



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 33 264 T2** 2004.11.25

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 824 588 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 264.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP95/01778**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 919 438.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/035782**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.05.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **14.11.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.02.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.11.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/11**

**C12N 15/63, A61K 48/00**

(73) Patentinhaber:

**Applied Research Systems ARS Holding N.V.,  
Curacao, AN**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
MC, NL, PT, SE**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(72) Erfinder:

**SERLUPI-CRESCENZI, Ottaviano, I-00186 Rome,  
IT; PEZZOTTI, Annarita, I-00181 Rome, IT**

(54) Bezeichnung: **INHIBITOREN DER IL-6 AKTIVITAET**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## GEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Nukleotidsequenz, die geeignet ist, die IL-6 Aktivität zu inhibieren, ihre Verwendung in der Therapie sowie auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die sie enthalten.

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0002]** IL-6 ist ein Protein, das zur Gruppe der Zytokine gehört, von denen bekannt ist, dass sie eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort und der Stimulierung der Hämatopoese im Organismus spielen.

**[0003]** Es wurden tatsächlich viele biologische Funktionen für IL-6 in der Hämatopoese, im Lymphsystem, in der Leber und in anderen Zielorganen und Zellen gefunden. Einige dieser Funktionen sind vorteilhaft, andere dagegen werden mit pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht. Zu Letzteren zählt, dass IL-6 ein Wachstumsfaktor für multiple Myelom-Zellen ist und weiter wurde gezeigt, dass anti-IL-6 Antikörper die Myelom-Proliferation in einem leukämischen Patienten vorübergehend hemmen können (siehe z.B.: Klein et al., Blood, 78, (5), pp. 1198–1204, 1991 und Lu et al., Eur. J. Immunol., 22, pp. 2819–24, 1992).

**[0004]** Erhöhte IL-6 Spiegel wurden mit Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis, Glomerulonephritis, Psoriasis und Castelman's Krankheit korreliert (siehe z.B. Graeve et al., Clin. Inv., 71, pp. 664–71, 1993). Auch wurde gezeigt, dass IL-6 eine direkte Rolle beim Verlust von Knochenmasse und bei Hyperkalzämie spielt (siehe z.B. Poli et al., Embo J., 13, (5) pp. 1189–96 und Yoneda et al., Cancer Res., 53, pp. 737–40, February 1993). Daher ist die Entwicklung von Inhibitoren der IL-6 Aktivität ein aktives Forschungsgebiet. Für diesen Zweck wurden verschiedene Ansätze verfolgt, einschließlich der Anwendung von Antikörpern gegen IL-6 (wie von Klein et al, s. oben, berichtet), gp130 oder gp80 sowie die Verwendung von löslichem gp130 oder die Anwendung von IL-6- oder IL-6-Rezeptor-Muteinen.

**[0005]** Da diese Ansätze mit spezifischen, unerwünschten Wirkungen in den klinischen Anwendungen verbunden sein können (wie von Lu et al., s. oben, beschrieben), würde das Etablieren von weiteren, die IL-6 Aktivität inhibierenden Strategien, nützlich sein.

**[0006]** Daher hat der Anmelder einen unterschiedlichen Ansatz verfolgt, die IL-6 Aktivität zu hemmen und zwar durch Blockierung der intrazellulären Proteine, die das IL-6 Signal vermitteln.

**[0007]** Die Übermittlung des IL-6-Signals in gut reagierenden Zellen wurde intensiv erforscht. Fowlkes et al. (PNAS USA, 81, pp. 2313–6, 1984) haben zuerst sogenannte "responsive elements" in der DNA vermutet, die spezifisch für das "Flanking" von IL-6 in den Fibrinogen-Genen der Ratte sind.

**[0008]** Später zeigten Kunz et al. (Nuuc. Ac. Res., 17, (3), 1121–37, 1989), dass ein "responsive element" in dem  $\alpha 2$ -Makroglobulinen der Ratte mit einer Kernsequenz, die identisch zu der des Ratten-Fibrinogens (CTGGGA) ist, auf IL-6 reagiert.

**[0009]** Die DNA "responsive elements", die verwandte Sequenzen zu den oben beschriebenen aufweisen, wurden auch in den Genen identifiziert, die für das humane C-aktive Protein (CRP) (siehe Toniatti et al., Mol. Biol. Med, 7, pp. 199–212, 1990) und humanes Haptoglobin (siehe Oliviero et al., Embo J. 6, (7), pp. 1905–12, 1987) kodieren sowie in anderen Genen, die für weitere "Akutphasen"-Proteine kodieren, die durch IL-6 induziert werden (siehe Heinrich et al., Biochem. J., 265, pp. 621–36, 1990), was zur Definition der Kern-Konsensus-Sequenz, CTGGGAW oder CTGGRAA, führte, wobei W für A oder T und R für A oder G steht.

**[0010]** Hocke et al. (Mol. Cell. Biol., 12, (5), pp. 2282–94, 1992) zeigten, dass mehrere verwandte Kernsequenzen, ähnlich zu den oben erwähnten Kernsequenzen, in den regulatorischen Regionen von Wildtyp-Genen vorliegen können, die auf IL-6 antworten und, dass diese Vielzahl zu einer Verstärkung der Antwort führt, wie mit dem Reporter-Gen-Assay untersucht wurde.

**[0011]** Wegenka et al. (Mol. Cell. Biol., 13, (1), pp. 276–88, 1993) haben kürzlich eine erweiterte Version der Kern-Konsensus-Sequenz als das sogenannte "Acute Phase Response Element (APRE)" beschrieben, das in Hepatomzellen aktiv ist und durch die Formel KTYMYKGKAA beschrieben werden kann, wobei M für C oder A, K für T oder G und Y für C oder T steht.

**[0012]** Yuan et al. (Mol. Cell. Biol., 14, (3), pp. 1657–68, 1994) haben gezeigt, dass solche APRE-ähnlichen Sequenzen einen Protein-Transkriptionsfaktor mit einem Molekulargewicht von ungefähr 90 KD, APRF genannt und kürzlich kloniert (siehe Akira et al., Cell, 77, pp. 63–71, 1994), binden. In der Praxis würde somit die Bindung von aktiviertem APRF an APRE Sequenzen zu einer Aktivierung von IL-6 induzierbaren Genen (solche APRE-Sequenzen enthaltend) in Zellen, die auf IL-6 reagieren, führen.

**[0013]** Folglich kann ein APRE-Element als ein Verstärker eines Zielgens in Zellen, die auf IL-6 reagieren, auf folgende Weise verwendet werden: In Zellen, die auf IL-6 reagieren, induziert die Behandlung mit IL-6 die Synthese von APRF-Proteinen, die an APRE-Elemente binden. Eine derartige Bindung aktiviert dann die Expression von Zielgenen.

**[0014]** Serlupi Crescenzi et al. (Poster, 12th European Immunol., Meeting, Barcelona, Jun. 14–17, 1994) haben gezeigt, dass eine 8-fache Wiederholung von APRE DNA-Sequenzen (M8) für eine 50–100-fache Induktion eines Reportergens in HepG2 humanen Hepatomzellen durch IL-6 verantwortlich ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0015]** Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleotidsequenz, die geeignet ist, die IL-6 Aktivität zu inhibieren, wobei diese enthält:

i) mindestens eine Nukleotidsequenz, die ein APRE-Element der allgemeinen Formel ZXMYKGKAA darstellt, wobei Z ein T oder G repräsentiert oder auch abwesend sein kann, X ein T repräsentieren kann oder abwesend sein kann, M ein C oder A, Y ein C oder T repräsentieren kann und K ein T oder G ,

in Verbindung mit

ii) mindestens einer Nukleotidsequenz, die eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle darstellt und verschieden von dem APRE-Element ist, wie z.B. solche, die in Promotor-Regionen vorliegen.

**[0016]** Beispiele der Nukleotidsequenzen vom letzteren Typ schliessen ein: TATA-box und die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1 (siehe Riabowol et al., PNAS USA, 89, pp. 157–161, 1992), AP-2, HNF-1 (siehe Clusel et al., Nuc. Ac. Res., 21 (15), pp. 3405–3411), SP-1 (siehe Wu et al., Gene, 89, pp. 203–209, 1990), NF-kB (siehe Bielinska et al., Science, 250, pp. 997–1000, 1990), Oct-1, E-2 and SRF Transkriptionsfaktoren.

**[0017]** In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind sowohl das APRE-Element (i) und/oder die Nukleotidsequenz (ii) der oben angegebenen allgemeinen Formel jeweils mindestens zweimal wiederholt, besonders bevorzugt zwischen 3 und 10 mal und noch bevorzugter 8 mal wiederholt.

**[0018]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Element (i) mindestens zwei verschiedene APRE-Elemente und/oder die Nukleotidsequenz (ii) umfasst mindestens zwei verschiedene Oligonukleotidsequenzen, die die Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle konstituiert und verschieden vom APRE-Element ist.

**[0019]** Die Nukleotidsequenz (ii) ist bevorzugt ein SV40 früher Promotor.

**[0020]** Das APRE-Element (i) umfasst z.B. die folgende Nukleotidsequenz: TTCTGGGAA. Die **Abb. 2** zeigt eine Nukleotidsequenz, die in den Bereich dieser Erfindung fällt, in Übereinstimmung mit ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ein solches Nukleotid ist auch in SEQ ID NO: 1 gezeigt und stellt einen erfindungsgemäßen Gegenstand dar.

**[0021]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Plasmidvektor, der die Nukleotidsequenz der Erfindung enthält.

**[0022]** Ein zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz als ein therapeutisches Mittel, um die Wirkung von IL-6 in den Zuständen, bei denen IL-6 eine pathologische Rolle spielt, zu inhibieren.

**[0023]** Die vorliegende Erfindung liefert auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine Nukleotidsequenz oder einen Plasmidvektor, gemäß dieser Erfindung, enthalten. Solche Zusammensetzungen können als eine orale, rektale, intravenöse oder topische Anwendungsform formuliert werden. Erfindungsgemäß können die Formulierungen der vorliegenden Erfindung die Verwendung irgendeiner Kombination aus den folgenden

einschliessen: Virus-vermittelter Gentransfer, Liposomen-Formulierung, Rezeptor-vermittelte DNA-Freisetzung, und/oder Hantelstrukturen des aktiven Nukleotidsequenz-Inhibitors.

**[0024]** Die inhibitorische Wirkung der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz wurde mit einem Reporter-gen-Assay bestimmt.

**[0025]** Der erfindungsgemäße Reporter-gen-Assay basiert auf der Fähigkeit des APRE-Elements als ein Verstärker eines jeglichen Gens in Zellen, die auf IL-6 reagieren, zu wirken. In diesem Fall wird das APRE-Element als Verstärker eines Ziel-Reportergens (z.B. das Luziferasegen) in Zellen, die auf IL-6 reagieren, (z.B. hepatische Zellen, wie HepG2) verwendet. Die Zellen werden dann mit IL-6 behandelt: wenn genügend des APRF-Proteins durch einen Überschuss an der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz weggefangen wird, kann das Zielgen nicht aktiviert werden.

**[0026]** Für diesen Assay wurden Inhibitor-Plasmide hergestellt, die die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz enthalten. Ein Beispiel eines solchen Plasmids ist in **Abb. 1** gezeigt, zusammen mit dem Verfahren seiner Herstellung.

**[0027]** Dieses und andere Plasmide, die die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz enthalten, stellen eine weitere Ausführungsform der Erfindung dar.

**[0028]** Diese Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele beschrieben, die jedoch nicht in irgendeiner Weise als die Erfindung einschränkend verstanden werden sollen. Die Beispiele werden sich auf die nachstehend beschriebenen Abbildungen beziehen.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

**[0029] Abb. 1:** Herstellung des Plasmids pM8SV. pM8SVL wurde mit Sal I und Hind III verdaut und die herausragenden Enden wurden in glatte Enden durch die Kleenow-Reaktion überführt. Das resultierende 3.2 Kb DNA-Fragment wurde dann mittels Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und anschließend mit sich selbst ligiert. Auf diese Weise wurde das Plasmid pM8SV hergestellt, die M8 Sequenz (ungefähr 170 Bp) und die Sequenz aus dem SV40 Virus frühen Promotor (ungefähr 190 Bp) war enthalten, das Luziferasegen fehlte.

**[0030] Abb. 2:** Sequenz des BamH I-Hind III Inhibitor-DNA-Fragments von Plasmid pM8SV. Die durchgehende Linie über dem oberen Teil der gezeigten Nukleotidsequenz stellt die M8-Sequenz dar. Die dicke, durchgehende Linie über dem unteren Teil der Nukleotidsequenz stellt die SV40 Promotorsequenz dar. BamH I- und Hind III-Restriktionsstellen sind ebenfalls angegeben.

**[0031] Abb. 3:** IL-6-Reporter-gen-Assay in T47D- und M1-Zellen. Test verschiedener M8-enthaltender Plasmide. Die dargestellten Werte der Lichtemission sind Durchschnittswerte von Doppelbestimmungen in cps von transfizierten Zellen, integriert über eine Dauer von 30 Sekunden (AUC: Fläche unter der Kurve). Jede Säule stellt den Durchschnittswert von dreifach durchgeführten Transfektionen  $\pm$  SEM dar.

**[0032] Abb. 4:** Zeitverlauf der Luziferase-Induktion transfizierter HepG2-Zellen nach Behandlung mit IL-6. Das Plasmid pM8SV wurde als positives Reporter-gen-Plasmid verwendet. Jede Säule stellt den Durchschnittswert von zweifach durchgeführten Transfektionen  $\pm$  SEM dar. Zwei Experimente sind in der Abbildung gezeigt.

**[0033] Abb. 5:** HepG2-Reporter-gen-Assay für IL-6. Test von pM8 als Inhibitor-Plasmid gegen pM8SV als Reporter-gen-Plasmid. Jede Säule stellt den Durchschnittswert von dreifach durchgeführten Transfektionen  $\pm$  SEM dar. Vier Experimente sind in der Abbildung gezeigt.

**[0034] Abb. 6:** HepG2-Reporter-gen-Assay für IL-6. Test von pM8SV als Inhibitor-Plasmid gegen pM8SVL als Reporter-gen-Plasmid, jede Säule stellt den Durchschnittswert von dreifach durchgeführten Transfektionen  $\pm$  SEM dar. Die Ergebnisse sind in % Hemmung, verglichen mit HepG2-Zellen, die mit dem pC Träger-Plasmid ohne Inhibitor-Plasmid transfiziert wurden, dargestellt.

**[0035] Abb. 7:** HepG2-Reporter-gen-Assay für IL-6. Test von pSV und pM8SV als Inhibitor-Plasmide gegen pM8SVL-Reporter-gen-Plasmid. Jede Säule stellt den Durchschnittswert von dreifach durchgeführten Transfektionen  $\pm$  SEM dar. Die Ergebnisse sind in % Hemmung, verglichen mit HepG2-Zellen, die die mit dem pC-Träger-Plasmid ohne Inhibitor-Plasmid transfiziert wurden, dargestellt.

**[0036] Abb. 8:** Inhibitionstest der IL-6-Aktivität durch die Inhibitor-Plasmide pM8 und pM8SV in einem HepG2 Reporter-Gen-Assay, basierend auf dem Luziferasegen unter Kontrolle der IL-6 induzierbaren, regulatorischen Sequenzen des humanen Haptoglobingen-Promotors. Jede Säule stellt den Durchschnittswert von dreifach durchgeführten Transfektionen  $\pm$  SEM dar. Die Ergebnisse sind in % Hemmung, verglichen mit HepG2-Zellen, die mit dem pC-Träger-Plasmid ohne Inhibitor-Plasmid transfiziert wurden, dargestellt. Die Transfektionen wurden mit 0,1  $\mu$ g Reporter-Gen-Plasmid-DNA und dem angegebenen, molaren Überschuss des Inhibitor-Plasmids durchgeführt. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA wurde mit dem Träger-Peptid konstant gehalten. Die transfizierten Zellen wurden für 18 Stunden mit 1 ng/ml IL-6 behandelt.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

##### Beispiel 1:

##### Herstellung der Plasmide.

**[0037]** Ein auf IL-6 reagierendes Luziferase-Reporter-Gen-Plasmid wurde wie folgt hergestellt: 1) durch chemische Synthese wurde ein 38 Bp langer Oligonukleotid-Doppelstrang mit einer ungeschnittenen BamHI-Stelle an seinem 5' glatten Ende hergestellt und weiter ein herausragender unterer Strang mit 4 Nukleotiden, die mit den Bgl II- und BamH I-Stellen am 3'-Ende kompatibel sind. Dieses synthetische Oligonukleotid wurde M2 genannt und enthielt zwei identische APRE-Sequenzen der Promotorregion von  $\alpha$ 2-Makroglobulinen aus Ratte. Die Sequenz des Oligonukleotids (oberer Strang, 5' nach 3') war folgende:  
GGATCCTTCTGGGAATTCTGATCCTTCTGGGAATTCTG (SEQ ID NO: 2).

**[0038]** Dieses Oligonukleotid wurde in die Sma I-Bgl II-Stellen des Plasmids pGL2-pv (von der Promega Corporation) kloniert, wobei die Expression des Luziferase-Reporter-Genes durch den SV40 Virus frühen Promotor getrieben wurde, so dass, nach Ligation mit sich selbst, das Plasmid pM2SVL gebildet wurde.

**[0039]** Das synthetische Oligonukleotid wurde über sein glattes 5'-Ende auch an die Sma I-Stelle des gleichen Plasmids pGL2-pv ligiert und das resultierende lineare Ligationsprodukt wurde dann mit Hind III geschnitten. Der resultierende lineare Vektor wurde als ein Empfänger verwendet, um die folgenden DNA-Fragmente zu klonieren: 1) das BamH I-Hind III Fragment mit 238 Bp vom Plasmid pM2SVL, so dass nach Selbstligation das Plasmid pM4SVL gebildet wurde; 2) das BamH I-Hind III Fragment mit 280 Bp von pM4SVL, so dass nach Selbstligation das Plasmid pM6SVL gebildet wurde 3) das BamH I-Hind III-Fragment mit 322 Bp von pM6SVL, so dass nach Selbstligation das Plasmid pM8SVL gebildet wurde.

**[0040]** Das Plasmid pM8L wurde durch Verdau von pM8SVL mit SfaI und durch Umwandlung der herausragenden Enden in glatte Enden mittels "fall in" Reaktion durch Kleenow-Enzym hergestellt. Nach BamH I Verdau, wurde das resultierende 163 Bp lange M8 DNA-Fragment mit einem synthetischen 16 Bp BamH I-Kpn I Adapter ligiert und in ein 5,6 Kb DNA-Fragment kloniert, das aus einem Sma I+Kpn I-Verdau des pGL2-b-Vektors (von der Promega Corporation) resultierte. Das Plasmid pGL2-b ist zu dem oben erwähnten pGL2-pv Plasmid identisch, mit Ausnahme von der Abwesenheit der SV40 Promotorsequenz in pGL2-b. Der 16 Bp Adapter enthielt eine multiple Klonierungsstelle und wurde durch chemische Synthese mit den folgenden Sequenzen hergestellt:

Oberer Strang: 5'CCCGGCCGCGCTCGAGG3' (SEQ ID NO: 3);  
unterer Strang: 5'GATCCCTCGAGGCGCGCGGTAC3' (SEQ ID NO: 4).

**[0041]** Das Plasmid, das aus dem obigen Verfahren resultierte, war pM8L, das die M8 DNA-Sequenz ohne Promotor aufwies, eingeschlossen in eine multiple Klonierungsstelle, stromaufwärts vom Luziferasegen.

**[0042]** Das Luziferase-Reporter-Gen-Plasmid pM8TKL wurde durch Schneiden des Plasmids pGEM-TK-CAT (beschrieben in Cohen et al., EMBO J., 7(5), pp. 1411-9, 1988) mit Xba I und Bgl II hergestellt. Das resultierende 181 Bp Fragment, die TK-Promotor-Sequenz des viralen HSV Thymidinkinasegens enthaltend, wurde mit dem 5.8 Kb Nhe I-Bgl II-Fragment des pM8L-Vektors ligiert, zwischen den M8- und den Luziferase-DNA-Sequenzen.

**[0043]** Das Luziferase-Reporter-Gen-Plasmid pHPSVL wurde erstens durch eine PCR-Amplifikation der 841 Bp der Haptoglobingen-Promotorregion aus humaner genomischer DNA hergestellt. Das 3'-Ende des amplifizierten PCR-Fragments korrespondierte zu der Position -36 in Bezug auf den Transkriptionsstart des humanen Haptoglobingens (wie von Maeda et al., J. Biol. Chem., 260(11), pp. 6698-709, Jun. 10, 1985 beschrieben).

Das PCR-Produkt wurde mit oberen und unteren Primern, die die Mlu I- beziehungsweise Bgl II-Restriktionsstellen enthielten, hergestellt. Die DNA-Primer, die für die genomische Amplifikation der Haptoglobin-Promotoregion synthetisiert wurden, hatten die folgenden Sequenzen:

Oberer Primer: 5'CTACGCGTGCAGTATTGACCCTTCCTCCT3' (SEQ ID NO: 5);

Unterer Primer: 5'CGCAGATCTAGCTCACTTCTCCCCCTTC3' (SEQ ID NO: 6).

**[0044]** Das so erhaltene PCR-Fragment wurde in Mlu I- und Bgl II-Stellen des Luziferase-Reportergen-Plasmids pGL2-pv, oben erwähnt, stromaufwärts vom SV40 frühen Promotor, eingefügt. Das resultierende Plasmid war pHPSVL.

**[0045]** Um das Inhibitor-Plasmid pM8 herzustellen, wurde das oben genannte pM8L-Plasmid mit Sal I und Bgl II verdaut und die so generierten, herausragenden Enden wurden in glatte Enden mit dem Kleenow-Enzym überführt. Das resultierende 3,1 Kb Fragment, dem die Luziferasegen-Sequenz fehlte, wurde über Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und anschließend mit sich selbst ligiert, um das Inhibitor-Plasmid pM8 zu erhalten.

**[0046]** Das Inhibitor-Plasmid pM8SV wurde, wie in **Abb. 1** beschrieben, hergestellt. pM8SVL wurde mit Sal I und Hind III verdaut und die herausragenden Enden wurden mit Hilfe des Kleenow-Enzyms in glatte Enden überführt. Das resultierende 3,2 Kb DNA-Fragment wurde über Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und anschließend mit sich selbst ligiert. So wurde das Plasmid pM8SV gewonnen, das die M8-Sequenz (ungefähr 170 Bp) und die Sequenz vom SV40 frühen Promotor (ungefähr 190 Bp) enthielt, aber nicht das Luziferasegen.

**[0047]** Das Inhibitor-Plasmid pSV wurde durch Herausschneiden des Sal I-Hind III-Fragments, das das Luziferasegen vom oben erwähnten pGL2-pv-Plasmid enthielt, hergestellt. Das resultierend 3.1 Kb-Fragment wurde mit dem Kleenow-Enzym einer "fall-in"-Reaktion unterworfen, über Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt und dann mit sich selbst ligiert, so dass das Plasmid pSV erhalten wurde, das den SV40 Promotor enthielt, aber nicht das Luziferasegen.

**[0048]** Das Träger-Plasmid pC wurde durch Schneiden des Plasmids pGL2-b mit Sal I- und Hind III-Restriktionsenzymen hergestellt. Das resultierende 2,9 Kb Fragment wurde einer "fall-in"-Reaktion mit Kleenow-Enzym unterworfen, über Agarosegel-Elektrophorese gereinigt und dann mit sich selbst ligiert, so dass das Plasmid pC erhalten wurde.

**[0049]** Alle oben beschriebenen Plasmid-Konstrukte wurden verwendet, um E. Coli, Stamm XL-1 Blue, mit Standard-Techniken (Ausubel R. et al., Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates und Wiley Interscience, New York) zu transformieren. Die Plasmid-DNA wurde von transformierten Klonen durch präparative alkalische Lyse-Methoden im kleinen Maßstab extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse und Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Die Klone mit einem erwarteten Muster wurden ausgewählt. Um gereinigte Plasmid-Präparationen zu erhalten, die in Säugerzell-Transfektionen verwendet werden konnten, wurden 300 ml Kulturen von ausgewählten E. Coli XL 1-Blue Transformanten hergestellt. Die Plasmide wurden dann mittels QIAGEN 500 Ionenaustausch-Minisäulen, entsprechend den Angaben des Herstellers, gereinigt.

## BEISPIEL 2

### Zelllinien und Kulturbedingungen.

**[0050]** HepG2 humane Hepatomzellen (ATCC) wurden in MEM kultiviert, dem 10 % FKS, 5 mM L-Glutamin, 20 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt war, T47D humane Brustkarzinomzellen (ATCC) wurden in DMEM kultiviert, dem 10% FKS, 5 mM L-Glutamin, 20 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, Maus M1 myeloide Leukämiezellen (ATCC) wurden in RPMI kultiviert, dem 10% FKS, 5 mM L-Glutamin, 20 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Die Kultur der oben genannten Zelllinien wurde in der An- oder Abwesenheit von geeigneten IL-6 Dosen durchgeführt (IL-6 aus CHO abstammend, von Interpharm Laboratories).

## BEISPIEL 3

Transiente Transfektionen sowie Luziferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Assays.

**[0051]** Transiente Transfektionen der HepG2 humanen Hepatomzellen und der T47D Brustkarzinomzellen wurden mittels Kalziumphosphat-DNA-Präzipitation in HEPES-Puffer nach Standardmethoden (Ausubel R. et al., Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York) durchgeführt. Die transiente Transfektion von Maus M1 myeloiden Leukämiezellen wurde mit DEAE-Dextran nach Standardmethoden durchgeführt (nach Ausubel, siehe oben).

**[0052]** Um Luziferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten nachzuweisen, wurden die Zellen in situ durch Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml/10<sup>6</sup> Zellen Extraktionspuffer (25 mM TRIS-Phosphat pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100) extrahiert. Für die Luziferase-Aktivität wurden 20  $\mu$ l des Zellextrakts direkt in 100  $\mu$ l Luziferase-Puffer (20 mM Tricin, 1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> Mg(OH)<sub>2</sub>-5H<sub>2</sub>O, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 0.27 mM Coenzym A, 0.47 mM Luziferin, 0.53 mM ATP) getestet. Für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden 10  $\mu$ l des Zellextrakts für 1 h bei 37°C mit 100  $\mu$ l Lumigal-Substrat (von Lumigen) inkubiert. Die Messungen der Lumigal- und Luziferase-Aktivität wurden mit einem Berthold Autolumat LB953 Luminometer durchgeführt, die Messwerte hatten die Einheit "counts per seconds" (cps), integriert über eine Periode von 30 Sekunden für die Luziferase und 15 Sekunden für die  $\beta$ -Galaktosidase.

**[0053]** Es wurde gezeigt, dass das Reporter-Plasmid pM8SVL die Eigenschaft, auf IL-6 zu reagieren, auf HepG2-Zellen nach Transfektion überträgt, da die Expression der Luziferase-Aktivität um das 50–100-fache gesteigert war (Serlupi Crescenzi et al., Poster at the 12th European Immunol., Meeting, Barcelona, Jun. 14–17, 1994).

**[0054]** Das Plasmid wurde auch in T47D-Brustkarzinomzellen und in Maus M1 myeloiden Leukämiezellen getestet. Die M1-Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ g DNA/10<sup>6</sup> Zellen unter Verwendung von DEAE/Dextran transfiziert, während 2,5  $\mu$ g DNA/10<sup>5</sup> Zellen für die Kalziumphosphat-Transfektion von T47D verwendet wurden.

**[0055]** Diese beiden Zelllinien sind sich nur sehr begrenzt ähnlich, abgesehen von ihrer gemeinsamen Fähigkeit, auf IL-6 zu reagieren. Die in **Abb. 3** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das M8-DNA-Molekül im Plasmid pM8SVL in beiden Zelllinien nach Behandlung mit IL-6 signifikant aktiviert war. Wie in **Abb. 3** gezeigt, wurde auch eine signifikante Antwort auf IL-6 in M1-Zellen mit dem Reporter-Plasmid pM8TKL, in dem das M8-Molekül von dem Thymidinkinase-Promotor flankiert war, das vom SV40 Promotor in pM8SVL verschieden war, beobachtet.

**[0056]** Der Zeitverlauf der Luziferase-Induktion von transfizierten HepG2-Zellen wurde nach einer Behandlung mit IL-6 (1 ng/ml) bestimmt. Das Plasmid pM8SV wurde als positives Reporter-Plasmid (bei 0,2  $\mu$ g/10<sup>5</sup> Zellen) verwendet. Die Zellen wurden über Nacht transfiziert, aufgeteilt und dann einer Behandlung mit IL-6 unterworfen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4** dargestellt und zeigen, dass die fast maximale Antwort nach nur zweistündiger IL-6 Behandlung auftrat.

## BEISPIEL 4

Test des Inhibitor-Plasmids pM8.

**[0057]** Die Inhibition der IL-6 Aktivität durch M8-DNA-Moleküle wurde nach Co-Transfektion in HepG2-Zellen von i) dem pM8SVL-Reporter-Plasmid, das auf IL-6 reagiert und ii) dem M8-Molekül, eingefügt in das M8-Inhibitor-Plasmid, gemessen. Das letztere Plasmid beinhaltet die M8-Sequenz, aber es kann nicht die Eigenschaft, auf IL-6 zu reagieren, übertragen. Die HepG2-Zellen wurden mit bis zu 2,5  $\mu$ g/10<sup>5</sup> Zellen an Reporter-Plasmid pM8SVL (M8 und das Luziferasegen enthaltend), das auf IL-6 reagiert, transfiziert und mit einem 10 oder 50-fachen molaren Überschuss an pM8, in der Anwesenheit unterschiedlicher IL-6 Dosen. Die Gesamtmenge der DNA pro Transfektion wurde durch Verwendung des Träger-Plasmids pC konstant gehalten, das identisch zu M8 ist, mit Ausnahme, dass ersterem Plasmid das spezifische, 165 Bp M8-DNA-Fragment fehlt.

**[0058]** Wie **Abb. 5** darstellt, zeigt das Inhibitor-Plasmid keine signifikante und reproduzierbare Inhibition der IL-6 Aktivität in vier Experimenten, auch nicht bei einem 50-fachen Überschuss an pM8 Inhibitor-Plasmid. In diesen Experimenten wurde das Reporter-Plasmid pM8SVL, das auf IL-6 reagiert, in einer Dosis von 0,1  $\mu$ g/10<sup>5</sup> Zellen eingesetzt, während die Menge der DNA konstant auf 5  $\mu$ g/10<sup>5</sup> Zellen gehalten wurde. Die sub-

optimale IL-6 Dosis, die in diesen Experimenten verwendet wurde, war 1 ng/ml. Wie in **Abb. 5** gezeigt, war die Variabilität unter diesen experimentellen Bedingungen, in Hinblick auf die Tatsache, dass unterschiedliche Transfektionen per se eine unvermeidbare Quelle der Variabilität darstellen, akzeptabel.

#### BEISPIEL 5

##### Test des Inhibitor-Plasmids pM8SV.

**[0059]** Die in **Abb. 5** vorgestellten Ergebnisse sind etwas überraschend, weil die aktive M8-Inhibitor-DNA-Sequenz des Inhibitor-Plasmids M8 identisch zu der aktiven Sequenz des pM8SVL Reporter-Plasmids ist. Nach Co-Transfektion würde man daher eine Konkurrenz zwischen diesen beiden identischen M8-Sequenzen, vorliegend in unterschiedlichen Plasmiden, erwarten, was in einer Inhibition der IL-6 Aktivität in dem Reporter-Gen-Assay resultieren müsste.

**[0060]** Darüber hinaus können die oben beschriebenen Ergebnisse nicht durch die Anwesenheit eines Überschusses an aktiviertem, IL-6-spezifischen Transkriptionsfaktor(en) erklärt werden, die durch die M8-Inhibitor-DNA-Moleküle nicht genügend neutralisiert wären, da die Daten in der Anwesenheit von limitierenden IL-6 Mengen erhalten wurden. Weiter sind publizierte Daten ähnlicher Experimente mit DNA-Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren (26–30) nicht mit den in **Abb. 5** vorgestellten Ergebnissen vereinbar.

**[0061]** Eine alternative Erklärung für die in **Abb. 5** gezeigten Ergebnisse könnte sein, dass andere als die M8-Sequenzen im Reporter-Plasmid an einer IL-6-spezifischen Signaltransduktion beteiligt sind. Diese Sequenzen sollten in dem positiven Reporter-Plasmid pM8SVL fehlen (z.B. Sequenzen des SV40 frühen Promotors, der allgemein Transkriptionsfaktoren binden kann). Das Inhibitor-Plasmid pM8 würde daher nicht wirksam mit dem Reporter-Plasmid pM8SVL konkurrieren können.

**[0062]** Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Inhibitor-Plasmid (pM8SV) hergestellt, das IL-6 Inhibitor-DNA-Sequenzen enthielt, sowohl die M8-Sequenz als auch die SV40 Sequenz (siehe **Abb. 1**). Dieses Inhibitor-Plasmid wurde in dem IL-6 Reporter-Gen-Assay mit HepG2-Zellen getestet. Vier unabhängige Experimente wurden durchgeführt, mit zweifach durchgeführten Transfektionen pro Experiment.

**[0063]** Die Transfektionen wurden mit 0,1 µg der Reporter-Plasmid-DNA und dem in **Abb. 6** angegebenen molaren Überschuss an Inhibitor-Plasmid durchgeführt. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde mit dem Träger-Plasmid konstant gehalten. Die transfizierten Zellen wurden für 18 h mit 1 ng/ml IL-6 behandelt.

**[0064]** Die in **Abb. 6** dargestellten Ergebnisse zeigen eine klare Dosisabhängigkeit der Inhibition der IL-6-Aktivität durch das pM8SV-Inhibitor-Plasmid. Die Rohdaten aus **Abb. 6** sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Transfektionen wurden dreifach pro Dosis des Inhibitor-Plasmids in jedem Experiment durchgeführt. Für jedes Experiment stammten die in einer einzelnen Reihe gezeigten, induzierten und nicht-induzierten Werte von der gleichen Transfektion. Die aufgeführten Werte der Lichtemission sind cps, über eine Dauer von 30 Sekunden integriert. Wie aus den Daten in Tabelle 1 gesehen werden kann, wurde etwas Variabilität in diesen Experimenten beobachtet, insbesondere mit den niedrigeren Dosen des Inhibitor-Plasmids, aber normalerweise waren die CVs von wiederholten Transfektionen deutlich niedriger als 20%.

**[0065]** Um auszuschließen, dass die Inhibition der IL-6 Aktivität, die durch das pM8SV-Inhibitor-Plasmid ausgelöst wurde, ausschließlich auf die SV40 Promotor-DNA zurückzuführen war und nicht auf eine Kombination der M8- und SV40-Sequenzen, wurde ein weiteres Inhibitor-Plasmid hergestellt und in dem Reporter-Gen-Assay getestet. Dieses Plasmid enthielt nur die SV40 DNA-Sequenz als Inhibitor der IL-6-Aktivität, ohne die M8-Sequenz oder das Luziferasegen.

**[0066]** Die Transfektionen wurden mit 0,1 µg der Reporter-Plasmid-DNA durchgeführt und dem in **Abb. 7** gezeigten, molaren Überschuss des Inhibitor-Plasmids. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA wurde mit dem Träger-Plasmid konstant gehalten. Die transfizierten Zellen wurden für 18 Stunden mit 1 ng/ml IL-6 behandelt. Die in **Abb. 7** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass dieses Inhibitor-Plasmid (pSV) nur eine teilweise Hemmung der IL-6-Aktivität bewirkte, die niemals über 40% lag und nicht dosis-abhängig war. Daraus folgte, dass die SV40 DNA-Sequenz alleine nicht für eine wirksame Inhibition der IL-6 Aktivität ausreichte. Auf der anderen Seite enthielt das Luziferase enthaltende Reporter-Plasmid pGL2-pv die SV40 Promotorsequenz, aber nicht die M8-Sequenz, was so zu einem Basallevel an Luziferase-Expression führte, der aber nicht weiter durch IL-6 induzierbar war. In diesem Plasmid war der Basallevel der Luziferase-Expression nicht durch das pM8SV Inhibitor-Plasmid inhibiert, was zeigt, dass die Transkriptionsfaktoren, die spezifisch nur an die SV40

Promotorregion binden, nicht wirksam durch das pM8SV-Inhibitor-Plasmid entfernt werden können. Tatsächlich war in Anwesenheit des letzteren Inhibitor-Plasmids die Luziferase-Aktivität des Reporter-Plasmids pGL2-pv sogar höher in der Abwesenheit des Inhibitor-Plasmid (nicht gezeigt).

## BEISPIEL 6

Inhibition der IL-6 Aktivität durch pM8SV bewirkt durch das Reporter-Plasmid pHPSVL.

**[0067]** Wir wollten dann das Inhibitor-Plasmid pM8SV in einem weiteren Reporter-Gen-Assay für IL-6 testen, wobei die Ziel-DNA-Sequenz, die das IL-6-Signal im Reporter-Gen vermittelt, nicht perfekt zur der M8-Inhibitor-Sequenz passte. HepG2-Zellen wurden daher mit dem Plasmid pHPSVL transfiziert, das 841 Basenpaare der Promotorsequenz des humanen Haptoglobins enthielt, flankiert vom SV40 Promotor und Luziferase-Gen. Eine APRE-Stelle von der Haptoglobin-Promotorsequenz (nach Maeda et al., J. Biol. Chem., 260(11), pp. 6698–709, June 10, 1985) liegt in diesem Plasmid vor. Wir haben vorher schon gezeigt, dass dieses Plasmid auf IL-6 mit einem 6 bis 8-fachen Anstieg an Luziferase-Expression reagiert (Serlupi Crescenzi et al., Poster at the 12th European Immunol., Meeting, Barcelona, Jun. 14–17, 1994).

**[0068]** Die Ergebnisse eines Experiments mit dreifach durchgeführten Transfektionen sind in **Abb. 8** dargestellt. Nach Co-Transfektion mit dem Reporter-Gen-Plasmid pHPSVL mit einem 50-fachen molaren Überschuss an Träger-Plasmid, resultierte die Induzierbarkeit durch IL-6 in einer 4-fach erhöhten Luziferase-Expression im Vergleich zum Basallevel. Im Gegensatz dazu verhinderte eine Co-Transfektion mit einem 50-fachen molaren Überschuss des Inhibitor-Plasmids pM8SV die Induzierbarkeit durch IL-6 vollständig. Das pM8SV-Inhibitor-Plasmid war daher fähig, die IL-6 Aktivität zu inhibieren, auch, wenn ein auf IL-6 antwortendes Reporter-Gen-Plasmid, das verschieden von pM8SVL war, getestet wurde (z.B. das Reporter-Gen pHPSVL).

## BEISPIEL 7

Test des Inhibitor-Plasmids pM8SV in T47D-Zellen.

**[0069]** Das pM8SV-Inhibitor-Plasmid wurde auch in dem pM8SVL-Reporter-Gen-Assay unter Verwendung von T47D humanen Brustkarzinomzellen getestet, in denen die Transduktion des IL-6-Signals unterschiedlich von dem in Hepatomzellen sein könnte. Wie vorher schon erwähnt, funktioniert der IL-6 Reporter-Gen-Assay mit dem pM8SVL-Reporter-Gen-Plasmid in dieser Zelllinie, obwohl er nicht optimiert wurde. Da die Sensitivität des Assays etwas niedriger mit den T47D-Zellen ist, wurden die Transfektionen mit  $1 \mu\text{g}$  des positiven Reporter-Gen-Plasmids/ $10^5$  Zellen durchgeführt, einer relativ großen Menge an Plasmid-DNA entsprechend. Daher wurde in diesem Experiment eine nicht-spezifische Inhibition in der Anwesenheit von im Überschuss vorliegenden Träger- oder Inhibitor-Plasmid beobachtet, was in einer höheren Variabilität der IL-6-spezifischen Inhibition resultierte.

**[0070]** Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt. Durchschnitt (AVG) und Standardabweichungen (SD) von dreifach durchgeführten Transfektionen aus 2 Experimenten sind angegeben.

**[0071]** Durchschnittliche Werte für eine x-fache Induktion wurden aus den Rohdaten jeder Transfektion berechnet.  $1$  und  $0,5 \mu\text{g}$  des Reporter-Gen-Plasmids wurden in den Experimenten 1 beziehungsweise 2 pro  $10^5$  transfizierter Zellen verwendet.

**[0072]** Separate Transfektionen von Träger-Plasmid und Inhibitor-Plasmid wurden in diesen Experimenten durchgeführt, beide Plasmide wurden in dem angegebenen molaren Überschuss in Bezug auf das Reporter-Plasmid durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 18 Stunden mit  $1 \text{ ng/ml}$  IL-6 induziert. Die angegebenen Werte der Lichtemission sind cps, integriert über eine Dauer von 30 Sekunden. Eine IL-6-spezifische Inhibition in diesen Experimenten wurde durch einen Vergleich der Induktion, die in der Anwesenheit von einem Überschuss an Inhibitor-Plasmid auftrat mit der Induktion, die in der Anwesenheit einer entsprechenden Menge an Träger-Plasmid erhalten wurde, festgestellt.

**[0073]** Darüber hinaus war der Basallevel der Luziferase-Expression, aufgrund der nicht spezifischen Inhibition, nahe dem Grenzwert für eine Quantifizierung in diesem Assay. Die in Tabelle 2 (siehe Experiment 1) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass nach dreifach durchgeführten Transfektionen, eine relevante, spezifische Inhibition der IL-6 Aktivität durch einen 20-fachen molaren Überschuss an Inhibitor-Plasmid pM8SV erhalten wurde, aber nicht durch einen 10-fachen Überschuss. Ein 50-facher molarer Überschuss des Inhibitor-Plasmids konnte in diesem Experiment nicht getestet werden, weil die unspezifische Inhibition zu groß wurde.

**[0074]** Diese Ergebnisse konnten in einem weiteren Experiment nicht reproduziert werden, wenn 0,5 µg DNA/10<sup>5</sup> Zellen verwendet wurden (Tabelle 2, siehe Experiment 2). Der Grund für das Fehlen der Reproduzierbarkeit könnte in der relativ hohen Variabilität und der geringen Sensitivität des T47D Reporter-Gen-Assays liegen. Alternativ könnten die unterschiedliche Selektivität der Zielzellen diese Ergebnisse erklären.

#### BEISPIEL 8

##### Definition der minimalen Inhibitor-DNA-Sequenz.

**[0075]** Um die minimale Inhibitor-DNA-Sequenz zu identifizieren, die noch die Eigenschaft aufweist, die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die für die Induzierbarkeit durch IL-6 relevant sind, zu inhibieren, kann der elektrophoretische Mobilitätsverschiebungs-Assay (EMSA) (nach Ausubel) verwendet werden. Ein Test für die funktionale Inhibierung, die durch die minimale Sequenz verursacht wird, kann mit dem in Beispiel 3 und den folgenden Beispielen erwähnten Reporter-Gen-Assay durchgeführt werden. Wir haben gezeigt, dass die minimale DNA-Sequenz, die funktional die IL-6 Aktivität in einem Reporter-Gen-Assay hemmen kann, das 350 Bp BamH I-Hind III-Fragment des inhibitor-Plasmids pM8SV war, das eine 8-fache Wiederholung von APRE DNA-Sequenzen enthielt und die SV40 frühe Promotor-Sequenz. Von letzterer Sequenz ist bekannt, dass sie Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren, wie AP-1-ähnliche Stellen (wie in Zenke et al., EMBO J., 5(2), pp. 387–97, 1986 beschrieben) und eine 6-fache Wiederholung von SP-1-ähnlichen Stellen (wie in Dynan et al., Cell, 35, pp. 79–87, 1983 beschrieben) enthält. Das BamH I-Hind III DNA-Fragment kann an seinen 5'- und/oder 3'-Enden durch konventionelle Techniken, wie PCR oder Nuklease-Behandlung (nach Ausubel), entfernt werden, um z.B. zwei APRE-Sequenzen zu enthalten und nur eine oder wenige Bindungsstellen für spezifische Transkriptionsfaktoren des SV40 frühen Promotors. Die resultierenden DNA-Sequenzen können für die Inhibierungs-Tests in pSVM8L-basierten Reporter-Gen-Assays in HepG2-Zellen verwendet werden.

**[0076]** Darüber hinaus kann ein minimales DNA-Fragment, das vollständig die Eigenschaft behält, das IL-6-Signal funktional zu inhibieren, in EMSA verwendet werden, durch Markierung dieser DNA mit P<sup>32</sup>-Nukleotid mit konventionellen Techniken, wie End-Markierung oder "fall-in" Klenow-Reaktionen. Das resultierende markierte DNA-Fragment kann mit nukleären Extrakten von HepG2-Zellen nach IL-6-Behandlung inkubiert werden.

**[0077]** Zunehmende Mengen an konkurrierender DNA-Sequenz können auch co-inkubiert werden, wie irgendeines der unmarkierten DNA-Fragmente, die aus den oben erwähnten Entfernungen des BamH I-Hind III-Inhibitor-DNA-Fragments resultierten. Nach Inkubation kann die Mischung mittels nicht-denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Die Bindung relevanter Transkriptionsfaktoren an die zu testenden, markierten DNA-Fragmente kann, mittels Vergleich zur erwarteten Mobilität ungebundener, markierter DNA, über eine Verschiebung in der Mobilität im Gel detektiert werden (Retardierung). Die Inhibierung dieser Bindung in Anwesenheit des Konkurrenten, unmarkierter DNA-Sequenzen, kann durch das spezifische Verschwinden von den verschobenen Gelbanden detektiert werden.

Tabelle 1 HepG2 Reportergen-Assay für IL-6. Test von pSVM8 Inhibitor-Plasmid gegen pSVM8L Reporter-Plasmid

| x-facher mol.<br>Überschuss<br>an Inhibitor | Experiment 1 |           | Experiment 2 |           | Experiment 3 |           | Experiment 4 |           |
|---|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
|   | - IL-6       | + IL-6    |
| 0   | 30.330       | 1.562.000 | 49.200       | 1.664.000 | 30.880       | 2.489.000 | 37.430       | 1.587.000 |
|   | 34.760       | 1.227.000 | 83.590       | 1.914.000 | 47.610       | 2.266.000 | 34.000       | 1.433.000 |
|   | 32.920       | 1.711.000 | 91.560       | 1.754.000 | 49.670       | 3.239.000 | 31.130       | 1.362.000 |
| 10  | 29.400       | 751.800   | 144.300      | 2.380.000 | 33.680       | 923.100   | 32.390       | 476.200   |
|   | 34.660       | 951.300   | 161.500      | 2.202.000 | 35.020       | 722.500   | 39.610       | 790.400   |
|   | 24.530       | 1.159.000 | 129.200      | 1.953.000 | 37.620       | 1.110.000 | 32.770       | 516.900   |
| 25  | 40.730       | 568.100   | 85.410       | 745.300   | 46.760       | 538.400   | 36.790       | 298.100   |
|   | 45.320       | 677.700   | 61.340       | 671.600   | 33.520       | 414.000   | 20.320       | 255.500   |
|   | 32.670       | 620.400   | 71.040       | 773.300   | 27.950       | 543.500   | 26.080       | 318.800   |
| 50  | 53.210       | 312.200   | 148.700      | 857.900   | 23.820       | 173.500   | 120.800      | 586.000   |
|   | 60.110       | 268.500   | 159.700      | 655.300   | 25.370       | 150.500   | 96.900       | 716.400   |
|   | 73.810       | 427.300   | 68.630       | 517.500   | 46.470       | 287.500   | 195.800      | 1.029.000 |

Tabelle 2 T47D-Reporter-gen-Assay für IL-6

| x-facher molarer Überschuss an Inhibitor oder Träger-Plasmid |   |                 | 10     |          | 20               |         |
|--|---|-----------------|--------|----------|------------------|---------|
|  |   |                 | AVG    | (SD)     | AVG              | (SD)    |
| EXP. 1   | Reporter-Plasmid plus Träger-Plasmid          | -IL-6           | 7832   | (3795)   | 932              | (141)   |
|  |   | +IL-6           | 423746 | (108679) | 58950            | (29703) |
|  |   | x-fache Indukt. | 61     | (27)     | 68               | (44)    |
|  | Reporter-Plasmid plus pM8-Inhibitor-Plasmid   | -IL-6           | 7498   | (2848)   | nicht detektiert |         |
|  |   | +IL-6           | 570099 | (29927)  |                  |         |
|  |   | x-fache Indukt. | 85     | (34)     |                  |         |
|  | Reporter-Plasmid plus pM8SV-Inhibitor-Plasmid | -IL-6           | 925    | (123)    | 704              | (103)   |
|  |   | +IL-6           | 98766  | (21586)  | 11416            | (11533) |
|  |   | x-fache Indukt. | 110    | (39)     | 15               | (13)    |
| EXP. 2   | Reporter-Plasmid plus Träger-Plasmid          | -IL-6           | 35320  | (20227)  | 2325             | (1019)  |
|  |   | +IL-6           | 390400 | (45230)  | 77617            | (30495) |
|  |   | x-fache Indukt. | 15     | (11)     | 35               | (8)     |
|  | Reporter-Plasmid plus pM8-Inhibitor-Plasmid   | -IL-6           | 7498   | (2256)   | nicht detektiert |         |
|  |   | +IL-6           | 570099 | (40806)  |                  |         |
|  |   | x-fache Indukt. | 85     | (14)     |                  |         |
|  | Reporter-Plasmid plus pM8SV-Inhibitor-Plasmid | -IL-6           | 925    | (495)    | 704              | (103)   |
|  |   | +IL-6           | 98766  | (64852)  | 11416            | (11533) |
|  |   | x-fache Indukt. | 110    | (8)      | 15               | (13)    |

SEQUENZ-AUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER:
  - (A) NAME: APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.
  - (B) STRASSE: 6 JOHN GORSIRAWEG
  - (C) STADT: CURACAO
  - (D) NETHERLANDS ANTILLES
  - (E) POSTLEITZAHL (ZIP): KEINE
  
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: INHIBITOREN DER IL-6 AKTIVITÄT
- (iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 6
- (iv) COMPUTERLESBARE FORM:
  - (A) MEDIUMTYP: Diskette
  - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIN Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 1

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 356 Bp
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) Strangtyp: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear
  
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SINN: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

```
CCCAGGATCC TTCTGGGAAT TCTGATCCTT CTGGGAATTC TGATCCTTCT GGGAAATCTG 60
ATCCTTCTGG GAATTCGAT CCTTCTGGGA ATTCTGATCC TTCTGGGAAT TCTGATCCTT 120
CTGGGAATTC TGATCCTTCT GGGAAATCTG ATCTGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG 180
TCCCGCCCTT AACTCCGCCC ATCCCGCCCC TAACTCCGOC CAGTTCCGCC CATTCCTCCG 240
CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GCGCGCCTCG GCCTCTGAGC 300
TATTCCLAGAA GTAGTGAGGA GGCCTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTCGAAA AAGCTT 356
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 2

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

- (A) LÄNGE: 38 Bp
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) Strangtyp: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (i) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (ii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SINN: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

```
GGATCCTTCT GGGAAATCTG ATCCTTCTGG GAATTCG
```

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 3

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

- (A) LÄNGE: 16 Bp
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) Strangtyp: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SINN: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

**CGCGGCCGCC TCGAGG**

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 4

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 24 Bp
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) Strangtyp: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SINN: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

**GATCCCTCGA GCGGGCCSCS GTAC**

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ ID NO: 5

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA
  - (A) LÄNGE: 29 Bp
  - (B) TYP: Nukleinsäure
  - (C) Strangtyp: einzeln
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTI-SINN: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

**CTACGGGTGC AGTATTGACC CTTCCTCT**

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA

(A) LÄNGE: 28 Bp

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) Strangtyp: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SINN: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

**CGCAGATCTA GCTCACTTCT CCCCCTTC**

**Patentansprüche**

1. Verwendung einer Nukleotidsequenz in der Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die für Therapien geeignet ist, um die Wirkung von IL-6 zu inhibieren, wobei die Nukleotidsequenz die IL-6 Aktivität inhibieren kann, und enthaltend:

i.) mindestens eine Nukleotidsequenz, die ein APRE-Element der allgemeinen Formel ZXMYKGKAA darstellt, wobei Z einem T oder G entspricht oder abwesend sein kann, X einem T entspricht oder abwesend sein kann, M einem C oder A entspricht, Y einem C oder T entspricht und K einem T oder G entspricht, in Verbindung mit  
ii.) mindestens einer Nukleotidsequenz, die eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle, verschieden von dem APRE-Element, darstellt.

2. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei (i) die Nukleotidsequenz TTCTGGGAA ist.

3. Die Verwendung gemäß einem der vorausgehenden Ansprüche, wobei (ii) aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus einer TATA-Box und den Bindungsstellen für die folgenden Transkriptionsfaktoren: AP-1, AP-2, HNF-1, SP-1, NF- $\kappa$ B, Oct-1, E-2 und SRR, besteht.

4. Die Verwendung gemäß einem der vorausgehenden Ansprüche, wobei das APRE-Element (i) mindestens zweimal wiederholt ist.

5. Die Verwendung gemäß Anspruch 4, wobei das APRE-Element zwischen 3 und 10 mal wiederholt ist.

6. Die Verwendung gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei das APRE-Element 8 mal wiederholt ist.

7. Die Verwendung gemäß einem der vorausgehenden Ansprüche, wobei die Sequenz (i) mindestens zwei verschiedene APRE-Elemente umfasst.

8. Die Verwendung gemäß einem der vorausgehenden Ansprüche, wobei die Sequenz (ii) mindestens zwei verschiedene Oligonukleotid-Sequenzen enthält, die eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle darstellen.

9. Die Verwendung gemäß Anspruch 8, wobei die Sequenz (ii) der SV40 frühe Promotor ist.

10. Die Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleotidsequenz der in SEQ ID NO: 1 dargestellten entspricht.

11. Die Verwendung gemäß einem der vorausgehenden Ansprüche, wobei die Nukleotidsequenz ein Plasmid-Vektor ist.

12. Die Verwendung gemäß einem der vorausgehenden Ansprüche, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung von Myelomen, Autoimmun-Krankheiten, Knochenverlust, Hyperkalzämie oder entzündliche Erkrankungen, einschließlich Rheumatoider Arthritis, Glomerulonephritis, Psoriasis oder Castelman's Krankheit, vorgesehen ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Abbildung 1 Herstellung des pM8SV-Plasmids

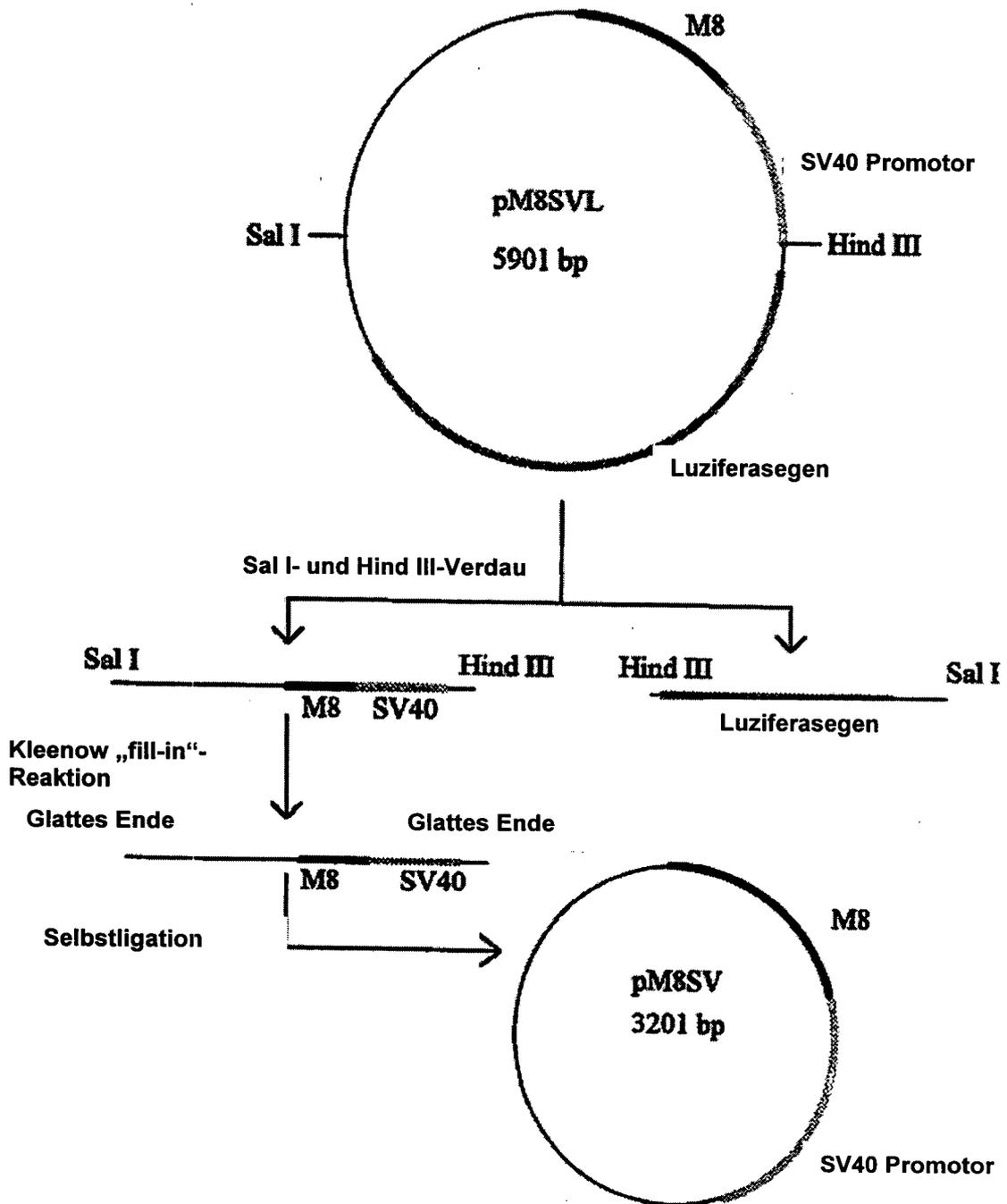


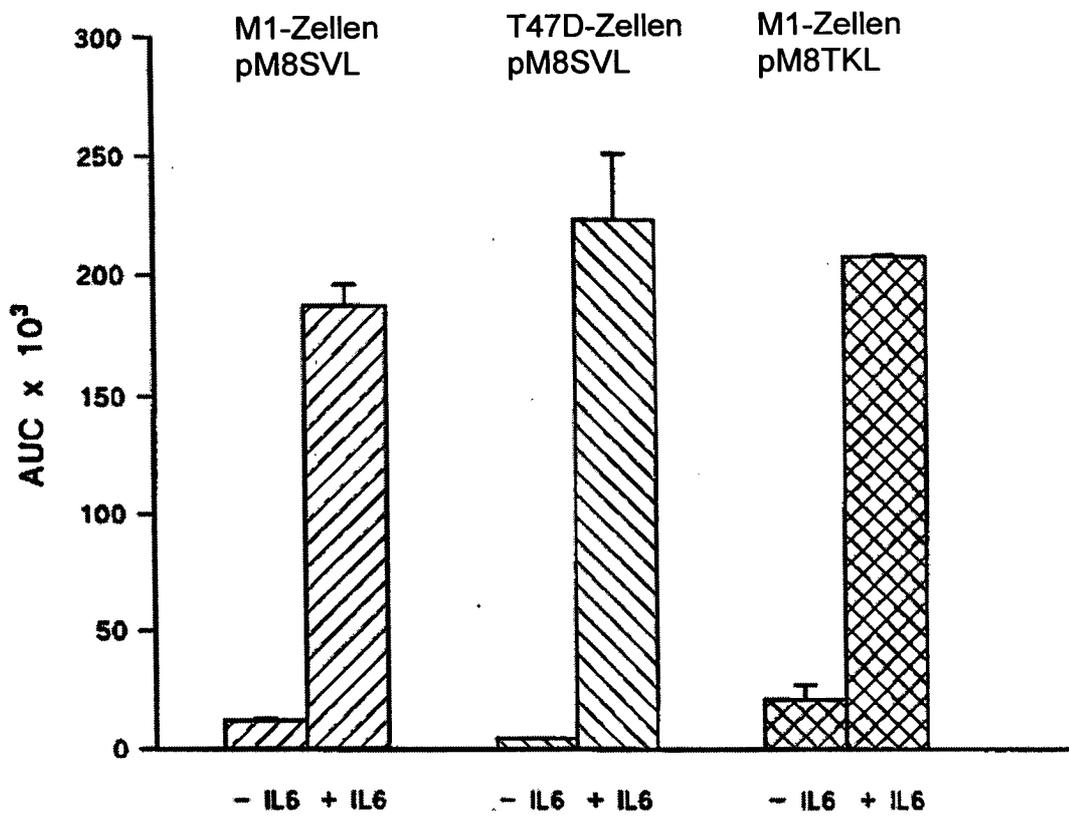
Abbildung 2 Sequenz des BamH I-Hind III-Inhibitor-DNA-Fragments von Plasmid M8SV.

```

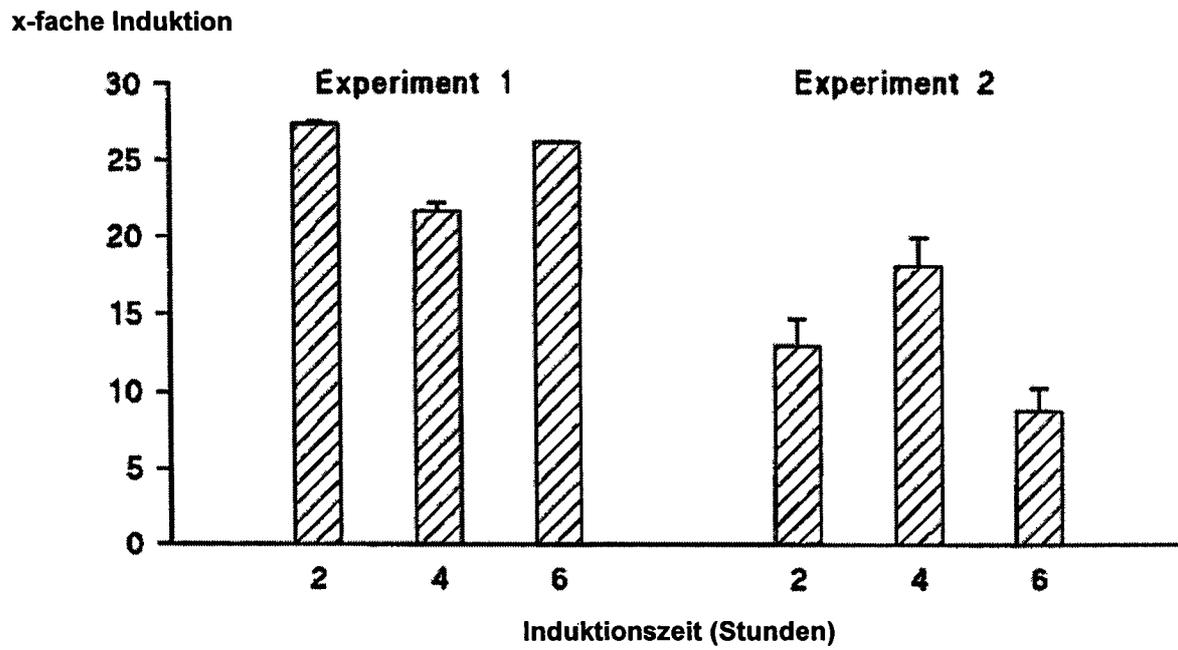
      BamHI \ _____
CCCAGGATCC TTCTGGGAAT TCTGATCCTT CTGGGAATTC 40
_____
TGATCCTTCT GGAATTCTG ATCCTTCTGG GAATTCTGAT 80
      M8-Sequenz
_____
CCTTCTGGGA ATTCTGATCC TTCTGGGAAT TCTGATCCTT 120
_____
CTGGGAATTC TGATCCTTCT GGAATTCTG ATCTGCATCT 160
_____
CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCC 200
_____
ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC 240
      SV40-Sequenz
_____
CCCATGGCTG ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA 280
_____
GGCCGCTCG GCCTCTGAGC TATTCCAGAA GTAGTGAGGA 320
_____
GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTCGAAA AAGCTT 356
      Hind III

```

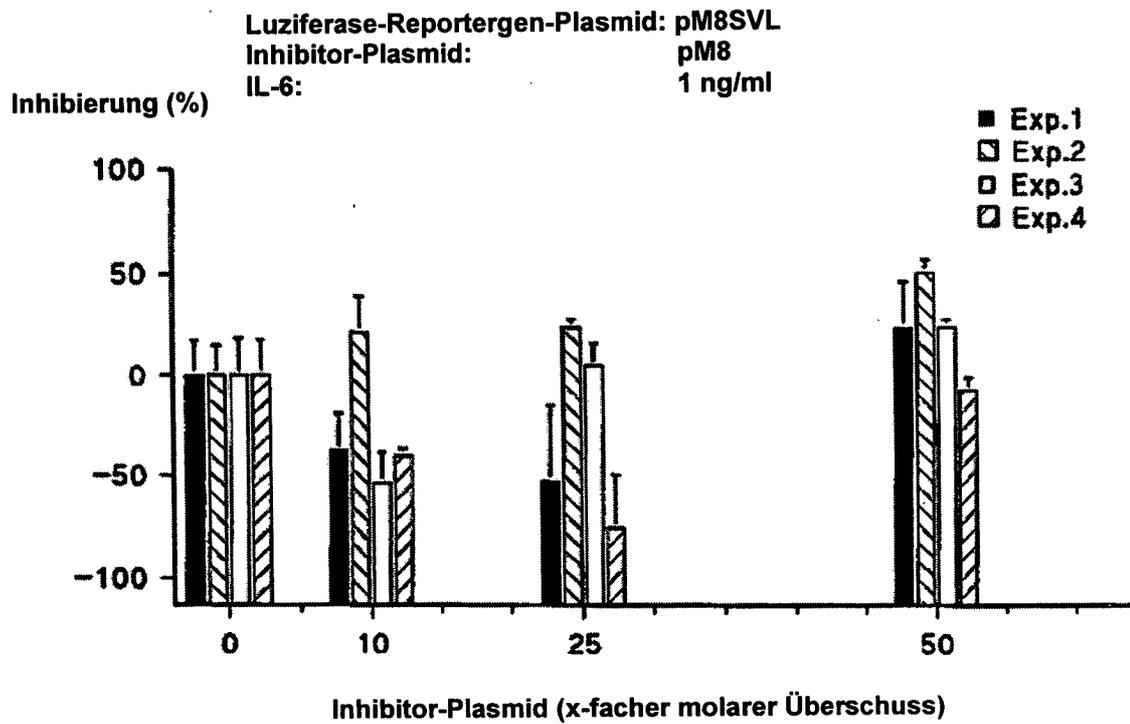
**Abbildung 3 IL-6-Reportergen-Assay in T47D- und M1-Zellen  
Test verschiedener M8-enthaltender Plasmide**



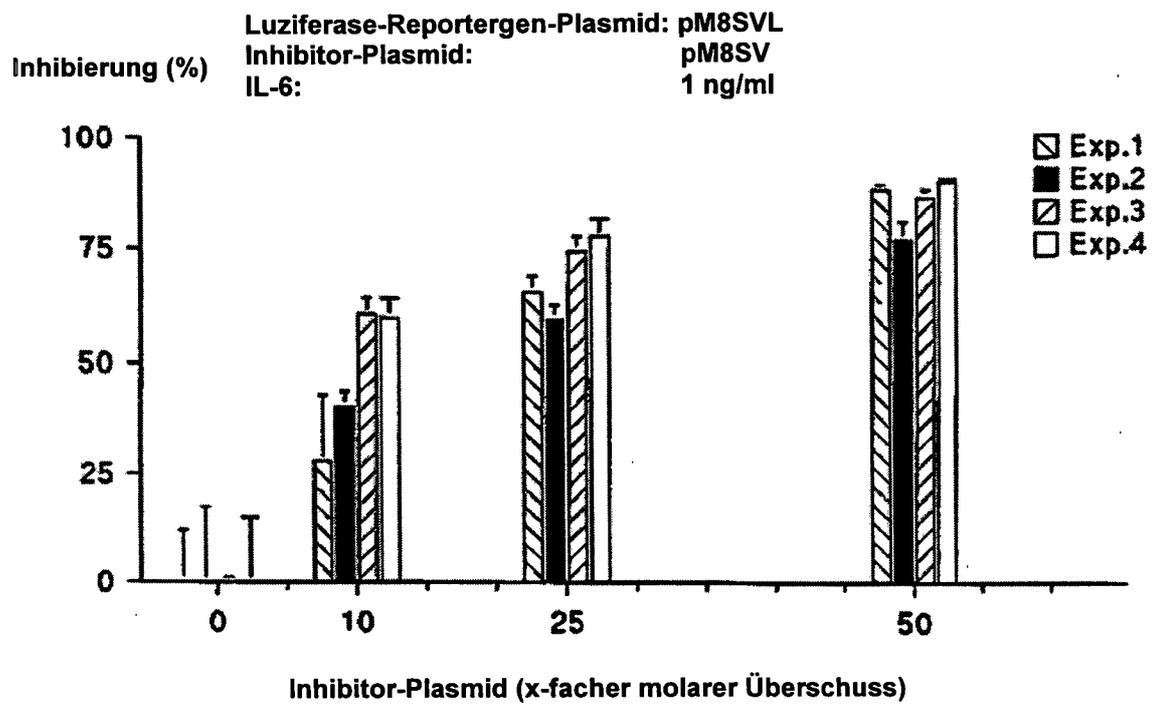
**Abbildung 4** Zeitverlauf der Luziferase-Induktion durch IL-6 in HepG2- Zellen



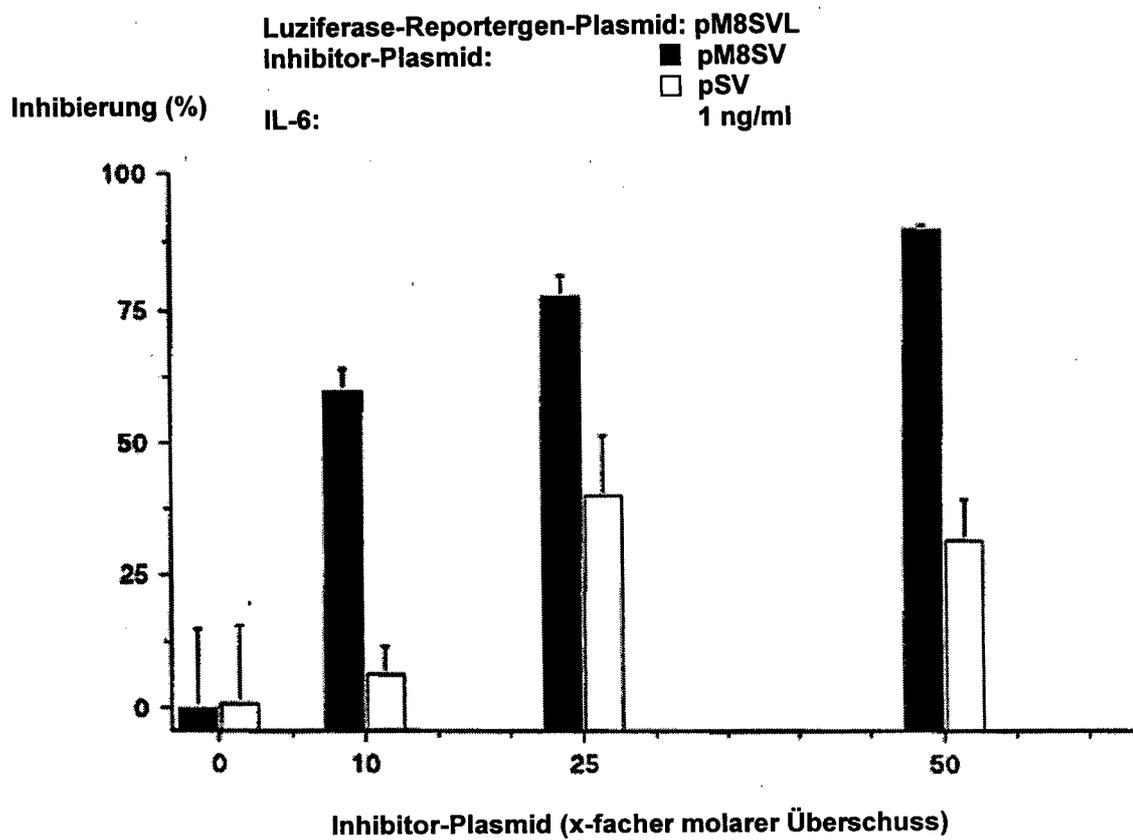
**Abbildung 5** HepG2-Reportergen-Assay für IL-6. Test von pM8-Inhibitor-Plasmid gegen pM8SVL-Reportergen-Plasmid



**Abbildung 6** HepG2-Reportergen-Assay für IL-6. Test von pM8SV-Inhibitor-Plasmid gegen pM8SVL-Reportergen-Plasmid



**Abbildung 7** HepG2-Reportergen-Assay für IL-6. Test von pSV- und pM8SV-Inhibitor-Plasmid gegen pM8SVL-Reportergen-Plasmid



**Abbildung 8** HepG2-Reportergen-Assay für IL-6. Test von Inhibitor-Plasmiden gegen pHPSVL-Reportergen-Plasmid

Luziferase-Reportergen-Plasmid: pHPSVL  
Inhibitor-Plasmid: wie gezeigt, bei 50-fachen molarem Überschuss  
IL-6: 1 ng/ml

