

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2001 -4444

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.06.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.06.1999 03.11.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/138724 1999/9926058**

(33) Země priority: **US GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/15098**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/77190**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 12 N 15/00

(71) Přihlašovatel:

**AVENTIS PHARMACEUTICALS PRODUCTS INC.,
Bridgewater, NJ, US;**

(72) Původce:

**Guo Kun, Eagleville, PA, US;
Ivashchenko Yuri, Norristown, PA, US;
Clark Kenneth, Gilbertsville, PA, US;**

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Protein Akt pro použití k indukci exprese VEGF

(57) Anotace:

Řešení se týká proteinu Akt pro použití k indukci exprese VEGF a přípravků pro vyvolání terapeutické angiogeneze. Konkrétně se týká indukce exprese VEGF (růstového faktoru vaskulárního endotelu) pomocí serin/threoninové proteinkinázy Akt. Ve výhodném provedení farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje nukleovou kyselinu kódující Akt.

CZ 2001 - 4444 A3

Protein Akt pro použití k indukci exprese VEGFOblast techniky

Předkládaný vynález se týká proteinu Akt pro použití k indukci exprese VEGF a přípravků pro vyvolání terapeutické angiogeneze. Konkrétně se týká indukce exprese VEGF (růstového faktoru vaskulárního endotelu) pomocí serin/threoninové proteinkinázy Akt. Farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje nukleovou kyseliny kódující protein Akt.

Dosavadní stav techniky

Angiogeneze

Angiogeneze je biologický proces, který vede k vývoji nových krevních cév. Tento proces zahrnuje různé typy interakcí buňka-buňka, buňka-matrix a buňka-cytokin (Melillo et al., 1997, Cardiovascular Research 35:480-489; Lewis et al., 1997, Cardiovascular Research 35:490-497). Vytváření nové cévní (vaskulární) sítě v dospělém organismu je velmi vzácné. Avšak nové cévy se objevují při určitých patologických stavech jako je např. ischemie, záněty, hojení poranění, růst nádoru, diabetická retinopatie, revmatoidní artritida, psoriáza a chronická poranění.

Terapeutická angiogeneze zahrnuje záměrnou stimulaci vývoje nových krevních cév pomocí vhodných angiogenních růstových faktorů. Terapeutickou angiogenezi lze využít k léčení různých ischemických stavů nebo k podpoře léčení poranění. Různé ischemické stavy postihují srdce, dolní končetiny, kožní laloky, periferní nervy, kosti nebo štěpy

(transplantáty). K typickým ischemickým onemocněním patří cerebrovaskulární ischemie, renální ischemie, pulmonární ischemie, ischemie končetin, onemocnění periferních artérií, intermitentní klaudikace (přerušované kulhání při bolesti v lýtkových svalech), ischemická kardiomyopatie a ischemie myokardu (viz také W0 97/14307).

Bylo ukázáno, že různé faktory projevují angiogenní aktivitu. K takovým faktorům patří např. bazický a kyselý růstový faktor fibroblastů (bFGF a aFGF), FGF-5 (Patent US č. 5,661,133), růstový faktor endotelových buněk (Pu et al., 1993, Circulation 88:208-2156), angiopoetin a VEGF (viz přehledné články Melillo et al., 1997 a Lewis et al., 1997).

Angiogeneze se považuje za nezbytný předpoklad pro růst a perzistenci solidních tumorů a jejich metastáz (Patent US č. 5,854,205). Pro stimulaci angiogeneze tumory zesilují ("upregulate") produkci různých angiogenních faktorů, včetně VEGF.

VEGF

Růstové faktory buněk vaskulárního endotelu (Vascular endothelial cell growth factor, VEGF) představují skupinu angiogenních polypeptidů, které jsou členy proteinové růstových faktorů pocházejících z destiček ("platelet-derived growth factors"). Tyto proteiny jsou glykosylované kationtové dimery s molekulovou hmotností přibližně 46 až 48 kDa. Na rozdíl od ostatních angiogenních faktorů VEGF obsahuje přirozenou signální sekvenci, která umožňuje sekreci tohoto faktoru z intaktních buněk. K alternativním jménům VEGF patří také označení faktor cévní permeability ("vascular permeability factor, VPF) a růstový faktor indukovaný c-fos ("c-fos induced growth, FIGF).

Byly identifikovány různé formy VEGF, např. VEGF₁₂₁ (Patent US č. 5,219,739), VEGF₁₆₅ (Patent US č. 5,332,672), VEGF₁₈₉ (Patent US č. 5,240,848), VEGF₂₀₆, VEGF-2 (W0 95/24473; W0 96/39515), VEGF-B (Patenty US č. 5,607,918 a 5,840,693), a VEGF-D (W0 97/12972). Bylo ukázáno, že různé formy VEGF jsou mitogenní pro buňky cévního endotelu a podporují vytváření kolaterálních krevních cév a průtok krve v ischemické tkáni.

Bylo ukázáno, že ionty přechodných kovů, jako např. CoCl₂, zvyšují expresi genu VEGF a stimulují vaskularizaci (Patent US č. 5,480,975).

Akt

Proteiny Akt jsou serin/threonin proteinkinázy, které se podílejí na apoptóze (programované buněčné smrti). Nedávno byly zkoumány dvě intracelulární signální dráhy zúčastněné v regulaci přežívání/smrti buněk. Aktivace kinázy 1 stimulující apoptózu (ASK1) vede k apoptóze buněk různých typů (Ichijo et al. 1997), zatímco signální dráha zahrnující fosfoinositidyl-3-kinázu (PI3K) a Akt vede k ochraně buněk (cytoprotekci). Bylo ukázáno, že aktivita ASK1 je indukována nádorovým nekrotickým faktorem alfa (TNF α) nebo ligací Fas (Ichijo et al. 1997, Chang et al. 1998). Nadměrná exprese ("overexpression") ASK1 dominantní negativní mutanty inhibuje apoptózu indukovanou TNF α nebo ligací Fas, což ukazuje, že ASK1 hraje významnou roli při apoptickém odumírání buněk indukovaném TNF α nebo ligací Fas. Molekulární mechanismy, kterými ASK1 indukuje apoptózu, však nejsou známy. Bylo ukázáno, že ektopická exprese ASK1 vede k aktivaci různých stresem aktivovaných signálních drah, jako jsou např. dráhy MKK4/JNK a MKK6/p38, které zřejmě zprostředkovávají ASK1-indukovanou apoptózu (Ichijo et al. 1997).

Dráha PI3K/Akt se zdá být důležitá pro regulaci přežívání/smrti buněk (Kulik et al. Franke et al. 1997, Kauffmann-Zeh et al, Hemmings 1997. Dudek et al. 1997). Faktory pro přežívání buněk, jako je růstový faktor destiček ("platelet derived growth factor", PDGF), nervový růstový faktor („nerve growth factor“, NGF) a inzulínu podobný růstový faktor 1 („insulin-like growth factor 1“, IGF-1), podporují přežívání buněk za různých podmínek tím, že indukují aktivitu PI3K (Kulik et al. 1997, Hemmings 1997). Aktivace PI3K vede k tvorbě fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfátu (PtdIns(3,4,5)-P₃), který se váže na a indukuje aktivitu serin/threonin kinázy Akt obsahující AH/PH doménu (Franke et al. 1995, Hemmings 1997b, Downward 1998, Alessi et al. 1996). Specifické inhibitory PI3K nebo dominantní negativní Akt mutanty ruší přežívání podporující aktivitu těchto růstových faktorů nebo cytokinů. Navíc vnesení konstitutivně aktivní PI3K nebo Akt mutace podporuje přežívání buněk v podmínkách, za kterých by normálně buňky podlehly apoptotické smrti (Kulik et al. 1997, Dudek et al. 1997). Tato pozorování ukazují, že signální dráha PI3K/Akt má významnou úlohu v regulaci přežívání buněk a apoptózy.

Byly identifikovány dvě isoformy humánní proteinkinázy Akt, Akt1 a Akt2, popsané v odborné literatuře (Staal, 1987). Třetí forma humánní Akt, označená jako Akt3, byla popsána v prozatímní patentové přihlášce US č. 60/125,108. Ještě další isoforma Akt byla popsána v Nakatani et al., 1999 (Biochem. Biophys. Res. Comm. 257, 906-910). Byla také identifikována Akt sekvence laboratorního potkana (Konishi et al. 1995).

Serin-473 na C-konci humánního Akt1 je kritický pro jeho regulaci (Stokeo et al. 1997; Stephens et al. 1998). Po stimulaci růstovým faktorem je aktivován PI3K. Produkt PI3K, PtdIns(3,4,5)-P, váže Akt1, a způsobuje translokaci Akt1

cytoplazmy do blízkosti vnitřní cytoplazmatické membrány, kde je fosforylován na zbytcích Thr308 a Ser473 (Downward, 1998). Fosforylace těchto aminokyselinových zbytků je kritická pro aktivaci Akt1. Bylo ukázáno, že nedávno identifikovaná proteinkináza PDK1 je zodpovědná za fosforylaci Thr308, zatímco kináza (případně kinázy) zodpovědná za fosforylaci Ser473 nebyla dosud identifikována (Stokeo et al. 1997, Stephens et al. 1998).

Genová terapie

Genová terapie v podstatě znamená, že nedostatky nebo abnormality (mutace, chybná exprese apod.) se napravují tím, že se do pacienta vnese nová genetická informace, konkrétně např. do nemocí zasaženého orgánu nebo tkáně pacienta. Tato genetická informace se vnáší buďto *in vitro* do buněk a tyto modifikované buňky se pak zpětně vracejí do těla pacienta, a nebo na vhodném místě přímo *in vivo*. V odborné literatuře byly popsány různé techniky transfekce buněk a přenosu genů (viz např. Roemer a Friedman, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211), zahrnující transfekci "nahé" DNA, a různé techniky přenosu komplexů DNA a DEAE-dextranu (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), DNA a jaderných proteinů (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), DNA a lipidů (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), využití liposomů (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431) a další metody. Nedávno se objevila nová slibná alternativa pro techniku fyzikální transfekce, a sice využití virů jakožto vektorů pro přenos genů. Byly testovány různé druhy virů, např. retroviry, herpetické viry, adeno-asociované viry a adenoviry, zda mají schopnost infikovat určité buněčné populace.

Byla navržena genová terapie angiogeneze specificky užívající sekvence kódující VEGF (Melillo et al., 1997; Lewis

et al., 1997). Intraarteriální nebo intramuskulární podávání plazmud obsahujícího cDNA pro VEGF₁₆₅ zvyšovalo kolaterální průtok krve u modelu králíků s ischemií zadních končetin (Tsurumi et al., 1996, Circulation 94:3281-3290; Takeshita et al., 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:628-635). Plazmidy obsahující cDNA pro humánní VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ a VEGF₁₈₉ projevují také angiogenní aktivitu na tomto modelu, jak ukázaly Takeshita et al., 1996, Lab. Invest. 75:487-501; a W0 97/14307). Podobně také replikačně defektní adenoviry, které obsahovaly sekvenci kódující VEGF₁₆₅ indukovaly neovaskularizaci u myší (Muhlhauser et al., 1995, Circ. Res. 77: 1077-1086). U lidí plazmidy obsahující sekvenci pro VEGF₁₆₅ indukovaly angiogenezi v ischemických končetinách (Isner et al., 1996, Lancet 348: 370-374) a v poškozeném srdci (viz Time, January 11, 1999, pp. 68-73).

Předkládaný vynález se týká alternativních způsobů stimulace angiogeneze k přímému podávání sekvence kódující VEGF. Konkrétně původce neočekávaně zjistil, že produkce VEGF je indukována proteinem Akt. Takže předkládaný vynález se týká stimulace exprese VEGF v buňkách tím, že se do buněk vnese protein Akt. Výhodně se jedná o buňky přítomné v pacientovi trpícím ischemickou chorobou, přičemž výsledkem je prospěšné vytváření kolaterálních krevních cév.

Publikace, které jsou citovány v předkládané přihlášce, nepředstavují automaticky dosavadní stav techniky.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká způsobů a přípravků pro stimulaci exprese VEGF v buňkách. Konkrétně je vynález založen na tom, že původce neočekávaně zjistil, že protein Akt je

schopen stimulovat expresi VEGF v buňkách. Výhodně se jedná o buňky přítomné v pacientovi trpícím ischemickou chorobou, přičemž výsledkem je prospěšné vytváření kolaterálních krevních cév.

První předmět vynálezu se týká způsobů indukce exprese VEGF tím, že se do buňky podává protein Akt. Přitom to může být jakýkoliv protein Akt. Výhodně jde o humánní protein Akt. Výhodněji je to humánní protein Akt1, Akt2 nebo Akt3.

VEGF, který se tvoří po podání proteinu Akt je jakákoliv forma VEGF, která je schopná stimulovat angiogenezi. Výhodné formy VEGF jsou VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF-2, VEGF-B nebo VEGF-D.

Jeden aspekt vynálezu se týká podávání proteinu Akt do buněk. Ve výhodném provedení se nukleová kyselina kódující protein Akt, operativně spojená s kontrolní expresní sekvencí, podá do buňky. Tato nukleová kyselina je částí plazmidového nebo virového vektoru. K výhodným virovým vektorům patří retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpetické viry a virus vakcínie.

Protein Akt nebo nukleová kyselina kódující protein Akt se mohou podávat samotné nebo v kombinaci s ionty přechodných kovů nebo s vasodilatačními činidly. Protein Akt nebo nukleová kyselina kódující protein Akt se také mohou podávat společně s nukleovou kyselinou kódující druhý angiogenní faktor operativně spojenou s kontrolní expresní sekvencí. K výhodným angiogenním faktorům patří VEGF, bazický a kyselý růstový faktor fibroblastů, růstový faktor endotelových buněk a angiopoetin. Podle jiného aspektu vynálezu se do buňky podává více než jeden protein Akt.

Předkládaný vynález se dále týká způsobu indukce exprese VEGF v buňkách u pacienta trpícího ischemickou nemocí tím, že se mu podává protein Akt. Ischemická nemoc je např.

cerebrovaskulární ischémie, renální ischémie, pulmonární ischémie, ischémie končetin, ischémie myokardu a ischemická, idiopatická nebo hypertrofická kardiomyopatie.

Protein Akt může být jakýkoliv protein Akt. Výhodně jde o humánní protein Akt1, Akt2 nebo Akt3.

VEGF, který se tvoří po podání proteinu Akt je jakákoliv forma VEGF, která je schopná stimulovat angiogenezi. Výhodné formy VEGF jsou VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF-2, VEGF-B nebo VEGF-D.

Jeden aspekt vynálezu se týká podávání proteinu Akt pacientovi. Ve výhodném provedení se pacientovi podává nukleová kyselina kódující protein Akt, operativně spojená s kontrolní expresní sekvencí. Tato nukleová kyselina je částí plazmidového nebo virového vektoru. K výhodným virovým vektorům patří retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpetické viry a virus vakcínie. Výhodné provedení vynálezu se týká podávání nukleové kyseliny kódující protein Akt přímo do srdeční tkáně transprikardiální chirurgickou cestou nebo perkutánním podáním pomocí katetru.

Protein Akt nebo nukleová kyselina kódující protein Akt se mohou pacientovi podávat samotné nebo v kombinaci s ionty přechodných kovů nebo s vasodilatačními činidly. Protein Akt nebo nukleová kyselina kódující protein Akt se také mohou podávat společně s nukleovou kyselinou kódující druhý angiogenní faktor operativně spojenou s kontrolní expresní sekvencí. K výhodným angiogenním faktorům patří VEGF, bazický a kyselý růstový faktor fibroblastů, růstový faktor endotelových buněk a angiopoetin. Podle jiného aspektu vynálezu se pacientovi podává více než jeden protein Akt.

Předkládaný vynález se dále týká farmaceutických přípravků, které obsahují nukleovou kyselinu kódující protein Akt, přechodný kov a/nebo vazodilatační činidlo a

farmaceuticky přijatelné vehikulum. Nukleová kyselina je částí plazmidového nebo virového vektoru. K výhodným virovým vektorům patří retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpetické viry a virus vakcínie.

Další aspekt vynálezu se týká inhibice angiogeneze u pacienta trpícího nádorovým onemocněním, a sice tím, že se inhibuje aktivita Akt, čímž se inhibuje tvorba VEGF. Hladina Akt se může snížit vnesením Akt "antisense" nukleových kyselin do buněk pacienta v podmínkách, kdy tyto "antisense" nukleové kyseliny hybridizují v buňkách s Akt mRNA. Hladina Akt může být také snížena vnesením intracelulárního vazebného proteinu, jako je např. jednořetězcová protilátka Fv (scFv), který se specificky váže na Akt v buňkách pacienta v množství dostatečném k tomu, aby se navázal na Akt a inaktivoval ho. V ještě dalším provedení vynálezu je aktivita Akt snížena tím, že se podává nukleová kyselina kódující dominantní negativní formu Akt. Výhodně "antisense" nukleová kyselina, intracelulární vazebný protein nebo nukleová kyselina kódující intracelulární vazebný protein nebo dominantní negativní formu Akt jsou podány přímo do buněk nádoru.

Popis obrázků

Obr. 1: Konstrukce aktivované mutanty Akt3

Obr. 1A: Schéma představující aktivovaný Akt3: úplná sekvence kódující humánní Akt3 byla fúzována ve shodném čtecím rámci s myrystylační signální sekvencí z humánního genu Src (Myr) na N-konci a dále byla fúzována ve shodném čtecím rámci se značkou HA ("HA-tag") na C- konci (viz příklady).

Obr. 1B: Ektopická exprese aktivovaného Akt3 v buňkách HEK293. Buňky HEK293 byly transfekovány buďto samotným

expresním plazmidem CMV6-MyrAkt3HA nebo (CMV6). 24 hodin po transfekci byly připraveny buněčné lyzáty a byly provedeny imunoblotty (imunopřenosy) s protilátkami anti-HA.

Obr. 1C: Aktivovaný Akt3 má Akt aktivitu. Buňky HEK293 byly transfekovány expresním plazmidem pro aktivovaný Akt3 (MyrAkt3HA) nebo samotným expresním vektorem (CMV6). 24 hodin po transfekci byly připraveny buněčné lyzáty a byla provedena imunoprecipitace s protilátkami anti-HA. Aktivita kinázy Akt3 v imunopeletech byla měřena pomocí substrátového peptidu získaného z GSK3. Bkgd: základní (background) hladina pro netransfekované buňky, CMV6: buňky transfekované CMV6, Akt3cck: buňky transfekované expresním plazmidem pro konstitutivně aktivovaný Akt3 (CMV6-MyrAkt3HA). (viz příklady).

Obr. 2: Akt zvyšuje sekreci VEGF-165 z buněk HeLa

HeLa buňky byly transfekovány expresním plazmidem pro aktivovaný myší Akt1 (Akt1), aktivovaný humánní Akt3 (Akt3) nebo samotným vektorem CMV6. Jedne den po transfekci byly buňky přeneseny do málo mitogenního média (DMEM-0,5%FBS). Po 16 hodinách bylo kultivační médium odebráno a byl proveden VEGF ELISA test. Dráha A: buňky (na 6-jamkových kultivačních miskách) byly transfekovány 0,4 µg DNA vektoru CMV6; dráha Akt1: buňky (na 6-jamkových kultivačních miskách) byly transfekovány 0,4 µg expresního plazmidu CMV6mAkt1cck, dráha Akt3: buňky (na 6-jamkových kultivačních miskách) byly transfekovány expresním plazmidem pro aktivovaný humánní Akt3 (Akt3).

Obr. 3: Akt zvyšuje expresi VEGF-165 v humánního buňkách hladkého svalstva koronární artérie a buňkách kosterního svalstva

Obr. 3A: Buňky humánního kosterního svalstva (HSKMCs) byly infikovány rekombinantním adenovirem pro zelený fluoreskující protein (AV-GFP), konstitutivně aktivní myší Akt1 (AVmAkt1cak) nebo konstitutivně aktivní humánní Akt3 (AV-hAkt3cak) v koncentraci 3×10^8 VP/ml přes noc (VP: virové částice). Jeden den po infekci bylo odebráno médium a byla změřena hladina VEGF pomocí testu ELISA.

Obr. 3B: Buňky humánního koronárního hladkého svalstva (HCASMCs) byly infikovány AV-GFP, AVmAkt1cak, AV-hAkt3cak v koncentraci 3×10^8 VP/ml přes noc. Jeden den po infekci bylo odebráno médium a byla změřena hladina VEGF pomocí testu ELISA pro humánní VEGF.

Obr. 3C: HCASMCs byly infikovány uvedenými viry v koncentraci 3×10^8 VP/ml přes noc. Jako kontrola byly neinfikované buňky přeneseny do hypoxických podmínek. Po jednom dni byla z těchto buněk izolována celková RNA a exprese VEGF byla detekována Northernovým přenosem (Northern blot).

Obr. 4: Akt zvyšuje expresi VEGF v kardiomyocytech potkanů

Neonatální kardiomyocyty byly infikovány rekombinantním adenovirem pro zelený fluoreskující protein (AV-GFP), konstitutivně aktivní myší Akt1 (AV-mAkt1cak) nebo konstitutivně aktivní humánní Akt3 (AV-hAkt3cak) v koncentraci 3×10^7 VP/ml přes noc. Jako kontrola byly užity neinfikované buňky přenesené do hypoxických podmínek na 24 hodin. Po jednom dni byla z těchto buněk izolována celková RNA a exprese VEGF byla detekována Northernovým přenosem (Northern blot).

Předkládaný vynález výhodně poskytuje přípravky ke stimulaci exprese VEGF v buňkách. Tudíž vynález umožňuje léčení ischemických onemocnění pacientů tím, že umožňuje

stimulovat vytváření kolaterálních krevních cév v ischemické tkáni. Konkrétně bylo ukázáno, že protein Akt stimuluje expresi angiogenního proteinu VEGF. Takže první aspekt předkládaného vynálezu se týká stimulace exprese VEGF v buňkách tím, že se do buněk vnese protein Akt. Ve výhodném provedení se do buněk vnese nukleová kyselina kódující protein Akt.

Vynález se týká léčení pacientů trpících ischemickým onemocněním, přičemž toto léčení spočívá v tom, že se pacientovi podává protein Akt. Výhodně se pacientovi podává nukleová kyselina kódující protein Akt, přičemž výsledkem je prospěšné vytváření kolaterálních krevních cév v ischemických tkáních pacienta.

Různé aspekty předkládaného vynálezu jsou dále ještě podrobněji popsány. Cílem tohoto uspořádání popisu vynálezu je, aby bylo usnadněno porozumění vynálezu, a nijak tudíž předkládaný vynález neomezuje.

Definice

V popisu předkládaného vynálezu se pro vysvětlení vynálezu užívají termíny, které jsou následně podrobněji definovány.

V popisu specifických provedení vynálezu se užívá termín "přibližně", což znamená v rozmezí 20 %, výhodně 10 %, a nejvýhodněji v rozmezí 5 % dané hodnoty nebo rozsahu.

Termín "nukleová kyselina" se týká polymerní sloučeniny obsahující kovalentně navázané podjednotky zvané nukleotidy. Nukleová kyselina je polyribonukleová kyselina (RNA) a polydeoxyribonukleová kyselina (DNA), přičemž obě mohou tvořit jednořetězcové nebo dvojřetězcové molekuly. DNA je cDNA, genomová DNA, syntetická DNA a nebo semi-syntetická DNA.

Termín "gen" označuje soubor nukleotidů, který kóduje polypeptid, přičemž jde o cDNA nebo genomovou DNA.

Termín "rekombinantní molekula DNA" označuje DNA molekulu, která byla upravena metodami genového inženýrství (molekulární biologie).

"Vektor" je jakýkoliv prostředek pro přenos nukleových kyselin do hostitelské buňky. Vektor může být replikon, ke kterému je připojen další DNA segment, takže se replikuje také připojený segment. Přitom "replikon" je jakýkoliv genetický element (např. plazmid, fág, kosmid, chromosom, virus), který funguje jako autonomní jednotka replikace DNA *in vivo*, to znamená, která je schopná sama řídit svou replikaci. "Vektor" zahrnuje jak virové tak i neviróvé prostředky pro vnesení nukleových kyselin do buněk *in vitro*, *ex vivo* nebo *in vivo*. K virovým vektorům patří retroviry, adeno-asociované viry, poxviry, bakuloviry, virus vakcínie, virus Herpes simplex, virus Epstein-Barrové a adenoviry, které budou ještě podrobněji popsány dále. K neviróvým vektorům patří plazmidy, liposomy, elektricky nabitě lipidy (cytofektiny), komplexy DNA-protein a biopolymery. Kromě nukleové kyseliny může vektor obsahovat navíc jeden nebo více regulačních úseků a/nebo selekčních markerů užitečných pro selekci, měření a monitorování výsledků přenosu nukleové kyseliny (tj. do jaké tkáně byla nukleová kyselina přenesena, jaké je trvání exprese apod.).

Termín "klonovací vektor" označuje replikon, jako je např. plazmid, fág nebo kosmid, ke kterému byl připojen další DNA segment, takže se replikuje i tento připojený segment. Klonovací vektory mohou být schopny replikace v jednom typu buněk a exprese v druhém typu buněk (tzv. "kyvadlové vektory").

Termín "kazeta" označuje segment DNA, který byl vložen do vektoru ve specifických restrikčních místech. Segment DNA kóduje požadovaný polypeptid, přitom kazeta a specifická restrikční místa jsou konstruovány tak, aby bylo zajištěno vložení kazety ve shodném čtecím rámci vhodném pro transkripci a translaci.

Buňka byla "transfekována" exogenní nebo heterologní DNA, když taková DNA byla vnesena do buňky. Buňka byla "transformována" exogenní nebo heterologní DNA, když transfekovaná DNA způsobuje fenotypovou změnu. Transformující DNA může být integrovaná (tj. je kovalentně navázaná) do chromozomové DNA vytvářející genom buňky.

Termín "molekula nukleové kyseliny" označuje polymerní formy fosfátesterů ribonukleosidů (adenosin, guanosin, uridin nebo cytidin; čili "molekula RNA") nebo deoxyribonukleosidů (deoxyadenosin, deoxyguanosin, deoxythymidin nebo deoxycytidin; čili "molekula DNA"), nebo jakékoliv jejich fosfoesterové analogy, jako jsou např. fosforothioáty a thioestery, a to buďto v jednořetězcové formě nebo ve formě dvojřetězcové šroubovice. Dvojřetězcové formy mohou obsahovat DNA-DNA, DNA-RNA a RNA-RNA. Termín molekula nukleové kyseliny, konkrétně molekula DNA nebo molekula RNA, se týká pouze primární a sekundární struktury molekuly, a nijak neomezuje konkrétní terciární formu dané molekuly. Takže tento termín zahrnuje dvojřetězcovou DNA, která se vyskytuje *inter alia* jako lineární nebo cirkulární molekula DNA (např. jako restrikční fragment, plazmid nebo chromosom). Při popisu struktury konkrétní dvojřetězcové molekuly DNA je popsána sekvence netranskribovaného řetězce DNA (tj. řetězce, který je sekvenčně homologní s mRNA) obvyklým způsobem ve směru od 5'-konce ke 3'-konci. Termín "rekombinantní molekula DNA"

označuje molekulu DNA, která byla jakkoliv upravena metodami genetického inženýrství (molekulární biologie).

Molekula nukleové kyseliny je "hybridizovatelná" s jinou molekulou nukleové kyseliny, jako je např. cDNA, genomová DNA nebo RNA, když se jednořetězcová forma této molekuly nukleové kyseliny může spojit s jinou molekulou nukleové kyseliny za vhodných podmínek teploty a iontové síly roztoku (viz Sambrook et al.). Podmínky dané teplotou a iontovou silou roztoku určují tzv. "stringence" (přísnost) podmínek hybridizace. Pro předběžný screening homologů nukleových kyselin se užívají méně přísné hybridizační podmínky, tj. podmínky s nízkou stringencí, které odpovídají T_m 55° C, např. hybridizaci v roztoku 5x SSC, 0,1% SDS, 0,25% mléko a žádný formamid; nebo 30% formamid, 5x SSC, 0,5% SDS. Hybridizace v podmínkách střední stringence odpovídající vyšší T_m je např. 40% formamid a 5x nebo 6x SCC. Hybridizační podmínky s vysokou stringencí odpovídající nejvyšší T_m jsou např. 50% formamid a 5x nebo 6x SCC. Hybridizace vyžaduje, aby dvě molekuly nukleové kyseliny obsahovaly komplementární sekvence, avšak v závislosti na stringenci hybridizačních podmínek je možný určitý počet neshodných bází. Vodná stringence pro hybridizaci nukleových kyselin také závisí na délce molekul a na míře jejich komplementarity, což je odborníkům dobře známo. Čím je větší míra podobnosti nebo homologie mezi dvěma nukleotidovými sekvencemi, tím vyšší je hodnota T_m pro hybridy nukleových kyselin obsahujících tyto sekvence. Relativní stabilita (odpovídající vyšší T_m) hybridů nukleových kyselin roste v následující posloupnosti: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Pro hybridy delší než 100 nukleotidů byly odvozeny rovnice pro výpočet T_m (viz Sambrook et al., str. 9.50-0.51). Pro hybridizaci kratších nukleových kyselin, tj. oligonukleotidů, je pozice neshodných bází mnohem důležitější a délka

oligonukleotidu určuje jeho specificitu (viz Sambrook et al., str. 11.7-11.8). Výhodně je nejmenší délka hybridizovatelné nukleové kyseliny alespoň 10 nukleotidů, výhodněji alespoň 15 nukleotidů a ještě výhodněji alespoň 20 nukleotidů.

Ve specifickém provedení vynálezu termín "standardní hybridizační podmínky" označuje T_m 55° C, a dále podmínky výše popsané. Výhodně T_m je 60° C; ještě výhodněji T_m je 65° C.

Termín "oligonukleotid" označuje nukleovou kyselinu, obsahující obecně alespoň 18 nukleotidů, která je hybridizovatelná s molekulou genomové DNA, cDNA nebo mRNA, které kódují Akt. Oligonukleotid může být označen např. ³²P-nukleotidem nebo nukleotidem, ke kterému je kovalentně navázaná značka, např. biotin. V jednom provedení vynálezu je užit značený oligonukleotid jako sonda pro detekci přítomnosti nukleové kyseliny kódují Akt. V jiném provedení jsou oligonukleotidy (z nichž jeden nebo oba jsou značeny) užity jako primery v PCR (polymerázové řetězové reakci), buďto pro klonování celého Akt nebo jeho fragmentu, nebo pro detekci přítomnosti nukleové kyseliny kódují Akt. V dalším provedení oligonukleotid podle vynálezu vytváří trojšroubovici s molekulou Akt DNA. Obecně se oligonukleotidy připravují synteticky, výhodně pomocí automatického syntetizátoru nukleových kyselin. Tudíž lze připravit i oligonukleotidy obsahující analogy fosfodiesterových vazeb, jako např. thioesterové vazby, a další.

"Kódující sekvence DNA" je dvojřetězcová sekvence DNA, která je transkribovaná a translatovaná do polypeptidu v buňce *in vitro* nebo *in vivo* když je umístěna pod kontrolu vhodné regulační sekvence. Hranice kódující sekvence jsou určeny počátečním kodonem (start-kodonem) na 5'-konci (aminokonci) a stop-kodonem translace na 3'-konci (karboxylovém konci). Kódující sekvence může obsahovat, avšak není omezena pouze na

ně, prokaryotické sekvence, cDNA z eukaryotické mRNA, sekvence genomové DNA z eukaryot (např. savčí DNA), a dokonce i syntetické DNA sekvence. Pokud je kódující sekvence určena pro expresi v eukaryotické buňce, pak polyadenylační signál a sekvence pro terminaci transkripce jsou obvykle umístěny na 3'-konci kódující sekvence.

Transkripční a translační kontrolní sekvence jsou regulační DNA sekvence, jako např. promotory, enhancery, terminátory apod., které umožňují a regulují expresi kódující sekvence v hostitelské buňce. V eukaryotické buňce polyadenylační signál je kontrolní sekvence.

"Promotorová sekvence" je regulační úsek DNA, který je schopen vázat RNA polymerázu v buňce a iniciovat transkripci ve směru k 3'-konci ("downstream") ležící kódující sekvence. Pro definici předkládaného vynálezu je promotorová sekvence navázaná svým 3'-koncem k místu iniciace transkripce a pokračuje směrem k 5'-konci ("upstream"), přitom obsahuje minimální počet bazí nebo elementů nutných k iniciaci transkripce v míře detekovatelné nad základní hladinou. Uvnitř promotorové sekvence se nachází místo iniciace transkripce (definované např. S1-nukleázovým mapováním) a také domény vázající proteiny (kanonické sekvence) zodpovědné za vazbu RNA polymerázy.

Kódující sekvence je tzv. "pod kontrolou", tj. je řízena kontrolními sekvencemi transkripce a translace v buňce, když RNA polymeráza transkribuje kódující sekvenci do mRNA, která je pak sestřihána (pokud kódující sekvence obsahuje introny) a translatována do proteinu kódovaného kódující sekvencí.

Termín "homologní" (ve všech gramatických podobách a formách) se týká vztahu mezi proteiny, které mají "společný evoluční počátek", včetně proteinů z tzv. proteinových superrodin (např. supprrodina imunoglobulinů) a homologních

proteinů z různých biologických druhů (např. lehký řetězec myosinu atd.) (Reeck et al., 1987, Cell 50:667). Takové proteiny (a geny, které je kódují) mají sekvenční homologii, což se odráží ve vysokém stupni podobnosti sekvencí.

Termín "sekvenční podobnost" (ve všech gramatických podobách) se týká stupně identity nebo míry, v jaké si odpovídají dvě sekvence nukleové kyseliny nebo dvě aminokyselinové sekvence, které nesdílejí shodný evoluční počátek (viz Reeck et al.). Avšak v obecném smyslu a také v předkládané přihlášce se termín "homologní", ještě doplněný příslovcem např. "vysoce" týká pouze podobnosti sekvencí, a nezahrnuje jejich společný evoluční počátek.

Ve specifickém provedení vynálezu jsou dvě sekvence DNA "v podstatě homologní" nebo "v podstatě podobné", když alespoň 50 % (výhodně alespoň 75 %, a nejvýhodněji alespoň 90 nebo 95 %) nukleotidů v definovaném úseku DNA se shoduje. Sekvence v podstatě homologní mohou být identifikovány porovnáním sekvencí užitím standardního softwaru, který je veřejně dostupný v sekvenčních databázích, nebo pomocí Southernovy hybridizace, např. hybridizace za stringentních podmínek definovaných pro konkrétní systém. Určení vhodných hybridizačních podmínek je v kompetenci odborníka (viz např. Maniatis et al., DNA Cloning, Vols. I & II, Nucleic Acid Hybridization).

Termín "antisense" nukleová kyselina označuje sekvenci nukleotidů, která je komplementární k "sense" sekvenci. Termíny "antisense" a "sense" nukleové kyseliny jsou odborníkům známy. "Antisense" nukleové kyseliny se mohou užít k inhibici nebo blokování exprese polypeptidu kódovaného "sense" řetězcem.

Transkripční a translační kontrolní sekvence jsou regulační DNA sekvence, jako např. promotory, enhancery,

terminátory apod., které umožňují expresi kódující sekvence v hostitelské buňce. V eukaryotické buňce je dalším typem kontrolní sekvence polyadenylační signální sekvence.

"Signální sekvence" je vložena na začátek kódující sekvence proteinu, který má být exprimován na povrchu buňky. Tato sekvence kóduje signální peptid, ležící na N-konci zralého polypeptidu, a tento signální peptid řídí hostitelskou buňku, aby translokovala polypeptid. Termín "translokační signální sekvence" se také užívá k označení tohoto typu signální sekvence. Translokační signální sekvence se vyskytuje ve spojení s různými proteiny nativními pro eukaryotické i prokaryotické organismy, a často jsou funkční v obou typech organismů.

"Regulační úsek" znamená sekvenci nukleové kyseliny, která reguluje expresi jiné sekvence nukleové kyseliny. Regulační úsek obsahuje sekvence, které jsou přirozeně zodpovědné za expresi určité nukleové kyseliny (homologní úsek) nebo obsahuje sekvence odlišného původu, zodpovědné za expresi jiného proteinu, nebo dokonce syntetické sekvence (heterologní úsek). Konkrétně to může být sekvence z eukaryotického nebo virového genu nebo z nich odvozená sekvence, která specificky nebo nespecificky stimuluje nebo potlačuje transkripci genu indukovatelným nebo neindukovatelným způsobem. K regulačním úsekům patří počátek replikace, místa sestřihu RNA, promotory, enhancery, sekvence pro terminaci transkripce (terminační sekvence), signální sekvence směřující polypeptid do sekretorické metabolické dráhy v cílové buňce, a také promotory.

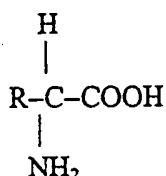
Regulační úsek z "heterologního zdroje" je regulační úsek, který není v přírodním (přirozeném) stavu spojen s nukleovou kyselinou, která je exprimována. K heterologním regulačním úsekům patří regulační úseky z jiného biologického

druhu, z jiného genu, hybridní regulační sekvence, a také regulační sekvence, které se nevyskytují v přírodě, ale které byly zkonstruovány odborníkem.

"Heterologní" DNA označuje DNA, která v přírodním stavu není obsažena v buňce nebo v ní není lokalizována v chromozomálním místě v buňce. Výhodně k heterologním DNA patří geny, které jsou pro danou buňku cizí (cizorodé).

"Homologní rekombinace" označuje vložení cizorodé DNA sekvence do jiné molekuly DNA, např. vložení vektoru do chromosomu. Výhodně je vektor pro homologní rekombinaci zaměřen do specifického místa v chromosomu. Pro specifickou homologní rekombinaci obsahuje vektor dostatečně dlouhé úseky homologní se sekvencemi chromosomu, aby bylo možné komplementární navázání vložení vektoru chromosomu. Delší úseky homologie a vyšší míra sekvenční podobnosti zvyšují účinnost homologní rekombinace.

"Polypeptid" je polymerní sloučenina obsahující kovalentně navázané aminokyselinové zbytky. Aminokyseliny mají následující obecnou strukturu:



Aminokyseliny jsou klasifikovány do sedmi skupin podle postranního řetězce R:

- (1) alifatický postranní řetězec,
- (2) postranní řetězec obsahuje hydroxylovou (OH) skupinu,
- (3) postranní řetězec obsahuje atomy síry,
- (4) postranní řetězec obsahuje kyselou nebo amidovou skupinu,
- (5) postranní řetězec obsahuje bazickou skupinu,
- (6) postranní řetězec obsahuje aromatický kruh, a

(7) prolin, což je aminokyselina, kde postranní řetězec je fúzován s aminoskupinou. Polypeptid podle vynálezu výhodně obsahuje alespoň 14 aminokyselin.

"Protein" je polypeptid, který má funkční nebo strukturní roli v živé buňce.

"Varianta" polypeptidu nebo proteinu je jakýkoliv analog, fragment, derivát nebo mutanta, která je odvozena z polypeptidu a uchovává si alespoň jednu biologickou vlastnost polypeptidu nebo proteinu. V přírodě existují různé varianty polypeptidu nebo proteinu. Tyto varianty jsou alelické varianty charakteristické rozdíly v nukleotidové sekvenci strukturního genu kódujícího protein, nebo jsou výsledkem odlišného sestřihu nebo zahrnují odlišné post-translační modifikace. Odborník je schopen připravit varianty mající jednu nebo více aminokyselinových substitucí, delecí, adicí nebo přesunů. K těmto variantám *inter alia* patří:

(a) varianty, kde jeden nebo více aminokyselinových zbytků je nahrazen konzervativní nebo nekonzervativní aminokyselinou,

(b) varianty, kde je k polypeptidu nebo proteinu přidána jedna nebo více aminokyselin,

(c) varianty, kde jedna nebo více aminokyselina obsahuje substituovanou skupinu,

(d) varianty, kde polypeptid nebo protein je fúzován s jiným polypeptidem, např. sérovým albuminem.

Metody přípravy těchto variant, včetně genetických (suprese, delece, mutace atd.), chemických a enzymatických postupů, jsou odborníkům dobře známy.

Jestliže takové alelické variace, analogy, fragmenty, deriváty, mutanty a modifikace, včetně alternativně sestřižených forem mRNA nebo alternativních post-translačních modifikací poskytují deriváty polypeptidu, který si uchovává

jakoukoliv biologickou vlastnost polypeptidu, pak také spadají do rozsahu předkládaného vynálezu.

"Heterologní protein" označuje protein, který se přirozeně v buňce netvoří.

Dvě aminokyselinové sekvence jsou "v podstatě homologní" nebo jsou "v podstatě podobné", když je více než 40 % aminokyselin identických nebo více než 60 % aminokyselin je podobných (funkčně identických). Výhodně jsou podobné nebo homologní sekvence identifikovány přiřazením užitím např. programu "pileup" z programového balíku GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin).

Termín "odpovídající" označuje podobné nebo homologní sekvence, ať je určitá pozice identická nebo odlišná od sekvence, se kterou se srovnání podobnosti nebo homologie provádí. Přiřazení sekvencí nukleových kyselin nebo aminokyselin pro srovnání může obsahovat mezery. Takže termín "odpovídající" se týká sekvenční podobnosti a nikoliv číslování aminokyselinových zbytků nebo nukleotidových bází.

Geny kódující proteiny Akt

Předkládaný vynález se týká užití proteinu nebo polypeptidu Akt, nebo nukleové kyseliny kódující protein nebo polypeptid Akt, ke stimulaci exprese VEGF v buňkách. Výhodně je Akt humánní protein nebo polypeptid Akt3, včetně úplné (plné délky) nebo přirozeně se vyskytující formy Akt, nebo jakéhokoliv jeho fragmentu schopného stimulovat expresi VEGF.

Termín "Akt" v předkládané přihlášce označuje polypeptid Akt, a "akt" označuje gen, který kóduje refers to a gen kódující polypeptid Akt.

Odborníkům jsou již známy různé myší a humánní sekvence Akt (viz např. Coffey et al., 1991, Eur. J. Biochem. 201:475-

481; Jones et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4171-4175; Bellacosa et al., 1993, Oncogen, 8:745-754; GenBank Accession Nos. M63167, X61037 a X65687; a prozatímní patentová přihláška US č. 60/125,108). Výhodně je Akt humánní Akt1 (SEKVENCE ID. Č. 11), Akt2 (SEKVENCE ID. Č. 12) nebo Akt3 (SEKVENCE ID. Č. 2). Výhodný Akt podle vynálezu obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2. Výhodná sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2, SEKVENCE ID. Č. 11 nebo SEKVENCE ID. Č. 12. Výhodněji nukleová kyselina obsahuje sekvenci uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 1. Akt může být také získán z jiného než humánního zdroje.

Podle předkládaného vynálezu je možné užít v oboru obvyklé postupy molekulární biologie, mikrobiologie a techniky rekombinantní DNA (metody genového inženýrství), které jsou odborníkům známy. Tyto různé metody byly plně popsány v odborné literatuře, viz např. Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (zkráceně zde citován jako "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I a II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.); *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Geny kódující Akt, ať již jako genomová DNA nebo cDNA, mohou být izolovány z jakéhokoliv zdroje, zejména z humánní cDNA knihovny nebo genomové knihovny. Obecné metody pro

izolaci genu *akt* jsou odborníkům známy, a byly popsány (viz např. Sambrook et al., 1989).

Tudíž jakékoliv zvíře může být potenciálním zdrojem nukleové kyseliny pro molekulární klonování genu *akt*. DNA se získá standardním postupem, který je odborníkům v oboru znám, z klonované DNA (např. z tzv. DNA "knihovny"), výhodně se získá z cDNA knihovny připravené z tkání, kde je vysoká hladina exprese požadovaného proteinu (např. srdce, pankreas a kosterní svalstvo), chemickou syntézou, klonováním cDNA nebo genomové DNA nebo jejich fragmentů, purifikovaných z požadovaných buněk (viz např. Sambrook et al., 1989, Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, I)]. Klony odvozené z genomové DNA obsahují kromě úseků kódující DNA také regulační a intronové úseky DNA, klony získané z cDNA neobsahují intronové sekvence. Bez ohledu na zdroj, gen je pak klonován do vektoru vhodného pro množení genu.

Jakmile jednou byly získány fragmenty DNA, identifikace specifických DNA fragmentů obsahujících požadovaný gen *akt* může být provedena řadou způsobů. Tak např. DNA fragmenty mohou být screenovány metodou hybridizace nukleových kyselin se značenou sondou (Benton a Davis, 1977, Science 196:180; Grunstein a Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961). Fragmenty DNA v podstatě homologní se sondou pak budou hybridizovat. Jak již bylo zmíněno výše, čím větší je míra homologie, tím přísnější podmínky (tj. podmínky s vyšší stringencí) se užijí. Ve specifickém provedení vynálezu se užije Northern hybridizace pro identifikaci mRNA sestřihových variant genu *akt*.

Další selekce se provádí na základě vlastností genu, např. zda gen kóduje proteinový produkt mající isoelektrické nebo elektroforetické vlastnosti nebo a aminokyselinovou nebo

částečnou aminokyselinovou sekvenci proteinu Akt podle vynálezu. Takže detekce genu může být proveden testem založeným na fyzikálních, chemických nebo imunologických vlastnostech exprimovaného produktu. Tak např. mohou být selektovány cDNA klony nebo DNA klony hybridizující s příslušnou mRNA, které produkují protein, která má podobnou nebo identickou elektroforetickou migraci; chování při isoelektrické fokusaci nebo při nerovnovážné pH gelové elektroforéze, proteolytické štěpné mapy, nebo antigenní vlastnosti jaké jsou u Akt. Ve specifickém provedení je exprimovaný protein rozpoznáván polyklonální protilátkou, která byla připravena proti epitopu specifickému pro humánní Akt.

Předkládaný vynález se také týká použití genů (např. cDNA) kódujících alelické varianty, sestřihové varianty, analogy a deriváty Akt, které mají schopnost stimulovat expresi VEGF. Příprava a použití derivátů a analogů Akt spadá do rozsahu předkládaného vynálezu. Takové varianty, analogy, deriváty a homology si uchovávají svou schopnost stimulovat expresi VEGF.

Deriváty Akt mohou být připraveny změnou kódující sekvence nukleové kyseliny jednou nebo více substitucemi, adicemi nebo delecemi, které poskytují funkčně ekvivalentní molekuly. Výhodně se připravují takové deriváty, které mají zlepšenou nebo zvětšenou funkční aktivitu vzhledem k nativnímu Akt.

Vzhledem k degenerovanosti nukleotidové kódující sekvence (resp. genetického kódu) se mohou pro realizaci předkládaného vynálezu užít i jiné sekvence DNA, které kódující v podstatě stejné aminokyselinové jako gen akt, včetně aminokyselinových sekvencí obsahujících jednoduché aminokyselinové varianty. K nim patří, avšak bez omezení,

alelické geny, homologní geny z jiných biologických druhů a nukleotidové sekvence obsahující celý nebo část genu akt, který byl změněn substitucí různých kodonů, které v sekvenci kódují stejné aminokyselinové zbytky, jde tedy o tzv. umlčené záměny.

Podobně k derivátům Akt podle vynálezu patří, avšak bez omezení, deriváty obsahující jako primární aminokyselinovou sekvenci celou nebo část aminokyselinové sekvence proteinu Akt včetně změněné sekvence, kde jsou aminokyselinové zbytky nahrazeny funkčně ekvivalentními aminokyselinovými zbytky, takže dochází ke konzervativním aminokyselinovým substitucím. Tak např. jeden aminokyselinový zbytek v sekvenci může být nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem s podobnou polaritou, který působí jako funkční ekvivalent, což vede k umlčené záměně. Substituty aminokyselin v sekvenci se vyberou z ostatních členů příslušné třídy aminokyselin, do které patří původní aminokyselina. Tak např. k nepolárním (hydrofobním) aminokyselinám patří alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin. Aminokyseliny obsahující aromatický kruh jsou fenylalanin, tryptofan a tyrosin. K polárním neutrálním aminokyselinám patří glycin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin. K pozitivně nabitým (bazickým) aminokyselinám patří arginin, lysin a histidin. K negativně nabitým (kyselým) aminokyselinám patří kyselina asparagová a kyselina glutamová. Tyto alterace aminokyselin nemění zjevnou molekulovou hmotnost stanovenou elektroforézou na polyakrylamidovém gelu nebo isoelektrický bod proteinu nebo polypeptidu.

Zvláště výhodné substituce jsou:

- Lys za Arg a naopak, takže se udržuje pozitivní náboj,
- Glu za Asp a naopak, takže se udržuje negativní náboj,
- Ser za Thr, takže se udržuje volná -OH skupina,

- Gln za Asn, takže se udržuje volná CONH₂ skupina.

Aminokyselinové substituce mohou být také provedeny s cílem vnést aminokyselinu se zvláště výhodnými vlastnostmi. Tak např. cys může být vnesen proto, aby se přidalo potenciální místo pro vytvoření disulfidického můstku s jiným Cys. His se může vnést jako zvláště "katalytické" místo (His může totiž působit jako kyselina nebo báze a je nejběžnější aminokyselinou v biochemické katalýze). Pro může být vnesen pro svou zvláštní planární strukturu, která indukuje β -ohyby ve struktuře proteinu.

Geny kódující deriváty a analogy Akt podle vynálezu mohou být připraveny různými způsoby, které jsou odborníkům známy. Úpravy (manipulace), které k nim vedou, se mohou odehrát na úrovni genu nebo proteinu. Tak např. klonovaná sekvence genu Akt může být modifikována jakoukoliv strategií v oboru známou (Sambrook et al., 1989). Sekvence může být štěpena ve vhodných místech restričními endonukleázami, pak případně dále enzymaticky modifikována, izolována a ligována *in vitro*. Při přípravě genu kódujícího derivát nebo analog Akt je třeba věnovat péči zajištění toho, že modifikace genu zůstává ve shodném translačním čtecím rámci jako gen Akt, a že není přerušen translačním stop-signálem v úseku, kde je kódována požadovaná aktivita.

Navíc sekvence nukleové kyseliny kódující Akt může být mutována *in vitro* nebo *in vivo*, aby se vytvořila a/nebo zrušila iniciační a/nebo terminační sekvence translace, nebo aby se vytvořily variace v kódujícím úseku a/nebo aby se vytvořila nová restriční místa nebo zrušila již existující stará, pro usnadnění dalších modifikací *in vitro*. Výhodně takové mutace zvyšují funkční aktivitu mutovaného genu Akt. Pro mutagenezi lze užít jakoukoliv metodu v oboru známou, včetně *in vitro* místně-cílené mutageneze (Hutchinson, C.,

et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551; Zoller a Smith, 1984, DNA 3:479-488; Oliphant et al., 1986, Gen 44:177; Hutchinson et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:710), použití linkerů TAB® (Pharmacia), přičemž tento výčet není omezující. PCR metody jsou výhodné pro místně cílenou mutagenezi (viz Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", in *PCR Technology' Principles and Applications, for DNA Amplification*, H. Erlich, ed., Stockton Press, Chapter 6, pp. 61-70).

Identifikovaný a izolovaný gen se pak vloží do vhodného klonovacího vektoru. Může se použít velký počet systémů vektor-hostitel, které jsou odborníkům známy. K vhodným vektorům, avšak bez omezení, patří plazmidy nebo modifikované viry, ale vektorový systém musí být kompatibilní s hostitelskými buňkami, které se užívají. K příkladům vhodných vektorů, aniž by výčet byl omezující, patří bakteriofágy *E. coli*, jako jsou např. lambda deriváty, nebo plazmidy, jako jsou např. deriváty plazmidu pBR322 nebo deriváty plazmidu pUC, např. tedy vektory pGEX, pmal-c, pFLAG atd.. Vložení (inzerce) do klonovacího vektoru se provede např. ligací DNA fragmentu do klonovacího vektoru s komplementárními kohezivními konci.

Jestliže komplementární restrikční místa ve fragmentu DNA nejsou přítomna v klonovacím vektoru, konce DNA molekuly mohou být enzymaticky modifikovány. Alternativně mohou být jakkoliv požadovaná restrikční místa vytvořena ligací nukleotidových sekvencí (linkerů) na konce fragmentu DNA; tyto ligované linkery obsahují specifické chemicky syntetizované oligonukleotidy kódující sekvence rozpoznávacích míst restrikčních endonukleáz. Rekombinantní molekuly se vnášejí do hostitelských buněk metodou transformace, transfekce, infekce, elektroporace a dalšími, takže se připraví mnoho kopií sekvence genu. Výhodně je klonovaná sekvence přítomna

v kyvadlovém vektorovém plazmidu, který umožňuje namnožení v klonovacích buňkách, např. *E. coli*, a usnadňuje purifikaci pro následné vnesení do vhodné expresní buněčné linie, pokud je to požadováno. Tak např. může být připraven kyvadlový vektor, což je vektor schopný replikace ve více druzích organismů, pro replikaci jak v *E. coli* tak i v *Saccharomyces cerevisiae*, a sice tak, že se spojí sekvence plazmidu z *E. coli* se sekvencemi kvasinkového plazmidu 2 μ .

Expresce polypeptidů Akt

Nukleotidová sekvence kódující Akt, nebo jeho antigenní fragment, derivát, analog nebo jeho funkční derivát včetně chimérického proteinu, se vloží do vhodného expresního vektoru, tj. vektoru, který obsahuje nezbytné elementy pro transkripci a translaci vložené sekvence kódující protein. Takové elementy se nazývají "promotory". Takže nukleová kyselina podle vynálezu je operativně spojena s promotorem v expresním vektoru podle vynálezu. Jak sekvence cDNA tak sekvence genomové DNA může být klonována a exprimována pod kontrolou takových regulačních sekvencí. Expresní vektor také vhodně obsahuje replikační počátek.

Nezbytné transkripční a translační signály poskytne rekombinantní expresní vektor nebo jsou obsaženy již v nativním genu kódujícím Akt a/nebo v úsecích obklopujících tento gen. V jednom výhodném provedení vynálezu je exprese Akt omezena na kardiomyocyty tím, že je užit promotor specifický pro srdeční tkáň a/nebo vektor se specifickým tropismem pro srdeční buňky.

K potenciálním systémům hostitel-vektor patří (aniž by výčet byl omezující) systémy jako jsou savčí buňky infikované viry (např. virem vakcínie, adenovirem atd.); hmyzí buňky infikované virem (např. bakulovirem); mikroorganismy jako jsou

kvasinky obsahující kvasinkové vektory, a nebo bakterie transformované bakteriofágovou DNA, plazmidovou DNA nebo kosmidovou DNA. Expresní elementy vektorů se liší svou účinností a specificitou. V závislosti na použitém systému hostitel-vektor je možné užít některý z vhodných transkripčních a translačních elementů.

Rekombinantní protein Akt nebo jeho funkční fragmenty, deriváty, chimérické konstrukty nebo analogy, jsou exprimovány chromozomálně, po integraci kódující sekvence homologní rekombinací. Pro dosažení vysoké hladiny stabilní exprese lze užít jakýkoliv z mnoha známých amplifikačních systémů (viz Sambrook et al., 1989).

Buňky obsahující rekombinantní vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující Akt se kultivují ve vhodném kultivačním médiu v takových podmínkách které vedou k expresi Akt v buňkách. Kteroukoliv z již popsaných metod pro inzerci klonované DNA do klonovacího vektoru lze užít pro konstrukci expresních vektorů obsahujících vhodné transkripční a translační kontrolní signální sekvence a sekvence kódující protein. K takovým metodám patří techniky syntetické rekombinantní DNA *in vitro* a rekombinace *in vivo* (genetická rekombinace).

Nukleová kyselina kódující polypeptid Akt je operativně spojená a řízená s jakýmkoliv vhodným, odborníkovi známým, regulačním úsekem, tj. úsekem obsahujícím element promotor/enhancer, avšak tyto regulační elementy musejí být funkční v cílovém nádoru, který byl vybrán pro expresi. Regulační úseky obsahují promotorový úsek pro funkční transkripci v hostitelské buňce; a také úsek situovaný na 3'-konci požadovaného genu, který nese signál pro terminaci transkripce a polyadenylační místo. Všechny tyto zmíněné elementy tvoří expresní kazetu.

K promotorům vhodným pro použití v předkládaném vynálezu patří jak konstitutivní promotory tak i regulované (indukovatelné) promotory. Mohou to být promotory přirozeně zodpovědné za expresi příslušné nukleové kyseliny. Mohou to být také promotory z heterologních zdrojů. Konkrétně to mohou být promotorové sekvence z eukaryotických nebo virových genů. Tak např. promotorová sekvence pocházející z genomu buňky, která má být infikována. Obdobně i promotorová sekvence pocházející z genomu viru, jako je např. adenovirus (E1A a MLP), cytomegalovirus nebo virus Rousova sarkomu (RSV). Navíc může být promotor modifikován připojením aktivační nebo regulační sekvence nebo sekvence umožňující tkáňově specifickou nebo převládající expresi (promotor z enolázy nebo GFAP apod.). Pokud nukleová kyselina neobsahuje promotorovou sekvenci, pak se do ní promotor vloží.

K příkladům promotorů užitečných pro předkládaný vynález patří všudypřítomné promotory (jako je např. promotor HPRT, vimentinu, aktinu, tubulinu); intermediární vláknité promotory (např. promotor desminu, neurofilament, keratinu, GFAP), promotory terapeutických genů (např. typu MDR, CFTR, faktoru VIII), tkáňově specifické promotory (např. promotor aktinu v buňkách hladkého svalstva), promotory přednostně aktivované v dělících se buňkách, promotory odpovídající stimul (např. receptor steroidních hormonů, receptor kyseliny retinové), transkripční modulátory regulované tetracyklinem, bezprostředně časné geny cytomegaloviru (CMV), retrovirové LTR; metalothionein, SV-40, adenovirus Ela, a hlavní pozdní promotor adenoviru (MLP). Tetracyklinem regulované transkripční modulátory a promotory CMV byly popsány v patentové přihlášce WO 96/01313, a patentech US 5,168,062 a 5,385,839, jejichž obsah je vložen formou odkazu.

Konkrétně exprese proteinu Akt může být řízena jakýmkoliv vhodným, odborníkovi známým, regulačním úsekem, tj. úsekem obsahujícím element promotor/enhancer, avšak tyto regulační elementy musejí být funkční v cílovém nádoru, který byl vybrán pro expresi. K vhodným promotorům pro řízení genové exprese podle vynálezu patří (příčemž tento výčet není omezující) časná promotorový úsek SV40 (Benoist a Chambon, 1981, Nature 290:304-310), promotor obsažený v 3' dlouhé terminální repetici, LTR, viru Rousova sarkomu (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787797), promotor thymidinkinázy z herpes viru (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), regulační sekvence metallothioneinového genu (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); prokaryotické expresní vektory jako je např. β -laktamázový promotor (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) nebo promotor tac (DeBoer, et al., 1983; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25); viz také článek "Useful proteins from recombinant bacteria" Scientifi American, 1980, 242:74-94); promotorové elementy z kvasinke nebo jiných hub jako je např. promotor Gal4, promotor ADC (alkoholdehydrogenázy), promotor PGK (fosfoglycerolkinázy), promotor alkalické fosfatázy; a také transkripční kontrolní úseky genů zvířat, které vykazují tkáňovou specificitu a byly užity např. v transgenních zvířatech: kontrolní úsek genu elastázy I, který je aktivní v hroznovitých buňkách pankreatu (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); kontrolní úsek insulinového genu, který je aktivní v beta-buňkách pankreatu (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), kontrolní úsek imunoglobulinového genu, který je aktivní v lymfatických buňkách (Grosschedl et, al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexaer et al.,

1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), kontrolní úsek z viru nádoru mléčné žlázy myší, který je aktivní ve tkáni varlat a prsu a v lymfatických buňkách a mastocytech (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), kontrolní úsek genu pro albumin, který je aktivní v játrech (Pinkert et al., 1987, Gens a Devel. 1:268-276), kontrolní úsek genu pro alfa-fetoprotein, který je aktivní v játrech (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58), kontrolní úsek genu pro alfa-1-antitrypsin, který je aktivní v játrech (Kelsey et al., 1987, Gens a Devel. 1:161-171), kontrolní úsek genu pro beta-globin, který je aktivní v myeloidních buňkách (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94), kontrolní úsek genu pro myelinový bazický protein, který je aktivní v oligodendrocytech mozku (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712), kontrolní úsek genu pro myosinový lehký řetězec 2, který je aktivní v kosterním svalstvu (Sari, 1985, Nature 314:283-286), a kontrolní úsek genu pro hormon uvolňující gonadotropiny, který je aktivní v hypothalamu (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Výhodně je exprese Akt omezena na kardiomyocyty tím, že se užije promotor specifický pro srdce nebo vektor se specifickým tropismem pro srdeční buňky.

Expresní vektory obsahující nukleové kyseliny kódující protein Akt lze identifikovat pěti různými postupy:

- (a) PCR amplifikací požadované plazmidové DNA nebo specifické mRNA,
- (b) Hybridizací nukleových kyselin,
- (c) Podle přítomnosti nebo absence genu pro selekční marker,
- (d) Analýzou užitím vhodných restričních endonukleáz,
- (e) Expresí vložené sekvence.

V první uvedené metodě se nukleové kyseliny amplifikují v PCR (polymerázové řetězové reakci) a pak se detekuje amplifikovaný produkt. V druhé metodě se přítomnost cizorodého genu vloženého do expresního vektoru detekuje pomocí hybridizace nukleových kyselin užitím sondy, která obsahuje sekvenci homologní se sekvencí vloženého markerového genu. Ve třetí metodě se rekombinantní systém vektor/hostitel identifikuje a selektuje na základě přítomnosti určitých funkcí "selekčních markerů" (např. β -galaktosidázová aktivita, thymidinkinázová aktivita, resistance k antibiotikům, transformovaný fenotyp, vytváření okluzních tělísek v bakulovirech apod.) způsobených vložením cizorodého genu do vektoru. Jiný příklad je takový, že nukleová kyselina kódující Akt je vložena do genu pro selekční marker a pak jsou rekombinanty obsahující Akt inzert identifikovány na základě absence této markerové genové funkce. Ve čtvrté metodě jsou rekombinantní expresní vektory identifikovány štěpením vhodnými restriktivními enzymy. V páté metodě jsou rekombinantní expresní vektory identifikovány testováním na aktivitu, biochemické nebo imunologické vlastnosti genového produktu exprimovaného v rekombinantách, za předpokladu, že exprimovaný protein zaujímá funkčně aktivní konformaci.

Pro expresi Akt DNA sekvence se může využít široké spektrum kombinací hostitel/expresní vektor. Užitečné expresní vektory jsou tvořeny např. segmenty chromosomální, non-chromosomální a syntetické DNA sekvence. K vhodným vektorům patří deriváty SV40 a známých bakteriálních plazmidů, např. *E. coli* plazmidy col E1, pCRI, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., 1988, gen 67:31-40), pMB9 a jejich deriváty, plazmidy jako je RP4; fágová DNA, např. četné deriváty fágu 1, např. NM989, a další fágové DNA, např., M13 a DNA z vláknitých jednořetězcových fágů; kvasinkové

plazmidy jako je např. plazmid 2m a jeho deriváty; vektory vhodné pro eukaryotické buňky, jako např. vektory vhodné pro hmyzí nebo savčí buňky; vektory získané kombinací plazmidové a fágové DNA, jako je např. plazmid, který byl modifikován tak, aby užíval fágovou DNA nebo jiné expresní kontrolní sekvence; a další.

Tak např. v bakulovirovém expresním systému se mohou využít jak nefúzní transferové vektory, jako je (avšak výčet není omezující) např. pVL941 (klonovací místo *BamHI*; Summers), pVL1393 (klonovací místo *BamHI*, *SmaI*, *XbaI*, *EcoRI*, *NotI*, *XmaIII*, *BglIII* a *PstI*; Invitrogen), pVL1392 (klonovací místo *BglIII*, *PstI*, *NotI*, *XmaIII*, *EcoRI*, *XbaI*, *SmaI* a *BamHI*; Summers a Invitrogen), a pBlueBacIII (klonovací místo *BamHI*, *BglIII*, *PstI*, *NcoI* a *HindIII*, s možností rekombinantního screeningu systémem modrá/bílá; Invitrogen), tak i fúzní transferové vektory, jako je (avšak výčet není omezující) např. pAc700 (klonovací místa *BamHI* a *KpnI*, kde *BamHI* rozpoznávací místo začíná v iniciačním kodonu; Summers); pAc701 a pAc702 (stejně jako pAc700, s odlišným čtecím rámcem), pAc360 (klonovací místo *BamHI* 36 párů bází "downstream" od polyhedrinového iniciačního kodonu; Invitrogen (195)), a pBlueBacHisA, -B, -C (tři různé čtecí rámce, s klonovacími místy *BamHI*, *BglIII*, *PstI*, *NcoI* a *HindIII*, a N-koncovým peptidem pro purifikaci pomocí ProBond, a systémem modrá/bílá pro rekombinantní screening plaků; Invitrogen (220)).

Savčí expresní vektory vhodné pro použití v předkládaném vynálezu zahrnují vektory s indukovatelným promotorem, jako je např. promotor genu dihydrofolátreduktázy (DHFR), tedy např. jakýkoliv expresní vektor s *DHFR* expresním vektorem, nebo koamplifikační vektor s *DHFR*/methotrexat, jako je pED (klonovací místo *PstI*, *SalI*, *SbaI*, *SmaI* a *EcoRI*, přičemž vektor exprimuje jak klonovaný gen tak i *DHFR*; Kaufman,

Current Protocols in Molecular Biology, 16.12 (1991). Nebo koamplifikační vektor glutaminsynthetáza/methionisulfoximin, jako je např. pEE14 (klonovací místo *HindIII*, *XbaI*, *SmaI*, *SbaI*, *EcoRI*, a *BcIII*, vektor exprimuje jak klonovaný gen tak i glutaminsyntázu; Celltech). V jiném provedení vynálezu vynálezu se může užít vektor, který řídí episomální expresi pod kontrolou viru Epstein-Barrové (EBV), jako je pREP4 (klonovací místo *BamHI*, *SfiI*, *XhoI*, *NotI*, *NheI*, *HindIII*, *NheI*, *PvuII*, a *KpnI*, konstitutivní promotor z dlouhé terminální repetice viru Rousova sarkomu (RSV-LTR), hygromycinový selekční marker; Invitrogen), pCEP4 (klonovací místo *BamHI*, *SfiI*, *XhoI*, *NotI*, *NheI*, *HindIII*, *NheI*, *PvuII* a *KpnI*, konstitutivní promotor bezprostředně časného genu humánního cytomegaloviru (hCMV), hygromycinový selekční marker; Invitrogen), pMEP4 (klonovací místo *KpnI*, *PvuI*, *NheI*, *HindIII*, *NotI*, *XhoI*, *SfiI*, *BamHI*, indukovatelný promotor genu pro methallothionein IIa, hygromycinový selekční marker, Invitrogen), pREP8 (klonovací místo *BamHI*, *XhoI*, *NotI*, *HindIII*, *NheI* a *KpnI*, promotor RSV-LTR, histidinylový selekční marker, Invitrogen), pREP9 (klonovací místo *KpnI*, *NheI*, *HindIII*, *NotI*, *XhoI*, *SfiI* a *BamHI*, promotor RSV-LTR, G418 selekční marker; Invitrogen), a pEBVHis (promotor RSV-LTR, hygromycinový selekční marker, N-koncový peptid purifikovatelný pomocí pryskyřice ProBond a štěpitelný enterokinázou; Invitrogen). Selektovatelné savčí expresní vektory pro použití podle vynálezu zahrnují pRc/CMV (klonovací místo *HindIII*, *BstXI*, *NotI*, *SbaI* a *ApaI*, G418 selekce; Invitrogen), pRc/RSV (klonovací místo *HindIII*, *SpeI*, *BstXI*, *NotI*, *XbaI*, G418 selekce; Invitrogen), a další. Savčí expresní vektory založené na viru vakcínie (viz Kaufman, 1991) pro použití podle vynálezu zahrnují (avšak výčet není omezující) pSC 11 (klonovací místo *SmaI*, TK- a β -gal selekce), pMJ601

(klonovací místo *SaII*, *SmaI*, *AflI*, *NarI*, *BspMII*, *BamHI*, *Apal*, *NheI*, *SacII*, *KpnI*, a *HindIII*; TK- a β -gal selekce), a pTKgptF1S (klonovací místo *EcoRI*, *PstI*, *SalI*, *AccI*, *HindII*, *SbaI*, *BamHI* a *Hpa*, TK nebo XPRT selekce).

Kvasinkové expresní systémy mohou být také užity pro expresi proteinu Akt podle předkládaného vynálezu. Např. nefúzní vektor pYES2 (klonovací místa *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *GstXI*, *EcoRI*, *BstXI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI* a *HindIII*; Invitrogen) nebo fúzní vektory pYESHisA, B, C (klonovací místo *XbaI*, *SphI*, *ShoI*, *NotI*, *BstXI*, *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, *KpnI* a *HindIII*, N-koncový peptid purifikovatelný pomocí pryskyřice ProBond a štěpitelný enterokinázou; Invitrogen), abychom zmínili alespoň dva vektory využitelné podle vynálezu.

Jakmile byla jednou určitá rekombinantní DNA molekula identifikována a izolována, pro její namnožení se může užít několik různých metod, které jsou odborníkům známy. Po etablování vhodného hostitelského systému a vhodných kultivačních podmínek se rekombinantní expresní vektory namnoží a připraví v požadovaném množství. Jak bylo již výše vysvětleno, k použitelným expresním vektorům patří (aniž by tento výčet byl omezující) následující vektory nebo jejich deriváty: humánní nebo zvířecí viry jako je např. virus vakcínie nebo adenovirus; hmyzí viry jako jsou bakuloviry; kvasinkové vektory; bakteriofágové vektory (např. fág lambda), a plazmidové a kosmidové DNA vektory.

Navíc může být vybrán hostitelský buněčný kmen, který moduluje expresi vložená sekvence, nebo specifickým způsobem modifikuje a "opracovává" genový produkt. Různé hostitelské buňky mají charakteristické a specifické mechanismy pro translační a post-translační opracování a modifikace proteinů.

Vhodné buněčné linie nebo hostitelské systémy se vyberou tak, aby se zajistily požadované modifikace a opracování

exprimovaného cizorodého proteinu. Expres v kvasinkách může poskytnout biologicky aktivní produkt. Expres v eukaryotických buňkách zvyšuje pravděpodobnost "nativního" uspořádání (prostorové struktury) proteinu. Navíc expres v savčích buňkách poskytuje nástroj pro rekonstituci aktivity Akt. A dále různé expresní systémy vektor/hostitel v různé míře ovlivňují reakce opracování proteinu jako např. proteolytické štěpení.

Vektory se vnášejí do požadovaných hostitelských buněk metodami, které jsou v oboru známy, jako je např. transfekce, elektroporace, mikroinjekce, transdukce, buněčná fúze, precipitace s DEAE dextranem, kalciumfosfátová precipitace, lipofekce (lysosomová fúze), užití "genového děla" nebo transportérů DNA vektorů (viz např. Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu a Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263:14621-14624; Hartmut et al., patentová přihláška Kanady č. 2,012,311, podaná 15. března 1990).

Rozpustné formy proteiny mohou být získány odběrem kultivačního média nebo solubilizací inkluzních tělísek, např. působením detergentů, a pokud je to třeba ještě sonikací nebo jiným mechanickým procesem. Solubilizované nebo rozpustné proteiny se pak izolují různými postupy, které jsou odborníkům známy, jako je např. elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE), isoelektrická fokusace, dvojrozměrná gelová elektroforéza, různé typy chromatografie (např. chromatografie na iontoměniči, chromatografie na afinitní, imunoafinitní a rozdělovací koloně), centrifugace, diferenční solubilita, immnprecipitace a další standardní techniky purifikace proteinů.

Genová terapie a transgenní vektory

Jak již bylo diskutováno výše, předkládaný vynález se týká schopnosti proteinů Akt stimulovat expresi VEGF, proteinu, který indukuje angiogenezi. Tudíž se předkládaný vynález týká také genové terapie, která spočívá v tom, že se podává nukleová kyselina kódující protein Akt pacientovi trpícímu ischemickým onemocněním. K ischemickým onemocněním patří, jak již bylo uvedeno, cerebrovaskulární ischémie, renální ischémie, pulmonární ischémie, ischémie končetin, onemocnění periferních artérií, intermitentní klaudikace, ischémie myokardu, a ischemická, idiopatická nebo hypertrofická kardiomyopatie.

Nukleová kyselina kódující Akt, kde je to vhodné vložena do vektoru, a farmaceutické přípravky, které ji obsahují, se užívají k léčení ischemické tkáně. Užijí se pro přenos expresi genů *in vivo* v jakémkoliv typu ischemické tkáně, zejména v tkáni srdce. Navíc může být léčení cíleno podle konkrétní nemoci, která je léčena (transfer do určité tkáně je určen zejména výběrem vektoru a exprese zas výběrem určitého promotoru). Nukleové kyseliny nebo vektor podle vynálezu se u lidí nebo zvířat výhodně užívají k *in vivo* intracelulární proteinů Akt schopných stimulovat expresi VEGF proteinů. Předkládaný vynález tak umožňuje specificky, lokálně a účinně léčit ischémii.

Nukleová kyselina kódující protein Akt se podává samotná nebo v kombinaci s nukleovou kyselinou kódující angiogenní faktor. Ke známým angiogenním faktorům patří bazický a kyselý růstový faktor fibroblastů (bFGF a aFGF), FGF-5 (patent US 5,661,133), růstový faktor endotelových buněk (Pu et al., 1993, *Circulation* 88:208-2156), angiopoetin a VEGF (viz přehledné články Melillo et al., 1997 a Lewis et al., 1997). Bylo identifikováno několik forem VEGF, jako je VEGF121

(Patent US 5,219,739), VEGF165 (Patent US 5,332,672); VEGF189 (Patent US 5,240,848), VEGF206, VEGF-2 (WO 95/24473; WO 96/39515); VEGF-B (Patenty US 5,607,918 a 5,840,693), a VEGF-D (WO 97/12972). Nukleová kyselina kódující protein Akt se může podávat také v kombinaci s iontem přechodného kov jako je např. CoCl_2 , který, jak bylo ukázáno, zvyšuje expresi genu VEGF a stimuluje vaskularizaci (Patent US 5,480,975).

Jak již bylo diskutováno výše, "vektor" je jakkoliv prostředek pro přenos nukleových kyselin podle vynálezu do hostitelských buněk: Výhodné vektory jsou virové vektory, jako jsou např. retroviry, herpetické viry, adenoviry, a adeno-asociované viry. Takže gen kódující protein nebo polypeptid Akt je vnesen do buněk *in vivo*, *ex vivo* nebo *in vitro* užitím virového vektoru nebo přímým vnesením DNA.

Expresie ve vybrané (zaměřené) cílové tkáni může být způsobena zaměřením transgenního vektoru do specifických buněk, jako je tomu při užití virového vektoru nebo receptorového ligandu, nebo užitím tkáňově-specifického promotoru, nebo současným užitím obou způsobů.

Virové vektory obecně užívané pro *in vivo* zaměřování a terapeutické postupy jsou vektory založené na DNA a retrovirové vektory. Metody konstrukce a využití virových vektorů jsou odborníkům známy [viz např. Miller a Rosman, *BioTechniques* 7:980-990 (1992)]. Vhodně jsou virové vektory replikačně defektní, tzn. nejsou schopně autonomní replikace v cílové buňce. Obecně řečeno, genom replikačně defektních virových vektorů, které se užívají podle vynálezu, postrádá alespoň jeden z úseků, které jsou nezbytné pro replikaci viru v infikované buňce. Tyto úseky mohou být eliminovány (jako celek nebo částečně) tím, že se vyřadí jejich funkce, a to jakýmkoliv způsobem, který je odborníkům znám. K těmto způsobům patří úplné odstranění, substituce (jinou sekvencí,

zejména vloženou nukleovou kyselinou), částečná delece nebo adice jedné nebo více bází v úseku nezbytném pro replikaci. Tyto způsoby se provádějí *in vitro* (s izolovanou DNA) nebo *in situ*, s využitím metod genového inženýrství nebo působení mutagenních činidel. Výhodně si replikačně defektní viry ponechávají sekvenci ze svého genomu, která je nezbytná pro enkapsidaci (zabalení) virových částic.

K DNA virovým vektorům patří atenuované (oslabené) nebo defektní DNA viry, jako jsou (avšak výčet není omezující) např. virus herpes simplex (HSV), papillomavirus, virus Epstein-Barrové (EBV), adenovirus, adeno-asociovaný virus (AAV), virus vakcínie apod. Výhodné jsou takové defektní viry, které úplně nebo téměř úplně postrádají virové geny. Defektní virus není po vnesení do buňky replikačně kompetentní, tudíž nezpůsobuje produktivní virovou infekci. Použití defektních virových vektorů umožňuje podávání do buněk ve specifické lokalizované oblasti, a to bez obav, že by virus infikoval jiné buňky. Takže je možné specificky zaměřovat jen určitou tkáň. K příkladům konkrétních vektorů patří (aniž by výčet byl omezující) vektor defektního herpes viru 1 (HSV 1) [Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-330 (1991)], vektor defektního herpes viru postrádající gen pro glykoprotein L [Patentová publikace RD 371005 A], nebo další vektory defektních herpes virů [Mezinárodní patentová přihláška WO 94/21807, publikovaná 29. Zářím 1994; WO 92/05263, publikovaná 2. Dubna 1994]; atenuované adenovirové vektory jako je např. vektor popsáný v Stratford-Perricaudet et al. [*J. Clin. Invest.* 90:626-630 (1992)]; a také La Salle et al., *Science* 259:988-990 (1993)); a vektory defektních adeno-asociovaných adenovirů [Samulski et al., *J. Virol.* 61:3096-3101 (1987); Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996 (1988)].

Výhodně se při podávání *in vivo* užívá vhodná imunosupresivní léčba společně s virovým vektorem, např. adenovirovým vektorem, aby se zabránilo imuno-deaktivaci virového vektoru a transfekovaných buněk. Např. se podávají imunosupresivní cytokiny, jako je např. interleukin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ) nebo anti-CD4 protilátka, pro zablokování humorální nebo buněčné imunitní reakce na virový vektor [viz např. Wilson, *Nature Medicine* (1995)]. Navíc je vhodné užít virové vektory, které jsou upraveny tak, aby exprimovaly co nejmenší počet antigenů.

Přirozeně vynález předpokládá pro terapeutické použití podávání takového vektoru, který zajistí expresi terapeuticky účinného množství Akt. Termín "terapeuticky účinné množství" zde označuje množství, které je dostatečné k tomu, aby vedlo k významnému zlepšení klinicky významného ischemického onemocnění.

Adenovirové vektory

Ve výhodném provedení vynálezu je vektorem adenovirový vektor. Adenoviry jsou eukaryotické DNA viry, které mohou být modifikovány pro účinný přenos nukleových kyselin podle vynálezu do buněk různých typů. Existují různé sérotypy adenovirů. Z těchto sérotypů jsou podle vynálezu výhodné humánní adenoviry typu 2 a typu 5 (Ad 2 Ad 5) nebo adenoviry zvířecího původu (viz WO 94/26914). K adenovirům zvířecího původu, které lze užít pro realizaci předkládaného vynálezu, patří psí, kravské, myší (např. Mavl, Beard et al., *Virology* 75 (1990) 81), ovčích, prasečích, ptačích a opičích (např. SAV) adenoviry. Výhodné adenoviry zvířecího původu jsou psí adenoviry, výhodněji je to adenovirus CAV2 (např. kmen Manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800)).

Výhodně replikačně defektní adenovirové vektory podle vynálezu obsahují ITR, tj. enkapsidační sekvence, a požadovanou nukleovou kyselinu. Nejvýhodněji přinejmenším úsek E1 adenovirového vektoru je nefunkční. Delece v úseku E1 výhodně zahrnuje nukleotidy 455 až 3329 v sekvenci adenovirus Ad5 (PvuII-BgIII fragment) nebo 382 až 3446 (HinfII-Sau3A fragment). Další úseky mohou být také modifikovány, zejména úsek E3 (WO 95/02697), úsek E2 (WO 94/28938), úsek E4 (WO 94/28152, WO 94/12649 a WO 95/02697), nebo také kterýkoliv z pozdních genů L1 až L5.

Ve výhodném provedení vynálezu má adenovirový vektor delecí v úseku E1 (Ad 1.0). Příklady adenovirů s delecí v E1 jsou popsány např. v EP 185,573, který je zahrnut formou odkazu. V jiném výhodném provedení vynálezu má adenovirový vektor delecí v úsecích E1 a E4 (Ad 3.0). Příklady adenovirů s delecemi v E1/E4 jsou popsány v WO 95/02697 a WO 96/22378, které jsou zahrnuty formou odkazu. V ještě dalším výhodném provedení vynálezu má adenovirový vektor delecí v úseku E1, kam byl vložen úsek E4 a požadovaná nukleová kyselina (viz FR 94/13355, je vložen formou odkazu).

Replikačně defektní rekombinantní adenoviry podle vynálezu se připravují metodami, které jsou odborníkům známy, (viz Levrero et al., gen 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Zejména se připravují homologní rekombinací mezi adenovirem a plazmidem, který nese krmě jiného požadovanou sekvenci DNA. K homologní rekombinaci dojde po kotransfekci adenoviru a plazmidu do vhodné buněčné linie. Vhodná buněčná linie by měla především (i) být transformovatelná uvedenými elementy, a (ii) obsahovat sekvence schopné komplementovat část genomu replikačně defektního adenoviru, výhodně v integrované formě, aby se zabránilo vzniku rekombinace. K příkladům výhodných linií,

keré lze užít k realizaci předkládaného vynálezu, patří buněčná linie humánních embryonálních ledvinných buněk 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), které obsahují levostrannou část genomu adenoviru Ad5 (12 %) integrovanou ve svém genomu, a buněčné linie schopné komplementovat funkce E1 a E4, které byly popsány v mezinárodních patentových přihláškách WO 94/26914 a WO 95/02697. Rekombinantní adenoviry se izolují a purifikují standardními metodami užívanými v molekulární biologii, které jsou odborníkům dobře známy.

Vektory adeno-asociovaných virů

Adeno-asociované viry (AAV) jsou DNA viry relativně malé velikosti, které se integrují trvalým a místně specifickým způsobem do genomu buňky, kterou infikovaly. Jsou schopné infikovat široké spektrum buněk, aniž by ovlivnily jejich růst, morfologii nebo diferenciaci, a zjevně se nepodílejí na žádné nemoci u lidí. Genom AAV byl klonován, sekvencován a charakterizován. Je tvořen přibližně 4700 bázemi a obsahuje na každém konci úsek invertované terminální repetice ("inverted terminal repeat", ITR) velikosti 145 bází, který slouží jako replikační počátek viru. Zbytek virového genomu je rozdělen na dva esenciální úseky, které nesou enkapsidační funkci: levostranná část genomu, která obsahuje gen rep nutný pro replikaci viru a expresi virových genů; a pravostrannou část genomu, která obsahuje gen cap kódující proteiny virové kapsidy.

Použití vektorů odvozených z AAV pro přenos genů *in vitro* a *in vivo* bylo popsáno např. v dokumentech WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US 5,139,941 a EP 488 528. Tyto publikace popisují různé konstrukty odvozené z AAV, ve kterých byl deletován gen rep a/nebo cap a nahrazen požadovaným genem, a použití těchto konstruktů pro *in vitro* přenos požadovaného

genu (v buněčných kulturách) nebo pro in vivo přenos (přímo do organismu). Replikačně defektní rekombinantní AAV podle vynálezu se připravují kotransfekcí plazmidu obsahujícího požadovanou nukleovou kyselinu obklopenou dvěma sekvencemi invertované terminální repetice (ITR) z AAV, a plazmidu nesoucího enkapsidační geny AAV (rep a cap), do buněčné linie, která je infikována humánním pomocným virem ("helper virus") jako je např. adenovirus. Rekombinantní AAV jsou produkovány a purifikovány standardními postupy, které jsou odborníkům známy.

Předkládaný vynález se proto také týká rekombinantních virů odvozených AAV, jejichž genom obsahuje sekvence nukleové kyseliny kódující Akt3 obklopené ITR z AAV. Vynález se dále také týká plazmidů, které obsahují sekvence nukleové kyseliny kódující Akt3 obklopené dvěma ITR z AAV. Tyto plazmidy mohou být použity pro přenos sekvencí nukleových kyselin, přičemž plazmid může být podle potřeby vložen do liposomového vektoru (tzv. pseudovirus).

Retrovirové vektory

V jiném výhodném provedení vynálezu je gen vložen do retrovirového vektoru, např. jak byly popsány v následujících publikacích: Aerson et al., Patent US č. 5,399,346; Mann et al., 1983, Cell 33:153; Temin et al., Patent US č. 4,650,764; Temin et al., Patent US č. 4,980,289; Markowitz et al., 1988, J. Virol. 62:1120; Temin et al., Patent US č. 5,124,263; EP 453242, EP178220; Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689; Mezinárodní patentová přihláška WO 95/07358, publikovaná 16. Března 1995, Dougherly et al.; Kuo et al., 1993, Blood 82:845.

Retroviry jsou integrující se viry, které infikují dělicí se buňky. Retrovirový genom obsahuje dva úseky LTR,

enkapsidační sekvenci a tři kódující úseky (*gag*, *pol* a *env*). V rekombinantních retrovirových vektorech jsou geny *gag*, *pol* a *env* obecně řečeno deletovány, celé nebo jejich části, a jsou nahrazeny požadovanou heterologní sekvencí nukleové kyseliny. Tyto vektory mohou být konstruovány z různých typů retrovirů, jako je např. HIV, MoMuLV (myší virus Moloneyho leukémie), MSV (myší virus Moloneyho sarkomu), HaSV (virus Harveyho sarkomu) SNV (virus nekrotizující slezinu); RSV (virus Rousova sarkomu) a Friendův virus. Defektní retrovirové vektory byly např. popsány v WO 95/02697.

Pro konstrukci rekombinantních retrovirů obsahujících sekvence nukleových kyselin se připravují plazmidy, které obsahují LTR, enkapsidační sekvenci a kódující sekvenci. Takový konstrukt se pak užije k infekci tzv. sbalovací (pakážovací) buněčné linie, což jsou buňky schopné doplnit *in trans* retrovirové funkce chybějící v plazmidu. Obecně sbalovací buněčné jsou schopné exprimovat geny *gag*, *pol* a *env*. Sbalovací buněčné linie byly popsány v dosavadním stavu techniky, jedná se např. o buněčnou linii PA317 (viz US 4,861,719); buněčnou linii PsiCRIP (WO 90/02806) a buněčnou linii GP⁺envAm⁻12 (WO 89/07150). Navíc rekombinantní retrovirové vektory mohou obsahovat modifikace v úsecích LTR pro supresi transkripční aktivity a také extenzivní enkapsidační sekvence, které mohou obsahovat část genu *gag* (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Rekombinantní retrovirové vektory se purifikují standardními postupy, které jsou odborníkům známy.

Retrovirové vektory se konstruují tak, aby byly účinné jako infekční virové částice nebo aby prošly jediným cyklem transfekce. V prvním případě je virus modifikován tak, aby si uchoval všechny svoje geny s výjimkou genů zodpovědných za schopnost onkogenní transformace, a aby expimoval heterologní

gen. Neinfekční virové vektory se připravují narušením virového sbalovacího signálu, ale zachovávají si strukturní geny nutné pro sbalení společně vneseného viru, který obsahuje heterologní gen a sbalovací signál. Takže produkované virové částice již neprodukují další virové částice.

Cílený přenos genů byl popsán v mezinárodní patentové přihlášce WO 95/28494, publikované v říjnu 1995.

Nevirové vektory

Alternativně se vektory *in vivo* vnášejí do buněk tzv. lipofekcí. V uplynulém desetiletí se ve velké míře užívaly liposomy pro zabalení a transfekci nukleových kyselin *in vitro*. Syntetické kationtové lipidy připravené kvůli snížení problémů spojených s transfekcí zprostředkovanou liposomy byly užity pro přípravu liposomů pro *in vivo* transfekci gen kódující marker [Felgner; et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413-7417 (1987); Mackey, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8027-8031 (1988); Ulmer et al., *Science* 259:1745-1748 (1993)]. Použití kationtových lipidů podporuje obalení negativně nabitě nukleové kyseliny a také podporuje fúzi s negativně nabitou buněčnou membránou [Felgner a Ringold, *Science* 337:387-388 (1989)]. Zvláště výhodné lipidové sloučeniny a přípravky vhodné pro přenos nukleových kyselin byly popsány v patentových dokumentech WO 95/18863 a WO 96/17823 a patentu US 5,459,127. Použití lipofekce pro *in vivo* vnášení exogenních genů do specifických orgánů má jisté praktické výhody. Molekulární zaměřování liposomů do specifických buněk představuje jednu prospěšnou oblast využití. Je jasné, že cílená transfekce konkrétních buněk by byla zvláště výhodná ve tkáních s heterogenitou buněk jako je např. pankreas, játra, ledviny a mozek. Lipidy mohou být pro účel zaměřování chemicky konjugovány s dalšími molekulami (viz

Mackey, et. al., výše). Na lipidy mohou být chemicky navázány zaměřovací peptidy, např. hormony nebo neurotransmitery, a proteiny jako např. protilátky, nebo nepeptidové molekuly.

Další molekuly mohou být užitečné pro usnadnění *in vivo* transfekce nukleových kyselin, a sice např. kationtové oligopeptidy (např. WO 95/21931), peptidy odvozené z DNA vazebných proteinů (např. WO 96/25508), nebo kationtové polymery (např. WO 95/21931).

Je také možné vnášet vektory *in vivo* ve formě "nahé" plazmidové DNA (viz patenty US č. 5,693,622, 5,589,466 a 5,580,859). Vektory nahé DNA se vnášejí do hostitelských buněk některou z metod, které jsou odborníkům známy, jako je např. transfekce, elektroporace, mikroinjekce, transdukce, buněčná fúze, precipitace s DEAE-dextranem, precipitace s kalciumfosfátem, použití "genového děla" nebo transportérů DNA vektorů [např. Wu et al., *J. Biol. Chem.* 267:963-967 (1992); Wu a Wu, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624 (1988); Hartmut et al., patentová přihláška Kanady č. 2,012,311, podaná 15. Března 1990; Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730 (1991)]. Lze také využít přenos DNA zprostředkovaný receptory [Curiel et al., *Hum. gen Ther.* 3:147-154 (1992); Wu a Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)]. K výhodným vektorům pro přenos "nahé" DNA patří plazmid pCOR mající podmíněný replikační počátek (viz WO 97/10343), a minikruhový plazmid postrádající replikační počátek a markerový gen (WO 96/26270).

Farmaceutické přípravky a jejich podávání

Předkládaný vynález se týká farmaceutických přípravků. Tyto přípravky obsahují protein nebo polypeptid Akt nebo nukleovou kyselinu kódující protein nebo polypeptid Akt, jak byly definovány v předchozím textu, a farmaceuticky přijatelný

nosič nebo vehikulum. Přípravky podle vynálezu jsou zvláště výhodné k formulaci biologického materiálu pro genovou terapii. Ve výhodném provedení vynálezu přípravky obsahují nukleové kyseliny kódující humánní protein nebo polypeptid Akt.

Přípravek podle vynálezu obsahuje protein Akt nebo nukleovou kyselinu kódující protein Akt. A navíc může přípravek obsahovat nukleovou kyselinu kódující angiogenní faktor.

Ke známým angiogenním faktorům patří bazický a kyselý růstový faktor fibroblastů (bFGF a aFGF), FGF-5 (patent US 5,661,133), růstový faktor endotelových buněk (Pu et al., 1993, Circulation 88:208-2156), angiopoetin a VEGF (viz přehledné články Melillo et al., 1997 a Lewis et al., 1997). Bylo již identifikováno několik forem VEGF, jako je VEGF₁₂₁ (Patent US 5,219,739), VEGF₁₆₅ (Patent US 5,332,672); VEGF₁₈₉ (Patent US 5,240,848), VEGF₂₀₆, VEGF-2 (WO 95/24473; WO 96/39515); VEGF-B (Patenty US 5,607,918 a 5,840,693), a VEGF-D (WO 97/12972). Přípravek může dále obsahovat ion přechodného kov jako je např. CoCl₂, který, jak bylo ukázáno, zvyšuje expresi genu VEGF a stimuluje vaskularizaci (Patent US 5,480,975). Protein Akt nebo nukleová kyselina se mohou podávat také společně s vasodilatačním činidlem. K vhodným příkladům vasodilatačních činidel (vasodilatans) patří nitrovasodilatans (jako je např. nitroprussid a nitroglycerin), nespecifická vasodilatans (např. hydralizin a papaverin), agonisté adenosinového receptoru, činidla blokující kalciové kanály, alfa-blokátory (např. prazosin), endogenní vasodilatační peptidy nebo příbuzné peptidové analogy (např. substance P, CGRP), aktivátor K kanálů, inhibitory ACE nebo blokátory angiotensinového receptoru,

blokátory endothelinového receptoru nebo inhibitory ECE, a vasodilatační prostaglainy.

Jakýkoliv vektor podle vynálezu, ať již virový nebo nevirový, je výhodně při užití *in vivo* ve farmaceuticky přijatelném nosiči nebo vehikulu. Termín "farmaceuticky přijatelný" se týká sloučeniny nebo přípravku, které jsou fyziologicky tolerovány a nevyvolávají při podání člověku alergické nebo podobné nežádoucí reakce jako je např. podráždění žaludku nebo nevolnost. Termín "farmaceuticky přijatelný" výhodně znamená, že příslušná látka byla schválena odpovídajícími úřady, ať již státními nebo federálními, pro veterinární a zejména humánní farmaceutické použití a je uvedena v Lékopisu USA nebo jiném všeobecně uznávaném lékopise. Termín "nosič" označuje ředidla, adjuvans, excipienty nebo jiná vehikula, s nimiž je sloučenina podle vynálezu podávána. K takovým farmaceutickým nosičům patří např. sterilní kapalina jako je voda nebo olej, ať již minerálního, živočišného, rostlinného nebo syntetického původu, jako je např. podzemnicový olej, sojový olej, minerální olej, sezamový olej a další. Voda nebo vodné roztoky solí a vodný roztok dextrózy a glycerolu se výhodně užívají jako nosiče, zejména pro injikovatelné roztoky. Vodné farmaceutické nosiče jsou přehledně popsány v publikaci E.W. Martin, "Remington's Pharmaceutical Sciences".

Farmaceutické přípravky podle vynálezu jsou formulovány pro topické, perorální, parenterální, intranasální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární nebo i jiné podávání.

Výhodně farmaceutické přípravky podle vynálezu obsahují farmaceuticky přijatelná vehikula pro injekční přípravky. To jsou zejména sterilní, isotonické solné roztoky (fosforečnan a difosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý a

hořečnatý apod., nebo jejich směsi). Nebo jde výhodně o suché, výhodněji lyofylizované přípravky, které po přidání sterilní vody nebo fyziologického roztoku vytvoří injikovatelný přípravek.

Přípravky jsou výhodně ve sterilním, isotonickém solném roztoku (fosforečnan a difosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý a hořečnatý apod., nebo jejich směsi), nebo jsou to suché přípravky, výhodně lyofylizované přípravky, které po přidání, je-li to vhodné, sterilní vody nebo fyziologického roztoku vytvoří injikovatelný přípravek

Výhodné sterilní injikovatelné přípravky jsou roztoky nebo suspenze v netoxickém parenterálně přijatelném rozpouštědle nebo ředidle. K příkladům takových farmaceuticky přijatelných nosičů patří roztok soli, pufrovaný roztok soli, isotonický roztok soli (fosforečnan a difosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý a hořečnatý apod., nebo jejich směsi), Ringerův roztok, dextróza, voda, sterilní voda, glycerol, etanol a kombinace těchto látek. Jako rozpouštědlo nebo suspenzační médium se obvykle užívají 1,3-butanol a sterilní stálé oleje. Jakýkoliv nedráždivý stálý olej se může užít, včetně syntetických mono- nebo diglyceridů. Mastné kyseliny jako např. kyselina olejová, jsou také využitelné pro přípravu injikovatelných přípravků.

Dávky nukleových kyselin podle vynálezu, buďto samotných nebo vložených do vektoru, použité pro podávání, se musí upravit v závislosti na různých parametrech, jako je zejména způsob podávání, léčená nemoc, exprimovaný gen, očekávaná doba léčení apod. Obecně lze říci, že v případě rekombinantních virů podle vynálezu, jsou formulovány a podávány v dávkách obsahujících 10^4 až 10^{14} pfu, výhodně 10^6 až 10^{10} pfu. Termín "pfu" ("plaque forming unit") charakterizuje infekčnost (infekční sílu) roztoku viru a stanovuje se testem infekce

vhodné buněčné kultury, obecně po 48 hodinách jako počet plaků infikovaných buněk. Metody stanovení pfu titru viru jsou dobře popsány v odborné literatuře

Přípravky podle vynálezu se podávají parenterálně nebo transmukosálně, např. perorálně, nasálně nebo rektálně, nebo transdermálně. Výhodné je podávání parenterální, např. intravenózní injekcí, a také např. (aniž by výčet byl omezující) infraarteriální, intramuskulární, intradermální, subkutánní, intraperitoneální, intraventrikulární, a intrakraniální. Přípravky se mohou také podávat injekcí přímo do léčeného místa, zejména do srdce.

Výhodný způsob podávání do srdce je podávání injekcí přímo do srdce (viz patenty US 5,693,622 a 5,661,133). Srdce se přitom monitoruje některou ze známých zobrazovacích metod, jako je např. magnetická resonance nebo počítačová tomografie, a terapeutický přípravek se podává stereotaktickou injekcí např. do ischemických úseků myokardu.

Výhodně je exprese Akt omezena na kardiomyocyty, a sice užitím promotoru specifického pro srdce nebo vektoru se specifickým tropismem pro srdeční buňky.

Podávání do srdce se může také provádět pomocí katetru. Různé porézní, balónkové, dvojité balónkové nebo hydrogelové katetry byly popsány např. v patentech US 5,851,521, 5,652,225, 5,328,470, 5,698,531, 5,707,969, 5,830,879 a 5,674,192.

V ještě dalším výhodném provedení vynálezu se farmaceutický přípravek obsahující polypeptid Akt nebo nukleovou kyselinu kódující polypeptid Akt podává pomocí terapeutického systému s řízeným uvolňováním léčiva. Např. nukleová kyselina nebo polypeptid se podává pomocí intravenózní infúze, implantovatelné osmotické pumpy, transdermální náplasti, liposomů apod. V jednom výhodném

provedení vynálezu je užita pumpa [viz Langer, výše; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al.; *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)]. V jiném výhodném provedení vynálezu se užívá polymerní materiál [viz *Medical Applications of Controlled Release*, Langer a Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug product Design a Performance*, Smolen a Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger a Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); viz také Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)]. V ještě dalším výhodném provedení vynálezu je systém s řízeným uvolňováním umístěn do blízkosti terapeutického cíle, tj. např. srdce, aplikují se pak jen části dávky, než jaká by byla potřeba při systémovém podávání [viz např. Goodson, in *Medical Applications Controllled Release*, viz výše, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]. Další systémy s řízeným uvolňováním léčiva jsou uvedeny v přehledné publikaci Langerera [*Science* 249:1527-1533 (1990)].

Takže přípravky podle vynálezu se podávají intravenózně, intraarteriálně, intraperitoneálně, intramuskulárně nebo subkutánně. Alternativně jsou přípravky formulovány pro nasální nebo perorální podávání. Konstantní přívod biologického materiálu je možné zajistit poskytnutím terapeuticky účinné dávky (tj. dávky, která způsobí metabolickou změnu u pacienta) v potřebných intervalech, např. jedenkrát denně, každých 12 hodin apod. Tyto parametry závisí na závažnosti onemocnění a dalších faktorech jako je např. úprava diety, pohlaví, hmotnost a věk pacienta a další faktorech, které odborník snadno určí.

Předkládaný vynález se týká také způsobů inhibice angiogeneze u pacientů trpících nádorovým onemocněním tím, že

se inhibuje hladina Akt a tím se inhibuje tvorba VEGF. Hladina Akt se může snížit vnesením Akt "antisense" nukleových kyselin do buněk pacienta v podmínkách, kdy tyto "antisense" nukleové kyseliny hybridizují v buňkách s Akt mRNA. Hladina Akt může být také snížena vnesením intracelulárního vazebného proteinu, jako je např. jednořetězcová protilátka Fv (scFv), který se specificky váže na Akt v buňkách pacienta v množství dostatečném k tomu, aby se navázal na Akt a inaktivoval ho. V jiném provedení vynálezu je aktivita Akt snížena tím, že se podává nukleová kyselina kódující dominantní negativní formu Akt. Výhodně se "antisense" nukleová kyselina, intracelulární vazebný protein nebo nukleová kyselina kódující intracelulární vazebný protein nebo dominantní negativní formu Akt podávají přímo do buněk nádoru.

Antisense sekvence podle vynálezu je komplementární k sekvenci kódující protein Akt a tlumí nebo blokuje expresi proteinu Akt. Ve výhodném provedení vynálezu je to antisense polynukleotidová molekula. Příprava a použití antisense polynukleotidů, DNA kódující molekuly antisense RNA a použití antisense oligonukleotidů bylo popsáno např. v mezinárodní přihlášce WO 92/15680, která je vložena formou odkazu.

Antisense nukleové kyseliny podle vynálezu jsou výhodně RNA schopně specificky hybridizovat s celou nebo částí DNA sekvence kódující protein Akt, nebo s odpovídající messenger RNA. Antisense sekvence podle předkládaného vynálezu se odvodí ze sekvence DNA, jejíž exprese v buňce vede k tvorbě RNA komplementární k celé nebo části humánní Akt mRNA. Tyto antisense sekvence se připraví expresí celé nebo části sekvence kódující protein Akt v opačné orientaci (EP 140 308). Jakákoliv délka antisense sekvence je vhodná pro realizaci vynálezu pokud je schopná tlumit nebo blokovat expresi Akt. Výhodně jsou antisense sekvence dlouhé alespoň 20 nukleotidů.

V jiném aspektu tohoto výhodného provedení vynálezu nukleová kyselina kóduje antisense RNA molekuly. V tomto výhodném provedení je nukleová kyselina operativně spojena se signály, které umožňují expresi sekvence nukleové kyseliny, a je vnesena do buňky výhodně jako rekombinantní vektor, který buď exprimovat antisense nukleovou kyselinu jakmile vstoupí do buňky. Příkladem vhodných vektorů jsou plazmidy, adenoviry, adeno-asociované viry, retroviry, a herpetické viry.

Další výhodné provedení vynálezu se týká specifické inhibice angiogeneze prostřednictvím inhibice aktivity Akt, kdy se exprimuje sekvence nukleové kyseliny kódující intracelulární vazebný protein schopný v transfekované buňce selektivní interakce s Akt. Dokumenty WO 94/29446 a WO 94/02610 (které jsou celé zahrnuty formou odkazu), popisují transfekci buněk geny kódujícími intracelulární vazebný protein. K intracelulárním vazebným proteinům patří jakýkoliv protein schopný selektivní interakce nebo vazby s proteinem Akt v buňce, ve které je exprimován, a tím neutralizovat funkci navázaného proteinu Akt. Výhodně je intracelulární vazebný protein protilátka nebo fragment protilátky.

Dokument WO 94/02610 popisuje přípravu protilátek a identifikaci nukleových kyselin kódujících určitou protilátku. Užitím proteinu Akt nebo jeho fragmentu se připraví monoklonální protilátka specifická k proteinu metodami, které jsou odborníkům známy. Pak se připraví způsoby podle vynálezu vektor obsahující nukleovou kyselinu kódující intracelulární vazebný protein nebo jeho část, a schopný exprese v hostitelské buňce. Vhodné vektory a způsoby přenosu nukleové kyseliny kódující intracelulární vazebný protein do buněk obsahujících Akt jsou stejné jaké byly popsány v předchozím textu. Sekvence nukleové kyseliny kódující intracelulární Akt vazebný protein mohou navíc obsahovat sekvenci kódující

lokalizační signál pro cílení intracelulárního vazebného proteinu do místa v buňce, kde se vyskytuje Akt a/nebo sekvenci zajišťující lokalizaci intracelulárního vazebného proteinu v plazmatické membráně. Lokalizační signál nebo inzerční sekvence mohou být umístěny kdekoliv na intracelulárním vazebném proteinu, pokud to nenarušuje vazbu s Akt. Příklady lokalizačních signálů jsou uvedeny např. v WO 94/02610.

V dalším výhodném provedení vynálezu je Akt aktivita snížena podáváním nukleové kyseliny kódující dominantní negativní formu Akt. Příklady dominantních negativních forem Akt byly popsány např. v Fujio et al., 1999 (J. Biol. Chem. 274(23):16349-16354), Wang et al., 1999 (Mol. Cell Biol. 19(6): 4008-4018), Jiang et al., 1999 (Proc. Natl: Acad. Sci. 96(5): 2077-2081), a Gerber et al., 1998 (J. Biol. Chem. 273(46): 30336-30343).

Výhodným organismem, kterému se podává biologický materiál podle vynálezu, je člověk, ale může to být i jakékoliv zvíře. Farmaceutické přípravky podle vynálezu jsou určeny také pro veterinární použití, zejména pro podávání savci, jako jsou (aniž by výčet byl omezující) např. domácí zvířata jako kočka nebo pes, hospodářská zvířata jako kráva, kůň, koza, ovce, prase, divoká zvířata (ať již volně v přírodě nebo držaná v zoologické zahradě), laboratorní zvířata jako myš, potkan, králík, koza, ovce, prase, pes, kočka a další, ale i pro podávání ptákům, jako např. kuřata, krocani, zpěvní ptáci a další.

Předkládaný vynález je dále podrobněji vysvětlen pomocí příkladů. Tyto příklady mají ilustrativní funkci a vynález nijak neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Obecné metody molekulární biologie použité v příkladech

Metody tradičně užívané v molekulární biologii, jako je např. preparativní extrakce plazmidové DNA, centrifugace plazmidové DNA cesiumchloridovém gradientu, elektroforéza na agarózovém nebo akrylamidovém gelu, purifikace fragmentů DNA elektroelucí, extrakce proteinů užitím fenolu nebo fenol/chloroformu, ethanolová nebo isopropanolová precipitace DNA v solném roztoku, transformace *Escherichia coli* a další jsou odborníkům dobře známy a jsou popsány v odborné literatuře [viz např. Maniatis T. et al., "Molecular Klonování, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; (2nd Ed. 1989); Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

K obvyklým klonovacím vektorům patří plazmidy typu pBR322 pUC a fágy série M13, které jsou běžně komerčně dostupné (např. Besda Research Laboratories).

Pro ligaci se fragmenty DNA separovaly podle velikosti elektroforézou na agarózovém nebo akrylamidovém gelu, extrahovaly fenolem nebo směsí fenol/chloroform, precipitovaly ethanolem a inkubovaly v přítomnosti fágové T4 DNA ligázy (Biolabs) podle doporučení výrobce.

Zaplnění přečnivajících 5'-konců se provedlo pomocí Klenowova fragmentu *E. coli* DNA polymerázy I (Biolabs) podle doporučení výrobce.

Odstranění přečnivajících 3'-konců se provedlo v přítomnosti fágové T4 DNA polymerázy (Biolabs) podle doporučení výrobce, odstranění přečnivajících 5'-konců se provedlo pomocí řízeného působení S1 nukleázy.

In vitro mutageneze cílená pomocí syntetických oligonukleotidů byla provedena postupem, který vyvinuli Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] a užitím soupravy od firmy Amersham.

Enzymatická amplifikace fragmentů DNA v PCR byla provedena podle publikovaného postupu (Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. a Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] užitím "DNA termální cykleru" (Perkin Elmer Cetus) podle instrukcí výrobce.

Verifikace nukleotidových sekvencí byla provedena sekvencováním podle Sangera et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] užitím soupravy od firmy Amersham.

Plazmidové DNAs byly purifikovány užitím soupravy Plazmid Purification System od firmy Qiagen podle instrukcí výrobce.

Příklad 1

Klonování humánního Akt3

Tento příklad popisuje klonování nukleové kyseliny Akt3 protein.

Příklad 1.1: Screening cDNA knihovny na Akt3

Prohledávání databází odhalilo, že jeden humánní cDNA klon obsahuje úsek humánní cDNA sekvence, který je homologní, ale odlišný od humánní Akt1 a Akt2. Pro izolaci úplné kódující sekvence této dosud neznámé humánní isoformy Akt (označena jako humánní Akt3) byl proveden screening humánní cDNA knihovny srdeční tkáně pomocí cDNA sondy odpovídající 5'-UTR úseku a kódujícímu úseku N-konce humánního Akt3.

Humánní cDNA klon (ID# 479072) byl zakoupen od firmy Genome System Inc. Jeden fragment této DNA, která obsahuje část 5'-UTR (netranslatovaný úsek) a část 5'-kódující sekvence humánního Akt3, byl amplifikován v polymerázové řetězové reakci (PCR) užitím následujících oligonukleotidových primerů:

AKT3-5'UTR-F3 (5'-TCC AAA CCC TAA AGC TGA TAT CAC-3'; sekvence id. č. 3) a

AKT3-C-R1 (5'-CCT GGA TAG CTT CTG TCC ATT C-3'; sekvence id. č. 4). Sonda cDNA byla značena pomocí [α -P32]dCTP užitím značící soupravy Random Primer DNA labeling kit (Boehringer Mannheim) podle instrukcí výrobce. Sonda byla purifikována užitím chromatografické centrifugační kolony od firmy Bio-Rad podle instrukcí výrobce.

Více než jeden milion fágových klonů bylo na počátku užito při screening cDNA knihovny (Clontech, katalog. č. HL5027t). Hostitelské buňky Xl1-B byly inokulovány ve 37 °C přes noc v LB médiu (přidán 20 mg/ml tetracyklin, 0,2% maltóza a 10 mM MgCl₂). Fágová infekce a otisk na membránu byly provedeny postupem, jak je popsán v příručce Maniatis; 1989. Membrány byly denaturovány, renaturovány a zapečeny, pak prehybridizovány v hybridizačním roztoku 4 hodiny při 65 °C. Denaturovaná forma sondy značené P32 (10 minut tepelné denaturace) byla přidána pro hybridizaci přes noc. Po hybridizaci byly membrány postupně oplachovány v 2x SSC/0,1% SDS, 1xSSC/0,1%SDS a 0,5xSSC/0,1% SDS při 65°C. Membrány byly usušeny na vzduchu a exponovány na rentgenové filmy Kodak. Po tomto primárním screeningu byly pozitivní klony selektovány v sekundárním a terciárním screeningu. Výsledné pozitivní fágy byly purifikovány, a fágová DNA byla konvertována na plazmidovou DNA užitím hostitelských buněk BM25.8-25 (Boehringer Mannheim) podle instrukcí výrobce.

Dva pozitivní klony byly vybrány pro úplné sekvencování a další charakterizaci. Jeden z těchto klonů (klon #9) obsahuje část 5'-UTR a N-koncovou kódující sekvenci (aa 1 až 127) humánního Akt3. Druhý klon (klon #1) obsahuje většinu humánní Akt3 sekvence (aa 15 až C-konec) a 3'-UTR. Úplná cDNA (plné délky) sekvence byla vytvořena fúzí těchto dvou částečných sekvencí. Úplná sekvence kódující humánní Akt3 je zde uvedena jako sekvence id. č. 1. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena jako sekvence id. č. 2. Akt3 je kratší než Akt1 a Akt1, a mezi Akt3 a Akt1 nebo Akt1 a C-koncem molekuly není žádná významná homologie. Zejména posledních 14 aminokyselin v C-koncovém úseku humánního Akt-3 se odlišuje od aminokyselin přítomných v humánním Akt1 a Akt1.

Příklad 2

Konstrukce expresních plazmidů Akt3

Tento příklad popisuje konstrukci expresního plazmidu pro aktivovaný Akt3. První dva částečné cDNA klony (klon #1 a klon #9, popsané výše) byly fúzovány a byla tak získána úplná kódující sekvence AKT3. DNA obsahující humánní Src myristylační sekvenci byla fúzována k N-konci úplné Akt3 sekvence. Sekvence značky HA-tag byla fúzována k C-konci úplné Akt3 sekvence (pro detekci exprese). Tato chimérická sekvence MyrAkt3HA byla vložena pod kontrolu promotoru CMV. Celý konstrukt byl nazván CMV6-MyrAkt3HA (Obr. 1A).

Příklad 2.1: CMV6-MyrAkt3HA

Tento příklad popisuje konstrukci plazmidů schopných exprimovat Akt3 a konstitutivně aktivní formu humánního Akt3.

Úplná kódující sekvence Akt3 byla získána PCR amplifikací klonu #1 užitím následujících primerů:

hAKT3c19-PCRS(F): (5'- ATG AGC GAT GTT ACC ATT GTG AAA GAA GGT TGG GTT CAG AAG AGG GGA GAA TAT ATA AAA AAC TGG AGG CCA AG - 3'; sekvence id. č. 5), který obsahuje kódující sekvence prvních 24 aminokyselin Akt3, a

hAKT3c11-PCR3(R): (5' - TTA TTT TTT CCA GGT ACC CAG CAT GCC - 3'; sekvence id. č. 6).

Pro vytvoření konstitutivně aktivní formy Akt3 byla úplná kódující sekvence Akt3 amplifikována v PCR s následujícími primery:

MyrAKT3Ha-F1 (5' - GCG CGC GAA TTC CCA CCA TGG GTA GCA ACA AGA GCA AGC CCA AGG ATG CCA GCC AGC GGC GCC GCA GCA GCG ATG TTA CCA TTG TGA AAG - 3'; sekvence id. č. 7), který obsahuje Kozakovu sekvenci (CCACC); myristylační sekvenci z humánního src (podtržena) a prvních 8 aminokyselin z humánního Akt3 (tučně), a

MyrAKT3Ha-R (5' - GCG CGC GGG CCC TTA GGC GTA GTC GGG GAC GTC GTA CGG GTA TTT TTT CCA GTT ACC CAG CAT GCC - 3'; sekvence id. č. 8), který obsahuje kódující sekvenci značky HA-tag (tučně). PCR produkt byl naštěpen EcoRI/ApaI a subklonován do EcoRI/ApaI míst plazmidu pCDNA3.1, čímž byl připraven pCDNA3-Myr-Akt-HA. Kódující sekvence MyrAktHA byla také PCR amplifikována a subklonována do KpnI/EcoRI míst vektoru CMV6. Pro tuto PCR reakci byly použity následující primery:

CMV6-AKT3cat-F (5' - CGG GGT ACC ACC ATG GGT AGC AAC AAG AGC AAG CCC AAG GAT GCC AGC CAG - 3'; sekvence id. č. 9), a

CMV6-AKT3cat-R (5' - CCG GAA TTC TTA GGC GTA GTC GGG GAC GTC - 3'; sekvence id. č. 10). Plazmid byl verifikován sekvencováním

Příklad 2.2: Exprese humánního AKT3

Tento příklad popisuje expresi humánního AKT3 ve tkáňové kultuře. Buňky HEK293 a COS-7 byly kultivovány v médiu DME obsahujícím 10% fetální hovězí sérum (FBS). Buňky byly kultivovány při 37° C v inkubátoru s 5% CO₂.

Plazmid CMV6-[MyrAkt3HA byl transientně transfekován do buněk HEK293. Jako kontrola byly transfekovány buňky HEK293 vektorem CMV6. Jeden den před transfekcí byly buňky naředěny na hustotu 0,2 x 10⁶/cm³. Transfekce byla provedena s pomocí LipofectAmine (Gibco BRL) podle instrukcí výrobce. Stručně shrnuto, DNA byla rozmíchána v médiu DME (bez séra a antibiotik). Pak byl přidán přípravek LipofectAmine (DNA:LipofectAmine = 1mg : 4ml). Po krátkém promíchání byla směs DNA/LipofectAmine ponechána 30 minut při teplotě místnosti. Buňky pak byly opláchnuty v 1xPBS, a exponovány směsí DNA/LipofectAmine po 3 hodiny. Po transfekci byly buňky dvakrát opláchnuty v 1xPBS a přeneseny do média DMEM-10% FBS.

24 hodin po transfekci byly buňky lyzovány. Lyzáty byly imunoprecipitovány anti-HA protilátkami, a kinázová aktivita imunoprecipitátů byla stanovena pomocí peptidů získaných z GSK-3, "downstream" cíle pro Akt1 (Cross et al. 1995). *In vitro* kinázový test Akt byl proveden podle Cross et al. (Cross et al, 1995) 24 hodin po transfekci. Buňky byly opláchnuty dvakrát v roztoku 1 x PBS a lyzovány v lyzovacím pufru (50mM Tris/HCl, pH 7,4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,5mM Na₃VO₄, 0,1% β-merkapt ethanol, 1% Triton X-100, 50mM NaF, 5mM hydrogenufosforečnan sodný, 10mM glycerofosfát sodný, 0,5mM PMSF, 2μg/ml aprotinin, 2mg/ml leupeptin, a 1mM mikrocytin). Nerozpustné materiály byly odstraněny centrifugací ve 4°C po 1 minutu. Buněčné lyzáty byly inkubovány s polyklonální anti-HA protilátkou (BABC0) 1 hodinu ve 4° C na rotační plošině.

Perličky agarózy a Proteinem A byly přidány k lyzátům na 1 hodinu. Po imunoprecipitaci byly pelety opláchnuty třikrát promývacím roztokem A (lyzovací pufr doplněný na 0,5M NaCl), třikrát promývacím roztokem B (50mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,03% Brij35, 0,1mM EGTA a 0,1% β -merkaptoethanol), a třikrát v kinázovém pufru (20mM MOPS, pH 7,2, 25mM β -glycerofosfát sodný pH 7,0, 1mM Na_3VO_4 , 1mM DTT). Po opláchnutí byly pelety resuspendovány ve 40 μl kinázové reakční směsi [100mM ATP, 0,1 mg/ml substrátový peptid Crosstide (ITBI), 20mM MgCl_2 , 10mM inhibitor proteinkinázy A/PKI (UBI), a 10mCi (g-32P)-ATP]. Reakce pak probíhala ve 30° C po 30 minut. Po dokončení reakce byla směs krátce centrifugována a 30 μl supernatantu bylo naneseno na kruhy nitrocelulóзовého papíru (Gibco BRL). Nitrocelulóзовé papíry pak byly opláchnuty třikrát 180mM kyselinou fosforečnou (každé oplachování 10 minut) a dvakrát v acetonu (každé oplachování 2 minuty). Radioaktivita zachycená na papíru pak byla změřena scintilačním zařízením. Kinázová aktivita přítomná ve vzorcích transfekovaných CMV6[MyrAkt3HA] byla 20 x vyšší než aktivita přítomná v bunkách transfekovaných kontrolním vektorem CMV6, která byla podobná bazální aktivitě v tomto testu (obr. 1B).

Pro testování exprese MyrAkt3HA v transfekovaných buňkách byly lyzáty připravené z transfekovaných buněk imunoblotovány s anti-HA protilátkou. Buněčné lyzáty byly připraveny stejně jak bylo popsáno výše, a rozděleny elektroforézou na SDS polyakrylamidovém gelu. Proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовé membrány, které byly přes noc inkubovány v blokovacím roztoku (1xPBS, 0,2% Tween 20, 5% sušené odtučněné mléko) ve 4° C. Membrány pak byla inkubovány s myší monoklonální anti-HA protilátkou (ředění 1:500 v blokovacím roztoku) po 3 hodiny při teplotě místnosti. Po opláchnutí třikrát v blokovacím roztoku (po 15 minutách),

membrány byly inkubovány s anti-myší IgG protilátkou konjugovanou s HRP (ředění 1:1000 v blokovacím roztoku) po 1 hodinu při teplotě místnosti. Po opláchnutí třikrát v blokovacím roztoku (po 10 minutách) a třikrát v 1xPBS s 0,2% Tween 20, byly membrány vyvíjeny v systému ECL (PIERCE) podle instrukcí výrobce a exponovány na rentgenové filmy Kodak. Jak je ukázáno na obr. 1C, silný pás přibližné velikosti 60 kD (obdobná velikosti MyrAkt1HA, data neuveden) je přítomen ve vzorcích transfekovaných CMV6-[MyrAkt3HA], avšak chybí ve vzorcích transfekovaných CMV6 (negativní kontrola). Závěrem údaje ukazují, že transfekce CMV6-[MyrAkt3HA] vede k funkční aktivitě Akt.

Příklad 3

Stimulace exprese VEGF

Příklad 3.1: Buněčné kultury

HeLa buňky (ATCC) byly kultivovány v médiu DME s 10% fetálním hovězím sérem (FBS). Buňky byly kultivovány ve 37° C, v inkubátoru s 5% CO₂. Humánní buňky kosterního svalstva (HSKMC) a humánní buňky hladkého svalstva koronárních cév (HCSMC) byly zakoupeny od firmy Clonetics Corporation.

Kardiomyocyty z novorozených potkanů byly izolovány užitím soupravy Myocyte Isolation System (Worthington Biochemical Co.). Stručně shrnuto, srdce odebraná z 1- až 3-denních potkanů byla rozdercena, naštěpena trypsinem (ve výsledné koncentraci 50 µg/ml) inkubací přes noc ve 4° C, pak následovala digesce kolagenázou ve 37° C po 45 minut. Po tritraci byla směs filtrována buněčné síto. Po krátké centrifugaci byly buňky resuspendovány v nanášecím médiu

(DMEM:M199 = 4:1, 10% tepelně inaktivované koňské sérum, 5% fetální hovězí sérum, 1x suplement inzulin-transferrin-selenium (Gibco BRL) a 1xGentamicin, 100 µg/ml BrdU) na hustotu $0,3 \times 10^6$ buněk/ml). Po 24 hodinách byly přeneseny na slabě mitogenní médium (DMEM:M199 = 4:1, 1xGentamicin).

Příklad 3.2: Transfekce

Jeden den před transfekcí byly buňky naředěny na hustotu $0,2 \times 10^6$ cells/cm². Transfekce byla provedena užitím LipofectAminu (Gibco BRL) podle instrukcí výrobce. Stručně, požadované DNA byly rozmíchány v médiu DME (bez séra a antibiotik) a byl přidán LipofectAmin (DNA:LipofectAmine = 1 µg : 4 µl). Po krátkém vortexování byla směs DNA/LipofectAmin ponechána 30 minut při teplotě místnosti. Buňky byly jedenkrát opláchnuty 1xPBS, a pak exponovány ve směsi DNA/LipofectAmine po 3 hodiny. Po transfekci byly buňky opláchnuty dvakrát v 1xPBS a přeneseny do média DMEM-10%FBS.

3.3 Konstrukce rekombinantních adenovirů

Rekombinantní adenovirus obsahující konstitutivně aktivní humánní Akt3 (hAkt3cak) byl konstruován jak popsali Crouzet et al. (1997) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, 1414-1419). cDNA pro konstitutivně aktivní humánní Akt3 (obsahující myristylační sekvenci z c-src na N-konci) byla subklonována do pXL2996 (Tento plazmid byl nazván pXL2996-hAkt3cak). Expresní kazeta pro hAkt3cak z pXL2996-hAkt3cak byla subklonována do kyvadlového vektoru pXL3474. Tento kyvadlový plazmid pro hAkt3cak a DNA plazmid pro adenovirovou β-gal (pXL3215) byly elektroporací vneseny do bakteriálních buněk JM83.

Po proběhnutí dvojité homologní rekombinace byla plazmidová DNA adenovirus-hAkt3cak purifikována na gradientu CsCl. Tato DNA pak byla linearizována štěpením restriktázou PacI a pak transfekována do buněk 293 užitím LipofectAminu.

Tři týdny po transfekci byl rekombinantní adenovirus obsahující hAkt3cak (AV-hAKT3cak) izolován a amplifikován v buňkách 293. Virový titr byl stanoven testem cytoplasmatické toxicity (CPA).

Rekombinantní adenovirus obsahující konstitutivně aktivní myší akt1 (AV-mAkt1cak) připravený standardním postupem (popsaným výše) poskytl Dr. Kenneth Walsh (Boston, MA).

Před virovou infekcí byl virus naředěn v médiu pro tkáňovou kulturu na koncentraci 3×10^7 /ml). 1 ml tohoto média obsahujícího virus byl přidán na 6-jamkovou kultivační destičku a 8 ml tohoto média obsahujícího bylo přidáno na každou 100-mm kultivační misku. Po infekci přes noc byl nadbytečný virus spláchnut promytím v 1xPBS a buňky byly přeneseny na normální médium.

Příklad 3.4: Test ELISA

Humánní VEGF ELISA test byl proveden pomocí komerčně dostupné detekční soupravy VEGF-165 ELISA (od firmy R&D Systems, Inc.; cat. DVE00). Kultivační médium bylo odebráno a krátce centrifugováno: vzorky pak byly nanесeny do příslušné jamky po přidání ředidla RD1W. Destičky pak byly inkubovány dvě hodiny při teplotě místnosti. Každá jamka pak byla propláchnuta třikrát oplachovacím pufrem. Pak byl do každé jamky nanесen konjugát anti-VEGF na dvě hodiny při teplotě místnosti. Pak byly opakovány stejné proplachovací kroky jaké byly zmíněny dříve. Byl přidán substrát a destičky byly inkubovány 20 minut při teplotě místnosti. Optická denzita byla měřena čtečkou mikrotitračních destiček při nastavení na 450 nm, a korekce vlnové délky byla nastavena na 540 nm.

Příklad 3.5: Izolace RNA a Northern blot

Celková RNA byla izolována pomocí soupravy reagensů Ultraspec pro izolaci RNA (Biotecx). Stručně shrnuto, po 1 ml roztoku Ultraspec bylo přidáno k buňkám na 100mm miskách pro tkáňové kultury. Pak byly buňky seškrábnuty z misek a přeneseny do Eppendorfových zkumavek zbavených RNázy. Po přidání 200 μ l chloroformu byla směs vortexována a centrifugována ve 4° C. Vodný roztok (tj. horní vrstva) byl odebrán a RNA byla precipitována stejným objemem isopropanolu. Po opláchnutí 70% ethanolem a osušení byla RNA rozpuštěna ve vodě ošetřené DEPC. 20 μ g celkové RNA bylo separováno na 1% agarózovém gelu. Po elektroforéze a přenosu na membránu ("blotování") byla RNA na membráně zesítna ozářením UV světlem. Hybridizace byla provedena se sondou značenou P32, která byla připravena značením pomocí soupravy pro značení DNA s náhodnými primery Random Primer DNA labeling kit (Boehringer Mannheim). Po hybridizaci v 65°C byla membrána postupně promyta 2xSSC/0,1%SDS a 0,1xSSC/0,1%SDS, a nakonec přes noc exponována na rentgenový film Kodak.

Příklad 3.6: Akt zvyšuje expresi VEGF v transfekovaných buňkách

HeLa buňky byly transfekovány expresním plazmidem pro aktivovaný myší Akt1 (CMV6-mAkt1cak), aktivovaný humánní Akt3 (CMV6-hAkt3) nebo vektorem CMV6 (jako kontrola). Po transfekci byly buňky přeneseny na slabě mitogenní médium (DMEM s 0,5% fetálním hovězím sérem). Po 16 hodinách bylo médium z transfekovaných buněk odebráno a testováno v testu ELISA pro humánní VEGF-165. Jak je ukázáno na obr. 2, hladina VEGF v médiu buněk transfekovaných Akt1 nebo Akt3 byla významně vyšší než hladina v médiu z kontrolních buněk transfekovaných

vektorem CMV6. Tyto údaje demonstrují, že konstitutivně aktivní Akt1 nebo Akt3 indukuje expresi VEGF-165 v buňkách HELA.

Příklad 3.7: AV-mAktlcak a AV-hAkt3cak indukují expresi VEGF v humánních buňkách kosterního svalstva a hladkého svalstva koronární artérie

Humánní buňky kosterního svalstva (HSKMC) a humánní buňky hladkého srdečního svalstva (HCASMC) byly infikovány rekombinantními adenoviry exprimujícími buďto myší Akt1 (AV-mAktlcak) nebo konstitutivně aktivní humánní Akt3 (AV-hAkt3cak). Jako kontrola byly buňky infikovány AV-GFP, který exprimuje zelený fluorescenční protein. Jeden den po infekci bylo odebráno kultivační médium a hladina VEGF v médiu byla stanovena testem ELISA. Jak je ukázáno na obr. 3A, jak AV-mAktlcak tak AV-hAkt3cak významně zvýšily expresi VEGF-165 HSKMC, zatímco infekce AV-GFP měla jen neznatelný nebo žádný účinek. A dále, jak je ukázáno na obr. 3B, AV-mAkt1 a AV-hAkt3cak indukoval VEGF-165 v humánních buňkách hladkého svalstva koronární artérie (HCASMCs).

Pro vyhodnocení účinku Akt na VEGF mRNA, byly buňky HCASMC infikovány adenovirem exprimujícím mAktlcak, hAkt3cak, nebo GFP. Jako pozitivní kontrola byly buňky přeneseny na hypoxické médium na 24 hodin. Celková RNA byla izolována a byla analyzována Northern hybridizací na přítomnost VEGF. Jak je ukázáno na obr. 3C, hypoxie významně indukovala expresi VEGF. Navíc AV-mAktlcak a AV-hAkt3cak, avšak nikoliv AV-GFP, významně zvýšily hladinu VEGF mRNA. Tato data ukazují, že Akt zvyšuje expresi VEGF zvýšením hladiny mRNA.

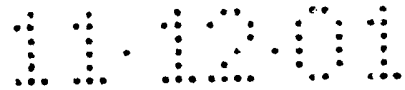
Příklad 3.8: AV-mAktlcak a AV-hAkt3cak indukují expresi VEGF v kardiomyocytech

Kardiomyocyty z novorozených potkanů byly infikovány adenovirem kódujícím mAktlcak (AVmAktlcak), myší Aktl divokého typu (AV-mAktlwt), hAkt3cak (AV-hAkt3cak) nebo AV-GFP (jako kontrola). Jako pozitivní kontrola byly neinfikované buňky inkubovány v hypoxických podmínkách po 24 hodin. Jeden den po infekci byla z buněk izolována RNA a exprese VEGF byla detekována Northern blot analýzou. Jak je ukázáno na obr. 3, AV-mAktlcak nebo AV-hAkt3cak významně zvýšily expresi VEGF v kardiomyocytech, zatímco AV-GFP nebo AV-mAktlwt měly jen nepatrný nebo žádný účinek na expresi VEGF-165.

Předmět vynálezu není nijak omezen zde uvedenými specifickými výhodnými provedeními vynálezu. Různé modifikace jsou odborníkovi zřejmé na základě zde uvedeného popisu a obrázků. Avšak i tyto modifikace spadají do rozsahu vynálezu definovaného připojenými patentovými nároky.

Je třeba připomenout, že všechny uvedené hodnoty velikostí nukleových kyselin v bázích nebo polypeptidů či proteinů v aminokyselinách, a také molekulové hmotnosti nukleových kyselin nebo polypeptidů jsou přibližné a jsou uvedeny pro ilustraci popisu.

Zde citované publikace jsou celé zahrnuty formou odkazu.



- Aams JM. et al. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. Vol281(5381): 1322-1326.
- Alessi DR. et al. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. Vol15(23): 6541-6551.
- Barinaga M. 1998a. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* Vol281: 1303-1304.
- Barinaga M. 1998b. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science* Vol281: 1302-1303.
- Chang HY et al. 1998. Activation of apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) by the adapter protein DAXX. *Science*. Vol281 (5384): 1860-1863.
- Cross DA. et al. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* Vol378(6559):785-789.
- Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* Vol10(2): 262-267
- Dudek H. et al. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* Vol275(5300): 661-665.
- Franke TF. et al. 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* Vol81(5): 727-736.
- Franke TF. et al. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* Vol88(4): 435-437.
- Hemmings BA. 1997a. Akt signalling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* Vol275(5300): 628-630.
- Hemmings BA. 1997b. PtdIns(3,4,5)P3 gets its message across. *Science* Vol277: 534.
- Ichijo H. et al. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. Vol 275: 90-94.
- Kauffmann-Zeh A. et al. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* Vol385(6616): 544-548.
- Klippel A. et al. 1997. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol. Cell Biol.* Vol17(1): 338-344.
- Konishi H. et al. 1995. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol. 216(2): 526-534.
- Kulik G. et al. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell Biol.* Vol17(3): 1595-1606.



- MacLellan WR. et al. 1998. Death by design: programmed cell death in cardiovascular biology and diseases. *Circ. Res.* Vol81(2): 137-144.
- Okubo Y. et al. 1998. Insulin-like growth factor-1 inhibits the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol. Chem.* Vol273: 25961-25966.
- Pullen N. et al. 1998. Phosphorylation and activation of p70S6K by PDK1. *Science* Vol279: 707-710.
- Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. 1989. *Moleucular Cloning* (2nd edition).
- Staal SP. 1987. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol84(14): 5034-5037.
- Stephens L. et al. 1998. Protein kinase B kinases that mediated phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* Vol279: 710-714.
- Stokoe D. et al. 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* Vol277: 567-570.
- Thornberry NA. et al. 1998. Caspases: enemies within. *Science* Vol281: 1312-1316.

SEZNAM SEKVENCÍ

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1570

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (126)..(1523)

<400> 1

gtcgacgttg caggctgagt catcactaga gagggggaag ggcagcagca gcagagaatc 60

caaaccctaa agctgatatc acaaagtacc atttctccaa gttgggggct cagaggggag 120

tcatac atg agc gat gtt acc att gtg aaa gaa ggt tgg gtt cag aag agg 170

Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg

1

5

10

15

gga gaa tat ata aaa aac tgg agg cca aga tac ttc ctt ttg aag aca 218

Gly Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr

20

25

30

gat ggc tca ttc ata gga tat aaa gag aaa cct caa gat gtg gat tta 266

Asp Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu

35

40

45

cct tat ccc ctc aac aac ttt tca gtg gca aaa tgc cag tta atg aaa 314

Pro Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys

50

55

60

aca gaa cga cca aag cca aac aca ttt ata atc aga tgt ctc cag tgg	362
Thr Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp	
65 70 75	
act act gtt ata gag aga aca ttt cat gta gat act cca gag gaa agg	410
Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg	
80 85 90 95	
gaa gaa tgg aca gaa gct atc cag gct gta gca gac aga ctg cag agg	458
Glu Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg	
100 105 110	
caa gaa gag gag aga atg aat tgt agt cca act tca caa att gat aat	506
Gln Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn	
115 120 125	
ata gga gag gaa gag atg gat gcc tct aca acc cat cat aaa aga aag	554
Ile Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys	
130 135 140	
aca atg aat gat ttt gac tat ttg aaa cta cta ggt aaa ggc act ttt	602
Thr Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe	
145 150 155	
ggg aaa gtt att ttg gtt cga gag aag gca agt gga aaa tac tat gct	650
Gly Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala	
160 165 170 175	
atg aag att ctg aag aaa gaa gtc att att gca aag gat gaa gtg gca	698
Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala	
180 185 190	
cac act cta act gaa agc aga gta tta aag aac act aga cat ccc ttt	746
His Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe	
195 200 205	
tta aca tcc ttg aaa tat tcc ttc cag aca aaa gac cgt ttg tgt ttt	794
Leu Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe	
210 215 220	
gtg atg gaa tat gtt aat ggg ggc gag ctg ttt ttc cat ttg tcg aga	842
Val Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg	
225 230 235	
gag cgg gtg ttc tct gag gac cgc aca cgt ttc tat ggt gca gaa att	890
Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile	
240 245 250 255	

gtc tct gcc ttg gac tat cta cat tcc gga aag att gtg tac cgt gat	938
Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp	
260 265 270	
ctc aag ttg gag aat cta atg ctg gac aaa gat ggc cac ata aaa att	986
Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile	
275 280 285	
aca gat ttt gga ctt tgc aaa gaa ggg atc aca gat gca gcc acc atg	1034
Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met	
290 295 300	
aag aca ttc tgt ggc act cca gaa tat ctg gca cca gag gtg tta gaa	1082
Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu	
305 310 315	
gat aat gac tat ggc cga gca gta gac tgg tgg ggc cta ggg gtt gtc	1130
Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val	
320 325 330 335	
atg tat gaa atg atg tgt ggg agg tta cct ttc tac aac cag gac cat	1178
Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His	
340 345 350	
gag aaa ctt ttt gaa tta ata tta atg gaa gac att aaa ttt cct cga	1226
Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg	
355 360 365	
aca ctc tct tca gat gca aaa tca ttg ctt tca ggg ctc ttg ata aag	1274
Thr Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys	
370 375 380	
gat cca aat aaa cgc ctt ggt gga gga cca gat gat gca aaa gaa att	1322
Asp Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile	
385 390 395	
atg aga cac agt ttc ttc tct gga gta aac tgg caa gat gta tat gat	1370
Met Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp	
400 405 410 415	
aaa aag ctt gta cct cct ttt aaa cct caa gta aca tct gag aca gat	1418
Lys Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp	
420 425 430	
act aga tat ttt gat gaa gaa ttt aca gct cag act att aca ata aca	1466
Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr	
435 440 445	

cca cct gaa aaa tgt cag caa tca gat tgt ggc atg ctg ggt aac tgg 1514
 Pro Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp
 450 455 460

aaa aaa taa taaaaagtaa gtttcaatag ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1570
 Lys Lys
 465

<210> 2

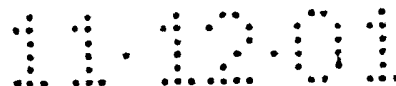
<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Asp Val Thr Ile Val Lys Glu Gly Trp Val Gln Lys Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ile Lys Asn Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Thr Asp
 20 25 30
 Gly Ser Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Lys Pro Gln Asp Val Asp Leu Pro
 35 40 45
 Tyr Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Lys Cys Gln Leu Met Lys Thr
 50 55 60
 Glu Arg Pro Lys Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr
 65 70 75 80
 Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Asp Thr Pro Glu Glu Arg Glu
 85 90 95
 Glu Trp Thr Glu Ala Ile Gln Ala Val Ala Asp Arg Leu Gln Arg Gln
 100 105 110
 Glu Glu Glu Arg Met Asn Cys Ser Pro Thr Ser Gln Ile Asp Asn Ile
 115 120 125
 Gly Glu Glu Glu Met Asp Ala Ser Thr Thr His His Lys Arg Lys Thr
 130 135 140
 Met Asn Asp Phe Asp Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Phe Gly
 145 150 155 160
 Lys Val Ile Leu Val Arg Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr Tyr Ala Met
 165 170 175
 Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Ile Ala Lys Asp Glu Val Ala His
 180 185 190
 Thr Leu Thr Glu Ser Arg Val Leu Lys Asn Thr Arg His Pro Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ser Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr Lys Asp Arg Leu Cys Phe Val
 210 215 220
 Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu



	260		265		270										
Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	His	Ile	Lys	Ile	Thr
	275		280		285										
Asp	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Ile	Thr	Asp	Ala	Ala	Thr	Met	Lys
	290		295		300										
Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Asp
305			310		315										320
Asn	Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Val	Asp	Trp	Trp	Gly	Leu	Gly	Val	Val	Met
			325		330										335
Tyr	Glu	Met	Met	Cys	Gly	Arg	Leu	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gln	Asp	His	Glu
			340		345										350
Lys	Leu	Phe	Glu	Leu	Ile	Leu	Met	Glu	Asp	Ile	Lys	Phe	Pro	Arg	Thr
			355		360										365
Leu	Ser	Ser	Asp	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Ile	Lys	Asp
			370		375										380
Pro	Asn	Lys	Arg	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Asp	Asp	Ala	Lys	Glu	Ile	Met
385			390		395										400
Arg	His	Ser	Phe	Phe	Ser	Gly	Val	Asn	Trp	Gln	Asp	Val	Tyr	Asp	Lys
			405		410										415
Lys	Leu	Val	Pro	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Ser	Glu	Thr	Asp	Thr
			420		425										430
Arg	Tyr	Phe	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Ala	Gln	Thr	Ile	Thr	Ile	Thr	Pro
			435		440										445
Pro	Glu	Lys	Cys	Gln	Gln	Ser	Asp	Cys	Gly	Met	Leu	Gly	Asn	Trp	Lys
			450		455										460
Lys															
465															

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 3

tccaaaccct aaagctgata tcac

24

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 4

cctggatagc ttctgtccat tc

22

<210> 5

<211> 74

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 5

atgagc gatg ttaccattgt gaaagaaggt tgggttcaga agaggggaga atatataaaa 60
aactggaggc caag 74

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 6

ttattttttc caggtacca gcatgcc

27

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 7

gcgcggaat tcccaccatg gtagcaaca agagcaagcc caaggatgcc agccagcggc 60
gccgcagcag cgatgttacc attgtgaaag 90

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 8

gcgcgcgggc ccttaggcgt agtcggggac gtcgtacggg tattttttcc agttaccag 60
catgcc 66

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 9

cggggtacca ccatgggtag caacaagagc aagccaagg atgccagcca g 51

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetické oligonukleotidové primery

<400> 10

ccggaattct taggcgtagt cggggacgtc 30

<210> 11

<211> 480

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Asn Glu Val Ser Val Ile Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly

	260		265		270														
Tyr	Arg	Asp	Ile	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	His				
		275					280					285							
Ile	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Ile	Ser	Asp	Gly				
	290					295					300								
Ala	Thr	Met	Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu				
305					310					315					320				
Val	Leu	Glu	Asp	Asn	Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Val	Asp	Trp	Trp	Gly	Leu				
				325					330					335					
Gly	Val	Val	Met	Tyr	Glu	Met	Met	Cys	Gly	Arg	Leu	Pro	Phe	Tyr	Asn				
			340					345					350						
Gln	Asp	His	Glu	Arg	Leu	Phe	Glu	Leu	Ile	Leu	Met	Glu	Glu	Ile	Arg				
	355						360					365							
Phe	Pro	Arg	Thr	Leu	Ser	Pro	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu				
	370					375					380								
Leu	Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Gln	Arg	Leu	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Asp	Ala				
385					390					395					400				
Lys	Glu	Val	Met	Glu	His	Arg	Phe	Phe	Leu	Ser	Ile	Asn	Trp	Gln	Asp				
				405					410					415					
Val	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Leu	Pro	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Ser				
			420					425					430						
Glu	Val	Asp	Thr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Asp	Glu	Phe	Thr	Ala	Gln	Ser	Ile				
		435					440					445							
Thr	Ile	Thr	Pro	Pro	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Glu	Leu				
	450					455					460								
Asp	Gln	Arg	Thr	His	Phe	Pro	Gln	Phe	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ile	Arg				
465					470					475					480				

<210> 12
 <211> 465
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met	Ser	Asp	Val	Thr	Ile	Val	Lys	Glu	Gly	Trp	Val	Gln	Lys	Arg	Gly
1				5					10					15	
Glu	Tyr	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	Pro	Arg	Tyr	Phe	Leu	Leu	Lys	Thr	Asp
			20					25					30		
Gly	Ser	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Glu	Lys	Pro	Gln	Asp	Val	Asp	Leu	Pro
		35					40					45			
Tyr	Pro	Leu	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Ala	Lys	Cys	Gln	Leu	Met	Lys	Thr
	50					55					60				
Glu	Arg	Pro	Lys	Pro	Asn	Thr	Phe	Ile	Ile	Arg	Cys	Leu	Gln	Trp	Thr
65					70					75					80
Thr	Val	Ile	Glu	Arg	Thr	Phe	His	Val	Asp	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu
				85					90					95	
Glu	Trp	Thr	Glu	Ala	Ile	Gln	Ala	Val	Ala	Asp	Arg	Leu	Gln	Arg	Gln
			100					105					110		
Glu	Glu	Glu	Arg	Met	Asn	Cys	Ser	Pro	Thr	Ser	Gln	Ile	Asp	Asn	Ile
			115				120					125			
Gly	Glu	Glu	Glu	Met	Asp	Ala	Ser	Thr	Thr	His	His	Lys	Arg	Lys	Thr
	130					135					140				
Met	Asn	Asp	Phe	Asp	Tyr	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr	Phe	Gly
145					150					155					160
Lys	Val	Ile	Leu	Val	Arg	Glu	Lys	Ala	Ser	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Met
				165					170					175	
Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Val	Ile	Ile	Ala	Lys	Asp	Glu	Val	Ala	His
			180					185					190		
Thr	Leu	Thr	Glu	Ser	Arg	Val	Leu	Lys	Asn	Thr	Arg	His	Pro	Phe	Leu
		195					200					205			
Thr	Ser	Leu	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gln	Thr	Lys	Asp	Arg	Leu	Cys	Phe	Val
	210					215					220				
Met	Glu	Tyr	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	His	Leu	Ser	Arg	Glu
225					230					235					240

11001

Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Thr Arg Phe Tyr Gly Ala Glu Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Gly Lys Ile Val Tyr Arg Asp Leu
 260 265 270
 Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Thr
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Thr Asp Ala Ala Thr Met Lys
 290 295 300
 Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Glu Asp
 305 310 315 320
 Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly Val Val Met
 325 330 335
 Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln Asp His Glu
 340 345 350
 Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Asp Ile Lys Phe Pro Arg Thr
 355 360 365
 Leu Ser Ser Asp Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu Ile Lys Asp
 370 375 380
 Pro Asn Lys Arg Leu Gly Gly Gly Pro Asp Asp Ala Lys Glu Ile Met
 385 390 395 400
 Arg His Ser Phe Phe Ser Gly Val Asn Trp Gln Asp Val Tyr Asp Lys
 405 410 415
 Lys Leu Val Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu Thr Asp Thr
 420 425 430
 Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ile Thr Pro
 435 440 445
 Pro Glu Lys Cys Gln Gln Ser Asp Cys Gly Met Leu Gly Asn Trp Lys
 450 455 460
 Lys
 465

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Protein Akt pro použití k indukci exprese VEGF v buňce.
2. Protein Akt podle nároku 1, který je vybrán ze skupiny obsahující Akt1, Akt2 a Akt3.
3. Protein Akt podle nároku 2, kde protein Akt je Akt3.
4. Protein Akt podle nároku 1, kde VEGF je vybrán ze skupiny obsahující VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF-2, VEGF-B a VEGF-D.
5. Nukleová kyselina kódující protein Akt operativně spojená s kontrolní expresní sekvencí pro použití k indukci exprese VEGF v buňce.
6. Nukleová kyselina podle nároku 5, kde nukleová kyselina je součástí plazmidového nebo virového vektoru.
7. Nukleová kyselina podle nároku 6, kde nukleová kyselina je součástí plazmidu.
8. Nukleová kyselina podle nároku 6, kde virový vektor je vybrán ze skupiny obsahující retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpetické viry a virus vakcínie.
9. Nukleová kyselina podle nároku 5, kde protein Akt je v buňce konstitutivně exprimován.

10. Kombinace proteinu Akt a iontů přechodného kovu, kombinace proteinu Akt a vazodilatačního činidla nebo kombinace proteinu Akt, iontů přechodného kovu a vazodilatačního činidla pro použití k indukci exprese VEGF v buňce.
11. Kombinace první nukleové kyseliny kódující protein Akt operativně spojené s expresní kontrolní sekvencí a druhé nukleové kyseliny kódující angiogenní faktor operativně spojené s expresní kontrolní sekvencí pro použití k indukci exprese VEGF v buňce.
12. Kombinace podle nároku 11, kde angiogenní faktor je vybrán ze skupiny obsahující VEGF, kyselý růstový faktor fibroblastů, bazický růstový faktor fibroblastů, růstový faktor endotelových buněk a angiopoetin.
13. Kombinace podle nároku 12, kde VEGF je vybrán ze skupiny obsahující VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF-2, VEGF-B a VEGF-D.
14. Kombinace podle nároku 12, kde angiogenní faktor je růstový faktor endotelových buněk.
15. Kombinace alespoň dvou různých forem proteinu Akt pro použití k indukci exprese VEGF v buňce.
16. Protein Akt podle nároku 1, kde buňka je v pacientovi trpícím ischemickým onemocněním.
17. Protein Akt podle nároku 16, kde ischemické onemocnění je cerebrovaskulární ischemie, renální ischemie, pulmonární



ischémie, ischémie končetin, ischémie myokardu nebo ischemická, idiopatická nebo hypertrofická kardiomyopatie.

18. Protein Akt pro použití k indukci exprese VEGF v buňkách pacienta trpícího ischemickým onemocněním.
19. Protein Akt podle nároku 18, kde protein Akt je vybrán ze skupiny obsahující Akt1, Akt2 a Akt3.
20. Protein Akt podle nároku 19, kde protein Akt je Akt3.
21. Protein Akt podle nároku 18, kde VEGF je vybrán ze skupiny obsahující VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF-2, VEGF-B a VEGF-D.
22. Nukleová kyselina kódující protein Akt operativně spojená s kontrolní expresní sekvencí pro použití k indukci exprese VEGF v buňkách pacienta trpícího ischemickým onemocněním.
23. Nukleová kyselina podle nároku 22, kde nukleová kyselina je součástí plazmidového nebo virového vektoru.
24. Nukleová kyselina podle nároku 23, kde nukleová kyselina je součástí plazmidu.
25. Nukleová kyselina podle nároku 23, kde virový vektor je vybrán ze skupiny obsahující retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpetické viry a virus vakcínie.
26. Nukleová kyselina podle nároku 22, kde protein Akt je v buňce konstitutivně exprimován.

27. Kombinace proteinu Akt a iontů přechodného kovu, kombinace proteinu Akt a vazodilatačního činidla nebo kombinace proteinu Akt, iontů přechodného kovu a vazodilatačního činidla pro použití k indukci exprese VEGF v buňkách pacienta trpícího ischemickým onemocněním.
28. Kombinace podle nároku 27, kde ischemické onemocnění je cerebrovaskulární ischemie, renální ischemie, pulmonární ischemie, ischemie končetin, ischemie myokardu nebo ischemická, idiopatická nebo hypertrofická kardiomyopatie.
29. Kombinace první nukleové kyseliny kódující protein Akt operativně spojené s expresní kontrolní sekvencí a druhé nukleové kyseliny kódující angiogenní faktor operativně spojené s expresní kontrolní sekvencí pro použití k indukci exprese VEGF v buňkách pacienta trpícího ischemickým onemocněním.
30. Kombinace podle nároku 29, kde angiogenní faktor je vybrán ze skupiny obsahující VEGF, kyselý růstový faktor fibroblastů, bazický růstový faktor fibroblastů, růstový faktor endotelových buněk a angiopoetin.
31. Kombinace podle nároku 30, kde VEGF je vybrán ze skupiny obsahující VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, VEGF-2, VEGF-B a VEGF-D.
32. Kombinace podle nároku 30, kde angiogenní faktor je růstový faktor endotelových buněk.

33. Kombinace alespoň dvou různých forem proteinu Akt pro použití k indukci exprese VEGF v buňce pacienta trpícího ischemickým onemocněním.
34. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje nukleovou kyselinu kódující protein Akt, přechodný kov a/nebo vazodilatační činidlo a farmaceuticky přijatelné vehikulum.
35. Farmaceutický přípravek podle nároku 34 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleová kyselina je součástí plazmidového nebo virového vektoru.
36. Farmaceutický přípravek podle nároku 35 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nukleová kyselina je součástí plazmidu.
37. Farmaceutický přípravek podle nároku 35 v y z n a č u j í c í s e t í m, že virový vektor je vybrán ze skupiny obsahující retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry, herpetické viry a virus vakcínie.
38. Akt antisense nukleová kyselina pro použití k inhibici aktivity Akt u pacienta trpícího nádorovým onemocněním vedoucí k inhibici tvorby VEGF a inhibici angiogeneze.
39. Intracelulární vazebný protein, který se specificky váže na protein Akt v buňkách pacienta v množství dostatečném k inaktivaci Akt, pro použití k inhibici aktivity Akt u pacienta trpícího nádorovým onemocněním vedoucí k inhibici tvorby VEGF a inhibici angiogeneze.

40. Intracelulární vazebný protein podle nároku 39, kde intracelulární vazebný protein je jednořetězcová Fv protilátka (scFv).

41. Nukleová kyselina kódující dominantní negativní formu Akt pro použití k inhibici aktivity Akt u pacienta trpícího nádorovým onemocněním vedoucí k inhibici tvorby VEGF a inhibici angiogeneze.

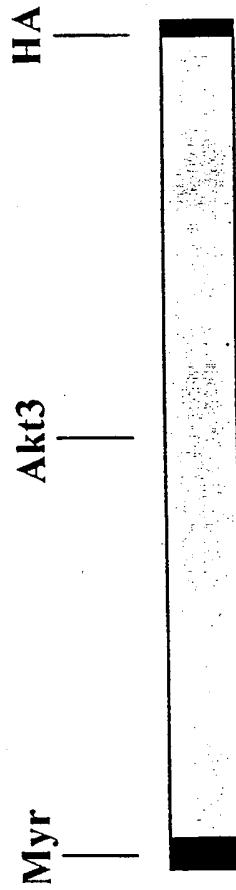
11.12.01

FV2001-444

1/8

~~92168~~

Obr. 1A



11.12.01

2/8

CMV6

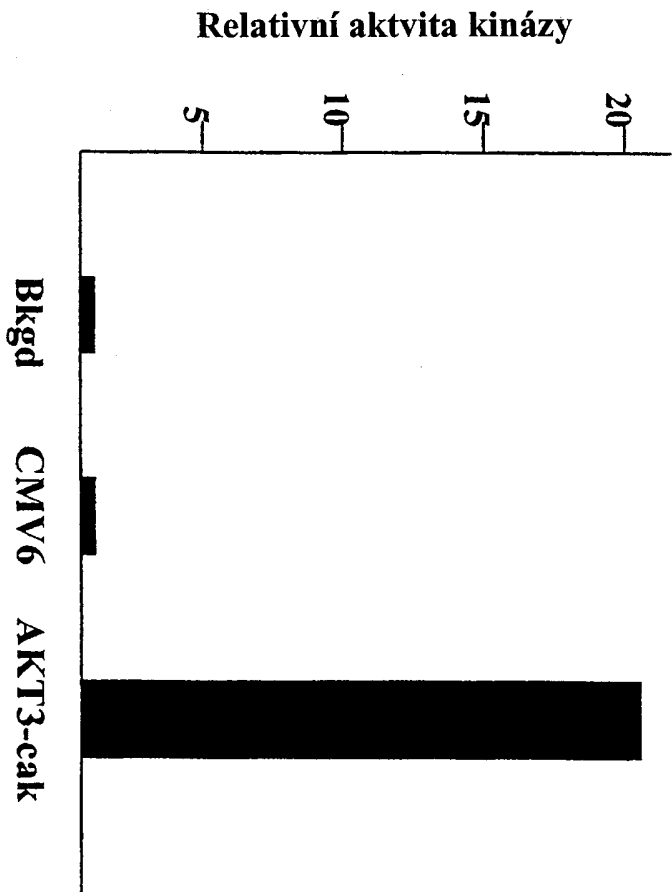
CMV6-MyrAK13HA

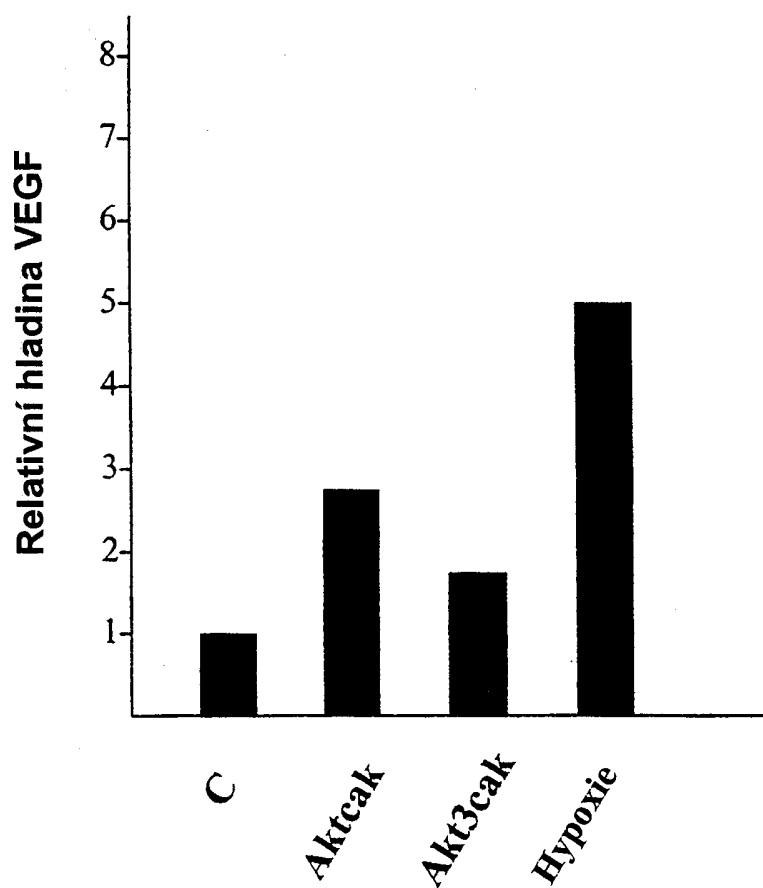


α-HA →

Obr. 1B

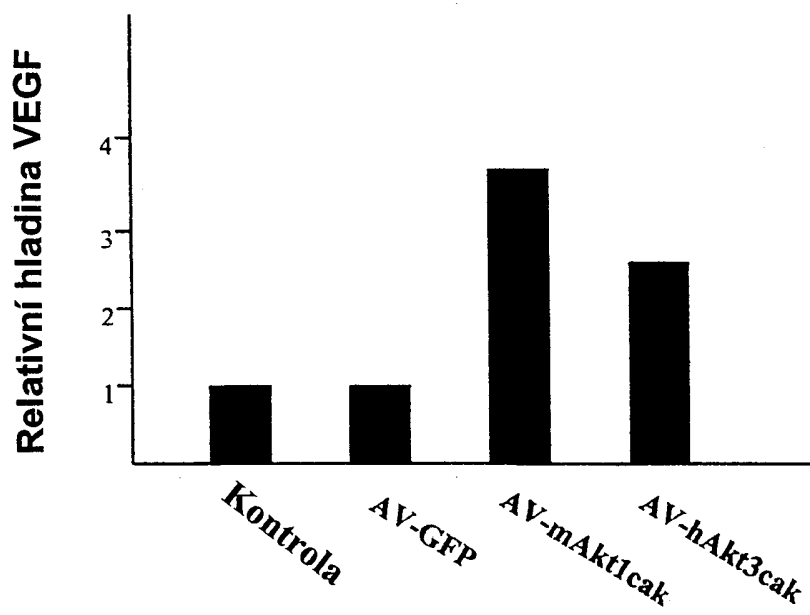
Obr. 1C



Obr. 2**Akt indukuje expresi VEGF v buňkách HeLa**

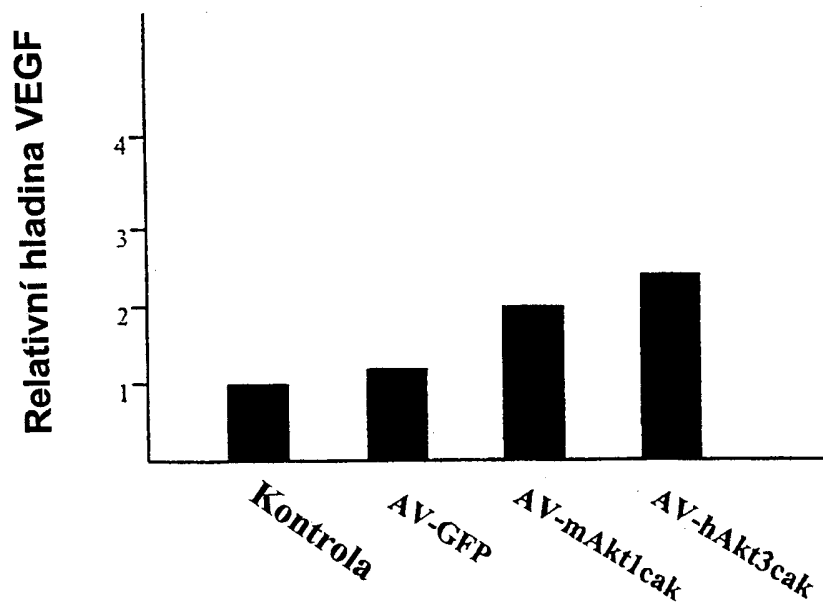
Obr. 3A

**Akt indukuje tvorbu VEGF v humánních buňkách
kosterního svalstva**



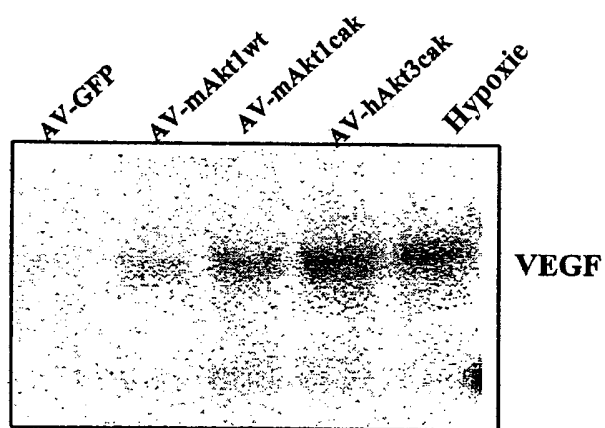
Obr. 3B

**Akt indukuje tvorbu VEGF v humánních buňkách
hladkého svalstva koronárních artérií**



Obr. 4

**Akt indukuje expresi VEGF v kardiomyocytech
novorozených laboratorních potkanů**



Obr. 3C

Akt indukuje expresi VEGF v buňkách HCASMC

