Obr. 7b



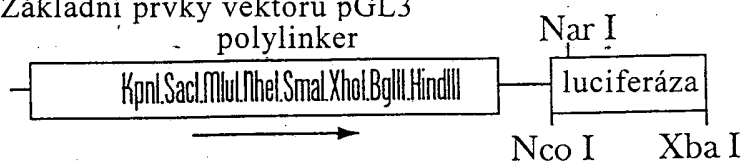
Obr. 7a

11/14

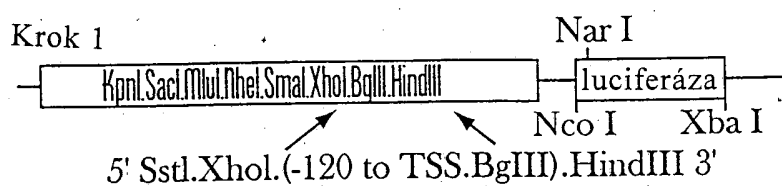


Obr. 8a

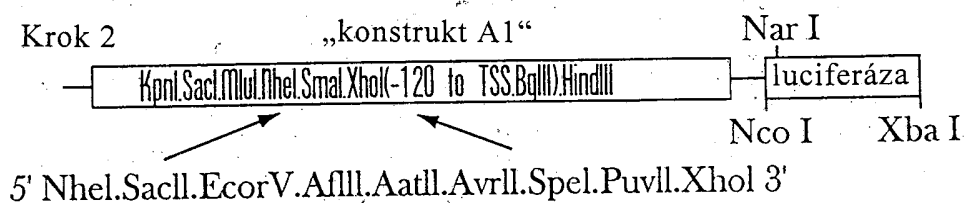
Základní prvky vektoru pGL3
polylinker



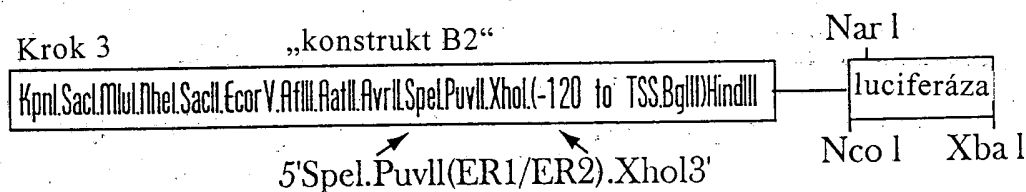
Krok 1



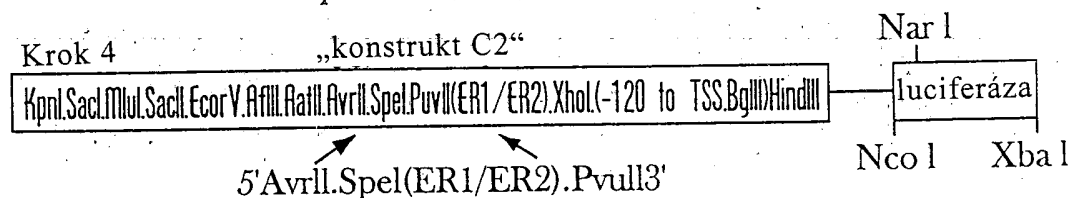
Krok 2



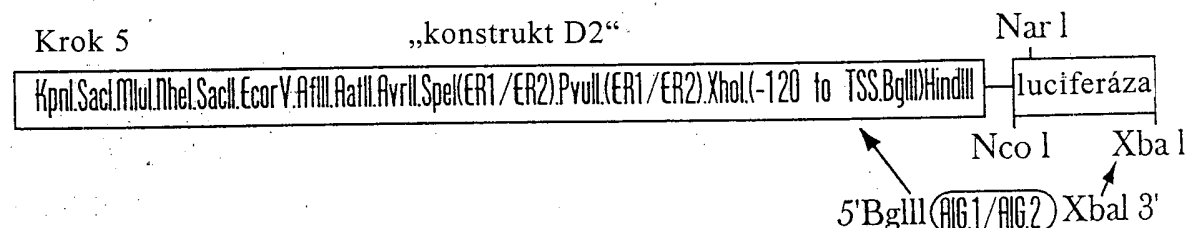
Krok 3



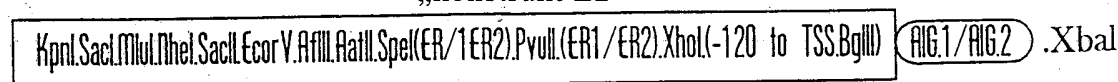
Krok 4



Krok 5

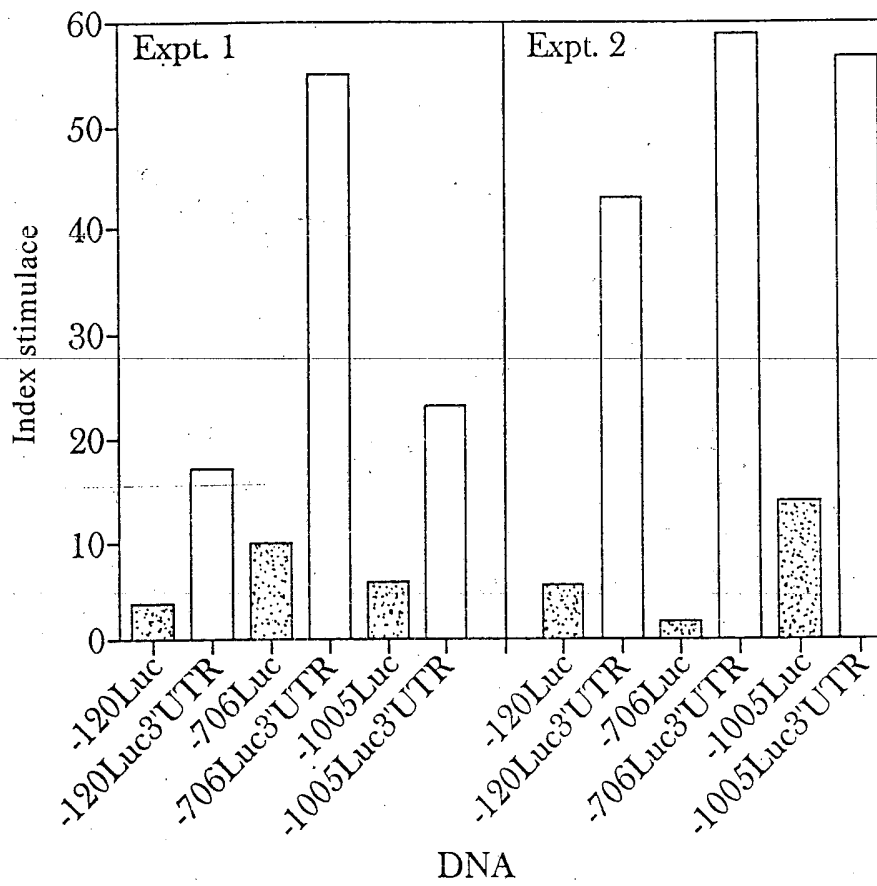


„konstrukt E2“

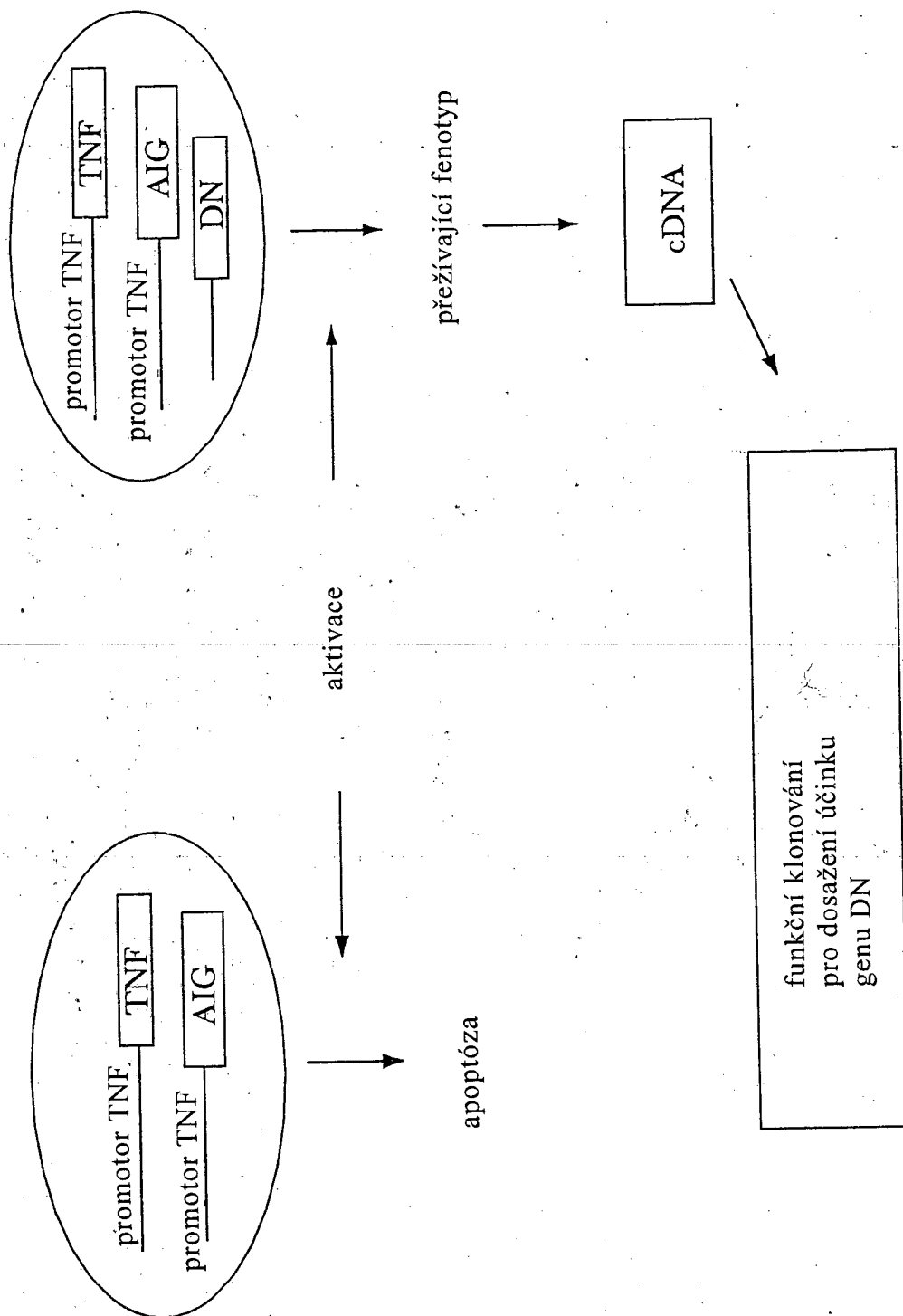


Obr. 8b

13/14



Obr. 9



Obr. 10