

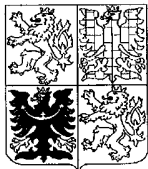
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3111

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.01.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.02.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/076316**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/00637**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/43840**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/85

C 12 N 9/64

C 12 Q 1/68

A 61 K 31/70

A 61 K 48/00

/(C 12 N 5/10)

(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:

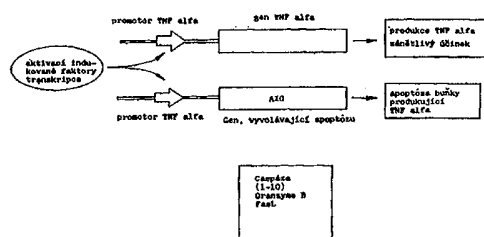
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Samoregulovatelná apoptóza zánětlivých buněk
genovou terapií**

(57) Anotace:

Popisují se chimerové nukleové kyseliny a terapeutická indukce apoptózy v aktivovaných zánětlivých buňkách nebo v buňkách v místě zánětu tím, že se do těchto buněk zavede chimerová nukleová kyselina. Chimerová nukleová kyselina má alespoň jeden zesilovač promotoru TNF α připojený k funkční kopii promotoru TNF α a dále připojený alespoň k jedné kopii genu indukujícího apoptózu, který je dále připojen k 3'UTR. Gen vyvolávající apoptózu je granzym B. Řešení se dále vztahuje k metodám přípravy a použití chimerových nukleových kyselin vhodných pro samoregulaci apoptózy a farmaceutických kompozic, které obsahují uvedené chimerové kyseliny za účelem léčby zánětlivého onemocnění.



CZ 2000 - 3111 A3

Samoregulovatelná apoptóza zánětlivých buněk genovou terapií

4/12/00

Oblast techniky

Vynález se týká oboru molekulární biologie a imunologie. Vynález popisuje vyvolání apoptózy v zánětlivých buňkách tak, že se do těchto buněk zavede gen, který v uvedených buňkách vyvolává apoptózu (programované odumírání buněk nebo odumírání buněk které není nekrotického původu).

Dosavadní stav techniky

V mnoha případech zánětů se produkují ve velkém množství cytokiny, jako jsou IL-1 β , IL-10, GM-CSF a TNF α , jako výsledek masové agregace a akumulace zánětlivých buněk (Brennan F.M. et al., British Medical Bulletin 1995, 51/2, 368-384). Pozitivní a nebo negativní regulace cytokinů v zánětlivé tkáni může být přímo nebo nepřímo odpovědná za zhoršení chronického zánětlivého onemocnění. Například nejvýznamnějším patologickým jevem v případě revmatoidní artritidy (RA) je lokální zánětlivé místo (to znamená synoviální klouby). Proto je pravděpodobné, že cytokiny produkované synoviálními klouby pacientů trpícími RA mají důležitou úlohu v procesu onemocnění. Věří se, že cytokiny IL-1 β a TNF α jsou zodpovědné za poškození chrupavky a kosti, které je pro toto onemocnění charakteristické (popisuje se v publikaci Dayer J. M. et al., J. Exp. Med. 1985, 162, 1208-1215, Gowen M. et al., Nature 1983, 306, 378.380). Ukázalo se, že přítomnost velkého množství IL-1 β a TNF α v synoviálních kloubech urychluje u hlodavců vývoj artritidy vyvolané kolagenem (popisuje se v publikaci Brennan F. M. et al., Clin. Expt. Immunol., 1994, 97/1, 1-3).

Apoptóza je základní fyziologický proces při embryonálním vývoji a při udržování homeostázy tkáně (popisuje se v publikaci Raff, M. C. *Nature*, 1992, 356, 397, Vaux, D. L. et al., *Cell*, 1994, 76, 777). Neúplnost tohoto nekrotického přirozeného procesu se projeví řadou neoplastických, neurodegenerativních a autoimunitních onemocnění (popisuje se v publikaci Thompson, C.B., *Science*, 1995, 267, 1456). Biochemické znaky zahrnující kaskádu signální transdukce jsou relativně komplexní a nejsou zcela jasné. Různé stimuly zahrnující aktivaci specifických receptorů, jako je vývojový konzervativní exekuční mechanismus zpuštěný TNFR1 nebo Fas, vyvolává odumírání buněk (popisuje se v publikaci Ahkenazi, A. a Dixit, V. M., *Science*, 1998, 181, 1305).

Granzym B je serinová proteáza, která se primárně nachází v cytoplazmatických granulích cytotoxických lymfocytů T a v přirozených buňkách K. Granzym B má důležitou úlohu při vyvolání apoptických změn v cílových buňkách pomocí odumírání zprostředkovaným cytotoxickými buňkami (popisuje se v publikaci Huesel J.W. et al., *Cell*, 76, 977-987, 1994, Shi, L. et al., *J. Exp. Med.* 176, 1521-1529, 1992) částečně katalýzou štěpení a aktivací několika kaspáz (popisuje se v publikaci Salvesen, G. S. and Dixit, V. M., *Cell*, 91, 443-446, 1997) a dráhou, která není závislá na kaspázách (Andrade, F. et al., *Immunity* 8, 451-460, 1998). Granzym B se produkuje jako polypeptid obsahující vedoucí peptid oddělený deaktivujícím dipeptidem (Gly-Glu) od aktivního polypeptidu granzymu B. Podobně jako kaspázy, granzym B rozeznává substráty pro štěpení specificky v kyselině aspartové.

TNF α je cytokin, který hlavně syntetizují monocyty, makrofágy a lymfocyty jako odezvu na aktivaci. Klasické elementy řídící jejich expresi se nacházejí v blízké nebo ve vzdálené promotorové oblasti (popisuje se v publikaci Pauli, U. *Critical Rev. Eukaryotic Gene Expression*, 1994, 4, 323-

344). Dále v textu se uvádí oblasti, které hrají důležitou úlohu při aktivitě promotoru TNF α :

- a) ukázalo se, že elementy TNF α -responsivní se nacházejí mezi páry bazí -100 až -125. Oblast -108 až -101 bp obsahují palindrom TGAGCTCA, který je podobný sekvenci AP-1, která obsahuje PMA-responsivní elementy. Více kopií -125 až -85 bp potvrzují sedminásobnou až jedenáctinásobnou indukci exprese reportního genu (popisuje se v publikaci Leitman, D. et al., J. Biol. Chem. 266, 9343, 1991),
- b) ukázalo se, že PMA-responzivní elementy jsou přítomny mezi -101 až -286 páry bazí (popisuje se v publikaci Hensel, G et al., Lymphokine Res. 8, 347, 1989),
- c) ukázalo se, že responzivní element vyvolávající protilátky proti CD3 (stejně jako protilátky indukované Ca-inoforem) leží mezi páry bazí -118 až -80. Sekvence KappaB3 (GGGTTTCTCC) v této oblasti je velmi důležitá pro aktivaci promotoru TNF α pomocí Ca-inoforu citlivou na CsA. Ukazuje se, že tyto elementy optimálně fungují v kontextu se svým vlastním promotorem (Goldfield, et al., J. Exp. Med. 178, 1356, 1993),
- d) v buňkách U937 se PMA-responzivní element nachází mezi páry bazí -95 až -36 a cAMP-responzivní element (CRE) se nachází v poloze -107 až -99 párů bazí. Tato oblast neodpovídá PMA (popisuje se v publikaci Economou, J. S., et al., J. Exp. Med. 170, 321, 1989).
- e) všechny tři místa kappaB (kappaB1 (-587 až -577), kappaB2 (-210 až -202) a kappaB3 (-98 až -87)) váží protein indukovatelný viry, ačkoli delece těchto míst neovlivňuje indukovatelnost virem (Goldfield, A, et al., PNAS, 87, 9769, 1990). Deleční mutanti míst kappaB ukazují, že nejsou primárními cíly v případě

stimulace PMA lidského genu TNF α (Goldfield, A. et al., J. Exp. Med. 174, 73, 1991),

- f) v myším systému jsou konstrukce promotoru TNF α -1059, -695 a -655 bp silně indukovatelné LPS. Tato indukovatelnost LPS se velmi omezila v konstrukci -451 a dále mezi -301 a 241 bp. Fragment promotoru TNF α nebyl v makrofágách exprimován a silně se exprimoval po stimulaci LPS. Největší pokles aktivace byl v poloze -659 až -655 bp, kde se v promotoru TNF α nachází element kappaB (Shakhov, A. N. et al., J. Exp. Med., 1990, 171, 35, Drouet, C. et al., Immunol., 1991, 147, 1694).

Elementy v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) genu TNF α jsou dobře známy tím, že jsou důležité při post-transkripční regulaci. V myším systému se provedla analýza vlivu 3'UTR, kde ve spojení s homologním promotorem indukovatelnost LPS byla velmi silná. Za použití promotorového systému myšího TNF α se ukázalo, že 3'UTR účinně inhibuje aktivitu CAT ve třech buněčných liniích, které nejsou makrofágy. Jsou to HeLa, NIH3T3 a L929. V 3'UTR se několikrát opakovala sekvence TTATTTAT a ukazuje se, že tato sekvence se podílí na regulaci (Han, J., et al., J. Immunology, 1991, 146, 1843-1848, Crawford, F. K. et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 22383-22390).

Různé buňky, jako jsou aktivované makrofágy, aktivované T buňky, synoviocyty podobné makrofágům stejně jako synoviocyty podobné fibroblastům a transformované synoviocyty podobné makrofágům (také se nazývají panocyty) se nacházejí v zánětlivých kloubech. Invazivní struktura nazývaná panus se odvodila z hyperplastické podstaty synoviocytů a panocytů. Panus může vzniknout rozsáhlou proliferací buněk a/nebo odbouráním apoptózy v těchto buňkách. Proliferační index v těchto buňkách je relativně nízký. Proto hyperplázie u synoviocytů je způsobena abnormalitami při apoptóze

synoviálního spojení. V synoviu je frekvence buněk v konečném stádiu apoptózy nízká. V synoviálních fibroblastech RA se mohou vyskytovat abnormality p53 mutací, které mohou vést k rezistenci na apoptózu. Navíc v synoviální tkáni vzniká velké množství pro-zánětlivých cytokinů, jako jsou TNF α a IL-1 β . Vznikají v různých typech buněk ve spojení chrupavka-panus, které zahrnuje buňky linie makrofágů, synoviocytů podobných makrofágům, aktivovaných T-buněk a pravděpodobně synoviocytů podobných fibroblastům (popisuje se v publikaci Chu C. Q. et al., Arthritis and Rheumatism, 1991, 34, 1125-1132, Deleuran B. W., et al., Arthritis and Rheumatism, 1992, 35, 1170-1178). To pokračuje infiltrací zánětlivých buněk a produkcí a produkcí více pro-zánětlivých cytokinů a faktorů, které jsou zodpovědné za proliferaci synoviálních buněk. Vedle popsaných zánětlivých účinků TNF α má důležitou TNF α úlohu při různých pro-zánětlivých jevech.

TNF α vyvolává aktivitu IL-1 β v monocytech. Vedle toho se ukázalo, že anti-TNF α neutralizující protilátky snižují celou produkci IL-1 β (Portillo et al., Immunol., 1989, 66, 170-175, Brennan F. M., et al., British Medical Bulletin 1995, 51/2, 368-384). Tak další výhodou při blokování účinku zánětlivého cytokinu TNF α byla redukce při produkci stejně destruktivního pro-zánětlivého mediátoru IL-1 β . Je dobře známo, že TNF α je aktivátor transkripce jiných genů spojených se zánětem. Například přítomnost TNF α stimuluje produkci jiných cytokinů (jako je GM-CSF) a buněčných povrchových receptorů, které zahrnují antigeny HLA třídy II a adhezivní molekuly (popisuje se v publikaci Alvaro-Garcia J. M., et al., J. Exp. Med., 1989, 146, 865-875), které podporují vznik aktivovaných buněk T a neutrofilů, což vede k synoviálnímu zánětu a hyperplázii a také k masivnímu poškození chrupavek a kostí (popisuje se v publikaci Allen J. B., J. Exp. Med., 1990, 171, 231).

Běžná terapie proti zánětlivým poruchám je v typickém případě řízena proti příznakům zánětu. Taková terapie poskytuje pouze dočasnou úlevu, aniž dojde podstatnému oddálení progresu onemocnění. Naopak terapie, jejímž cílem je TNF α a jiné faktory vyvolané zánětlivým procesem jsou pravděpodobně více slibné. Například u zvířecího modelu artritidy vyvolané kolagenem protilátky proti TNF α a rozpustná chiméra receptoru TNF α -IgG účinně redukuje otok tlapek, postižení kloubů a poškození kostí (popisuje se v publikaci Williams R. O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89, 9784-9788). Testy na člověku za použití protilátek proti TNF α a chimérových molekul receptoru TNF α -IgG dávají dramatické výsledky (Elliot M. J., et al., Arthritis and Rheumatism, 1993, 36, 1681-1690, Elliott M. J., et al., Lancet, 343, 1105-1110). Ačkoli se zdá, že léčba těmito antagonisty TNF α je velmi dobře snášena, vede také k produkci protilátek proti rekombinantním proteinům. Tyto terapie pak mohou být vhodné pro dlouhodobou léčbu a nezpůsobují opravdové zastavení nemoci.

Dokument WO 97/07828 popisuje metody léčby genovou terapií pacienta s akumulací buněk nebo s chronickým zánětlivým onemocněním, které je výsledkem genu regulujícího defektní apoptózu specificky p53. Léčba upravuje defekt genu divokého typu spojeného s promotorem, který řídí expresi genu regulujícího apoptózu.

Za účelem aktuálně upravit progresi onemocnění, TNF α musí být cílem terapie, která je specifická pro TNF α . Takovou nepřerušovanou léčbu není možné praktikovat s těmito biologickými činidly a bude obtížné je aplikovat po dlouhou dobu.

Při alternativním způsobu léčby zánětlivé synovium se může odstranit za použití metody chirurgické (Herold N. and Schroder H. A., Acta Orthop. Scand., 1995, 66, 252-254, Ogilvie-Harris D. J. and Weisleder L., Arthroscopy, 1995, 11, 91 - 95), chemické (Cruz-Esteban C. and Wilke W. S., Bailliere's Clinical Rheumatol., 1995, 9, 787-801) nebo zářením vyvolané synovektomie (popisuje se v publikaci Cruz-Esteban C. and Wilke W. S., Bailliere's Clinical Rheumatol., 1995, 9, 787-801). Po artroskopickém odstranění se získaly hraniční až dobré výsledky. Synovektomie, která se neprovedla chirurgickým zásahem se uskutečnila za použití různých chemických činidel, jako je kyselina osmičelá, alkylační činidla, jako je dusíkatý yperit a tepa a metotrexát. Bohužel synovektomie, které se neprovádí chirurgickou cestou (zahrnující chemickou a zářením indukovanou synovektomii) mají komplikovaný postup, poskytují pouze krátkodobé zlepšení a vykazují pouze malé omezení synoviální hyperplázie. Navíc většina nechirurgických alternativ jsou potenciálními teratogeny. Přirozená zánětlivá odezva souhlasí s poškozením tkáně, které vzniká chemickým nebo chirurgickým zásahem. Nakonec je nutné poznamenat, že tyto přístupy jsou nevýhodné tím, že existuje riziko a vedlejší účinky běžně spojené s běžnou léčbou farmaky a invazivních chirurgických metod, které zahrnují nákladnou a nepříjemnou hospitalizaci a rehabilitaci.

Stále je nutné vytvořit účinný terapeutický přístup pro léčbu zánětlivých poruch zvláště pak RA.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje způsoby a kompozice vztahující se k poškození buněk, které produkují $TNF\alpha$, vyvolané apoptózou. Vynález popisuje chimérové molekuly nukleových kyselin, které

mají alespoň jednu oblast zesilující promotor TNF α (obsahující nukleovou kyselinu se sekvencí SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 nebo konzervativní substituci a nebo její alelické varianty) spojenou s promotorem TNF α . Promotor TNF α se dále připojil na sekvenci nukleové kyseliny, která kóduje protein granzymu B nebo konzervativní substituci nebo její alelické varianty, které naopak jsou dále připojeny na sekvenci nukleové kyseliny 3'UTR.

Vynález dále popisuje TNFp-AIG a podobné chimérové konstrukce nukleové kyseliny, způsoby jejich přípravy a způsoby jejich použití a přípravky, které je obsahují.

Dále vynález popisuje způsob léčby zánětlivých stavů, aplikací pacientovi, který tuto léčbu potřebuje, farmaceuticky účinného množství prostředku, který obsahuje chimérovou molekulu nukleové kyseliny.

Dále vynález popisuje způsob vyvolání apoptózy v buňkách transfekovaných chimérovou nukleovou kyselinou TNFp-AIG, dále způsob pro *in vitro* selekci variant somatických buněk, které neprodukují TNF α , v populaci buněk, způsob identifikace dominant/negativních genů odpovědných za vznik populace, která neprodukuje TNF α , a způsob identifikace produktů odpovědných za regulaci produkce TNF α .

Podstata vynálezu

Vynález popisuje nové chimérové molekuly nukleových kyselin vhodné pro použití v terapeutických kompozicích a v metodách, které používají takové kompozice. Kompozice jsou řízeny na selektivně indukovanou apoptózu v buňkách produkujících TNF α , což způsobuje poškození těchto buněk.

Zkratka 3'UTR znamená 3'nepřekládanou oblast.

Zkratka „AIG“ znamená gen vyvolávající apoptózu. IAG zahrnuje granzym B.

Zkratka „CsA“ znamená cyklosporin A, což je biologicky aktivní metabolit hub, který vykazuje imunosupresivní vlastnosti.

Zkratka „DN“ znamená dominantní/negativní genové produkty, které mají negativní účinek na expresi nebo funkci jiných genů nebo genových produktů.

Zkratka „ER“ znamená oblast zesilovače, přičemž ER1 má sekvenci SEQ ID NO: 4, ER2 má sekvenci SEQ ID NO: 5, ER3 má sekvenci SEQ ID NO: 11 a ER4 má sekvenci SEQ ID NO: 12.

Zkratka „GB“ znamená granzym B.

Zkratka „PMA“ znamená forbolmyristatacetat.

Zkratka „RA“ znamená revmatoidní artritidu.

Zkratka „TNF α “ znamená faktor nekrózy nádoru alfa.

Termíny „promotor TNF“, „promotor TNF α “ a „TNFp“ jsou zde zaměnitelné. Není-li uvedeno jinak, tyto termíny se vztahují k celé nukleotidové sekvenci odpovídající přirozené minimální sekvenci promotoru TNF α připojené na jeden nebo více elementů zesilovače, které leží proti směru exprese.

Termín „substituce aminokyselin“ znamená nahrazení jedné nebo více aminokyselin. Jsou v podstatě konzervativní, když substituovaná aminokyselina má podobnou strukturu a/nebo chemické vlastnosti. Příklady konzervativního nahrazení jsou substituce leucinu izoleucinem nebo valinem, aspartátu glutamátem nebo threoninu serinem.

Termín „konzervativní varianty“ znamenají substituce aminokyselin v polypeptidu.

Termín „alelické varianty“ znamená varianty na úrovni nukleové kyseliny a proteinu, které působí konzervativní nebo nekonzervativní substituce, přičemž vzniká alternativní forma stejného genu.

Termín „reportní“ molekuly znamená chemické části, které se používají pro značení sekvence nukleové kyseliny nebo aminokyseliny. Reportní molekuly zahrnují, ale nejsou omezeny na radionuklidy, enzymy, fluorescenční, chemiluminiscenční nebo chromogenní činidla. Reportní molekuly jsou spojovány s určitou aminokyselinovou sekvencí nebo s určitou sekvencí nukleových kyselin, stanovují jejich přítomnost a umožňují jejich kvantifikaci.

Termín „reportní geny“ znamená nukleové kyseliny a jejich fragmenty, které kódují funkční protein, jako je luciferáza, jenž je možné použít při hodnocení aktivity heterologních promotorů.

Termín „funkční fragmenty“ polynukleotidu a nukleové kyseliny obsahují celou nebo libovolnou část nukleotidové sekvence, která má několik nukleotidů. Tyto fragmenty se mohou použít jako dostatečný genetický materiál pro iniciaci transkripce genu nebo kódování funkční podjednotky polypeptidu.

Tento vynález je založen na důkazu, že apoptóza zánětlivých buněk u jistých zánětlivých onemocnění je výhodná. Vynález se zvláště popisuje samoregulovatelnou apoptózu genovou terapií. Vynález dále popisuje chimerovou nukleovou kyselinu obsahující alespoň jeden zesilovač promotoru připojený alespoň k jedné funkční kopii minimálního promotoru. Promotor je gen nebo kombinace genů aktivovaných v zánětlivých

buňkách nebo v buňkách v místě zánětu. Tato chimerová nukleová kyselina je spojena alespoň s jednou kopií genu vyvolávajícího apoptózu (AIG) tak, že exprese AIG se řídí promotorem, přičemž cílem jsou zánětlivé buňky. Promotory indukovatelných genů, které se aktivují při zánětu, zahrnují sekvenci nukleové kyseliny promotoru TNF α a konzervativní substituci nebo jejich alelické varianty. Chimerové nukleové kyseliny podle vynálezu obsahují zesilovač, promotor a elementy AIG přímo spojené nebo vzdálené nebo blízko u sebe a jejich kombinace. Jak se uvádí shora v textu a popisuje se detailněji dále v textu v některých provedeních se použije v případě dosažení maximální účinnosti více kopií zesilovače, promotoru a/nebo AIG.

Vynález klade důraz na chimerové nukleové kyseliny obsahující alespoň jeden zesilovač promotoru TNF α spojený alespoň s jednou kopií minimálního promotoru TNF α a dále spojený, pouze z důvodů ilustrace, alespoň s jednou kopií AIG. Příklady provedení vynálezu obsahují tyto typy základních konstrukcí.

Gen vyvolávající apoptózu (který se nazývá AIG) je řízen promotorem TNF α (TNFp) nebo jiným indukovatelným genem, který se aktivuje při zánětu. V jednom provedení podle vynálezu se apoptóza selektivně indukovala v těch buňkách, které jsou schopny produkovat TNF α . TNFp-AIG nebo jiná chimerová nukleová kyselina může být vhodná pro zavedení *in vivo* za použití běžných metod genové terapie. Je výhodné v určitém provedení vynálezu, kde chimerová nukleová kyselina je TNFp-AIG, aby se exprimovala pouze v těch buňkách, které produkují zánětlivé cytokiny TNF α . Vedle toho, protože chimerová nukleová kyselina obsahuje elementy promotoru TNF α , také odděluje indukovatelné TNFp-selektivní transkripční faktory. To vede k omezení endogenní produkce TNF α . Vynález popisuje specificky TNFp-AIG

a podobné genové konstrukce, buňky obsahující chimerové nukleové kyseliny, způsoby vyvolání apoptózy v buňkách transfekovanými chimerovými nukleovými kyselinami, farmaceutické kompozice obsahující chimerové nukleové kyseliny, způsoby vhodné pro *in vitro* selekci variant somatických buněk, které neprodukují TNF α , v populaci buněk produkujících TNF α a podobně, způsob identifikace dominantních negativních/dominantních supresivních genů odpovědných za inhibici produkce TNF α a terapeutických metod za použití chimerové nukleové kyseliny.

Aby byla jasná diskuse dále v textu, uvádí se sekvence chimerové nukleové kyseliny podle vynálezu:

SEQ ID NO: 1 je nukleotidová sekvence odpovídající referenční promotorové sekvenci plné délky lidského TNF α , jak se popisuje v publikaci Takashiba S., et al., Gene, 1993, 131, 307-308). Číslo nukleotidů odpovídají číslování této sekvence.

SEQ ID NO: 2 je přirozená sekvence promotoru TNF α genu, který se používá TNF α podle vynálezu (-1077 nukleotidů od místa počátku transkripce, TSS). V nukleotidové sekvenci TNF α SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2 existuje několik rozdílů. Takové rozdíly v nukleotidových sekvencích promotoru TNF α se uvádějí v publikaci Takashiba S., et al., Gene, 1993, 131, 307-308).

SEQ ID NO: 3 je přirozená minimální sekvence promotoru TNF α (nukleotid -120 až -TSS), která zahrnuje alespoň jeden element zesilovače (místo k3). Popisuje se v publikaci Pauli, U., Crit. Rev. in Eucaryotic Gene Expression, 1994; 4, 323-344, Rhoades K.L. et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 22102-22107 a Takashiba S., et al., Gene, 131, 307-108).

SEQ ID NO: 4 je oblast zesilovače 1 (ER1) promotoru TNF α obsahující nukleotidy -1005 až -905.

SEQ ID NO: 5 je oblast zesilovače 2 (ER2) promotoru TNF α obsahující nukleotidy -706 až 517.

SEQ ID NO: 6 je další vícenásobné klonovací místa (MCS), které se zavedly proti směru exprese -120 minimálního promotoru TNF α v konstrukci -120pGL3.

SEQ ID NO: 7 je 3'nepřekládaná oblast (3'UTR) genu TNF α (popisuje se v publikaci Nedwin, G. E., et al., Nucleic Acid Research, 1985, 13, 6361-6373).

SEQ ID NO: 8 se granzym B v plné délce.

SEQ ID NO: 9 zkrácená forma granzymu B, který postrádá nukleotidy kódující vedoucí peptid a deaktivující dipeptid.

SEQ ID NO: 10 je granzym B v plné délce, který obsahuje nukleotidy kódující vedoucí peptid, ale postrádá nukleotidy kódující deaktivující dipeptid.

SEQ ID NO: 11 je oblast zesilovače 3 (ER3) promotoru TNF α , která obsahuje nukleotidy -234 až -120.

SEQ ID NO: 12 je zesilující oblast 4 (ER4) promotoru TNF α , která obsahuje nukleotidy -243 až -65.

SEQ ID NO: 13 je chimerová nukleová kyselina - 706TNFpGB3'UTR.

SEQ ID NO: 14 je chimerová nukleová kyselina - 1005THFpGB3'UTR.

Elementy promotoru TNF α vhodné pro přípravu konstrukcí chimerové kyseliny podle vynálezu se vybraly z elementů, které jsou schopné vyvolat expresi terapeutického genu, kterou řídí promotor TNF α . Tyto promotorové elementy se zde nazývají jako

„vyvolatelné cis elementy“, „cis-vyvolatelné elementy“ nebo „elementy zesilovače“ promotoru TNF α .

Elementy zesilovače se mohou fyzikálně spojit s minimální promotorovou sekvencí nebo se mohou oddělit od minimální promotorové sekvence sekvencí linkeru, která může obsahovat ale nemusí jedinečné restriční místo. Jak se uvádí shora v textu elementy zesilovače se mohou připojit přímo, mohou být vzdáleny nebo blízko od chimerové nukleové kyseliny podle vynálezu nebo v jejich kombinaci. Ty se v typickém případě v konstrukci nachází proti směru exprese od promotoru. Příklad elementů zesilovače promotoru TNF α jsou uvedeny v sekvenci SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11 a SEQ ID NO: 12. Mohou se také použít jejich funkční fragmenty nebo variace a jejich kombinace. Některé preferované genové konstrukce podle vynálezu zahrnují ty, které mají velké množství kopií elementů zesilovače. To znamená dvě nebo více kopií. Některá provedení vynálezu mají přibližně 2 až 25, přednostně 2 až 10 a dokonce více se upřednostňuje 2 až 5 kopií.

Zde se používá termín „promotor TNF“, „promotor TNF α “ a „TNFp“. Tyto termíny je možné zaměnit. Není-li uvedeno jinak, tyto termíny odpovídají celé nukleotidové sekvenci odpovídající přirozené minimální sekvenci promotoru TNF α , která je připojena k jedné nebo více elementům zesilovače proti směru exprese (buď se vyskytují přirozeně nebo se geneticky manipulují v laboratoři). Příklady zahrnují, ale nejsou omezeny na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 3 a jejich funkční fragmenty, varianty a směsi. Řada funkčních fragmentů a variant sekvencí TNF α a dalších zde popsaných faktorů sdílí alespoň 80 % sekvenční homologii a v některém případě 90 % s jejich přirozenými a geneticky manipulovanými částmi. Ty jsou dobře známy v oboru.

Vynález popisuje novou terapeutickou metodu zahrnující zavedení savčí chimerové nukleové kyseliny do buněk, přičemž uvedená nukleová kyselina obsahuje gen vyvolávající apoptózu (IGA) řízený promotorem TNF α (TNFp). Příklady chimerových nukleových kyselin podle vynálezu jsou uvedeny v SEQ ID NO: 13 a 14. Mohou se také použít jejich funkční fragmenty nebo varianty. Výsledek se kontroloval pomocí TNFp a AIG se exprimoval pouze v těch buňkách, které produkují zánětlivý cytokin TNF α . Proto libovolné buňky exprimující TNF α podléhají samodestrukci, zatímco buňky, které exprimují TNF α , nejsou ovlivněny. Je výhodné, že tato metodologie se může cílit na libovolné buňky produkující TNF α , jako jsou aktivované makrofágy, aktivované buňky T, synoviocyty podobné makrofágům a fibroblastům a primární buňky, které se nacházejí v RA kloubech. Cílená buňka produkující TNF α je ta buňka, která v normálním případě nese nebo nenesé nebo exprimuje apoptózový gen v jeho přirozené nezměněné formě. Proto za použití chimerových nukleových kyselin a metod podle vynálezu se mohou buněčné zdroje TNF α poškodit vysoce selektivním způsobem.

Jinou výhodou použití chimerové nukleové kyseliny podle vynálezu je, že TNFp odděluje transkripční faktory, které jsou nutné pro endogenní TNFp, přičemž se sníží endogenní produkce TNF α . V jednom příkladu se TNFp nachází v terapeuticky cílených buňkách ve velkém přebytku. Toho je možné dosáhnout zavedením více kopií transfekovaného genu do buňky. V jiném případě chimerová nukleová kyselina podle vynálezu může obsahovat více kopií indukovatelných cis elementů promotoru TNF α . Jak se uvádí shora v textu více kopií „indukovatelných elementů zesilovačů“ TNFp je přítomno v některých provedeních chimerové nukleové kyseliny TNFp-AIG podle vynálezu. Tím, že obsahují více kopií indukovatelných cis elementů konstrukce TNFp, transkripční faktory potřebné transfekovanou buňkou za

účelem produkce TNF α se oddělily exogenně zavedenou sekvencí. Tato preferovaná chimerová konstrukce TNFp-AIG se charakterizovala zvýšenou účinností v soutěžení o TNFp-specifické transkripční faktory, což se porovnává s chimerovými nukleovými kyselinami podle vynálezu, které obsahují pouze jediný zesilovací element spojený s TNFp. „Indukovatelný super promotor“ se zkonstruoval tímto způsobem je schopný 1) účinněji soutěžit o TNF α specifické indukovatelné transkripční faktory a 2) řídit expresi genu vyvolávajícího apoptózu tak, aby došlo k její zesílení, k čemuž napomáhá více zesilovacích elementů.

U pacientů s revmatoidní artritidou se ukázalo, že synovektomie, to znamená odstranění synoviální tkáně, je výhodné. Na rozdíl od běžných a chirurgických způsobů synovektomie, zde popsaná terapeutická metoda cílená na buňky postihuje pouze buňky produkující TNF α . Tak je výhodné zavést a exprimovat chimerový gen TNFp-AIG a následným vyvoláním apoptózy předejít zánětlivé odezvě. Metody podle vynálezu jsou srovnatelně selektivní a výsledek je minimální poškození tkáně a omezení zánětu.

Zde popsané produkty a metody se mohou použít při léčbě jiných zánětlivých onemocnění. Takové zánětlivé poruchy zahrnují, ale nejsou omezeny na roztroušenou sklerózu, Guillain-Barrův syndrom, Crohnovu nemoc, ulcerativní kolitidu, lupénku, lupus erythematoses, odmítnutí štěpů, cukrovku s nutností aplikovat inzulin, psoriatickou artritidu, sarkoidózu, hypercitlivou pneumonitidu, ankylozující spondylitidu a příbuznou spodyloarthropatii, Reiterův syndrom a generalizovanou sklerózu. Vynález zdůrazňuje způsoby léčby zánětlivých poruch u pacienta aplikací pacientovi, který tuto léčbu potřebuje, farmaceuticky účinné množství farmaceutické kompozice, která obsahuje chimerovou nukleovou kyselinu podle

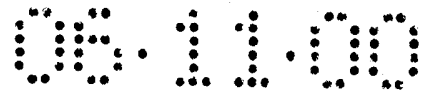
vynálezu. Apoptóza se vyvolala v zánětlivých buňkách nebo v buňkách, které se nacházejí u pacienta na místě zánětu, zavedením alespoň jedné chimerové kyseliny podle vynálezu do místa zánětu. To se v typickém případě provede tak, že se připraví farmaceutická kompozice, která obsahuje alespoň jednu chimerovou nukleovou kyselinu podle vynálezu a v typickém případě farmaceuticky přijatelný nosič a kompozice se aplikuje pacientovi za použití standardních způsobů, které jsou dobře známy v oboru. Farmaceutická kompozice se může zavést přímo do místa zánětu za použití místní povrchové, intravenózní, intraperitoneální a podobné metody. Další způsoby se popisují dále v textu.

Vedle terapeutických indikací, chimérové nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou použít při různých testovacích a selekčních metodách. Při jedné takové metodě se mohou varianty somatických buněk, které neprodukují TNF α v populaci buněk produkujících TNF α , vybrat in vitro zavedením chimerové nukleové kyseliny TNFp-AIG do populace buněk produkujících TNF α . Buňky produkující TNF α vykazují apoptózu. Buňky, které neprodukují TNF α přežijí. Výběr těchto buněčných variant, které vykazují fenotyp buněk, které přežily, je jednoduchý způsob identifikace buněk, které TNF α neprodukují. Takový selekční způsob se může použít při stanovení exprese genů, které působí trans způsobem, aby regulovaly aktivitu promotoru TNF α , přičemž se redukuje produkce TNF α . Takové geny se charakterizovaly jako dominantní negativní (DN)/dominantní supresivní geny v jiných systémech (popisuje se v publikaci Behrends S., et al., J. Biol. Chem. 1995, 270, 21109-21113, Zhang S., et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 23934-23936, Watowich S.S., et al., Mol. Cell Biol., 1994, 14/6, 3535-3549).

Dále při způsobu *in vitro* se chimerová nukleová kyselina TNFp-AIG podle vynálezu může použít k identifikaci dominantního negativního genu odpovědného za vývoj populace buněk, které neprodukují TNF α . Podle této metody chimerová nukleová kyselina TNFp-AIG se zavedla do buněk, které produkují TNF α . Blokováním přítomnosti dominantního negativního genu tyto buňky po aktivaci podléhají apoptóze. Proto je možné dedukovat, že varianty, které přežijí, nesou dominantní negativní gen schopný negativně regulovat produkci TNF α . Dominantní negativní gen je možné snadno identifikovat produkcí knihovny cDNA a transfekcí buněčných linií (například Jukartovi buňky a THP-1). Tyto buňky jsou buď stabilní transfektanty indukovatelné chimerové nukleové kyseliny nebo buňky transfekované TNFp-luciferázovým genem TNFp-AIG. Tyto buňky se vybraly pro aktivaci *in vitro* na základě fenotypu přeživších buněk. Fenotyp přeživších buněk se indikovala podle účinku genů DN. V buňkách transfekovaných genem TNFp-luciferázy se redukce aktivity luciferázy indikuje účinkem genu DN. Dominantní negativní geny identifikované za použití tohoto protokolu se mohou použít samotné jako terapeutická činidla. Takové geny jsou kandidáty genové terapie za účelem redukovat produkci TNF α .

Způsoby, které se využívají pro transfer genu se rozdělily do dvou kategorií:

1. Přímý přístup: *In situ* transdukce terapeutického genu do cílových buněk, jako jsou synoviocyty za použití vhodného vektoru jako nosiče terapeutického genu. Vektor obsahující terapeutický gen, který se injekcí zavedl přímo do oblasti, kde má působit (například artritický kloub).
2. Nepřímý přístup: *Ex-vivo* transfekce terapeutického genu do cílových buněk, jako jsou synoviocyty. Při tomto přístupu se synovium odstranilo z kloubů,



izolovaly se synoviocyty a kultivovaly se *in vitro*. *In vitro* kultivované buňky se transfekovaly terapeutickým genem a geneticky upravené synoviocyty se transplantovaly zpátky do synovia.

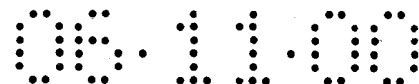
V případě *in vivo* transferu se u několika vektorů zhodnotila účinnost při zavedení genu (popisuje se v publikaci Nita et al., *Arthritis and Rheumatism*, 1996, 39/5, 820-828). Mezi vektory používanými pro genovou terapii jsou vektory získané z retrovirů, které jsou z daleka nejlépe vyvinuty. Tyto vektory byly schopny začlenit genetický materiál do hostitelského genomu a tak produkovat stabilní transfektanty. Tyto vektory však nebyly schopny infikovat buňky, které se nedělí, a protože se začlenily do genomu nemůže dojít k inzerční mutagenezi. Vektory získané z adenovirů infikují buňky, které se dělí i které se nedělí a DNA zůstává epizomální. Nevýhodou vektorů založených na adenovirech je, že tyto vektory pokračují v produkci virových proteinů v infikovaných buňkách a tvoří je potencionálně antigenní. Třetí typ vektorů založených na viru se získal z virů Herpes simplex (HSV), které byly schopny infikovat buňky, které se dělí i buňky, které se nedělí.

Mezi nevirovými vektorovými systémy se hodnotily kationové liposomy a samotná plazmidová DNA. Liposomy jsou nejvýhodnější ve většině stádiích vývoje, ačkoli jisté typy buněk, jako jsou buňky kůže a svalů pohlcují a exprimují i samotnou plazmidovou DNA.

Zaváděcí systém genů zprostředkovaný částicemi je také možný (popisuje se v publikaci Rakhmievich, et al., *PNAS*, 1996, 93, 6291) a zdá se to být vhodný přístup.

Pro zavedení chimerových nukleových kyselin je možné použít následující protokoly pro zavádění genů „*in vivo*“:

- 1) Nita et al., *Arthritis and Rheumatism*, 1996, 39, 820-823



In vivo experiment u králíků:

Každý vektor je možné zavést dovnitř kloubu. V případě několika virových vektorů se do kolene zavedlo 10^8 a 10^9 částic suspendovaných v 0,5 ml rovnovážného solného roztoku.

Do kolona se zavedly komplexy lipozom-DNA (200 molů DC-Chol v komplexu s 20 μg DNA v mililitru) v 1 ml rovnovážného solného roztoku.

2) Methods in molecular medicine: Gene Therapy Protocols, Paul Robbins, ed., 1997, Barr et al., str. 205-212.

Zavedení vektoru založeného na adenoviru do hepatocytů se provádí následujícím způsobem: kryší hepatocyty 1×10^{11} PFU na 100 g tělesné hmotnosti zvířete.

U psů (12 až 17 kg) se portální žíla předem fúzovala s přibližně $1,5 \times 10^{11}$ PFU/kg za vzniku jedné kopie genomu adenoviru na diploidní kopii hostitelské DNA.

V případě králíků (2 až 4 kg) se 100% transdukce hepatocytů dosáhlo $1,5 \times 10^3$ virovými částicemi (přibližně $1,5 \times 10^{11}$ PFU), 50 až 75 % transdukce se dosáhlo 4×10^{12} virovými částicemi.

Yang N-S, et al., 281-296

Zavedení genu zprostředkované zlatými částicemi: Transfekce savčí kožní tkáně 0,1, 0,5, 1,0 a 2,5 μg DNA/mg částice vykazuje lineární vztah exprese transgenu.

Nabel et al., 297-305

zavádění genů zprostředkované lipozomy v případě lidí:

Protokol 1: 15 nmol lipozomů DC-Chol/Dope kombinovaných s 1 μg DNA v 0,7 ml. 0,2 ml shora popsané směsi se zavedlo injekcí do pacienta s melanomem uzlin. V případě zavedení katetrem se do arterie zavedlo 0,6 ml roztoku.

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

V případě injekce přímo do nádoru se koncentrace DNA pohybovala v rozmezí 3 μg s 4,5 nM DMRIE/Dope až 300 μg v komplexu s 450 nM DMRIE/Dope.

3) Roessler, et al., 369-374

Transfer genu do synovia:

K terapii kloubu se použilo rozmezí dávky 10^9 až 10^{12} adenovirových částic na kloub. Optimální dávku v případě určité série pokusů je nutné stanovit empiricky a je závislá na vlastnostech rekombinantního adenovirového genomu a transgenu, který se exprimuje.

V případě nepřímého přístupu se zavedly různé metody zahrnující využití kationických lipidů nebo transfekce založené na kationickém polymeru a elektroporaci.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 je schématické znázornění chimerové nukleové kyseliny TNFp-AIG podle vynálezu. Gen indukující apoptózu (AIG) je granzym B.

Obrázek č. 2 znázorňuje výsledky genové terapie za použití TNFp-AIG chimérových nukleových kyselin podle vynálezu.

Obrázek č. 3 znázorňuje souhrn delečních konstrukcí, které se používají k identifikaci indukovatelných cis elementů promotoru TNF α , kde se jako reportní systém používá exprese genu luciferázy (Luc).

Obrázek č. 4(a) ukazuje výsledky reprezentativního experimentu uskutečněného za účelem hodnocení exprese genu luciferázy řízené delečními konstrukcemi promotoru TNF α v dočasně transfekovaných Jurkatových buňkách. Histogramy reprezentují stimulační index jako míru indukovatelnosti

aktivačního činidla PMA. Jurkatovi buňky po stimulaci PMA produkují TNF α .

Obrázek č. 4(b) znázorňuje výsledky reprezentativního experimentu, který se uskutečnil na základě hodnocení exprese genu luciferázy řízené delečními konstrukcemi promotoru TNF α v dočasně transfekovaných buňkách THP-1. Histogramy reprezentují stimulační index, jako míru indukovatelnosti aktivačního činidla LPS. Buňky THP-1 po stimulaci LPS produkují TNF α .

Na obrázku č. 5 je blokové schéma pro přípravu TNFpGB za použití vybraných přirozených elementů promotoru TNF α a granzymu B.

Na obrázku č. 6 (a a b) jsou znázorněny souhrny výsledků reprezentativních experimentů, které se provedly za účelem exprese chimérového TNFp-granzymu B (TNFpGB). Expres různých klonů konstrukcí TNFpGB se exprimovaly v dočasně transfekovaných Jurkatových buňkách (obrázek č. 6a). Expres granzymu B se hodnotila analýzou westernovým přenosem za použití protilátek proti granzymu B. Pruhy zobrazující granzym B v transfekovaných buňkách se označily šipkami. Indukce apoptózy expresí chimérových nukleových kyselin TNFpGB se hodnotily dočasnou transfekcí v Jurkatových buňkách (obrázek č. 6b). Apoptóza se hodnotila testem ELISA, který zjišťuje neživé buňky. V obou experimentech histogramy s rozptýlenými body reprezentují nestimulovanou kontrolu, kde buňky se tranfekovaly chimérovou nukleovou kyselinou a transfekované buňky nebyly stimulovány PMA. Pevné histogramy reprezentují vyvolání apoptózy po stimulaci s PMA buď při řízené transfekci (transfekce s -1005Luc3'UTR) nebo chimérovými nukleovými kyselinami, které exprimují granzym B.

Na obrázku č. 7 (a a b) je digram chimérové nukleové kyseliny TNFp-AIG podle vynálezu, která obsahuje více kopií indukovatelných cis elementů promotoru TNF α , které naopak řídí expresi AIG (obrázek č. 7a). Diagram chimérové nukleové kyseliny TNFpAIG obsahující více kopií indukovatelných cis elementů promotoru TNF α , který řídí expresi AIG, přičemž po směru exprese se nachází 3' nepřekládaná oblast genu TNF α (TNF3'UTR) (Obrázek č. 7b). 3'UTR genu TNF α se implikoval při regulaci vyvolané exprese TNF α (popisuje se v publikaci Han, J., et al., J. Immunology, 1991, 146, 1843-1843, Crawford, E. K., et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 21120-21137 a obrázek č. 9).

Obrázek č. 8 (a a b) jsou bloková schémata pro přípravu chimerových konstrukcí super-promotor TNF α - granzym B.

Obrázek č. 9 znázorňuje souhrn výsledků dvou experimentů, aby znázornily regulační účinek TNF3'UTR na indukovatelnou expresi reportního genu luciferázy. Dočasná transfekce se provedla v buněčné linii fibroblastů. Tečkované histogramy reprezentují indukovatelnost TNFpLuc za nepřítomnosti TNF3'UTR a pevné histogramy reprezentují indukovatelnost TNFpLuc v přítomnosti TNF3'UTR. Podobné výsledky se také získaly v Jurkatových buňkách.

Obrázek č. 10 je diagram reprezentující selekci variant somatických buněk, které neprodukují TNF α v populaci buněk produkujících TNF α a identifikují dominantní negativní supresorové geny odpovědné za inhibici produkce TNF α .

Obrázek č. 11(a) znázorňuje diagram reprezentující identifikované oblasti zesilovače (ER) ER1 (SEQ ID NO: 4), ER2 (SEQ ID NO: 5), ER3 (SEQ ID NO: 11) a ER4 (SEQ ID NO: 12)

promotoru TNF α a začlenění dvou kopií uvedeného ER proti směru exprese od přirozeného promotoru -120 TNF α .

Obrázek č. 11(b) znázorňuje výsledky experimentů, které se provedly, aby se hodnotila exprese genu luciferázy řízená přirozeným promotorem -120 TNF α , na jehož 5'konec se připojily dvě kopie zesilovacích oblastí ER1, ER2, ER3 a ER4. Konstrukce řídicí expresi genu luciferázy se dočasně transfekovaly do Jurkatových buněk. Histogramy reprezentují stimulační index jako míru indukovatelnosti aktivačním činidlem PMA. Po stimulaci PMA Jurkatovi buňky produkují TNF α .

Obrázek č. 11(c) ukazuje výsledky experimentů, které se uskutečnily za účelem zhodnocení exprese genu luciferázy řízené přirozeným promotorem -120 TNF α , na jehož 5'konec se připojily dvě kopie oblastí zesilovačů ER1, ER2, ER3 a ER4. Konstrukce řídicí expresi genu luciferázy se dočasně transfekovaly do buněk THP-1. Histogramy reprezentují stimulační index jako míru indukovatelnosti aktivačním činidlem LPS. Buňky THP-1 po stimulaci LPS produkují TNF α .

Obrázek č. 12 je grafická reprezentace sekvence chimérové nukleové kyseliny -706TNFpGB3'UTR, kde sekvence fragmentu promotoru je označena malými písmeny, sekvence linkerového fragmentu je označena velkými písmeny italikou, sekvence fragmentu granzymu B je označena velkými písmeny a sekvence fragmentu TNF α 3'UTR je označena malými podtrženými písmeny.

Obrázek č. 13 je grafická reprezentace sekvence chimérové nukleové kyseliny -1005TNFpGB3'UTR, kde sekvence fragmentu promotoru je označena malými písmeny, sekvence linkerového fragmentu je označena velkými písmeny italikou, sekvence fragmentu granzymu B je označena velkými písmeny a sekvence fragmentu TNF α 3'UTR je označena malými podtrženými písmeny.

Příklady provedení vynálezuPříklad 1: Produkce konstrukcí TNF α -granzym B

Za účelem zkonstruovat chimerový granzym B řízený zesilovacím elementem cis promotoru TNF buď v jedné nebo více kopiích stejné oblasti nebo různých oblastí se provedla identifikace oblastí odpovědných za optimální indukovatelnou expresi reportního genu.

Výběr elementů promotoru TNF α pro konstrukci chimerové nukleové kyseliny.

Oblasti promotoru TNF α se amplifikovaly polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) za použití primerů, které dávají vznik různým delečním konstrukcím promotoru TNF α (obrázek č. 3). Oblasti se identifikovaly dalším zkoumáním v různých dalších buněčných systémech (Rhoades, et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 22102-22107, Leitman, et al., Mol. Cell Biol., 1992, 12, 1352-1356, Pauli U., Crit. Review Eukaryotic Gene Expression, 1994, 4, 323-344). PCR amplifikované geny se pak klonovaly proti směru exprese od reportního genu, jako je luciferáza, v běžném vektoru, který neobsahuje promotor. U těchto konstrukcí se testovala jejich konstitutivní a indukovatelná exprese v různých buněčných liniích, jako jsou Jurkatovy buňky (T lymfoblastoidy), U973 (myelomonocyty), THP-1 (monocyty), fibroblasty a in vitro kultivované lidské synoviocyty. Identifikace oblastí odpovědných za vyvolanou expresi reportního genu je primárně založená na výsledcích získaných za použití dvou buněčných linií, které produkují TNF α , (viz. Jurkatovi buňky; následuje po stimulaci PMA) a THP-1 (následuje po stimulaci s LPS) (obrázek č. 4 a a b). Tyto buňky se dočasně transfekovaly za použití dobře zavedených metod a běžně dostupných činidel, například dextran DEAE a superfekt. Cis-elementy promotoru TNF α , které jsou odpovědné

za vyvolanou expresi reportního genu se pak použily ke konstrukci chimerových nukleových kyselin TNFp-granzym B.

Konstrukce chimerových nukleových kyselin TNFp-granzym B

Kódující oblast granzymu B se amplifikovala za použití cDNA svázané s oligo-dT, která se použije jako templát a získala se z periferních lidských krevních lymfocytů aktivovaných PHA/anti-CD3, které se udržovaly v médiu obsahujícím IL-2. Při amplifikaci zkrácené formy (SEQ ID NO: 9) granzymu B a její plné délky (SEQ ID NO: 8) se použily primery odpovídající kodonům 1 až 7 a 21 až 27. Antisense primer byl stejný v obou amplifikacích a vznikl produkt, který odpovídá terminálnímu kodonu, to je zbytek 248. Dipeptidové deletované konstrukce granzymu B (SEQ ID NO: 10) se připravily za použití granzymu B v plné délce (SEQ ID NO: 8), jenž slouží jako templát. Mutagenní sense a antisense komplementární primery, které lemují na každé straně 15 nukleotidů, ale nezahrnují 6 nukleotidů odpovídající kodonům 19 a 20 (deaktivující dipeptid) se použily k vytvoření delece. Konstrukce se vytvořily za použití kitu pro mutagenezi QuickChange (Stratagene). Fragmenty nukleové kyseliny kódující granzym B s deletovaným dipeptidem se subklonoval po směru exprese od promotoru TNF α tím, že se nahradil gen luciferázy v delečních konstrukcích -706 a -1005 promotorů TNF α (obrázek č. 5). Celá 3' nepřekládaná oblast genu TNF α (SEQ ID NO: 7) se amplifikovala PCR a začlenila se po směru exprese fragmentu nukleové kyseliny kódující granzym B s deletovaným dipeptidem řízeným delečními fragmenty -706 a -1005 promotoru TNF α . Celá sekvence chimerové nukleové kyseliny je uvedena v SEQ ID NO: 13 a 14.

Konstrukce chimerové nukleové kyseliny super promotoru TNF α - granzymu B

Dvě široce preferované oblasti, viz ER1(-1005 až -905) (SEQ ID NO: 4) odpovědné za indukovatelnou expresi shora popsaného reportního genu (obrázek č. 4a a b) se amplifikovaly PCR a ligovaly se proti směru exprese minimálního přirozeného promotoru (-120 až TSS, SEQ ID NO: 3), buď jako jedna kopie nebo více kopií. Dvě další oblasti ER3(-234 až -120) (SEQ ID NO: 11) a ER4 (-234 až -65 (SEQ ID NO: 12) promotoru TNF α se také identifikovaly jako zesilující oblasti, které se použily při chimerických konstrukcích za použití dále v textu popsané strategie. Super promotor obsahuje více (2 až 10) kazet shora popsaných oblastí obsahujících indukovatelné promotorové elementy (obrázek č. 7). Toho se dosáhlo amplifikací zajímavých oblastí za použití primerů syntetizovaných s restričními místy začleněnými na 5' konec každého z primerů. Produkt amplifikovaného genu lemuje z každé strany jediné restriční místo. Upřednostňuje se, že AIG amplifikovaný PCR se klonoval po směru exprese super promotoru TNF α tak, že se luciferázový reportní gen nahradil původní konstrukcí, jak se popisuje v případě přirozeného promotoru TNF α (obrázek č. 5).

Schéma pro konstrukce super promotoru TNF α a linkerových sekvencí, které reprezentují jedinečná restriční místa (tyto restriční místa nejsou přítomna ve vybraných elementech promotoru TNF α a granzymu B), která umožňují účinnou řízenou inzerci, jsou uvedena dále v textu na obrázku č. 8:

Schema 1:

Krok 1: Začlenění minimálního promotoru TNF α (-120 až TSS) do pGL3 základního luciferázového vektoru (bez promotoru) (Promega):

Elementy základních vektorů pGL3, které se použily při konstrukci chimerové nukleové kyseliny TNFp-AIG jsou uvedeny dále v textu.

____KpnI.SacI.MluI.NheI.SmaI.XhoI.BglII.HindIII.(luciferáza).X
baI____

Minimální promotor se amplifikoval PCR za použití primerů, které obsahují restrikční místa XhoI a BglII.HindIII tak, že restrikční místo XhoI bylo na 5'konci a restrikční místa BglII.HindIII byly na 3'konci amplifikovaného produktu. Tento fragment se začlenil do polylinkeru základního vektoru pGL3 za použití stejných restrikčních míst. Konstrukce se označila jako „konstrukce A1“ a byla následující:

____KpnI.SacI.MluI.NheISmaIXhoI.(-120 až TSS BglII).HindII.
(luciferáza).XbaI____

Krok 2: Zesilovací fragment (ER1, ER2, ER3 nebo ER4) se amplifikoval PCR za použití primeru, který obsahuje několik restrikčních míst. Výsledný fragment zahrnuje restrikční místa KpnI.AatII.BssHII na 5'konci a na 3'konci NsiI.SpeI.MluI, jak se uvádí dále v textu:

5'KpnI.AatII.BssHII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).NsiI.SpeI.
MluI3''. Fragment se začlenil do „konstrukce A1“, který se vytvořil v kroku 1 za použití restrikčních míst KpnI a MluI. Tato konstrukce se nazývá jako "konstrukce B1" a uvádí se dále v textu:

____KpnI.AatII.BssHII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).NsiI.SpeI.MluI.
NheI.SmaI.XhoI(-120 až TSSBglII).HindIII. (luciferáza).XbaI____

Krok 3: Zesilovací fragment TNF α (ER1, ER2, ER3 nebo ER4) se amplifikoval za použití primerů, které obsahují restrikční místa AatII a BssHII za vzniku produktu PCR:

5'AatII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).BssHII3'. Tento fragment se klonoval do „konstrukce B1“ za použití stejných restrikčních míst. tato konstrukce se označila jako „konstrukce C1“ a je následující:

____KpnI.AatII.BssHII.(ER1 nebo ER2).NsiI.SpeI.MluI.NheI.
SmaI.XhoI(-120 až TSSBglII).HindIII. (luciferáza).XbaI____

Krok 4: Zesilovací fragment TNF α (ER1, ER2, ER3 nebo ER4) se amplifikoval za použití primerů, které obsahují restrikční místa NsiI a SpeI za vzniku produktu PCR:

5'NsiI.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).SpeI3'. Tento fragment se klonoval do „konstrukce C1“ za použití stejných restrikčních míst. tato konstrukce se označila jako „konstrukce D1“ a je následující:

___KpnI.AatII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).BssHII.(ER1. ER2, ER3
nebo ER2).NsiI. (ER1, ER2, ER3 nebo ER4)SpeI.
MluI.NheI.SmaI.XhoI(-120 až TSSBglII).HindIII. (luciferáza).
XbaI___

Krok 5: Oblasti kódující granzym B se amplifikovala PCR za použití primerů, které obsahují restrikční místa BglII a XbaI, které tvoří fragment popsany dále v textu:

5'EcoRI.BglII.(granzym B).Xba3". Tento fragment se začlenil do „konstrukce D1“ za použití restrikčních míst BglII a XbaI. Výsledná konstrukce se označila jako „konstrukce E1“ a je následující:

___KpnI.AatII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).BssHII.(ER1. ER2, ER3
nebo ER2).NsiI. (ER1, ER2, ER3 nebo ER4).SpeI.
MluI.NheI.SmaI.XhoI(-120 až TSSBglII).HindIII.
(luciferáza).EcoRI XbaI___

Alternativní schéma 2 je následující:

Schéma 2:

Krok 1: Stejný jako na schématu 1, přičemž vzniká „konstrukce A1“, která je následující:

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

Krok 2: Začlenění dalších vícenásobných klonovacích míst (SEQ ID NO: 6). Dva komplementární oligonukleotidy (5' fosforylované), které poskytují

___NheI.SacII.EcoRV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.PvuII.XhoI___, se syntetizovaly za použití komerčních zdrojů. Tyto oligonukleotidy se spojily a pak se klonovaly do restričních míst NheI a XhoI „konstrukce A1“. Výsledná konstrukce se označila jako „konstrukce B2“ a je následující:

___KpnI.SacI.MluI.NheI.SacI.EcorV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.PvuII.XhoI.(-120 až TSS BglII).HindIII.(luciferáza).XbaI___

Krok 3: Zesilovací fragment TNF α (ER1, ER2, ER3 nebo ER4) se amplifikoval za použití primerů, které obsahují restriční místa SpeI.PvuII na 5' konci a XhoI na 3' konci za vzniku PCR produktu 5' SpeI.PvuII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).XhoI3'. Tento fragment se klonoval do „konstrukce B2“ za použití restričních míst SpeI a XhoI. Tato konstrukce se označila jako „konstrukce C2“:

___KpnI.SacI.MluI.NheI.SacI.EcorV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.PvuII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).XhoI.(-120 až TSS BglII).HindIII.(luciferáza).XbaI___

Krok 4: Zesilovací fragment (ER1, ER2, ER3 nebo ER4) se amplifikoval za použití primerů, které obsahují restriční místa AvrII.SpeI na 5' konci a PvuII na 3' konci za vzniku PCR produktu: 5' AvrII.SpeI.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).PvuII3'. Tento fragment se klonoval do „konstrukce C2“ za použití restričních míst AvrII a PvuII. Tato konstrukce se označila jako „konstrukce D2“:

___KpnI.SacI.MluI.NheI.SacI.EcorV.AflIII.AatII.AvrII.SpeI.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).PvuII.(ER1, ER2, ER3 nebo ER4).XhoI.(-120 až TSS BglII).HindIII.(luciferáza).XbaI___

Za použití strategie alespoň sedmi kopií zesilovacích oblastí (ER1, ER2 ER3 nebo ER4 jednotlivě nebo v kombinaci) se

mohou jednou přidat za použití dalšího restričního místa proti směru exprese dřívějšího při amplifikaci PCR zvolených zesilovacích oblastí. Když se přidá požadovaný počet kopií zesilovacích oblastí, AIG se začlení po směru exprese od super promotoru, jak se popisuje v kroku 5 schématu 1.

Indukovatelná exprese chimerového genu TNFp-granzym B se testovala dočasnou transfekcí shora zmiňovaných buněčných linií. Exprese nukleové kyseliny TNFp-granzym B se měřila detekcí apoptózy transfekovaných buněk, přičemž se odhadly exprimované proteiny AIG v testu westernův přenos za použití běžně dostupných protilátek a odhadu proteázové aktivity za použití běžně dostupných dobře zdokumentovaných specifických syntetických tetrapeptidových substrátů.

Regulace exprese reportního genu řízená TNFp

3' nepřekládaná oblast genu TNF α má důležitou úlohu při regulaci biosyntézy TNF α . To se zahrnuje do translační exprese genu TNF α v normálním neaktivovaném stádiu. Je důležité, že tyto elementy umožňují de-represi, která se objevuje, když se aktivují buňky externími podněty (popisuje se v publikaci Han, J. et al., J. Immunology, 1991, 146, 1843-1848, Crawford, F. K., et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 22383-22390).

Připravily se genetické konstrukce, ve kterých se celá 3' nepřekládaná oblast (SEQ ID NO: 13) začlenila po směru exprese genu luciferázy řízeného delečními fragmenty, viz. -120, -706 a -1005 promotoru TNF α . Výsledky dočasné exprese těchto konstrukcí se shrnuly na obrázku č. 9. Při použití shora popsané strategie se 3' UTR také začlenila po směru exprese od granzymu B chimerové konstrukce TNFpGB (Obrázky č. 6(a), 12 a 13).

Příklad 2: Testovací protokoly

Metody *in vitro*:

Luciferázový test: luciferázová aktivita se stanovila za použití běžně dostupných činidel (Promega).

Expresse genu granzym B:

- a) westernovy přenosy lyzátů transfekovaných buněk se vyvinuly za použití protilátek proti granzymu B.
- b) apoptóza transfekovaných buněk: apoptóza transfekovaných buněk způsobená granzymem B se stanovila barvením jádra propidium jodidem (popisuje se v publikaci Krishan, A., J. Cell Biol., 66, 1994, 188-193) a běžně dostupným kitem Cell Death ELISA (Boehringer Mannheim).

Zvířecí modely

Králičí model artritidy indukované IL-1 β (Pettipher E. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 83, 8749-8753): IL-1 β se zavedlo injekcí do kolenního kloubu do novozélandských bílých králíků. Nitrokloubní injekce IL-1 β způsobuje infiltraci leukocytů závislou na dávce do kloubního prostoru a ztrátu proteoglykanu z kloubní chrupavky.

Artritida vyvolaná antigenem: Nitrokloubní injekce antigenu (ovalbumin) do kolenních kloubů vyvolává akumulaci leukocytů a degradaci chrupavky, která vede u lidí k revmatoidní artritidě. Po aplikaci injekce koleno oteklo a otok přetrvává 14 dní.

Model lidských-scid myších synoviocytů (popisuje se v publikaci Hourii J. M., et al., Current Opinions in Rheumatol., 1995, 7, 201-205, Sack U., et al., J. Autoimmunity, 1995, 9, 51-58, Geiler T., et al., Arthritis and Rheumatism, 1994, 37, 1664-1671): Jde o v současné době vyvinuté modely artritidy, ve kterých čerstvá synoviální tkáň

z pacientů, kteří vykazují onemocnění RA, se implantovala spolu s normální lidskou chrupavkou do scid myši buď podkožně pod renální kapsuli (Geiler T, et al., Arthritis and Rheumatism, 1994, 37, 1664-1671) nebo do koleních kloubů (Sack U., et al., J. Autoimmunity, 1995, 9, 51-58). Implantáty rostou s charakteristikami podobnými artritidě, což zahrnuje tvorbu tkáně panusu s vysokou hustotou buněk, eroze kostí a chrupavek, vývoj obřích buněk s více jádry a invazi chrupavky se synoviálními fibroblasty.

Nepřímá metoda: Synoviocyty se transfekovaly *in vitro* terapeutickým genem a zavedly se do zad králíků. Artritida se vyvolala u těchto králíků injekcí IL-1 β a expresí terapeutického genu, pak se hodnotila aktivace. Exprese vyvolaná aktivací chimerové nukleové kyseliny vyvolá v transplantovaných buňkách apoptózu.

Přímá metoda: nitrokloubní injekce chimerových nukleových kyselin.

Může se použít libovolná popsaná metoda pro zavádění genů zahrnující zavedení samotné plazmidové DNA zprostředkované lipozomy. Při použití metody založeném na virovém vektoru se chimerové nukleové kyseliny klonovaly do vhodných vektorů. Vektory se pak upravily delecí eukaryontního promotoru, který je přítomen v těchto vektorech. Nitrokloubní injekce terapeutických genů začleněných do vhodných vektorů se pak použije k odhadu terapeutické stejně jako profylaktické účinnosti.

Příklad 3: Výběr variant somatických buněk, které neprodukují TNF α

Buňky (THP-1, Jurkatovi buňky) se stabilně transfekovaly *in vitro* chimerovou nukleovou kyselinou. Po několika cyklech stimulace, která vyvolává v buňkách exprimující gen TNFp-AIG apoptózu, se shromáždily živé buňky. Z těchto buněk se

zkonstruovala cDNA knihovna, která se použila v případě funkčního klonování (Legerski R and Peterson C., Nature, 1992, 359, 70-73, Jaattela M., et al., Oncogene, 1995, 10, 2297-2305).

Příklad 4: Identifikace a charakterizace dominantních negativních (DN) genů

THP-1 a Jurkatovi buňky se stabilně transfekovaly TNFp-AIG se vystavily opakovaným cyklům stimulace, přičemž došlo k aktivaci exprese TNFp-AIG. Buňky, které neexprimují negativní regulační geny, podléhají apoptóze, zatímco tyto, co exprimují dominantní negativní geny přežívají. V těchto buňkách, které přežily, produkty genu DN působí in trans s promotorem TNF α , čímž inhibují své aktivace traskribce AIG, což vede k fenotypu buněk, které přežívají. Knihovna cDNA se zkonstruovala za použití polyadenylační mRNA z těchto buněk. Geny DN, které zachrání buňky THP-1 nebo Jurkatovi buňky transfekované TNFp-AIG před apoptózou se identifikovaly funkčním klonováním, jak se popisuje v případě ostatních genů (Legerski R. and Peterson C., Nature, 1992, 359, 70-73, Jaattela M., et al., Oncogene, 1995, 10, 2297-2305).

Seznam sekvencí

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1 178 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, lidský promotor TNF-alfa

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc agggctctgga ggggcggggg 60
 tcaggagact cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg gttacaggag 120
 acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggct atggaagtgc 180
 agtatcgggg acccccctt aacgaagaca gggccatgta gagggcccca gggagtgaaa 240
 gagcctccag gacctccagg tatggaatac aggggacggt taagaagata tggccacaca 300
 ctggggccct gagaagtgag agcttcatga aaaaaatcag ggaccccaga gttccttggg 360
 agccaagact gaaaccagca ttatgagtct cccggtcaga atgaaagaag aaggcctgcc 420
 ccagtgtct gtgaattccc gggggtgatt tcaactcccc ggctgtcca ggcttgtccc 480
 tgctaccccc acccagcctt tctgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttc 540
 tccccgcaga cccaaacaca ggcctcagga ctcaacacag ctttccctc caaccccgtt 600
 ttctctcct caaggactca gctttctgaa gccctccca gttctagttc tatcttttc 660
 ctgcatcctg tctggaagtt agaaggaaac agaccacaga cctggtcccc aaaagaaatg 720
 gaggcaatag gttttgaggg gcatggggac ggggttcagc ctccagggc ctacacacaa 780
 atcagtcagt ggcccagaag acccccctcg gaatcggagc agggaggatg gggagtgtga 840
 ggggtatcct tgatgcttgt gtgtcccaaa ctttccaaat ncccgcctc gcgatggaga 900
 agaaaccgag acagaaggtg cagggccac taccgcttc tccagatgag cttatgggtt 960
 tctccaccaa ggaagttttc cgctggttga atgattcttt cccgcctc ctctgcctc 1020

aggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgctccct cagcaaggac 1080
 □
 agcagaggac cagctaagag ggagagaagc aactgcagac cccccctgaa aacaaccctc 1140
 □
 agacgccaca tcccctgaca agctgccagg caggttct 1178
 □

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1 096 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, lidský promotor TNF-alfa

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

gaggccgcca gactgctgca ggggaagcaa aggagaagct gagaagatga aggaaaagtc 60
 □
 agggctctgga ggggcggggg tcagggagct cctgggagat atggccacat gtagcggctc 120
 □
 tgaggaatgg gttacaggag acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat 180
 □
 gtccagggct atggaagtcc agtatgggga cccccctta acgaagacag ggccatgtag 240
 □
 agggccccag ggagtgaaag agcctccagg acctccaggt atggaataca ggggacgttt 300
 □
 aagaagatat ggccacacac tggggccctg agaagtgaga gttcatgaa aaaaatcagg 360
 □
 gaccccagag ttccttgaa gccaaactg aaaccagcat tatgagtctc cgggtcagaa 420
 □
 tgaaagaaga aggctgccc cagtggggtc tgtgaattcc cgggggtgat ttcactcccc 480
 □
 ggggctgtcc caggcttgtc cctgctacc ccaccagcc tttcctgagg cctcaagcct 540
 □
 gccaccaagc cccagctcc ttctcccgc agggaccaa acacaggcct caggactcaa 600
 □
 cacagctttt cctccaacc cgttttctc tcctcaagg actcagcttt ctgaagcccc 660
 □
 tcccagttct agttctatct tttcctgca tcctgtctgg aagttagaag gaaacagacc 720
 □
 acagacctgg tccccaaaag aatggaggc aataggtttt gaggggcatg gggacggggg 780
 □
 tcagcctcca gggctctaca cacaaatcag tcagtggccc agaagacccc cctcggaatc 840
 □
 ggagcagggg ggatggggag tgtgaggggt atccttgatg cttgtgtgtc cccaactttc 900
 □
 caaatcccgc cccccgcgat ggagaagaaa ccgagacaga aggtgcaggg cccactaccg 960
 □

```

cttcctccag atgagctcat gggtttctcc accaaggaag ttttccgctg gttgaatgat 1020
□
tctttccccg ccctcctctc gccccagggg catataaagg cagttgttgg cacaccaccg 1080
□
cagcagacgc tccctc 1096
□

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 139 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, přirozený minimální promotor
TNF-alfa

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

```

ccgcttcttc cagatgagct catgggttcc tccaccaagg aagttttccg ctggttgaat 60
□
gattctttcc cggccctcct ctgccccag ggacatataa aggcagttgt atggcacacc 120
□
cgccagcaga cgctccctc 139
□

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 123 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, oblast 1 zesilovače promotoru
TNF-alfa (ER1)

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

```

ggggcggggg tcagggagct cctgggagat atggccacat gtagcggctc tgaggaatgg 60
□
gttacaggag acctctgggg agatgtgacc acagcaatgg gtaggagaat gtccagggct 120
□
atg 123
□

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 190 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE:
 - (D) TOPOLOGIE:
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA, oblast 2 zesilovače promotor TNF-alfa (ER2)
- (vi) PUVODNÍ ZDROJ:
- (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

```

-
tccttgaag ccaagactga aaccagcatt atgagtctcc gggtcagaat gaaagaagaa 60
□
ggcctgcccc agtgggggtct gtgaattccc ggggtgatt tcaactcccc gggctgtccc 120
□
aggettgtcc ctgctacccc caccagcct ttcttgaggc ctcaagcctg ccaccaagcc 180
□
cccagctcct                                     190
□

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 223 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) DRUH ŘETĚZCE:
 - (D) TOPOLOGIE:
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA, vícenásobná klonovací místa se zavedla proti směru exprese od minimálního promotoru TNF-alfa v konstrukci -120pGL3
- (vi) PUVODNÍ ZDROJ:
- (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

```

-
ggtaccgagc tcttacgcgt gctagccgcg gatattctaa gacgtcctag gactagtcag 60
□
ctgctcgagc cgcttctccc agatgagctc atgggtttct ccaccaagga agttttccgc 120
□
tggttgaatg attctttccc cgcctctctc tcgccccagg gacatataaa ggcagttggt 180
□
ggcacacca gccagcagac gctccctcag cagatctaag ctt                                     223
-

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 787 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, nepřekládaná oblast TNF-alfa

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

```

- tctagaggag gacgaacatc caaccttccc aaagcctccc cctgcccaca tccctttatt 60
□
□ acccctcct tcagacaccc tcaacctctt ctggctcaaa aagagaattg ggggcttagg 120
□
□ gtcggaaccc aagcttagaa cttaagcaa caagaccacc acttcgaaac ctgggattca 180
□
□ ggaatgtgtg gcctgcacag tgaagtgtg gcaaccacta agaattcaaa ctggggcctc 240
□
□ cagaactcac tggggcctac agctttgatc cctgacatct ggaatctgga gaccagggag 300
□
□ cctttgggtc tggccagaat gctgcaggac ttgagaagac ctcacctaga aattgacaca 360
□
□ agtggacctt aggccttctt ctctccagat gtttccagac ttcttgaga cacggagccc 420
□
□ agccctcccc atggagccag ctccctctat ttatgtttgc acttgtgatt atttattatt 480
□
□ tatttattat ttatttattt acagatgaat gtatttattt gggagaccgg ggtatcctgg 540
□
□ gggacceaat gtaggagctg ccttggctca gacatgtttt ccgtgaaaac ggagctgaac 600
□
□ aataggctgt tcccatgtag ccccctggcc tctgtgcctt cttttgatta tgttttttaa 660
□
□ aatatttata tgattaagtt gtctaaacaa tgctgatttg gtgaccaact gtcactcatt 720
□
□ gctgagcctc tgctcccag gggagttgtg tctgtaatcg cctactatt cagtggcgag 780
□
□ atctaga
□

```

787

(2) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 839 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, granzym B v plné délce

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

```

atgcaaccaa tcttgcttct gctggccttc ctctgctgc ccagggcaga tgcaggggag 60
□
atcatcgggg gacatgaggc caagccccac tcccgccctt acatggctta tcttatgatc 120
□
tgggatcaga agtctctgaa gaggtgcggt ggcttctga tacaagacga ctctgtgctg 180
□
acagctgctc actggtgggg aagctccata aatgtcacct tgggggcca caatatcaag 240
□
gaacaggagc cgaccagca gtttatccct gtgaaaagag ccatcccca tccagcctat 300
□
aatocaaaga acttctcaa tgacatcatg ctactgcagc tggagagaaa ggccaagcgg 360
□
accagagctg tgcagcccct caggctacct agcaacaagg cccaggtgaa gccagggcag 420
□
acatgcagtg tggccggctg ggggcagacg gccccctgg gaaaacactc acacacacta 480
□
caagaggtga agatgacagt gcaggaagat cgaaagtgcg aatctgactt acgccattat 540
□
tacgacagta ccattgagtt gtgcgtgggg gaccagaga ttaaaaagac ttcctttaag 600
□
gggactctg gaggcctct tgtgtgtaac aaggtggccc agggcattgt ctctatgga 660
□
cgaaacaatg gcatgcctcc acgagcctgc accaaagtct caagctttgt aactggata 720
□
aagaaaacca tgaaacgcta ctaactacag gaagcaaact aagccccgc tgtaatgaaa 780
□
caccttctct ggagccaagt ccagatttac actgggagag gtgccagcaa ctgaataaa 839
□

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 782 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, zkrácená forma granzymu B
(chybí vedoucí peptid a deaktivující dipeptid)

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

```

atgatcatcg ggggacatga ggccaagccc cactcccgcc cctacatggc ttatcttatg 60
□
atctgggatc agaagtctct gaagaggtgc ggtggcttcc tgatacaaga cgacttcgtg 120
□
ctgacagctg ctcaactgttg gggaagctcc ataaatgtca ccttgggggc ccacaatata 180
□
aaggaacagg agccgaccca gcagtttata cctgtgaaaa gagccatccc ccatccagcc 240
□
tataatccta agaacttctc caatgacatc atgctactgc agctggagag aaaggccaag 300
□
cggaccagag ctgtgcagcc cctcaggcta cctagcaaca aggcccaggt gaagccaggy 360
□
cagacatgca gtgtggccgg ctgggggcag acggccccc tgggaaaaca ctcacacaca 420
□
ctacaagagg tgaagatgac agtgcaggaa gatcgaaagt gcgaatctga cttacgccat 480
□
tattacgaca gtaccattga gttgtgctg ggggaccag agattaataa gacttccttt 540
□
aagggggact ctggaggccc tcttgtgtgt aacaaggtgg cccagggcat tgtctcctat 600
□
ggacgaaaca atggcatgcc tccacgagcc tgcaccaaag tctcaagctt tgtacactgg 660
□
ataaagaaaa ccatgaaacg ctactaacta caggaagcaa actaagcccc cgctgtaatg 720
□
aaacaccttc tctggagcca agtccagatt tacactggga gaggtgccag caactgaata 780
□
aa
□

```

782

(2) Informace o SEQ ID NO: 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(E) DÉLKA: 1 725 párů bází

(F) TYP: nukleová kyselina

(G) DRUH ŘETĚZCE:

(H) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, granzym B s deletovaným deaktivujícím dipeptidem

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

```

| atgcaaccaa tcttgcttct gctggccttc ctctgctgc ccagggcaga tgcaatcatc 60
|
| gggggacatg aggccaagcc cactcccgc ccctacatgg cttatcttat gatctgggat 120
|
| cagaagtctc tgaagaggtg cggtagcttc ctgatacaag acgacttcgt gctgacagct 180
|
| gctcactggt ggggaagctc cataaatgct accttggggg ccacacaatat caaggaacag 240
|
| gagccgacct agcagtttat ccctgtgaaa agagccatcc cccatccagc ctataatcct 300
|
| aagaacttct ccaatgacat catgctactg cagctggaga gaaaggccaa gcgaccaga 360
|
| gctgtgcagc ccctcaggct acctagcaac aaggcccagg tgaagccagg gcagacatgc 420
|
| agtgtggccg gctgggggca gacggcccc ctgggaaaac actcacacac actacaagag 480
|
| gtgaagatga cagtgcagga agatcgaaag tgcgaatctg acttacgcca ttattacgac 540
|
| agtaccattg agttgtgctg .gggggaccca gagattaata agacttcctt taagggggac 600
|
| tctggaggcc ctcttgtgtg taacaaggtg gccagggca ttgtctccta tggacgaaac 660
|
| aatggcatgc ctccacgagc ctgcacaaa gtctcaagct ttgtacactg gataaagaaa 720
|
| accatgaaac gctactaact acaggaagca aactaagccc ccgctgtaat gaaacacctt 780
|
| ctctggagcc aagtccagat ttacactggg agaggtgcca gcaactgaat aaa 833
|

```

(2) Informace o SEQ ID NO: 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 114 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, zesilovací oblast 3: -234 až -120 promotoru TNF-alfa

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

```
gcaggaggga tggggagtgt gaggggtatc cttgatgctt gtgtgtcccc aactttccaa 60
□
atccccgccc ccgcatgga gaagaaaccg agacagaagg tgcagggcc acta 114
□
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 169 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, zesilovací oblast 4: -234 až -65 promotoru TNF-alfa

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

```
gcaggaggga tggggagtgt gaggggtatc cttgatgctt gtgtgtcccc aactttccaa 60
□
atccccgccc ccgcatgga gaagaaaccg agacagaagg tgcagggcc actaccgctt 120
□
cctccagatg agctcatggg tttctccacc aaggaagttt tccgctggt 169
□
```

(2) Informace o SEQ ID NO: 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2 270 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, chimerový gen: -706TNFpGB3'UTR

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

```

ctcgagtctt tggaagccaa gactgaaacc agcattatga gtctccgggt cagaatgaaa 60
□
gaagaaggcc tgccccagtg gggctctgtga attccccggg gtgatttcac tccccggggc 120
□
tgtcccaggc ttgtccctgc taccocacc cagcctttcc tgaggctcaa gcctgccacc 180
□
aagccccag ctctttctcc cogcagggac ccaaacacag gcctcaggac tcaacacagc 240
□
ttttccctcc aaccccgttt totctccctc aaggactcag ctttctgaag cccctcccag 300
□
ttctagttct atctttttcc tgcattctgt ctggaagtta gaaggaaaca gaccacagac 360
□
ctggccccca aaagaaatgg aggcaatagg ttttgagggg catggggacg gggttcagcc 420
□
tccagggtcc tacacacaaa tcagtcagtg gcccagaaga cccccctcgg aatcggagca 480
□
gggaggatgg ggagtgtgag gggatcctt gatgcttgtg tgtcccacac tttocaaatc 540
□
ccccccccg cgatggagaa gaaaccgaga cagaagggtc agggcccact accgcttctc 600
□
ccagatgagc tcatggggtt ctccaccaag gaagttttcc gctgggtgaa tgattctttc 660
□
ccccccctcc tctcgcccca gggacatata aaggcagttg ttggcacacc cagccagcag 720
□
acgctccctc agcagatcta tgcaaccaat cctgcttctg ctggccttcc toctgctgcc 780
□
cagggcagat gcaatcatcg ggggacatga ggccaagccc cactcccgcc cctacatggc 840
□

```

- ttatcttatg atctgggatc agaagtctct gaagaggtgc ggtggcttcc tgatacaaga 900
 □
 cgacttcgtg ctgacagctg ctcaactgtg gggaagctcc ataaatgtca ccttgggggc 960
 □
 ccacaatatc aaagaacagg agccgacca gcagtttacc cctgtgaaaa gaccatccc 1020
 □
 ccatccagcc tataatccta agaacttctc caacgacatc atgctactgc agctggagag 1080
 □
 aaaggccaag cggaccagag ctgtgcagcc cctcaggcta cctagcaaca aggcccaggt 1140
 □
 gaagccaggg cagacatgca gtgtggcgg ctgggggcag acggcccccc tgggaaaaca 1200
 □
 ctcacacaca ctacaagagg tgaagatgac agtgcaggaa gatcgaaagt gcgaatctga 1260
 □
 cttacgccat-tattaogaca gtaccattga gttgtgcgtg ggggaccag agattaaaaa 1320
 □
 gacttccttt aagggggact ctggaggccc tcttgtgtgt aacaaggtgg cccagggcat 1380
 □
 tgtctcctat ggacgaaaca atggcatgcc tccacgagcc tgcaccaaag tctcaagctt 1440
 □
 tgtacactgg ataaagaaaa ccatgaaacg ctactaagaa ttctctagag gaggacgaac 1500
 □
 atccaacctt cccaaacgcc tcccctgccc caatcccttt attaccctt ccttcagaca 1560
 □
 ccctcaacct cttctggctc aaaaagagaa ttgggggctt agggtcggaa cccaagctta 1620
 □
 gaactttaag caacaagacc accacttoga aacctgggat tcaggaatgt gtggcctgca 1680
 □
 cagtgaagtg ctggcaacca ctaagaattc aaactggggc ctccagaact cactggggcc 1740
 □
 tacagcttg atccctgaca tctggaatct ggagaccagg gagcctttgg ttctggccag 1800
 □
 aatgctgcag gacttgagaa gacctcacct agaaattgac acaagtggac cttaggcctt 1860
 □
 cctctctcca gatgtttcca gacttccttg agacacggag cccagccctc cccatggagc 1920
 □
 cagctccctc tatttatggt tgcacttgtg attatttatt atttatttat tatttattta 1980
 □
 tttacagatg aatgtattta tttgggagac cggggtatcc tgggggaccc aatgtaggag 2040
 □
 ctgccttggc tcagacatgt tttccgtgaa aacggagctg aacaataggc tgttcccatg 2100
 □
 tagccccctg gcctctgtgc cttcttttga ttatgtttt taaaatattt atctgattaa 2160
 □
 gttgtctaaa caatgctgat ttggtgacca actgtcactc attgctgagc ctctgctccc 2220
 □
 caggggagtt gtgtctgtaa tcgcctact attcagtggc gagatctaga 2270
 □

(2) Informace o SEQ ID NO: 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 2 570 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA, -1005TNFpGB3'UTR

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

```

ctcgagggcg ggggtcaggg agctcctggg agatatggcc acatgtagcg gctctgagga 60
□
atggggttaca ggagacctct ggggagatgt gaccacagca atgggtagga gaatgtccag 120
□
ggctatggaa gtcgagtatg gggaccccc cttaacgaag acagggccat gtagagggcc 180
□
ccagggagtg aaagagcctc caggacctcc aggtatggaa tacaggggac gtttaagaag 240
□
atatggccac aactggggc cctgagaagt gagagcttca tgaaaaaat cagggacccc 300
□
agagttcctt ggaagccaag actgaaacca gcattatgag totccgggtc agaatgaaag 360
□
aagaaggcct gccccagtgg ggtctgtgaa ttcccggggg tgatttcact ccccggggct 420
□
gtcccaggct tgtccctgct acccccaccc agcctttcct gaggcctcaa gcctgccacc 480
□
aagccccag ctctttctcc ccgcaggac ccaaacacag gcctcaggac tcaacacagc 540
□
ttttccctcc aacccgttt tctctccctc aaggactcag ctttctgaag ccctcccag 600
□
ttctagttct atctttttcc tgcacctgt ctggaagtta gaaggaaaca gaccacagac 660
□
ctggtcccca aaagaaatgg aggcaatagg ttttgagggg catggggacg gggttcagcc 720
□
tccagggctc tacacacaaa tcagtcagtg gccagaaga ccccctcgg aatcggagca 780
□
gggaggatgg ggagtgtgag gggatcctt gatgcttgtg tgtcccacac tttccaaatc 840
□

```

cccgcccccg cgatggagaa gaaaccgaga cagaagggtgc agggcccact accgcttcct 900
 □
 ccagatgagc tcatgggttt ctccaccaag gaagttttcc gctgggtgaa tgattctttc 960
 □
 cccgcccctcc tctcgcccca gggacatata aaggcagttg ttggcacacc cagccagcag 1020
 □
 acgctccctc agcagatcta tgcaaccaat cctgcttctg ctggccttcc tcctgctgcc 1080
 □
 cagggcagat gcaatcatcg ggggacatga ggccaagccc cactcccgcc cctacatggc 1140
 □
 ttatcttatg atctgggatc agaagtctct gaagagggtgc ggtggcttcc tgatacaaga 1200
 □
 cgacttcgtg ctgacagctg ctoactgttg gggaaagctcc ataaatgtca ccttggggggc 1260
 □
 ccacaatatc aaagaacagg agccgaccca gcagtttata cctgtgaaaa gacccatccc 1320
 □
 ccatccagcc tataatccta agaacttctc caacgacatc atgctactgc agctggagag 1380
 □
 aaaggccaag cggaccagag ctgtgcagcc cctcaggcta cctagcaaca agggccaggt 1440
 □
 gaagccaggg cagacatgca gtgtggccgg ctgggggagc acggccccc tgggaaaaca 1500
 □
 ctcacacaca ctacaagagg tgaagatgac agtgcaggaa gatcgaaagt gcgaatctga 1560
 □
 cttacgccat tattacgaca gtaccattga gttgtgcgtg ggggaccag agattaataa 1620
 □
 gacttccttt aagggggact ctggaggccc tcttgtgtgt aacaaggtgg cccagggcat 1680
 □
 tgtctcctat ggacgaaaca atggcatgcc tccacgagcc tgcaccaaag tctcaagctt 1740
 □
 tgtacactgg ataaagaaaa ccatgaaacg ctactaagaa ttctctagag gaggacgaac 1800
 □
 atccaacctt cccaaacgcc tcccctgccc caatcccttt attaccocct ccttcagaca 1860
 □
 ccctcaacct cttctggctc aaaaagagaa ttgggggctt agggtcggaa cccaagctta 1920
 □
 gaactttaag caacaagacc accacttoga aacctgggat tcaggaatgt gtggcctgca 1980
 □
 cagtgaagtg caggcaacca ctaagaattc aaactggggc ctccagaact cactggggcc 2040
 □
 tacagctttg atccctgaca tctggaatct ggagaccagg gagcctttgg ttctggccag 2100
 □
 aatgctgcag gacttgagaa gacctcacct agaaattgac acaagtggac cttaggcctt 2160
 □
 cctctctcca gatgtttcca gacttccttg agacacggag cccagccctc cccatggagc 2220
 □
 cagctccctc tatttatggt tgcaactgtg attatttatt atttattat tatttattta 2280
 □
 tttacagatg aatgtattta tttgggagac cggggtatcc tgggggacc aatgtaggag 2340
 □
 ctgccttggc tcagacatgt tttccgtgaa aacggagctg aacaataggc tgttcccatg 2400
 □
 tagccccctg gcctctgtgc cttcttttga ttatgttttt taaaatattt atctgattaa 2460
 □
 gttgtctaaa caatgctgat ttggtgacca actgtcactc attgctgagc ctctgctccc 2520
 □
 caggggagtt gtgtctgtaa togcctact attcagtggc gagatctaga 2570
 □

P A T E N T O V É N Á R O K Y

PV 1070 - 3111

~~48226~~

1. Molekula chimerové nukleové kyseliny, která zahrnuje: alespoň jednu zesilovací oblast promotoru TNF α , která je připojena k tomuto promotoru, zesilovací oblast obsahující nukleovou kyselinu SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 nebo konzervativní substituci nebo její alelové varianty, přičemž promotor TNF α je dále zachycen na sekvenci nukleové kyseliny, která kóduje protein granzym B nebo konzervativní substituci nebo její alelické varianty, které jsou naopak dále připojeny na sekvenci 3'UTR nukleové kyseliny.

2. Molekula chimerové nukleové kyseliny podle nároku 1, kde je přítomno dvě až pět zesilovacích oblastí promotoru TNF α a kde libovolná ze zesilovacích oblastí zahrnuje SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12 nebo jejich kombinace.

3. Molekula chimerové nukleové kyseliny podle nároku 2, kde promotor TNF α obsahuje nukleovou kyselinu SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 nebo konzervativní substituci nebo její alelické varianty.

4. Molekula chimerové nukleové kyseliny podle nároku 1, kde sekvence molekuly nukleové kyseliny se vybrala ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 a konzervativní substituci nebo jejich alelické varianty.

5. Molekula chimerové nukleové kyseliny podle nároku 1, kde se 3'UTR ligovala po směru exprese sekvence nukleové kyseliny granzymu B.

6. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje molekulu chimerové nukleové kyseliny podle nároku 1.

7. Způsob léčby zánětlivých stavů, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci pacientovi, který potřebuje

takovou léčbu, farmaceuticky účinné množství prostředku podle nároku 6.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zánětlivý stav se vybral ze skupiny zahrnující revmatoidní artritidu, roztroušenou sklerózu, Guillain-Barrův syndrom, Crohnovu nemoc, ulcerativní kolitidu, lupénku, lupus erythematoses, odmítnutí štěpů, cukrovka se závislostí na inzulinu, psoriatická artritida, sarkoidóza, hypercitivní pneumonitida, ankylozující spondylitida, Reiterův syndrom a generalizovaná skleróza.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zánětlivý stav je revmatoidní artritida.

10. Způsob konstrukce molekuly chimerové nukleové kyseliny, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e alespoň jeden zesilovač promotoru TNF α je připojen k funkční kopii minimálního promotoru TNF α připojeného alespoň k jedné kopii molekuly nukleové kyseliny vyvolávající apoptózu, která je dále připojena k sekvenci nukleové kyseliny TNF α -3'UTR, kde exprese nukleové kyseliny vyvolávající apoptózu je řízena promotorem TNF α , přičemž uvedený způsob zahrnuje:

- a) amplifikaci molekuly nukleové kyseliny zahrnující promotor TNF α polymerázovou řetězovou reakci za použití primerů, které obsahují deleční konstrukce promotoru TNF α ,
- b) klonování nukleové kyseliny amplifikované PCR získané podle popisu v odstavci a) proti směru exprese od sekvence reportní nukleové kyseliny, přičemž vzniká konstrukce,
- c) testování konstitutivní nebo indukovatelné exprese konstrukcí získaných podle popisu v odstavci b) v alespoň jedné buněčné linii, která produkuje TNF α ,
- d) výběr promotoru TNF α odpovědného za indukovatelnou expresi reportní molekuly v buněčné linii,
- e) PCR amplifikace oblastí promotoru TNF α , která zesiluje expresi reportní molekuly, přičemž se získá zesilovač, a

ligace alespoň jedné kopie zesilovače proti směru exprese od promotoru,

- f) začlenění alespoň jedné kopie molekuly nukleové kyseliny vyvolávající apoptózu po směru exprese od promotoru TNF α tím, že se nahradí promotor delečními konstrukcemi nukleové kyseliny, která vyvolává apoptózu a
- g) PCR amplifikace TNF α -3'UTR a ligace po směru exprese molekuly nukleové kyseliny vyvolávající apoptózu, přičemž se získá molekula nukleové kyseliny.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dvě nebo více kopií zesilovače se začlenily proti směru exprese od promotoru.

12. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e sekvence reportní nukleové kyseliny je luciferáza.

13. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zesilovač obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny obsahující SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11 a SEQ ID NO: 12.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e nukleová kyselina vyvolávající apoptózu je granzym B nebo konzervativní substituce nebo jeho alelické varianty.

15. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e molekula chimerové nukleové kyseliny se vybrala ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 a konzervativní substituci nebo její alelové varianty.

16. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e buněčné linie vhodné pro testování konstrukcí se vybraly ze skupiny zahrnující T lymfoblastoidní, myelomonocytické, monocytické buňky, fibroblasty, kultivované lidské synoviocyty a primární buňky, které se vyskytují u RA.

17. Způsob testování dominantních negativních genů, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje transfekci

populace buněk, které neprodukují TNF α , sekvenci obsahující molekulu chimerové nukleové kyseliny podle nároku 1 a stimulaci exprese začleněné sekvence a výběr buněk, které přežily a obsahují dominantní negativní geny.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e sekvence obsahuje molekulu chimerové nukleové kyseliny podle nároku 2.

PU2010-2111
48226

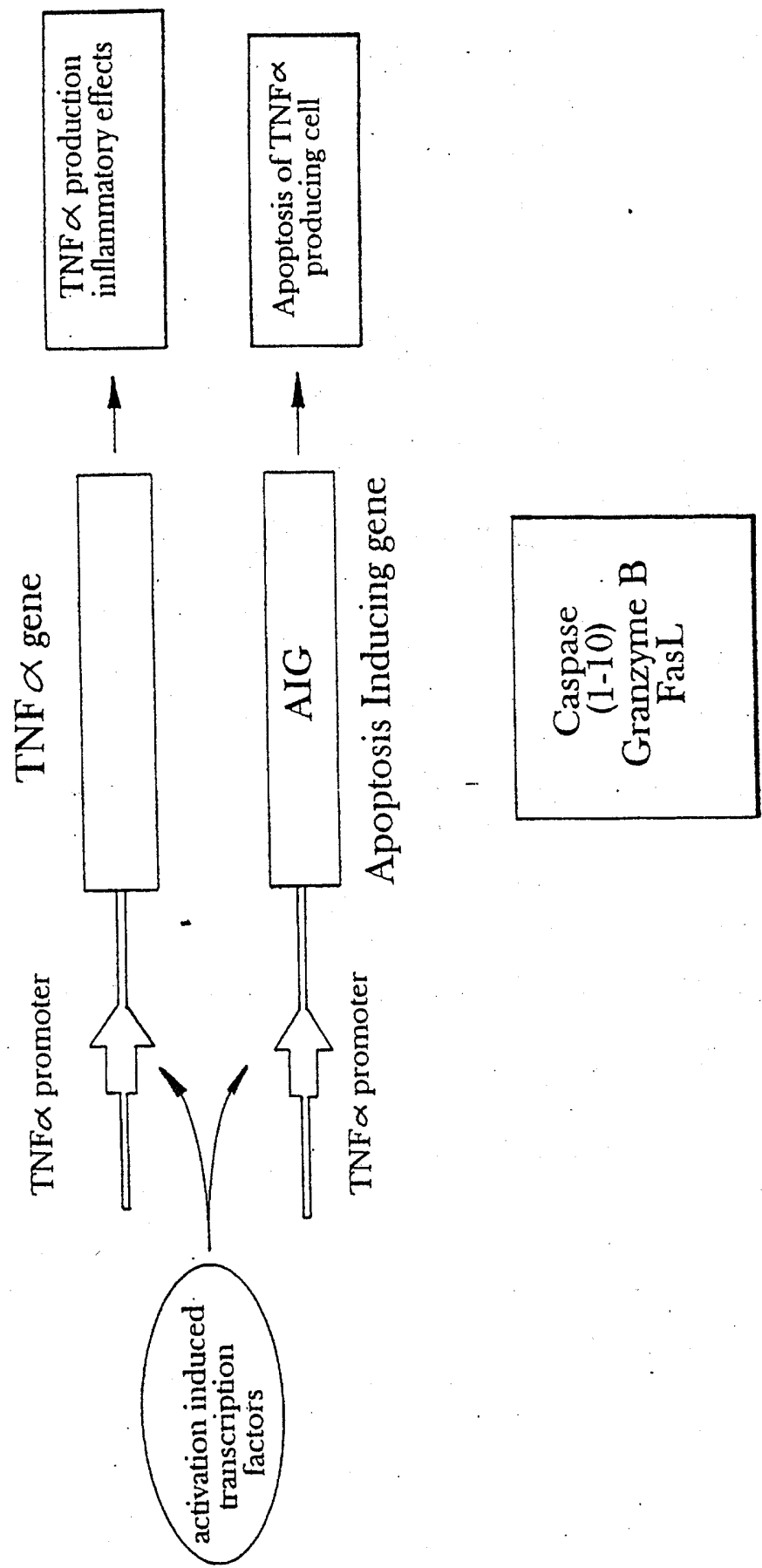


Fig. 1

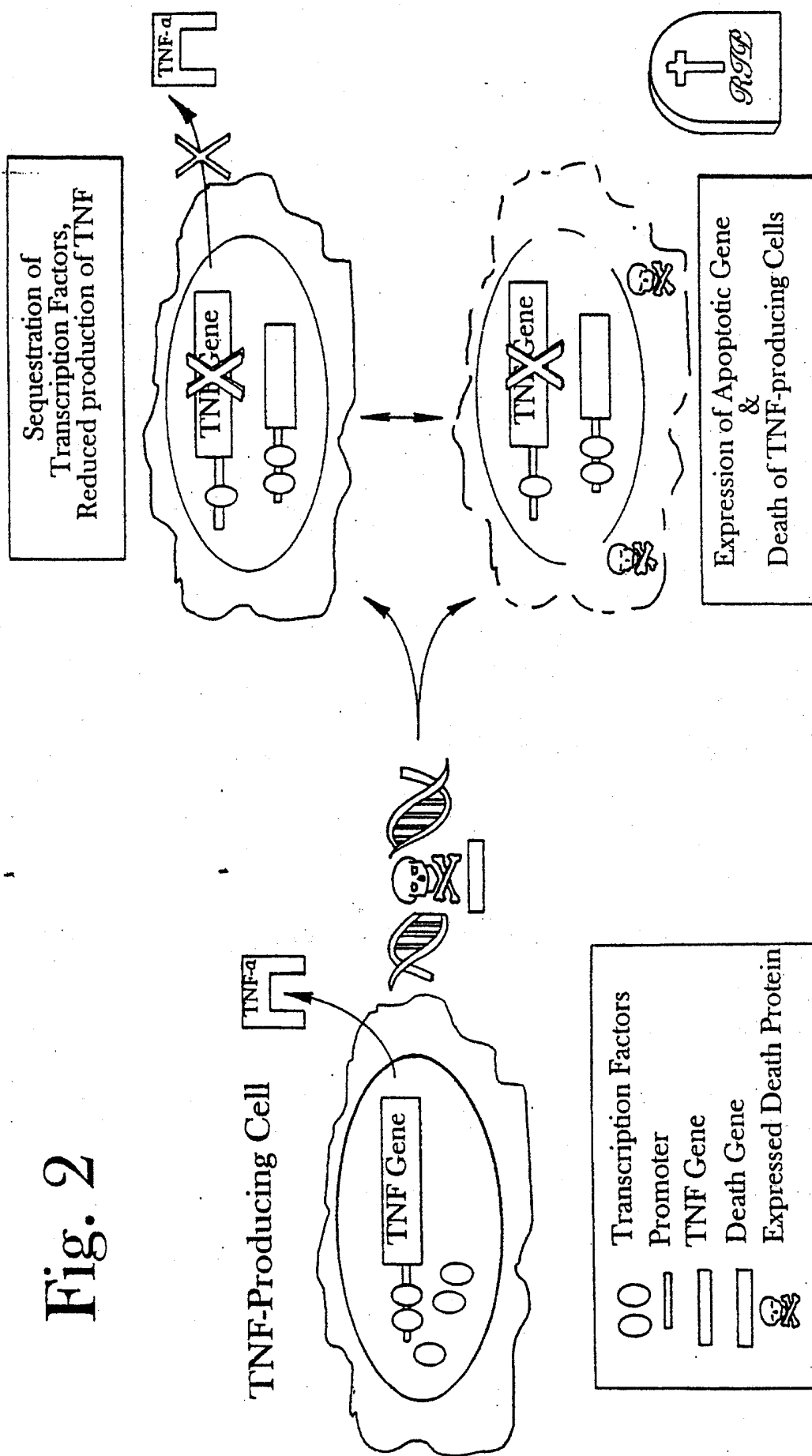


Fig. 2

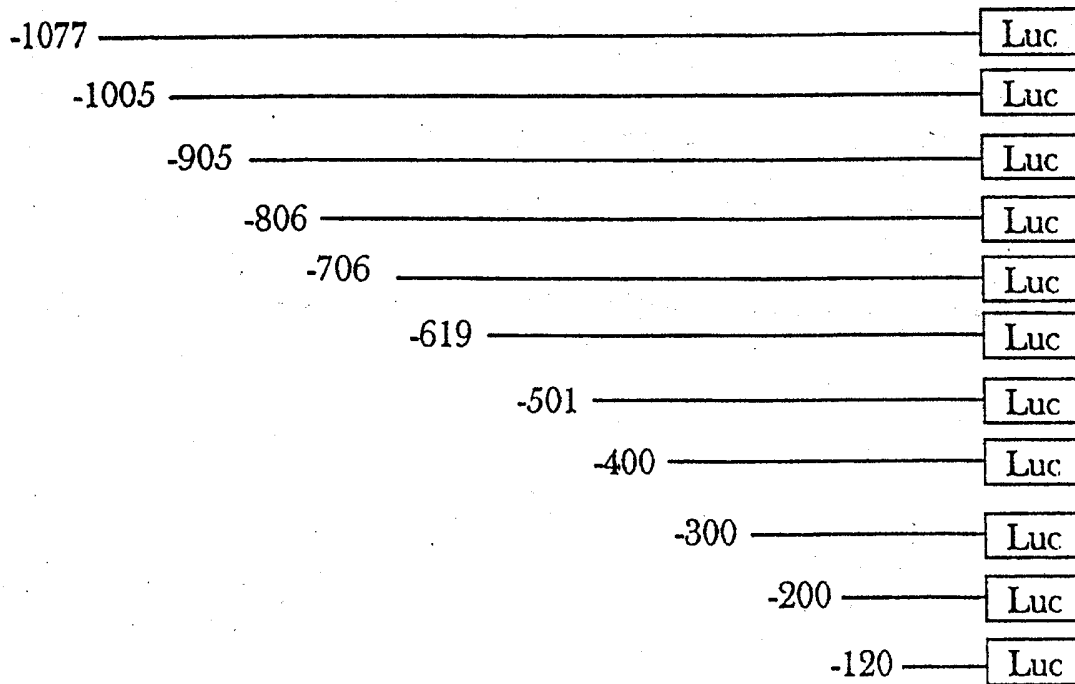


Fig. 3

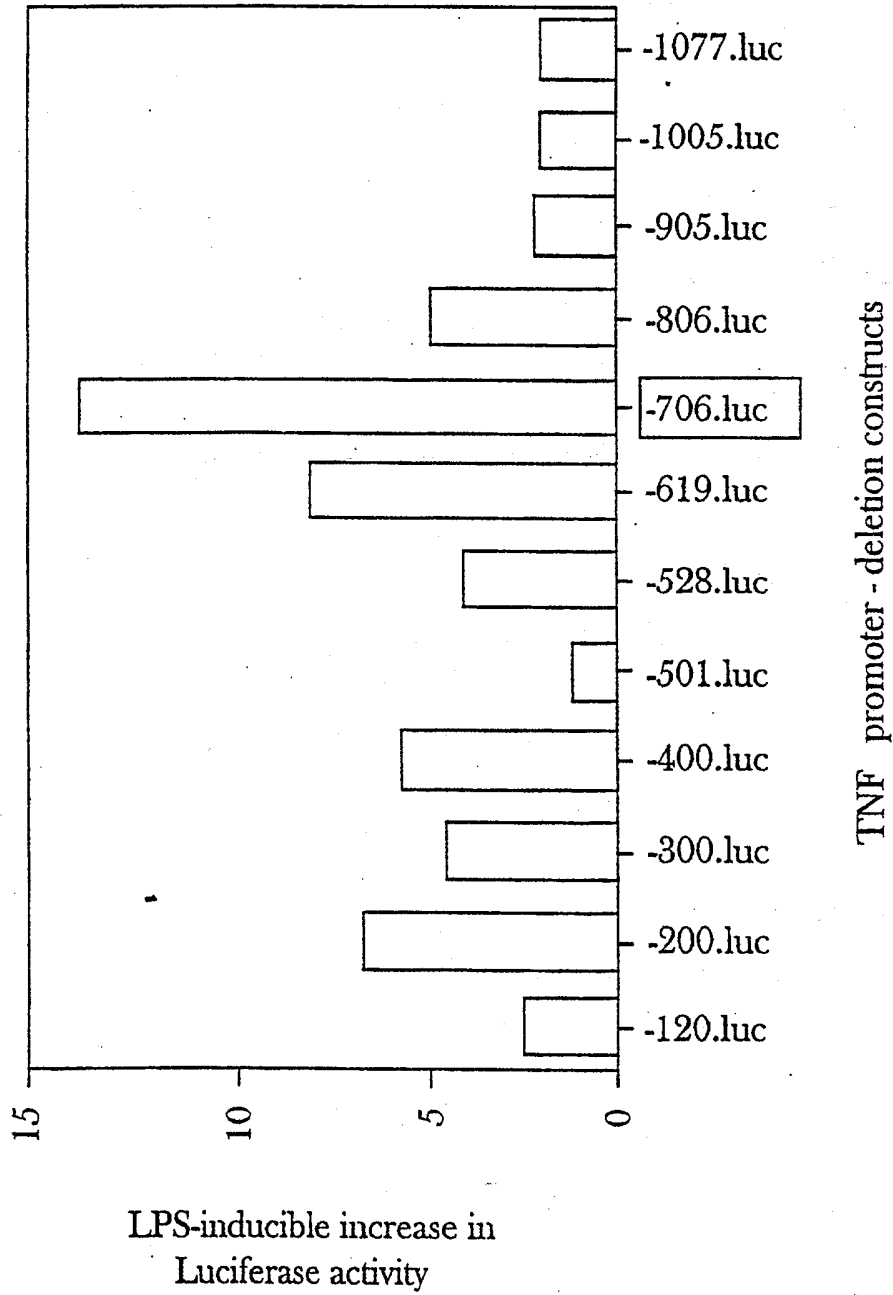


Fig. 4a

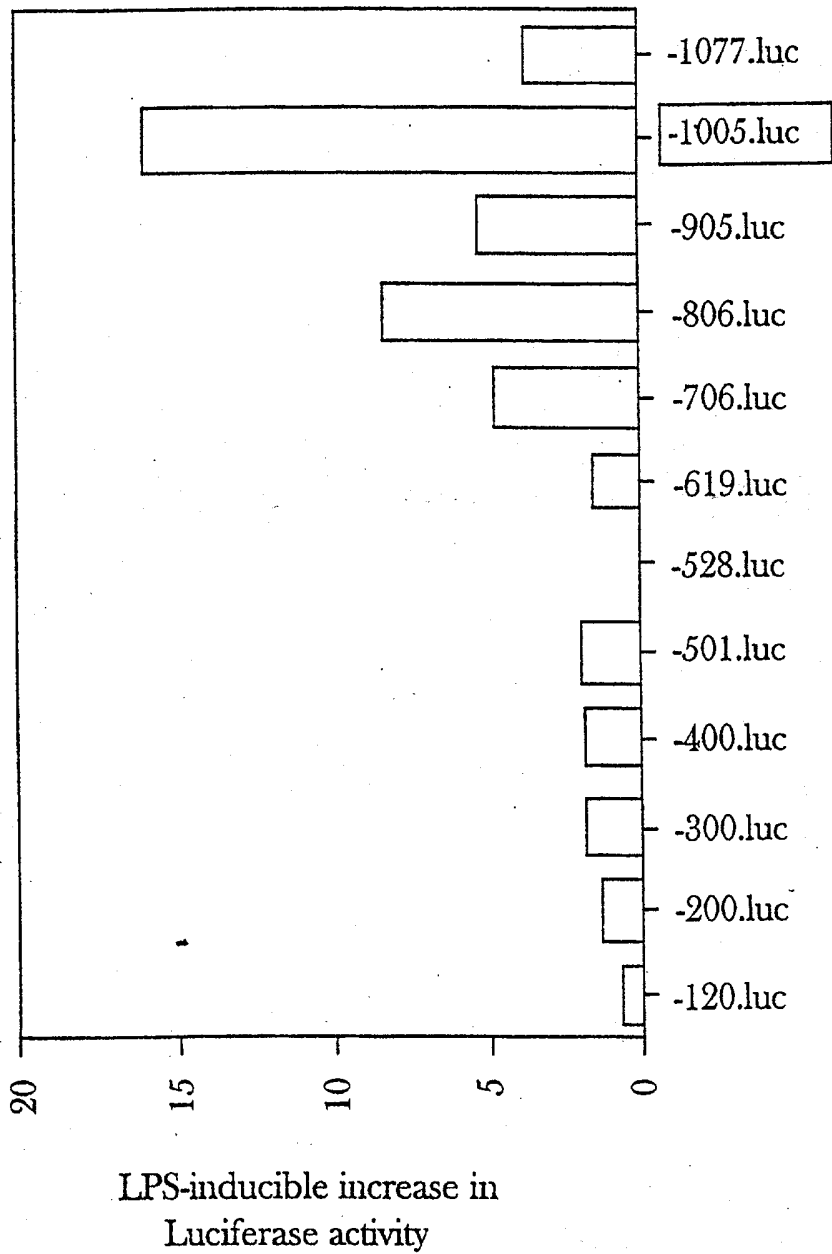


Fig. 4b

pGL3 basic vector elements

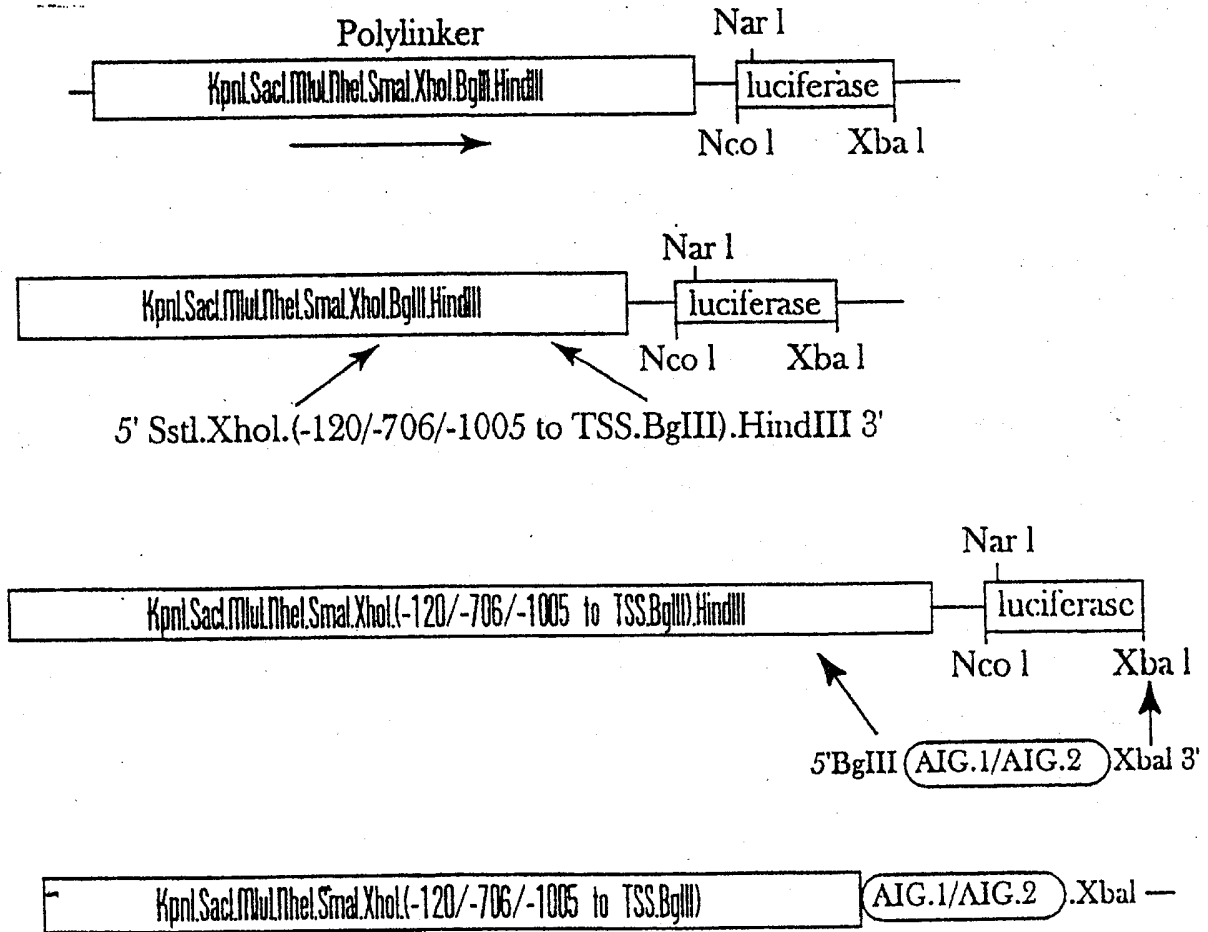


Fig. 5

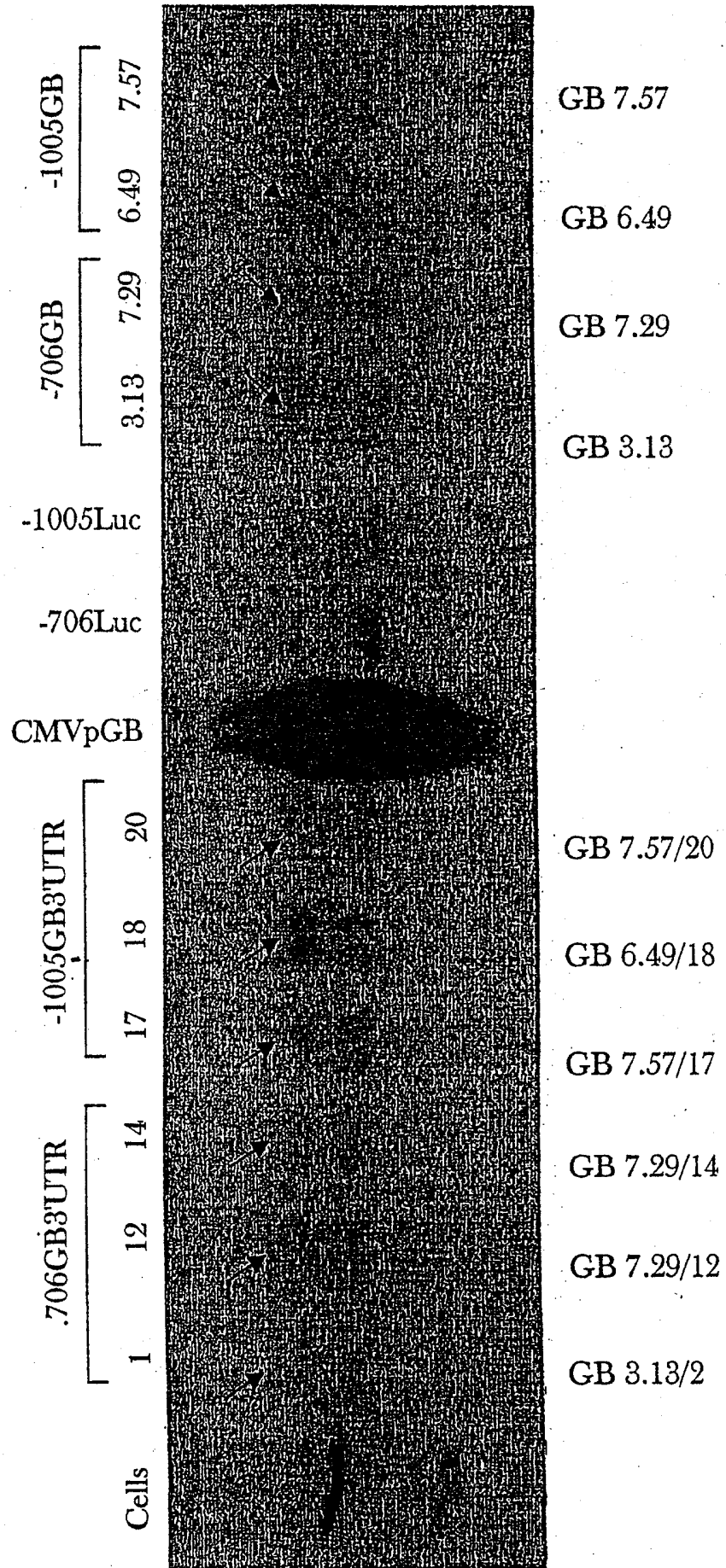


Fig. 6a

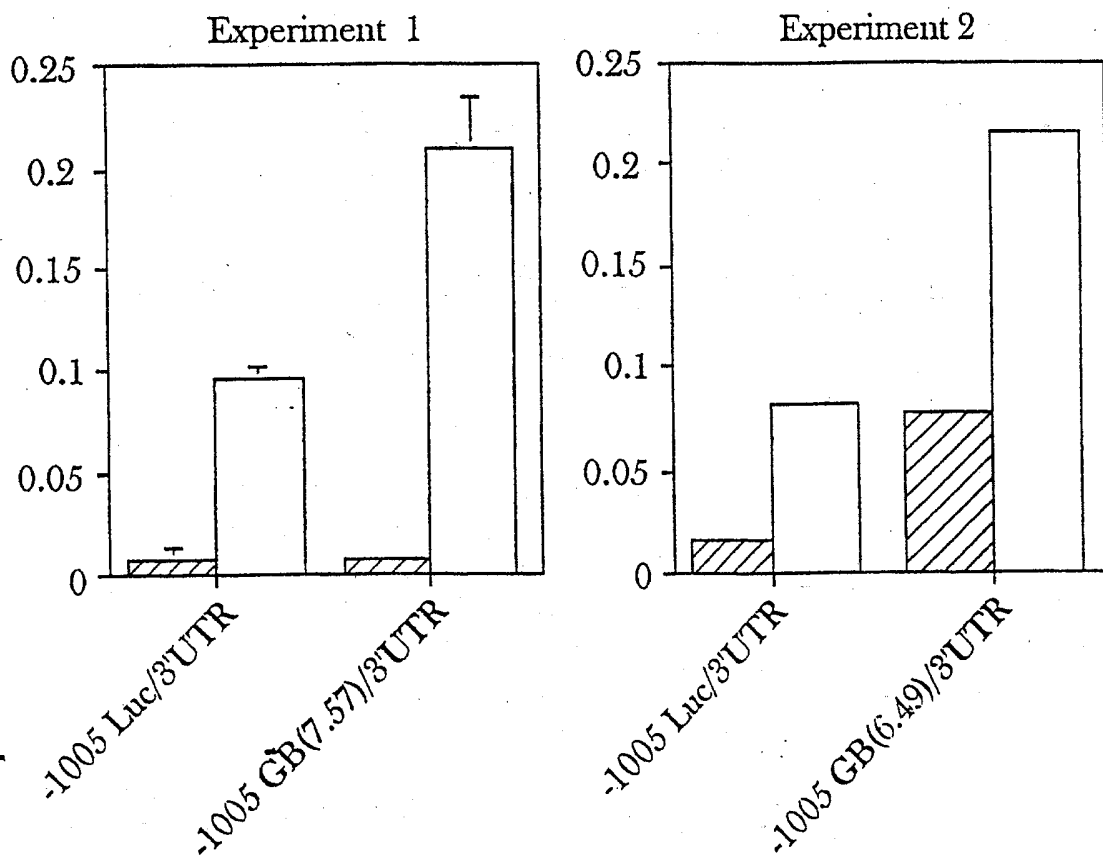


Fig. 6b

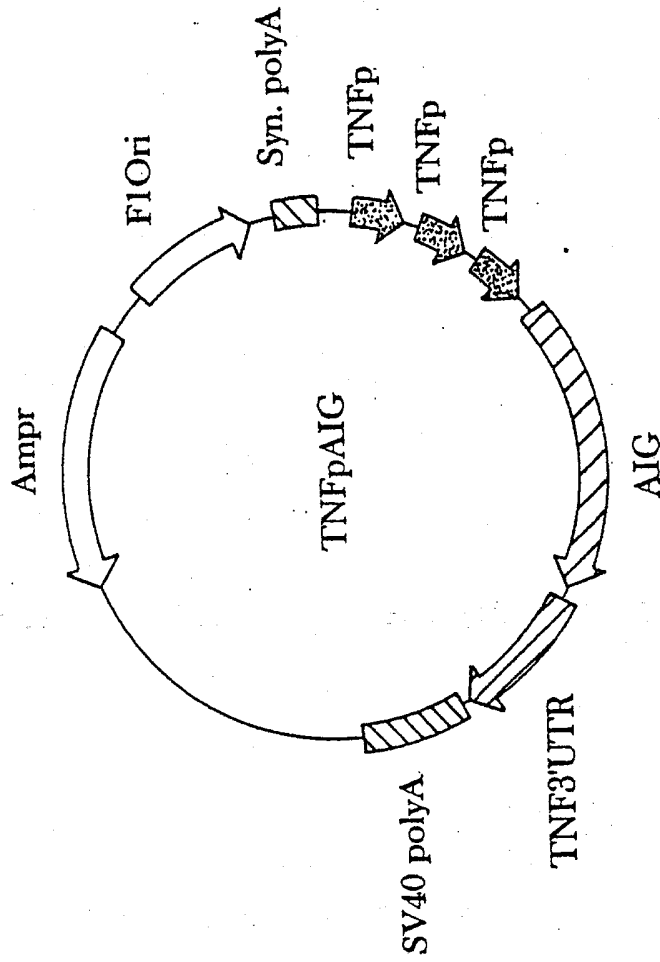


Fig. 7B

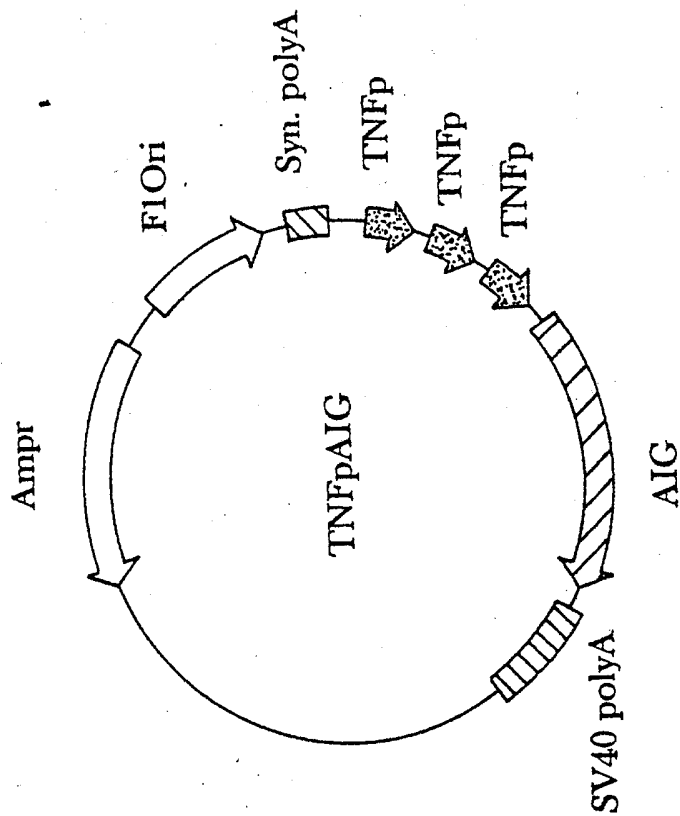


Fig. 7A

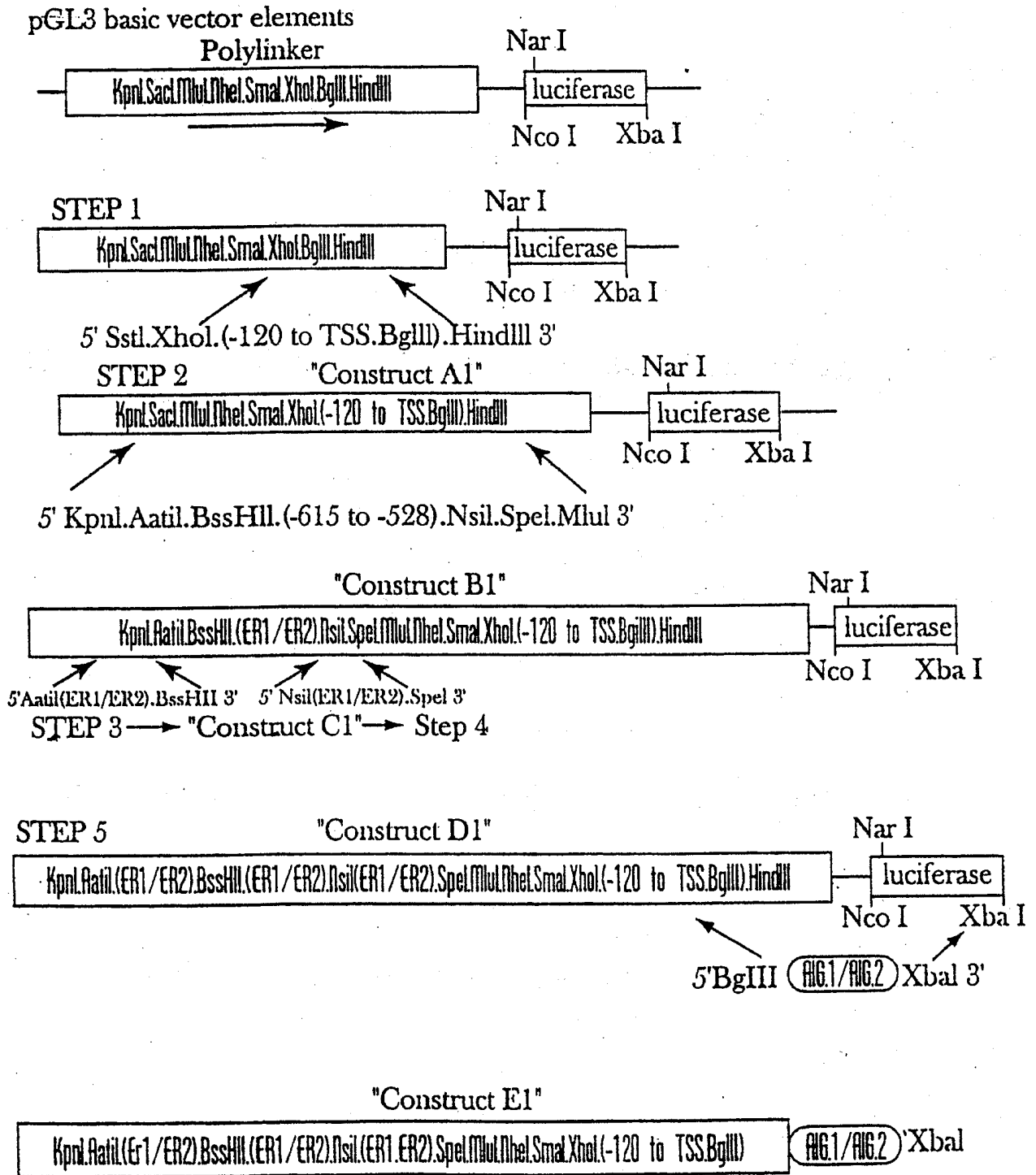


Fig. 8a

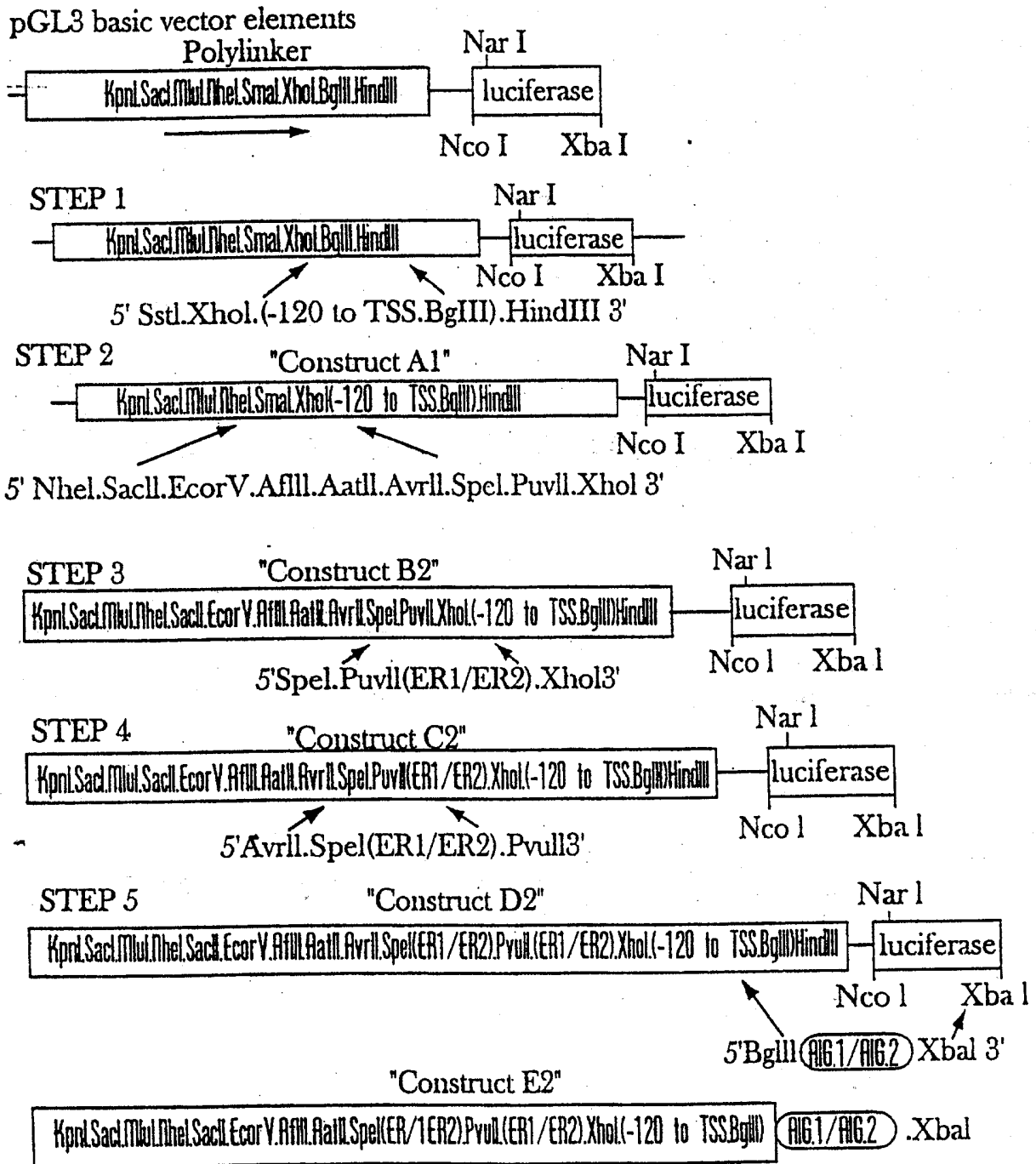


Fig. 8b

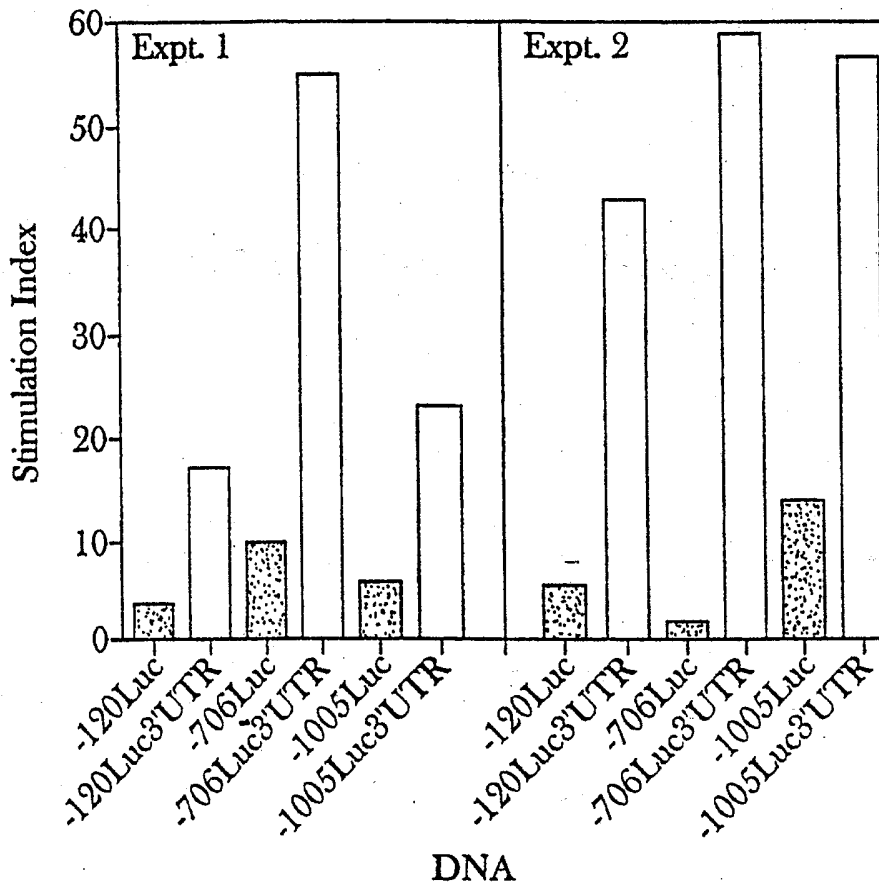


Fig. 9

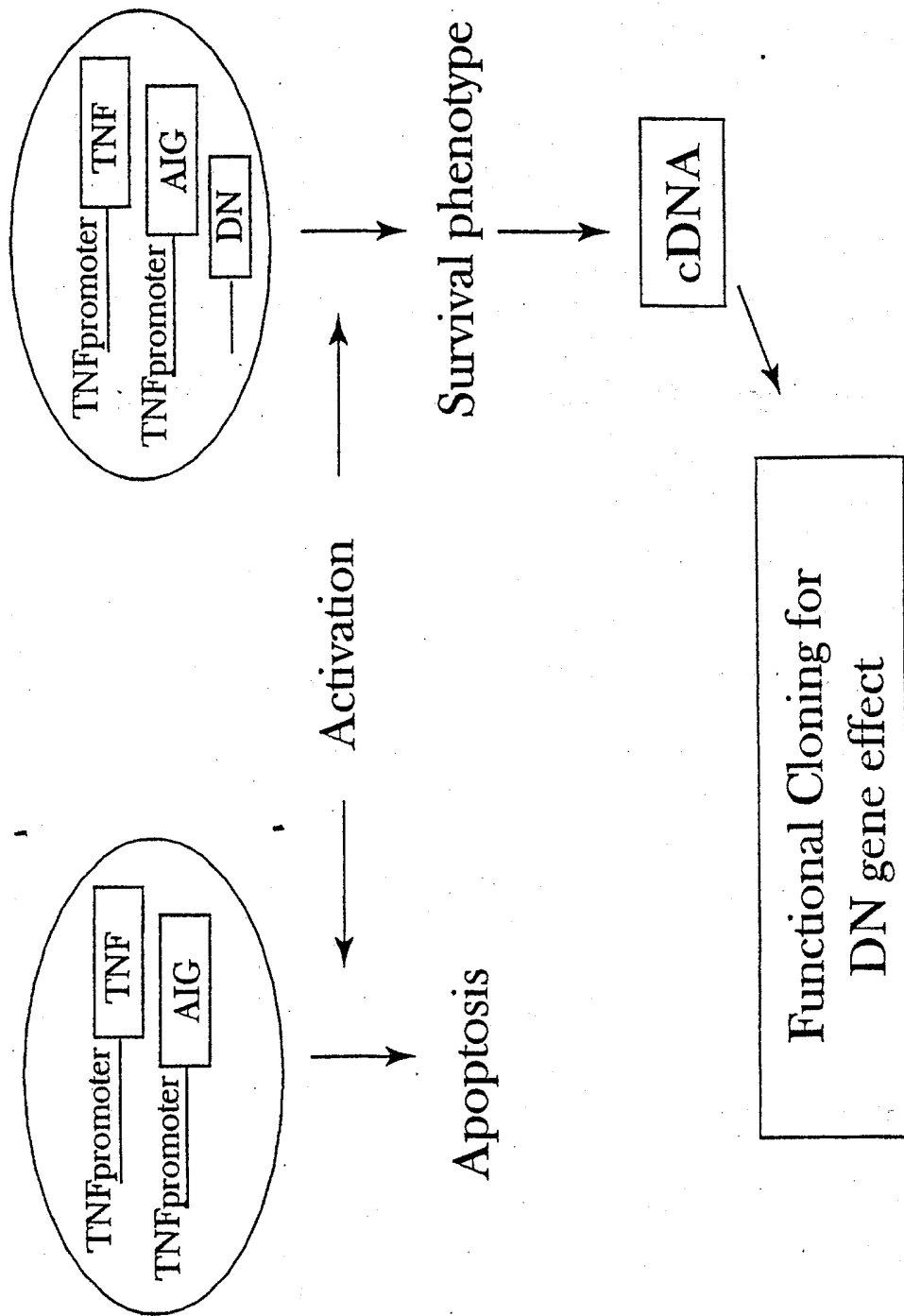


Fig. 10

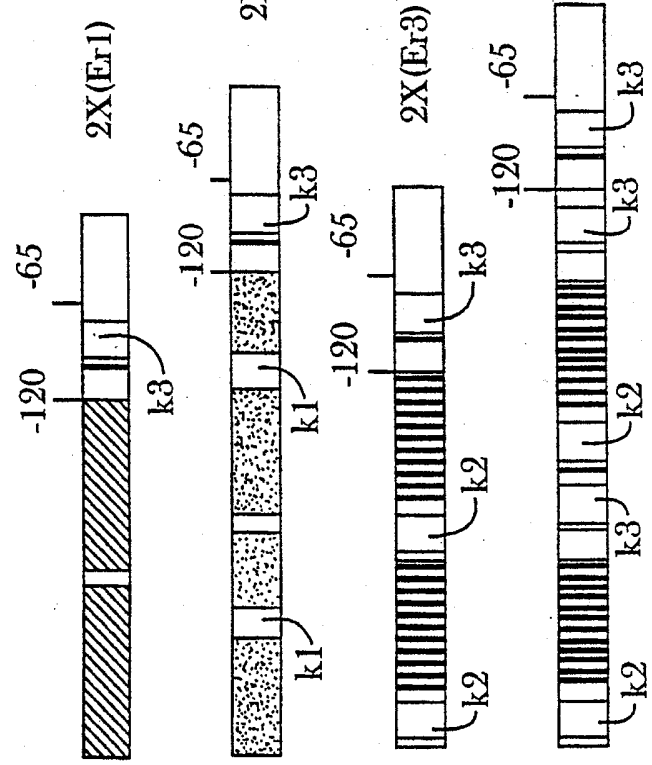
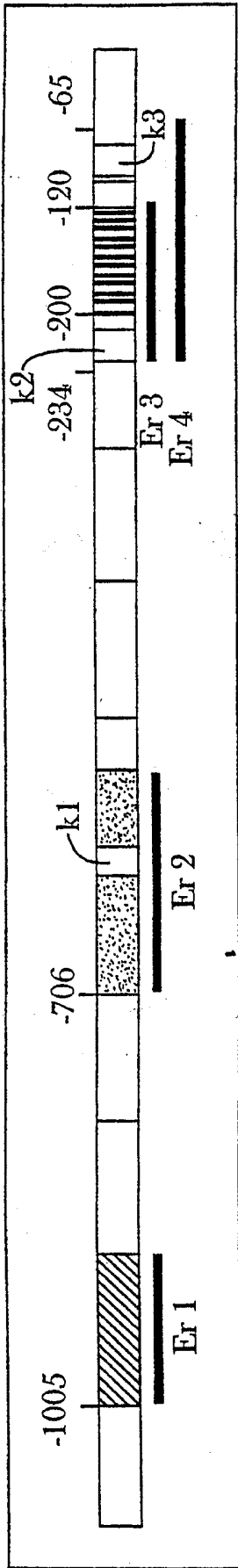


Fig. 11a

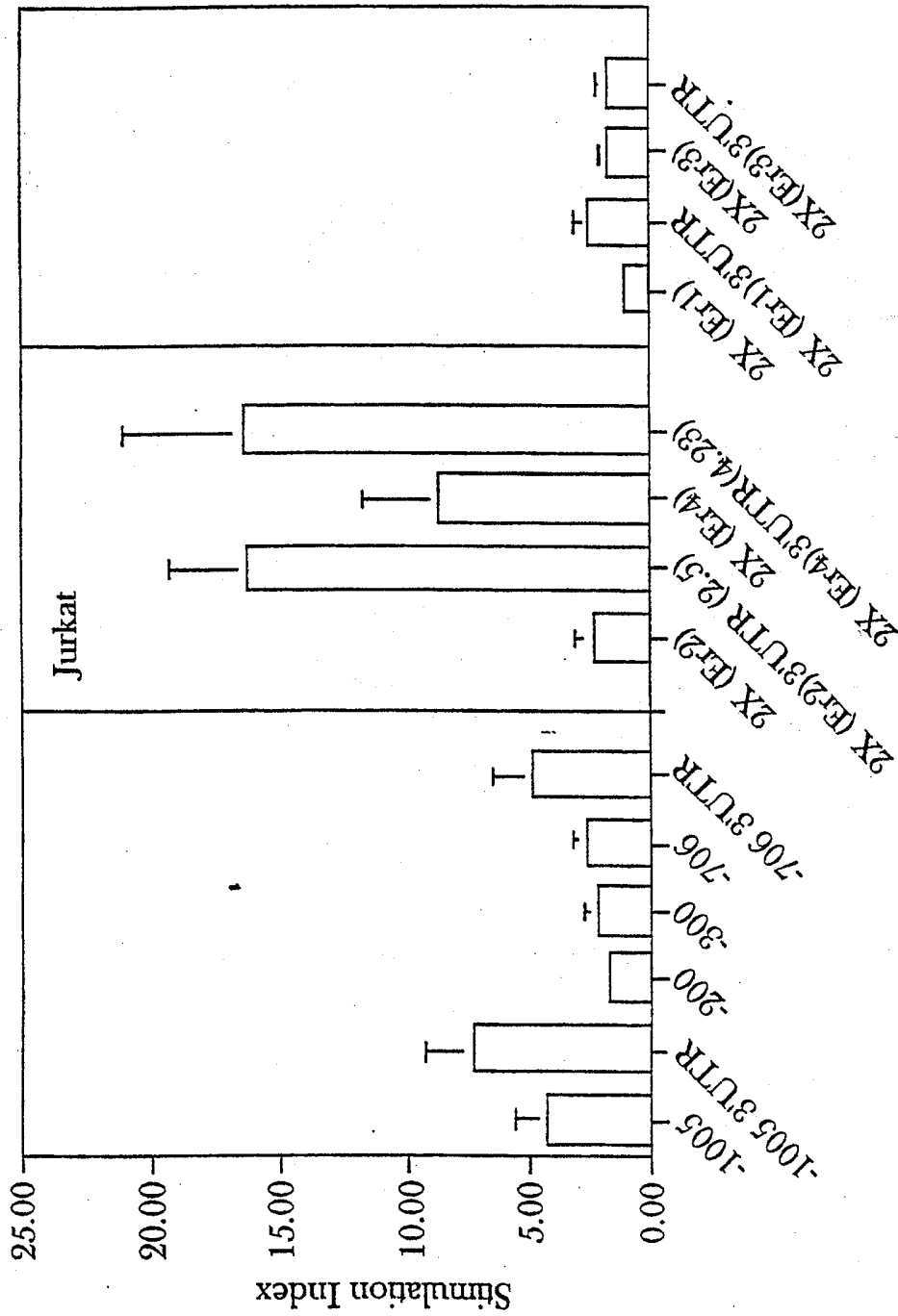


Fig. 11b

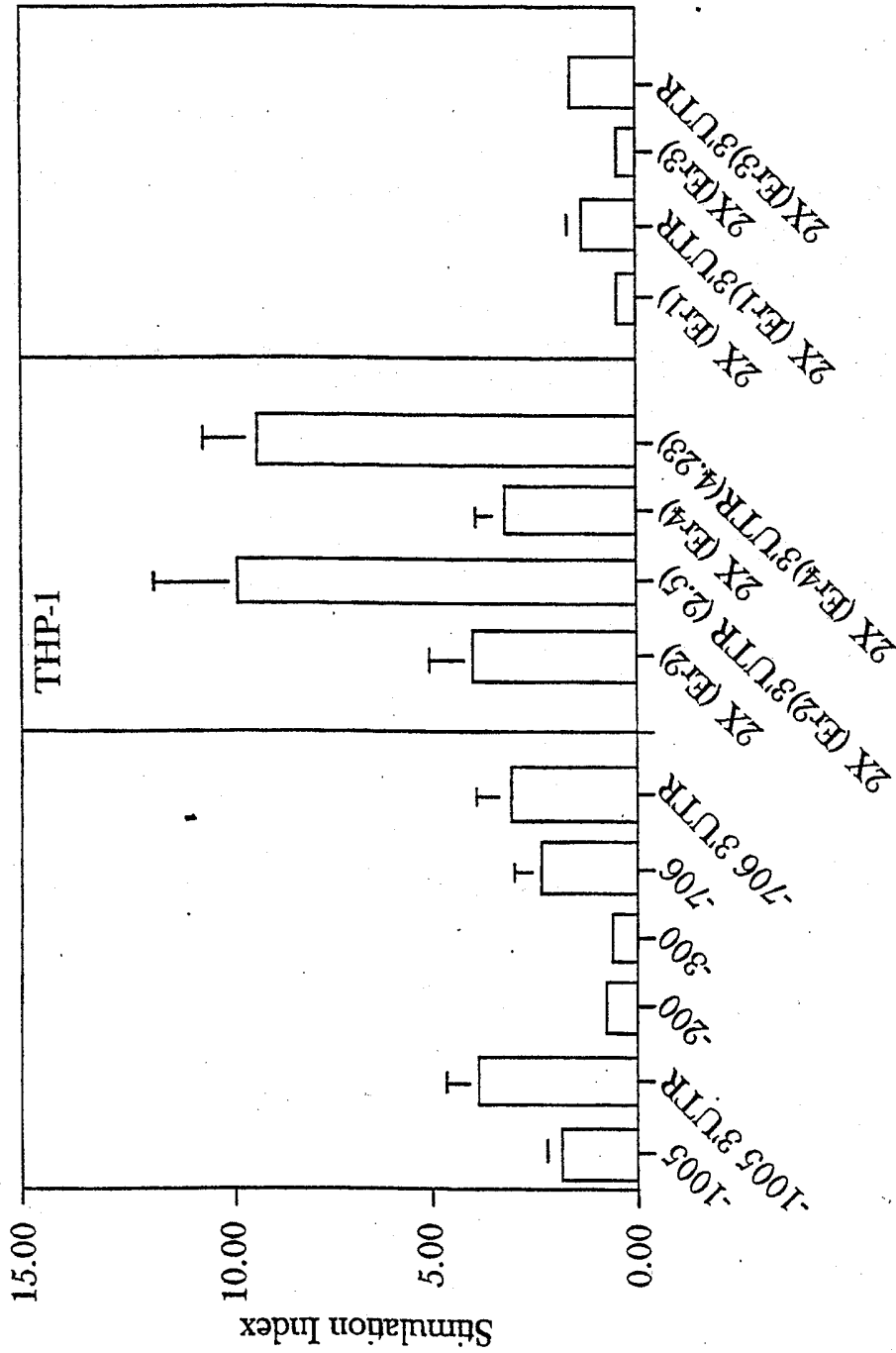
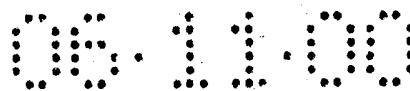


Fig. 11C

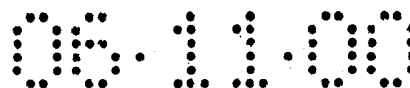


Chimeric Nucleic Acid (-706TNFpGB3'UTR)

*CTCGAGT*ccttgggaagccaagactgaaaccagcattatgagtctccgggtcagaatgaaagaagaa
 ggcttgcctcagtgagggtctgtgaattcccgggggtgatttcactccccgggggtgtcccaggctt
 gtccctgtacccccaccagccttctctgaggctcaagcctgccaccaagccccagctccttct
 ccccgaggaccacaacacaggcctcaggactcaacacagcttctccctccaacccccgttttctc
 tccctcaaggactcagcttctgaagcccctcccagttctagttctatcttttctctgcacctgt
 ctggaagttagaaggaacagaccacagacctggtccccaaaagaaatggaggcaataggttttga
 ggggcatggggacgggggttcagcctccagggtcctacacacaaatcagtcagtgggcccagaagacc
 cccctcggaatcggagcaggaggatggggagtgtgagggtatccttgatgcttgtgtgtcccca
 actttccaaatccccgccccgcgatggagaagaaaccgagacagaaggtgcagggccactaccg
 ctccctccagatgagctcatgggttctccaccaaggaagtttccgctggttgaatgattctttc
 cccgccctcctctgcctccaggacatataaaggcagttggtggcacaccagccagcagacgctc
 cctcagcAGATCTATGCAACCAATCCTGCTTCTGCTGGCCTTCTCCTGCTGCCAGGGCAGATGC
 AATCATCGGGGACATGAGGCCAAGCCCCACTCCCGCCCCTACATGGCTTATCTTATGATCTGGGA
 TCAGAAAGTCTCTGAAGAGGTGCGGTGGCTTCTGATACAAGACGACTTCGTGCTGACAGCTGCTCA
 CTGTTGGGGAAGCTCCATAAATGTCACCTTGGGGGCCACAATATCAAAGAACAGGAGCCGACCCA
 GCAGTTTATCCCTGTGAAAAGACCCATCCCCCATCCAGCCTATAATCCTAAGAACTTCTCCAACGA
 CATCATGCTACTGCAGCTGGAGAGAAAGGCCAAGCGGACCAGAGCTGTGCAGCCCCTCAGGCTACC
 TAGCAACAAGGCCCAGGTGAAGCCAGGGCAGACATGCAGTGTGGCCGGCTGGGGGCAGACGGCCCC
 CCTGGGAAAACACTCACACACACTACAAGAGGTGAAGATGACAGTGCAGGAAGATCGAAAGTGCGA
 ATCTGACTTACGCCATTATTACGACAGTACCATTGAGTTGTGCGTGGGGGACCCAGAGATTA AAAA
 GACTTCCTTTAAGGGGGACTCTGGAGGCCCTCTTGTGTGTAACAAGGTGGCCCAGGGGATTGTCTC
 CTATGGACGAAACAATGGCATGCCTCCACGAGCCTGCACCAAAGTCTCAAGCTTTGTACACTGGAT
 AAAGAAAACCATGAAACGCTACTAAGAATTCTCTAGAggaggacgaacatccaaccttcccaaacg
cctcccctgccccaatccctttattaccccctccttcagacaccctcaacctcttctgggtcaaaa
agagaattgggggcttagggtcggaacccaagcttagaactttaagcaacaagaccaccacttcga
aacctgggattcaggaatgtgtggcctgcacagtgaagtgctggcaaccactaagaattcaaactg
ggcctccagaactcactggggcctacagcttctgatccctgacatctggaatctggagaccagggg
gcctttggttctggccagaatgctgcaggacttgagaagacctcacctagaaattgacacaagtgg
accttaggccttctctccagatgtttccagacttcttgagacacggagcccagccctcccca
tggagccagctccctctatttatgtttgcacttgtgattatttattattattattattattta
ttacagatgaatgtatttatttgggagaccgggtatcctgggggacccaatgtaggagctgcct
tggctcagacatgttttccgtgaaaacggagctgaacaataggctgttcccagtagccccctggc
ctctgtgccttcttttgattatgttttttaaataatctctgattaagttgtctaacaatgctg
atgtggtgaccaactgtcactcattgctgagcctctgctcccaggggagttgtgtctgtaatcgc
cctactattcagtgggcagaTCTAGA

Figure 12

Promoter sequence-lowercase, linker sequence-uppercase Italics,
 Granzyme B sequence-uppercase, TNF α 3'UTR sequence -lowercase
 underlined



Chimeric Nucleic Acid (-1005TNF α GB3'UTR)

CTCGAGggcggggggtcagggagctcctgggagatatggccacatgtagcggctctgaggaatgggt
 tacaggagacctctggggagatgtgaccacagcaatgggtaggagaatgtccagggctatggaagt
 cgagtatggggaccccccttaacgaagacagggccatgtagaggcccccagggagtgaaagagcc
 tccaggacctccaggtatggaatacaggggacgtttaagaagatatggccacacactggggccctg
 agaagtgagagcttcatgaaaaaatcagggaccccagagttccttggagccaagactgaaacca
 gcattatgagctctccgggtcagaatgaaagaagaaggcctgccccagtggggtctgtgaattcccg
 ggggtgatttcactccccggggctgtcccaggttgtcctgctacccccaccagcctttcctga
 ggctcaagcctgccaccaagccccagctccttctccccgcagggacccaaacacaggcctcagg
 actcaacacagcttttccctccaaccccgttttctctcctcaaggactcagctttctgaagccc
 tcccagttctagttctatcttttctctgcatcctgtctggaagttagaaggaaacagaccacagac
 ctgggtccccaaaagaaatggaggcaataggttttgaggggcatggggacgggggttcagcctccagg
 gtccataCacacaaatcagtcagtgggcccagaagacccccctcggaatcggagcagggaggatgggg
 agtgtgaggggtatccttgatgcttgtgtgtccccaaactttccaaatccccgcccccgcatggag
 aagaaaccgagacagaaggtgcagggcccactaccgcttctccagatgagctcatgggtttctcc
 accaaggaagttttccgctgggtgaatgattctttccccgcctcctctcgccccagggacatata
 aaggcagttggtggcacaccagccagcagagcctcctcagcAGATCTATGCAACCAATCCTGCT
 TCTGCTGGCCTTCTCCTGCTGCCAGGGCAGATGCAATCATCGGGGACATGAGGCCAAGCCCCA
 CTCCCGCCCTACATGGCTTATCTTATGATCTGGGATCAGAAGTCTCTGAAGAGGTGCGGTGGCTT
 CCTGATACAAGACGACTTCGTGCTGACAGCTGCTCACTGTTGGGGAAGCTCCATAAATGTCACCTT
 GGGGGCCCACAATATCAAAGAACAGGAGCCGACCCAGCAGTTTATCCCTGTGAAAAGACCCATCCC
 CCATCCAGCCTATAATCCTAAGAACTTCTCCAACGACATCATGCTACTGCAGCTGGAGAGAAAGGC
 CAAGCGGACCAGAGCTGTGCAGCCCCCTCAGGCTACCTAGCAACAAGGCCAGGTGAAGCCAGGGCA
 GACATGCAGTGTGGCCGGCTGGGGGCAGACGGCCCCCTGGGAAAACACTCACACACACTACAAGA
 GGTGAAGATGACAGTGCAGGAAGATCGAAAGTGCGAATCTGACTTACGCCATTATTACGACAGTAC
 CATTGAGTTGTGCGTGGGGGACCCAGAGATTA AAAAGACTTCTTTAAGGGGACTCTGGAGGCC
 TCTTGTGTGTAACAAGGTGGCCAGGGCATTGTCTCTATGGACGAAACAATGGCATGCCTCCAG
 AGCCTGCACCAAAGTCTCAAGCTTTGTACACTGGATAAAGAAAACCATGAAACGCTACTAAGAATT
CTCTAGAggaggacgaacatccaaccttcccaaacgcctcccctgcccacatccctttattacccc
ctccttcagacaccctcaacctctctggctcaaaaagagaattgggggcttagggtcggaaccca
agcttagaaccttaagcaacaagaccaccacttcgaaacctgggattcaggaatgtgtggcctgca
cagtgaaagtgctggcaaccactaagaattcaaactggggcctccagaactcactggggcctacagc
tttgatccctgacatctggaatctggagaccagggagcctttggttctggccagaatgctgcagga
cttgagaagacctcacctagaaattgacacaagtggaccttaggccttccctctctccagatgtttc
cagacttccctgagacacggagcccagccctcccctgagaccagctccctctatttatgtttgca
cttgatgattatattattattattattattattattattacagatgaatgtattttatttgggagac
cggggtatcctgggggacccaatgtaggagctgccttggctcagacatgttttccgtgaaaacgga
gctgaacaataggctgttcccatgtagccccctggcctctgtgccttcttttgattatgtttttta
aatattttatctgattaagttgtctaaacaatgctgatttggtgaccaactgtcactcattgctga
gcctctgctccccaggggagttgtgtctgtaatccccctactattcagtgggcgagaTCTAGA

Figure 13

Promoter sequence-lowercase, linker sequence-uppercase Italics, Granzyme B
 sequence-uppercase, TNF α 3'UTR sequence -lowercase underlined