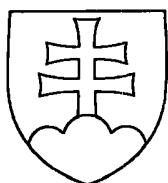


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania prihlášky: **2. 6. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9811836.7
9815035, .2 9819846.8, 9828578.6**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **2. 6. 1998
11. 7. 1998, 12. 9. 1998, 23. 12. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: **GB, GB, GB, GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **6. 11. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/GB99/01722**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO99/62561**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1832-2000

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.7 :

A61K 48/00

(71) Prihlasovateľ: **GLAXO GROUP LIMITED, Greenford, Middlesex, GB;**

(72) Pôvodca: **Braddock Martin, Stevenage, Hertfordshire, GB;
Campbell Callum Jeffrey, Stevenage, Hertfordshire, GB;
Schwachtgen Jean-Luc, Munich, DE;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, Sk;**

(54) Názov: **Použitie molekuly nukleovej kyseliny, farmaceutický prostriedok s jej obsahom a molekula nukleovej kyseliny**

(57) Anotácia:
Použitie polypeptidového transkripčného faktora Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu a molekuly nukleovej kyseliny kódujúcej takéto polypeptidy na výrobu liečiva vhodného na ošetrovanie rán cicavca vrátane človeka. Ďalej je uvedená sekvencia, ktorá pravdepodobne zahŕňa dôležité oblasti, ktoré sa podieľajú na transkripcii faktora Egr-1 u ľudí a na jej regulácii. Tieto sekvencie sa môžu použiť na navrhnutie vhodných molekúl nukleovej kyseliny a vektorov, ktoré je možné použiť na ošetrovanie rán, rovnako ako na inú liečbu.

SK 1832-2000 A3

Použitie molekuly nukleovej kyseliny, farmaceutický prostriedok s jej obsahom a molekula nukleovej kyseliny

Oblasť techniky

Vynález opisuje použitie metód génovej terapie na hojenie rán a pri príbuzných stavoch. Opisuje najmä nové použitie polynukleotidov, ktoré kódujú transkripčný faktor skorej rastovej odozvy-1 (Egr-1), na liečbu rán, hojenie rán a pri príbuzných stavoch, ako napríklad na liečbu kožných vredov, ktoré vznikajú pri ischémii, neuropatie spojenej s cukrovkou, okluzívneho ochorenia periférnych artérií, trombózy hlbokých žíl, chronickej venózne nedostatočnosti a preležanín, na zmenšenie pooperačných jaziev spojených napríklad s kataraktami, pri aplikácii kožných štepov po popáleninách, na liečbu lupienky, na zrýchlenie, remodelovanie a regeneráciu tkaniva, reparáciu tvrdého tkaniva, ako napríklad kostí, reparáciu mäkkého tkaniva, ako napríklad šliach, väzív, svalov, na podporu angiogenézy, obnovenia bunkovej výstelky ciev nasledujúceho po perkutánnej trans-luminálnej koronárnej angioplastike, na inhibíciu ľavej ventrikulárnej hypertrofie srdca, moduláciu kalcifikácie stien ciev a na podporu regenerácie nervov.

Ďalej sa vynález týka inhibície fibrotických stavov, ako napríklad pulmonárnej a pečenej fibrózy, a prevencie plešatosti.

Vynález opisuje transkripciu Egr-1 a jej reguláciu.

Doterajší stav techniky

Hojenie rán predstavuje široký rozsah bunkových, molekulárnych, fyziologických a biochemických dejov. V priebehu procesu hojenia migrujú bunky do miesta rán, kde sa rozmnožujú a syntetizujú sa komponenty extrabunkovej matrice, aby sa obnovilo tkanivo tak, aby bolo veľmi podobné s pôvodným nezraneným tkanivom. Táto aktivita sa reguluje mediátami vylučovanými z buniek, ktoré sa nachádzajú na okrajoch rán. Sú to napríklad rastový faktor získaný z krvných doštičiek (PDGF), epidermálny rastový faktor (EGF), transformačný rastový faktor beta (TGF) a iné cytokíny. Pozitívne účinky týchto činidiel na bunky boli demonštrované tak *in vitro*,

ako aj *in vivo* (opisuje sa v publikácii Moulin a ďalší, J. Cell Biol. 68, 1-7, 1995) a zahŕňajú výhodné aplikácie PDGF na potkaních modeloch cukrovky (opisuje sa v publikácii Brown a ďalší, J. Surg. Res. 56, 562-570, 1994).

V priebehu posledných piatich rokov sa ukázalo, že množstvo faktorov urýchľuje proliferáciu buniek *in vitro* a tak podporuje hojenie rán vo zvieracích modeloch. V kontexte s hojením rán sa najväčšia pozornosť venuje TGF beta, pretože podporuje proliferáciu, diferenciáciu buniek a produkciu matrice. TGF beta, aplikovaný buď povrchovo, alebo systémovo, urýchľuje hojenie kožných rán vo zvieracích modeloch. (Aschcroft a ďalší, Nature Medicine, 3, 1209-1215, 1997, Sporn a Roberts J. Cell Biol. 119, 1017-1021, 1997, Beck a ďalší, J. Clin. Invest. 92, 2841-2849, 1993). Ukázalo sa, že aj PDGF podporuje obnovu epitelu a ciev v ischemic-kých tkanivách a u zvierat s cukrovkou (opisuje sa v publikácii Uhl a ďalší, Lagenbecks Archiv fur Chirurgie-Supplement-Kongressbad 114, 705-708, 1997 a Dirks a Bloemers, Mol. Biol. Reports 22, 1-24, 1996).

Transkripčný faktor Egr-1 je potenciálny regulátor tridsiatich génov a má dôležitú úlohu pri raste, vývoji a diferenciácii (opisuje sa v publikácii Liu a ďalší, Crit Rev. Oncogenesis 7, 101-125, 1996, Khachigian a Collins, Circ. Res. 81, 457-461, 1997). Egr-1 sa vyvolá pri poranení vaskulárneho endotelia (opisuje sa napríklad v publikácii Khachigian a ďalší, Science, 271, 1427-1431, 1996) a cieľom transkripčnej aktivácie je množstvo génov, ktoré zahŕňajú epidermálny rastový faktor (EGF), rastový faktor A získaný z krvných doštičiek (PDF-A), základný fibroblastový rastový faktor (bFGF), indukcia PDGF A, PDGF B, TGF beta, bFGF, aktivátor uro-plazminogénu (u-PA), tkanivový faktor a rastový faktor podobný inzulínu-2 (IGF-2).

Transkripčný komplex, ktorý sprostredkováva vyvolanie vaskulárneho endoteliálneho faktora (VEGF) závisí na AP2, a nie priamo na Egr-1 (publikácia Gille a ďalší, EMBO J. 16, 750-759, 1997). PDGF B priamo znižuje expresiu VEGF (Frinkelzeller, Oncogene 15, 669-676, 1997). Transkripčná mRNA VEGF sa zosilnila množstvom faktorov, ktoré zahŕňajú PDGF B, bFGF, keratinocytový rastový faktor (KGF), EGF, nádorový nekrotický faktor alfa (TNF) a TGF beta1. VEGF podporujú opätovnú tvorbu endotelia pri poranení artérie. Údaje získané v testoch s králikami ukazujú voľným VEGF riadenú pasiváciu stentov ovplyvňujúcich inhibíciu in-

stentných formácií neo-intimy, zníženie výskytu trombotických oklúzií, zrýchlenie obnovenia endotelu pri protézach a zvýšenie vazomotorickej aktivity (opisuje sa v publikácii Van Belle, E. a ďalší, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 235, 311-316, 1997, Van Belle, E. a ďalší, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29, 1371-1379, 1997, Asahara, T., a ďalší, *Circulation*, 94, 3291-3302, 1997). V roku 1996 schválil NIH pilotnú štúdiu skúmajúcu, či VEGF podporuje obnovu endotelu u ľudí. Navyše sa ukázalo, že HGF podporuje aj obnovu endotelu nasledujúcu po angioplastike v potkaňom modeli poranenia krčnej tepny (Nakamura a ďalší, Abstract 1681, American Heart Association Meeting, Dallas, 1998). Na zvieracom modeli sa ukázalo, že pasivácia kovových stentov riadená VEGF inhibuje tvorbu neointimy, zrýchľuje obnovenie endotelu a zvyšuje vazomotorickú aktivitu (Asahara a ďalší, *Circulation*, 94, 3291-3302).

Expresia VEGF sa spája s hojením rán a kože zasiahnutej lupienkou. V oboch prípadoch sú TGF alfa a jeho receptorový ligand EGF (EGFr) pozitívne regulované. Expresia EGF indukuje Egr-1 (opisuje sa v publikácii Iwami a ďalší, *Am. J. Physiol.* 270, H2100-2107, 1996, Fang a ďalší, *Calcified Tissue International* 57, 450-455, 1995, J. *Neuroscience Res.* 36, 58-65, 1993). Existuje dôkaz, že Egr-1 môže aktivovať expresiu vnútrobunkovej adhezívnej molekuly-1 (ICAM-1) v B lymfocytoch stimulovaných forbolesterom (opisuje sa v publikácii Maltzman a ďalší, *Mol. Cell. Biol.* 16, 2283-2294, 1996) a môže aktivovať expresiu TNF alfa prostredníctvom prítomnosti väzobného miesta pre Egr-1 v promótoch TNF alfa (opisuje sa v publikácii Kramer a ďalší, *Biochem. Biophys. Acta* 1219, 413-421, 1994). Nakoniec, myši s vyradeným génom Egr-1 sú sterilné a vykazujú nedostatočnosť luteinizačného hormónu (LH) (opisuje sa v publikácii Lee a ďalší, *Science* 273, 1219-1221, 1996), z čoho vyplýva, že aj promótor LH môže byť cieľom aktivácie Egr-1.

Ukladanie v kostiach, mechanické namáhanie a tok tekutiny v bunkách podobných osteoblastom MC3T3E1 indukuje Egr-1 (opisuje sa v publikácii Dolce a ďalší, *Archs. Oral Biol.* 41, 1101-1118, 1996, Ogata *J. Cell Physiol.* 170, 27-34, 1997) so súčasnou aktiváciou rastových faktorov. V chrupavkách a kostiach vyvíjajúcich sa myši prevláda expresia Egr-1 (opisuje sa v publikácii McMahon a ďalší, *Development* 108, 281-287) a spôsobuje reguláciu rastu a diferenciácie

osteoblastových buniek (opisuje sa v publikácii Chaudhary a ďalší, Mol. Cell. Biochem. 156, 69-77, 1996). Egr-1 a príbuzný transkripčný faktor Wilmového nádoru 1 (WT1) s motívom "zinc finger" sa podieľa na regulácii osteoklastogenézy (opisuje sa v publikácii Kukita a ďalší, Endocrinology 138, 4384-4389, 1997) a prostacyklín E2 (PGE2) a EGF sa indukujú pomocou Egr-1 (opisuje sa v Fang a ďalší, Calcified Tissue International 57, 450-455, 1995, Fang a ďalší, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 54, 109-114, 1996). Vaskulárna kalcifikácia sa aktívne reguluje spôsobom podobným tvorbe kostí, ktorý zahŕňa bunky a faktory známe tým, že sú dôležité pri regulácii kostného metabolizmu (opisuje sa v publikácii Dermer a ďalší, Trends Cardiovasc. Med. 4, 45-49, 1994). Regulátory osteoblastogenézy a/alebo osteoklastogenézy môžu upraviť stupeň kalcifikácie ciev.

Hypertrofné stimuly, ako napríklad hemodynamická dávka a angiotenzín II, sa môžu použiť na riadenie produkcie negatívne dominantného Egr-1, ktorý je riadený promótorom špecifickým pre myocyty a používa sa na liečbu zlyhania srdca.

Egr-1 je podstatný pri expresii receptora P75 nervového rastového faktora (NGF) v Schwannových bunkách (opisuje sa v publikácii Nikam a ďalší, Mol. Cell. Neuroscience 6, 337-348, 1995). NGF vyvoláva expresiu Egr-1 so sprievodnou aktiváciou rastových faktorov (opisuje sa v publikácii Kendall a ďalší, Brain Research. Molecular Brain Research. 25, 73-79, 1994, Kujubu a ďalší, Journal of Neuroscience Research 36, 58-65, 1993).

Zistilo sa, že aplikácia polynukleotidu kódujúceho transkripčný faktor Egr-1 v mieste rany a jeho následná expresia podporuje zrýchlené hojenie.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je použitie molekuly nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologickyaktívny fragment, na výrobu liečiva na ošetrovanie rán cicavcov, vrátane človeka.

Aby sa predišlo omylu, zodpovedá termín "polynukleotid" ľubovoľnému odkazu na molekulu nukleovej kyseliny.

Vynález ďalej opisuje spôsob liečby rán cicavcov, vrátane človeka. Tento spôsob zahŕňa aplikáciu molekuly nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologickyaktívny fragment, na cicavca.

Vynález ďalej opisuje molekulu nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologickyaktívny fragment, ktorú je možné použiť na hojenie rán.

Vynález ďalej opisuje farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje molekulu nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu Egr-1 alebo jej biologickyaktívny fragment, spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi.

Vynález ďalej opisuje terapeutické použitie polynukleotidov kódujúcich transkripčný faktor Egr-1 na liečbu rán. Vynález ďalej opisuje terapeutické použitie samotného transkripčného faktora Egr-1 na liečbu rán, ako sa opisuje ďalej v texte.

Vynález ďalej opisuje použitie polypeptidov Egr-1 a sekvencií nukleových kyselín kódujúcich Egr-1 ľubovoľného pôvodu alebo typu. Proteínové sekvencie sú medzi druhmi vysoko konzervatívne. Napríklad u potkana a myši vykazujú sekvencie 98% homológiu. Je známa sekvencia DNA myšieho Egr-1 (opisuje sa v publikácii Cell, 53, 37-43, (1998)). Dedukovaná aminokyselinová sekvencia vykazuje dlhý otvorený čítací rámec so stop kodónom ((TAA) v polohe 1858). Z dedukovanej aminokyselinovej sekvencie sa dá predpokladať polypeptid obsahujúci 533 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 56596. Zodpovedajúce sekvencie sa z každého druhu môžu získať spôsobmi, ktoré sú v odbore známe, napríklad skríningom genómovej knižnice alebo cDNA knižnice, kedy sa ako sondy použijú oligonukleotidové sekvencie založené na alebo odvodené od sekvencie myšieho Egr-1. Je známe, že cDNA ľudského Egr-1 sa opisuje v publikácii Nucleic Acids Research 18, str. 4283, 1990. Podobnosť medzi myšiacou a ľudskou sekvenciou je 87 % na úrovni nukleozidov a 94 % na úrovni proteínov.

Referencie na tu opísané polypeptidy Egr-1 a polynukleotidy je možné všeobecne aplikovať na sekvencie ľubovoľného pôvodu, ktoré zahŕňajú myšiaciu Egr-1 DNA a zodpovedajúce aminokyselinové sekvencie, ako sa opisuje v publikácii Cell, 53, 37-43 (1988) a ľudské sekvencie uvedené v publikácii Nucleic Acids

Research 18, str. 4283, 1990 a sekvencie iných druhov. Ako sa opisuje vyššie v texte, zahŕňa výraz Egr-1 aj varianty, fragmenty a analógy Egr-1. Najviac sa preferuje použitie ľudskej sekvencie.

Výraz "liečba rán" zahŕňa liečbu stavov spojených s poranením, hojenie rán a liečbu príbuzných stavov a terapiu, ktorá podporuje, zvyšuje alebo urýchľuje hojenie tkaniva a zahŕňa liečbu vredov vytvorených v súvislosti s cukrovkou a okluzívnym ochorením periférnych artérií, liečbu pooperačných jaziev, popálenín, lupienky, urýchlenie remodelovania tkaniva a korekcie kostí a podporu angiogenézy, opätovnej tvorby endotelu nasledujúcej po perkutánnej trans-luminárnej koronárnej angioplastike, inhibíciu ľavej ventrikulárnej kardiálnej hypertrofie, úpravu kalcifikácie stien ciev a podporu neuroregenerácie. Ďalej tento výraz zahŕňa inhibíciu fibrotických stavov, ako sú napríklad pľúcna a pečeneňová fibróza, a prevenciu alopecie.

Výraz "biologicky aktívny fragment" Egr-1 znamená fragment, ktorý vykazuje aktivitu Egr-1, ktorá zahŕňa horenie rán podľa vynálezu.

Výraz "genetické elementy" znamená polynukleotidy obsahujúce oblasť, ktorá kóduje polypeptid alebo oblasť polynukleotidu, ktorá reguluje replikáciu, transkripciu alebo transláciu alebo iné procesy, ktoré sú dôležité pre expresiu polypeptidu v hostiteľskej bunke, alebo polynukleotid obsahujúci tak oblasť kódujúcu polypeptid, ako aj operatívne pripojenú oblasť, ktorá reguluje expresiu. Genetické elementy sa môžu nachádzať vo vektore, ktorý sa replikuje ako epizomálny element. To znamená, že existuje ako molekula, ktorá je fyzicky nezávislá na genóme hostiteľskej bunky. Tieto molekuly sa môžu nachádzať v plazmidoch. Genetické elementy sa môžu vyskytovať aj v genóme hostiteľskej bunky, avšak nie v jej prirodzenom štádiu. Potom nasleduje manipulácia, ako izolácia, klonovanie a zavedenie do hostiteľskej bunky vo forme purifikovanej DNA alebo vo vektore.

Výraz "hostiteľská bunka" znamená bunku, ktorá bola transformovaná alebo transfekovaná, alebo je možné ju transformovať alebo transfekovať exogénnou polynukleotidovou sekvenciou.

Výraz "zhoda" znamená vzťah medzi dvoma a viacerými polypeptidovými sekvenciami alebo dvoma a viacerými polynukleotidovými sekvenciami, ako sa definuje porovnaním sekvencií. Tento výraz znamená aj porovnanie stupňa

príbuznosti sekvencie medzi polypeptidovými alebo polynukleotidovými sekvenciami, ako príklad sa môže uviesť párovanie medzi vláknami takýchto sekvencií. Zhodu je možné ľahko vypočítať (opisuje sa v publikácii Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. vyd., Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., Vyd., Academic Press, New York, 1993, Computer Analysis of Sequence Data, Partl, Griffin, A.M. a Griffin, H.G., vyd., Humana Press, New Jersey, 1994, Sequence Analysis in Molecular Biology, Von Heinje, G. Academic Press, 1987, a Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. a Devereux, J. vyd., M. Stockton Press, New York, 1991). Zatiaľ čo existuje množstvo metód, ktoré stanovujú mieru zhody medzi dvoma polynukleotidovými alebo polypeptidovými sekvenciami, je tento termín veľmi dobre známy v odbore (opisuje sa v publikácii Sequence Analysis in Molecular Biology, Von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. a Devereux, J., vyd., M. Stockton Press, New York, 1991 a Carillo, H., a Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)). Metódy, ktoré sa bežne používajú na stanovenie zhody medzi sekvenciami zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na tie, ktoré sú opísané v publikácii Carillo, H., a Lipman, D., Siam J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Výhodné spôsoby stanovenia zhody sa navrhli tak, aby vznikol maximálny počet párov medzi testovanými sekvenciami. Spôsoby na stanovenie zhody sa kodifikujú počítačovým programom. Výhodné počítačové metódy vhodné na stanovenie zhody medzi dvoma sekvenciami zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na program GCG (opisuje sa v publikácii Devereux, J., a ďalší, Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTIN a FASTA (Atschul, S.F. a ďalší, J. Molec. Biol. 215: 403 (1990)).

Výraz "izolovaná" znamená zmenená "človekom" oproti svojmu prirodzenému štádiu. To znamená, že ak sa vyskytuje v prírode, odstráni sa zo svojho prirodzeného prostredia alebo sa jej prirodzené prostredie zmení alebo oboje. Napríklad, prirodzene sa vyskytujúci polynukleotid alebo polypeptid, ktorý sa nachádza v živom organizme v svojom prirodzenom štádiu sa nepovažuje za "izolovaný", ale rovnaký polynukleotid alebo polypeptid oddelený od existujúceho materiálu jeho prirodzeného štádia sa nazýva izolovaný. Ako súčasť procesu izolácie alebo po izolácii sa takéto polynukleotidy môžu spojiť s inými

polynukleotidmi, ako je DNA, za účelom mutagenézy, čím vzniká fúzovaný proteín, a za účelom propagácie alebo expresie v hostiteľovi. Izolované polynukleotidy samotné alebo spojené s inými poly-nukleotidovými sekvenciami, napríklad vo forme vektorov, sa môžu zaviesť do hostiteľských buniek, do bunkovej kultúry alebo do celých organizmov. Ak sa DNA zavedie do hostiteľskej bunky v kultúre alebo v celom organizme, je takáto DNA stále izolovaná, pretože sa nevyskytuje vo svojej prirodzenej forme alebo vo svojom prirodzenom prostredí. Ostáva izolovaným polynukleotidom alebo polypeptidom v tu vysvetlenom význame.

Výraz "polynukleotidy" znamená vo všeobecnom prípade ľubovoľný polyribonukleotid alebo polydeoxyribonukleotid, ktorý môže predstavovať neupravenú RNA alebo DNA alebo upravenú RNA alebo cDNA. Tak napríklad medzi polynukleotidy patrí okrem iných jednoreťazcová a dvojreťazcová DNA, DNA, ktorá je zmesou jednoreťazcových a dvojreťazcových oblastí, alebo jednoreťazcových, dvojreťazcových a trojreťazcových oblastí, jednoreťazcové a dvojreťazcové RNA a RNA, ktorá je zmesou jednoreťazcových a dvojreťazcových oblastí, hybridné molekuly obsahujúce DNA a RNA, ktoré môžu byť jednoreťazcové, typicky dvojreťazcové a trojreťazcové alebo sa môžu vyskytovať vo forme zmesi jednoreťazcových a dvojreťazcových oblastí. Okrem toho tu polynukleotid znamená trojreťazcové oblasti obsahujúce RNA a DNA alebo aj DNA aj RNA. Reťazce takýchto oblastí môžu pochádzať z rovnakej molekuly alebo z rôznych molekúl. Oblasti môžu zahŕňať celé molekuly, ale v typickom prípade zahŕňajú len oblasť niektorej z molekúl. Jednou z oblastí trojzávitnice je často oligonukleotid. Výraz polynukleotid zahŕňa DNA alebo RNA, ako je opísané vyššie v texte, ktorá obsahuje jednu alebo viac upravených báz. DNA alebo RNA s kostrou upravenou tak, aby bola stabilnejšia, alebo spĺňala iné kritériá, sú "polynukleotidy" v zmysle tu uvedeného výrazu. DNA alebo RNA obsahujúce neobvyklé bázy, ako je inozín, alebo upravené bázy, ako je tritylovaná báza, sú polynukleotidy v zmysle tu uvedeného výrazu. Je výhodné, aby sa uskutočnilo veľké množstvo úprav DNA a RNA, ktoré potom môžu slúžiť na mnoho rôznych účelov, ktoré sú v odbore dobre známe. Výraz "polynukleotid" znamená chemicky, enzymaticky alebo metabolicky upravené formy polynukleotidov, rovnako ako chemické formy DNA alebo RNA charakteristických vírusov a buniek, ktoré

zahŕňajú jednotlivé bunky alebo ich komplexy. Polynukleotidy znamenajú krátke polynukleotidy, ktoré sa tu označujú ako oligonukleotidy.

Výraz "polypeptidy" zahŕňa všetky polypeptidy, ako sú opísané ďalej v texte. Základná štruktúra polypeptidov je dobre známa a opisuje sa v mnohých učebniciach a v iných publikáciách. Tu používaný výraz znamená ľubovoľný peptid alebo proteín obsahujúci dve alebo viacero aminokyselín vzájomne spojených do lineárneho reťazca peptidovými väzbami. Tento termín zahŕňa krátke reťazce, ktoré sa v odbore bežne nazývajú peptidy, oligopeptidy a oligoméry, a dlhšie reťazce, ktoré sa vo všeobecnom prípade nazývajú proteíny, a ktorých existuje veľa druhov. Je vhodné, aby polypeptidy obsahovali aj iné aminokyseliny ako je 20 prirodzene sa vyskytujúcich aminokyselín. Tieto aminokyseliny, vrátane terminálnych aminokyselín, sa môžu v danom polypeptide upravovať buď prirodzenými spôsobmi, ako sú post-translačné úpravy, alebo aj spôsobmi chemickej modifikácie, ktoré sú v odbore dobre známe. Dokonca bežných modifikácií, ktoré sa vyskytujú prirodzene v modifikáciách, je toľko, že ich zoznam tu nemôže byť uvedený. Tieto modifikácie sa však veľmi jasne opisujú v základných učebniciach a podrobne v monografiách, ako aj vo vedeckej literatúre a sú v odbore dobre známe.

Medzi známe modifikácie polypeptidov je možné zaradiť niekoľko ilustratívnych príkladov. Je to acetylácia, acylácia, ADP-ribozylácia, amidácia, kovalentné pripojenie flavínu, kovalentné pripojenie hemočastí, kovalentné pripojenie nukleotidu alebo nukleotidového derivátu, kovalentné pripojenie lipidu alebo lipidového derivátu, kovalentné pripojenie fosfotidylinozitolu, sieťovanie, vytvorenie cyklu, vytvorenie disulfidovej väzby, demetylácia, vytvorenie kovalentného zosietenia, vytvorenie cystínu, vytvorenie proglutamátu, formylácia, gamma-karboxylácia, glykozylácia, vytvorenie kotvy GPI, hydroxylácia, jodizácia, metylácia, myristoylácia, oxidácia, proteolytické spracovanie fosforylácia, prenylácia, racemizácia, selenoylácia, sulfatácia, prenos RNA sprostredkovaný adíciou aminokyselín na proteíny, ako je arginylácia a ubikvitinácia. Taktéto modifikácie sú dobre známe v odbore a opisujú sa v odbornej literatúre. Niekoľko zvlášť bežných modifikácií, glykozylácia, pripojenie lipidu, sulfatácia, gamma-karboxylácia zvyškov kyseliny glutámovej a ADP-ribozylácia, sa opisujú napríklad v publikácii *Proteins-structure and molecular properties*, 2. vyd., T.E. Creighton, W.H.

Freeman and Company, New York (1993), v publikácii Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, str. 1-12 v Postranslational covalent modification of proteins, B.C. Johnson, Vyd., Academic Press, New York (1983), Seifter a ďalší, Math. Enzymol. 182: 626-646 (1990) a Ratten a ďalší, Protein Synthesis: Posttranslational modifications and aging, Ann. N.Y. Aca. Sci. 663: 48-62 (1992). Je vhodné, aby polypeptidy boli vždy celé lineárne. Polypeptidy môžu byť vo všeobecnom prípade výsledkom posttranslačného spracovania, ktoré zahŕňa prirodzené spracovanie alebo manipuláciu človekom, ku ktorej prirodzene nedochádza. Cyklické, vetvené a vetvené cyklické polypeptidy sa môžu syntetizovať netranslačným prirodzeným procesom a úplne syntetickým procesom. Modifikácie sa môžu vyskytovať na ľubovoľnom mieste polypeptidu, vrátane peptidovej kostry, aminokyselinového bočného reťazca a N- alebo C-konca. V skutočnosti je blokovanie aminoskupiny alebo karboxylovej skupiny v polypeptide alebo zablokovanie oboch uvedených skupín kovalentnou modifikáciou bežné v prirodzene sa vyskytujúcich a syntetických polypeptidoch, a takéto modifikácie sa môžu vyskytovať v polypeptidoch podľa vynálezu. Napríklad zvyšok N-konca polypeptidov pripravených v *E. coli* alebo v iných bunkách bude, než dôjde k proteolytickému spracovaniu, skoro bez výnimky N-formylmetionín. V priebehu posttranslačnej modifikácie peptidu sa môže deletovať metionínový zvyšok na NH₂-konci. Vynález predpokladá použitie variantov proteínu podľa vynálezu, ktoré na konci obsahujú alebo neobsahujú metionín. Modifikácie polypeptidu často fungujú tak, ako sa uskutočnili. V prípade polypeptidov pripravených expresiou klonovaného génu v hostiteľovi, bude podstata a rozsah modifikácií z veľkej časti determinovaná posttranslačnou modifikačnou kapacitou hostiteľskej bunky a modifikačnými signálmi nachádzajúcimi sa v aminokyselinovej sekvencii polypeptidu. Je napríklad známe, že ku glykozylácii často nedochádza v bakteriálnych hostiteľoch, ako je napríklad *E. coli*. V prípade, že je nutná glykozylácia, polypeptid sa môže exprimovať v hostiteľovi, v ktorom glykozylácia prebieha, vo všeobecnom prípade v eukaryotickej bunke. V hmyzích bunkách často dochádza k posttranslačnej glykozylácii ako v cicavčích bunkách a z toho dôvodu sa vyvinuly expresné systémy pre hmyzie bunky, aby sa mohli účinne exprimovať cicavčie proteíny, ktoré majú prirodzené vzory glykozylácie. Podobný postup sa môže zvažovať aj pri iných

modifikáciách. Je vhodné, aby bol rovnaký typ modifikácie prítomný v rovnakom alebo v kolísavom stupni na niekoľkých miestach daného polypeptidu. Daný polypeptid môže obsahovať rôzne typy úprav. Vo všeobecnom prípade zahŕňa výraz polypeptid všetky takéto modifikácie, najmä tie, ktoré sa nachádzajú v polypeptidoch syntetizovaných rekombinantnou expresiou poly-nukleotidu v hostiteľskej bunke.

Výraz "varianty" polynukleotidov alebo polypeptidov zahŕňa polynukleotidy alebo polypeptidy, ktoré sa líšia od referenčného polynukleotidu alebo polypeptidu. Takéto varianty sa opisujú ďalej v texte. (1) Polynukleotid, ktorý sa líši svojou nukleotidovou sekvenciou od iných polynukleotidov, sa nazýva referenčný polynukleotid. Vo všeobecnom prípade sa rozdiely definujú tak, že referenčná nukleotidová sekvencia a variant si sú navzájom podobné a veľa oblastí je rovnakých. Ako sa uvádza ďalej v texte, zmeny v nukleotidovej sekvencii variantov sú tiché. To znamená, že sa nemenia aminokyseliny kódované polynukleotidom. V prípade, že sú zmeny obmedzené na tiché zmeny tohoto typu, kóduje variant polynukleotidu polypeptid s rovnakou aminokyselinovou sekvenciou ako referenčný polynukleotid. Ako sa opisuje aj ďalej v texte, môžu zmeny v nukleotidovej sekvencii zmeniť aminokyselinovú sekvenciu polypeptidu kódovaného referenčným poly-nukleotidom. Takéto zmeny nukleotidov môžu viesť k substitúciám, adíciám, deléciám, fúziám a skráteniu aminokyselín v polypeptide kódovanom referenčnou sekvenciou, ako je opísané ďalej v texte. (2) Polypeptid, ktorý sa líši aminokyselinovou sekvenciou od iného, takzvaného referenčného polypeptidu. Vo všeobecnom prípade sa rozdiely definujú tak, že referenčná sekvencia a variant si sú podobné a v mnohých oblastiach zhodné. Variant a referenčný polypeptid sa môžu líšiť aminokyselinovou sekvenciou a to jednou alebo viacerými substitúciami, adíciami, deléciami, fúziami a skráteniami, ktoré sa môžu vyskytovať aj v ľubovoľnej kombinácii.

Výraz "liečba/terapia" zahŕňa režim, ktorý je vhodný pre človeka alebo zviera. Liečba môže prebiehať s ohľadom na existujúce stavy alebo môže byť profylaktickou liečbou (preventívnou liečbou).

Výraz "obsahujúci" zahŕňa všetko, čo vykazuje špecifikovaný znak/charakteristiku, ale aj čokoľvek, čo má jeden alebo viac ďalších znakov/charakteristík. V

prípade sekvencie nukleovej kyseliny/proteínu obsahujúcich danú sekvenciu je samotná sekvencia pokrytá dlhšou sekvenciou.

Výraz "homológ" zahŕňa ľubovoľný variant špecifikovanej biologickej molekuly, ktorý vykazuje jednu alebo viac biologických aktivít molekuly.

Vynález opisuje terapeutické použitie molekúl nukleových kyselín obsahujúcich sekvenciu, ktorá kóduje polypeptid Egr-1. Vynález opisuje aj terapeutické použitie fragmentov uvedenej polynukleotidovej sekvencie, ktorá kóduje biologicky aktívne fragmenty Egr-1 alebo varianty polynukleotidovej sekvencie, ktoré následkom genetického kódu kódujú funkčné, to znamená biologicky aktívne, fragmenty Egr-1 a funkčne ekvivalentné alelické varianty a príbuzné sekvencie modifikované adíciou, substitúciou a/alebo deléciou jedinej alebo viacerých báz, ktoré kódujú polypeptidy majúce aktivitu Egr-1.

Tieto polypeptidy je možné získať štandardným postupom klonovania, ktorý je v odbore dobre známy.

Polynukleotidy kódujúce transkripčný faktor Egr-1 sa môžu vyskytovať vo forme DNA, cDNA alebo RNA tak, že mRNA sa získa klonovaním alebo sa vyprodukuje spôsobom chemickej syntézy. DNA je jednoreťazcová alebo dvojureťazcová. Jednoreťazcová DNA môže byť kódujúci alebo antikódujúci DNA-reťazec alebo to môže byť nekódujúci alebo kódujúci DNA-reťazec. V prípade terapeutického použitia je polynukleotid vo forme schopnej exprimovať funkčný transkripčný faktor Egr-1 v mieste rany liečeného jedinca. Polynukleotidy sa môžu používať aj na *in vitro* produkciu polypeptidu Egr-1 vhodného na ďalšiu terapeutickú aplikáciu, ako sa opisuje ďalej v texte.

Polynukleotidy podľa vynálezu, ktoré kódujú polypeptid transkripčného faktora Egr-1, môžu zahŕňať, ale nie sú obmedzené na kódujúcu sekvenciu polypeptidu Egr-1 alebo jej biologickyaktívnych fragmentov. Polynukleotid sa môže pripraviť spolu s ďalšími kódujúcimi sekvenciami, ktoré zahŕňajú napríklad nekódujúce sekvencie 5' a 3', ako sú prepisované neprekladané sekvencie, ktoré sa zúčastňujú na transkripcii (vrátane napríklad terminačných signálov), naviazania na ribozóm, elementy stability mRNA a ďalšie kódujúce sekvencie, ktoré kódujú ďalšie aminokyseliny, ako sú aminokyseliny vykazujúce ďalšie funkcie. Polynukleotidy

podľa vynálezu zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na polynukleotidy obsahujúce štruktúrálly gén Egr-1 a jeho prirodzene pripojené genetické elementy.

Výraz "polynukleotid kódujúci polypeptid" opisuje polynukleotidy, ktoré zahŕňajú sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1. Výraz opisuje polynukleotidy, ktoré zahŕňajú jedinu kontinuálnu oblasť alebo nekontinuálne oblasti kódujúce polypeptid (napríklad prerušené začleneným fágom alebo začlenenou sekvenciou) spolu s ďalšími oblasťami, ktoré môžu obsahovať aj kódujúce a/alebo nekódujúce sekvencie.

Vynález ďalej opisuje varianty vyššie opísaných polynukleotidov, ktoré kódujú fragmenty, analógy a deriváty polypeptidu. Variant polynukleotidu môže zahŕňať prirodzene sa vyskytujúci variant alebo to môže byť variant, ktorý sa nevyskytuje prirodzene. Takéto neprirodzene sa vyskytujúce varianty polynukleotidov môžu byť vyrobené metódami mutagenézy, ktoré zahŕňajú tie metódy, ktoré sa aplikujú na polynukleotidy, bunky a organizmy.

Medzi tieto varianty patria varianty, ktoré sa líšia od vyššie zmieňovaných polynukleotidov substitúciou, deléciou alebo adíciou nukleotidov. Substitúcie, delécie alebo adície môžu zahŕňať jeden alebo viacero nukleotidov. Varianty sa môžu meniť v kódujúcich alebo v nekódujúcich oblastiach alebo v oboch oblastiach. Zmeny v kódujúcich oblastiach môžu produkovať konzervatívne alebo nekonzervatívne aminokyselinové substitúcie, delécie alebo adície.

Ďalej sú výhodným uskutočňovaním vynálezu polynukleotidy, ktoré vykazujú aspoň 70% zhodu v celej dĺžke s polynukleotidom kódujúcim polypeptid, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu uvedenú v publikácii Cell 53 37-43 (1988) (myšacia sekvencia), viac sa uprednostňuje aspoň 70% zhoda v celej dĺžke s polynukleotidom kódujúcim sekvenciu ľudskej cDNA a ich komplementárnymi polynukleotidmi (ľudská sekvencia) (opisuje sa v publikácii Nucleic Acids Research 18 4283, 1990) a s polynukleotidmi, ktoré sú komplementárne s takýmito polynukleotidmi. V inom prípade sú najviac preferované polynukleotidy, ktoré obsahujú oblasť, ktorá vyказuje aspoň 80% zhodu v celej dĺžke s polynukleotidom kódujúcim polypeptid podľa vynálezu. Čo sa týka polynukleotidov, výhodná je najmenej 90% zhoda v celej dĺžke.

Výhodné sú polynukleotidy, ktoré kódujú polypeptidy, ktoré si uchovávajú v podstate rovnakú biologickú funkciu alebo aktivitu, ako zrelý polypeptid Egr-1 kódovalý sekvenciou myšacej DNA (opísanou v publikácii Cell 53, 37-43 (1988)). Výhodnejšie je, aj je polypeptid kódovalý ľudskou sekvenciou opísanou v publikácii Nucleic Acids Research 18, 4283, 1990.

Vynález ďalej opisuje polynukleotidy hybridizujúce s vyššie opísanými sekvenciami. Vynález ďalej opisuje polynukleotidy, ktoré hybridizujú v prísnych podmienkach s vyššie opísanými polynukleotidmi. Výraz "prísne podmienky" znamená, že k hybridizácii dôjde, aj sekvencie vykazujú najmenej 95% a výhodne 97% zhodu. Je výhodné, aby sekvencie, ktoré hybridizujú uvedeným spôsobom so sekvenciou podľa vynálezu, kódovali polypeptid, ktorý vykazuje biologickú aktivitu Egr-1.

Polynukleotidy môžu kódovať polypeptid, ktorým je zrelý proteín plus ďalšie aminokyseliny N- a C-konca. Takéto ďalšie sekvencie sa môžu podieľať napríklad na predlžovaní alebo skracovaní polčasu rozpadu proteínu a umožňujú manipuláciu proteínu vhodného na testovanie alebo produkciu. Vo všeobecnom prípade sa môžu *in vivo* získať ďalšie aminokyseliny zo zrelého proteínu pomocou bunkových enzýmov.

Polynukleotidy vhodné na použitie v génovej terapii podľa vynálezu sa môžu pripraviť samotné, alebo ako súčasť vektora, ako napríklad expresného vektora, ktoré sú v odbore známe.

Polynukleotid kódujúci Egr-1 sa môže použiť terapeuticky v spôsobe podľa vynálezu spôsobom génovej terapie, pri ktorom sa polynukleotid aplikuje do rany alebo do iných tkanív, ktoré je nutné liečiť, vo forme, ktorá je schopná riadiť produkciu Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu *in situ*. Verí sa, že Egr-1 podporuje hojenie rán aktiváciou génov, ktoré sa podieľajú na hojení rán, ako sú gény kódujúce VEGF, PDGF, EGF, TGF beta, základný rastový faktor fibroblastov, UPA a tkanivový faktor.

Pri génovej terapii sa polynukleotid exprimujúci sa v jedincovi prednostne aplikuje tak, že sa aplikuje vo forme rekombinantnej molekuly DNA obsahujúcej polynukleotid kódujúci Egr-1 operatívne spojený so sekvenciou nukleovej kyseliny, ktorá riadi expresiu, ako je napríklad expresia vektora. Taký vektor bude potom

zahŕňať vhodné transkripčné riadiace signály, ktoré zahŕňajú oblasť promótoru schopného exprimovať kódujúcu oblasť, pričom uvedený promótor je operatívne spojený s liečeným subjektom. V prípade génovej terapie aplikovanej u ľudí výraz nezahŕňa len sekvenciu nevyhnutnú na nasmerovanie RNA polymerázy na miesto začiatku transkripcie, ale aj, ak je to vhodné, operačné a riadiace sekvencie, ktoré zahŕňajú zosilovač, ľudskú promótorovú sekvenciu z ľudského génu alebo z génu, ktorý sa v typickom prípade exprimuje u ľudí, ako je promótor z ľudského cytomegalovírusu (CMV). Medzi známe vhodné eukaryotické promótory patrí stredne skorý promótor, promótor tymidínkinázy HSV, skorý a neskorý promótor SV40, promótory retrovírusového LTR, ako napríklad vírusu Rousového sarkómu (RSV) a metalotioneínový promótor, ako napríklad myši metalotioneínový promótor I.

Ako je diskutované nižšie v texte, môže sa použiť prirodzený promótor Egr-1. Zistilo sa, že publikovaná sekvencia uvedená v prípade ľudského promótoru Egr-1 nie je správna a publikovala sa nová sekvencia s rôznymi rozdielmi v porovnaní s uvedenou publikovanou sekvenciou.

Polynukleotidová sekvencia a sekvencia riadiaca transkripciu sa môžu klonovať do replikovateľného plazmidového vektora založeného na bežne dostupných plazmidoch, ako je pBR322, alebo sa môžu skonštruovať z dostupných plazmidov dobre známym publikovaným postupom.

Vektor môže zahŕňať signály riadiace transkripciu, umiestnené na 3' konci sekvencie kódujúcej Egr-1 a aj polyadenylačné signály, ktoré sú rozoznateľné v liečenom subjekte. Ako sú napríklad zodpovedajúce sekvencie z vírusov. V prípade liečby človeka sa môže použiť napríklad vírus SV40. V odbore sú ďalej dobre známe ďalšie sekvencie riadiace transkripciu a tieto sekvencie sa tiež môžu použiť.

Expresné vektory môžu zahŕňať aj selektovateľné markery, ako je rezistencia na antibiotiká, ktoré umožňujú šírenie vektorov.

Expresné vektory schopné *in situ* syntetizovať Egr-1 sa môžu zaviesť do miesta poranenia priamo, fyzikálnymi metódami. Príklady tohoto postupu zahŕňajú povrchovú aplikáciu nahej vektorovej nukleovej kyseliny vo vhodnom prostriedku, napríklad v roztoku, vo farmaceuticky prijateľnom excipiente, ako napríklad fyziologickom roztoku tlmenom fosforečnanom, alebo aplikáciu vektora fyzikálnymi metódami, ako je bombardovanie časticami opísané v patente US-5371015, kedy

sú inertné častice, ako sú zlaté častice, pokryté vektorom, dostatočne urýchlené, aby prešli povrchom v mieste poranenia, napríklad bunkami kože, pomocou vystrelenia zo zariadenia za vysokého tlaku (vynález opisuje aj častice pokryté molekulami nukleovej kyseliny podľa vynálezu a zariadenie obsahujúce takéto častice).

Ďalšie fyzikálne metódy aplikácie DNA priamo do recipienta zahŕňajú ultrazvuk, elektrickú stimuláciu, elektroporáciu a mikrovýsev.

Výhodné je najmä zavedenie mikrovýsevom, čo je systém na zavedenie genetického materiálu do buniek pacienta. Spôsob sa opisuje v US patente č. 5697901.

Sekvencie nukleovej kyseliny kódujúce Egr-1 vhodné na použitie na terapiu podľa vynálezu sa môžu zaviesť aj pomocou zavedenia vektorov. Tieto vektory zahŕňajú vírusové vektory, ako sú adenovírusové alebo retrovírusové zavádzacie vektory, ktoré sú v odbore dobre známe.

Iné, nevírusové, zavádzacie vektory zahŕňajú lipidové zavádzacie vektory zahŕňajúce lipidové zavádzacie vehikulá, ktoré sú v odbore dobre známe.

Sekvencie nukleovej kyseliny kódujúce Egr-1 sa môžu aplikovať na miesto poranenia aj pomocou transformovaných hostiteľských buniek. Takéto bunky zahŕňajú bunky získané zo subjektu, do ktorého sa zaviedla sekvencia nukleovej kyseliny metódami transferu génov, ktoré sú v odbore dobre známe. Potom nasleduje kultivácia transformovaných buniek a zavedenie štepu do subjektu.

Expresné konštrukcie, ako sa opisujú vyššie v texte, sa môžu použiť aj v rôznych spôsoboch terapie podľa vynálezu. Môžu sa priamo zaviesť do miesta poranenia subjektu alebo sa môžu použiť aj na prípravu samotného rekombinantného transkripčného faktora Egr-1, ktorý sa môže aplikovať na miesto poranenia. Vynález ďalej opisuje hostiteľské bunky, ktoré sa geneticky manipulujú konštruktami, ktoré obsahujú polynukleotid Egr-1 alebo polynukleotidy podľa vynálezu alebo genetické elementy definované vyššie v texte. Ďalej vynález opisuje použitie uvedených vektorov a buniek pri terapeutických metódach podľa vynálezu. Tieto konštrukty sa môžu použiť pri terapeutických spôsoboch podľa vynálezu alebo sa môžu použiť na prípravu polypeptidu Egr-1.

Vektorom môže byť napríklad plazmidový vektor, jednoreťazcový alebo dvojreťazcový fágový vektor, jednoreťazcový alebo dvojreťazcový RNA alebo DNA vírusový vektor, čo závisí na skutočnosti, či sa vektor aplikuje priamo do miesta poranenia (to je napríklad v prípade syntézy *in situ* v prípade Egr-1) alebo je možné použiť syntézu rekombinantného Egr-1. Tu opísané počiatočné plazmidy sú verejne dostupné a môžu sa skonštruovať z dostupných plazmidov bežnou aplikáciou dobre známeho publikovaného postupu. Množstvo plazmidov a iné klonovacie a expresné vektory, ktoré je možné použiť podľa vynálezu, sú dobre známe a jednoducho dostupné.

Vo všeobecnom prípade vektory vhodné na expresiu polypeptidu Egr-1 na použitie podľa vynálezu obsahujú *cis*-pôsobiace kontrolné oblasti, ktoré sú účinné pri expresii v hostiteľovi, ktoré sú operatívne spojené s exprimovaným polynukleotidom. Vhodné *trans*-pôsobiace faktory poskytuje buď hostiteľ, alebo doplnkový vektor, alebo samotný vektor po zavedení do hostiteľa.

V istom uskutočnení vynálezu sa používajú vektory vhodné na expresiu. V prípade produkcie rekombinantného Egr-1 môže byť takou špecifickou expresiou indukateľná expresia alebo expresia len v iných typoch buniek alebo to môže byť indukateľná a bunkovo špecifická expresia. Z indukateľných vektorov sú výhodné najmä vektory, pri ktorých je možné indukovať expresiu faktormi prostredia, ktoré je možné jednoducho ovplyvniť. Sú to napríklad teplota a nutričné doplnky. Rôzne vektory vhodné na použitie podľa vynálezu zahŕňajú konštitutívne a indukateľné expresné vektory použiteľné v prokaryotických a eukaryotických hostiteľoch.

Na expresiu Egr-1 na použitie podľa vynálezu sa môže použiť veľké množstvo expresných vektorov. Takéto vektory okrem iných zahŕňajú chromozomálne, epizomálne vektory a vektory odvodené od vírusov. Sú to napríklad vektory získané z bakteriálnych plazmidov, z bakteriofágov, z transpozónov, z kvasinkových epizómov, z inzerčných elementov, z kvasinkových chromozomálnych elementov, z vírusov ako sú bakulovírusy, papova vírusy, ako je napríklad SV40, vírusov vakcínie, adenovírusov, vírusu kiahní, vírusu besnoty a retrovírusov a vektory získané z ich kombinácií, ako sú napríklad vektory odvodené od plazmidu, a bakteriofágových genetických elementov, ako sú napríklad kozmidy

a fagemidy. Všetky sa môžu použiť na expresiu podľa vynálezu. Vo všeobecnom prípade sa ľubovoľný vektor vhodný na udržiavanie, šírenie alebo expresiu polynukleotidou za účelom expresie polypeptidu v hostiteľovi môže použiť na expresiu.

Vhodná sekvencia DNA sa môže začleniť do vektora ľubovoľnými dobre známymi spôsobmi, ako sa opisuje napríklad v publikácii Sambrook a ďalší, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Sekvencia nukleovej kyseliny v expresnom vektore je operatívne spojená s vhodnou expresnou riadiacou sekvenciou, ktorá zahŕňa napríklad promótor vhodný na riadenie transkripcie mRNA. Predstavitelia takýchto promótorov zahŕňajú, ale nie sú obmedzený na promótor lambda fága PL, promótory *lac*, *trp* a *tac* baktérie *E. coli* v prípade rekombinantnej expresie, a skorý a neskorý promótor SV40 a promótory retrovírusových LTR v prípade expresie *in situ*.

Vo všeobecnom prípade budú expresné konštrukcie obsahovať miesta vhodné na iniciáciu a termináciu transkripcie a v transkribovanej oblasti väzobné miesto pre ribozóm vhodné na transláciu. Kódujúca časť zreých transkriptov exprimovaných konštruktami zahŕňa translačný iniciačný AUG kodón a terminačný kodón vhodne umiestnený na konci polypeptidu, ktorý sa dá translatovať.

Konštrukty môžu navyše obsahovať riadiace oblasti, ktoré regulujú a vyvolávajú expresiu. Vo všeobecnom prípade v súlade s bežne používanými postupmi môžu také oblasti pracovať na základe riadenia transkripcie. Sú to napríklad transkripčné faktory, väzbové miesta represorov a terminátory.

Vektory vhodné na šírenie a expresiu obsahujú vhodné markery a amplifikačné oblasti, ako sú opísané napríklad v publikácii Sambrook a ďalší, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Reprezentatívne príklady vhodných hostiteľov v prípade rekombinantnej expresie Egr-1 zahŕňajú bakteriálne bunky, ako sú stafylokoky, streptokoky, *E. coli*, *Streptomyces* a bunky *Bacillus subtilis*, bunky húb, ako sú kvasinky a bunky *Aspergillus*, hmyzie bunky, ako sú bunky *Drosophila* S2 a bunky *Spodoptera* Sf9,

živočíšne bunky, ako sú bunky CHO, COS, HeLA, C127, 3T3, BHK, 293 a bunky Bowesovho melanómu a rastlinné bunky.

Nasledujúce vektory sú bežne dostupné spôsobom opísaným v príkladoch. Medzi vektory, ktoré sú výhodné na použitie v baktériách patria pQE70, pQE60 a pQE-9, dostupné od firmy Qiagen, vektor pBS, vektor Phagescript, vektor Bluescript, pNH8A, pNH16a, PNH18A, pNH46A, dostupné od firmy Stratagene a ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, dostupné od firmy Pharmacia a pBR322 (ATCC 37017). Medzi výhodné eukaryotické vektory patrí pWLNEO, pSV3CAT, pOG44, pXT1 a pSG, dostupné od firmy Stratagene a pSVK3, pBPV, pMSG a pSVL, dostupné od firmy Pharmacia. Tieto vektory, ktoré sa môžu použiť na rekombinantnú expresiu a na expresiu *in situ*, sú uvádzané ako ilustratívne príklady bežne dostupných a dobre známych vektorov. Je vhodné použiť akýkoľvek iný plazmid alebo vektor vhodný napríklad na zavedenie, udržiavanie, šírenie alebo expresiu polynukleotidu alebo polypeptidu použiteľného na terapiu podľa vynálezu.

Príklady vektorov vhodných na použitie podľa vynálezu zahŕňajú expresné vektory, v ktorých sa sekvencie cDNA Egr-1 začlenili do plazmidu, pričom expresia génu sa riadi ľudským stredne skorým silným promótorom cytomegalovírusu (opisuje sa v publikácii Foecking a Hofstetter, Cell, 45, 101-105, 1986). Takéto expresné plazmidy môžu obsahovať signály na skracovanie RNA. Pri SV40 sú takými signálmi polyadenylačný a terminačný signál. Expresné konštrukty používajúce CMV promótor, ktoré sú bežne dostupné, zahŕňajú pCDM8, pcDNA1 a jeho deriváty, pcDNA3 a jeho deriváty (Invitrogen). Iné bežné expresné vektory, ktoré je možné použiť, zahŕňajú pSVK3 a pSVL, ktoré obsahujú promótor SV40 a miesto zostrihu mRNA a polyadenylačné signály z SV40 (pSVK3) a signály spracovania SV40 VP1 (pSVL, vektory od firmy Pharmacia).

Promótorové oblasti sa môžu vybrať z ľubovoľného želateľného génu s použitím vektorov, ktoré obsahujú reportérovú transkripčnú jednotku, ktorá nemá promótorovú oblasť, ako je transkripčná jednotka chloramfenikolacetyltransferázy (CAT), v smere expresie génu od restričného miesta alebo miest na zavedenie promótorového fragmentu, to znamená fragmentu, ktorý môže obsahovať promótor. Ako je dobre známe, zavedenie fragmentu, ktorý obsahuje promótor, do vektora, do restričného miesta proti smeru expresie od štiepneho miesta vyvoláva produkciu

aktivity CAT, ktorú je možné detegovať štandardnými testami CAT. Vektory vhodné na tento účel sú dobre známe a jednoducho dostupné. Sú to napríklad pKK232-8 a pCM7. Promótoory vhodné na expresiu polynukleotidov, ktoré sa používajú na terapiu podľa vynálezu, nezahŕňajú len dobre známe a jednoducho dostupné promótoory, ale aj promótoory, ktoré je možné jednoducho získať nasledujúcim postupom použitím reporterového génu. V prípade expresie *in situ*, musí byť takýto promótoor rozpoznávaný v liečenom subjekte.

Zo známych prokaryotických promótoorov vhodných na expresiu polynukleotidov a polypeptidov podľa vynálezu na terapiu podľa vynálezu sa môžu použiť promótoory *lacI* baktérie *E. coli* a *lacZ* a promótoory T3 a T7 a *gpt*, lambda PR, promótoory PL a *trp*.

Rekombinantné expresné vektory obsahujú napríklad počiatky replikácie, promótoor prednostne získaný zo silno exprimovaného génu, pričom tieto fragmenty riadia transkripciu v smere expresie génu od štruktúrálnej sekvencie, a selekčný marker, ktorý umožňuje izoláciu buniek obsahujúcich vektor po zavedení vektora.

Polynukleotidy vhodné na použitie na terapiu podľa vynálezu, ktoré kódujú heterologickú štruktúrálnu sekvenciu polypeptidu podľa vynálezu, sa vo všeobecnom prípade začlenia do vektora použitím štandardných postupov tak, že sa operatívne spoja s expresným promótoorom. Polynukleotid sa umiestni tak, že miesto počiatku transkripcie sa nachádza presne na 5' konci väzobného miesta ribozómu. Väzobné miesto ribozómu bude na 5' konci kodónu AUG, ktorý iniciuje transláciu exprimovaného polypeptidu.

Vo všeobecnom prípade neexistuje žiadny iný otvorený čítací rámec, ktorý začína iniciačným kodónom, obvykle AUG, a leží medzi ribozómovým väzobným miestom a iniciačným kodónom. Vo všeobecnom prípade sa vyskytuje aj kodón ukončujúci transláciu na konci polypeptidu a v eukaryotických hostiteľoch sa bude v konštrukte nachádzať polyadenylačný signál. Signál ukončujúci transkripciu sa výhodne nachádza na 3' konci transkribovanej oblasti a môže sa nachádzať aj v polynukleotidovej konštrukcii.

Aby sa daný proteín vylučoval do lumenu endoplazmatického retikula, do periplazmatického priestoru alebo do mimobunkového prostredia, je nutné začleniť vhodné sekrečné signály do exprimovaného polypeptidu v priebehu jeho

rekombinantnej syntézy. Tieto signály môžu byť voči peptidu endogénne alebo to môžu byť heterológne signály.

Polypeptid sa môže exprimovať v upravenej forme, ako je napríklad fúzovaný proteín, a môže obsahovať nie len sekrečné signály, ale aj odlišné heterológne funkčné oblasti. Tak napríklad oblasť ďalších aminokyselín, najmä nabitých aminokyselín, sa môže pridať na N- alebo C-koniec polypeptidu, aby sa zlepšila stabilita a pretrvávanie v hostiteľskej bunke v priebehu čistenia alebo v priebehu následnej manipulácie a skladovania. Do polypeptidu sa môže pridať aj oblasť, ktorá umožňuje čistenie. Takéto oblasti je možné odstrániť skôr ako dôjde ku konečnej príprave polypeptidu. Okrem peptidových častí polypeptidu sa používajú spôsoby, ktoré sú v odbore dobre známe, aby došlo ku sekrécii alebo exkrécii, aby sa zlepšila stabilita, alebo aby sa umožnilo čistenie. Výhodný fúzovaný proteín obsahuje heterológnu oblasť z imunoglobulínu, ktorú je možné použiť na rozpustenie alebo čistenie polypeptidov. Bunky sa potom v typickom prípade zhromažďujú centrifugáciou, narušujú sa fyzikálnymi alebo chemickými spôsobmi a výsledný surový extrakt sa uchováva na ďalšie čistenie.

Mikrobiálne bunky, ktoré sa používajú na expresiu proteínov, sa môžu narušiť akoukoľvek metódou, ktorá zahŕňa cyklické rozmrazovanie a zmrazovanie, sonikáciu, mechanické porušenie alebo použitie činidiel lyzujúcich bunky. Takéto metódy sú v odbore dobre známe.

Cicavčie expresné vektory môžu obsahovať počiatok replikácie, vhodný promótor a zosilovač a aj ľubovoľné ribozóm viažuce miesto, polyadenylačné oblasti, donor zostrihu a akceptorové miesta, sekvencie ukončujúce transkripciu a sekvencie ohraničujúce 5' koniec, ktoré sa neprepisujú, a ktoré sú nevyhnutné na expresiu.

Ďalej je možné použiť na prípravu polypeptidov Egr-1 podľa vynálezu geneticky manipulované hostiteľské bunky. Zavedenie polynukleotidov do hostiteľskej bunky sa môže uskutočniť transfekciou fosforečnanom sodným, transfekciou sprostredkovanou DEAE-dextránom, transfekciou mikroinjekciou, transfekciou sprostredkovanou kationickými lipidmi, elektroporáciou, transdukciou, zavedením použitím striel, infekciou alebo pomocou iných metód. Takéto metódy sú opísané v mnohých štandardných manuáloch, ako je Davis a ďalší, Basic methods

in molecular biology, (1986) a Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Zrelé proteíny je možné exprimovať v hostiteľských bunkách, ktoré zahŕňajú cicavčie bunky, ako sú bunky CHO, kvasinky, baktérie alebo iné bunky, pričom proteíny sú riadené vhodným promótorom. Translačné systémy, kde sa nepoužívajú bunky, sa môžu použiť na produkciu takýchto proteínov použitím RNA získanej z DNA konštruktov podľa vynálezu. Vhodné klonovacie a expresné vektory vhodné na použitie v prokaryotických a eukaryotických hostiteľoch sa opisujú v publikácii Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Polypeptid je možné získať a čistiť z rekombinantnej bunkovej kultúry známymi metódami, ktoré zahŕňajú precipitáciu síranom amónnym alebo etanolom, kyslú extrakciu, chromatografiu s výmenou aniónov a katiónov, chromatografiu na fosfocelulóze, chromatografiu s hydrofóbnymi interakciami, afinitnú chromatografiu, chromatografiu na hydroxylapatite a chromatografiu na lektíne. Najvýhodnejšie je, ak je pri čistení použitá vysokovýkonná kvapalinová chromatografia. V prípade opätovného zbalenia proteínu sa môže použiť regenerovaná aktívna konformácia, keď sa polypeptid v priebehu izolácie a čistenia denaturuje.

V prípade terapie sa polynukleotid kódujúci Egr-1, napríklad vo forme rekombinantného vektora, môže čistiť spôsobmi, ktoré sú v odbore dobre známe, ako je kolónová chromatografia, ako sa opisuje v publikácii Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Ako sa uvádza ďalej v texte, Egr-1 sa môže aplikovať na miesto poranenia buď ako nukleová kyselina kódujúca Egr-1, ktorá sa prepisuje a prekladá na Egr-1 v samotnom mieste poranenia, vo forme génovej terapie, alebo sa môže priamo aplikovať samotný transkripčný faktor.

Ďalej vynález opisuje použitie polypeptidového transkripčného faktora Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu na výrobu lieku na liečbu poranenia cicavcov vrátane človeka.

Ďalej vynález opisuje spôsob liečby poranenia cicavcov vrátane človeka, ktorý zahŕňa aplikáciu terapeuticky účinného množstva polypeptidového transkripčného faktora Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu cicavcovi.

Ďalej vynález opisuje použitie transkripčného faktora Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu na liečbu poranenia a na hojenie rán.

Ďalej vynález opisuje farmaceutický prostriedok obsahujúci transkripčný faktor Egr-1 alebo jeho biologicky aktívny fragment spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi.

Výraz "polypeptidový transkripčný faktor Egr-1" zahŕňa prirodzene a rekombinantne produkovaný transkripčný faktor Egr-1, prirodzené, syntetické a biologicky aktívne polypeptidové analógy alebo varianty alebo jeho deriváty alebo jeho biologicky aktívne fragmenty alebo varianty, deriváty a analógy uvedených fragmentov.

Produkty proteínového transkripčného faktora Egr-1 zahŕňajúce biologicky aktívne fragmenty transkripčného faktora Egr-1 sa môžu generovať a/alebo izolovať všeobecnou metódou, ktorá je v odbore dobre známa.

Egr-1 a vyššie uvedené fragmenty a ich deriváty vhodné na použitie na liečbu podľa vynálezu sa môžu extrahovať z prirodzených zdrojov spôsobmi, ktoré sú v odbore dobre známe. Takéto spôsoby zahŕňajú čistenie metódami DNA afinitnej chromatografie, ktorá je sekvenčne špecifická, ako sa opisuje v publikácii Briggs a ďalší, Science 234, 47-52, 1986, použitím oligonukleotidu viažuceho DNA, ktorý rozoznáva Egr-1. Polypeptid sa môže pripraviť aj metódami rekombinantnej DNA, ako sa opisuje vyššie, to znamená expresiou opísaného konštruktú v hostiteľských bunkách. V inom prípade sa môžu polypeptidy podľa vynálezu synteticky produkovať na bežných syntetizátoroch peptidov.

Vynález sa týka aj použitia fragmentov, analógov a derivátov Egr-1. Výrazy "fragment", "derivát" a "analóg" znamenajú polypeptid, ktorý vykazuje rovnakú biologickú funkciu alebo aktivitu ako polypeptid. Takže analóg zahŕňa proproteín, ktorý sa môže aktivovať štiepením proproteínovej časti, čím vzniká aktívny zrelý polypeptid.

Fragment, derivát alebo analóg polypeptidu môže byť i) ten, v ktorom sa jeden alebo viac aminokyselinových zvyškov substituujú konzervatívnym alebo

nekonzervatívnym aminokyselinovým zvyškom (výhodne konzervatívnym aminokyselinovým zvyškom) a takýto substituovaný aminokyselinový zvyšok môže alebo nemusí byť kódovaný genetickým kódom, alebo ii) ten, v ktorom jeden alebo viac aminokyselinových zvyškov zahŕňa substitučnú skupinu, alebo iii) ten, v ktorom zrelý polypeptid fúzuje s inou zlúčeninou tak, že zlúčenina predlžuje polčas rozpadu polypeptidu (napríklad polyetylénglykol), alebo iv) ten, v ktorom ďalšie aminokyseliny fúzujú so zrelým polypeptidom, ako je vedúca alebo sekrečná sekvencia, alebo sekvencia, ktorá sa používa na čistenie zrelého polypeptidu alebo proproteínovej sekvencie. Takéto fragmenty, deriváty a analógy sú obsahom vynálezu.

Medzi výhodné varianty patria tie, ktoré sa odlišujú od prirodzene sa vyskytujúceho Egr-1 konzervatívnymi substitúciami aminokyselín. Také substitúcie substituujú danú aminokyselinu v polypeptide inou aminokyselinou s podobnými vlastnosťami. V typickom prípade sa za konzervatívnu substitúciu považuje nahradenie jednej aminokyseliny za inú v rámci alifatických aminokyselín Ala, Val, Leu a Ile, vnútorná zámena hydroxylových zvyškov Ser a Thr, zámena kyslých zvyškov Asp a Glu, substitúcia v rámci amidových zvyškov Asn a Gln, a v rámci aromatických zvyškov Phe, Tyr.

Ďalej sa najmä z tohto dôvodu preferujú varianty, analógy a deriváty fragmentov, ktoré majú aminokyselinovú sekvenciu polypeptidu, v ktorom sa 5 až 10, 1 až 5, 1 až 3, 2, 1 alebo žiadny aminokyselinový zvyšok substituuje, deletuje alebo pridá v ľubovoľnej kombinácii. Výhodné sú najmä tzv. tiché substitúcie, adície a delécie, ktoré nemenia vlastnosti a aktivitu polypeptidu podľa vynálezu. Výhodné sú najmä konzervatívne substitúcie.

Zvlášť výhodnými fragmentami sú biologicky aktívne fragmenty. To znamená fragmenty, ktoré si uchovávajú vlastnosti hojenia rán rodičovského polypeptidu.

Polypeptidy a polynukleotidy podľa vynálezu sa môžu prednostne vyskytovať v izolovanej forme a výhodne sa čistia, aby dosiahli stupeň homogenity.

Polypeptidy Egr-1 vhodné na použitie podľa vynálezu zahŕňajú polypeptid Egr-1 ako aj polypeptidy, ktoré vykazujú aspoň 70% zhodu, výhodne aspoň 80% zhodu, výhodnejšie aspoň 90% zhodu a najvýhodnejšie aspoň 95% zhodu (ešte výhodnejšie 99% zhodu) s myšacou polypeptidovou sekvenciou ako je uvedená v

publikácii Cell 53, 37-43 (1988) a s polypeptidmi kódovanými ľudskou sekvenciou, a zahŕňajú aj časti takýchto polypeptidov kódovaných ľudskou sekvenciou a zahŕňajú aj časti takýchto polypeptidov s takou časťou polypeptidu, ktorá vo všeobecnom prípade obsahuje aspoň 30 aminokyselín a výhodne aspoň 50 aminokyselín.

Fragmenty a časti polypeptidov, ktoré sa používajú na terapiu podľa vynálezu, sa môžu použiť na produkciu zodpovedajúceho polypeptidu s úplnou dĺžkou prostredníctvom peptidovej syntézy. Preto sa tieto fragmenty môžu použiť ako medziprodukty na produkciu polypeptidov s úplnou dĺžkou. Fragmenty alebo časti polynukleotidov podľa vynálezu sa môžu použiť na syntézu polynukleotidov s úplnou dĺžkou podľa vynálezu.

Vynález ďalej opisuje použitie fragmentov polypeptidu Egr-1 definovaného vyššie a fragmentov jeho variantov a derivátov.

Fragment je polypeptid, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je rovnaká ako časť, ale nie ako celá, aminokyselinová sekvencia polypeptidov Egr-1 a ich variantov a derivátov.

Takéto fragmenty sa môžu vyskytovať voľne, to znamená, že nie sú súčasťou, ani nefúzujú s inými aminokyselinami alebo polypeptidmi, ani nie sú obsiahnuté vo väčšom polypeptide, v ktorom by tvorili časť alebo oblasť. V prípade, že tvoria časť väčšieho polypeptidu, tvoria uvedené fragmenty vo väčšine prípadov jedinú neprerušovanú oblasť. V jedinom, väčšom fragmente je obsiahnutých niekoľko fragmentov. Napríklad v určitom výhodnom uskutočnení vynálezu sa používajú fragmenty polypeptidov podľa vynálezu, ktoré sa nachádzajú v prekurzorovom polypeptide navrhnutom na expresiu v hostiteľovi, ktorý obsahuje prepolypeptidové a propolypeptidové oblasti fúzované s N-koncom fragmentu a ďalšiu oblasť fúzovanú s C-koncom fragmentu. Preto výraz "fragmenty" znamená časť alebo časti fúzovaného polypeptidu alebo fúzovaného proteínu získaného z polypeptidu podľa vynálezu.

Vynález opisuje fragmenty vyznačujúce sa štrukturálnymi alebo funkčnými znakmi polypeptidu, ktorý je možné použiť na terapiu podľa vynálezu. Výhodné uskutočnenia podľa vynálezu zahŕňajú fragmenty, ktoré obsahujú alfa-závitnicu a oblasti tvoriace alfa-závitnicu, beta skladaný list a oblasti tvoriace beta skladaný list, slučku a oblasti tvoriace slučku, závitnicu a oblasti tvoriace závitnicu, hydrofilné

oblasti, hydrofóbné oblasti, alfa amfipatické oblasti, beta amfipatické oblasti, flexibilné oblasti, oblasti tvoriace povrch, oblasť viažucu substrát a oblasti polypeptidu podľa vynálezu s oblasťami s vysokým antigénnym indexom a kombinácie takýchto fragmentov.

Najvýhodnejšie sú fragmenty, ktoré majú chemické, biologické alebo iné účinky polypeptidu podľa vynálezu, ktoré zahŕňajú podobné účinky alebo zlepšené účinky alebo majú znížený požadovaný účinok. Ďalšími výhodnými polypeptidovými fragmentami sú tie, ktoré obsahujú antigénne alebo imunogénne determinanty u živočíchov, najmä u človeka.

Výhodné je, aby vynález okrem iných opisoval aj polynukleotidy opisujúce vyššie uvedené fragmenty, najmä tie, ktoré hybridizujú v prísnych podmienkach a polynukleotidy, ako sú PCR primery na amplifikáciu polynukleotidov, ktoré kódujú fragmenty. Výhodnými polynukleotidmi sú tie, ktoré zodpovedajú výhodným fragmentom, ako sú opísané vyššie.

Ďalšie uskutočnenie vynálezu zahŕňa biologicky, profylakticky, klinicky alebo terapeuticky použiteľné varianty, analógy alebo ich deriváty alebo fragmenty vrátane fragmentov, variantov, analógov a derivátov a prostriedkov, ktoré obsahujú to isté. Vynález ďalej opisuje biologicky aktívne varianty, analógy alebo fragmenty.

Vynález ďalej opisuje prostriedky obsahujúce polynukleotidy alebo polypeptidy opísané vyššie. Preto sa polynukleotidy alebo polypeptidy podľa vynálezu môžu použiť v kombinácii s farmaceuticky prijateľným nosičom alebo nosičmi.

Takéto nosiče môžu zahŕňať, ale nie sú obmedzené na fyziologický roztok, tlmený fyziologický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, etanol a ich kombinácie.

Polypeptidy a polynukleotidy sa môžu použiť podľa vynálezu samotné, alebo v spojení s inými zlúčeninami, ako sú napríklad terapeutické prostriedky.

Farmaceutické prostriedky sa môžu aplikovať ľubovoľným účinným vhodným spôsobom, ktorý je účinný v prípade nasmerovania do miest poranení. Takéto spôsoby zahŕňajú okrem iných napríklad povrchovú, intravenóznú, intramuskulárnu, intranazálnu alebo intradermálnu aplikáciu. Vo všeobecnom prípade sa prostriedok môže aplikovať lokálne na rany alebo v prípade podobných stavov.

V prípade terapie alebo profylaxie sa účinné činidlo môže aplikovať jednotlivcovi ako injektovateľný prostriedok. Napríklad ako sterilná vodná disperzia, pričom výhodná je izotonická disperzia.

V inom prípade sa môže pripraviť zlúčenina na povrchovú aplikáciu, napríklad vo forme mastí, krémov, roztokov, očných mastí, očných kvapiek, ušných kvapiek, ústnej vody, nasýtených obväzov a chirurgických nití a aerosolov a môže obsahovať vhodné bežné aditíva vrátane napríklad konzervačných činidiel, rozpúšťadiel, ktoré napomáhajú penetrácií liekov, a zmäkčujúce prostriedky do mastí a krémov. Takéto povrchové formulácie môžu obsahovať aj bežné kompatibilné nosiče vhodné napríklad ako základ mastí lebo krémov a etanol alebo olejový alkohol v prípade roztokov. Takéto nosiče môžu tvoriť približne 1 % až približne 98 % hmotnosti formulácie. Obvykle tvoria až približne 80 % hmotnosti formulácie.

V prípade aplikácie cicavcom a najmä ľuďom sa očakáva, že denná dávka aktívnej látky je 0,01 mg/kg až 1,0 mg/kg. V typickom prípade je denná dávka 1 mg/kg. Lekár stanoví aktuálnu dávku, ktorá bude najvhodnejšia pre jednotlivca na základe jeho veku, telesnej hmotnosti a individuálnej odozvy. Vyššie uvedené dávky sú príkladmi priemerného príkladu. Môžu samozrejme existovať jednotlivé príklady, kedy je vhodné aplikovať vyššie alebo nižšie dávky.

Vynález opisuje farmaceutický prostriedok obsahujúci transkripčný faktor Egr-1, molekulu nukleovej kyseliny obsahujúcu sekvenciu kódujúcu Egr-1 spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi.

Výhoda pri terapii, kde sa používajú transkripčné faktory na zrýchlenie hojenia rán, spočíva v aktivácii viacerých cieľových génov, ktoré podporujú zrýchlené hojenie. Egr-1 sa prirodzene aktivuje ako odozva na poranenie a výhodou je aj zosilnenie prirodzenej odozvy. Liečba je založená na DNA a poskytuje vhodný a reprodukovateľný zavádzací systém.

V prípade, že sa v terapeutických metódach používa polynukleotid Egr-1 podľa vynálezu, používa sa tento polynukleotid ako časť expresného konštruktú. Napríklad vo forme expresného vektora. Pri takejto metóde sa konštrukt zavedie do miesta poranenia, kde sa produkuje Egr-1 *in situ*. Používanými konštruktami môžu

byť štandardné vektory a/alebo systémy na zavádzanie génov, ako sú lipozómy, zavádzacie systémy sprostredkované receptorom a vírusové vektory.

Vynález je ďalej vhodný na účely hojenia rán, ktoré zahŕňajú vtedy na končatinách sprevádzajúce cukrovku a periférne arteriálne okluzívne ochorenia, hojenie pooperačných jaziev, popálenín a lupienky.

Ako sa opisuje vyššie, polypeptidy Egr-1 alebo nukleové kyseliny podľa vynálezu sa môžu aplikovať lokálne do miesta poškodenia tkaniva ľubovoľným vhodným spôsobom, napríklad povrchovou aplikáciou. Jedným spôsobom zavedenia produktov nukleových kyselín je použitie technológie génového dela, pri ktorej sa molekula izolovanej nukleovej kyseliny Egr-1, napríklad vo forme cDNA, alebo vo forme expresného vektora, imobilizuje na zlatých časticiach a vystreľuje sa priamo do miesta poranenia. Vynález ďalej opisuje použitie molekuly nukleovej kyseliny obsahujúcej sekvenciu kódujúcu Egr-1 v génovom dele na liečbu poranení. Ďalej sa opisuje zlúčenina vhodná na terapiu použitím génového dela, ktorá zahŕňa sekvenciu kódujúcu transkripčný faktor Egr-1 a zlaté častice.

Výhodným zavedením nukleovej kyseliny alebo polypeptidu podľa vynálezu je mikrovýsev, ako je opísané v publikácii US 5697901.

Ako sa opisuje vyššie, polynukleotid obsahujúci sekvenciu kódujúcu Egr-1 alebo jeho biologicky aktívny fragment môže byť riadený aspoň časťou prirodzeného promótoru Egr-1. Pričom výhodný je ľudský promótor Egr-1.

Izoloval a sekvenoval sa myšací promótor Egr-1 (opisuje sa v publikácii Morris, Nucleic Acid Research, 16: 3335-3346). Potenciálne regulačné sekvencie zahŕňajú element AAATA ("TATA" homológ) v polohe -26 až -22, CCAAT box v polohách -337 až -333, elementy odozvy na päť sér (SRE) v polohách -110 až -91, -342 až -324, -358 až -339, -374 až -355 a -412 až -393, dve miesta Ap1 v polohách -610 až -603 a -867 až -860, štyri miesta Sp1 v polohách -285 až -280, -649 až -644, -700 až -695 a -719 až -714 a dva elementy odozvy na cAMP v polohách -138 až -131 a -631 až -624. Ukazuje sa, že Egr-1 sa viaže na promótor myšacieho Egr-1 a znižuje transkripciu svojej vlastnej expresie. Sekvencia tohto promótoru je uvedená na obrázku č. 9.

Menej sa vie o regulácii promótoru ľudského Egr-1. Pripravila sa údajná sekvencia ľudského Egr-1. Vzhľadom k začiatočnému miestu v polohe +1 mRNA sa

identifikovalo 695 nukleotidov sekvencie proti smeru expresie génu. Táto sekvencia proti smeru expresie génu obsahuje element AAATA ("TATA" homológia) v polohe -26 až -22 a množstvo potencionálnych regulačných elementov, ktoré zahŕňajú dve miesta Sp1 v polohách -505 až -499 a -647 až -642, dva elementy odozvy na cyklické AMP v polohách -134 až -127 a -630 až -623, elementy odozvy na päť sér (SRE) v polohách -108 až -89, -344 až -326, -359 až -340, -376 až -357 a -410 až -394, väzobné miesto pre Egr-1 (EBS) v polohe -597 až 598 a responzívny element na tetradekanoylforbolacetát (TPA) (väzobné miesto Ap-1) v polohe -609 až -602. Je známe, že väzobné miesto TPA funguje tak, že TPA stimuluje expresiu z plazmidu exprimujúceho gén chloramfenikolacetyltransferázy. SRE 3 a 4 sprostredkovávajú odozvu promótoru Egr-1 na stres a môžu potvrdiť odozvu promótoru SV40 na stres. Delícia EBS z ľubovoľného promótorového elementu vedie k zvýšeniu odozvy daného promótoru na stres, z čoho vyplýva diskusia o úlohe Egr-1 pri znižovaní regulácie aktivity ľudského promótoru.

Zistilo sa, že publikovaná sekvencia pripravená pre ľudský promótor Egr-1 nie je správna a je poskytnutá nová sekvencia s rôznymi rozdielmi od publikovanej sekvencie. Tieto sekvenčné rozdiely nie je možné predpokladať a aspoň niektoré z nich sa považujú za funkčné a podstatné. Ďalej sa pripravila celá sekvencia, zatiaľ čo publikovaná promótorová sekvencia ľudského Egr-1 obsahuje rôzne medzery.

Molekula nukleovej kyseliny obsahujúca sekvenciu kódujúcu Egr-1 alebo jej biologickyaktívny fragment sa môže operatívne spojiť so sekvenciou nukleovej kyseliny, ktorá

- a) má reťazec obsahujúci sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako GW SEQ, alebo
- b) má reťazec obsahujúci jednu alebo viacero delícií, inzercií a/alebo substitúcií vzhľadom ku GW SEQ, ale ktorý neobsahuje sekvenciu zobrazenú na obrázku 7 ako ON SEQ, a ktorý navyše neobsahuje sekvenciu zobrazenú na obrázku č. 9.

Vynález opisuje molekulu nukleovej kyseliny, ktorá

- a) má reťazec obsahujúci sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako GW SEQ, alebo
- b) má reťazec obsahujúci jednu alebo viacero delícií, inzercií a/alebo substitúcií vzhľadom ku GW SEQ, ale ktorý neobsahuje sekvenciu zobrazenú na obrázku 7 ako ON SEQ, a ktorý navyše neobsahuje sekvenciu zobrazenú na obrázku č. 9, alebo

c) má reťazec, ktorý hybridizuje s reťazcom opísaným vyššie v odstavci a) alebo b).

Nasleduje podrobnejší opis molekúl opísaných v odstavcoch a), b) alebo c):

a) Molekula nukleovej kyseliny, ktorá má sekvenciu uvedenú na obrázku 7 ako GW SEQ

Je možné vidieť, že sekvencia GW SEQ zobrazená na obrázku č. 7 má rôzne oblasti uzavreté v rámečkoch. Verí sa, že tieto oblasti sú funkčne podstatné a funkcie rôznych oblastí ohraničených na obrázku 7 rámečkom sú opísané ďalej v texte:

Sp1 (dve oblasti)

Sp1 označuje sekvenciu vhodnú na naviazanie transkripčného faktora Sp1 a jeho homológov.

cAMP RE (dve oblasti)

cAMP RE označuje sekvenciu vhodnú na naviazanie transkripčného faktora ATF a homológov. To sa indukuje pomocou cAMP a sekvencia sa potom nazýva element odozvy na cAMP.

TPA RE

TPA RE označuje sekvenciu vhodnú na naviazanie transkripčného faktora AP1 a homológov. Tie zahŕňajú napríklad forbolester TPA a sekvencia sa nazýva element odozvy na TPA.

EBS

EBS označuje sekvenciu na naviazanie transkripčného faktora Egr-1 a homológov.

SRE (SRE5, SRE4, SRE3, SRE2, SRE1)

SRE označuje sekvenciu poskytujúcu odpoveď na sérum (to znamená element odozvy na sérum). Spolu s asociovanými Ets (špecifické pre transformáciu E26) viažu väzobné miesta elementov odozvy na sérum transkripčné faktory, ako SRF, Elk-1 a/alebo F-ACT1, ako aj homológy.

TATA

Verí sa, že TATA box je nevyhnutný na zostavenie transkripčného komplexu, ktorý obsahuje viacero transkripčných faktorov nutných na iniciáciu transkripcie. Ak

je to potrebné, neobsahuje presnú sekvenciu TATA, pretože je to konvenčná sekvencia a objavuje sa istý stupeň variability.

GW SEQ vykazuje rôzne rozdiely v sekvencii vzhľadom k publikovanej sekvencii ľudského Egr-1 (tu sa označuje ako "ON SEQ"). Rozdiely sa diskutujú vzhľadom na usporiadanie sekvencií GW SEQ a ON SEQ zobrazené na obr. č. 7.

Ako je možné vidieť na základe obrázku 7, GW SEQ má päť nukleotidov, ktoré sa zmenili oproti špecifickým nukleotidom poskytovaným v zodpovedajúcich polohách v sekvencii ON SEQ. Tie sa považujú za substitúcie vo vzťahu k ON SEQ. Dve z nich sa nachádzajú v oblastiach, ktoré sú ohraničené rámečkmi. Tieto dve substitúcie sú substitúcia G za T nachádzajúca sa v prvom rámečku cAMP RE a substitúcia G za C nachádzajúca sa v rámečku SRE3.

GW SEQ obsahuje aj rôzne ďalšie nukleotidy v porovnaní s ON SEQ (to je nukleotidy, ktoré nie sú špecificky identifikované v ON SEQ). Tie sa môžu považovať za inzerty príbuznej sekvencie ON SEQ. Štyri z nich sa nachádzajú v rámečku SRE5 (tri z nich sú inzerty A a jedno je začlenenie C).

Sekvencia GW SEQ má jednu deléciu v porovnaní so sekvenciou ON SEQ. Je to delécia G. Nenachádza sa v oblasti rámečkov. Nachádza sa medzi druhým boxom Sp1 a SRE5.

Molekuly opísané vo vynáleze a) majú samozrejme ďalšie sekvencie proti a v smere expresie génu v porovnaní s GW SEQ. Môže sa pripraviť napríklad jedna alebo viac oblastí, ktoré sa podieľajú na transkripcii/translácii alebo ich regulácii. Môže sa pripraviť aj kódujúca oblasť (výhodne kódujúca Egr-1 alebo jeho biologicky aktívny fragment). Ďalšie oblasti sa opisujú ďalej v texte.

b) Molekula nukleovej kyseliny, ktorá má reťazec obsahujúci jednu alebo viac delécií, inzercii a/alebo substitúcií v porovnaní s GW SEQ, ale, ktorý neobsahuje sekvenciu zobrazenú na obrázku č. 7 ako ON SEQ, a ktorý neobsahuje ani sekvenciu zobrazenú na obrázku č. 9.

Môžu sa pripraviť zmeny v nukleotidovej sekvencii vzhľadom k sekvencii GW SEQ, čím vzniknú iné molekuly, ktoré sa ešte využívajú. Takéto zmeny opisuje vynález. Zahŕňajú alelické a nealelické varianty.

Výhodné varianty podľa vynálezu b) budú obvykle obsahovať jednu alebo viac regulačných oblastí, ktoré majú funkciu zodpovedajúcu funkcii jednej alebo viacerých oblastí ohraničených rámčekom, ktoré sú zobrazené v GW SEQ (dokonca, ak sa funkcia reguluje pozitívne alebo negatívne vzhľadom k jednej alebo viacerým oblastiam ohraničeným v rámčeku, zobrazených v GW SEQ). Najvýhodnejšie je, aby také molekuly mali jednu alebo viac oblastí, ktoré vykazujú rovnaké sekvencie ako jedna alebo viac oblastí ohraničených v rámčeku, zobrazených v GW SEQ.

Požadované varianty podľa vynálezu b) budú vykazovať podstatnú zhodu sekvencie s celou alebo s časťou uvedenej GW SEQ v celej dĺžke uvedenej sekvencie GW SEQ alebo s jej časťou.

Ak má variant jednu alebo viac oblastí, ktoré zodpovedajú jednej alebo viacerým v rámčeku ohraničeným oblastiam zobrazeným na obrázku č. 7 v GW SEQ, je výhodné, aby sa nevyskytovali žiadne rozdiely vzhľadom k uvedeným oblastiam ohraničeným v rámčekoch, alebo len niekoľko takýchto rozdielov (vo všeobecnom prípade je napríklad výhodné, aby mali maximálne len 1, 2 alebo 3 rozdiely vzhľadom na danú oblasť ohraničenú rámčekom). Mimo oblastí ohraničených rámčekom môže existovať viac zmien v sekvenciách. Takéto varianty môžu vykazovať relatívne nižší stupeň zhody sekvencií so zodpovedajúcou časťou GW SEQ vo vzťahu k oblastiam, ktoré nie sú ohraničené rámčekom na obrázku 7. Niektoré varianty nemajú jednu alebo viac oblastí, ktoré zodpovedajú jednej alebo viacerým oblastiam mimo uvedených oblastí ohraničených rámčkami v GW SEQ.

Výhodné molekuly nukleovej kyseliny opísané vo vynáleze obsahujú jednu alebo viac regulačných oblastí schopných zmeniť silu transkripcie Egr-1 v cicavcoch (výhodnejšie u ľudí) ako odozvu na podmienky *in vivo*. Takéto molekuly nukleových kyselín sa môžu aplikovať cicavcom, pričom vzniká Egr-1 spôsobom, ktorý umožňuje reguláciu ich expresie na úrovni transkripcie (tieto molekuly nukleových kyselín môžu preto vo všeobecnom prípade obsahovať oblasť kódujúcu látku, ktorá vykazuje aktivitu Egr-1).

Môže byť prítomných jeden alebo viac elementov odozvy na sérum (SRE). Je nutné, aby jeden alebo viac z nich boli elementy odozvy na stres. Sú to oblasti, ktoré potvrdzujú odpoveď na stres v prípade transkripcie.

Veľké množstvo SSRE môže spolupracovať pri umožnení odpovede na stres. Je nutné, aby boli spojené s jedným alebo viacerými miestami Ets, alebo aby obsahovali tieto miesta. V niektorých prípadoch je nutné, aby bolo prítomné len jedno miesto (výhodne spolu s miestom Ets), za účelom poskytnutia stupňa odozvy na stres.

Výhodné SSRE je uvedené na obrázku č. 7 ako SRE5 v sekvencii "GW SEQ". Dokázalo sa, že tieto oblasti sú funkčné, zatiaľ čo sekvencia SRE5 sa zdá byť vzhľadom na sekvenciu ON SEQ nefunkčná. Samotná oblasť SRE5, ako aj varianty SRE5, sú schopné poskytnúť odpoveď na stres podľa vynálezu. Takéto varianty výhodne obsahujú aspoň jeden nukleotidový rozdiel nachádzajúci sa v GW SEQ SRE5 v porovnaní s ON SEQ SRE5.

Iné výhodné SSRE sú SRE3 a SRE4, ako sú uvedené na obrázku č. 7 v GW SEQ, rovnako ako jeho varianty schopné poskytnúť odozvu na stres.

Najvýhodnejšie je, keď sú prítomné všetky oblasti SRE3, SRE4 a SRE5 (alebo ich varianty, ktoré sú schopné poskytnúť odpoveď na stres).

Bez ohľadu na skutočnosť či je alebo nie je prítomná určitá oblasť SRE, obsahuje molekula nukleovej kyseliny podľa vynálezu TATA box (ktorý nebude nevyhnutne obsahovať konvenčnú sekvenciu TATA). Obvykle tiež bude obsahovať aj CCAAT box (ktorý nebude nevyhnutne zahŕňať konvenčnú sekvenciu CCAAT).

Je obvyklé, že je prítomná aspoň jedna alebo viacero väzobných oblastí Sp-1. Jedna z väzobných oblastí Sp1, alebo obe, môžu byť sekvencie viažuce Sp1 zobrazené na obrázku č. 7 v GW SEQ.

Môže byť prítomná oblasť odozvy na cAMP. Takéto výhodné oblasti obsahujú sekvencie zobrazené na obrázku č. 7 a majú označenie cAMP RE v sekvencii GW SEQ. Najvýhodnejšia je prvá cAMP RE zobrazená na obrázku č. 7 v GW SEQ. To umožňuje reguláciu transkripcie pomocou cAMP.

Môže byť prítomné väzbové miesto EGR-1 (EBS). Verí sa, že toto miesto má dôležitú úlohu pri negatívnej regulácii transkripcie Egr-1 potom, keď množstvo Egr-1 prekročí určitú prahovú hodnotu. Tak Egr-1 môže obmedzovať svoju vlastnú expresiu po stimulácii stresom. Vo všeobecnom prípade sa použije EBS, ak je nutné týmto spôsobom obmedziť množstvo Egr-1. EBS môže mať sekvenciu zobrazenú na obrázku č. 7 v GW SEQ ako EBS. Nukleotidové zmeny sa môžu uskutočniť za

vzniku EBS, pričom vznikajú ich varianty. Varianty je možné pripraviť s obmedzenou afinitou pre Egr-1 v porovnaní s EBS, ako je zobrazené na obrázku č. 7 v GW SEQ. Jedným takým variantom je EBS zobrazené na obrázku č. 8. V niektorých prípadoch nemôže byť prítomné funkčné EBS, a preto sa môže regulácia pomocou Egr-1 úplne odstrániť (môže napríklad dôjsť k úplnej delícii EBS). Je možné pripraviť aj nukleotidové zmeny v EBS, čím vznikne zvýšená afinita pre Egr-1. Je to použiteľné, ak je nutné posilniť samoreguláciu expresie Egr-1.

c) Molekula nukleovej kyseliny, ktorá má reťazec, ktorý hybridizuje s reťazcom opísaným vyššie v odstavci a) alebo b)

Vynález opisuje molekuly nukleovej kyseliny, ktoré môžu hybridizovať s jednou alebo viacerými molekulami nukleových kyselín opísaných vyššie v texte. Také molekuly nukleovej kyseliny sa nazývajú ako "hybridizujúce" molekuly nukleovej kyseliny. Je nutné, aby hybridizujúce molekuly podľa vynálezu obsahovali aspoň 10 nukleotidov a výhodne aspoň 25, aspoň 50, aspoň 100 alebo aspoň 200 nukleotidov.

Molekula hybridizujúcej nukleovej kyseliny podľa vynálezu môže vykazovať vysoký stupeň zhody sekvencií v celej dĺžke s molekulou nukleovej kyseliny, ktorá je komplementárna s nukleovou kyselinou podľa vynálezu a) a b) (napríklad aspoň 50%, aspoň 75%, aspoň 90%, aspoň 95% alebo aspoň 98% zhodu), hoci to nie je podstatné. Čím vyšší stupeň sekvenčnej zhody, ktorý je medzi danou molekulou jednoreťazcovej nukleovej kyseliny a inou molekulou jednoreťazcovej nukleovej kyseliny, tým vyššia pravdepodobnosť, že bude hybridizovať s molekulou jednoreťazcovej nukleovej kyseliny, ktorá je komplementárna s molekulou inej jednoreťazcovej nukleovej kyseliny, za vhodných podmienok.

Výhodné hybridizačné molekuly hybridizujú v podmienkach strednej alebo vysokej prísnosti. Hybridizačné podmienky sa opisujú na strane 1.101 až 1.110 a 11.45 až 1161 publikácie Sambrook a ďalší, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Jeden príklad hybridizačných podmienok, ktoré je možné použiť zahŕňa použitie premývacieho roztoku 5x koncentrovaného SSC, 0,5% SDS, 1,0mM EDTA (pH 8,0), pričom hybridizácia prebieha cez noc pri teplote 55 °C s použitím

5xSSC. Existuje však množstvo iných možností. Niektoré z nich sú uvedené v tabuľke č. 1 publikácie WO 98/45435 (vhodné je preskúmať najmä podmienky označené písmenami A-F v tabuľke a menej výhodné sú podmienky označené písmenami G až L alebo M až R).

Ďalší prístup je stanovenie T_m pre daný úplný duplex (to je bez nesprávneho párovania) určitej dĺžky v daných podmienkach a potom uskutočnenie hybridizácie s jedným reťazcom duplexu v uvedených podmienkach, ale pri teplote, ktorá je dostatočne nižšia ako teplota T_m , aby sa vytvorili stabilné hybridy prijateľnou rýchlosťou, kým je ešte požadovaný významný stupeň hybridizačnej špecificity. Teplota T_m sa v prípade takéhoto duplexu môže stanoviť empiricky poskytnutím duplexu a postupným zvyšovaním teploty, až sa dosiahne hodnota T_m . T_m sa môže aj odhadnúť, napríklad použitím rovnice $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\text{frakcia G+C}) - (600/N)$, kde N je dĺžka reťazca (tento vzorec je presný v prípade koncentrácie Na^+ 1 M alebo nižšej a v prípade dĺžok polynukleotidov 14 až 70, ale je menej presný v prípade, že tieto parametre nie sú splnené). V prípade molekuly nukleovej kyseliny, ktorá je väčšia ako 200 nukleotidov, môže hybridizácia prebiehať pri teplote, ktorá je nižšia o 15 až 25 °C ako je hodnota T_m perfektného hybridu (to je bez nesprávneho párovania), v daných podmienkach. So zväčšujúcou sa dĺžkou sa znižuje hodnota T_m tak, že niekedy nie je vhodné uskutočňovať hybridizáciu pri hodnote $T_m - 25$ °C. Hybridizácia s kratšími molekulami nukleových kyselín sa preto často uskutočňuje pri teplote, ktorá je nižšia len o 5 až 10 °C ako je hodnota T_m . Existuje pravidlo, že každé 1 % nesprávneho párovania znižuje hodnotu T_m o 1 až 1,5 °C. Výhodné je, aby sa hybridizačné podmienky vybrali tak, aby sa vyskytovalo menej ako 25 % nesprávnych párov. Výhodnejšie je ak sa vyskytuje menej ako 10 % nesprávnych párov alebo menej ako 5 %. Po hybridizácii nasleduje premytie v prísnejších podmienkach. Prvé premytie sa môže uskutočniť v menej prísnych podmienkach, ale potom nasleduje premytie v prísnych podmienkach, až sa dosiahnu podmienky, pri ktorých prebiehala hybridizácia.

Pretože odborník je schopný meniť parametre podľa toho ako je to vhodné za účelom dosiahnutia vhodných hybridizačných podmienok, je možné do premenných zahrnúť aj dĺžku polynukleotidu, zastúpenie báz, podstatu duplexu (DNA/DNA, RNA/RNA alebo DNA/RNA), typ prítomného iónu atď...

Najvýhodnejšie je, keď hybridizujúce molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu hybridizujú s molekulou DNA, ktorá má sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako GW SEQ alebo jednu alebo viac oblastí ohraničených v rámečku na obrázku č. 7.

Hybridizujúce molekuly nukleových kyselín sa môžu použiť napríklad ako sondy alebo primery.

Sondy sa môžu použiť na čistenie a/alebo identifikáciu nukleových kyselín. Môžu sa použiť aj na diagnostikovanie. Sondy sa môžu použiť napríklad na stanovenie toho, či jednotlivci vykazujú defekt vo svojom genóme, ktorý môže ovplyvniť transkripciu Egr-1 alebo reguláciu takejto transkripcie. Také defekty môžu u jedincov viesť k rôznym poruchám, ktoré sa môžu liečiť podľa vynálezu. Hojenie rán je napríklad možné porušiť mutáciami v jednom alebo vo viacerých SRE. Takéto mutácie sa môžu identifikovať použitím sond, ktoré hybridizujú s vyšším stupňom špecificity s jedným alebo viacerými SRE uvedenými v GW SEQ v porovnaní so zodpovedajúcim mutantom SRE (a naopak).

Ak je to nutné, hybridizujúce molekuly podľa vynálezu silnejšie hybridizujú s molekulou DNA majúcou sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako GW SEQ alebo s jednou alebo viacerými rámečkom ohraničenými oblasťami, v porovnaní s molekulou DNA majúcou sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako sekvencia ON SEQ alebo s jednou alebo viacerými jej ohraničenými oblasťami. Hybridizujúca molekula sa môže napríklad navrhnuť s vysokým stupňom špecificity pre jednu alebo viac oblastí SRE3, SRE5 a cAMP uvedených v GW SEQ na obrázku č. 7 (všetky tieto oblasti vykazujú rozdiely v sekvencii v porovnaní so zodpovedajúcimi oblasťami ON SEQ).

Hybridizujúce molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu zahŕňajú primery. Primery je možné použiť na amplifikáciu nukleových kyselín alebo ich častí, napríklad metódou PCR.

Okrem toho, že hybridizujúce molekuly nukleových kyselín je možné použiť ako sondy a primery, môžu sa použiť ako antisense molekuly za účelom zmenenia expresie. Tento postup je možné použiť na antisense liečbu. Antisense molekuly sa môžu napríklad použiť na blokovanie alebo obmedzenie expresie Egr-1 predchádzaním alebo obmedzením sily transkripcie. V inom prípade sa môžu použiť

na prevenciu alebo zníženie regulácie transkripcie Egr-1 daným regulátorom naviazaním na oblasť, na ktorú sa bude regulátor v normálnom prípade viazať.

Je nutné poznamenať, že molekuly nukleovej kyseliny vhodné na použitie podľa vynálezu zahŕňajú nie len molekuly s klasickou štruktúrou DNA alebo RNA, ale aj varianty s upraveným (nie s fosfodiesterovým) hlavným reťazcom. Sú to napríklad morfolinoderiváty a peptidové nukleové kyseliny (PNA), ktoré obsahujú pseudo-peptidovú kostru založenú na *N*-(2-aminoetyl)glycíne (opisuje sa v publikácii Nielsen, P.E., Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 24 167-83 (1995)). Varianty nukleových kyselín s upravenou kostrou môžu vykazovať zvýšenú stabilitu v porovnaní s neupravenými nukleovými kyselinami a sú použiteľné najmä ak je nutné dosiahnuť dlhotrvajúcu hybridizáciu (napríklad pri antisense terapii).

Z vyššie opísaných skutočností vyplýva, že vynález opisuje veľký počet nukleových kyselín. Z obsahu vyplýva, že molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu môžu vykazovať jednu alebo viac z nasledujúcich charakteristík:

- 1) Môžu sa vyskytovať vo forme DNA alebo RNA (zahŕňajú varianty prirodzene sa vyskytujúcich štruktúr DNA alebo RNA, ktoré obsahujú neprirodzené sa vyskytujúce bázy a/alebo neprirodzené sa vyskytujúce kostry).
- 2) Môžu byť jednoreťazcové alebo dvojureťazcové (zahŕňajú tak daný reťazec, ako aj jeho komplement, či už sú alebo nie sú spojené).
- 3) Môžu existovať v rekombinantnej forme, to znamená, že sú kovalentne spojené s heterológnou sekvenciou ohraničujúcou 5' a/alebo 3' koniec, čím vzniká chiméerna molekula (napríklad vektor), ktorá sa v prírode nevyskytuje.
- 4) Môžu sa vyskytovať bez sekvencií ohraničujúcich 5' a/alebo 3' koniec, tak ako sa v normálnom prípade vyskytujú v prírode.
- 5) Môžu existovať v podstate čistej forme (napríklad v izolovanej forme). To je možné uskutočniť napríklad použitím sond, aby sa izolovali klonované molekuly, ktoré majú požadovanú cieľovú sekvenciu, alebo použitím metódy chemickej syntézy. Takže nukleové kyseliny môžu existovať vo forme, ktorá v podstate neobsahuje žiadne kontaminujúce proteíny a/alebo iné nukleové kyseliny.
- 6) Môžu existovať s intrónami (napríklad ako gén s úplnou dĺžkou) alebo bez intrónov.

Molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu môžu obsahovať ľubovoľnú požadovanú sekvenciu. Napríklad jeden alebo viacero elementov odozvy na sérum sa môže operatívne viazať na kódujúcu sekvenciu, ktorá nie je v normálnom prípade spojená s takýmito elementami. To je možné využiť napríklad na hojenie rán, ak je nutné získať odozvu na sérum s ohľadom na dané terapeutické činidlo kódované kódujúcou sekvenciou, ktoré v normálnom prípade nevykazuje odozvu na sérum.

Avšak vhodné je, že molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu obsahujú kódujúcu sekvenciu Egr-1 alebo jeho aktívneho fragmentu.

Je nutné, aby molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu obsahovali promótorovú oblasť a mohli sa použiť za vzniku Egr-1 tak, že umožnia transkripciu mRNA Egr-1. Tá sa môže prekladať prostredníctvom ribozómov nachádzajúcich sa v hostiteľovi. Molekuly nukleových kyselín sa môžu podať subjektu (výhodne človeku alebo inému cicavcovi) tak, že sa ďalšie molekuly môžu syntetizovať v subjekte alebo (čo je menej výhodné) sa môžu použiť na prípravu samotného Egr-1, ktorý sa potom môže podať subjektu.

Molekuly výhodných nukleových kyselín podľa vynálezu aplikované subjektu sa môžu prepísať takým spôsobom, že transkripcia sa môže regulovať jedným alebo viacerými faktormi, ktoré regulujú transkripciu Egr-1 v subjekte.

Môže sa napríklad pripraviť jeden alebo viac SSRE (ako sú opísané vyššie), aby sa dosiahla transkripcia Egr-1 s odozvou na stres. Výhodné je najmä, aby sa molekuly nukleovej kyseliny podľa vynálezu aplikovali pacientovi (radšej ako aplikácia samotného Egr-1). Odozva na stres je výhodná tam, kde sa molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu používajú *in vivo* na liečbu rán. To je z toho dôvodu, že stres v mieste poranenia môže viesť k vylučovaniu faktorov, ktoré sa viažu na SSRE, ktoré môžu stimulovať transkripciu Egr-1. Zvýšené množstvo Egr-1 môže urýchliť hojenie rán.

V niektorých prípadoch môže byť nutné obmedziť silu odpovede na stres. Môže byť napríklad nutné týmto spôsobom spomaliť liečbu poranení (napríklad, aby sa obmedzilo vytváranie jaziev). V inom prípade je nutné redukovať nebezpečenstvo kardiovaskulárnych problémov spojených s odozvou na stres.

Vynález ďalej opisuje celé sekvencie piatich ľudských SRE asociovaných s reguláciou transkripcie ľudského Egr-1. Jedno alebo viac SRE sa môže upraviť mutáciou, aby sa obmedzila odozva na stres a to na silu odozvy získateľnej použitím jedného alebo viacerých SRE zobrazených na obrázku č. 7 v GW SEQ.

V inom prípade môže byť nutné zvýšiť silu odpovede na stres tým, že sa uskutočnia mutácie v jednej alebo vo viacerých z piatich SRE tak, že sa zvýši odozva na stres v porovnaní s odozvou použitím SRE zobrazených v GW SEQ na obrázku č. 7. Takéto mutácie sa môžu použiť napríklad na zrýchlenie liečby poranenia.

Molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu môžu byť vo forme vektorov, hoci to nie je podstatné. Môžu sa aplikovať pacientovi pomocou fyzikálnych metód. Takéto metódy zahŕňajú povrchovú aplikáciu nahých vektorov nukleovej kyseliny vo vhodnom vehikule, napríklad v roztoku farmaceuticky prijateľného excipienta, ako je fyziologický roztok tlmový fosforečnanom (PBS). Takéto metódy zahŕňajú bombardovanie časticami (ktoré je známe aj ako technológia génového delu) a opisujú sa v publikácii US 5371015. Inertné častice, ako napríklad zlaté častice, pokryté nukleovou kyselinou, sú urýchľované rýchlosťou dostatočnou na to, aby prestúpili povrchom do miesta poranenia (napríklad kožou), spôsobom vypustenia za vysokého tlaku z vhodného strieľajúceho zariadenia (častice sú pokryté molekulami nukleovej kyseliny podľa vynálezu, vynález zároveň opisuje aj zariadenie, ktoré obsahuje takéto častice). Iné fyzikálne metódy aplikácie DNA priamo do recipienta zahŕňajú ultrazvuk, elektrickú stimuláciu, elektroporáciu a mikrovýsev. Výhodný je najmä spôsob mikrovýsevu. Ten sa opisuje v publikácii US 5697901.

Molekuly nukleovej kyseliny podľa vynálezu sa môžu aplikovať aj spôsobom špecializovaných zavádzacích vektorov.

Môže sa použiť ľubovoľný vektor vhodný na génovú terapiu. Prístupy génovej terapie sa opisujú napríklad v publikácii Verna a ďalší, Nature 389: 239-242. Môžu sa použiť tak nevírusové, ako aj vírusové systémy.

Systémy založené na vírusoch zahŕňajú retrovírusový, lentivírusový, adenovírusový, adenoasociovaný vírusový systém a systém založený na víruse herpes a vakcinia.

Nevírusové systémy zahŕňajú priamu aplikáciu nukleových kyselín a systémy založené na lipozómoch.

Sekvencie nukleových kyselín podľa vynálezu sa môžu aplikovať dokonca spôsobom transformovaných hostiteľských buniek. Takéto bunky zahŕňajú bunky získané z objektu. Molekuly nukleových kyselín podľa vynálezu sa môžu zaviesť do takýchto buniek *in vitro* a transformované bunky sa neskôr môžu vrátiť do subjektu. Molekuly nukleových kyselín sa nemusia zavádzať ako vektory, pretože sa môžu zaviesť nevektorové molekuly nukleových kyselín. Niektoré molekuly sa môžu začleniť do nukleovej kyseliny, ktorá sa už nachádza v hostiteľskej bunke, homologickou rekombináciou.

Vynález ďalej zahŕňa expresné systémy, ktoré sa môžu použiť za vzniku polypeptidov (napríklad Egr-1). Takéto polypeptidy sa potom môžu použiť na terapiu.

Výhodnými expresnými vektormi sú eukaryotické vektory. Môžu sa však použiť aj prokaryotické vektory. Vhodné vektory vo všeobecnom prípade zahŕňajú kódujúcu sekvenciu operatívne spojenú s jednou alebo viacerými regulačnými sekvenciami. Výhodné je, ak kódujúca sekvencia kóduje Egr-1.

Množstvo rôznych expresných systémov sa opisuje v publikácii Sambrook a ďalší, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Z predchádzajúcej diskusie vyplýva, že je vhodné, aby sa nukleové kyseliny podľa vynálezu (ktoré môžu byť prítomné vo forme vektorov) mohli použiť na rôzne terapeutické aplikácie, rovnako ako polypeptidy produkované použitím takýchto nukleových kyselín. Vynález ďalej opisuje farmaceuticky prijateľné zlúčeniny obsahujúce uvedené nukleové kyseliny alebo polypeptidy, najmä v kombinácii s farmaceuticky prijateľným nosičom alebo nosičmi.

Takéto nosiče môžu zahŕňať, ale nie sú obmedzené na fyziologický roztok, tlmený fyziologický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, etanol a ich kombinácie.

Polypeptidy a nukleové kyseliny sa môžu použiť podľa vynálezu samotné alebo v spojení s inými látkami, ako sú terapeutické látky. Za istých okolností sa môžu aplikovať represory Egr-1 (ako napríklad NAB1 a/alebo NAB2) (napríklad ak je nutné minimalizovať tvorbu jaziev, aby sa inhibovala resterióza, aby sa upravila

kalcifikácia steny ciev a/alebo aby sa inhibovala proliferácia buniek (napríklad pri zhubnom bujení)). Ak sa majú aplikovať dve alebo viac aktívnych činidiel, môže sa to uskutočniť kombinovaným prostriedkom na súčasné, oddelené alebo postupné použitie.

Farmaceutické prostriedky podľa vynálezu sa môžu aplikovať ľubovoľným účinným spôsobom, ktorý zahŕňa okrem iného napríklad povrchovú, intravenóznú, intramuskulárnu, intranazálnu alebo intradermálnu cestu. Vo všeobecnom prípade je výhodné, ak sa zlúčeniny môžu aplikovať lokálne, napríklad do alebo blízko miesta poranenia. Môže sa však použiť systémová aplikácia.

Aktívne činidlo sa môže aplikovať jednotlivcovi ako injektovateľná zlúčenina, napríklad ako sterilná vodná disperzia. Výhodné je, aby bola prakticky izotonická s telesnými tekutinami pacienta (napríklad krvou pacienta).

V inom prípade sa prostriedok môže pripraviť tak, aby bol vhodný na povrchovú aplikáciu napríklad vo forme masť, krémov, roztokov, očných masť, očných kvapiek, ušných kvapiek, ústnej vody, nasýtených obväzov a chirurgických nití a vo forme aerosolov. Môže obsahovať aditíva, ktoré zahŕňajú napríklad konzervačné činidlá, rozpúšťadlá, ktoré napomáhajú prestúpeniu liekov, a zmäkčujúci prostriedok v prípade masť a krémov. Takéto povrchové prostriedky môžu obsahovať aj kompatibilné nosiče, ako sú napríklad krémy alebo základ masť a etanol alebo oleylalkohol v prípade roztokov. Takéto nosiče môžu tvoriť približne 1 % až približne 98 % hmotnosti prostriedku. Je obvyklé, že budú tvoriť približne 80 % hmotnosti prostriedku.

Najvýhodnejšie sú farmaceutické prostriedky, ktoré obsahujú nukleové kyseliny podľa vynálezu upravené na aplikáciu technológiou génového delu. Takéto nukleové kyseliny sa môžu spájať s časticami (napríklad so zlatými časticami), ktoré sa potom môžu použiť ako projektily.

V prípade aplikácie cicavcom, najmä ľuďom, sa potom očakáva, že denná dávka aktívneho činidla sa bude pohybovať v rozmedzí 0,01 mg/kg až 10 mg/kg, v typickom prípade približne 1 mg/kg. V praxi lekár stanoví aktuálnu dávku, ktorá bude najvhodnejšia pre daného jednotlivca, a tá sa môže meniť v závislosti na veku, telesnej hmotnosti a stave určitého jednotlivca. V prípade, že vzniknú vedľajšie účinky, je možné dávku znížiť v súlade s klinickou praxou.

Okrem terapeutického použitia sa môže vynález použiť aj na diagnostikovanie. Ako je uvedené vyššie, vynález opisuje sondy, ktoré je možné použiť na diagnostikovanie rôznych porúch. Tie môžu existovať ako súčasť diagnostického kitu, ktorý môže obsahovať aj iné komponenty. Napríklad jeden alebo viac premývacích roztokov, prostriedky detegovania hybridizácie, inštrukcie na použitie. Sondy sa môžu označiť detegovateľným markerom (napríklad fluorescenčným markerom alebo rádioaktívnou značkou).

Vynález sa môže použiť na skrining. Molekula nukleovej kyseliny podľa vynálezu (ako napríklad molekula obsahujúca GW SEQ uvedenú na obrázku č. 7 alebo jej časť) sa môže použiť na testovanie zlúčenín, ktoré sa na ňu viažu. Takéto látky sa môžu testovať, aby sa zistilo, či ovplyvňujú transkripciu Egr-1. Môžu sa použiť aj na navrhovanie liekov na liečbu, ktorá je opísaná vyššie v texte. V inom prípade sa molekula nukleovej kyseliny podľa vynálezu môže použiť na testovanie látky schopnej blokovat' naviazanie inej zlúčeniny na molekulu nukleovej kyseliny. V prípade, že iná zlúčenina je regulátorom transkripcie zlúčeniny Egr-1, môžu sa zlúčeniny blokujúce uvedené naviazanie tiež použiť na navrhovanie liekov vhodných na liečbu uvedenú vyššie v texte.

Vynález je možné použiť aj vo výskume. Molekuly nukleovej kyseliny podľa vynálezu sa môžu použiť ako východiskový materiál na štúdiu, v ktorej sa uskutoční jedna alebo viac zmien vzťahujúcich sa k danej molekule nukleovej kyseliny. To je možné uskutočniť, aby sa zistilo, ktorá ich časť je dôležitá na transkripciu Egr-1 alebo na reguláciu takejto transkripcie. Napríklad sa môže uskutočniť inzercia/delécia/substitúcia vzhľadom k jednej alebo viacerým oblastiam ohraničeným v rámečku uvedeným na obrázku č. 7 v GW SEQ a je možné skúmať účinok takejto inzercie/delécie/substitúcie. Zmeny sa môžu uskutočniť, aby sa skúsili identifikovať molekuly nukleových kyselín schopné zvýšiť alebo znížiť transkripciu Egr-1.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obrázku 1a a b je zobrazená expresia Egr-1 VEGF.

Na obrázku 1c a d je zobrazená expresia Egr-1 TGF-B1.

Na obrázku 1e a f je zobrazená expresia Egr-1 PDGF A.

Na obrázku 2a je zobrazený účinok Egr-1 na stiahnutie vyrezaných rán u potkanov.

Na obrázku 2b je znázornený účinok transfekcie DNA Egr-1 na histológiu hojenia vyrezaných rán u potkanov.

Na obrázku 2c je znázornený účinok Egr-1 na ukladanie kolagénu do vyrezaných rán u potkanov.

Na obrázku 2d je znázornený účinok Egr-1 na angiogénny profil vo vyrezaných ranách potkanov použitím imunologického farbenia WF.

Na obrázku 3a je zobrazená optimalizácia pomeru lipid:DNA (objem/hmotnosť) pri transfekcii plazmidu pGL3 luciferázovej kontroly do systému kokultivácie pri angiogenéze použitím Mirus TransIT (Cambridge Biosciences).

Na obrázku 3b je znázornený účinok Egr-1 na angiogonézu. CMV-Egr-1 DNA sa transfekovala do systému kokultivácie za použitia Mirus TransIT. Je znázornený Egr-1 v titračnom rozmedzí, bez spracovania, a účinky agonitu (VEGF proteín) a antagonistu (suramín).

Na obrázku 4a sú zobrazené vzorky vstupu do kostí použitím Western blot analýzy.

Na obrázku 4b je znázornená Western blot analýza proteínu Egr-1 v ľudských kostných bunkách TE85, ktoré sa vystavili nanoseniu. Šípka ukazuje Egr-1 proteín, dráhy 1 a 2 = pozitívna kontrola, dráha 3 = PMA kontrola po 24 hodinách, dráhy 4 až 8 znamenajú nanosenie na 2, 4, 6, 24 a 48 hodín a dráhy 9 až 13 sú nenanesené kontroly.

Obrázok 4c znázorňuje analýzu PDGF BB pomocou ELISA testu, pričom PDGF BB sa produkuje z kostných buniek TE85 po vystavení nanoseniu.

Na obrázku 4d je zobrazená detekcia VEGF a TGF-B1 po transfekcii CMV-TGF-B1 do buniek COS.

Na obrázku 4e je zobrazená detekcia VEGF a TGF-B1 po transfekcii CMV-TGF-B1 do buniek MC3tE1.

Obrázok 5 znázorňuje účinok Egr-1 na množstvo alkalickéj fosfatázy v modeli tvorby ektopických kostí.

Na obrázku 6a je znázornené farbenie buniek ľudského hladkého svalstva transfekovaných CMV Egr-1 použitím anti-Egr-1 protilátok.

Na obrázku 6b je znázornené farbenie buniek hladkého svalstva transfekovaných DNA CMV Egr-1 použitím anti-Egr-1 protilátok.

Na obrázku 6c je znázornená optimalizácia transfekcie kontroly pGL3 luciferázy do ľudských SMC pomocou Fugene.

Na obrázku 6d je znázornená optimalizácia transfekcie kontroly pGL3 luciferázy do prasačích SMC pomocou Fugene.

Na obrázku 6e je znázornená aktivácia produkcie/vylučovania VEGF transfekciou CMV-Egr-1 do ľudských SMC.

Na obrázku 6f je znázornená aktivácia produkcie/vylučovania HGF transfekciou CMV-Egr-1 do ľudských SMC.

Na obrázku 6g je znázornená aktivácia produkcie/vylučovania PDGF transfekciou CMV-Egr-1 do ľudských SMC.

Obrázok 6h zobrazuje imunologické farbenie proteínu Egr-1 v stenách ciev pred a po poranení.

Obrázok 7 znázorňuje porovnanie nukleotidových sekvencií označených ako GW SEQ a ON SEQ. Sekvencia ON SEQ predstavuje publikovaný promótor odozvy skorého rastu 1 (Sakamoto a ďalší, Oncogene 6, 867-871, 1991) a GW SEQ je sekvencia podľa vynálezu, ktorá obsahuje množstvo inzercíí/delácií báz a substitúcií (podčiarknuté hrubou čiarou).

Obrázok 8 znázorňuje variant sekvencie uvedenej na obrázku 7, ktorý má upravenú oblasť EBS. Mutácia vo väzobnom mieste Egr-1 (EBS) je zvýraznená podčiarknutím hrubou čiarou).

Na obrázku 9 je zobrazená publikovaná 5' upstream sekvencia génu myšacieho Egr-1 (opisuje sa v publikácii Morris, Nucleic Acids Research, 16: 8835-8846). Nukleotidy sa číslujú od miesta medzery = +1. Pravdepodobné elementy TATA a CCAAT sú ohraničené rámcami. Potencionálne regulačné elementy sú podčiarknuté a sú uvedené na obrázku. Čiarkované podčiarknutie znázorňuje polohu 29-méru používaného pri štúdiách predĺžovania primeru.

Na obrázku 10 je znázornená aktivácia SRE5 prechodnou transfekciou pFA-MEK1.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklady 1 a 2 opisujú zavedenie plazmidovej DNA exprimujúcej β -galaktozidázu a Egr-1 pomocou génového dela do kože hlodavcov, pričom uvedená DNA tvorí komplex so zlatými časticami.

a) Príprava potrubia

Zariadenie na prípravu potrubia sa umiestnilo do sterilného digestora s lamiránym odťahom vzduchu a vytrelo sa 70% I.M.S. a sušilo sa na vzduchu v digestore. Plynové potrubie od valca s dusíkom k zariadeniu na prípravu potrubia sa sterilizovalo v autokláve a vložil sa filter Gelman s veľkosťou pórov 0,2 μm . Autoklávované potrubie sa spojilo s vtokovým otvorom pre plyn na prípravnom zariadení luerovým konektorom a plyn sa nechal pretekať rýchlosťou 0,2 litra/minútu, aby sa potrubie úplne vysušilo.

Potrubie na zavedenie častíc sa pripojilo k pripravenému zariadeniu a plyn sa nechal pretekať, aby úplne vyschlo vnútro trubiek. Zvyšková vlhkosť v trubkách vzniká na základe slabého alebo nedokonalého nanosenia zlatých častíc na steny trubiek a môže negatívne poškodiť výstupné údaje experimentu.

b) Príprava mikronosičových zlatých častíc s DNA:

Zlaté častice s veľkosťou 1,0 μm sa získali od firmy BioRad UK. Alikvoty zlatých častíc (53 mg) sa rozvážili do mikrocentrifugačných skúmaviek a pridalo sa 100 μl 0,05M spermidínu a skúmavky sa jemne miešali na vortexe.

Pridalo sa 100 μl roztoku DNA, ktorý obsahoval 100 až 120 μg plazmidovej DNA exprimujúcej buď Egr-1 alebo β -galaktozidázu, potom sa za stáleho miešania na vortexe po kvapkách pridalo 100 μl 1M roztoku CaCl_2 . Táto zmes sa nechala stáť počas 10 minút pri laboratórnej teplote a potom sa centrifugovala. Odstránil sa supernatant, pelet zlatých častíc sa trikrát premyl v absolútnom EtOH.

Zlaté častice sa nakoniec resuspendovali v absolútnom etanole, ktorý obsahoval 0,1 mg/ml polyvinylpyrolidónu (PVP).

Odhad účinnosti pokrývania zlatých mikročastíc s DNA a uvoľnenia vo vodnom roztoku: Vo všetkých vzorkách (východiskový materiál, supernatant po zrážaní, tvorba komplexov DNA/zlato a eluovaný materiál) sa testovala prítomnosť DNA použitím testu GeneQuant (Pharmacia). Zvyšková DNA po precipitácii udáva mieru nenaviazaného materiálu a pomer viazaného ku počiatočnému materiálu udáva účinnosť pokrývania.

c) Nanesenie suspenzie DNA/mikronosič do potrubia na zavedenie zlata:

Suspenzia zlatých častíc v zmesi etanol/PVP sa potom naniesla do zavádzacieho potrubia použitím striekačky a suspenzia sa nechala stáť 3 až 5 minút v potrubí. V priebehu tohto času sa častice zrážali na vnútornom povrchu potrubia, čo umožnilo, aby sa etanol odstránil striekačkou. Keď sa mal etanol odstrániť, potrubie sa otáčalo a častice sa distribuovali na vnútornom povrchu potrubia. Po 2 až 3 minútach otáčania prešiel cez potrubie dusík s rýchlosťou 0,1 litra/minútu, aby sa odstránil zvyšný etanol, a aby sa nechali adherovať zlaté častice. Po 10 minútach sa potrubie vyňalo, narezalo sa na vhodné dĺžky použitím noža, ktorý poskytuje firma Bio-Rad UK, a narezané potrubie sa vnieslo do génového dela.

Expresia Egr-1 a aktivita sa stanovovala použitím štandardných imuno-histochemických metód s bežne dostupnými protilátkami, aby sa detegoval Egr-1 (Santa Cruz) a 1 až 7 dní sa monitorovala produkcia a expresia Egr-1 cieľového génu (Santa Cruz alebo R plus D systémy). Negatívna kontrola neobsahovala DNA.

Príklad 1

Zavedenie Egr-1 DNA do nepoškodenej kože hlodavca

1.1. Spôsoby

Expresný plazmid obsahujúci Egr-1 cDNA riadenú promótorom ľudského cytomegalovírusu (hCMV, opisuje sa v publikácii Houston a ďalší, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 281-289, 1999) sa zaviedol do chrbta neporanených myší prostredníctvom technológie génového dela. Komplexy zlato/DNA sa pripravili vyššie opísaným spôsobom a 0,5 až 1,0 μg DNA sa zaviedlo do jedného zvieraťa použitím génového dela a tlaku 2,45 MPa a zlatých častíc s veľkosťou 1,6 μm .

Zvieratá sa usmrtili v dňoch 0, 1, 2 a 6 po zavedení DNA a koža sa uložila do OTC a rýchle sa zmrazila v zmesi suchého ľadu a hexánu. Pripravili sa rezy s hrúbkou 0,7 μm a cieľové rastové faktory Egr-1 sa testovali imunologickým farbením použitím protilátok nasmerovaných proti VEGF, PDGF A, TGF β a Egr-1.

1.2. Výsledky

Uvedené sú imunohistochemické údaje pre prípad Egr-1 aktivácie VEGF (obrázky 1a a 1b), TGF β (obrázky 1c a 1d) a PDGF A (obrázky 1e a 1f). Výsledky dokazujú dramatickú pozitívnu reguláciu proteínu VEGF na 1. a 2. deň, ktorá sa znižovala na 6. deň, pozitívnu reguláciu TGF β na 6., ale nie v dňoch 1 a 2, a rýchlu pozitívnu reguláciu PDGF A dve hodiny po zavedení Egr-1 DNA (označené ako deň 0).

1.3. Záver

Tieto údaje potvrdzujú, že Egr-1 môže aktivovať expresiu cieľových rastových faktorov *in vivo*. Tieto údaje ilustrujú, že aktivácia Egr-1 rastových faktorov sa objavuje na dočasne oddelenej časovej osi.

Po potvrdení aktivácie cieľových génov Egr-1 použitím neporanenej kože hlodavcov (príklad 1), sa uskutočnilo zavedenie génov Egr-1 a β -galaktozidázy do vyrezaných rán potkanov pomocou génového dela, aby sa zistil vplyv Egr-1 na rýchlosť hojenia.

Príklad 2

Použitie transkripčného faktora Egr-1 na podporenie hojenia rán hlodavcov

2.1. Metódy

2.1.1. Konštrukcia plazmidov

V tejto štúdii sa používali expresné plazmidy CMV riadené β -galaktozidázou a Egr-1 (opisuje sa v publikácii Houston a ďalší, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 281-289, 1999). Plazmidy sa pomnožili v baktériách *Escherichia coli* XL-2 Blue MR a DNA sa pripravila použitím kitu Qiagen.

2.1.2. Transfer génov sprostredkovaný časticami

18 potkanov Sprague Dawley, ktoré mali telesnú hmotnosť 250 g, sa uspalo izofloránom v zmesi 2:1 kyslík:oxid dusitý. Na chrbte potkanov sa pripravili dve miesta na transfekciu (8 cm od lebky, 1,5 cm na oboch stranách chrbta) a to tak, že sa najprv scvakla koža a potom sa prerezala žiletkou. V jednom mieste, 8 mm od poranenia, sa uskutočnili dve transfekcie urýchlenými komplexami DNA/zlaté častice buď s Egr-1, alebo β -galaktozidázou, do kože pri tlaku 2,45 MPa. Celkové množstvo DNA bolo menšie než 1,7 μ g na jednu transfekciu (3,4 μ g na jednu ranu).

2.1.3. Model hojenia rezných rán

24 hodín po transfekcii sa zvieratá uspalo a pripravili sa 2 rany s úplnou šírkou (priemer 8 mm) použitím žiletky na biopsie v skutočnom mieste transfekcie (opisuje sa ďalej v texte). Bezprostredne po príprave rán sa každá rana zašila použitím sady kamera/video a zvieratá sa nechalo zotaviť z anestézie. 2., 4. a 6. deň po vytvorení rán sa 6 zvierat usmrtilo a každá rana sa zašila použitím rovnakej sady kamera-video. Rany sa pitvali a nasledovalo odobranie vzoriek na histológiu a imunohistochemiu.

2.1.4. Analýza hojenia

i) Makroskopické hodnotenie

Plocha poranení sa stanovila použitím analýzy zobrazení a hojenie sa vykazovalo ako zväčšenie pôvodnej plochy rany. Štatistická významnosť rozdielov medzi ošetrovanými a kontrolnými skupinami sa podotkla použitím testu Mann-Whitney.

ii) Mikroskopické hodnotenie

Histologická analýza:

Každá rana sa v určitom časovom bode po vyrezaní horizontálne rozpolila. Jedna polovica sa umiestnila do 4% formaldehydu na 24 hodín a spracovala sa na histologickú analýzu použitím vosku. Z každej rany sa narezali rezy s hrúbkou 5 μ m

použitím mirotomu a rezy sa farbili podľa Geisona. Použitím uvedeného histologického farbiva sa hodnotili kľúčové markery hojenia rán, ktoré zahŕňali obnovu epitelu a obsah kolagénu a tieto markery sa porovnávali medzi kontrolnými a ošetrovanými rezmi.

Imunohistochemia:

Imunologická cytochemická analýza sa uskutočnila, aby sa kvantifikovali rozdiely použitím histológie. Po zamrazení v OCT sa druhá polovica každej rany rozdelila na rezy s hrúbkou 7 μm použitím kryostatu. Dva rezy z každej rany sa fixovali v acetóne chladenom ľadom a uskutočnilo sa fluorescenčné imunologické farbenie kolagénu I a faktora Von Willebrand (vWF). Bezprostredne po imunologickom farbení sa každé sklíčko umiestnilo pod fluorescenčný mikroskop a plocha rany sa zašila použitím 25x zväčšenia. Obraz sa integroval a stanovil sa pás citlivosti, aby sa minimalizovalo pozadie. Plocha a intenzita farbenia sa merala použitím analýzy obrazu a zaznačila sa do grafu. Štatisticky významné rozdiely medzi ošetrovanou a kontrolnou skupinou sa hodnotili použitím Man-Whitney testu bez parametrov.

2.2. Výsledky

2.2.1. Účinok Egr-1 na hojenie rezných rán u potkanov

(i) Stiahnutie rany

Celá hrúbka potkaních rezných dermálnych rán, čo je 8 mm v priemere, sa stiahla zjavne rýchlejšie následkom odozvy na transfekciu Egr-1 v porovnaní s kontrolou (β -galaktozidáza) až do 6-teho dňa po vytvorení rany. Štatisticky významné zvýšenie stiahnutia ($p < 0,05$) sa objavilo 6 dní po vytvorení rany, pričom rany ošetrované s Egr-1 sa zmrštili na plochu o 7 % menšiu než v prípade kontrolných rán (obrázky č. 2a).

(ii) Histologická analýza

Rezy rán zafarbené podľa Van Giesona vykazujú veľké rozdiely v histológii rán 4 až 6 dní po vytvorení rán. Druhý deň po vytvorení rán existoval malý rozdiel

medzi ranami transfekovanými Egr-1 a β -galaktozidázou. Pri oboch typoch liečby existujú v mieste poranenia mononukleárne bunky, ktoré indukujú skorú zápalovú odozvu s vytvorením jazvy, ale nedochádza k opätovnému vytvoreniu epitelu. 4 dni po vytvorení epitelu sa rany úplne nezahojili, ale rany transfekované Egr-1 mali viac kolagénu v porovnaní s miestom poranenia transfekovaným β -galaktozidázou. 6 dní potom, čo sa rany ošetrili s Egr-1, vykazovali zrelšie granulované tkanivo, ktoré obsahovalo zreteľne viac kolagénu v mieste poranenia v porovnaní s β -galaktozidázou až do rozsahu, kedy bolo možné jasne vidieť tenké vlákna kolagénu. Obnova epitelu je dokončená v 50 % poranení ošetrovaných s Egr- v porovnaní s 0 % pri ošetrovaní s β -galaktozidázou. Z hľadiska histológie vykazujú rany ošetrované s Egr-1 zrýchlené hojenie v porovnaní s ranami ošetrovanými s β -galaktozidázou (obrázok č. 2b).

(iii) Kvantifikácia vplyvu Egr-1 na ukladanie kolagénu použitím imunohistochemickej analýzy a zobrazovacej analýzy

Imunologické farbenie kolagénu I sa uskutočnilo použitím kryorezov rán s hrúbkou 7 μ m, ktoré sa ošetrili s Egr-1 alebo β -galaktozidázou a farbenie sa kvantifikovalo použitím zobrazovacej analýzy. Poranenia ošetrované β -galaktozidázou vykazovali podstatne viac kolagénu 3 dni po vytvorení rany v porovnaní s Egr-1. 4 až 6 dní po transfekcii rany s Egr-1 sa v ranách začalo ukladať viac kolagénu ako v kontrolách (β -galaktozidáza), čo potvrdzuje zistenia použitím rutinných histologických metód s voskom. Transfekcia s Egr-1 zvýšila množstvo uloženého kolagénu štyri až šesť dní po vytvorení rán (obrázky č. 2c).

(iv) Kvantifikácia účinku Egr-1 na angiogézu použitím imunohistochemickej analýzy a zobrazovacej analýzy

Angiogéza sa kvantifikovala použitím imunologického farbenia Von Willenbrandového faktora použitím kryorezov rán a zobrazovacej analýzy, aby sa zmerala plocha pozitívneho farbenia v mieste poranenia. Dva dni po transfekcii s Egr-1 vykazovali rany podstatne väčšie množstvo krvných ciev (hodnota p je menšia než 0,01) v porovnaní s kontrolou (β -galaktozidáza). 4 a 6 dní po transfekcii s Egr-1

a β -galaktozidázou sa dosiahol podobný stupeň angiogenézy. Transfekcia s DNA exprimujúcou Egr-1 vykazuje angiogenézu o dva dni skôr ako pri β -galaktozidáze (obrázok č. 2d).

2.3. Závěry

Transfekcia rezných rán u potkanov s Egr-1 zrýchlila hojenie, zrýchlila zaceľovania, obnovovanie epitelu a ukladanie kolagénu. Transfekcie Egr-1 podporujú aj angiogenozu dva dni po vytvorení rany.

Príklad 3

Použitie transkripčného faktora Egr-1 na podporu angiogenézy

3.1. Metódy

Egr-1 riadený promótorom hCMV (opisuje sa v publikácii Houston a ďalší, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 281-289, 1999) sa transfekoval do systému ko-kultúr ľudských buniek, aby sa stanovila miera angiogenézy *in vitro*. Kit na angiogenézu (TCS Biologicals) sa použil spôsobom opísaným výrobcou použitím proteínu VEGF (2 ng/ml) ako pozitívnej kontroly a suramínu (20 μ M) ako negatívnej kontroly v prípade angiogenézy.

Optimalizácia transfekcie v systéme ko-kultúr sa uskutočnila použitím pGL3 kontrolnej luciferázy (Promega) s 1,0 μ g a 0,5 μ g CMV- β gal, ako normalizačným plazmidom vhodným na riadenie transfekcie. Použili sa dva pomery lipid:DNA (objem/hmotnosť), 2:1 a 4:1 (obrázok č. 3a). DNA CMV Egr-1 sa transfekovala v množstvách 0,5, 1,0 a 1,5 a 2,5 μ g na jednu jamku trojmo na mikrotitračnej doštičke s 24 jamkami použitím činidla Mirus Transit (Cambridge Biosciences) v pomere s DNA 2:1 (objem/hmotnosť). Do jamiek sa pridal, ako pozitívna kontrola, proteín VEGF, a ako negatívna kontrola, suramín. Po 11 dňoch ko-kultivácie sa stanovila angiogenéza farbením endoteliálneho bunkového markeru PECAM-1 a vizualizáciou substrátom BCIP/NBT.

Zaznamenávalo sa reprezentatívne zobrazenie tvorby tubulov použitím všetkých štyroch dávok expresného plazmidu Egr-1 spolu s proteínom VEGF (pozitívna kontrola) a suramínom (negatívna kontrola) a spracovávalo sa

zobrazovacou analýzou použitím analyzátoru zobrazení Quantimet 600 a vhodného softweru.

3.2. Výsledky

Angiogenéza vyjadrená, tvorbou tubulov, viditeľná svetelným mikroskopom, sa detegovala po 11 dňoch spoločnej kultivácie. Angiogénne skóre sa prezentuje ako analýza zobrazení, uvedené v celej bunke, a výsledky sa prezentujú ako tubuly na jednotku plochy *versus* ošetrovanie (obrázok č. 3b).

Bunky ošetrované proteínom VEGF vykazujú zvýšenú tvorbu tubulov (bunky ošetrované proteínom suramín a zvýšená tvora tubulov). Ukázalo sa, že Egr-1 vykazuje zvýšenú tvorbu tubulov spôsobom inverzne závislým na dávke.

3.3. Závery

V ko-kultivačnom systéme je expresia transkripčného faktora Egr-1 angiogénna. Túto skutočnosť podporujú údaje z príkladu 1, pričom sa ukázalo, že Egr-1 pozitívne reguluje expresiu rastového faktora (napríklad VEGF), keď sa zavedie do myšej kože génovým delom a aj údaje z príkladu 5, kde transfekcia s Egr-1 vykazuje zvýšené množstvo VEGF produkované v bunkách ľudského vaskulárneho hladkého svalstva. Inverzná dávková odozva Egr-1, ako pro-angiogénny stimul, je v súlade s výsledkami získanými v príklade 6 a s predstavou, že Egr-1 môže negatívne regulovať svoju vlastnú produkciu (opisuje sa v publikácii Cao, X. a ďalší, J. Biol. Chem. 268, 16949-16957, 1993, Schwachtgen, J.-L. a ďalší, J. Clin. Invest. 101, 254-2549, 1998).

Príklad 4

Použitie transkripčného faktora na podporu osteogenézy *in vitro*

4.1. Aplikácia do kostí a stanovenie rastových faktorov

4.1.1. Metódy:

Používané boli bunky TE85, čo je bunková línia podobná osteoblastom získaná z osteosarkómu. Subkonfluentné bunkové vrstvy sa trypsinizovali a resuspendovali sa v DMEM, ktoré obsahovalo 10% fetálne telacie sérum (FCS) a

1% penicilín-streptomycín (PS). Bunková suspenzia sa vysiala na podklad (štvorec plastu upraveného pre tkanivovú kultúru s rozmermi 18x18 mm). Bunky sa cez noc nechali zachytiť. Keď sa bunky zachytili na podklade, preniesli sa do nádoby, ktorá obsahovala DMEM s 2% FCS a 1% PS, kde sa nechali ďalších 24 hodín v kľude, aby došlo k stimulácii.

Na obrázku 4a sú uvedené štyri sady podmienok pre každý časový okamžik:

(1) nanosenie (200 cyklov 2000 mikrozov pri rýchlosti 3232 mikrozov za sekundu).

(2) kontrola (nie je nanosená)

(3) pozitívna kontrola (100 ng/ml PMA počas 1 hodiny)

(4) rozpustná kontrola

V prípade nanášania buniek sa bunky asepticky preniesli zo štandardnej tkanivovej kultúry do komory. Nanosenie buniek do komory trvalo 4 minúty. Po nanosení sa bunky vrátili do svojich pôvodných kultivačných podmienok. Kontrolné ošetrené bunky sa v skutočnosti ošetrili rovnakým spôsobom s tou výnimkou, že nedošlo k nanoseniu do komory.

Výsledky sa analyzovali dvoma rôznymi spôsobmi. Najprv sa stanovila prítomnosť transkripčného faktora Egr-1 Western blot analýzou bunkového peletu. Bunkové pelety sa zhromaždili po nanášacích experimentoch (obrázok č. 4b). Po druhé sa stanovila prítomnosť vylučovaných rastových faktorov ELISA testom média tkanivových kultúr (obrázok č. 4C).

4.1.2. Závěry

Tieto výsledky dokazujú v podmienkach vnesenia do kostí, že transkripčný faktor Egr-1 sa produkuje v bunkách podobných osteoblastom získaných z ľudského osteosarkómu. Aplikácia vnesenia stimuluje v prípade ľudských buniek TE85 produkciu a vylučovanie rastových faktorov, ktorým je napríklad PDGF B.

4.2. Transfekcia CMV TGF- β 1 do MC3TE1 a buniek ROS, pričom potom nasledujú ELISA testy ľudského TGF- β 1 a myšacieho VEGF v supernatantoch bunkových kultúr

4.2.1. Materiály

(i) Transfekcia

Myšacie osteoblastové bunky (MC3TE1) a bunky potkanieho osteoblastómu (ROS17/2.8) sa použili na výsev na platne so 6 jamkami.

Bunky MC3T3E1 sa kultivovali v kultivačnom médiu MEM- α (Sigma), 10% fetálnom teľacom sére (Life Technologies), 1% L-glutamíne (Life Technologies), 1% penicilín-streptomycíne (Life Technologies).

Bunky ROS sa kultivovali v F12 HAM, F-12 HAM s glutamínom (Life Technologies), 10% fetálnom teľacom sére (Life Technologies), 1% penicilín-streptomycíne (Life Technologies).

Bunky sa transfekovali použitím Fugene (Boehringer Mannheim) s plazmidom exprimujúcim CMV TGF- β 1, ako sa opisuje v publikácii Benn, S.I. a ďalší, J. Clin. Invest., 98, 2894-2902, 1996). Transfekcia buniek sa uskutočnila nižšie uvedeným spôsobom:

- 1) Pripravila sa platnička so 6 jamkami, pričom v každej bolo 2×10^5 buniek, a nechala sa stáť cez noc, až sa dosiahla konfluentnosť na 50 až 70 %.
- 2) Na druhý deň sa pridalo 94 μ l kultivačného média bez séra (SFM) a do každej Eppendorfovej skúmavky sa pridalo 6 μ l prípravku Fugene a nechali sa stáť pri laboratórnej teplote 5 minút.
- 3) Zo 6 separátnych skúmaviek sa do 2 nedala žiadna DNA, zatiaľ čo do zvyšných 4 sa pridali 4 μ g DNA CMV-TGF- β 1.
- 4) Zmes opísaná v kroku 2), fugene/SFM, sa po kvapkách pridávala do skúmaviek opísaných v odstavci 3), skúmavky sa niekoľko krát obrátili a inkubovali sa 15 minút pri laboratórnej teplote.
- 5) Transformačná zmes fugen/SFM/DNA sa po kvapkách pridala do každej z jamiek, zatiaľ čo 6-jamková platnička sa pohybovala. Platnička sa inkubovala pri teplote 37 °C 48 hodín.
- 6) Supernatanty bunkovej kultúry sa rozdelili na alikvoty a skladovali sa pri teplote -20 °C. Vyššie opísaný protokol sa uskutočnil v prípade oboch druhov buniek, MC3TE1 a ROS.

Prítomnosť TGF- β 1 a VEGF v supernatante bunkovej kultúry sa detegovala testom ELISA (R plus D Systems) použitím farebného detekčného systému založeného na použití streptavidín-HRP.

4.2.2. Výsledky:

Produkcia a detekcia TGF- β 1 a VEGF po transfekcii s CMV-TGF- β 1 je zobrazená v prípade buniek ROS (obrázok č. 3) a v prípade buniek MC3TE1 (obrázok č. 4). Tieto údaje ukazujú, že cieľový gén Egr-1, v tomto prípade TGF- β 1, aktivuje produkciu VEGF.

4.3. Záver

Expresia Egr-1 a aktivácia cieľových génov Egr-1 môže synergicky aktivovať VEGF.

Príklad 5

Použitie transkripčného faktora Egr-1 na podporu osteogenézy *in vivo*

5.1. Tvorba ektopických väzieb u potkanov

Podkožná implantácia zlúčenín indukujúcich možnú väzbu u hlodavcov predstavuje biologický testovací systém (opisuje sa napríklad v Wozney, J.M., Cell. Mol. Biol., 131-167, 1993). Použitie nosičovej matrice zvyšuje reprodukovateľnosť a citlivosť väzobnej indukčnej odozvy. V testovacom systéme (opisuje sa v publikácii Reddi, A.H., a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1601-1605, 1972, Sampath, T.K., Ibid, 78, 7599-7603, 1981) sa nosičová matrica získala z diafyzálnej časti potkaních dlhých kostí, ktoré sa narezali na časti s určitou veľkosťou, následne sa demineralizovali a biologická aktivita sa odstránila extrakciou s guanidínom. Zvyšný nosič obsahuje primárne viazaný kolagén bez osteoindukčnej kapacity. Testovaná zlúčenina alebo látka sa potom ukladala do matrice zrážaním s alkoholom, dialyzovaním oproti vode alebo lyofilizáciou. Táto matricová kombinácia sa potom implantovala do podkožných tkanív potkana počas viacerých dní (v prípade uvedeného experimentu je to 12 dní). V implantátoch sa potom histologicky a biochemicky testovala ich schopnosť indukovať tvorbu kostí (opisuje sa v publikácii

Sampath, T.K. a ďalší, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6591-6595, 1983, Sampath, T.K. a ďalší, ibid, 84, 7109-7113, 1987, Wang, E. ibid, 85, 9484-9488, Wang, E. a ďalší, ibid, 87, 2220-2224, Sampath, T.K. a ďalší, J. Cell Biol., 98, 2192-2197, 1984).

5.1.1. Experimentálne metódy

Pripravilo sa 20 samcov potkanov Sprague Dawley (vek 42 až 49 dní, hmotnosť 170 až 220 g). Vybrali sa náhodne, aby sa im aplikovali dva implantáty zavedené pod kožu do dorzálneho thoraxu v anestézii halotánom. Implantáty sa ošetrili jedným z nasledujúcich štyroch ošetrení:

- negatívna kontrola - samotný nosič (demineralizovaná kostná matrica DGBM extrahovaná guanidínom)
- DNA CMV Egr-1, 500 µg na nosiči DGBM
- DNA CMV Egr-1, 500 µg plus rekombinantný morfogenetický proteín (BMP) 4, 5 µg na nosiči DGBM (BMP4 sa používa kvôli jeho chemotaktickým účinkom)
- rekombinantný proteín BMP4, 5 µg na nosiči DGBM

Deň zavedenia sa označil ako deň 0 a o 12 neskôr sa všetky potkany operatívne usmrtili použitím upravenej metódy, odstránili sa implantáty, odstránilo sa mäkké tkanivo a implantáty sa rozdelili na rovnaké polovice. Jedna polovica sa umiestnila do 10% formalínu na histologické testovanie a druhá polovica sa zamrazila a skladovala sa pri teplote -20 °C. V tejto vzorke sa potom testoval obsah vápnika a aktivita alkalickéj fosfatázy.

5.1.2 Príprava demineralizovaných kostí potkanov

Odstránila sa stredná časť femuru, tibie a humerusu dospelých potkanov Sprague Dawley, odstránila sa mäkká časť a špičkové dutiny sa vypláchli normálnym fyziologickým roztokom. Z kostí sa potom odstránil tuk miešaním v 100 ml zmesi chloroform:metanol (2:1) počas 30 minút. Tento krok sa opakoval ešte raz a potom nasledovalo sušenie na vzduchu v sušiarňi. Stredné časti kostí sa potom zmrazili v kvapalnom dusíku, a rozomleli sa na CRC mikro-mlynčeku. Výsledný prášok sa preosial, aby sa dosiahla diskretná veľkosť častíc 75 až 425 µm a potom sa

demineralizoval v 0,5M HCl 3 hodiny za stáleho miešania. Zmes sa potom 30 minút centrifugovala pri 190 000 ot./min. (Kontron CentriksT124, Rotor A8.24) pri teplote 15 °C. Pelet sa resuspendoval v 100 ml vody, miešal sa jednu hodinu a centrifugoval sa. Tento krok sa opakoval. Pelet sa potom resuspendoval v 100 ml etanolu, miešal sa jednu hodinu a centrifugoval sa. Etanol sa odparil a vzorka sa resuspendovala v zmesi 4M guanidínhydrochlorid/50mM Tris, pH 7,4 a miešala sa cez noc. Ďalšia centrifugácia sa uskutočnila s peletom resuspendovaným v 50 ml vody, ktorý sa miešal jednu hodinu a centrifugoval sa. Tento krok sa opakoval dvakrát. Vzorka sa potom sušila cez noc v sušiarni. Mechanickým miešaním a lyofilizáciou sa ku kostiam pridala DNA.

5.2. Histologické skúmanie

Po počiatočnom fixovaní vo formalíne sa vzorky zaliali metylmetakrylátom a narezali sa na rezy s hrúbkou 1 μm a zafarbili sa podľa Von Kossa a toluidínovou modrou. Z každého implantátu sa hodnotili tri rezy, ktoré spolu nesusedili.

V prípade chrupaviek a kostí sa použil štandardný skórovací systém.

± tentatívna identifikácia kostí alebo chrupavky

1. >10 % každého rezu novej chrupavky alebo kosti
2. > 25% každého rezu novej chrupavky alebo kosti
3. >50 % každého rezu novej chrupavky alebo kosti
4. >75 % každého rezu novej chrupavky alebo kosti
5. >80 % každého rezu novej chrupavky alebo kosti

5.3. Biochemický test

Tkanivo sa homogenizovalo v 2 ml ľadom chladenej zmesi 0,25M sacharózy a 3mM NaHCO₃. Homogenáty sa centrifugovali pri 12000 ot./min. 15 minút v dvoch stupňoch centrifugácie, a kvôli enzymatickému testu sa izolovali supernatanty. Aktivita alkalickéj fosfatázy sa stanovila použitím kolorimetrického testu s *p*-nitro-fenylfosforečnanom (PNP) ako substrátom. Po inkubovaní testovaných vzoriek s PNP pri teplote 37 °C sa stanovila optická hustota pri vlnovej dĺžke 405 nm na čítacom zariadení pre štandardné mikrotitračné platne.

5.4. Výsledky

Výsledky sú uvedené na obrázku č. 5. Analyzovali sa údaje získané po ošetrení dvoch implantovaných nezávislých miest v prípade každého potkana. Vzhľadom na malé množstvo údajov a asymetrickú distribúciu údajov sa prezentuje stredná hodnota a vnútorné kvartilové rozmedzie (IQR). Testy podľa Kruskal Wallisa sa uskutočnili s vyššie uvedenými premennými a zistilo sa, že množstvo alkalickéj fosfatázy sa vzájomne podstatne líši.

Tvorba kostí bola pozitívna v prípade jedného implantátu v prípade piatich implantovaných miest len v jednej skupine (CMV Egr-1 DNA/BMP). Počiatočný experiment použil jediný časový bod v prípade testu trvajúceho 12 dní, ktorý sa vybral, aby sa získali predpokladané výsledky. V tomto časovom okamžiku sa v podstate hodnotí aktivita alkalickéj fosfatázy pri DNA CMV Egr-1 a CMV Egr-1 DNA/BM4. Takéto dočasné zvýšenie aktivity alkalickéj fosfatázy je možné vidieť v typickom prípade (ako prekursor pri tvorbe kostí) so zlúčeninami, ako je BMP, ktoré stimulujú tvorbu kostí, maximálne 10 až 15 dní a potom tvorba kostí slabne. Obsah vápniku vo vzorkách nevykazuje podstatné rozdiely, hoci sa pozorovala skorá kalcifikácia v mnohých histologických vzorkách v skupine CMV-Egr-1/BMP4. To je možné vysvetliť plánovanými biopsiami v čase, kedy práve začala kalcifikácia.

5.5. Záver

Egr-1 zvyšuje silu alkalickéj fosfatázy v modeli hlodavcov pri tvorbe ektopických kostí a môže podporovať lokalizovanú tvorbu kostí.

Príklad 6

Použitie transkripčného faktora na podporu opätovnej endotelizácie po perkutánnej transluminálnej koronárnej angioplastike *in vitro*

6.1. Metódy

Bunky ľudského alebo prasačieho vaskulárneho hladkého svalstva (SMC, Clonetics) sa rozmrazili a udržiavali sa v kultivačnom médiu a prešli 4 pasážami podľa inštrukcií výrobcu. SMC sa transfekovali expresným plazmidom, ktorý obsahoval Egr-1 cDNA exprimovanú z promotóra CMV (Houston a ďalší,

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19, 281-289, 1999). DNA exprimujúca Egr-1 sa transfekovala do SMC použitím fugene (Boehringer Mannheim) po optimalizácii SMC s kontrolou, ktorou je luciferázový reporterový vektor pGL3 (Promega) alebo Mirus Transit (Cambridge Biosciences), pričom oba transfekčné protokoly používali β -galaktozidázu ako normalizačný plazmid vhodný na kontrolu transfekcie.

6.2. Výsledky

DNA CMV Egr-1 sa transfekovala do ľudských SMC a proteín Egr-1 sa detegoval imunohistochemicky použitím polyklonálnych protilátok (Santa Cruz) a detekcie peroxidázou (Sigma a Vector Laboratories). Ľudské SMC transfekované s DNA CMV Egr-1 (panel na pravej strane) alebo falošné transfekcie (panel na ľavej strane) sú zobrazené na obrázku č. 6a. Prasačie SMC transfekované s DNA CMV Egr-1 (panel na pravej strane) alebo falošné transfekcie (panel na ľavej strane) sú zobrazené na obrázku č. 6b. Expresia proteínu Egr-1 je detekovateľná ako hnedé sfarbenie. Optimalizácia transfekcie DNA sa dosiahla použitím fugene 6 (spolu s ďalšou charakterizáciou *in vitro*, obrázok č. 6c) a Mirus Transit (podstatné v štúdiu *in vivo*, obrázok č. 6d). Na základe týchto údajov sa v experimentoch aktivácie rastového faktora použili 4 μ g DNA CMV-Egr-1, pričom sa použila zmes lipid:DNA v pomere 3:1. Zmes lipid:DNA v pomere 3:1 sa použila aj v experimentoch zavádzania génu *in vivo*.

Aktivácie troch rastových faktorov prostredníctvom Egr-1 sa analyzovali ELISA testom bunkových supernatantov. Produkcia VEGF (obrázok č. 6e), HGF (obrázok č. 6f) a PDGF-AB (obrázok č. 6g) sa zvýšila ako odozva na aktiváciu Egr-1. Dochádza k aktivácii v závislosti na dávke a k inverznej odozve na dávku, ako sa opisuje vyššie v texte. Určité koncentrácie DNA (Egr-1) sú uvedené v príklade 3.

6.3. Záver

Proteín Egr-1 sa exprimoval v SMC transfekovaných s DNA CMV Egr-1. Transfekcia s Egr-1 zvýšila produkciu/vylučovanie PDGF, HGF a VEGF získaných z SMC.

Príklad 7

Promótorová sekvencia Egr-1

Fragment promótoru ľudského Egr-1 nachádzajúci sa v polohe -674 až +12 sa syntetizoval pomocou PCR v reakčnej zmesi obsahujúcej 0,5 µg ľudskej placentárnej genómovej DNA, ako templát, 0,4mM dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 25pmol priameho primeru (5'-GGC CAC GCG TCG TCG GTT CGC TCT CAC GGT CCC-3', miesto, ktoré rozoznáva restričný enzým *MluI* je podčiarknuté), 25pmol reverzný primer 5'-GCA GCT CGA GGC TGG ATC TCT CGC GAC TCC-3', (miesto, ktoré rozoznáva restričný enzým *XhoI*, je podčiarknuté), a DNA polymerázu Vent (NEB). PCR fragment sa štiepil restričnými enzýmami *MluI* a *XhoI*, oddelil sa na agarózovom géli a klonoval sa medzi miesta, ktoré sú rozoznávané restričnými enzýmami *MluI* a *XhoI* v multiklonovacom mieste základného vektora pGL3 (Promega).

Celá sekvencia sa získala následným doplnením medzier v publikovanej sekvencii. To je zobrazené na obrázku č. 7, kde sa celá sekvencia (GW SEQ) porovnáva so skôr publikovanou sekvenciou (ON SEQ). Táto promótorová sekvencia je funkčná a skúmala sa pri štúdií stresu v endoteliálnych bunkách.

Dôležitý rozdiel medzi publikovanou sekvenciou promótoru ľudského Egr-1 a sekvenciou, ktorá sa opisuje (na obrázku č. 8), spočíva v predtým neznámych SRE. Zatiaľ čo sa publikovalo, že sekvencie SRE5 a SRE1 neviažu faktor odozvy na sérum (SRF), a že nie sú funkčné (Nurrish SJ, Treisman R., Mol Cell Biol 1995, 15(8): 4076-85), zistilo sa, že sú v súlade so sekvenciou SRF (obrázok č. 7).

Veľký záujem je o sekvenciu SRE5. Syntetizovala sa nová sekvencia SRE5 v spojení s väzobnými miestami transkripčného faktora Ets vo forme dvojreťazcového oligonukleotidu a začlenili sa do restričného miesta *NheI* proti smeru prepisu génu minimálneho promótorového vektora SV40 (pSV40).

SRE5 má sekvenciu:

AG

GCTGCGACCCGGAATGCCATATAAGGAGCAGGAAGGATCCCCCGCGC

G

CGACGCTGGGCCTTTACGGTATATTCCTCGTCCTTCCTAGGGGGGCGGCC

GA

Dve miesta Ets sú zvýraznené tučným písmom a SRE je zvýraznené podčiarknutím. Presah AG sa používa na klonovanie do čiastočne vyplneného restričného miesta *Nhe* promótoru pGLE.

Výsledný reporterový plazmid pSVSRE5 sa prechodne transfekoval do buniek HeLa spolu s plazmidmi pFA-dbd (konštrukt kódujúci väzobnú doménu DNA Gal14 (dbd) alebo pFA-MEK1 (konštrukt kódujúci fúzovaný proteín DNA väzobnej domény Gal4 (dbd) a domény MAP kinázy MEK1). Fúzovaný proteín Gal4-MEK1 je stále aktívny a fosforyluje Elk1 a SRF a viaže sa na SRE5.

Výsledky uvedené na obrázku č. 10 ukazujú, že izolovaná sekvencia SRE5 sa trojnásobne aktivuje prítomnosťou MEK1, zatiaľ čo promótor SV40 vykazuje len minimálnu aktiváciu.

Z výsledkov vyplýva, že nové SRE5 je funkčné.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie molekuly nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologicky aktívny fragment, na výrobu lieku na ošetrovanie rán cicavcov, vrátane človeka.

2. Použitie podľa nároku 1, kde Egr-1 je ľudský Egr-1.

3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2, kde molekula nukleovej kyseliny obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologicky aktívny fragment operatívne spojený so sekvenciou nukleovej kyseliny, ktorá riadi expresiu.

4. Použitie podľa nároku 3, kde sekvencia nukleovej kyseliny, ktorá riadi expresiu:

a) má reťazec obsahujúci sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako GW SEQ, alebo
b) má reťazec obsahujúci jednu alebo viac delécií, inzercií a/alebo substitúcií vo vzťahu ku GW SEQ, ale neobsahuje sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako ON SEQ, a ktorá neobsahuje ani sekvenciu uvedenú na obrázku č. 9.

5. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 4, pričom je molekula nukleovej kyseliny zostavená tak, aby bola vhodná na aplikáciu cicavcovi fyzikálnymi spôsobmi.

6. Použitie podľa nároku 5, pričom molekula nukleovej kyseliny je zostavená tak, aby bola vhodná na aplikáciu cicavcovi prostredníctvom bombardovania časticami.

7. Použitie podľa nároku 6, pričom molekula nukleovej kyseliny je imobilizovaná na zlatých časticách.

8. Použitie podľa nároku 5, pričom molekula nukleovej kyseliny je zostavená tak, aby sa aplikovala mikrovýsevom.

9. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, pričom molekula nukleovej kyseliny je vo vektore.

10. Použitie podľa nároku 9, pričom molekula nukleovej kyseliny je v bunke.

11. Molekula nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologicky aktívny fragment, na použitie na ošetrovanie rán.

12. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa molekulu nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jej biologicky aktívny fragment, spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi.

13. Spôsob ošetrovania rán cicavcov, vrátane človeka, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa aplikáciu molekuly nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu polypeptidový transkripčný faktor alebo jej biologicky aktívny fragment, cicavcovi.

14. Použitie polypeptidového transkripčného faktora Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu na výrobu lieku na ošetrovanie rán cicavcov, vrátane človeka.

15. Použitie podľa nároku 14, pričom Egr-1 alebo jeho biologicky aktívny fragment sa produkuje prirodzene, synteticky alebo rekombinantne.

16. Použitie podľa nároku 14 alebo 15, pričom Egr-1 je ľudský Egr-1.

17. Polypeptidový transkripčný faktor Egr-1 alebo jeho biologicky aktívny fragment vhodný na použitie na ošetrovanie rán.

18. Spôsob ošetrovania rán cicavca, vrátane človeka, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa aplikáciu terapeuticky účinného množstva polypeptidového transkripčného faktora Egr-1 alebo jeho biologicky aktívneho fragmentu cicavcovi.

19. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa transkripčný faktor Egr-1 alebo jeho biologicky aktívny fragment spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi.

20. Molekula nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje

- a) reťazec obsahujúci sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako GW SEQ,
- b) reťazec obsahujúci jednu alebo viac delácií, inzercií a/alebo substitúcií vo vzťahu ku GW SEQ, ktorý ale neobsahuje sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako ON SEQ, a ani sekvenciu uvedenú na obrázku č. 9, alebo
- c) reťazec, ktorý hybridizuje s reťazcom opísaným vyššie v odstavci a) alebo b).

21. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 20, ktorá obsahuje jeden alebo viac elementov odozvy na sérum (SRE).

22. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 21, ktorá obsahuje sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 ako SRE5 v GW SEQ alebo jej funkčný variant.

23. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 22, pričom variant vykazuje aspoň jeden z rozdielov nukleotidov nachádzajúcich sa v GW SEQ SRE5 v porovnaní s ON SEQ SRE5, ktoré sú zobrazené na obrázku č. 7.

24. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 23, ktorá obsahuje elementy odozvy na sérum uvedené na obrázku č. 7 ako SRE3 a SRE4 alebo ich funkčné varianty.

25. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 24, ktorá obsahuje TATA box.

26. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 25, kde TATA box obsahuje sekvenciu AAATA.

27. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 26, ktorá obsahuje väzobné miesto Egr-1 (EBS).

28. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 27, pričom väzobné miesto Egr-1 má sekvenciu uvedenú na obrázku č. 7 v GW SEQ ako EBS alebo variant uvedenej sekvencie.

29. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 28, pričom variant má obmedzenú afinitu pre Egr-1 v porovnaní so sekvenciou uvedenou ako EBS na obrázku č. 7 v GW SEQ.

30. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 29, pričom variant obsahuje sekvenciu zobrazenú na obrázku č. 2 ako EBS

31. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 26, ktorá neobsahuje väzobné miesto Egr-1.

32. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 31, ktorá obsahuje sekvenciu schopnú viazať Sp1.

33. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 32, ktorá obsahuje dve sekvencie schopné viazať Sp1.

34. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 32 alebo 33, ktorá obsahuje jednu alebo obe sekvencie viažuce Sp1 zobrazené na obrázku č. 7 v GW SEQ.

35. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 34, ktorá obsahuje element odpovedajúci na cAMP.

36. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 35, ktorá obsahuje najmenej jeden element odpovedajúci na cAMP zobrazený na obrázku č. 7 v GW SEQ ako cAMP RE.

37. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 35 alebo 36, ktorá obsahuje najskôr cAMP RE zobrazený na obrázku č. 7 v GW SEQ.

38. Molekula nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje všetky sekvencie uvedené v rámčekoch na obrázku č. 7 v GW SEQ s možnou výnimkou EBS.

39. Molekula nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje variant molekuly uvedenej na obrázku č. 7 ako GW SEQ, ktorá je schopná zosilniť transkripciu Egr-1 v porovnaní s molekulou uvedenou na obrázku č. 7 ako GW SEQ.

40. Molekula nukleovej kyseliny, ktorá obsahuje variant molekuly uvedenej na obrázku č. 7 ako GW SEQ, ktorá je schopná zoslabiť transkripciu Egr-1 v porovnaní s molekulou uvedenou na obrázku č. 7 ako GW SEQ.

41. Molekula nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 40, ktorá obsahuje sekvenciu kódujúcu Egr-1.

42. Vektor nukleovej kyseliny, ktorý obsahuje molekulu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 41.

43. Bunka, ktorá obsahuje molekulu nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 41 alebo vektor podľa nároku 42.

44. Spôsob liečby pacienta, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa aplikáciu molekuly nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 41, vektora podľa nároku 42 alebo bunky podľa nároku 43, pacientovi.

45. Spôsob liečby pacienta, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa aplikáciu Egr-1, ktorý sa produkoval použitím molekuly nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 41, vektora podľa nároku 42 alebo bunky podľa nároku 43, pacientovi

46. Spôsob podľa nároku 44 alebo 45, vyznačujúci sa tým, že liečbou je ošetrovanie rany zahŕňajúce hojenie a asociované stavy a terapiu, ktorá podporuje, zosilňuje alebo urýchľuje hojenie tkaniva a zahŕňa liečbu kožných vredov pri cukrovke, okluzívneho ochorenia periférnych artérií, pooperačných jaziev, popálenín, lupienky, zrýchlenie remodelovania a regenerácie kostí, podporu angiogenézy, obnovenia bunkovej výstelky ciev po perkutánnej transluminálnej koronárnej angioplastike.

47. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 44 až 46, vyznačujúci sa tým, že molekula nukleovej kyseliny alebo Egr-1 sa aplikujú priamo do rany alebo do blízkosti rany.

48. Spôsob diagnostikovania, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa použitie molekuly nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 40 ako sondy na stanovenie toho, či existuje alebo neexistuje genetická vada.

49. Spôsob testovania, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa použitie molekuly nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 40, pričom na základe väzobných štúdií sa identifikuje potencióálne terapeutické činidlo.

50. Spôsob identifikácie činidla schopného pozitívne alebo negatívne regulovať transkripciu Egr-1, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa prípravu molekuly nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 40 (napríklad v

porovnaní s molekulou obsahující GW SEQ uvedenú na obrázku č. 7) a stanovenie toho, či uvedené zmeny ovplyvňujú silu transkripcie Egr-1.

51. Činidlo, vyznačujúce sa tým, že sa identifikovalo spôsobom podľa nároku 49 alebo 50.

52. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a molekulu nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 41, vektor podľa nároku 42, alebo bunku podľa nároku 43.

53. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič a Egr-1 produkovaný použitím molekuly nukleovej kyseliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 41, vektor podľa nároku 42 alebo bunku podľa nároku 43.

FIG.1a

VEGF expresia

Deň 0

Zlato - DNA

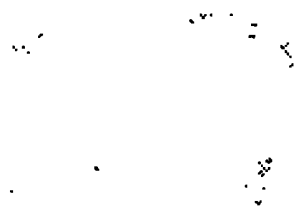


Zlato + Egr-1 DNA



Deň 1

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



FIG.1b

VEGF expresia

Deň 2

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



Deň 6

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



FIG.1c

TGF- β 1 expresia

Deñ 0

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



Deñ 1

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



TGF- β 1 expresia

FIG.1d

Deñ 2

Zlato - DNA

Zlato + Egr-1 DNA



Deñ 6

Zlato - DNA

Zlato + Egr-1 DNA



PDGF α expresia

FIG.1e

Deñ 0

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



Deñ 1

Zlato - DNA



Zlato + Egr-1 DNA



FIG.1f

PDGF α expresia

Deñ 2

Zlato - DNA



Zlato +Egr-1 DNA



7/30

Fig. 2a

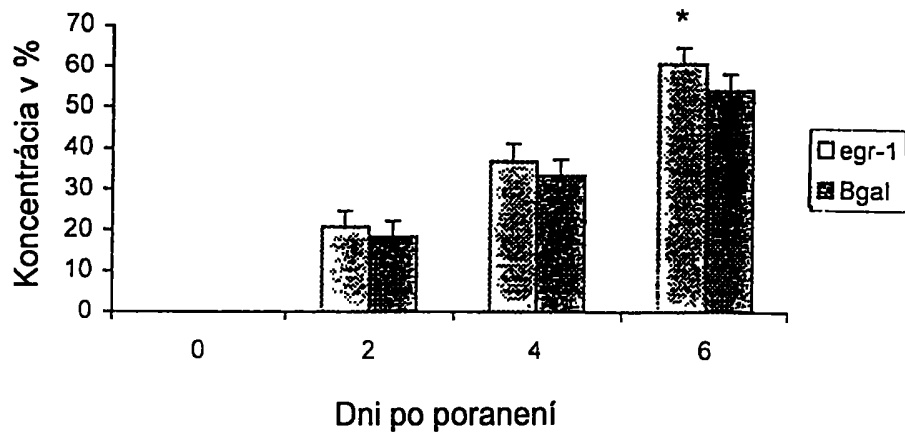
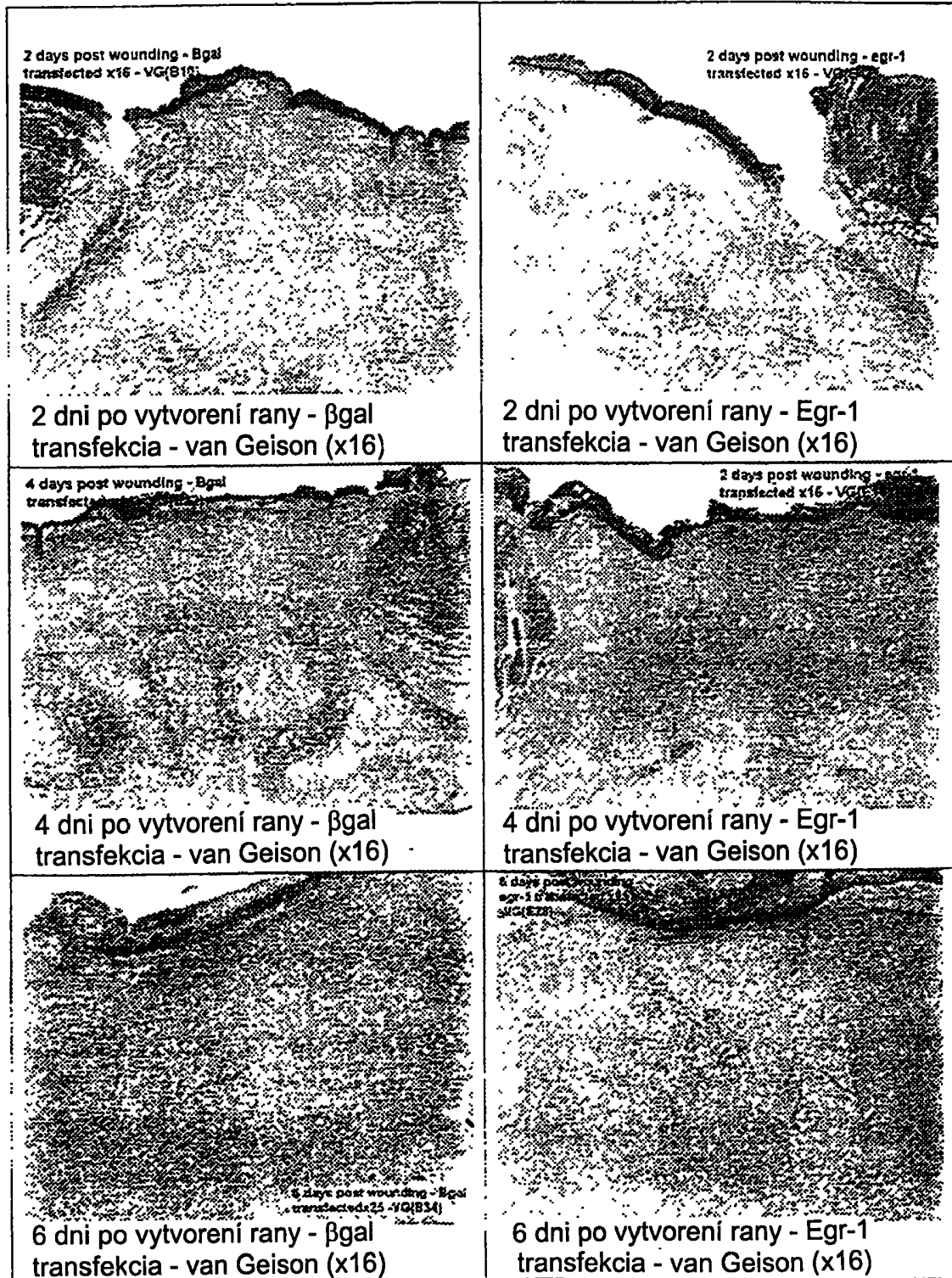
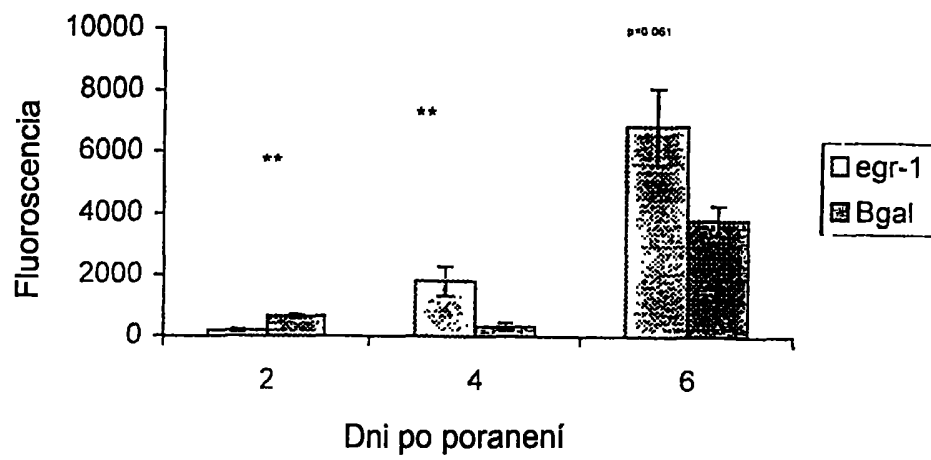


FIG.2b



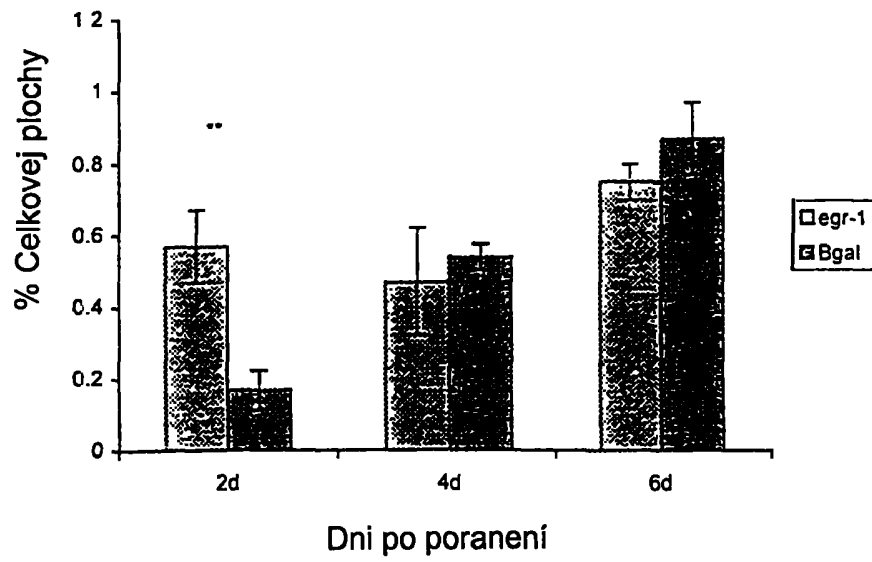
9/30

Fig. 2c



10/30

Fig. 2d



11/30

Fig. 3a

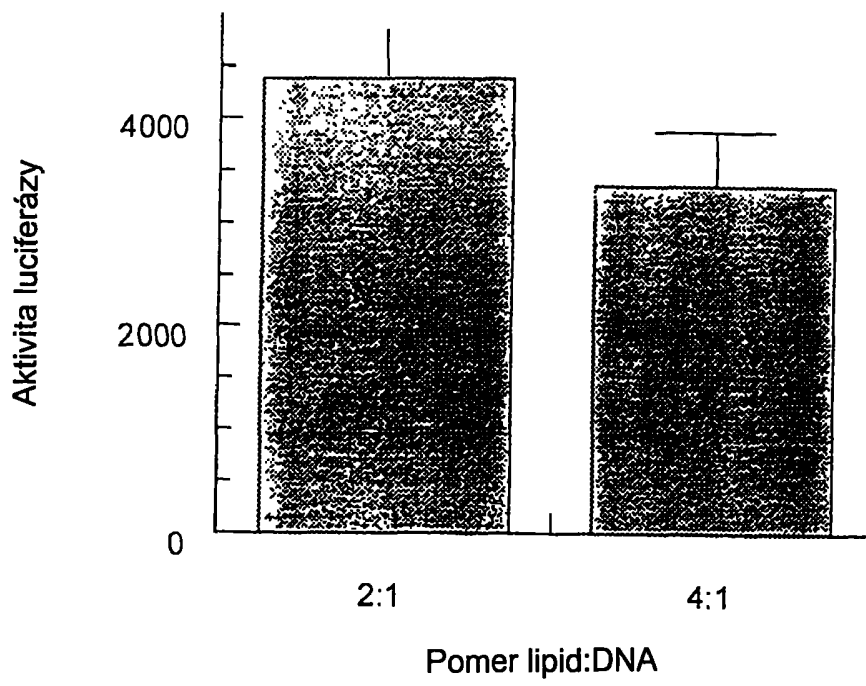


Fig. 3b

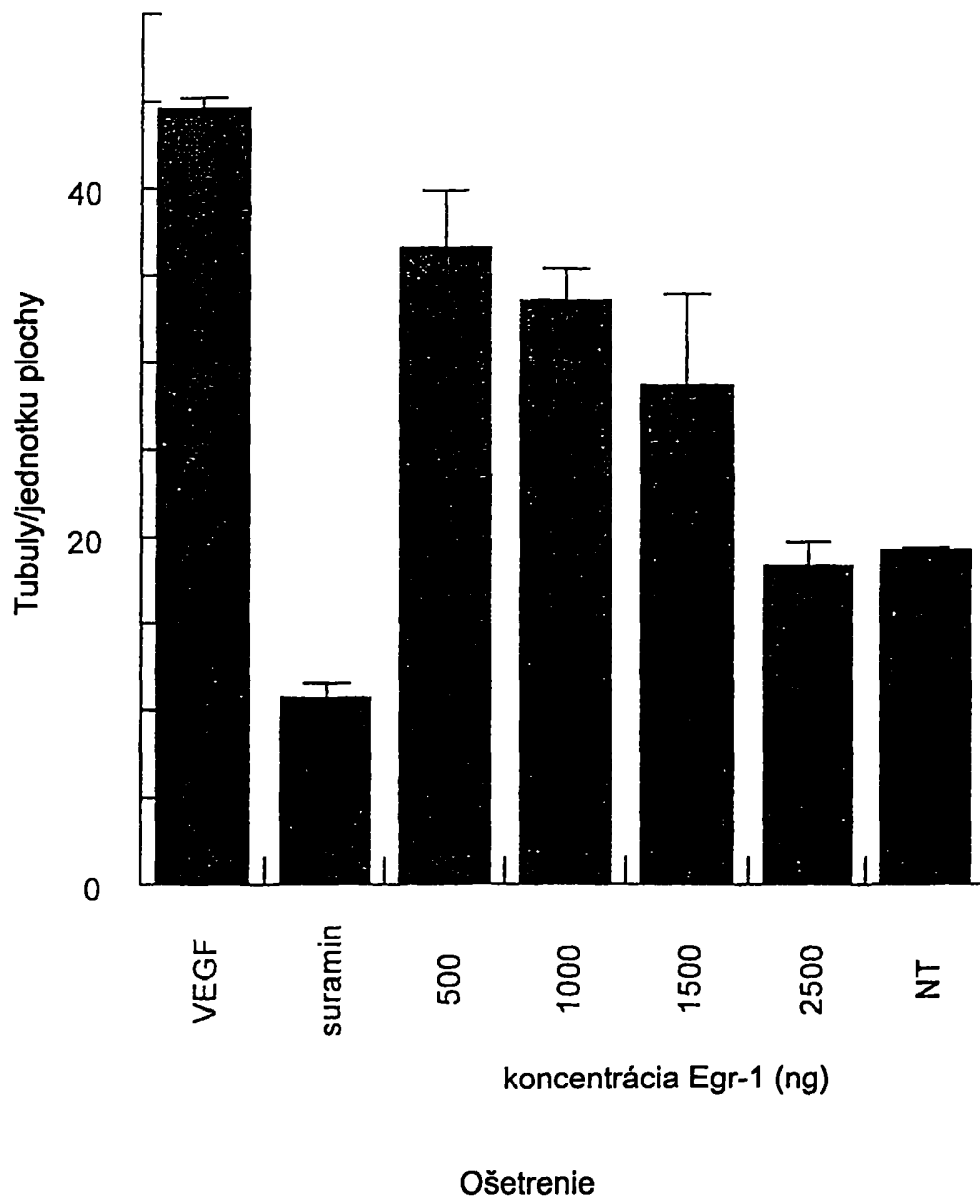


FIG. 4a

Identifikácia vzorky

Vzorka č.	Spracovanie	Vzorka č.	Spracovanie
1	Nanesenie 24 h	43	Rozpustná kontrola 0 h
2	↓	44	↓
3	↓	45	↓
4	Kontrola 24 h	46	Pozitívna kontrola 0 h
5	↓	47	↓
6	↓	48	↓
7	Rozpustná kontrola 24 h	49	Nanesenie 2 h
8	↓	50	↓
9	↓	51	↓
10	Pozitívna kontrola 24 h	52	Kontrola 2 h
11	↓	53	↓
12	↓	54	↓
13	Nanesenie 48 h	55	Rozpustná kontrola 2 h
14	↓	56	↓
15	↓	57	↓
16	Kontrola 48 h	58	Pozitívna kontrola 2 h
17	↓	59	↓
18	↓	60	↓
19	Rozpustná kontrola 48 h	61	Nanesenie 4 h
20	↓	62	↓
21	↓	63	↓
22	Pozitívna kontrola 48 h	64	Kontrola 4 h
23	↓	65	↓
24	↓	66	↓
25	Nanesenie 72 h	67	Rozpustná kontrola 4 h
26	↓	68	↓
27	↓	69	↓
28	Kontrola 72 h	70	Pozitívna kontrola 4 h
29	↓	71	↓
30	↓	72	↓
31	Rozpustná kontrola 72 h	73	Nanesenie 6 h
32	↓	74	↓
33	↓	75	↓
34	Pozitívna kontrola 72 h	76	Kontrola 6 h
35	↓	77	↓
36	↓	78	↓
37	Nanesenie 0 h	79	Rozpustná kontrola 6 h
38	↓	80	↓
39	↓	81	↓
40	Kontrola 0 h	82	Pozitívna kontrola 6 h
41	↓	83	↓
42	↓	84	↓

FIG.4b

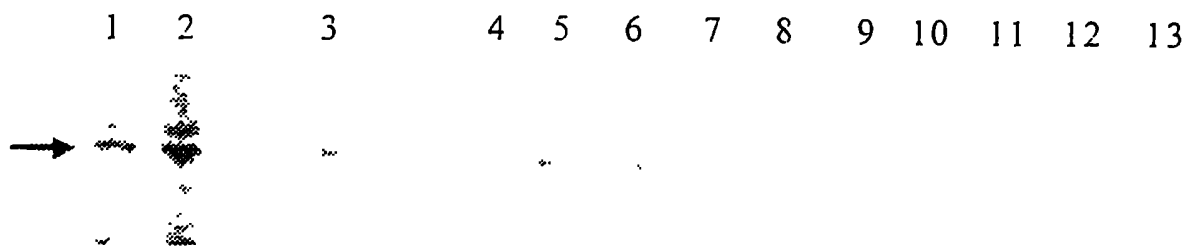
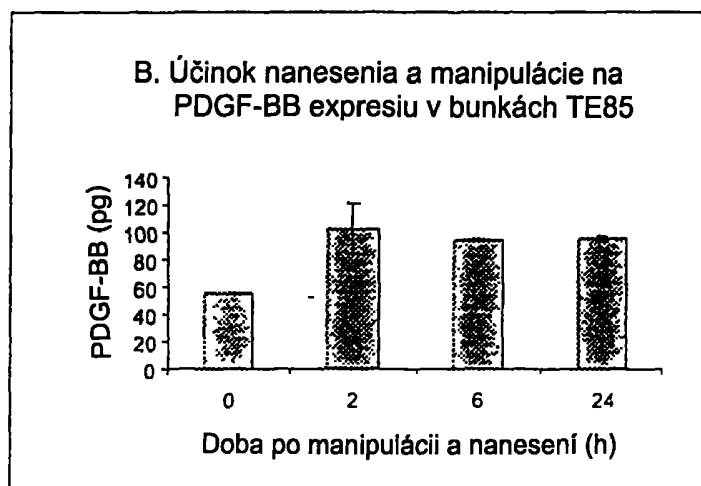
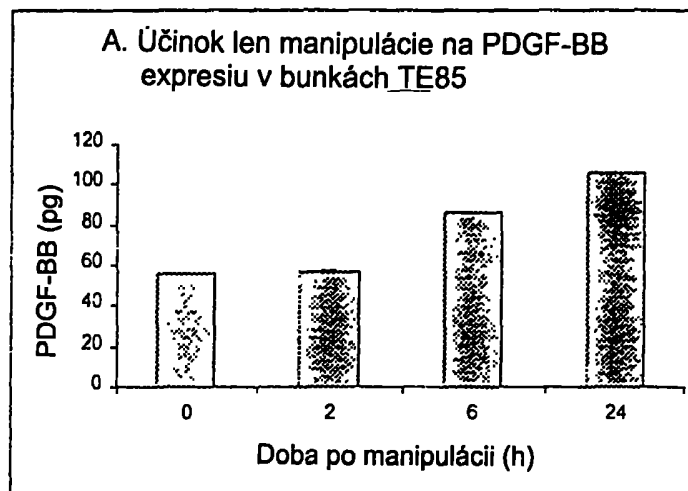
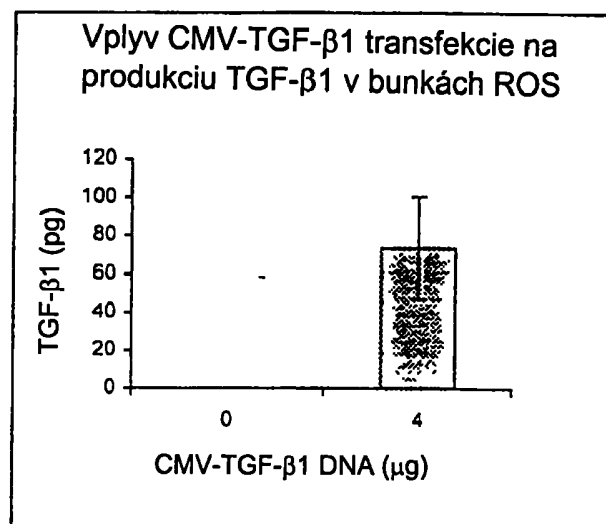
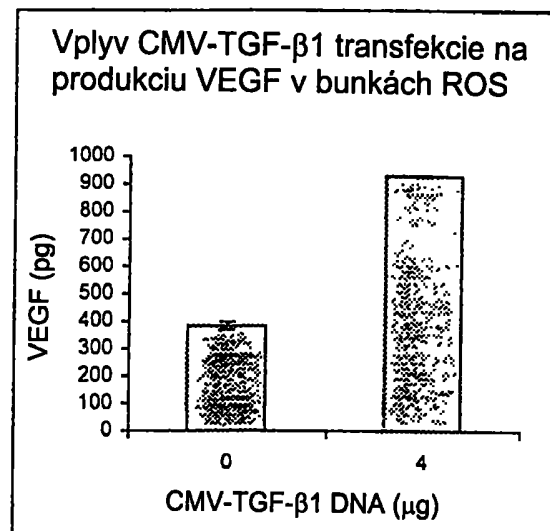


Fig. 4c



16/30

Fig. 4d



17/30

Fig. 4e

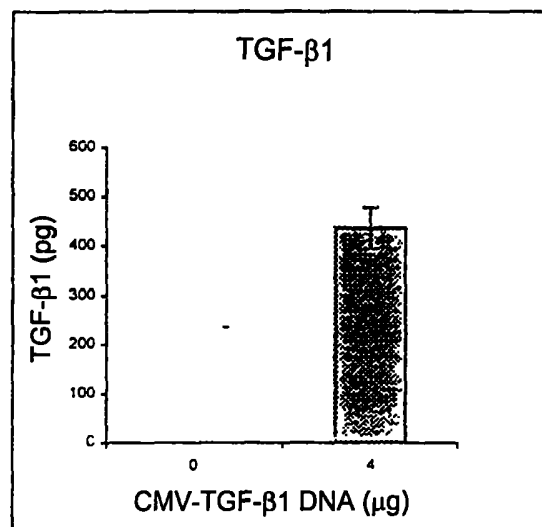
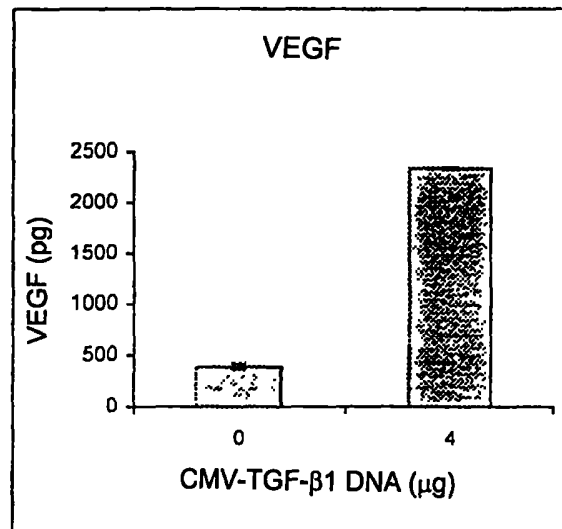
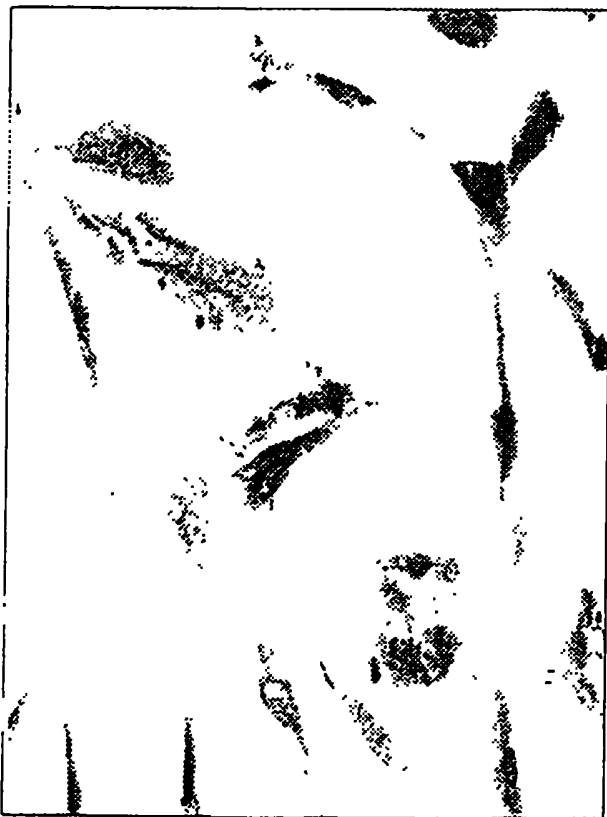


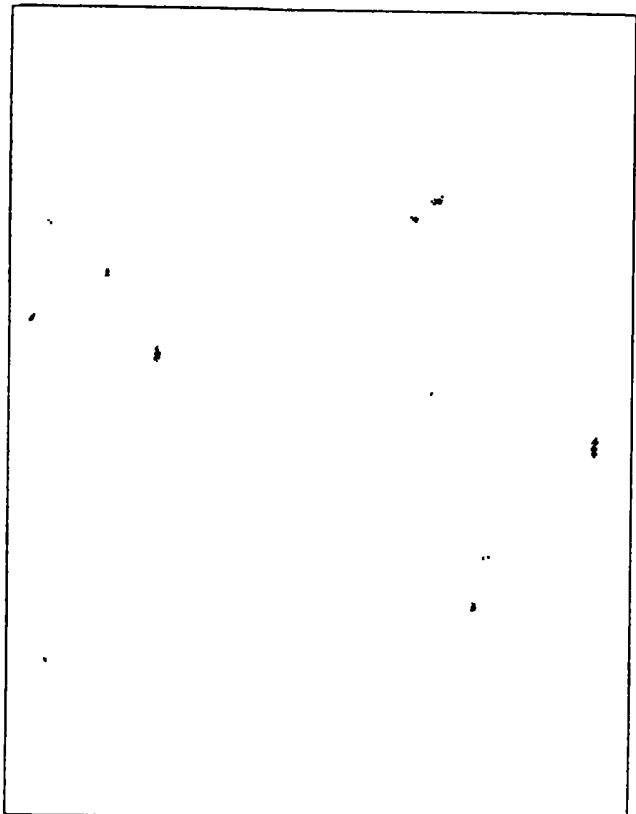
Fig. 5

	Kontrola	DNA a BMP	DNA	BMP
	N=10 miest	N=10 miest	N=10 miest	N=10 miest
alkalický fosfátový medián (IQR)	0.48 (0.28, 0.55)	0.90 (0.66, 1.57)	1.30 (0.55, 2.03)	0.63 (0.53, 1.0)
PNP medián (IQR)	5.90 (3.78, 11.26)	17.45 (10.22, 22.23)	18.11 (5.69, 37.73)	15.89 (4.16, 27.76)
	N=5 miest	N= 5 miest	N=5 miest	N=5 miest
Ca v % sušiny priemer (SD)	0.106 (0.035)	0.098 (0.035)	0.1060 (0.042)	0.097 (0.032)
Ca v % sušiny priemer (IQR)	0.09 (0.09, 0.13)	0.08 (0.08, 0.125)	0.09 (0.07, 0.15)	0.07 (0.06, 0.10)
Kolagén medián (IQR)	0.91 (0.775, 1.455)	1.24 (1.10, 1.45)	0.99 (0.75, 1.23)	0.87 (0.705, 1.50)
Tvorba kosli	0	1 miesto	0	0

FIG.6a

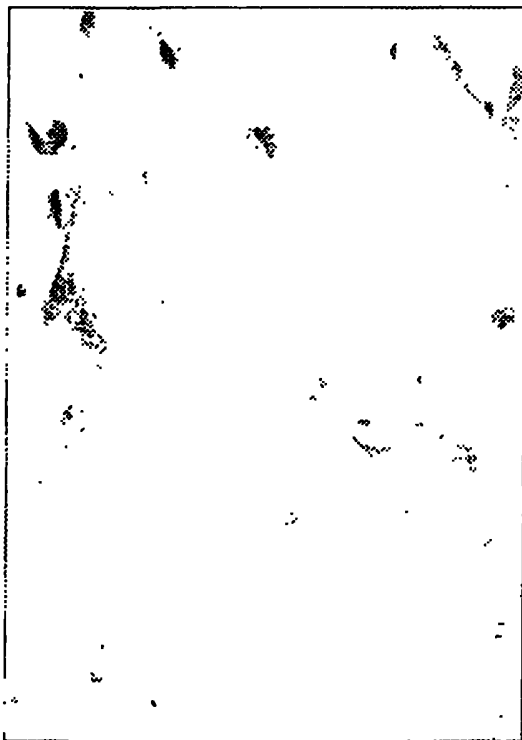


Test

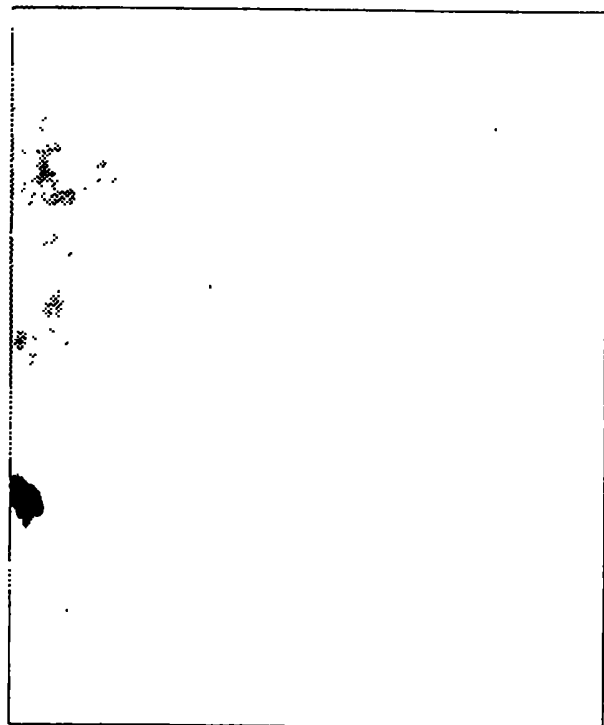


Simulácia

FIG.6b



Test



Simulácia

21/30

Fig. 6c

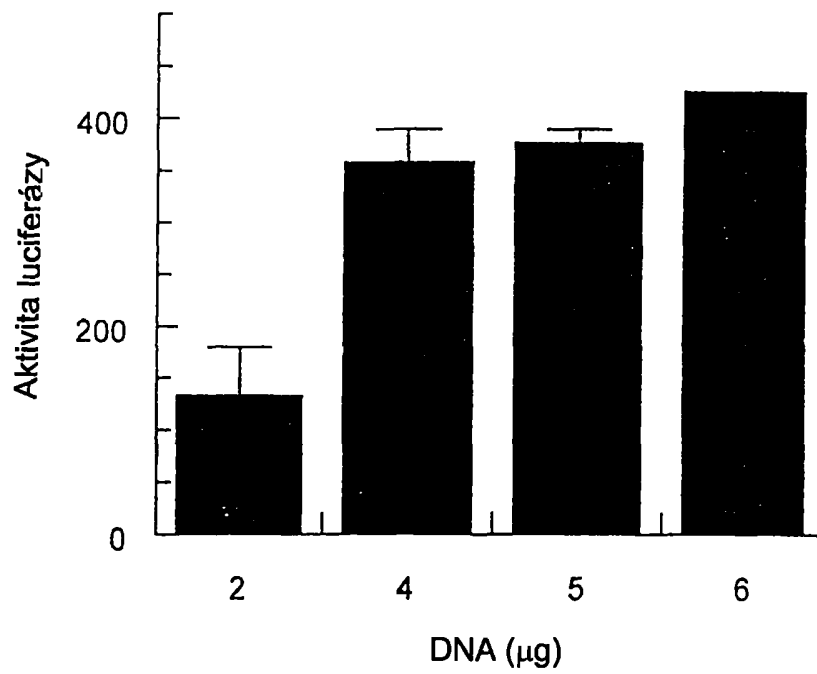


Fig. 6d

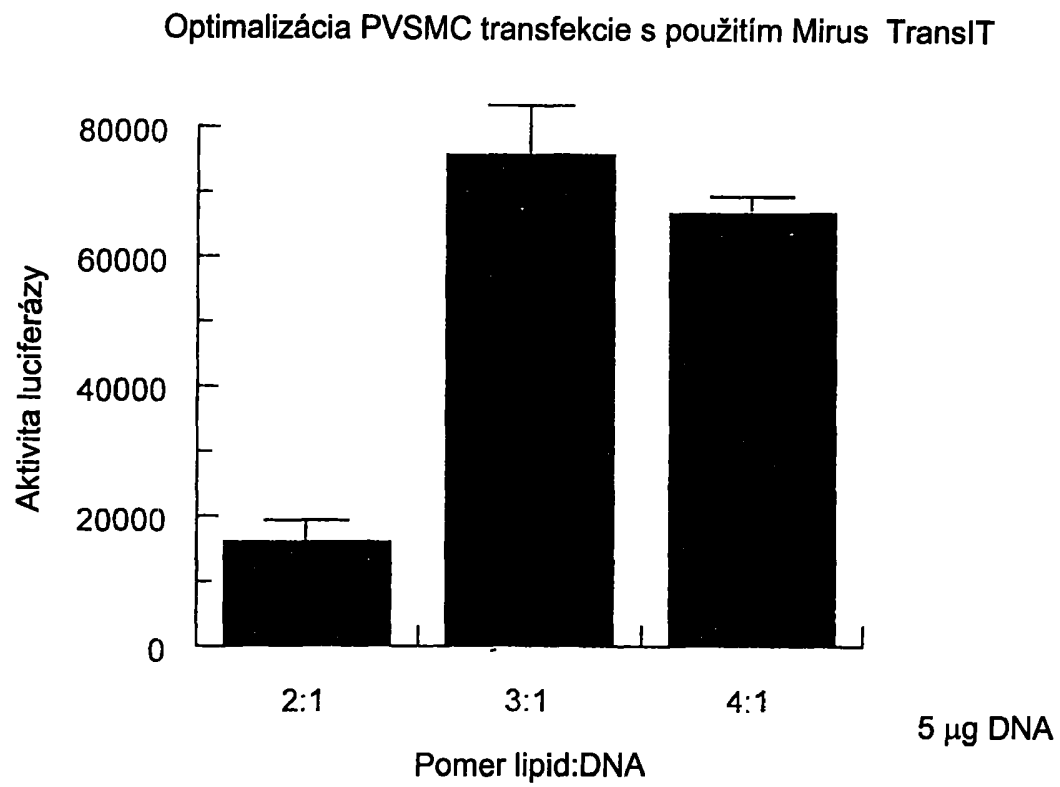


Fig. 6e

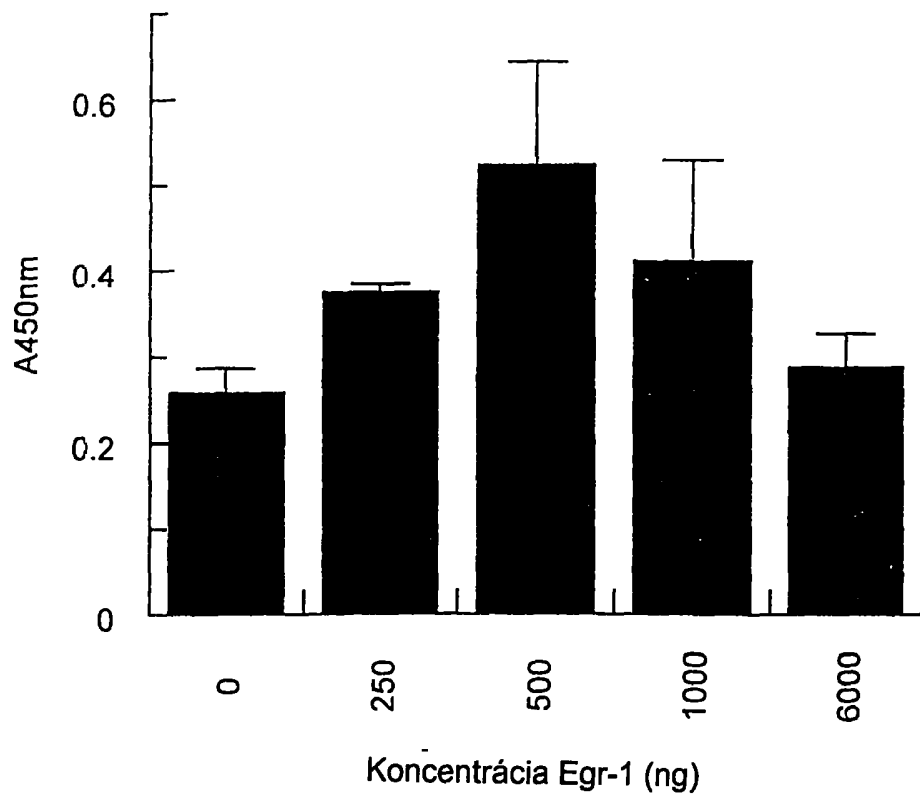
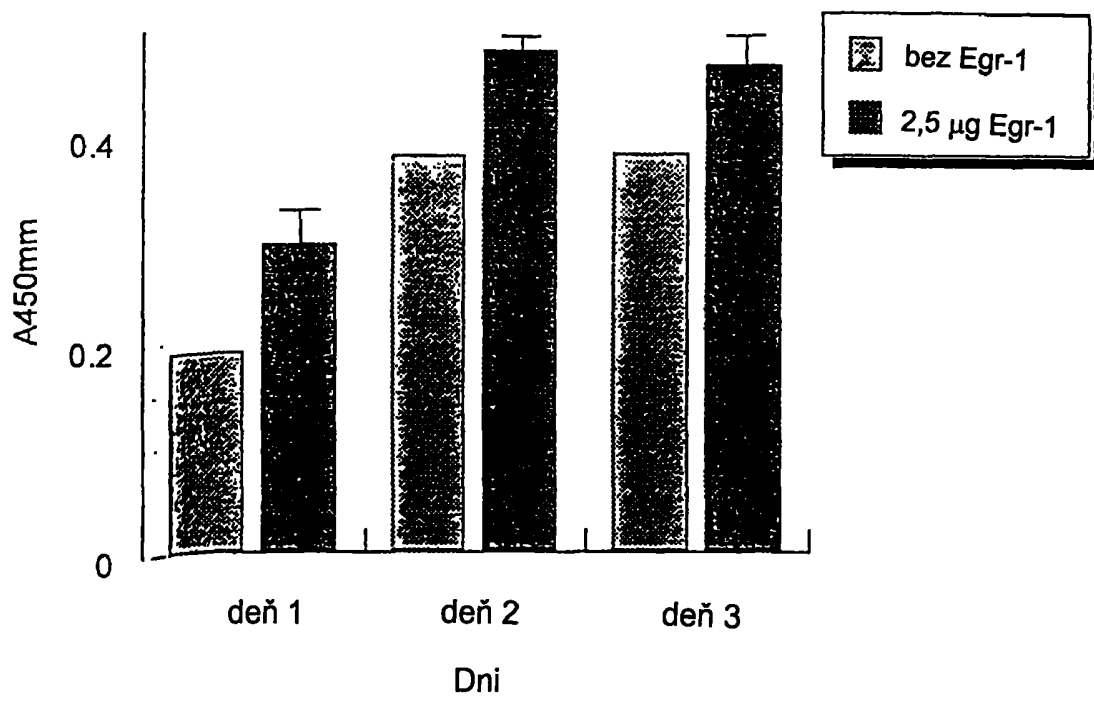


Fig. 6f



25/30

Fig. 6g

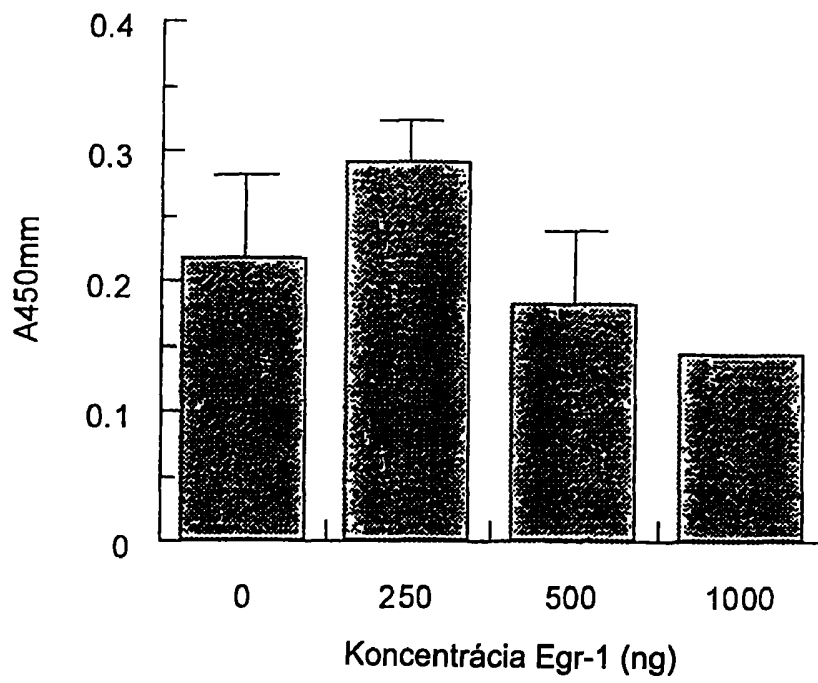


FIG.6h

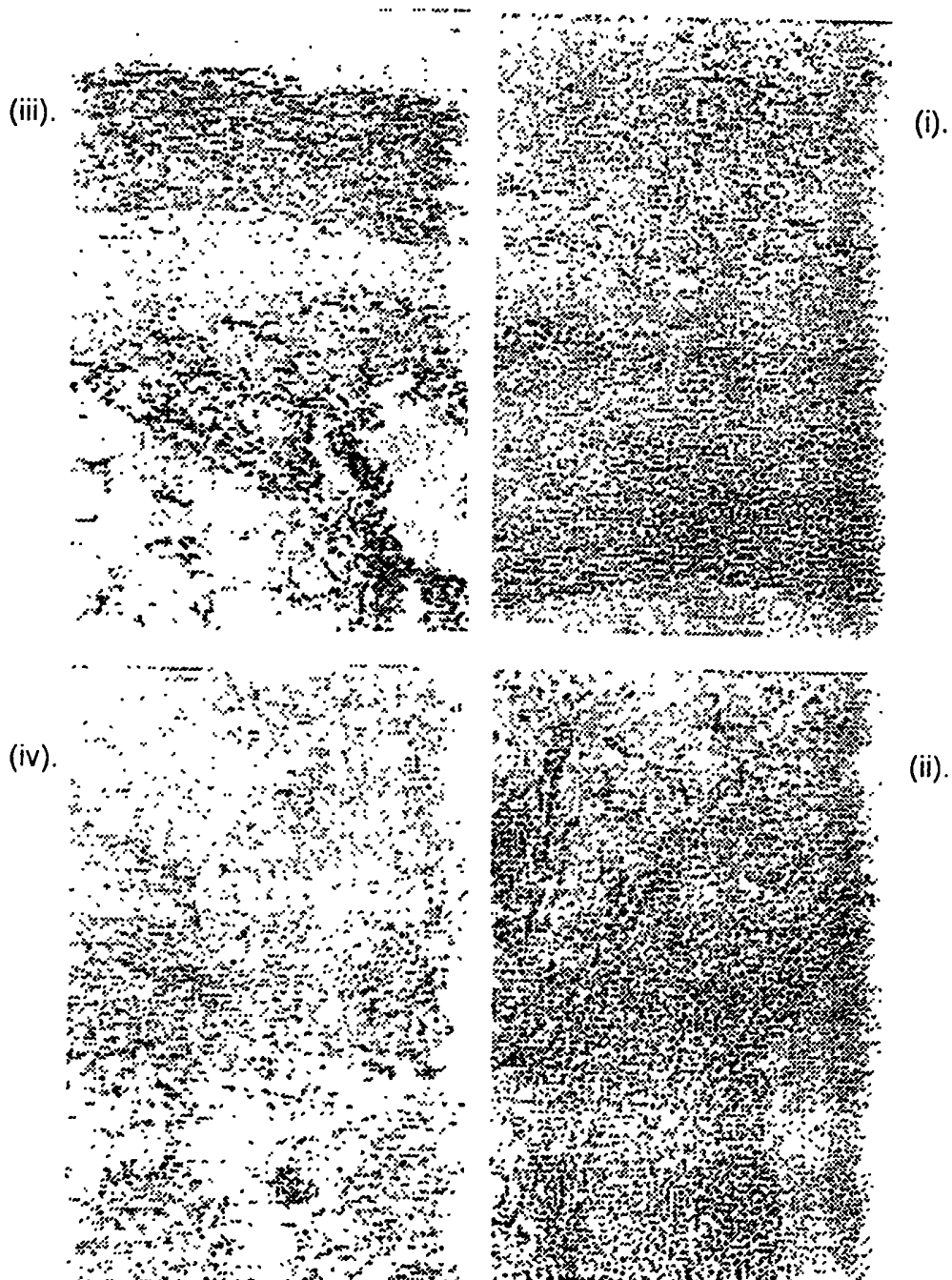


Fig. 7

Ludský promótor egr-1 divokého typu

```

                Sp1                                cAMP RE                                TPA RE
ON SEQ  CGGTTGCTC TCACGGTCCC TGAGGTGGGCGGGGCC. TGGAGGAGAGCGATAGAACC CCGGCCCGCG
GW SEQ  CGGTTGCTC TCACGGTCCC TGAGGTGGGCGGGGCC TGGATGAGAGCGATAGAACC CCGGCCCGCG
                10                20                30                40                50                60                70

                EBS
ON SEQ  TCGCCCTCGCCTCCGCTCTG GGTCTGGGCT TCCCAGCCT AGTTCACGCC TAGGAGCCGC CTGAGCAGCC
GW SEQ  TCGCCCTCGCCTCCGCTCTG GGTCTGGGCT TCCCAGCCT AGTTCACGCC TAGGAGCCGC CTGAGCAGCC
                80                90                100                110                120                130                140

                Sp1
ON SEQ  GCGC.CA.AG CGCCACACGC CACGAGCCCT CCGCGCTGG GCGTCCCCGG ATCCCGCGAG CGCTCGGGCT
GW SEQ  GCGCGCCCAG CGCCACACGC CACGAGCCCT CCGCGCTGG GCGTCCCCGG ATCCCGCGAG CGCTCGGGCT
                150                160                170                180                190                200                210

                SRE5
ON SEQ  CCCGGCTTGG AACCAGGGAG GAGGGAGGGA GCGAGGGAGC AACCAGCT.C GGACC.GGRA.TGCATATA
GW SEQ  CCCGGCTTGG AACCAGGGAG GAGGGAGGGA GCGAGGGAGC AACCAGCTGC G.ACCCGGAATGCCATATA
                220                230                240                250                260                270                280

                SRE5                                SRE4                                SRE3
ON SEQ  GTAGCAGGA AGGATCCCC GCGGAGAGATCCCTATTGCGGCAGCACCGATTTCGAGCTGGGCGCAT
GW SEQ  AGAAGCAGGA AGGATCCCC GCGGAGAGATCCCTATTGCGGCAGCACCGATTTCGAGCTGGGCGCAT
                290                300                310                320                330                340                350

ON SEQ  GGGCGGC.G CTTCCGCTC TGGGAGGAGG GAAGAAGGCG GAGGGAGGGG CAACGCGGGA ACTCCGGAGC
GW SEQ  GGGCGGC.C CTTCCGCTC TGGGAGGAGG GAAGAAGGCG GAGGGAGGGG CAACGCGGGA ACTCCGGAGC
                360                370                380                390                400                410                420

ON SEQ  TGC.CGG.TC CCGGAGGCC CCGCGGCGGC TAGAGCTCTA GGCTTCCCCG AAGC.TGGGC GCCTGGGATG
GW SEQ  TGC.CGG.TC CCGGAGGCC CCGCGGCGGC TAGAGCTCTA GGCTTCCCCG AAGCCTGGGC GCCTGGGATG
                430                440                450                460                470                480                490

                cAMP RE
ON SEQ  CGGGC.CGGG C.CGGGCCCT AGGGTGCAGG ATGGAGGTGC CGGGCGCTGT CGGATGGGGG GCTTCACGC
GW SEQ  CGGGC.CGGG CCGGGGCCCT AGGGTGCAGG ATGGAGGTGC CGGGCGCTGT CGGATGGGGG GCTTCACGC
                500                510                520                530                540                550                560

                SRE2                                SRE1
ON SEQ  ACTCCGGGTC CTCCC.CCG CTCTGCGCATATTAGGGCTTC.TGCTTCCC ATATATG.CC ATGTACGTCA
GW SEQ  ACTCCGGGTC CTCCC.GCCG GTCTGCGCATATTAGGGCTTCCTGCTTCCC ATATATGGCC ATGTACGTCA
                570                580                590                600                610                620                630

                TATA
ON SEQ  CGACGGAGGC GGACCCGTGC CGTTCAGAC CCTTCATATA GAGGCGGATC CGGGGAGTCG CGAGAGATCC
GW SEQ  CGACGGAGGC GGACCCGTGC CGTTCAGAC CCTTCATATA GAGGCGGATC CGGGGAGTCG CGAGAGATCC
                640                650                660                670                680                690                700

ON SEQ  AGC
GW SEQ  AGC
                713
    
```

28/30

Fig. 8

Mutovaný ľudský egr-1 promótor

CGGTTTCGCTC TCACGGTCCC TGAGGTGGGC GGGCGGGCCC TGGATGACAG CGATAGAACC CCGGCCGGAC CGGAC
 10 20 30 40 50 60 70
GGCCCTCGC TATCGCTTG GGTCTGGGCT TCCCCAGCCT AGTTCACGCC TAGGAGCCGC CTGAGCAGCC
 80 90 100 110 120 130 140
 GCGCGCCCAG CGCCACACGC CACGAGCCCT CCCGGCTGG GCGTCCCCGG ATCCCGCGAG CGCTCGGGCT
 150 160 170 180 190 200 210
 CCCGGCTTGG AACCAGGGAG GAGGGAGGGA GCGAGGGAGC AACCACTGC G.ACCCGGAG TATGCCATATA
 220 230 240 250 260 270 280
AGGAGCAGGA AGGATCCCC GCCGGAACA CCC TATTTG GGCAGCCCT TATTTGGAGT GGCCCGATAT
 290 300 310 320 330 340 350
GGCCCGGCCG CTTCGGGCTC TGGGAGGAGG GAAGAAGGCG GAGGGAGGGG CAACCGGGGA ACTCCGGAGC
 360 370 380 390 400 410 420
 TGGCGGGGTC CCGGAGGCCC CGGCGGGCGC TAGAGCTCTA GGCTTCCCCG AAGCCTGGGC GCCTGGGATG
 430 440 450 460 470 480 490
 CGGGCGGGG CGCGGGCCCT AGGGTGCAGG ATGGAGGTGC CGGGCGCTGT CGGATGGGGG GCT GGCCGG
 500 510 520 530 540 550 560
 ACTCCGGGTC CTCCGGCCG GTCCTGCCAT ATTAGGGCT CCCTGCTTCCC ATATATGGCC ATGTACGTCA
 570 580 590 600 610 620 630
 CGACGGAGGC GGACCCGTGC CGTTCAGAC CCTTC TATA GAGGCGGATC CGGGGAGTCG CGAGAGATCC
 640 650 660 670 680 690 700

AGC
713

Fig. 9

Publikovaná 5'-upstream sekvencia génu myšacieho Egr-1

-935	ACGGAGGGAA	TAGCCTTTCG	ATTCTGGGTG	GTGCATTGGA	AGCCCCAGGC	TCTAAAACCC	-876
-875	CCAACCTACT	<u>GACTGGTGGC</u>	CGAGTATGCA	CCCGACTGCT	AGCTAGGCAG	TGTCCCAAGA	-816
-815	ACCAGTAGCC	AAATGTCTTG	GCCTCAGTTT	TCCCGGTGAC	ACCTGGAAAG	TGACCCTGCC	-756
-755	ATTAGTAGAG	GCTCAGGTCA	GGGCCCCGCC	TCTCCTGGGC	<u>GGCCTCTGCC</u>	CTAGCCCGCC	-696
-695	CTGCCGCTCC	TCCTCTCCGC	AGGCTCGCTC	CCACGGTCCC	<u>CGAGGTGGGC</u>	<u>GGGTGAGCCC</u>	-636
-635	<u>AGGATGACGG</u>	<u>CTGTAGAACC</u>	<u>CCGGCCTGAC</u>	<u>TCGCCCTCGC</u>	CCCCGCGCCG	GGCCTGGGCT	-576
-575	TCCTAGCCC	AGCTCGCACC	CGGGGGCCGT	CGGAGCCGCC	GCGCGCCCAG	CTCTACGCGC	-516
-515	CTGGCCCTCC	CCACGCGGGC	GTCCCCGACT	CCCGCGCGCG	CTCAGGCTCC	CAGTTGGGAA	-456
-455	CCAAGGAGGG	GGAGGATGGG	GGGGGGGGTG	TGCGCCGACC	<u>CGGAAACGCC</u>	<u>ATATAAGGAG</u>	-396
-395	CAGGAAGGAT	CCCCCGCCGG	<u>AACAGACCTT</u>	<u>ATTGGGCAG</u>	<u>CGCCTTATAT</u>	<u>GGAGTGGCCC</u>	-336
-335	<u>AAATATGGCCC</u>	<u>TGCCGCTTCC</u>	GGCTCTGGGA	GGAGGGGCGA	GCGGGGGTTG	<u>GGGCGGGGGG</u>	-276
-275	AAGCTGGGAA	CTCCAGGCGC	CTGGCCCCGG	AGGCCACTGC	TGCTGTTCCA	ATACTAGGCT	-216
-215	TTCAGGAGC	CTGAGCGCTC	GCGATGCCGG	AGCGGGTCGC	AGGGTGGAGG	TGCCACCAC	-156
-155	TCTTGGATGG	GAGGGCTTCA	<u>CGTCACTCCG</u>	GGTCCTCCCG	<u>GCCGGTCCTT</u>	<u>CCATATTAGG</u>	-96
-95	<u>GCTTCCTGCT</u>	TCCCATATAT	GGCCATGTAC	GTCACGGCGG	AGGCGGGCCC	GTGCTGTTCC	-36
-35	AGACCCTTGA	<u>AATAGAGGCC</u>	GATTCGGGGA	GTCGCGAGAG	ATCCAGCGC	GCAGAACTTG	+25
+26	GGGAGCCGCC	GCCGCGAATC	GCCGCCGCCG	CCAGCTCCG	CCGCCGAAG	ATCGGCCCT	+85
+86	GCCCCAGCCT	CCGCGGCAGC	CCTGCGTCCA-	CCACGGGCCG	CGGCTACCGC	CAGCCTGGGG	+145
+146	GCCCCACTAC	ACTCCCCGCA	GTGTGCCCT	GCACCCCGCA	TGTAACCCGG	CCAACCCCG	+205
+206	GCGAGTGTGC	CCTCAGTAGC	TTCGGCCCCG	GGCTGCGCCC	ACCACCCAAC	ATCAGTTCTC	+265

Fig. 10

Aktivácia SRE5 prechodnou transfekciou pFA-MEK1

	PSV40 (násobky aktivácie)	PSVSRE5 (násobky aktivácie)
PFA-dbd	1	2.15
PFA-MEK1	1.13	6.70