



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319144

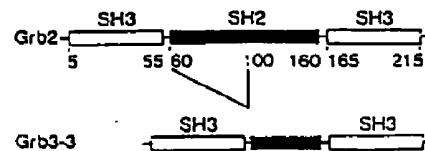
C 12 N 15/11, C 07 H 21/04, A 61 K 48/00,
C 12 N 15/86

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19960965	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.05.09 PCT/FR94/00542
(22)	Inng.dag	1996.03.08	(85)	Videreføringsdag	1996.03.08
(24)	Løpedag	1994.05.09	(30)	Prioritet	1 993.09.15, FR, 9310971
(41)	Alm.tilgj	1996.03.08			
(45)	Meddelt	2005.06.27			
(73)	Innehaver	Aventis Pharma SA , 20, avenue Raymond Aron, 92160 ANTONY CÉDEX, FR			
(72)	Oppfinner	Fabien Schweighoffer, Vincennes, FR Bruno Tocque, Paris, FR			
(74)	Fullmektig	Jan E. Helgerud - Bryns Zacco AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 Oslo, NO			
(54)	Benevnelse	Nukleotidsekvens og dens anvendelse, vektor omfattende sekvensen samt farmasøytisk preparat omfattende vektoren.			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Et nytt gen, kalt Grb3-3 samt dets varianter finner anvendelse særlig ved anti-cancerøs gen-terapi.



Foreliggende oppfinnelse angår en nukleotidsekvens som representeres ved sekvensen SEQ ID nr. 1.

5 Oppfinnelsen angår også en vektor omfattende nukleotidsekvensen, et farmasøytisk preparat omfattende en slik vektor samt anvendelse av en sekvens av den beskrevne type for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av cancer.

10 Forskjellige gener kalt oncogener og suppressor-gener er implikert ved kontrollen av celledeling. Blant disse spiller ras-genene og deres produkter, generelt p21-proteiner, en nøkkelrolle i kontrollen av cellulær proliferering hos alle de eucaryotiske organismer der de har vært undersøkt. Særlig har det vært vist at visse spesifikke modifikasjoner av disse proteiner gjør at de mister sin normale kontroll, noe som fører til at de blir oncogeniske. Således har et stort antall human-tumorer vært forbundet med nærværet av modifiserte ras-gener. Videre kan en overekspressjon av disse p21-proteiner føre til en
15 de-regulering av den cellulære proliferering. Forståelsen av den nøyaktige rolle for disse p21-proteiner i cellene, deres funksjonsmåte og deres karakteristika, er således av stor betydning for forståelsen og muligheten for terapi ved cancerogenese.

Forskjellige faktorer som er implikert i den ras-avhengige signalvei har vært identifisert.
20 Blant disse figurerer genet Grb2 som koder for et protein på 23-25 kDa med en struktur SH3-SH2-SH3 (Lowenstein et al., "Cell" 70 (1992) 431; Matouka et al., "PNAS" 89 (1992) 9015). Produktet av Grb2-genet synes å interagere med de fosforylerte tyrosinproteiner med sitt SH2-område, og med en GDP-utbyttingsfaktor av SOS-klassen, med sitt SH3-område (Egan et al., "Nature" 363 (1993) 45). Dette er således en
25 av forbindelsene med transformant-aktivitet av ras-genets produkt. Foreliggende oppfinnelse tar sikte på å påvise, klonere og å karakterisere i en ISO-form av genet Grb2, kalt Grb3-3, med en delesjon i SH2-området. Dette genet er uttrykt i voksent vev, det tilsvarende mRNA er tilstede i et eneste bånd på 1,5 kb og fører til et protein på 19 kDa. På grunn av dets delesjon i SH2-området er produktet av genet Grb3-3 ikke lenger i
30 stand til å interagere med de fosforylerte tyrosin-proteiner (fosforylert EGF-reseptor), men det bevarer sin evne til å interagere med de prolinrike områder av SOS-proteinene. På grunn av delesjonen er således produktet av Grb3-3-genet i stand til å motvirke cellulære effekter av produktet av genet Grb2. Overføring av dette gen in vivo, eller varianter av dette, omfattende anti-retningssekvensene, tillater således å interferere med
35 prolifererings-, differensierings- og/eller celledød-prosessene.

Som nevnt ovenfor er en første gjenstand for oppfinnelsen en nukleotid-sekvens som

karakteriseres ved at den representeres ved sekvensen SEQ ID nr. 1.

Nærmere bestemt angår oppfinnelsen en nukleotidsekvens som representeres ved sekvensen SEQ ID nr. 1 og som er i stand til i det minste delvis å inhibere ekspresjon av proteinet Grb-2 eller Grb-3-3.

Særlig angår oppfinnelsen anti-retningssekvenser hvis ekspresjon i en målcelle tillater å kontrollere den cellulære mRNA-transkripsjon. Slike sekvenser kan for eksempel transkriberes i målcellen til RNA som er komplementær med Grb2- eller Grb3-3-cellulær mRNA og således blokkere deres traduksjon til protein, i henhold til den teknikk som er beskrevet i EP 140.308. Slike sekvenser kan bestå av hele eller deler av SEW ID nr. 1 nuklein-sekvensene, transkribert i invers retning.

Som nevnt ovenfor er Grb2 et protein som minst er bifunksjonelt, forankret med sitt SH2-område til spesielle, fosforylerte sekvenser hos tyrosin, og med sine to SH3-områder til utbyttingsfaktorer fra SOS-familien. Grb3-3 som har tapt sin evne til å forbinde seg med de fosforylerte tyrosinproteiner kan således kun danne et kompleks med SOS-proteinene. Grb3-3 kan således virke mot rekruttering av Grb2-SOS-komplekset på grunn av reseptorer av autofosforylerte vekstfaktorer eller assosierte proteiner som likeledes er fosforylert til tyrosin som SHC eller IRS1. Grb3-3 er således i stand til å blokkere denne rekruttering, den er i stand til å blokkere de mitogene veier og å indusere celle-død. Foreliggende oppfinnere har vist at proteinet Grb3-3 eksprimeres under visse fysiologiske prosesser som for eksempel thymus-maturering hos rotter. Foreliggende oppfinnere har likeledes vist at Grb3-3 er i stand til å indusere celledød ved apoptose av forskjellige typer celler. Disse egenskaper som helt og holdent er fordelaktige kan påvises (i) ved injeksjon av det rekombinante protein i 3T3-fibroblastene og (ii) ved overføring av sekvensen som koder for Grb3-3 i 3T3-cellene (eksempel 4). Grb3-3 er således i stand til å indusere celledød i levedyktige celler som immortaliserte, cancerøse eller embryonære celler. Som vist i eksemplene er Grb2 i stand til å motsette seg virkningene av Grb3-3.

Videre har en undersøkelse av ekspresjonen av Grb3-3, gjennomført under infeksjon av lymfocyt-celler med HIV-virus, tillatt å vise at den massive virale produksjon som observeres 7 dager etter infeksjon korreleres med en overekspresjon av mRNA av Grb3-3 av de infektete celler (eksempel 5). Dette viser at å eliminere eller å motvirke de cellulære effekter av Grb3-3 likeledes kan tillate å opprettholde de infektete celler i live, særlig ved VIH, og så tillate T4 lymfocytene å fortsette å spille en rolle i

immunforsvaret. I denne forbindelse angår oppfinnelsen likeledes anvendelsen av forbindelser som er i stand til å eliminere eller å motvirke i det minste partielt de cellulære virkninger av Grb3-3 for fremstilling av et farmasøytisk preparat men for behandling av AIDS. Mer spesielt kan forbindelsene være:

- 5 - genetiske anti-retningssekvenser som definert ovenfor,
- spesifikke Grb3-3-oligonukleotider, eventuelt modifisert for øket stabilitet eller bio-disponerbarhet (fosforotioater, interkalansmidler og så videre). Det kan fortrinnsvis dreie seg om oligonukleotider som den kodende sekvens som er lokalisert mellom det SH3-N-terminale området og SH2-restområdet,
- 10 - enhver sekvens hvis overføring i infektete celler induserer en overekspressjon av Grb2.

Nukleinsekvensene ifølge oppfinnelsen kan benyttes som sådanne, for eksempel etter injeksjon i mennesker eller dyr, for å indusere en beskyttelse eller for å behandle cancer.

- 15 Spesielt kan de injiseres i form av naken DNA i henhold til den teknikk som er beskrevet i WO 90/11092. De kan likeledes administreres i kompleksform, for eksempel med DEAE-dekstran (Pagano et al., "J.Virol." 1(1967)891), med nukleære proteiner (Kaneda et al., "Science" 243 (1989) 375), med lipider (Felgner et al., "PNAS" 84 (1987) 7413), i form av liposomer (Fraley et al., "J.Biol.Chem." 255 (1980) 10431), og så videre.

20

Fortrinnsvis er nukleinsekvensene ifølge oppfinnelsen del av en vektor. Anvendelsen av en slik vektor tillater å forbedre administreringen av nukleinsyren i cellene som skal behandles og tillater likeledes å øke stabiliteten i cellene, noe som tillater å oppnå en varig terapeutisk virkning. Videre er det mulig å innføre flere nukleinsyresekvenser i en

25 og samme vektor, noe som likeledes øker behandlingens effektivitet.

Som nevnt innledningsvis angår oppfinnelsen også en vektor som karakteriseres ved at den omfatter en nukleotidsekvens som beskrevet ovenfor.

- 30 Ifølge oppfinnelsen dreier det seg fortrinnsvis om en viral vektor og spesielt om en vektor som er avledet fra adenoviruser, retroviruser, AAV, HSV-virus, CMV eller vaksinevirus.

Spesielt dreier det seg om en replikasjonsdefektiv virus.

35

Vektoren som benyttes kan ha diverse opprinnelser forutsatt at den er i stand til å transformere animalceller og fortrinnsvis human-tumorale celler. I en foretrukket

utførelsesform av oppfinnelsen benyttes det en viral vektor som kan velges blant adénoviruser, retroviruser, adénoassosierte viruser (AAV), herpesvirus, cytomégalovirus (CMV), vaksinevirus og så videre. Vektorer som er avledet fra adénoviruser, retroviruser eller AAV og som bærer heterologe nukleinsyresekvenser er beskrevet i litteraturen [Akli et al., "Nature Genetics" 3 (1993) 224; Stratford-Perricaudet et al., "Human Gene Therapy" 1 (1990) 241; EP 185 573, Levrero et al., "Gene" 101 (1991) 195; Le Gal la Salle et al., "Science" 259 (1993) 988; Roemer et Friedmann, "Eur.J. Biochem." 208 (1992) 211; Dobson et al., "Neuron" 5 (1990) 353; Chiocca et al., "New Biol." 2 (1990) 739; Miyano-hara et al., "New Biol." 4 (1992) 238; WO91/18088].

Foreliggende oppfinnelse angår således også en hvilken som helst rekombinant virus som, innskutt i sitt genom, inneholder en nukleinsekvens som definert ovenfor.

Fortrinnsvis er som nevnt den rekombinante virus ifølge oppfinnelsen en defektiv virus. Uttrykket "defektiv virus" angir en virus som ikke er i stand til replikering i målcellen. Generelt er genomet av den defektive virus som benyttes innenfor oppfinnelsens ramme berøvet i det minste for de sekvenser som er nødvendig for replikering av virusen i den infiserte celle. Disse områder kan enten være eliminert (helt eller delvis), gjort ikke-funksjonelle eller erstattet med andre sekvenser og særlig med en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen. Fortrinnsvis har det defektive virus ikke desto mindre beholdt sekvensene av sitt genom som er nødvendig for enkapsidering av de virale partikler.

Det er særlig fordelaktig å benytte nukleinsekvenser ifølge oppfinnelsen i innarbeidet form på en defektiv, rekombinant adénovirus, AAV eller en retrovirus.

Når det gjelder adénoviruser foreligger det forskjellige cérotyper hvis struktur og egenskaper varierer noe men som ikke er patogene for mennesker og særlig ikke for ikke-immunosvekkede personer. Videre integreres disse viruser ikke i genomet til cellene som infiseres og kan inneholde vesentlige eksogene DNA-fragmenter. Blant de forskjellige sérotyper foretrekker man innenfor rammen av oppfinnelsen å benytte adénovirusene av type 2 eller 5 (Ad 2 eller Ad 5). Når det gjelder adénovirus Ad 5 er de sekvenser som er nødvendige for replikering, i områdene E1A og E1B.

De defektive, rekombinante viruser ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved homolog rekombinering mellom en defektiv virus og et plasmid som blant annet bærer den nukleotidiske sekvens som definert ovenfor (Levrero et al., "Gene" 101 (1991) 195;

Graham, "EMBO J." 3(12) (1984) 2917). Den homologe rekombinering skjer etter ko-transfeksjon av virusen og plasmidet i en egnet cellelinje. Den benyttede cellelinje må fortrinnsvis (i) være transformerbar av elementene og (ii) bære sekvenser som er i stand til å komplementere genomdelen av den defektive virus, fortrinnsvis i integrert form for å unngå risiki for rekombinering. Som eksempel på linje som kan benyttes for fremstilling av defektive, rekombinante adénoviruser skal nevnes den humane embryonære linje 293 (Graham et al., "J.Gen.Virol." 36 (1977) 59) som særlig, integrert i sitt genom, inneholder hele den venstre del av et Ad5 adénovirus-genom (12 %). Som eksempel på linje som kan benyttes for defektive, rekombinante retroviruser skal nevnes linjen CRIP (Danos et Mulligan", "PNAS" 85 (1988) 6460).

Derefter blir den multipliserte virus gjenvunnet og rensset i henhold til klassiske teknikker i molekylbiologien.

Oppfinnelsen angår som nevnt innledningsvis også et farmasøytisk preparat som karakteriseres ved at det omfatter en eller flere vektorer som beskrevet ovenfor.

Eventuelt inneholder preparatet en eller flere nukleotidsekvenser som beskrevet ovenfor i kompleksert form med DEAE-dekstran, med nukleære proteiner eller med lipider, i uren form eller også innarbeidet i liposomer.

De farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan formuleres for topisk, oral, parenteral, intranasal, intravenøs, intramuskulær, subkutan eller intraokkulær administrering eller andre metoder.

Fortrinnsvis inneholder de farmasøytiske preparater farmasøytiske bærere som er aksepterbare for en injiserbar formulering, eventuelt direkte i tumoren som skal behandles. Det kan særlig dreie seg om sterile, isotoniske saltoppløsninger av for eksempel mono- eller dinatriumfosfat eller natrium-, kalium-, kalsium- eller magnesiumklorid eller andre, eller tørre preparater, særlig lyofiliserte, som ved tilsetning av for eksempel sterilisert vann eller fysiologisk serum tillater konstituering av det injiserbare middel.

Dosene av nukleinsyrer (sekvens eller vektor) som benyttes for administrering kan tilpasses som en funksjon av forskjellige parametre og særlig som en funksjon av den benyttede administreringsmåte, den angjeldende patologi, nukleinsyren som skal uttrykkes eller også den tilsiktede behandlingsvarighet. Rent generelt formuleres og

administreres de rekombinante viruser ifølge oppfinnelsen i doser som omfatter 10^4 og 10^{14} pfu/ml, fortrinnsvis 10^6 til 10^{10} pfu/ml. Uttrykket pfu eller "plaque forming unit" tilsvarer infeksjonskraften for en virusoppløsning og bestemmes ved infeksjon av en egnet cellekultur og måles, generelt etter 48 timer, ved antallet infektete cellepopulasjoner. Bestemmelsesteknikkene for pfu-konsentrasjonen for en viral oppløsning er godt dokumentert i litteraturen.

Slike farmasøytiske preparater kan benyttes på mennesker for behandling og/eller prevensjon av cancer. Særlig kan produktene ifølge oppfinnelsen være i stand til å modulere aktiviteten til ras-proteinene idet de tillater å intervenere i prosessen for utvikling av cancere og særlig kan de inhibere aktiviteten til oncogener hvis transformasjonsaktivitet går via en funksjonell p21-GAP-interaksjon. Tallrike cancere har vært forbundet med nærværet av oncogeniske ras-proteiner. Blant de cancere som oftest omfatter muterte ras-gener kan særlig nevnes pancreás-adénocarcinomene der 90 % har en Ki-ras-oncogen, mutert på det tolvte codon (Almoguera et coll., "Cell" 53 (1988) 549), adénocarcinomene og thyroïd-cancerne (50 %) eller lungecarcinomene og myéloïdleukemiene (30 %, Bos, J.L. "Cancer Res." 49 (1989) 4682). Mer generelt kan preparatene ifølge oppfinnelsen benyttes for å behandle enhver type patologi der det observeres en anormal celle-prolifisering, ved apoptose-induksjon, samt enhver patologi som karakteriseres ved celledød ved apoptose (AIDS, Huntingtons Korea, Parkinson sykdom), ved hjelp av forbindelser som blokkerer virkningene av Grb3-3 (særlig antiretning).

Oppfinnelsen angår til slutt anvendelsen av en sekvens som beskrevet ovenfor eller en vektor inneholdende sekvensen som beskrevet ovenfor for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av cancer.

Oppfinnelsen skal beskrives nærmere under henvisning til de illustrerende eksempler i forbindelse med de ledsagende figurer.

30

Figurforklaring

- Figur 1: Skjematisk illustrasjon av strukturområdene for Grb2 og Grb23-3.
 Figur 2: Studium av forbindelsen mellom Grb3-3 og EGF-reseptoren (figur 2a) og til de prolinrike peptider (figur 2b).
 Figur 3: Virkningen av Grb3-3 på transaktivering med et ras av en derivert RRE for å forsterke polyom-virusen.

35

Figur 4: Påvisning av celledød, induisert av Grb3-3 på 3T3-fibroblaster.

Figur 5: Påvisning av ekspresjon av Grb3-3 i celler infisert med HIV-virus.

Generelle teknikker i molekylbiologien.

- 5 De klassiske metoder som benyttes i molekylærbiologien som preparativ ekstrahering av plasmidisk DNA, sentrifugering av plasmidisk DNA i cesiumklorid-gradient, eletroforese på agarose- eller akrylamid-gel, rensing av DNA-fragmenter ved elektroeluering, ekstrahering av proteiner i fenol eller fenolkloroform, precipitering av DNA i salt medium med etanol eller isopropanol, transformering i E.Coli og så videre, er
- 10 velkjente for fagmannen og rikelig beskrevet i litteraturen [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al., (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].
- 15 Plasmidene av typen pBR322, pUC og fagene fra serie M13 er av kommersiell opprinnelse (Bethesda Research Laboratories).

For ligaturene kan DNA-fragmentene separeres i henhold til størrelse ved elektroforese på agarose- eller akrylamid-gel, ekstraheres med fenol eller fenol:kloroform, precipiteres med etanol og derefter inkuberes i nærvær av DNA-ligase av fagen T4 (Biolabs) i

20 henhold til leverandørens anbefalinger.

- Oppfyllingen av de proeminente 5' ender kan gjennomføres med Klenow-fragmentet av DNA-polymerasen av E. coli (Biolabs) i henhold til leverandørens spesifikasjon.
- 25 Destrueringen av de proeminente 3' ender gjennomføres i nærvær av DNA-polymerase av fagen T4 (Biolabs), anvendt i henhold til fabrikkantens anbefalinger. Destrueringen av de proeminente 5' ender gjennomføres ved en behandling gjennomført med nukleasen S1.
- 30 Den styrte mutagenese in vivo med syntetiske oligodeoksynukleotider kan gjennomføres i henhold til den metode som er utviklet av Taylor et al., ["Nucleic Acids Res." 13 (1985) 8749-8764] under anvendelse av den kit som markedsføres av Amersham.

Enzymatisk forsterkning av DNA-fragmentene ved den teknikk som kalles PCR

35 [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., "Science" 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., "Meth.Enzym." 155 (1987) 335-350] kan gjennomføres under anvendelse av en "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) i henhold til

fabrikantens spesifikasjoner.

Verifisering av nukleotidsekvensene kan gjennomføres ved den metode som er utviklet av Sanger et al., ["Proc.Natl. Acad.Sci. USA," 74 (1977) 5463-5467] under anvendelse av den kit som markedsføres av Amersham.

Eksempler

1. Isolering av genet Grb3-3

Genet Grb3-3 isoleres ved sikting av en human DNA-bank ved hjelp av en sonde avledet fra sekvensen av genet Grb2.

500 000 rekombinante λ -gt11-fager som bærer DNA-fragmentene, fra en human placenta-bank (Clontech) siktet ved hjelp av en sonde avledet fra sekvensen av genet Grb2. Den benyttede sonde tilsvarte de 8 første aminosyrer av proteinet Grb2 og hadde følgende sekvens:

ATGGAAGCCATCGCCAAATATGAC (SEQ ID nr. 2).

På denne måte ble det identifisert 10 positive kloner. Innskuddet av disse 10 kloner ble isolert i form av EcoRI-fragmenter, klonet inn i plasmidet M13mp18 og sekvensert. Blant disse 10 kloner bar 9 innskutt som var identisk med Grb2-sekvensen. En eneste blant dem bar et innskudd med en størrelse mindre enn genet Grb2 på grunn av en delesjon i SH2-området (figur 1). Analysen av resten av sekvensen viste en perfekt identitet med de tilsvarende områder av Grb2, deriblant de ikke-kodende områder 5' og 3'. Den åpne lesefase for denne klon koder for et protein på 177 aminosyrer (SEQ ID nr. 1), omfattende 2 SH3-områder som omgir et ufullstendig SH2-område (figur 1). Aminosyrene som er utelatt i SH2-området (60 til 100 rester av proteinet Grb2) tilsvarer restene som er implikert i bindingen av Grb2 til peptider inneholdende fosforylerte tyrosiner.

2. Bindingsaktivitet for Grb3-3proteinene.

Som antyd det ovenfor er Grb2-protein et mediator for interaksjonen mellom de fosforylerte vekstfaktor-reseptorer og SOS-faktorene. Dette viser for eksempel at proteinet Grb3-3 ikke er i stand til å interagere med reseptoren for fosforylert EGF men bevarer sin evne til å interagere med et prolinrikt peptid som stammer fra sekvensen av humanfaktor SOS1.

Kapasiteten for Grb3-3-bindingen har vært studert under anvendelse av fusjonsproteiner på biotinylerede glutation-S-transferase (GST). Denne type fusjon tillater en hurtig og effektiv rensing av de rekombinante produkter. For dette formål blir oppfinnelsens sekvenser uttrykt i stammen TG1 av E.coli i form av fusjonsproteiner med GST i henhold til den teknikk som er beskrevet av Smith og Johnson i ["Gene" 67 (1988) 31]. Kort sagt blir genene Grb2 og Grb3-3 modifisert ved innføring på den ene og annen side av start- og stopp-kodonene av et BamHI-sete. For dette formål blir de åpne lesefaser av disse gener forsterket ved PCR ved hjelp av de følgende oligonukleotider:

10 Oligonukleotid I (5') (SEQ ID nr. 3):
GAATTCCGGATCCATGGAAGCCATCGCCAAATATGACTTC.

Oligonukleotid II (3') (SEQ ID nr. 4):
GAATTCCGGATCCTTAGACGTTCCGGTTCACGGGGGTGAC.

15 Den understrekede del tilsvarer det dannede BamHI-setet, fulgt eller foregått av start- og stopp-codonene.

De således forsterkede gener klones derefter i form av BamHI-fragmenter i vektoren pGEX 2T (Pharmacia) som er linearisert med det samme enzym, ved 3' og i fase med et cDNA som koder for GST. De således oppnådde vektorer benyttes derefter for å transformere stammen E.coli TG1. De således transformerte stammer forkultiveres over natten ved 37°C, fortynnes til 1/10e i LB-medium, det tilsettes så IPTG for å indusere ekspresjon (2 timer, 25°C), og derefter dyrkes det hele i ca. 21 timer ved 25°C. Cellene blir derefter lysert og de fremstilte fusjonsproteiner renses ved affinitet på agarose-GSH-kolonne. For dette formål blir bakterielysatsat inkubert i nærvær av gel (fremstilt og ekvilibrert med lyseringsbuffer) i 15 minutter ved 4°C. Etter 3 vaskinger med en Tris-HCl pH 7,4-buffer elueres proteinene i nærvær av en Tris-HCl pH 7,7-buffer inneholdende et overskudd av GST. Supernatanten samles og sentrifugeres.

30 Den samme protokoll benyttes for å fremstille en mutant av Grb2 der glycin 203 er erstattet av arginin (Grb2G203R) og en mutant av Grb3-3 der glycin 162 er erstattet med et arginin (Grb3-3G162R). Mutanten Grb2G203R er beskrevet som ikke lenger å ha noen aktivitet i en re-initieringstest for DNA-syntese (Lowenstein et al supra).

35 Mutanten Grb3-3G162R bærer den samme mutasjon i den samme posisjon og skulle derfor likeledes være inaktiv.

Disse mutanter fremstilles ved mutagenese ved PCR på genene Grb2 og Grb3-3 under anvendelse, ved 5', av oligonukleotid I som beskrevet ovenfor, og, ved 3', oligonukleotid I i henhold til hvilket den muterte codon er understreket:

5 Oligonukleotid III (3') (SEQ ID nr. 5):

GACGTTCCGGTTCACGGGGGTGACATAATTGCGGGGAAACATGCGGGTC.

De således forsterkede fragmenter blir derefter eluert, reforsterket ved PCR ved hjelp av oligonukleotidene I og II og derefter klonet inn i vektoren pGEX 2T. Mutantene
10 fremstilles derefter som beskrevet ovenfor.

Fusjonsproteinene på GST (GST-Grb2), GST-Grb3-3, GST-GRB3-3G162R og GST) biotinyleres derefter ved klassiske teknikker som kjent av fagmannen (jfr. generelle teknikker for molekylær-biologi samt Mayer et al. i "PNAS" 88 (1991) 627), og blir
15 så benyttet som sonder for å bestemme bindingen til reseptoren på immobilisert, fosforylert EGF (2.1.) og derefter på et peptid avledet fra hSOS1 (2.2).

2.1. Vinning til fosforylert EGF-reseptor

20 Protokoll: Reseptoren på det benyttede EGF renses fra A431-celler ved immobilisering på WGA-sefarose i henhold til den teknikk som er beskrevet av Duchesne et al. i ("Science" 259 (1993) 525). 2 µg av denne reseptor stimuleres derved med 1 µM EGF i 10 min. ved 22°C og inkuberes så, med eller uten kald ATP (10 µM), i nærvær av 2,5 mM MnCl₂ i en HNTG-buffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton, 10 %
25 Glycerol, pH = 7,5) ved 4°C i 2 minutter. Fosforyleringen av reseptoren stanses derefter ved tilsetning av en nedbrytningsbuffer. Prøvene deponeres derefter på en SDS-PAGE 4-20 % gel og overføres så på difluorerte polyvinyliden-membraner (PVDF). De dannede blots blir derefter inkubert i nærvær av forskjellige biotinylerede GST-fusjoner (2 µg/ml), og så bestemt ved hjelp av streptavidin koblet med alkalisk fosfatase (Promega).
30 EGF-reseptorene underkastes likeledes en immunoblot i nærvær av anti-fosfotyrosin-antistoffer (anti-PY) for å verifisere at reseptorene virkelig er fosforylert.

Resultater: De oppnådde resultater er vist i figur 2a. De viser, som ventet, at proteinet Grb2 interagerer med reseptoren EGF kun i fosforylert form. De viser videre at proteinet Grb3-3 ikke binder reseptoren EGF, uansett fosforyleringsgrad.
35

2.2. Binding til et peptid avledet fra hSOS1.

Protokoll: De to følgende proteinrike peptider syntetiseres:

- 5 Peptid hSOS1: GTPEVPVPPPVPVRRRPESA: Dette peptid tilsvarer restene 1143 til 1162 av protein hSOS1 (Li et al., "Nature" 363 (1993) 83), ansvarlig for interaksjonen mellom Grb2 og hSOS1 (SEQ ID nr. 6).

- 10 Peptid 3BP1: PPPLPLV: Dette peptid avledes fra protein 3BP1 som er kjent for på effektiv måte å binde SH3-området av Ab1 og Src (Cicchetti et al., "Science" 257 (1992) 803)(SEQ ID nr. 7).

- 15 Hvert av disse peptider (1 µl, 10 mg/ml) ble mobilisert på en nitrocellulosemembran. Membranene ble derefter inkubert i en blokkerende buffer (Tris 20 mM pH = 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween, 3 % bovinalbumin). Membranene inkuberes derefter natten over ved 4°C i nærvær av forskjellige biotinylerede GST-fusjoner (4 µg/ml), og påvises så ved hjelp av streptavidin, koblet til alkalisk fosfatase (Promega).

- 20 Resultater: De oppnådde resultater er vist i figur 2b. De viser at Grb3-3 på samme måte som Grb2 er i stand til å binde peptidet hSOS1. De viser videre at denne interaksjon er spesifikk fordi overhodet ingen annen binding observeres med peptidet 3BP1. Videre viser resultatene også at mutanten Grb3-3G162R ikke lenger er i stand til å binde hSOS1, noe som bekrefter viktigheten av denne resten og den funksjonelle rolle for denne interaksjon.

25

3. Aktivitet for proteinet Grb3-3.

Dette eksempel viser at proteinet Grb3-3, på tross av delesjonen i området SH2, har en funksjonell virkning.

- 30 Aktiviteten til proteinet Grb3-3 er studert ved bestemmelse av kapasiteten til å koope-
rere med ras for transaktivering av en promoter som har ras-respons-elementer (RRE)
og styrer ekspresjonen av en rapportør-gen.

- 35 Den benyttede protokoll er for eksempel beskrevet av Scweighoffer et al., i "Science"
256 (1992) 825. Kort sagt er den benyttede promoteren en syntetisk promoter bestående
av murin-promoteren av genet til kinase-tymidin og 4 repeterte PEA1-elementer,
avledet fra polyôm-forsterkeren (Wasylyk et al., "EMBO J." 7 (1988) 2475): Py-TK-

promoter. Denne promoter styrer ekspresjonen av rapportør-genet ved oppreden av det bakterielle gen av klor-aminfenikol-acetyl-transferase (KAT): vektor Py-TK-KAT.

Ekspresjonsvektorene for de prøvede gener ble konstruert ved innskyting av genene i form av BamHI-fragmenter på BglII-setet av plasmidet pSV2. Dette setet tillater å plassere genene under kontroll av den tidlige promoter SV40.

ER22-cellene med 40 % konfluens transfekteres med 0,5 µg vektor Py-TK-KAT alene, (Py) eller i nærvær av ekspresjonsvektoren som, under kontroll av den tidlige promoter av SV40, bærer genet Grb2, 2 µg, Grb3-3, 2 µg, Grb2(G203R) 2 µg, Grb3-3(G162R) 2 µg, eller Grb3-3, 2 µg + Grb2, 2 µg. I hvert tilfelle justeres den totale mengde DNA til 5 µg med en ekspresjonsvektor uten innskudd. Transfeksjonen gjennomføres i nærvær av lipospermin (Transfectam IBF-Sepracor). Cellene holdes i 48 timer i kultur i et DMEM-medium som er supplert med 0,5 % fetalkalveserum. Kat-aktiviteten (transaktiviering av RRE) bestemmes derefter som beskrevet av Wasyluk et al. i ("PNAS" 85 (1988) 7952).

De oppnådde resultater er vist i figur 3. De viser klart at ekspresjonen av proteinet Grb3-3 motvirker virkningen av aktiveringen av en vekst-faktor-reseptor. De viser likeledes at Grb2 i overskudd motvirker virkningen av Grb3-3 på vekstfaktor-responsen.

4. Grb3-3 induserer cellulær apoptose.

Dette eksempel viser den direkte implikasjon av Grb3-3 i cellulær apoptose. Denne egenskap gir spesielt fordelaktige anvendelser for behandling av patologier som skyldes en cellulær proliferering (cancere, restenose og så videre).

Induksjonen av cellulære apoptose på grunn av Grb3-3 vises (i) ved injeksjon av det rekombinante protein i 3T3-fibroblaster og (ii) ved overføring av sekvensen som koder for Grb3-3 i 3T3-celler.

(i) Injeksjon av rekombinant protein.

Det rekombinante Grb3-3-protein fremstilles i form av fusjonsprotein med GST i henhold til den protokoll som er beskrevet i eksempel 2. Fusjonsproteinet behandles derefter med trombin (0,25 %, Sigma) for å separere GST-delen og renses derefter ved ionebyttingskromatografi på en monoQ-kolonne. Fraksjonene inneholdende det rekombinante protein konsentreres derefter ved hjelp av Mikrosep mikrokonsentratorer (Filtron) i en fosfatbuffer 20 mM (pH 7) inneholdende 100 mM NaCl. Det således oppnådde, rensede protein injiseres (1 til 3 mg/ml) i 3T3-celler i kultur ved hjelp av en

automatisk Eppendorf mikroinjektor. Cellene inkuberes derefter ved 34°C og fotografes i regulære intervaller for å følge de morfologiske transformasjoner. De oppnådde resultater viser at 5 timer etter injeksjon av Grb3-3 er størstedelen av cellen død mens injeksjon under de samme betingelser av Grb2 eller mutanten Grb3-3 (G162R) ikke har noen virkning på cellenes levedyktighet.

(ii) Overføring av sekvensen som koder for det rekombinante protein.

Det konstrueres et plasmid omfattende sekvensen SEQ ID nr. 1 som koder for proteinet Grb3-3 under kontril av den tidlige promoter av virusen SV40.

Fibroblastene 3T3 med 40 % konfluens transfekteres i nærvær av lipospermin (Transfectam, IBF-Sepracor) med 0,5 eller 2 µg av dette ekspresjonsplasmid. 48 timer etter transfeksjon er 50 % av cellene i suspensjon i mediet og de resterende celler som adherer til veggen, oppviser meget vesentlige morfologiske endringer (figur 4). En analyse ved agarose-gel-elektroforese viser videre at cellene oppviser et oligonukleosomt DNA-fragmenteringsmønster som er karakteristisk for døde celler (figur 4). I motsetning til dette bevarer cellene som er transfektert under de samme betingelser med et ekspresjonsplasmid av Grb2, Grb3-3 (G162R) eller Grb2 (G203R) bevarer en normal morfologi og forblir levedyktige og oppviser overhodet ingen DNA-fragmentering. Som vist i figur 4 tillater koekspressjonen av Grb2 å motvirke virkningene til Grb3-3.

Disse resultater viser således klart at Grb3-3 utgjør et dreper-gen som er i stand til å indusere cellulær apoptose. Som antydnet ovenfor tilbyr denne egenskap spesielt fordelaktige anvendelser for behandling av patologier som skyldes en cellulær proliferering som særlig cancere, restenose, og så videre.

5. Påvisning av ekspressjonen av Grb3-3 i lymfocytter som er infektert med HIV-virus.

Dette eksempel viser at, under infeksjonscyklusen for T-lymfocytene med HIV-virus, den relative andel av mRNA i Grb2 og Grb3-3 modifiseres og at meddelelsen for Grb3-3 overeksprimeres på tidspunktet for massiv viral produksjon og cellulær død.

Lymfocytene fra perifert blod infekteres med HIV-1-virus i to fortyninger (1/10 og 1/100) den første, fjerde eller syvende dag. mRNA fra disse celler analyseres derefter ved revers-PCR ved hjelp av spesifikke Grb2- og Grb3-3-oligonukleotider for å bestemme den relative andel av meddelelsen av Grb2 og Grb3-3. De spesifikke oligonukleotider av Grb3-3 som benyttes er de følgende:

Oligonukleotid IV (3'):ATCGTTTCCAAACGGATGTGGTTT (SEQ ID nr.8)

Oligonukleotid V (5'):ATAGAAATGAAACCACATCCGTTT (SEQ ID nr.9).

- 5 De oppnådde resultater er vist i figur 5. De viser klart at 7 dager etter infeksjon med HIV-virus blir mRNA av Grb3-3 overeksprimert. Som vist ved dosering av p24-proteinet og inversvirus-transkriptase tilsvarer dag 7 likeledes den periode ved hvilken det observeres en massiv, viral produksjon.

SEKVENSLISTE:**(1) Generell informasjon:****(i) Søker:**

- 5 (A) Navn: Aventis Pharma S.A.
 (B) Gate: 20, avenue Raymond Aron
 (C) By: Antony
 (E) Land: Frankrike
 (F) Postkode: 92165

10

(ii) Oppfinnelsens tittel: Genet Grb3-3 med varianter derav samt deres anvendelse.**(iii) Antall sekvenser: 9**

15

(iv) Maskinlesbar form:

- (A) Bærertype: Floppy disk
 (B) Maskin: IBM kompatibel PC
 (C) Eksploateringssystem: PC-DOS/MS-DOS
 (D) Program: PatentIn Release #1.0, Versjon # 1.25 (OEB).

20

(2) Informasjon for SEQ ID nr. 1:**(i) Sekvenskarakteristikk:**

- (A) Lengde: 933 basepar
 (B) Type: nukleinsyre
25 (C) Antall grener: dobbel
 (D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

30

(iii) Hypotetisk: Nei**(iii) Anti-retning: Nei****(vi) Opprinnelse:**

- 35 (A) Organisme: Homosapiens

(ix) Ytterligere karakteristik:

(A) Navn/nøkkel: CDS

(B) Plassering: 37..567

(D) Andre opplysninger: /produkt= "Grb3-3"

5

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 1:

	GAATTCGGGG CTGCTGAGCA CTGAGCAGGG CTCAGA	ATG GAA GCC ATC GCC AAA	54
		Met Glu Ala Ile Ala Lys	
		1 5	
10	TAT GAC TTC AAA GCT ACT GCA GAC GAC GAC CTG AGC TTC AAA AGG GGG		102
	Tyr Asp Phe Lys Ala Thr Ala Asp Asp Asp Leu Ser Phe Lys Arg Gly		
	10 15 20		
	GAC ATC CTC AAG GTT TTG AAC GAA GAA TGT GAT CAG AAC TGG TAC AAG		150
	Asp Ile Leu Lys Val Leu Asn Glu Glu Cys Asp Gln Asn Trp Tyr Lys		
15	25 30 35		
	GCA GAG CTT AAT GGA AAA GAC GGC TTC ATT CCC AAG AAC TAC ATA GAA		198
	Ala Glu Leu Asn Gly Lys Asp Gly Phe Ile Pro Lys Asn Tyr Ile Glu		
	40 45 50		
	ATG AAA CCA CAT CCG TTT GGA AAC GAT GTG CAG CAC TTC AAG GTG CTC		246
	Met Lys Pro His Pro Phe Gly Asn Asp Val Gln His Phe Lys Val Leu		
20	55 60 65 70		
	CGA GAT GGA GCC GGG AAG TAC TTC CTC TGG GTG GTG AAG TTC ATT TCT		294
	Arg Asp Gly Ala Gly Lys Tyr Phe Leu Trp Val Val Lys Phe Asn Ser		
	75 80 85		
	TTG AAT GAG CTG GTG GAT TAT CAC AGA TCT ACA TCT GTC TCC AGA AAC		342
	Leu Asn Glu Leu Val Asp Tyr His Arg Ser Thr Ser Val Ser Arg Asn		
25	90 95 100		
	CAG CAG ATA TTC CTG CGG GAC ATA GAA CAG GTG CCA CAG CAG CCG ACA		390
	Gln Gln Ile Phe Leu Arg Asp Ile Glu Gln Val Pro Gln Gln Pro Thr		
	105 110 115		
	TAC GTC CAG GCC CTC TTT GAC TTT GAT CCC CAG GAG GAT GGA GAG CTG		438
	Tyr Val Gln Ala Leu Phe Asp Phe Asp Pro Gln Glu Asp Gly Glu Leu		
30	120 125 130		
	GGC TTC CGC CGG GGA GAT TTT ATC CAT GTC ATG GAT AAC TCA GAC CCC		486
	Gly Phe Arg Arg Gly Asp Phe Ile His Val Met Asp Asn Ser Asp Pro		
	135 140 145 150		
	AAC TGG TGG AAA GGA GCT TGC CAC GGG CAG ACC GGC ATG TTT CCC CGC		534
	Asn Trp Trp Lys Gly Ala Cys His Gly Gln Thr Gly Met Phe Pro Arg		
35	155 160 165		

AAT TAT GTC ACC CCC GTG AAC CGG AAC GTC TAAGAGTCAA GAAGCAATTA 584
 Asn Tyr Val Thr Pro Val Asn Arg Asn Val
 170 175

TTTAAAGAAA GTGAAAAATG TAAAACACAT ACAAAGAAT TAAACCCACA AGCTGCCTCT 644
 5 GACAGCAGCC TGTGAGGGAG TGCAGAACAC CTGCCGGGTC ACCCTGTGAC CCTCTCACTT 704
 TGGTTGGAAC TTTAGGGGGT GGGAGGGGGC GTTGGATTTA AAAATGCCAA AACTTACCTA 764
 TAAATTAAGA AGAGTTTTTA TTACAAATTT TCACTGCTGC TCCTCTTTCC CCTCCTTTGT 824
 CTTTTTTTTT TTCCTTTTTT CTCTTCTGTC CATCAGTGCA TGACGTTTAA GGCCACGTAT 884
 AGTCCTAGCT GACGCCAATA AAAACAAGA AACCAAAAAA CCCGAATTC 933

10

(2) Informasjon for SEQ ID nr. 2:

(i) Sekvenskarakteristikk:

(A) Lengde: 24 basepar

(B) Type: nukleinsyre

15

(C) Antall grener: enkel

(D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

20

(vi) Opprinnelse:

(A) Organisme: Oligonukleotid

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 2:

ATGGAAGCCA TCGCCAAATA TGAC 24

25

(2) Informasjon for SEQ ID nr. 3:

(i) Sekvenskarakteristikk:

(A) Lengde: 39 basepar

(B) Type: nukleinsyre

30

(C) Antall grener: enkel

(D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

(vi) Opprinnelse:

(A) Organisme: Oligonukleotid I

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 3:

5 GAATTCGGAT CCATGGAAGC CATCGCCAAA TATGACTTC 39

(2) Informasjon for SEQ ID nr. 4:

(i) Sekvenskarakteristikk:

(A) Lengde: 39 basepar

10 (B) Type: nukleinsyre

(C) Antall grener: enkel

(D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

15

(vi) Opprinnelse:

(A) Organisme: Oligonukleotid II

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 4:

20 GAATTCGGAT CCTTAGACGT TCCGGTTCAC GGGGGTGAC 39

(2) Informasjon for SEQ ID nr. 5:

(i) Sekvenskarakteristikk:

(A) Lengde: 49 basepar

25 (B) Type: nukleinsyre

(C) Antall grener: enkel

(D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

30

(vi) Opprinnelse

(A) Organisme: Oligonukleotid III

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 5:

35 GACGTTCCGG TTCACGGGGG TGACATAATT GCGGGGAAAC
ATGCGGGTC 49

- (C) Antall grener: enkel
- (D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

5

(vi) Opprinnelse:

- (A) Organisme: Oligonukleotid IV

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 8:

10

ATCGTTTCCA AACGGATGTG GTTT

24

(2) Informasjon for SEQ ID nr. 9:

(i) Sekvenskarakteristikk:

15

- (A) Lengde: 24 basepar
- (B) Type: nukleinsyre
- (C) Antall grener: enkel
- (D) Konfigurasjon: lineær.

(ii) Molekyltype: cDNA

20

(vi) Opprinnelse:

- (A) Organisme: Oligonukleotid V

(xi) Beskrivelse av sekvensen: SEQ ID nr. 9:

25

ATAGAAATGA AACCCACATCC GTTT

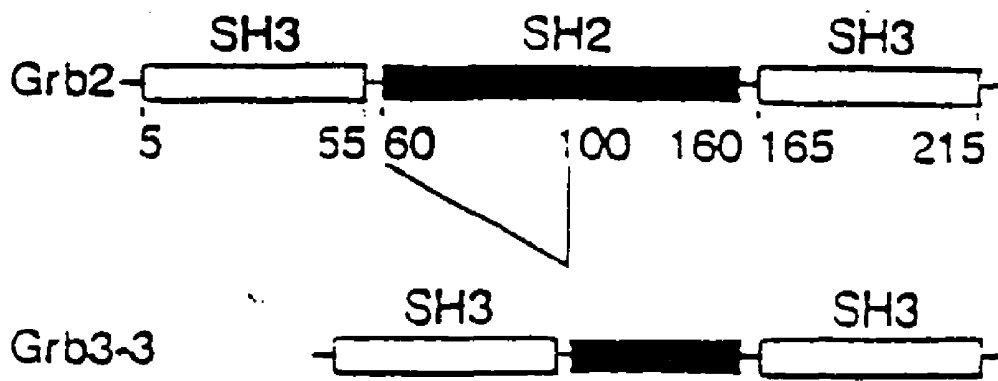
24

Patentkrav

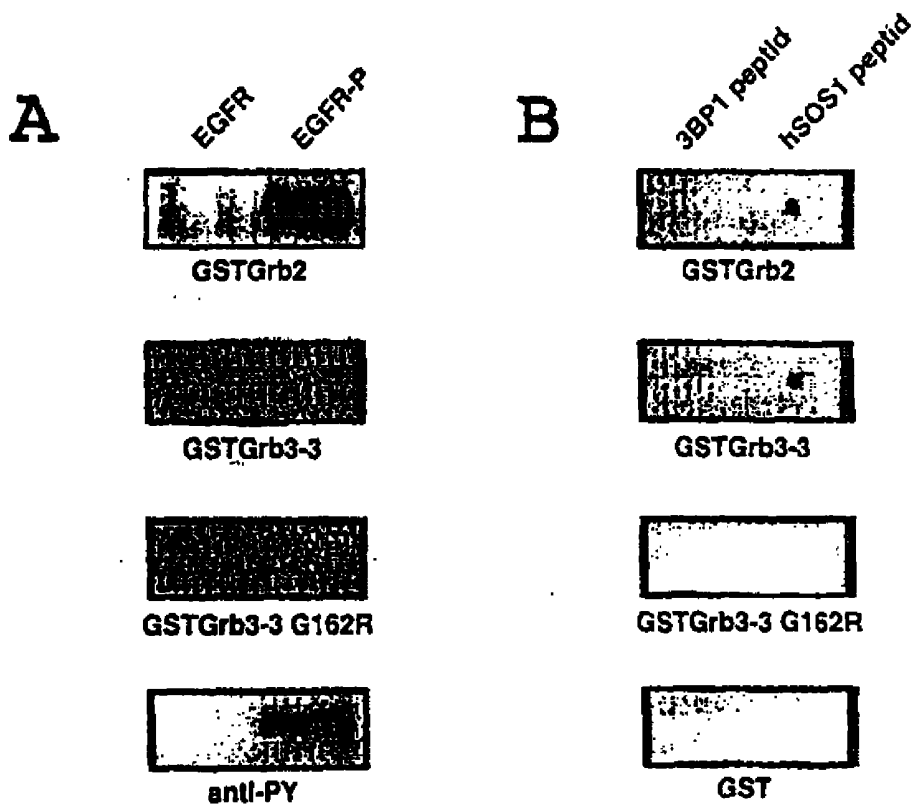
1.
Nukleotid-sekvens, karakterisert ved at den representeres ved sekvensen
5 SEQ ID nr. 1.
2.
Nukleotid-sekvens, karakterisert ved at den er representert ved sekvensen
SEQ ID nr. 1 og i stand til i det minste delvis å inhibere ekspresjon av proteinet Grb2
10 eller Grb3-3.
3.
Vektor, karakterisert ved at den omfatter en nukleotid-sekvens i henhold til
krav 1 eller 2.
15
4.
Vektor ifølge krav 3, karakterisert ved at det dreier seg om en viral-vektor.
5.
20 Vektor ifølge krav 4, karakterisert ved at det dreier seg om en vektor avledet
fra adenoviruser, retroviruser, AAV, HSV-virus, CMV eller vaksine-virus.
6.
Vektor ifølge krav 4 eller 5, karakterisert ved at det dreier seg om en
25 replikasjonsdefektiv virus.
7.
Farmasøytisk preparat, karakterisert ved at det omfatter en eller flere
vektorer ifølge et av kravene 3 til 6.
30
8.
Farmasøytisk preparat, karakterisert ved at det inneholder en eller flere
nukleotid-sekvenser i henhold til kravene 1 eller 2 i kompleksert form med DEAE-
dekstran, med nukleære proteiner eller med lipider, i uren form eller også innarbeidet i
35 liposomer.

9.

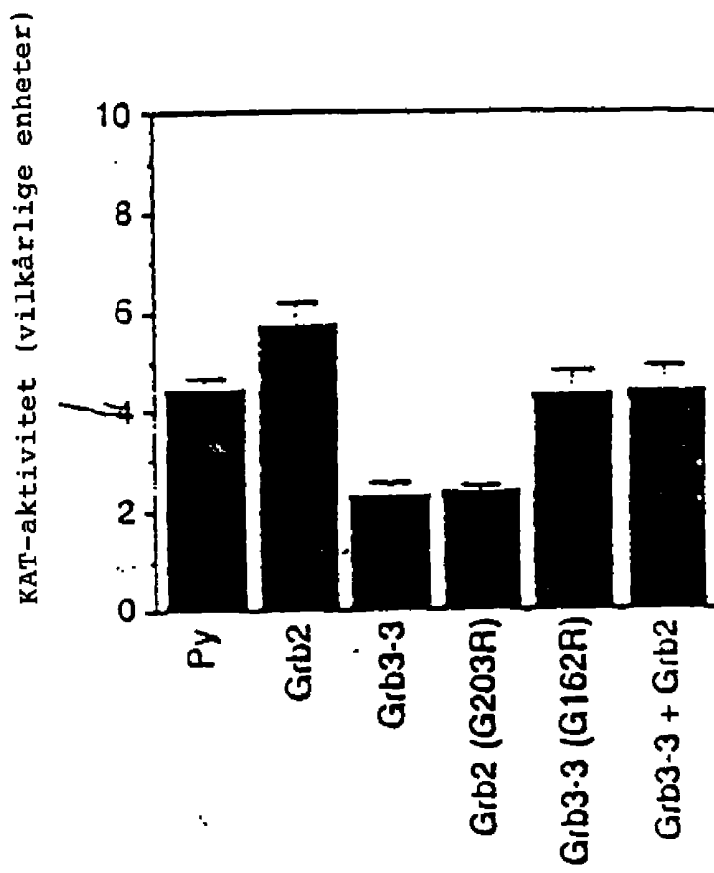
Anvendelse av en sekvens ifølge krav 1 eller 2 eller en vektor inneholdende sekvensen for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av cancer.



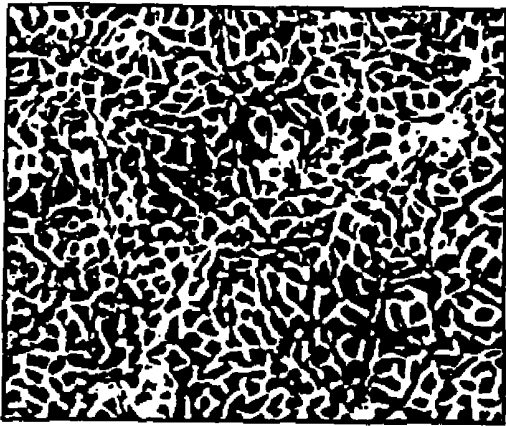
Figur 1



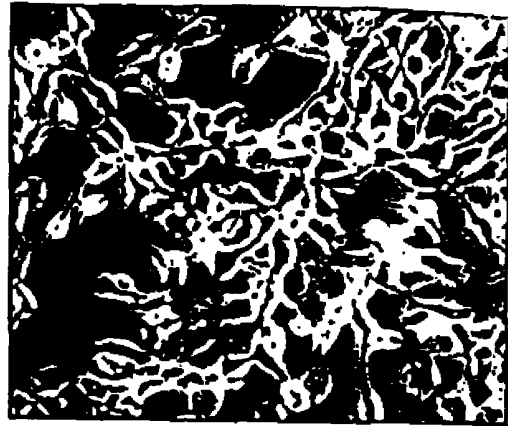
Figur 2



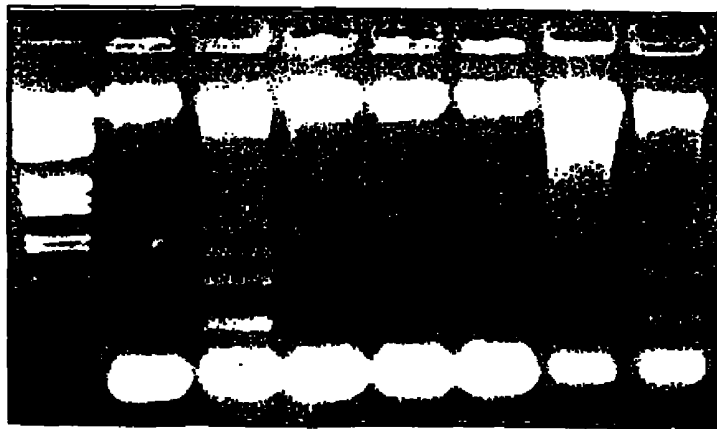
Figur 3



NIH3T3

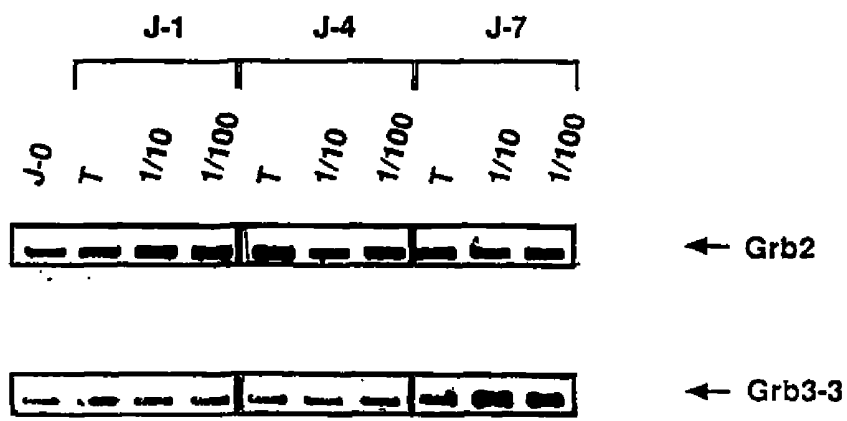


+Grb3-3



Marker
NIH3T3
+ Grb3-3
+ Grb2
+ Grb3-3 + Grb2R
+ Grb2 G203R
+ Grb3-3 + Grb2
+ Grb3-3 + Grb2G203R

Figure 4



Figur 5