

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Dezember 2005 (08.12.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/116201 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/12, A61K 38/17, 38/43

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000668

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. April 2005 (13.04.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 026 045.1 25. Mai 2004 (25.05.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): UNIVERSITÄT ULM [DE/DE]; Albert-Einstein-Allee 5, 89081 Ulm (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEUFFERLEIN, Thomas [DE/DE]; Föhrenweg 22, 89275 Elchingen (DE). ADLER, Guido [DE/DE]; Zeppelinstrasse 7, 89075 Ulm (DE). BREY, Andreas [DE/DE]; Tokajerweg 25, 89072 Ulm (DE).

(74) Anwalt: RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, 69198 Schriesheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 2005/116201 A1

(54) Title: TYROSINE KINASE TNK FOR USE AS INHIBITOR FOR NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTOR KAPPA B (NFκB)

(54) Bezeichnung: TYROSINKINASE TNK ALS INHIBITOR FÜR DEN NUKLEÄREN TRANSKRIPTIONSFAKTOR KAPPA B (NFκB)

(57) Abstract: The invention relates to the enzyme tyrosine kinase TNK 1 which is suitable as inhibitor for nuclear transcription factor kappa B (NFκB) in eukaryotic cells.

(57) Zusammenfassung: Als Inhibitor für den nukleären Transkriptionsfaktor Kappa B (NFκB) in eukaryontischen Zellen ist das Enzym Tyrosinkinase TNK 1 geeignet.

TYROSINKINASE TNK ALS INHIBITOR FÜR DEN NUKLÄREN TRANSKRIPTIONSFAKTOR KAPPA B
(NF- κ B)

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft einen Inhibitor für den nukleären Transkriptionsfaktor kappa B (NF κ B).

Der nukleäre Transkriptionsfaktor kappa B – kurz NF κ B - fördert Tumorwachstum und Metastasierung, spielt eine Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher
10 Darmerkrankungen, ischämischer Erkrankungen, Kachexie, sowie bei Autoimmunerkrankungen und bei der Regulation der Expression des HIV-1 Gens.

NF κ B ist ein Heterodimer, bestehend aus den Proteinuntereinheiten p50 und p65. Im inaktiven Zustand liegt NF κ B gebunden an seinen inhibierenden Proteinkomplex I- κ B im Cytosol vor. Zur Aktivierung von NF κ B wird I- κ B nach Phosphorylierung durch
15 I κ B Kinase-Komplexe (IKK) mittels des 26-S Proteasoms abgebaut und NF κ B wird freigesetzt. Anschließend gelangt NF κ B in den Zellkern, wo es an die DNA bindet und die Transkription aktiviert. Auf diese Weise werden überwiegend Gene exprimiert, welche für die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , Interleukine), induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), Adhäsionsmolekülen und für Proteine
20 mit anti-apoptotischer Wirkung (sogenannte antiapoptotische Mediatoren) kodieren. Antiapoptotische Mediatoren spielen eine Rolle bei der Ausbildung von Apoptoseresistenz und der damit verbundenen Entstehung bestimmter Tumoren.

Im Stand der Technik werden bereits verschiedene Substanzen zur Hemmung der NF κ B
25 Aktivierung eingesetzt. Diese Substanzen hemmen entweder die Translokation von NF κ B in den Zellkern, oder die DNA-Bindung oder die Transaktivierung von NF κ B, ihre Wirkung ist jedoch insbesondere hinsichtlich der Spezifität nicht (voll) zufriedenstellend.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, einen neuen NFκB-Inhibitor bereitzustellen, der spezifisch und effektiv die NFκB- Aktivierung und/oder NFκB-Aktivität hemmt.

- 5 Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Angabe der Substanz Tyrosinkinase TNK1 zur Verwendung als Inhibitor der Transaktivierung von NFκB in eukaryontischen Zellen.

Die Tyrosinkinase TNK1 ist eine Tyrosinkinase, die ursprünglich aus foetalen
10 CD34+/Lin-/CD38-B-Zell Vorläufern isoliert wurde (Hoehn et al. 1996). TNK1 ist überwiegend in embryonalen Geweben im Rahmen der Organogenese/-differenzierung exprimiert, sowie in einigen Tumorzellen und fetalem Blut (Hoehn et al., 1996, Brey, A., Adler G., Seufferlein T., unveröffentlichte Daten). TNK1 hat ein Molekulargewicht von 72 kDa und wird in die ACK Familie der Tyrosinkinasen eingruppiert. Die Kinase
15 besitzt die für diese Familie typische Anordnung von Subdomänen, bei der die Kinasedomäne am N-Terminus lokalisiert ist. Darüber hinaus befinden sich C-terminal zwei putative Proteininteraktionsdomänen (*src homology domain 3* und *proline rich stretch*-Domänen, Sequenz siehe Anhang 2). Die Aktivierung/Autophosphorylierung von TNK1 erfolgt bereits bei deren Expression. Als Interaktionspartner von TNK1
20 wurde bislang die SH3 Domäne von PLCgamma1 etabliert (Felschow et al., 2000). Die Aktivität der Kinase wird durch endogene Faktoren nicht wesentlich moduliert (Hoehn et al., 1996).

Die Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, daß der Transkriptionsfaktor
25 NFκB durch diese Tyrosinkinase TNK1 in seiner Wirkung gehemmt werden kann. Es konnte ein *in vitro* Modell etabliert werden, das im wesentlichen aus humanen embryonalen Nierenzellen HEK293 besteht, in denen TNK1 durch Tetrazyklin induzierbar exprimiert wird. (Da TNK1 normalerweise kaum in HEK293 Zellen exprimiert wird, entspricht diese induzierte Expression von TNK1 quasi einer *de novo*
30 Expression). Die Zellen zeigen bei Expression von TNK1 ein verlangsamtes Zellwachstum und eine Abnahme der Zellzahl. Als Target für die TNK1 Wirkung

wurde der NFκB Signalweg identifiziert: TNK1 hemmt durch Phosphorylierung von Tyrosinresten der p65-Untereinheit des NFκB-Dimers dessen Transaktivierungseigenschaften. Die Bindung von NFκB an die DNA wird durch TNK1 dagegen nicht gehemmt. Es wurde zudem eine hohe Wirkungsspezifität der TNK1 festgestellt, nämlich eine selektive Wirkung auf NFκB, während andere Transkriptionsfaktoren von TNK1 in ihrer Wirkung nicht beeinflusst werden.

Die erfindungsgemäße Verwendung von TNK1 als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB eröffnet ein völlig neues Prinzip zur Therapie von Erkrankungen, die mit erhöhter NFκB-Aktivierung verbunden sind, d.h. die mit einer erhöhten NFκB Aktivierung einhergehen und/oder durch diese erhöhte NFκB Aktivierung entscheidend beeinflusst werden. Hierzu gehören beispielsweise Tumorwachstum und Metastasierung, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, ischämische Erkrankungen, Kachexie, Autoimmunerkrankungen und die Regulation der Expression des HIV-1 Gens.

Die erfindungsgemäße Verwendung von TNK1 als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB ist daher außerdem dazu geeignet, die Wirkung einer Chemo- oder Strahlentherapie, die zu einer gegenregulatorischen Hochregulation von NFκB im Tumorgewebe führt, zu verstärken.

Desweiteren ist die Verwendung von TNK1 als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB auch zur Facilitierung von zellulärer Apoptose geeignet. Das heißt: zelleigene Programme, die natürlicherweise eine Apoptose auslösen, im konkreten Fall jedoch durch eine (wodurch auch immer bedingte) hohe NFκB-Aktivierung in ihrer Wirkung blockiert sind, können durch eine TNK1-induzierte Hemmung der NFκB-Aktivierung wieder planmäßig ablaufen. Die Hemmung von NFκB durch Expression von TNK1 ist ausreichend, um die mRNA-Expression von NFκB-regulierten anti-apoptotischen Zielgenen wie z.B. XIAP zu inhibieren.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, daß die TNK 1 mittels Gentransfer in die NFκB exprimierenden Zellen eingebracht wird.

Dieser Gentransfer ist vorzugsweise induzierbaren und/oder konstitutiv, weiter vorzugsweise entweder transient oder dauernd und weiter vorzugsweise entweder viral oder nicht viral.

5

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert. Bei den Figuren zeigen:

Fig. 1: Domänenstruktur von TNK1: Eine N-terminale Kinasedomäne, gefolgt von einer SH3 Domäne und einer C-terminalen Prolin-reichen Domäne.

10

Fig. 2: Zellwachstum von HEK293 Zellen in An-/Abwesenheit von TNK1 und unter Stimulation mit TNF α in An-/Abwesenheit von TNK1. Zellen, die TNK1 exprimieren, sind an Tag 7 nicht mehr nachweisbar, wenn sie zusätzlich mit TNF α inkubiert wurden.

15

Fig. 3: A: Konzentration des in den Apoptoseprozeß involvierten Enzyms Effektorcaspase 3 nach 6 und 12 Stunden [h] Inkubation mit TNF α in Zellen mit verstärkter TNK 1 Expression infolge Inkubation mit Tetracyclin (Spuren "TNK") und in Zellen ohne (signifikant nachweisbare) TNK 1 Expression infolge Inkubation ohne Tetracyclin (Spuren "-")

20

B: Konzentration des 89 kDa-Fragments des DNA Reparaturenzyms PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) infolge Spaltung durch die Effektorcaspase 3. Spur "-" = Zellen, die weder TNK1 exprimieren, noch mit TNF α behandelt wurden

25

Spur "TNK1" = Zellen, die TNK1 exprimieren ohne TNF α Stimulation

Spur "TNF α " = Zellen, die nur mit 400U/ml TNF α stimuliert wurden

Spur "TNK1/ TNF α " = Zellen, die TNK1 exprimieren und mit 400U/ml TNF α stimuliert wurden

30

C: Konzentration der feien Nukleosomen (DNA-Histon-Komplexe) im Zytosol infolge des Abbaus der genomischen DNA.

Spur "TNK1-/ TNF α -" = Zellen, die weder TNK1 exprimieren, noch mit TNF α behandelt wurden

Spur "TNK1+/ TNF α -" = Zellen, die TNK1 exprimieren, ohne TNF α Stimulation

5 Spur "TNK1-/ TNF α +" = Zellen, die nur mit 400U/ml TNF α stimuliert wurden

Spur "TNK1+/ TNF α +" = Zellen, die TNK1 exprimieren und mit 400U/ml TNF α stimuliert wurden

10

Fig. 4: Luziferase-Aktivität bzw. NF κ B-Aktivität von HEK293-Zellen, die mit dem Plasmid pcDNA4-TO-TKN1 transfiziert sind, von HEK293-Zellen, die mit der Kinase-defizienten Plasmid-Mutante K148R-TNK1-pcDNA3 transfiziert sind, und von HEK293-Zellen, die mit einem GAL-p65-Fusionsplasmid mit inregriertem GAL4 Luciferase Reportersystem transfiziert sind.

15

A: HEK293 Zellen wurden mit 0.1 μ g/ml eines 6x HIV-NF- κ B Reporter Konstrukts, 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids und 1 μ g/ml Wildtyp- bzw. K148R-TNK1 pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) für 24 h unter Verwendung von FuGene, Roche, nach Herstellerangaben transfiziert. 4h vor Zelllyse wurden die Zellen mit 400 U/ml TNF α inkubiert. Zur Messung der NF- κ B Aktivität wurde der Dual-Luciferase Assay Kit (Promega) eingesetzt.

20

B: HEK293 Zellen wurden mit 0.1 μ g/ml eines NF- κ B2 Reporter Konstrukts, 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids und 1 μ g/ml Wildtyp- bzw. K148R-TNK1 pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) für 24 h unter Verwendung von FuGene, Roche, nach Herstellerangaben transfiziert. 4h vor Zelllyse wurden die Zellen mit 400 U/ml TNF α inkubiert. Zur Messung der NF- κ B Aktivität wurde der Dual-Luciferase Assay Kit (Promega) eingesetzt.

25

C: HEK293 Zellen wurden mit 0.1 μ g/ml eines pFR-Luc Reporter Konstrukts, 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids, 1 μ g/ml Wildtyp- bzw. K148R-TNK1 pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) sowie 0,1 μ g/ml

30

eines Galp65 Konstruktes für 24 h unter Verwendung von FuGene, Roche, nach Herstellerangaben transfiziert. Zur Messung der Aktivität des Gal-Promoters wurde der Dual-Luciferase Assay Kit (Promega) eingesetzt.

5

Beispiel 1: Nachweis von Tyroxinkinase TNK1 als Inhibitor der Aktivität des Transkriptionsfaktor NFκB im Zellkulturmodell

A) Etablierung eines in vitro Zellkulturmodells mit humanen embryonalen Nierenzellen

10

Das Zellmodell besteht aus humanen embryonalen Nierenzellen HEK293, die stabil mit einem Tetrazyklin Repressor pcDNA6-TR Plasmid transfiziert sind. Eine Transfektion dieser Zellen mit dem „gene of interest“ - im vorliegenden Fall: Flag-getaggte TNK1 - in einem pcDNA4-TO-Plasmid erlaubt die Expression dieses Gens nach Zugabe von Tetrazyklin, da der durch das pcDNA6-TR-Plasmid codierte Repressor des Genpromotors verdrängt wird. Die Integrität beider Plasmide bis zur chromosomalen Rekombination wird durch Zugabe selektiver Antibiotika gemäß den Angaben des Herstellers gewährleistet. Stabil mit dem Repressor transfizierte HEK293 Zellen sind kommerziell bei der Fa. Invitrogen erhältlich (T-Rex HEK293 System. Cat. No: R710-20 07).

In die HEK293 Zellen wurde das aus einer humanen embryonalen Nierenzelllinie isolierte und in das pcDNA4-TO Plasmid klonierte TNK1-Protein (vgl. Fig. 1) mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellten Aminosäuresequenz eingeschleust. Mit anderen Worten: diese HEK293 Zellen wurden mit einem pcDNA4-TO Plasmid transfiziert, das die im Sequenzprotokoll SEQ ID NO. 2 dargestellte c-DNA umfaßt und für das TNK1- Protein mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 dargestellten Aminosäuresequenz kodiert. Anstelle der konkret genannten Aminosäuresequenz bzw. Nukleotidsequenz eignen sich auch solche Aminosäuresequenzen bzw. Nukleotidsequenzen, die zu der genannten Sequenz SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID. NO. 2 wenigstens 90 % Homologie im Bereich der Kinasedomäne aufweisen und ein funktionelles Protein hervorbringen (bilden), das hinsichtlich seiner physiologischen

25

30

Funktion und Wirkung mit der Tyrosinkinase TNK 1 übereinstimmt. Die Transfektion erfolgte mit den im Stand der Technik bekannten Verfahren der Lipid-basierten Transfektion. Vorzugsweise wurden die HEK293 Zellen mit dem Lipid-basierten Transfektionsreagenz FuGene (Roche) nach den Angaben des Herstellers mit 1µg/ml
5 pcDNA4-TO-TNK1 transfiziert.

Durch Zugabe/Verabreichung von Tetrazyklin war in diesen Zellen die Expression der TNK1 induzierbar.

10

B) Wirkung der TNK1-Expression

In dem unter (A) beschriebenen Zellkulturmodell wird die TNK1-Expression durch die Zugabe von Tetrazyklin zum Kulturmedium (Endkonzentration: 1µg/ml) induziert. Da
15 TNK1 normalerweise kaum in HEK293 Zellen exprimiert wird, entspricht diese induzierte signifikant starke Expression von TNK1 quasi einer de novo Expression Die erfolgreich induzierte Expression von TNK1 ist über die Detektion des N-terminalen Flag-Tags (Flag-TNK1) mittels eines kommerziell erhältlichen anti-Flag Antikörpers (Sigma) nachweisbar. Die signifikant stark TNK1 exprimierenden Zellen zeigen ein
20 verlangsamtes Zellwachstum und eine Abnahme der Zellzahl (siehe Fig. 2). Bei gleichzeitiger Inkubation dieser (Tetracyclin-induzierten und infolgedessen) stark TNK1 exprimierenden Zellen mit dem Zytokin TNF α kommt es zu einem wesentlich verstärkten Zelluntergang /Apoptose (programmierten Zellsterben), während bei einer Inkubation von nicht induzierten Zellen ohne (signifikante) TNK 1-Expression mit
25 TNF α kein Zelluntergang (programmiertes Zellsterben)/ keine Apoptose feststellbar ist (siehe Fig. 2).

Als Ursache für den Zelluntergang nach Inkubation und damit Stimulation mit TNF α wurde die Induktion von Apoptose identifiziert, und zwar (A) anhand des Anstiegs der Konzentration bzw. der Aktivität des in den Apoptoseprozeß involvierten Enzyms
30 Effektorcaspase 3, (B) anhand des Ausmaß der Spaltung des DNA Reparaturenzyms PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) durch die Effektorcaspase 3, die das 116 kDa

große Protein in zwei Fragmente von 89 kDa und 24 kDa spaltet und dadurch inaktiviert und (C) anhand des Abbaus bzw. der Fragmentierung genomischer DNA bzw. des daraus resultierenden Anstiegs freier Nukleosomen im Zytosol.

- 5 Der Apoptoseprozess wird von hierarchisch angeordneten Faktoren gesteuert, die über die Aktivierung von spezifischen Nukleasen und Proteasen, darunter auch die Effektorcaspase 3, den Abbau der Zellen bewirkt. Der Anstieg der Konzentration aktiver und damit gespaltener Caspase 3 in den Zellen (als Maß für die Aktivität dieses Enzyms) wurde mittels der dem Fachmann bekannt und geläufigen Methodik der SDS-
- 10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen. Aus den in Fig. 3 A dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, daß die Konzentration/Aktivität der Effektorcaspase 3 in den Tetrazyklin-induzierten und damit verstärkt TNK1-exprimierenden Zellen bereits nach 6 – 8 h deutlich höher war als in den Kontrollzellen ohne Tetrazyklin-Induktion.
- Die Spaltung der PARP wurde anhand der Spaltprodukte, nämlich des 89 kDa-
- 15 Fragments der mit der dem Fachmann bekannten und geläufigen Western-Blot-Analyse unter Einsatz (im Handel erhältlicher) PARP-spezifischer Antikörper nachgewiesen (Fig. 3 B). Aus Fig. 3 B ist ersichtlich, daß in den Zellen, in denen ein Anstieg der Effektorcaspase-3-Konzentration/Aktivität zu beobachten ist, auch eine Spaltung des DNA Reparaturenzyms PARP in seine Untereinheiten auftritt.
- 20 Die Fragmentierung der genomischer DNA in frei Nukleosomen (DNA-Histon-Komplexe) wurde mittels der dem Fachmann bekannt und geläufigen Methodik des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen DNA/Histon-Komplexe nachgewiesen (Fig. 3 C). Aus Fig. 3 C ist ersichtlich, wie die Konzentration der freien Nukleosomen (DNA-Histon-Komplexe) im
- 25 Zytosol in denjenigen Zellen, die ohne TNF α -Stimulation TNK1 exprimieren (Spur "TNK1+/ TNF α -") etwa doppelt so groß ist wie Zellen, die weder TNK1 exprimieren, noch mit TNF α behandelt wurden (Spur "TNK1-/ TNF α -"). In denjenigen Zellen, die nur mit 400U/ml TNF α stimuliert wurden (Spur "TNK1-/ TNF α +"), ist die Konzentration der freien Nukleosomen (DNA-Histon-Komplexe) im Zytosol etwa 8
- 30 mal so groß wie in denjenigen Zellen, die weder TNK1 exprimieren, noch mit TNF α behandelt wurden (Spur "TNK1-/ TNF α -"), und in denjenigen Zellen, die TNK1

exprimieren und mit 400U/ml TNF α stimuliert wurden (Spur "TNK1+/ TNF α +") etwa 15 mal so groß.

5 In allen Fällen ist die Apoptose in Zellen, die TNK1 exprimieren (also mit dem Plasmid pcDNA4-TO transfiziert sind und in Anwesenheit von Tetracyclin inkubiert werden/wurden), deutlich höher als in den Kontrollzellen ohne (verstärkte) Induktion der TNK 1 Expression (also Zellen, die zwar mit dem Plasmid pcDNA4-TO transfiziert sind, jedoch in Anwesenheit von Tetracyclin inkubiert werden/wurden).

10 Da TNK1 alleine per se keine zelluläre Apoptose induziert sondern ein Modulator der TNF α -abhängigen pro- und anti-apoptotischen Signalwege ist, folgt aus den dargestellten Befunde, daß die Induktion der Apoptose durch TNF α über eine TNK1 vermittelte NF κ B-Blockierung erfolgt.

15

C) Nachweis des NF κ B Signalwegs als Target für die TNK1 Wirkung

In dem unter (A) beschriebenen und gemäß (B) zur verstärkten TKN1-Expression induzierten Zellkulturmodell wurden die HEK293 Zellen mit 0.1 μ g/ml eines 6x HIV-
20 NF κ B Reporter-Promotor-Konstrukts (= artifizieller 6x HIV- bzw. NF κ B-Promotor, dessen Aktivität direkt mit dem "Report" - hier der Aktivität der Luciferase - korreliert) 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids und 1 μ g/ml des TNK1-pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) transfiziert (FuGene, Roche).

Parallel dazu wurden als Kontrolle (I) HEK293 Zellen mit 0.1 μ g/ml eines 6x HIV-
25 NF κ B Reporter Konstrukts (artifizieller Promotor), 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids und 1 μ g/ml der Kinase-defizienten Plasmid-Mutante K148R-TNK1-pcDNA3 transfiziert.

Ebenfalls parallel dazu wurde als Kontrolle (II) ein GAL-p65-Fusionsplasmid mit
30 inregriertem GAL4 Luciferase Reportersystem konstruiert, in HEK293 Zellen transient transfiziert und untersucht. Vorzugsweise wurde hierfür das im Handel erhältliche Dual-Luciferase Assay Kit (Promega) eingesetzt. Bei diesem System bzw. Konstrukt erfolgt

die Promotoraktivierung unter Umgehung der NF κ B spezifischen Ko-Faktoren, indem eine an die p65-Untereinheit von NF κ B fusionierte GAL4-DNA-Bindungsdomäne mit einem GAL4 Bindungselement auf dem Reporter in Interaktion tritt. Mit anderen Worten: in diesem System wird der NF κ B Transkriptionskomplex umgangen, da die

5 Protein/DNA Interaktion über das GAL4/Gal-Promotor System erfolgt. Die beobachteten Effekte sind folglich auf die Modifikation der Transaktivierungsdomäne von p65 zurückzuführen und nicht auf eine Änderung der Zusammensetzung des NF κ B Transkriptionskomplexes, die die Protein/DNA Interaktion beeinträchtigt.

Zur Messung der NF κ B Aktivität wurde der Dual-Luciferase Assay Kit (Promega)

10 eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Luciferase Assays sind in Fig.4 graphisch dargestellt. Fig. 4 A zeigt die Luciferaseaktivität und damit die Promotoraktivität derjenigen HEK293 Zellen, die mit 0.1 μ g/ml eines 6x HIV-NF- κ B Reporter-Promotor-Konstrukts, 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids und 1 μ g/ml Wildtyp- bzw. K148R-TNK1 pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) transfiziert und 4h vor der

15 Zellyse mit 400 U/ml TNF α inkubiert wurden.

Fig. 4 B zeigt die Luciferaseaktivität und damit die Promotoraktivität derjenigen HEK293 Zellen, die mit 0.1 μ g/ml eines NF- κ B2 Reporter-Promotor-Konstrukts, 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids und 1 μ g/ml Wildtyp- bzw. K148R-TNK1 pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) transfiziert und 4h vor der Zellyse

20 mit 400 U/ml TNF α inkubiert wurden.

Fig. 4 C zeigt die Luciferaseaktivität und damit die Promotoraktivität derjenigen HEK293 Zellen, die mit 0.1 μ g/ml eines pFR-Luc Reporter-Konstrukts, 50 ng/ml eines Renilla-Plasmids, 1 μ g/ml Wildtyp- bzw. K148R-TNK1 pcDNA3 Plasmids (unter der Kontrolle des CMV Promotors) sowie 0,1 μ g/ml eines Galp65 Konstruktes transfiziert

25 wurden.

Aus Fig. 4 A und Fig. 4 B ist ersichtlich, daß infolge der verstärkten TNK1 Expression die TNF α -abhängige, NF κ B-vermittelte Transaktivierung des artifiziellen (6x HIV-Reporter; Fig. A) und des endogenen Promotors (NF κ B2-Promotor; Fig. B) dereguliert

30 (negativ reguliert, gehemmt) ist bzw. die transkriptionelle Aktivität von NF κ B reprimiert, d.h. gehemmt oder ganz unterdrückt ist.

Mit anderen Worten: Die Lipid-basierte Transfektion von TNK1 in HEK293 Zellen führt nach TNF α Stimulation zu einer signifikanten Hemmung der Luciferaseaktivität sowohl eines artifiziellen (6x HIV-Promotor; Fig. 4 A) als auch eines natürlichen NF κ B Promotor-Reportersystems (NF κ B2-Promotor; Fig. 4 B). In allen Fällen zeigt die

5 Kinase-defiziente Mutante K148R einen deutlich geringeren oder nicht nachweisbaren negativ-regulatorischen Effekt. Dies weist auf eine funktionelle Bedeutung der Kinaseaktivität von TNK1 für die negative Regulation der TNF α -induzierten NF- κ B Aktivität hin.

10 Stromaufwärts im NF κ B Signalweg liegende Ereignisse wie z.B. die Ubiquitinierung von I κ B α werden dagegen gemäß der ermittelten Daten durch die Expression von TNK1 nicht gehemmt. Die Hemmung des NF κ B Signalwegs erfolgt somit direkt durch Modulation der transkriptionellen/transaktivierenden Eigenschaften und nicht durch Modulation an aktivatorischen/inhibitorischen Ereignissen im Zytoplasma vor der

15 Freisetzung von NF κ B aus dem retendierenden I κ B Komplex.

Die in Fig. 4 C dargestellten Ergebnisse zeigen weiter, daß der negativ regulatorische (reprimierende) Effekt infolge Tetrazyklin-induzierter und damit einsetzender Expression von TNK1 auch bei dem GAL-p65-Fusionsplasmid nachweisbar ist, d.h.

20 also auch dann, wenn die nativen Bestandteile des NF κ B Transkriptionskomplexes umgangen werden (Kontrolle II). Damit kann eine Beteiligung von Ko-Faktoren des NF κ B Transkriptionskomplexes bei der Inhibitor-Wirkung von TNK1 auf NF κ B ausgeschlossen werden.

25 Bei den mit der Kinase-defizienten Plasmid-Mutante K148R-TNK1 transfizierten HEK293 Zellen war kein negativer regulatorischer Effekt zu nachweisbar. Die Kinase-Aktivität ist folglich essentiell für die inhibitorische Wirkung von TNK1 auf NF κ B. Mit anderen Worten: Der reprimierende Effekt von TNK1 auf NF κ B ist auf die Tyrosinkinase-Aktivität zurückzuführen, wobei eine Phosphorylierung von

30 Tyrosinresten potentieller Substrate besonders in Betracht kommt

(D) Nachweis der inhibitorischen Wirkung von TNK1 auf die p65-Untereinheit des NFκB-Dimers mittels Tyrosinphosphorylierung

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß TNK1 nicht die Bindung von NFκB an die DNA hemmt. Daraus folgt, daß die Repression der transkriptionellen Aktivität von NFκB
5 durch TNK1 nicht über eine verminderte Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA vermittelt, sondern sehr wahrscheinlich über eine Modifikation der Transaktivierungsdomäne von p65 herbeigeführt wird.

10 Bei den mit der Kinase-defizienten Plasmid-Mutante K148R-TNK1 transfizierten HEK293 Zellen war kein wesentlicher reprimierender Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von NFκB nachweisbar. Daraus folgt, dass die Tyrosinkinaseaktivität von TNK1 für den NFκB-inhibierenden Effekt erforderlich ist, zumal in der Transaktivierungsdomäne von p65 mehrere Tyrosine vorhanden sind.

15 HEK293 Zellen, die TNK1 exprimieren zeigen eine massive Tyrosinphosphorylierung von endogenem NFκB p65, sowie von ko-transfiziertem p65-YFP und einer p65-YFP-Deletionsmutante, die nur noch aus der Transaktivierungsdomäne besteht. Hierfür wurde eine Immunpräzipitation mit einem anti-p65 bzw. anti-GFP Antikörper durchgeführt und anschließend die Tyrosinphosphorylierung mittels eines anti-pY
20 Antikörpers detektiert (Upstate, anti-pY, Klon 4G10).

Die Zusammensetzung des heterodimeren NF-κB Transkriptionsfaktorkomplexes bleibt unter Expression von TNK1 konstant. Die ermittelten und hier angegebenen Daten zur funktionellen Relevanz der Tyrosinkinaseaktivität von TNK1 für die TNFα-induzierte NF-κB Aktivierung sowie die Tatsache, dass TNK1 eine
25 Tyrosinphosphorylierung von p65 induziert, weisen darauf hin, dass durch Mutagenese spezifischer Tyrosinreste an p65 eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB erzielt werden kann.

Beispiel 2: Einsatz von TNK1 als neues Prinzip zur Therapie von Erkrankungen, die mit erhöhter NFκB Aktivierung einhergehen bzw. durch erhöhte NFκB Aktivierung unterhalten werden

5 Es sind zahlreiche Erkrankungen bekannt, die mit einer erhöhten NFκB Aktivierung einhergehen und durch diese erhöhte NFκB Aktivierung entscheidend beeinflusst werden. Hierzu gehören Tumorwachstum und Metastasierung, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, ischämische Erkrankungen, Kachexie, Autoimmunerkrankungen und die Regulation der Expression des HIV-1-Gens. Diese Krankheiten können durch
10 einen induzierbaren, konstitutiven, transienten oder dauernden, viralen oder nicht viralen Gentransfer von TNK1 beeinflusst werden, d.h. die erfindungsgemäße Verwendung von TNK1 ermöglicht eine Therapie dieser Krankheiten. Durch den Einsatz von TNK1 und die damit induzierte NFκB-Blockierung können zelleigene Programme, die eigentlich Apoptose auslösen, jedoch durch eine begleitende hohe
15 NFκB-Aktivierung in ihrer Wirkung gehemmt sind, wieder in Gang gebracht, d.h. proapoptotisch wirksam gemacht werden.

Die erfindungsgemäße Verwendung von TNK1, d.h. die Durchführung eines induzierbaren, konstitutiven, transienten oder dauernden, viralen oder nicht viralen
20 Gentransfers von TNK1 ist außerdem dazu geeignet, die Wirkung einer Chemo- oder Strahlentherapie, die zu einer gegenregulatorischen Hochregulation von NFκB im Tumorgewebe führt, zu verstärken.

Ferner haben weitergehende Experimente in unterschiedlichen Tumorzellmodellen
25 gezeigt, dass die Expression von TNK1 zur Hemmung der in zahlreichen Tumorzellen zu beobachtenden konstitutiven NFκB Aktivierung führt und die betreffenden Zellen susceptibel für zytotoxische Therapieansätze macht.

Literatur:

Felschow DM, Civin CI, Hoehn GT. Characterization of the tyrosine kinase Tnk1 and
5 its binding with phospholipase C-gamma1. Biochem Biophys Res Commun.
2000;273:294-301.

Hoehn GT, Stokland T, Amin S, Ramirez M, Hawkins AL, Griffin CA, Small D, Civin
CI. Tnk1: a novel intracellular tyrosine kinase gene isolated from human umbilical cord
10 blood CD34+/Lin-/CD38- stem/progenitor cells. Oncogene. 1996;12:903-13.

A n s p r ü c h e

1. Verwendung des Enzyms Tyrosinkinase TNK 1 als Inhibitor für den nukleären Transkriptionsfaktor kappa B (NFκB) in eukaryontischen Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß TNK1 zur Inhibierung der Transaktivierungseigenschaften von NFκB geeignet und vorgesehen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß daß TNK1 zur Inhibierung der p65 Untereinheit von NFκB geeignet und vorgesehen ist.
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibierung durch Phosphorylierung von wenigstens einem Tyrosinmolekül der p65 Untereinheit von NFκB realisiert ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die TNK1 mit Methoden des Gentransfers in die eukaryontischen Zellen eingebracht wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine für TNK1 kodierende Gensequenz in die eukaryontischen Zellen eingeschleust wird und in den Zellen zur Expression bringbar ist, wobei diese Expression durch die Einwirkung von Tetrazyklin induzierbar ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Tyroxinkinase TNK1 die Aminosäuresequenz gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO.1 aufweist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Tyroxinkinase TNK1 eine Aminosäuresequenz aufweist, die von einer DNA mit der im Sequenzprotokoll SEQ ID NO.2 dargestellten Nukleotidsequenz oder mit einer im Bereich der Kinasedomäne wenigstens 90 % zu dieser homologen Nukleotidsequenz kodiert wird.

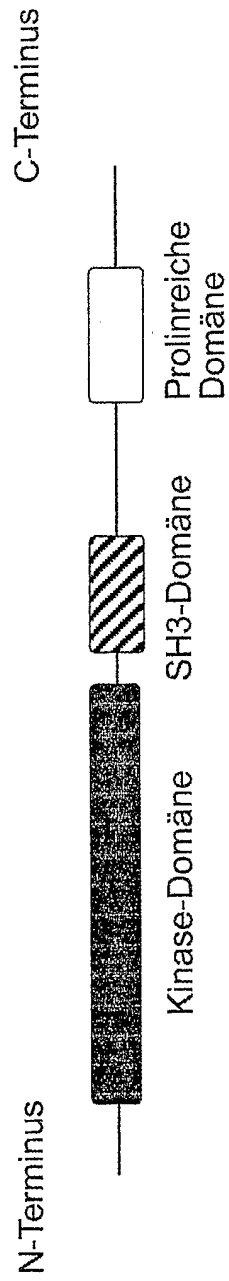


Fig. 1

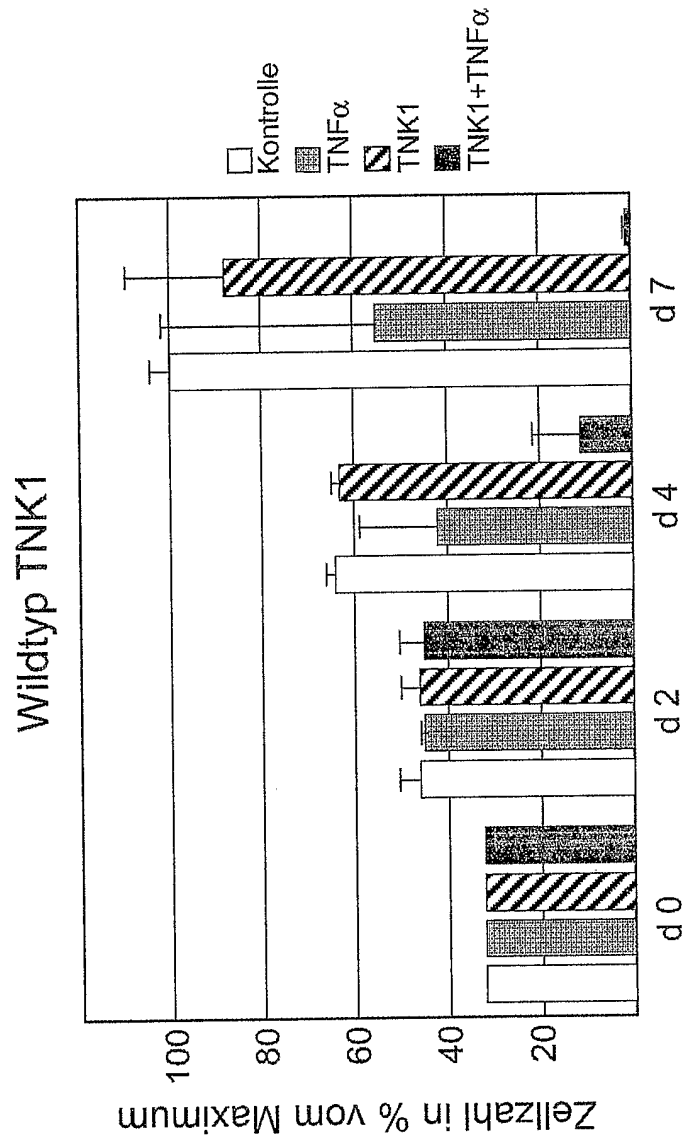


Fig. 2

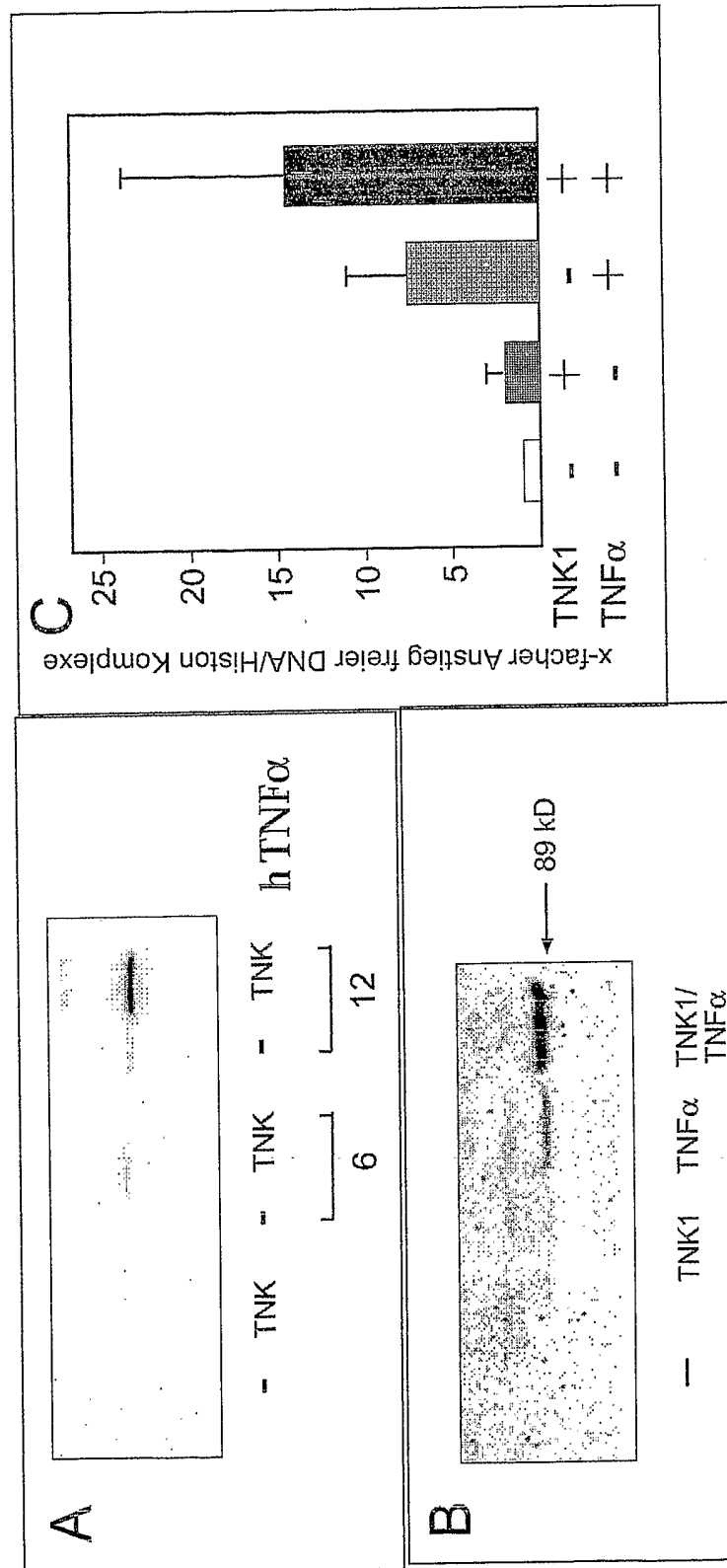


Fig. 3

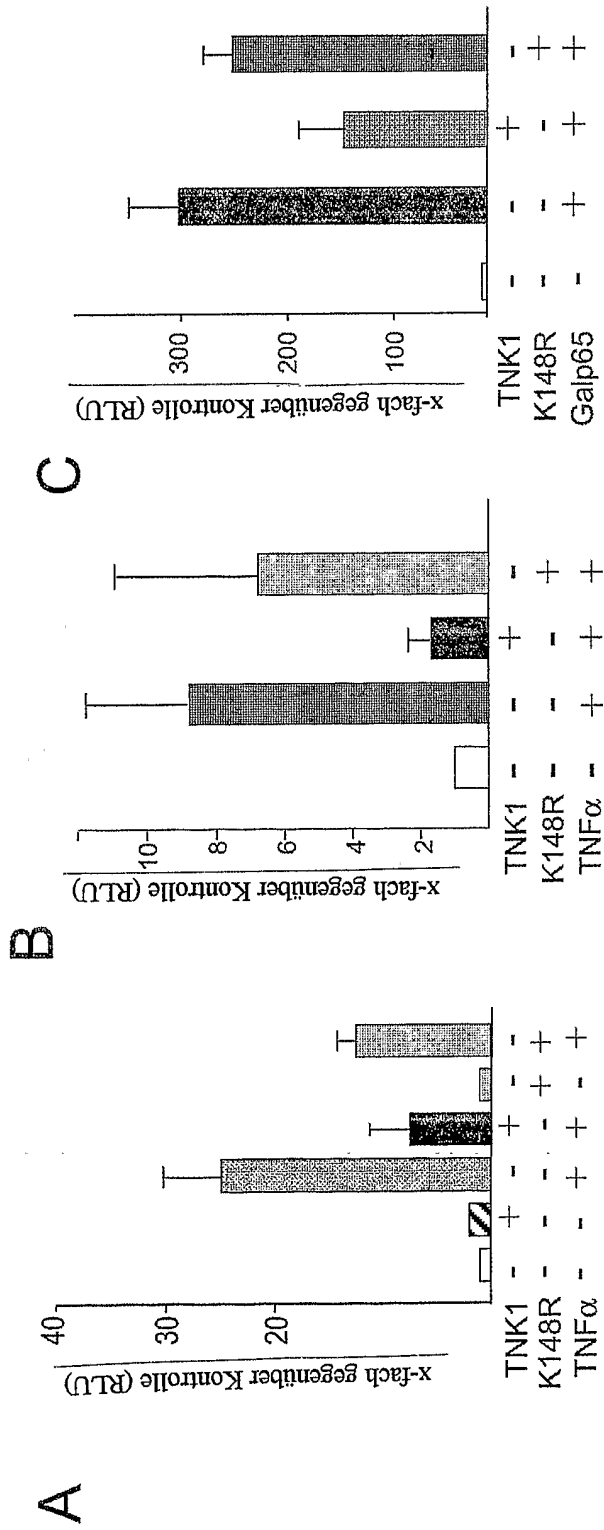


Fig. 4

SEQUENCE LISTING

<110> Universität Ulm

<120> Inhibitor für den nukleären Transkriptionsfaktor kappa B (NFkB) / Inhibitor for the nuclear transcription factor kappa B (NFkB)

<130> seuf-1-DE

<140> DE 104

<141> 2004-04-01

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 661

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Pro Glu Ala Gly Ser Leu Trp Leu Leu Lys Leu Leu Arg Asp
1 5 10 15

Ile Gln Leu Ala Gln Phe Tyr Trp Pro Ile Leu Glu Glu Leu Asn Val
20 25 30

Thr Arg Pro Glu His Phe Asp Phe Val Lys Pro Glu Asp Leu Asp Gly
35 40 45

Ile Gly Met Gly Arg Pro Ala Gln Arg Arg Leu Ser Glu Ala Leu Lys
50 55 60

Arg Leu Arg Ser Gly Pro Lys Ser Lys Asn Trp Val Tyr Lys Ile Leu
65 70 75 80

Gly Gly Phe Ala Pro Glu His Lys Glu Pro Thr Leu Pro Ser Asp Ser
85 90 95

Pro Arg His Leu Pro Glu Pro Glu Gly Gly Leu Lys Cys Leu Ile Pro
100 105 110

Glu Gly Ala Val Cys Arg Gly Glu Leu Leu Gly Ser Gly Cys Phe Gly
115 120 125

Val Val His Arg Gly Leu Trp Thr Leu Pro Ser Gly Lys Ser Val Pro
130 135 140

Val Ala Val Lys Ser Leu Arg Val Gly Pro Glu Gly Pro Met Gly Thr
 145 150 155 160

Glu Leu Gly Asp Phe Leu Arg Glu Val Ser Val Met Met Asn Leu Glu
 165 170 175

His Pro His Val Leu Arg Leu His Gly Leu Val Leu Gly Gln Pro Leu
 180 185 190

Gln Met Val Met Glu Leu Ala Pro Leu Gly Ser Leu His Ala Arg Leu
 195 200 205

Thr Ala Pro Ala Pro Thr Pro Pro Leu Leu Val Ala Leu Leu Cys Leu
 210 215 220

Phe Leu Arg Gln Leu Ala Gly Ala Met Ala Tyr Leu Gly Ala Arg Gly
 225 230 235 240

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Leu Leu Leu Ala Ser Pro
 245 250 255

Arg Thr Ile Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Val Arg Pro Leu Gly Gly
 260 265 270

Ala Arg Gly Arg Tyr Val Met Gly Gly Pro Arg Pro Ile Pro Tyr Ala
 275 280 285

Trp Cys Ala Pro Glu Ser Leu Arg His Gly Ala Phe Ser Ser Ala Ser
 290 295 300

Asp Val Trp Met Phe Gly Val Thr Leu Trp Glu Met Phe Ser Gly Gly
 305 310 315 320

Glu Glu Pro Trp Ala Gly Val Pro Pro Tyr Leu Ile Leu Gln Arg Leu
 325 330 335

Glu Asp Arg Ala Arg Leu Pro Arg Pro Pro Leu Cys Ser Arg Ala Leu
 340 345 350

Tyr Ser Leu Ala Leu Arg Cys Trp Ala Pro His Pro Ala Asp Arg Pro
 355 360 365

Ser Phe Ser His Leu Glu Gly Leu Leu Gln Glu Ala Gly Pro Ser Glu
 370 375 380

Ala Cys Cys Val Arg Asp Val Thr Glu Pro Gly Ala Leu Arg Met Glu
385 390 395 400

Thr Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Glu Gly Ser Pro Asp Ser Thr Ile
405 410 415

Trp Lys Gly Gln Asn Gly Arg Thr Phe Lys Val Gly Ser Phe Pro Ala
420 425 430

Ser Ala Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Gly Leu Pro Ala Thr Arg Pro
435 440 445

Val His Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gly Asp Gln His Pro Gly Ser Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Arg Lys Lys Ala Asn Leu Trp Asp Ala Pro Pro Ala Arg
465 470 475 480

Gly Gln Arg Arg Asn Met Pro Leu Glu Arg Met Lys Gly Ile Ser Arg
485 490 495

Ser Leu Glu Ser Val Leu Ser Leu Gly Pro Arg Pro Thr Gly Gly Gly
500 505 510

Ser Ser Pro Pro Glu Ile Arg Gln Ala Arg Ala Val Pro Gln Gly Pro
515 520 525

Pro Gly Leu Pro Pro Arg Pro Pro Leu Ser Ser Ser Ser Pro Gln Pro
530 535 540

Ser Gln Pro Ser Arg Glu Arg Leu Pro Trp Pro Lys Arg Lys Pro Pro
545 550 555 560

His Asn His Pro Met Gly Met Pro Gly Ala Arg Lys Ala Ala Ala Leu
565 570 575

Ser Gly Gly Leu Leu Ser Asp Pro Glu Leu Gln Arg Lys Ile Met Glu
580 585 590

Met Glu Leu Ser Val His Gly Val Thr His Gln Glu Cys Gln Thr Ala
595 600 605

Leu Gly Ala Thr Gly Gly Asp Val Val Ser Ala Ile Arg Asn Leu Lys
610 615 620

Val Asp Gln Leu Phe His Leu Ser Ser Arg Ser Arg Ala Asp Cys Trp
 625 630 635 640

Arg Ile Leu Glu His Tyr Gln Trp Asp Leu Ser Ala Ala Ser Arg Tyr
 645 650 655

Val Leu Ala Arg Pro
 660

<210> 2
 <211> 2756
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 cgccgcttcc gccttgacca ggtggagctg gagacctggt ctctctaggg cctaccctga 60
 gctcaccatc tgaaggagag tgccatcatc cttaggaact ctttctccag acatgcttcc 120
 tgaggctggc tcctgtggc tactgaagct gctccgggac atccagttgg cccagtttta 180
 ctggcccatc ctagaggagc ttaatgtcac tcggccagag cacttcgact ttgtaaagcc 240
 tgaggacctg gacggcattg gcatgggccc gctgcccag cgcagactgt ccgaagctct 300
 gaaaaggcta cgttctgggc ctaagtctaa gaactgggtc tacaagatcc ttggaggttt 360
 tgcccctgag cacaaggagc ccaccctgcc ctcgacagc ccacggcacc tcctgagcc 420
 agaggggggc ctcaagtgtc tgatcccaga ggggtgctgtt tgcagagggg agctgctggg 480
 ttcaggctgc ttcggtgtgg tgcaccgagg gctgtggacg ctgcccagtg gcaagagtgt 540
 cccagtggct gtcaagtccc tccgggtagg tcccgaaggc ccgatgggca cagaactggg 600
 ggacttctctg cgagaggtat cggatcatgat gaacttgag caccacacag tgctgctct 660
 gcacggcctt gtactgggcc agcctctgca gatggtgatg gagctggcgc cactgggctc 720
 cctgcacgcg cgcctaacgg ccccgggccc gacacccccg ctgctcgtgg cctgctctg 780
 cctcttctctg cggcagctgg cgggagccat ggcgtacctg ggggcccgcg ggctgggtgca 840
 ccgagacctc gctacgcgca acctactgct ggcgtcggcg cgcaccatca aggtggctga 900
 cttcgggctg gtgcggcctc tgggcggtgc ccggggccgc tacgtcatgg gcgggccccg 960
 ccctatcccc tacgcctggt gtgccccaga gagcctgcgc cacggagcct tctcgtctgc 1020
 ctcgagctg tggtggtttg gggtagcgt gtgggagatg ttctccgggg gcgaggaacc 1080
 ctgggcccggg gtcccaccgt acctcatcct gcagcggctg gaggacagag cccggctgcc 1140
 taggcctccc ctctgctcca gggccctcta ctccctcggc ttgcgctgct gggccccca 1200

ccctgccgac	cggectagct	tttccacct	ggaggggctg	ctgcaagagg	cggggccttc	1260
ggaagcatgt	tgtgtgaggg	atgtcacaga	accaggcgcc	ctgaggatgg	agactgggtga	1320
ccccatcaca	gtcatcgagg	gcagccccga	ctccacaatc	tggaagggcc	agaatgggtcg	1380
caccttcaaa	gtgggcagct	tcccagcctc	ggcagtgacg	ctggcagatg	cggggggctt	1440
gccagccacc	cgtccagtcc	acagaggcac	ccctgcccg	ggagatcaac	accaggaag	1500
catagatgga	gacagaaaga	aggcaaatct	ttgggatgcg	ccccagcac	ggggccagag	1560
gaggaacatg	cccctggaga	ggatgaaagg	catttccagg	agtctggagt	cagttctgtc	1620
cctcggtcct	cgtcccacag	ggggtggttc	aagccccct	gaaattcgac	aagccagagc	1680
tgtgccccag	ggacctccag	gcctgcctcc	acgcccacct	ttatcctcta	gctctcctca	1740
gcccagccag	ccctctaggg	agaggcttcc	ctggcccaa	agaaaacccc	cacacaatca	1800
ccccatggga	atgcctggag	cccgtaaagc	cgctgcctc	tctggaggcc	tcttgtccga	1860
tcttgagttg	cagaggaaga	ttatggagat	ggagctgagt	gtgcatgggg	tcaccacca	1920
ggagtgccag	acagcactag	gagccactgg	gggagatgtg	gtttctgcca	tccggaacct	1980
caaggtagat	cagctcttcc	acctgagtag	cgggtccaga	gctgactgct	ggcgcatcct	2040
ggagcattac	cagtgggacc	tctcagctgc	cagccgctat	gtcctggcca	ggccctgagc	2100
tcagcttctg	cgggcacaga	caccagcatg	aaaagcctag	gcccctgagg	gcctggccac	2160
atgggaccaa	gcggaaccag	aacaaggctc	cgacaggggt	agacgttcca	cctggggaga	2220
tcccacctgc	cgtaggcaca	tgaggaggga	gcccagagtt	gggcaactgg	aatgtctcc	2280
tccctcccat	gctccttggc	ttctgaaggc	tgaagctcct	ttggctgggc	caagaaggat	2340
ttagtctgcc	cactacattc	tcaaacaaga	ggacttggag	gaaaagagct	gctatacatc	2400
atatgcagag	gaagctttta	cgcgctagag	aggatcaagg	ggccacactg	gacctgtga	2460
acagccatcc	tgaactgcca	tcagctacca	cactggactc	tgagggcag	ccatcctgga	2520
tgatggaagc	caccatattg	acttggggta	taggcccaaa	ctgccttcgt	ttggtccagg	2580
gccatcgtgg	gtgatgacga	ttgctctctt	gcactcaagg	acatttgatg	ctggtagtat	2640
ggattatgag	atggactagc	ccctgcccga	gcccagctct	cacattcccc	tttgtttttt	2700
cccataccaa	ctgcttctac	cctcccctat	tacatacatc	tttcaatgtc	caaaaa	2756

Organization Applicant

```

-----
Street : Albert Einstein Allee 5
City : 89081 Ulm
State :
Country : Germany
PostalCode :
PhoneNumber :
FaxNumber :
EmailAddress :
<110> OrganizationName : Universität Ulm
    
```

Application Project

```

-----
<120> Title : Inhibitor für den nukleären Transkriptionsfaktor kappa B (NFkB)
) / Inhibitor for the nuclear transcription factor kappa B (NFkB)
<130> AppFileReference : seuf-1-DE
<140> CurrentAppNumber : DE 104 .. ...
<141> CurrentFilingDate : 2004-04-01
    
```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Homo sapiens
<400> PreSequenceString :
MLPEAGSLWL LKLLRDIQLA QFYWPILEEL NVTRPEHFDF VKPEDLDGIG MGRPAQRRLS      60
EALKRLRSGP KSKNWVYKIL GGFAPKHKEP TLPSPSPRHL PEPEGGLKCL IPEGAVCRGE      120
LLGSGCFGVV HRGLWTLPSG KSVPVAVKSL RVGPEGPMGT ELGDFLREVS VMMNLEHPHV      180
LRLHGLVLGQ PLQVMELAP LGS LHARLTA PAPTPLLVA LLCLFLRQLA GAMAYLGARG      240
LVHRDLATRN LLLASPRTIK VADFGILVRPL GGARGRYVMG GPRPIPYAWC APESLRHGAF      300
SSASDVWMMFG VTLWEMFSGG EEPWAGVPPY LILQRLDRA RLPRPPLCSR ALYSLALRCW      360
APHPADRPSF SHLEGLLQEA GPSEACCVRD VTEPGALRME TGDPIITVIEG SPDSTIWKGQ      420
NGRTFKVGSF PASAVTLADA GGLPATRPVH RGTPARGDQH PGSIDGDRKK ANLWDAPPAR      480
GQRRNMLPLR MKGISRSLES VLSLGRPTG GGSSPPEIRO ARAVPQPPG LPPRPPLSSS      540
SPQPSQPSRE RLPWPKRKPP HNHMPMGMPGA RKAALSGGL LSDPELQRKI MEMELSVHGV      600
THQECQTALG ATGGDVVSAI RNLKVDQLFH LSSRSRADCW RILEHYQWDL SAASRYVLAR      660
P
<212> Type : PRT
<211> Length : 661
SequenceName : TNK 1
SequenceDescription :
    
```

Sequence

```

-----
<213> OrganismName : Homo sapiens
<400> PreSequenceString :
cgccgcttcc gccttgacca ggtggagctg gagacctggt ctctctaggg cctacctga      60
gctcaccatc tgaaggagag tgccatcatc ctttaggaact ctttctccag acatgcttcc      120
tgaggctggc tccctgtggc tactgaagct gctccgggac atccagttgg cccagtttta      180
ctggcccata ctagaggagc ttaatgtcac tcggccagag cacttcgact ttgtaaagcc      240
tgaggacctg gacggcattg gcatgggocg gcctgccagc cgcagactgt ccgaagctct      300
gaaaaggcta cgttctgggc ctaagtctaa gaactgggtc tacaagatcc ttggaggttt      360
tgcccctgag cacaaggagc ccaccctgcc ctccggacagc ccacggcacc tccctgagcc      420
agaggggggc ctcaagtgtc tgatcccaga ggggtgctgtt tgcagagggg agctgctggg      480
ttcaggctgc ttcggtgtgg tgcaccgagg gctgtggacg ctgccagtg gcaagagtgt      540
cccagtggtc gtcaagtccc tccgggtagg tcccgaaggc ccgatgggca cagaactggg      600
ggacttctct cgagaggtat cggatcatgat gaacttggag caccacacag tgctgctctc      660
gcacggcctt gtactgggac agcctctgca gatggtgat gagctggcgc cactgggctc      720
cctgcacgcg cgcctaacgg ccccgccccc gacaccccg ctgctcgtgg ccctgctctg      780
cctcttctct cggcagctgg cgggagccat ggcgtacctg ggggcccgcg ggctggtgca      840
    
```

```

ccgagacctc gctacgcgca acctactgct ggcgtgcgcg cgcaccatca aggtggctga 900
cttcgggctg gtgcggcctc tgggcgggtc cgggggccc cccgggccccg 960
ccctatcccc tacgcctggg gtgccccaga gagcctgcgc caccggagcct tctcgtctgc 1020
ctcggacgtg tggatgtttg gggtgacgct gtgggagatg ttctccgggg gcgaggaacc 1080
tagggccggg gtcccaccgt acctcatcct gcagcggctg gaggacagag cccggctgcc 1140
taggcctccc ctctgctcca gggccctcta ctccctcgcc ttgcgctgct gggcccccca 1200
cctgcccagc cggcctagct ttccccacct ggaggggctg ctgcaagagg ccgggccttc 1260
ggaagcatgt tgtgtgaggg atgtcacaga accaggcgcc ctgaggatgg agactgggta 1320
ccccatcaca gtcctcggag gcagccccga ctccacaatc tggaaaggcc agaatggctg 1380
caccttcaaa gtgggcagct tcccagcctc ggcagtgcag ctggcagatg cggggggctt 1440
gccagccacc cgtccagctc acagaggcac ccctgcccgg ggagatcaac acccaggaag 1500
catagatgga gacagaaaga aggcaaactt ttgggatgcg cccccagcac gggggccagag 1560
gaggaacatg cccctggaga ggatgaaagg cattedcagg agtctggagt cagttctgtc 1620
cctcggctct cgtcccacag ggggtggttc aagccccctt gaaattcgac aagccagagc 1680
tgtgcccag ggacctccag gcctgcctcc acgcccacct ttatcctcta gctctcctca 1740
gccagccag ccctctaggg agaggcttcc ctggcccaaa agaaaacccc cacacaatca 1800
ccccatggga atgcctggag cccgtaaagc cgtgcctc tctggaggcc tcttgtccga 1860
tctcaggttg cagaggaaga ttatggagat ggagctgagt gtgcatgggg tcacccacca 1920
ggagtgccag acagcactag gagccactgg gggagatgtg gtttctgcca tcoggaacct 1980
caaggtagat cagctcttcc acctgagtag cgggtccaga gctgactgct ggogcatcct 2040
ggagcattac cagtgggacc tctcagctgc cagccgctat gtccctggcca ggcctgagc 2100
tcagcttctg cgggcacaga caccagcatg aaaagcctag gcccctgagg gcttggccac 2160
atgggaccaa gcggaaccag aacaaggctc cgacaggggt agacgttcca cctggggaga 2220
tcccacctgc cgtaggcaca tggaggagga gccagagtt gggcactggc aaatgtctcc 2280
tccctcccat gctccttggc ttctgaaggc tgaagctcct ttggctgggc caagaaggat 2340
ttagtctgcc cactacattc tcaacaaga ggacttggag gaaaagagct gctatacatc 2400
atatgcagag gaagctttta cgcgctagag aggatcaagg ggccacactg gaccatgtga 2460
acagccatcc tgaactgcca tcagctacca cactggactc tgcagggcag ccatoctgga 2520
tgatggaagc caccatattg acttggggta taggccc aaa ctgccttctg ttggtccagg 2580
gccatcgtgg gtgatgacga ttgctctctt gcaactcaagg acatttgatg ctggtagtat 2640
ggattatgag atggactagc ccctgcccc gcccagctct cacattcccc tttgtttttt 2700
cccataccaa ctgcttctac cctcccctat tacatacatc tttcaatgtc caaaaa 2756

```

```

<212> Type : DNA
<211> Length : 2756
      SequenceName : TNK 1 c-DNA
      SequenceDescription :

```

Custom Codon

Sequence Name : TNK 1 c-DNA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/000668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/12 A61K38/17 A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	SCHMITZ M L ET AL: "IkappaB-independent control of NF-kappaB activity by modulatory phosphorylations" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 26, no. 3, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 186-190, XP004229461 ISSN: 0968-0004 the whole document	
A	----- UMEZAWA K ET AL: "Molecular design and biological activities of NF-kB inhibitors" MOLECULES AND CELLS, SEOUL, KR, vol. 14, no. 2, 2002, pages 163-167, XP002982583 ISSN: 1016-8478 the whole document ----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of box C Patent family members are listed in annex

° Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 October 2005	Date of mailing of the international search report 15/11/2005
--	--

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer: Schneider, P
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2005/000668

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>GRETEN FLORIAN R ET AL: "The IKK/NF-kappaB activation pathway: A target for prevention and treatment of cancer." CANCER LETTERS, vol. 206, no. 2, 8 April 2004 (2004-04-08), pages 193-199, XP002349074 ISSN: 0304-3835 the whole document</p>	
A	<p>FELSCHOW DONNA M ET AL: "Characterization of the tyrosine kinase Tnk1 and its binding with phospholipase C-gamma1" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 273, no. 1, 24 June 2000 (2000-06-24), pages 294-301, XP002349075 ISSN: 0006-291X cited in the application the whole document</p>	
A	<p>HOEHN GERARD T ET AL: "Tnk1: A novel intracellular tyrosine kinase gene isolated from human umbilical cord blood CD34+/Lin-/CD38- stem/progenitor cells" ONCOGENE, vol. 12, no. 4, 1996, pages 903-913, XP008053903 ISSN: 0950-9232 cited in the application the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2005/000668

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1 to 8 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N9/12 A61K38/17 A61K38/43

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHMITZ M L ET AL: "IkappaB-independent control of NF-kappaB activity by modulatory phosphorylations" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, Bd. 26, Nr. 3, 1. März 2001 (2001-03-01), Seiten 186-190, XP004229461 ISSN: 0968-0004 das ganze Dokument	
A	UMEZAWA K ET AL: "Molecular design and biological activities of NF-kB inhibitors" MOLECULES AND CELLS, SEOUL, KR, Bd. 14, Nr. 2, 2002, Seiten 163-167, XP002982583 ISSN: 1016-8478 das ganze Dokument	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche.

13. Oktober 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/11/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P B 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	<p>GRETEN FLORIAN R ET AL: "The IKK/NF-kappaB activation pathway: A target for prevention and treatment of cancer." CANCER LETTERS, Bd. 206, Nr. 2, 8. April 2004 (2004-04-08), Seiten 193-199, XP002349074 ISSN: 0304-3835 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>FELSCHOW DONNA M ET AL: "Characterization of the tyrosine kinase Tnk1 and its binding with phospholipase C-gamma1" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 273, Nr. 1, 24. Juni 2000 (2000-06-24), Seiten 294-301, XP002349075 ISSN: 0006-291X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>HOEHN GERARD T ET AL: "Tnk1: A novel intracellular tyrosine kinase gene isolated from human umbilical cord blood CD34+/Lin-/CD38- stem/progenitor cells" ONCOGENE, Bd. 12, Nr. 4, 1996, Seiten 903-913, XP008053903 ISSN: 0950-9232 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2005/000668

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl die Ansprüche 1 bis 8 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.