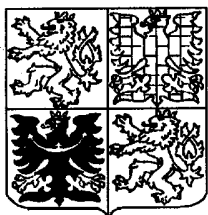


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 14.02.94
(32) 12.02.93, 16.07.93, 07.01.94
(31) 93/017931, 93/092977, 93/179748
(33) US, US, US
(40) 17.04.96

(21) 2061-95

(13) A3

6(51)

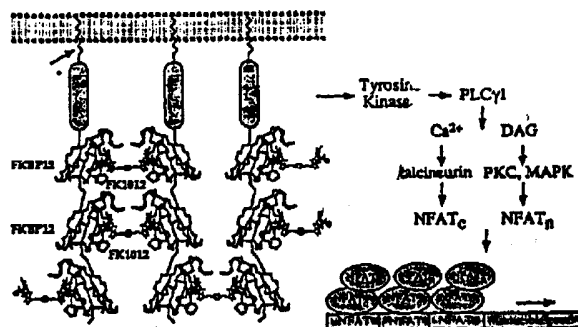
C 12 N 15/11
C 12 N 15/00
C 12 N 5/06
C 12 N 5/00
C 12 P 21/06
C 12 P 21/00

(71) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY, Stanford, CA, US;
PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE, Cambridge, MA, US;

(72) Crabtree Gerald R., Woodside, CA, US;
Schreiber Stuart L., Cambridge, MA, US;
Spencer David M., Los Altos, CA, US;
Wandless Thomas J., Cambridge, MA, US;
Belshaw Peter, Cambridge, MA, US;

(54) **Regulovaná transkripce cílených genů a jiných
biologických materiálů**

(57) Dimerizace a oligomerizace proteinů jsou biologické kontrolní mechanismy, které se podílejí na aktivaci buněčných mnoha buněčných procesů. Vyvinuli jsme obecný postup pro řízenou (indukovanou) dimerizaci nebo oligomerizaci intracelulárních proteinů. Jak je uvedeno na obrázku, mohou být jakékoliv dva cílové proteiny indukovány ke spojení zpracováním buněk nebo organismů, které je nesou, s buněčně permeabilními, syntetickými ligandy. Souhrnně, indukovali jsme: (1) intracelulární agregaci cytoplasmického konce zeta řetězce T buněčného receptoru komplexu (TCR)-CD3, což vede k signalizaci a transkripci reporter genu, (2) homodimerizaci cytoplasmického konce Fas receptoru, což vede k buněčně specifické apoptosis (programová buněčná smrt) a (3) heterodimerizaci DNA-vazebné domény (Gal4) a transkripční aktivační domény (VP16), což vede k přímé transkripci reporter genu.



2061, 95

č.j.	071115
Dod.	10. XI. 5
URAD	PRŮMYSL. VLASTNICTVÍ
PŘÍL.	

Regulovaná transkripce cílených genů a jiných biologických materiálů

Oblast techniky

Předložený vynález se týká materiálů, metod a použití, týkajících se oligomerace chimerních proteinů s dimerní nebo multimerní, výhodně nepeptidickou organickou molekulou. Aspekty vynálezu jsou znázorněny příklady rekombinantních modifikací hostitelských buněk a jejich použitím v genové terapii nebo jiných aplikacích vyvolávajících genovou expresi.

Dosavadní stav techniky

Biologická specifita obvykle vzniká z vysoce specifických interakcí mnoha proteinů. Jako příklad tohoto principu je možno uvést signální transdukci, proces při kterém extracelulární molekuly ovlivňují intracelulární vztahy. Mnohé z drah pocházejí z vazby extracelulárních ligandů k receptorům buněčného povrchu. V mnoha případech vede receptorová dimerizace ke transfosforylaci a posílení proteinu tak, že pokračuje signální kaskáda. Domněnka,, že membránové receptory by mohly být aktivovány homodimerizací vznikly z pozorování, že receptory by mohly být aktivovány protilátkami, které křížově spojují dva receptory. Následně bylo nalezeno mnoho receptorů, které se podílejí na těchto vlastnostech. Extracelulární a transmembránové regiony mnoha receptorů jsou považovány za funkční při přenosu cytoplasmických domén receptorů v těsné podobnosti na ligandu závislou dimerizací nebo oligomerizací, protože cytoplasmické domény receptoru vedou specifické signály ke vnitřním prostorům buněk.

V dalších pracech byly hodnoceny ligand-receptorové interakce v různých systémech. Například Clark a spol. Science (1992) 258, 123 popisuje cytoplasmické efekторы B-buněčného antigen receptorového komplexu. Durand a spol. Mol.Cell.Biol. (1988)8, 1715, Verweij a spol., J.Biol.Chem. (1990)265, 15788 a Shaw a spol., Science (1988)241, 202 uvádějí, že NF-AT-řízená transkripce je rigorózně pod kontrolou antigen receptoru. Inhibice NF-AT-řízené transkripce cyclosporinem A a FK506 je popsána Emmelem a spol., Science (1989), 246, 1617 a Flanaganem a spol., Nature (1991) 352, 803. Durand a spol., Mol.Cell.Biol. (1988) 8, 1715 a Mattila a spol., EMBO J.(1990), 9, 4425 popisují NF-AT vazebná místa. Reference, popisující řetězec, zahrnují práce Orlova a spol., Nature(1990)347, 189-191; Kinet a spol. Cell (1989) 57, 351-354; Weisman a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA (1988)85,9709-9713 a Lanier, Nature (198) 342, 803-805. CD4 imunoaderin je popsán Byrnem a spol. Nature (1990), 344, 667-670. CD8- fuzovaný protein je popsán Irvingem a spol., Cell (1992), 64, 891. Viz také Letourner a Klausner, Science (1992) 255, 79.

Ilustrativní články, popisující transkripční faktorovou asociaci s promotorovými regiony a oddělenou aktivaci a DNA vazbu transkripčních faktorů zahrnují: Keegan a spol., Nature (1986) 231, 699; Fields a Song, ibid (1989) 340, 245; Jones, Cell (1990) 61, 9; Lewin, Cell (1990) 61, 1161; Ptashne a gann, Nature (1990) 346, 329; Adams a Workman, Cell (1993) 72, 306.

Ilustrativní články popisující vesiklové cílení a fuzi zahrnují: Sollner a spol. (1993) Nature 362, 318-324 a Bennett a Schellere (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90, 2559-2563.

Ilustrativní články, popisující proteinovou degradaci zahrnují: Hochstrasser a spol., (1990) Cell 61, 697; Scheffner M. a spol. (1993) Cell 75, 495, Rogers a spol. (1986) Science 234, 364-368.

Ilustrativní publikace poskytující další informace, týkající se syntézních technik a modifikací ve vztahu k FK506 a příbuzných sloučenin zahrnují: GB 2244991 A; EP 0455427 A1; WO 91/17754; EP 0465426 A1; US 5023263 a WO 92/00278.

Nicméně jak bude zřejmé z tohoto popisu, žádný z předchozích autorů nepopisuje nebo nenaznačuje předložený vynález. Náš vynález, který bude dále podrobně popsán, zahrnuje obecně aplikovatelnou metodu a materiály pro použití proteinové homodimerizace, heterodimerizace a oligomerizace v žijících buňkách. Chimérní odpovídající proteiny jsou intracelulárně exprimovány jako fuzní proteiny se specifickou receptorovou doménou. Ošetření buněk s pro buňky pertmeabilním multivalentním ligandovým činidlem, které se váže k receptorové doméně vede k dimerizaci nebo oligomerizaci chiméry. Analogicky k jiným chimérním receptorům (viz např. Weiss, Cell (1993) 73, 209), jsou chimérní proteiny vytvářeny tak, že oligomerozace spouští požadované následné kroky, např. propagaci intracelulárního signálu přes následné interakce protein-protein a tím aktivaci specifické podskupiny transkripčních faktorů. Počátek transkripce může být detegován použitím zkoušky reporter-genu. Intracelulární zesílení chimerních proteinů syntetickými ligandy má využití v základním hodnocení různých celulárních procesů a v regulaci syntézy proteinů, které jsou terapeuticky nebo agrikulturně důležité. Dále ligandem zprostředkovaná oligomerizace nyní umožňuje řízenou genovou terapii. Poskytuje značný posun ve zvýšení bezpečnosti, expresní

hladiny a obecně účinnosti získané s genovou terapií.

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje nové chimerní (nebo "fuzované") proteiny a malé organické molekuly schopné oligomerizace chimerních proteinů. Chimerní proteiny obsahují alespoň jednu ligand-vázající (nebo "receptor") doménu fuzovanou k další ("akční") doméně, jak je detailně popsáno dále. Jak bude také popsáno, mohou chimerní proteiny obsahovat i další domény. Tyto chimerní proteiny jsou rekombinantní v tom smyslu, že různé domény jsou odvozeny z různých zdrojů a jako takové nejsou společně v přírodě nacházeny (tj. jsou heterologní).

Geny, tj. RNA nebo výhodně DNA molekuly se zde označují jako "genetické" nebo "DNA" konstrukty), které kodují nové chimerní proteiny a popřípadě cílové geny, jsou poskytovány pro genetické zpracování hostitelských buněk. Poskytnuty jsou také metody a kompozice pro poskytnutí a použití takových modifikovaných buněk. Zpracované buňky podle tohoto vynálezu obsahují alespoň jeden takový chimerní protein nebo první serie genetických konstruktů, kodujících chimerní protein(y). Tyto konstrukty jsou rekombinantní ve smyslu, že podíly kompetent, např. kodující jednotlivou doménu nebo expresi řídicí sekvenci, nebyly nalezeny přímo vzájemně spojené v přírodě (tj. jsou heterologní).

Jeden z DNA konstruktů podle vynálezu koduje chimerní protein, obsahující (a) alespoň jednu receptorovou doménu (schopnou vazby k vybranému ligandu) fuzovanou k (b) heterologní další ("akční") proteinové doméně. Významné je,

že ligand je schopen vazby ke dvěma (nebo více) receptorovým doménám, tj. chimérní proteiny, obsahující takové receptorové domény, buď po sobě nebo současně, výhodně s Kd hodnotou pod asi 10^{-6} , výhodněji pod asi 10^{-7} , a ještě výhodněji pod asi 10^{-8} a v některých provedeních pod asi 10^{-9} M. Ligand výhodně není protein a má molekulovou hmotnost menší než asi 5 kDa. Receptorové domény takto oligomerizovaných chimérních proteinů mohou být stejné nebo rozdílné. Chimérní proteiny jsou schopny iniciace biologického procesu po vystavení ligandu, tj. po vzájemné oligomerizaci. Kodovaný chimérní protein může dále obsahovat intracelulární cílovou doménu schopnou řízení chimérního proteinu k požadovanému buněčnému prostoru. Cílová doména může být například sekreční leader sekvence, membránová překlenovací doména, membránová vazebná doména nebo sekvence řízená k proteinu pro spojení s vesikly nebo s jádry.

Akční domény chimérních proteinů mohou být vybrány ze širokého množství proteinových domén schopných ovlivňovat požadovaný biologický výsledek při oligomerizaci chimérního proteinu(ů). Například akční doména může obsahovat proteinovou doménu jako je CD3 zeta podjednotka schopná při vystavení ligandu a následné oligomerizaci, iniciace detegovatelného intracelulárního signálu; DNA-vazebný protein jako je Gal 4; nebo transkripční aktivační doména jako je VP16. Je zde poskytnuto mnoho dalších příkladů. Jedním z příkladů detegovatelného intracelulárního signálu je signál aktivující transkripci genu za transkripční kontroly transkripčního kontrolního prvku (např. prvky enhancer/promotor a podobně), který je odpovědný za oligomerizaci.

Jak je dále podrobněji popsáno, v různých provedeních tohoto vynálezu je chimérní protein schopen se

vázat k ligandu typu FK506, ligandu typu cyklosporinu A, tetracyklinovému nebo steroidnímu ligandu. Taková vazba vede k oligomerizaci chimérodního proteinu s jinými chimérodními proteinovými molekulami, které mohou být stejné nebo rozdílné.

Buňky výhodně obsahují dále druhý rekombinantní genetický konstrukt, nebo druhé serie takového konstruktu(ů), obsahujících cílový gen za kontoly transkripce transkripčním kontrolním prvkem (např. promotor/enhancer) odpovědný za signál spouštěný ligandem-zprostředkovanou oligomerizací chimérodních proteinů, tj. na vystavení ligandu. Tyto konstrukty jsou rekombinantní v tom smyslu, že cílový gen je nepřírozený za transkripční kontroly odpovědného transkripčního kontrolního prvku.

V jednom aspektu vynálezu DNA konstrukt obsahuje (a) transkripční kontrolní element odpovědný za oligomerizaci chimérodního proteinu jak je popsáno výše a (b) přiléhající DNA sekvenci od cílového genu zprostředkující homologní rekombinaci transkripčního kontrolního prvku v hostitelské buňce ve spojení s cílovým genem. V jiných provedeních konstrukt obsahuje požadovaný gen a lemující sekvenci od cílového místa, zprostředkující homologní rekombinaci cílového genu do požadovaného lokusu. Konstrukt může také obsahovat odpovědný transkripční kontrolní element, nebo odpovědný element může být poskytnut v lokusu. Cílový gen může kodovat povrchový membránový protein, sekretovaný protein, cytoplasmický protein nebo ribozym nebo pozitivní sekvenci.

Konstrukty podle vynálezu mohou také obsahovat selektující marker, zprostředkující transfekci konstruktů do

hostitelských buněk a selekci transfektantů, obsahujících konstrukt. Předložený vynález dále zahrnuje DNA vektory, obsahující takové konstrukty, jak pro episomální transfekci tak pro integraci do chromosomů hostitelské buňky. Tento vektor může být virální vektor, obsahující například adeno-, adeno asociovaný nebo retrovirální vektor.

Tento vynález dále zahrnuje chimérní protein, kodující jakýkoliv z našich DNA konstruktů, jakož i buňky jej obsahující a/nebo eprimující, zahrnující prokaryotické a eukaryotické buňky a zejména, kvasinkové, červové, hmyzí, myší buňky nebo buňky jiných hlodavců, a další savčí buňky, zahrnující lidské buňky různých typů a rodů, jak zmrazené tak aktivně rostoucí, jak v kultuře nebo v celém organismu je obsahující.

Například v jednom aspektu poskytuje tento vynález buňky, výhodně ale ne nezbytně savčí, které obsahují první DNA konstrukt, kodující chimérní protein, obsahující (i) alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k selektovanému oligomerizujícímu ligandu podle tohoto vynálezu a (ii) další proteinovou doménu, heterologní s ohledem na receptorovou doménu, ale schopnou, za oligomerizace s jednou nebo více podobnými doménami, spuštění aktivace transkripce cílového genu za transkripční kontroly transkripčním kontrolním prvkem odpovědným za uvedenou oligomerizaci. Buňky dále obsahují cílový gen pod expresní kontrolou transkripčním kontrolním prvkem odpovědným za uvedenou oligomerizaci ligandu. Následné vystavení selektovanému ligandu exprimuje cílový gen.

V dalším aspektu poskytuje vynález buňky, které obsahují první set DNA konstruktů, kodujících první chimérní protein,

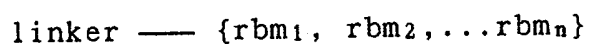
obsahující DNA-vazebnou doménu a alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k první vybrané ligandové skupině. Buňka dále obsahuje druhý chiménní protein, obsahující transkripční aktivační doménu a alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby ke druhému selektovanému ligandu (které mohou být stejné nebo se lišit od první selektované ligandové skupiny). Buňky dále obsahuje DNA konstrukt, kodující cílový gen pod transkripční kontrolou heterologní transkripční kontrolní sekvence, který se váže sDNA-vazebnou doménou a je odpovědný za transkripční aktivační doménu tak, že buňka exprimuje cílový gen po vystavení substanci, kodující selektované ligandové skupiny(u).

Jsou také poskytnuty DNA kompozice, obsahující první DNA konstrukt, kodující chiménní protein, obsahující alespoň jednu receptorovou doménu, schopnou vazby k selektovanému ligandu, fuzovanou k heterologní další proteinové doméně, schopný vazby k selektovanému ligandu, fuzovaný k heterologní další proteinové doméně schopné iniciace biologického procesu po vystavení oligomerizujícímu ligandu, tj. za oligomerizace chiménního proteinu; a druhý DNA konstrukt, kodující cílový gen pod transkripční kontrolou transkripčním kontrolním prvkem odpovědným za oligomerizaci ligandu.

Další příkladná DNA kompozice podle vynálezu obsahuje první serie DNA konstruktů, kodujících první a druhý chiménní protein a druhý DNA konstrukt, kodující cílový gen za transkripční kontroly transkripčním kontrolním prvkem odpovědným za oligomerizaci chiménních proteinových molekul. DNA konstrukt, kodující první chiménní protein obsahuje (a) alespoň jednu první receptorovou doménu schopnou vazby k vybraném první ligandové skupině, fuzovaný k (b) heterologní - další proteinové doméně schopné iniciace

biologického procesu po vystavení oligomerizačnímu ligandu, tj. po oligomerizaci prvního chimérického proteinu ke druhé chimérické proteinové molekule. DNA konstrukt, kodující druhý chimérický protein obsahuje (i) alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k vybrané druhé ligandové skupině, fuzovaný k (ii) heterologní další proteinové doméně schopné iniciace biologického procesu při vystavení oligomerizačnímu ligandu, tj. při oligomerizaci k prvnímu chimérickému proteiinu. První a druhá receptorová skupina mohou být v takových případech stejné nebo rozdílné a první a druhá vybraná ligandová skupina mohou být podobně stejné nebo rozdílné.

Naše ligandy jsou molekuly schopné vazby ke dvěma nebo více chimérickým proteinovým molekulám podle tohoto vynálezu za tvorby jejich oligomeru a mají vzorec



kde n je celé číslo od 2 do asi 5, $\text{rbm}_{(1)}\text{--}\text{rbm}_{(n)}$ jsou receptor vázající skupiny, které mohou být stejné nebo rozdílné a které jsou schopny vazby k chimérickému proteinu(ům). rbm skupiny jsou kovalentně připojeny k linkerové skupině, kterou je bi- nebo multifunkční molekula schopná být kovalentně připojena ("—") ke dvěma nebo více rbm skupinám. Výhodně má ligand molekulovou hmotnost menší než asi 5 kDa a není to protein. Příklady takových ligandů zahrnují ty, ve kterých rbm skupiny jsou stejné nebo rozdílné a zahrnují skupinu FK506-typu, skupinu cyklosporinového typu, steroid nebo tetracyklin. Skupiny cyklosporinového typu zahrnují cyklosporin a jeho deriváty, které jsou schopny navázání k cyklofylinu, přirozeně se vyskytujícímu nebo modifikovanému, výhodně s Kd hodnotou pod asi 10⁻⁶M. V

některých provedeních je výhodné, že se ligand váže k přirozeně se vyskytujícímu receptoru s K_d hodnotou větší než asi $10^{-6}M$ a výhodněji větší než asi $10^{-5}M$. Ilustrativní ligandy podle tohoto vynálezu jsou, ve kterých alespoň jeden rbm obsahuje molekulu FK506, FK520, rapamycinu nebo jeho derivátů, modifikovanou na C9, C10 nebo na obou, ligandy, vázajícími k modifikovanému receptoru nebo chiméřní molekule, obsahující modifikovanou receptorovou doménu s K_d hodnotou alespoň jeden a výhodně 2 a výhodněji 3 a ještě výhodněji 4 nebo 5 nebo více řádově menších než jejich K_d hodnoty vzhledem k přirozeně se vyskytujícímu receptorovému proteinu. Linkerové skupiny jsou také popsány podrobněji dále, ale pro ilustraci zahrnují takové skupiny jako je C2-C20 alkylen, C4-C18 azalkylen, C6-C24 N-alkylenazalkylen, C8-C18 arylen, C8-C24 ardialkylen nebo C8-C36 biskarboxamidoalkylenovou skupinu.

Monomerní rbm podle tohoto vynálezu, jakož i sloučeniny, obsahující prosté kopie rbm, které jsou schopny se vázat k našim chiméřním proteinům, ale neovlivňovat dimerizaci nebo jejich oligomerizaci vyššího řádu (z hlediska monomerního charakteru jednotlivého rbm) jsou oligomerizačními antagonisty.

V jednom provedení, geneticky zpracované buňky podle tohoto vynálezu mohou být použity pro regulovanou produkci požadovaného proteinu. V takovém provedení buňky, zpracované v souladu s tímto vynálezem pro expresi požadovaného genu za ligandem vyvolané regulace, rostou v kultuře za běžných podmínek. Přídavek ligandu ke kultivačnímu mediu vede k expresi požadovaného genu a produkci požadovaného proteinu. Exprese genu a produkce proteinu může být obrácena přídavkem činidla, které je antagonistou oligomerizace k mediu, jak je

podrobněji popsáno dále. Alternativně může být tento vynález použit pro zapracování ligandem indukovatelných charakteristik buněčné smrti do buněk. Takové zpracované buňky pak mohou být eliminovány z buněčné kultury po té, co posloužily svému zamýšlenému účelu (např. produkci požadovaného proteinu nebo jiného produktu) přidavkem ligandu k mediu. Zpracované buňky podle tohoto vynálezu mohou být také použity in vivo, k modifikaci celého organismu, výhodně zvířat, včetně lidí, např. tak, že buňky produkují požadovaný protein nebo jiné vedou k živočichovi, obsahujícímu takové buňky. Takové použití zahrnuje genovou terapii. Alternativně chimérické proteiny a oligomerizující molekuly mohou být použity extracelulárně k uvedení proteinů do vzájemného kontaktu, který působí tak, že iniciuje fyziologickou akci.

Tento vynález tak poskytuje materiály a metody pro dosažení biologického vlivu na buňky v odezvě na přídavek oligomerizujícího ligandu. Metoda zahrnuje poskytnutí buněk zpracovaných v souladu s tímto vynálezem a vystavení buněk ligandu.

Například jedním provedením vynálezu je metoda pro aktivaci transkripce cílového genu v buňkách. Metoda zahrnuje poskytnutí buněk, obsahujících a schopných exprese (a) alespoň jeden DNA konstrukt, kodující chimérní protein podle tohoto vynálezu a (b) cílový gen. Chimérní protein obsahuje alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k vybranému oligomerizačnímu ligandu. Receptorová doména je fuzována k akční doméně schopné - po vystavení oligomerizujícímu ligandu, tj. za oligomerizace s jedním nebo více chimérními proteiny, obsahujícími další kopii z akční domény- z iniciace intracelulárního signálu. Tento signál je schopen aktivace transkripce genu, jako je cílový gen v tomto případě, který

je pod transkripční kontrolou transkripčního kontrolního prvku odpovědného za tento signál. Metoda tak zahrnuje vystavení buněk oligomerizačnímu ligandu schopnému vázat se k chimérickému proteinu v množství účinném k dosažení exprese cílového genu. V případech, ve kterých buňky rostou v kultuře, jejich vystavení ligandu je ovlivněno přidavkem ligandu ke kulturnímu mediu. V případech, ve kterých jsou buňky přítomny v hostitelském organismu, je jejich vystavení ligandu ovlivněno podáním ligandu hostitelskému organismu. Například v případech, ve kterých je hostitelským organismem živočich, zejména savec (včetně člověka), je ligand podáván hostitelskému živočichovi orálně, bukálně, sublinguálně, transdermálně, subkutánně, intramuskulárně, intravenózně, intra-joint nebo inhalačním podáním ve vehikulu, které je pro něj vhodné.

Tento vynález dále zahrnuje farmaceutický přípravek, obsahující oligomerizační ligand podle tohoto vynálezu ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem a popřípadě s jednou nebo více farmaceuticky přijatelnými přísadami pro aktivaci transkripce cílového genu, například, nebo pro ovlivnění jiného biologického výsledku podle tohoto vynálezu, v subjektu, obsahujícím zpracované buňky podle vynálezu. Oligomerizační ligand může být homo-oligomerizační činidlo nebo heteroligomerizační činidlo jak je popsáno dále podrobněji. Podobně tento vynález dále zahrnuje farmaceutický přípravek, obsahující antagonistu oligomerace podle tohoto vynálezu ve směsi s farmaceuticky přijatelným nosičem a popřípadě s jednou nebo více farmaceuticky přijatelnými přísadami pro redukci, vcelku nebo částečně, hladiny oligomerizace chimerních proteinů v zpracovaných buňkách podle tohoto vynálezu v subjektu a tak pro deaktivaci transkripce cílového genu, například, nebo zastavení dalšího

biologického výsledku podle tohoto vynálezu. Použití oligomerizačních činidel a oligomerizačních antagonistických činidel pro přípravu farmaceutických přípravků je zahrnuto do rozsahu tohoto vynálezu.

Tento vynález také poskytuje metodu pro získání hostitelského organismu, výhodně živočicha, a v mnoha případech savce, citlivého na oligomerizační ligand podle tohoto vynálezu. Metoda zahrnuje zavedení inženýrsky zpracovaných buněk v souladu s tímto vynálezem do organismu, tj. obsahujících DNA konstrukt, kodující chimérní protein a tak dále. Alternativně, je možno zavést DNA konstrukty podle tohoto vynálezu do hostitelského organismu, např. savce za podmínek způsobujících transfekci jedné nebo více buněk hostitelského savce.

Dále jsou poskytnuty kity pro výrobu buněk citlivých k ligandu podle tohoto vynálezu. Jeden kit obsahuje alespoň jeden DNA konstrukt, kodující jeden z našich chimérních proteinů, obsahujících alespoň jednu receptorovou doménu a akční doménu (jak jsou popsány samy o sobě). Kit může obsahovat více ligandů podle tohoto vynálezu, schopných oligomerizovat molekuly chimérního proteinu, kodované DNA konstrukty kitu a může obsahovat přídavek množství oligomerizačního antagonisty, např. monomerního ligandového činidla. Jestliže je samotný chimérní protein kodován konstruktem(ty), je oligomerizační ligand ligand homooligomerizační. Jestliže je kodován více než jeden takový chimérní protein, může být zahrnut hetero-oligomerizační ligand. Kit může dále obsahovat "druhé serie" DNA konstrukt, kodujícího cílový gen a/nebo transkripční kontrolní element citlivý k oligomerizaci chimérních proteinových molekul. DNA konstrukty budou výhodně spojeny s jedním nebo více

selekčními markery pro běžnou selekci transfektantů, jakož i jinými běžnými vektorovými prvky vhodnými pro replikaci v prokaryotech, pro expresi v eukaryotech a podobně. Selekcí markery mohou být stejné nebo rozdílné pro každý rozdílný DNA konstrukt, umožňující selekci buněk, které obsahují každý takový DNA konstrukt(y).

Například jeden z kitů podle tohoto vynálezu obsahuje první DNA konstrukt, kodující chimérní protein, obsahující alespoň jednu receptorovou doménu (schopnou vazby k selektovanému ligandu), fuzovanou k transkripční aktivátorové doméně; druhý DNA konstrukt, kodující druhý chimérní protein, obsahující alespoň jednu receptorovou doménu (schopnou vazby k selektovanému ligandu), fuzovaný k DNA vazebné doméně; a třetí DNA konstrukt, kodující cílový gen za kontroly transkripčním kontrolním prvkem, obsahujícím DNA sekvenci, ke které se váže DNA vazebná doména a která je transkripčně aktivována vystavením ligandu za přítomnosti prvního a druhého chimérního proteinu.

Alternativně, DNA konstrukt pro zavedení cílového genu pod kontrolou odpovědného transkripčního kontrolního prvku může obsahovat klonovací místo v cílovém genu za poskytnutí kitu pro inženýring buněk pro vyvolání exprese genu pro realizaci odborníkem.

Jiné kity podle tohoto vynálezu mohou obsahovat jeden nebo dva (nebo více) DNA konstrukty pro chimérní proteiny, ve kterých jeden nebo více obsahuje klonovací místo v akční doméně (transkripční iniciační signální generátor, transkripční aktivátor, DNA vazebný protein atd.), umožňující uživateli inzertovat jakoukoliv z akčních domén podle požadavků. Takový kit může popřípadě obsahovat jiné prvky jak

je popsáno výše, např. DNA konstrukt pro cílový gen zaodpovědné expresní kontroly, oligomerizační ligand, antagonistu atd.

Jakýkoliv z těchto kitů může také obsahovat pozitivní kontrolní buňky, které byly stabilně transformovány konstrukty podle vynálezu, jako jsou ty, které exprimují reporterový gen (pro CAT, beta-galaktosidázu nebo jakýkoliv běžně detegovatelný genový produkt) v odpovědi na vystavení buněk ligandu. Mohou být také poskytnuta činidla pro detekci a/nebo kvantifikaci exprese reporterového genu.

Popis obrázků na přiložených výkresech

Obr. 1 je diagram plasmidu pSXNeo/IL2 (IL2-SX). V NF-AT-SX je HindIII-ClaI DNA fragment z IL2-SX, obsahující IL2 enhancer/promotor, nahrazen minimálně IL-2 promotorem, umožňujícím bazální transkripci a indukovatelný element, obsahující tři tandemy NFAT-vazebná místa (popsáno dále).

Obr. 2 je průtokový diagram přípravy intracelulárních signálních chimérních plasmidů p#MXFn a p#MFnZ, kde n znamená počet vazebných domén.

Obr. 3A a 3B jsou průtokové diagramy přípravy extracelulárního chimérního plasmidu p#lFK3/pBJ5.

Obr. 4A, 4B a 4C jsou sekvence primérů použitých v konstrukci plasmidů použitých v tomto vynálezu.

Obr. 5 je mapou odezvy reporterových konstruktů, majících různé enhancerové skupiny na reakci receptoru TAC/CD3 s ligandem.

Obr. 6 je mapa aktivity různých ligandů s TAg Jurkat buňkami popsány v příkladu 1.

Obr. 7 je mapa aktivity ligandu FK1012A /8, obr. 9B) s extracelulárním receptorem 1FK3 (FKBPx3/CD3).

Obr. 8 je mapa aktivace NFAT reporteru signalizací přes myristoylatovanou CD3 /FKBP12 chiméru.

Obr. 9A a 9B jsou chemické vzore allyl-napojených FK506 variant a cyklohexyl-napojených FK506 variant.

Obr. 10 je průtokový diagram syntézy derivátů FK520.

Obr. 11A a B jsou průtokový diagram syntézy derivátů FK520 a chemických struktur FK520, kde spodky struktur jsou tvarovány pro vazbu k mutantu FKBP12.

Obr. 12 je diagramové znázornění mutantu FKBP s modifikovaným FK520 v domnělém rozštěpení.

Obr. 13 je průtokový diagram syntézy heterodimerů FK520 a cyklosporinu.

Obr. 14 je schematické znázornění oligomerizace chimerních proteinů, ilustrované chimérními proteiny, obsahujícími imunofilinovou skupinu jako receptorovou doménu.

Obr. 15 znázorňuje ligandem zprostředkovanou oligomerizaci chimerních proteinů, se schematickým uvedením spuštění transkripčního iniciačního signálu.

Obr. 16 znázorňuje schemata syntézy HED a HOD činidel na bázi skupin typu FK-506.

Obr. 17 znázorňuje syntézu (CsA)₂ začínající s CsA.

Obr. 18 je přehled fúze cDNA konstruktů a proteinu MZF3E.

Obr. 19 znázorňuje ko-imunoprecipitaci MZF1E_h s MZF1E_f za přítomnosti FK1012 (E_h: Flu-epitop-tag, E_f: Flag-epitop-tag).

Obr. 20 představuje FK1012-indukovanou buněčnou smrt Jurkat T-buněčné linie transfektované s myristoylovaným Fas-FKBP12 fúzním proteinem (MFF3E), jak je indikováno sníženou transkripční aktivitou buněk.

Obr. 21 je analýza cyklofilin-Fas (a Fas-cyklofilin) fúzních konstruktů v přechodné transfekční zkoušce. MC3FE byl v této serii nejaktivnější.

Obr. 22 znázorňuje imunoilin-Fas antigen chiméry a výsledky pokusů přechodné exprese v Jurkat T buňkách stabilně transformovaných velkým T-antigenem. Myr: myristylační sekvence odebraná z pp60^{c-src} kodující zbytky 1-14 (Wilson a spol., Mol & Cell Biol 9 4 (1989); FKBP: lidský FKBP12; CypC: myší cyklofilin C sekvence, kodující zbytky 36-212 (Freidman a spol., Cell 66 4 (191): 799-806); Fas: intracelulární doména lidského Fas antigenu, kodující zbytky 179-319 (Oehm a spol., J.Biol.Chem. 267 15 (1992): 10709-15). Buňky byly elektroporovány plasmidem, kodujícím reporterový gen sekretované alkaické fosfatázy pod kontrolou 3 tandemu AP1 promotorů spolu se šestinásobným molárním přebytkem imunoilinového fúzního konstruktů. Po 24 hodinách byly buňky stimulovány s PMA (50 ng/ml), který stimuluje syntézu

reporterového genu a (CsA(2. Za 48 hodin byly buňky zkoumány na aktivitu reporterového genu. Western bloty byly provedeny po 24 h za použití anti-HA epitopových protilátek.

Obr. 22 znázorňuje výsledky CAT zkoušky z příkladu 8.

Obr. 23 znázorňuje syntézu modifikovaných sloučenin typu FK-506.

Popis

1. Obecná diskuse

Tento vynález poskytuje chiménní proteiny, organické molekuly pro oligomerizaci chiménních proteinů a systém pro jejich použití. Fuzované proteiny mají vazebnou doménu pro vazbu k (výhodně malým) organickým oligomerizujícím molekulám a akční doménu, která může ovlivňovat fyziologické působení nebo celulární proces jako výsledek oligomerizace chiménních proteinů.

Základní koncept pro vyvolání proteinové asociace je ilustrován na obr. 14. Ligandy, které mohou působit jako heterodimerizační (nebo heterooligomerizační, "HED") a homodimerizační (nebo homo-oligomerizační "HOD") činidla, jsou znázorněny jako činkovitě tvarované struktury.

Homodimerizace a homooligomerizace označuje asociaci podobných složek za tvorby dimerů nebo oligomerů, spojených ligandy podle tohoto vynálezu. Heterodimerizace a heterooligomerizace označuje asociaci podobných složek za tvorby dimerů nebo oligomerů. Homooligomery tak obsahují asociaci mnoha kopií jednotlivé složky, zatímco

heterooligomery obsahují asociaci kopií různých složek.

"Oligomerizace", "oligomerizovat" a "oligomer" , jak jsou zde používány, s nebo bez prefixů, jsou míněny jako zahrnující "dimerizaci", "dimerizovat" a "dimer", pokud není výslovně uvedeno jinak).

Na obr. 14 jsou také znázorněny molekuly fuzních proteinů, obsahující cílovou proteinovou doménu , která je středem zájmu ("akční doména") a jednu nebo více receptorových domén, které se mohou vázat k ligandům. Pro intracelulární chimérické proteiny, tj. proteiny, které jsou umístěny v buňkách, ve kterých jsou produkovány, budou výhodně také přítomny celulární cílové sekvence (zahrnující organelovově cílové aminokyselinové sekvence).

Buněčné procesy, které mohou být spuštěny oligomerizací, zahrnují změnu stavu jako je fyzický stav, např. konformační změnu, změnu ve vazebném partnerovi, buněčnou smrt, iniciaci transkripce, otevření kanálků, iontové uvolnění, např. Ca^{2+} atd, nebo chemického stavu, jako je chemická reakce, např. acylace, methylace, hydrolýza, fosforylace nebo defosforylace, změnu v redox stavu, přesmyk nebo podobně. Tak je jakýkoliv proces, který může být spuštěn ligandem zprostředkovanou oligomerizací, je zahrnut v rozsahu tohoto vynálezu.

Jako první aplikace předloženého vynálezu, jsou buňky modifikovány tak, aby byly citlivé k oligomerizujícím molekulám. Modifikované buňky mohou být použity v genové terapii, jakož i v jiných aplikacích kde je požadována indukovaná transkripce nebo translace (obě jsou zahrnuty pod výrazem exprese). Buňky jsou charakterizovány genomem, obsahujícím alespoň první nebo první serie (serie mohou

obsahovat pouze jeden konstrukt) genetických konstruktů a je-li to žádoucí druhou nebo druhé serie (serie mohou obsahovat pouze jeden konstrukt) konstruktů.

Charakter a počet takových genetických konstruktů budou záviset na charakteru chimérního proteinu a roli, kterou hraje v buňce. Například v provedeních, kde chimérné protein má být spojen s expresí genu (a který může obsahovat intracelulární cílovou sekvenci nebo doménu, která řídí chimérní protein aby byl spojen s buněčnou povrchovou membránou nebo s organelou např. jádra nebo vesiklu), budou normálně alespoň dvě serie konstruktů: první série, kodující chimérní protei(y), který po ligandem zprostředkované oligomerizaci iniciuje signální řízení cílové genové exprese a podle potřeby druhé serie, které obsahují cílový gen a/nebo expresní kontrolní prvky, které jsou citlivé k signálu.

Pouze jediný konstrukt v první serii bude vyžadován, je-li obsažen homooligomer, obvykle homodimer, zatímco mohou být obsaženy dva nebo více, obvykle ne více než tři konstrukty tam, kde je obsažen heterooligomer. Chimérní proteiny, kodované prvními seriemi konstruktů budou spojeny se spuštěním genové transkripce a budou normálně řízeny k povrchové membráně jádra, je-li oligomerizovaný chimérní protein schopen iniciovat, přímo nebo nepřímo, transkripci jednoho nebo více cílových genů. druhé serie dalších konstruktů budou vyžadovány tam, kde je zaváděn exogenní gen(y) nebo kde je zaváděn exogenní nebo rekombinantní expresní kontrolní sekvence (např. homologní rekombinací) pro expresi endogenního genu, v jiném případě, jehož transkripce bude aktivována oligomerizací chimérního proteinu.

Různé první serie konstruktů se používají tam, kde jsou

chimérní proteiny intracelulární a mohou působit přímo bez iniciace transkripce dalšího genu. Například proteiny spojené s exocystosou mohou být exprimovány induktivně nebo konstitutivně, kde se proteiny nebudou normálně komplexovat s výjimkou za přítomnosti oligomerizující molekuly. Při použití proteinů, které mají jakoukoliv nebo všechny z těchto vlastností, které nekomplexují v hostitelské buňce; jsou inhibovány komplexací s jinými proteiny a tato inhibice může být překonána oligomerizací s ligandem; vyžadují aktivaci procesem, který není dostupný v hostitelské buňce; nebo modifikací proteinů, která řídí fúzi vesiklu a plasmovou membránou za vzniku chimérních proteinů, kde rozsah tvorby komplexu a membránové fúze je zvýšen za přítomnosti oligomerizující molekuly, je nebo byla exocystosa schopna být indukována oligomerizující mmolekulou.

Jiné intracelulární proteiny jako je kináza, fosfatáza a buněčný cyklus řídící proteiny, mohou být podobně modifikovány a použity.

Různé třídy genetických konstruktů podle vynálezu jsou popsány dále:

(1) konstrukty, které kodují chimérní protein, obsahující vazebnou doménu a akční doménu, kde vazebná doména je extracelulární nebo intracelulární a akční doména je intracelulární jako je ligand-zprostředkující oligomerizaci chimérního proteinu, samu o sobě (za vzniku homo-oligomeru) nebo s rozdílným fuzním proteinem, obsahujícím jinou akční doménu (za vzniku hetero-oligomeru), indukuje signál, který vede k serii událostí vedoucí k transkripční aktivaci jednoho nebo více genů;

(2) konstrukty, které kodují chimérní protein, mající

vazebnou doménu a akční doménu, kde vazebná doména a akční doména jsou v jádru, jako je ligandem zprostředkovaná oligomerizace proteinu, samu o sobě (za vzniku homo-oligomeru) nebo s jiným fuzním proteinem, obsahujícím jinou akční doménu (za vzniku hetero-oligomeru), indukuje iniciaci transkripce přímo přes komplexaci oligomerů s DNA transkripčním iniciačním regionem;

(3) konstrukty, které kodují chimérní protein, obsahující vazebnou doménu a akční doménu, kde vazebná doména a akční doména jsou cytoplasmické, jako je ligandem zprostředkovaná oligomerizace proteinu, sama o sobě (za vzniku homo-oligomeru) nebo s jiným fuzním proteinem, obsahujícím jinou akční doménu (za vzniku hetero-oligomeru), což vede k exocytose; a

(4) konstrukty, které kodují chimérní protein, obsahující vazebnou doménu a akční doménu, kde vazebná doména a akční doména jsou extraceklulární a akční doména je spojena s iniciací biologické aktivity (jen pro ilustraci, akční doména se může sama vázat k substanci, receptoru nebo jinému membránovému proteinu za získání, při ligandem zprostředkované oligomerizaci chimér, spojení jedné nebo více podobných nebo rozdílných molekul nebo buněk) a

(5) konstrukty, které kodují destabilizační, inaktivační nebo krátkodobý chimérní protein, mající vazebnou doménu a akční doménu jako je ligandem zprostředkovaná oligomerizace proteinu s cílovým proteinem, obsahujícím odlišnou akční doménu, vede k destabilizaci a/nebo degradaci nebo inaktivaci uvedeného oligomerizovaného cílového proteinu.

II. Transkripční regulace

Konstrukt(y) skupiny (1) a (2) budou vzaty v úvahu jako první. Skupina (1) konstruktů se liší od skupiny (2) konstruktů svým účinkem. Skupina (1) konstruktů je poněkud pleiotropní, tj. schopna aktivace mnoha standardních typů genů, jakož i cílového genu(ů). Dále, odezva expresních produktů genů skupiny (1) k ligandu je relativně pomalá. Skupina (2) konstruktů může být směřována ke specifickému cílovému genu a je schopna omezení počtu genů, které budou transkribovány. Odezva expresních produktů konstruktů skupiny (2) k ligandu je velmi rychlá.

Vlastní systém skupin (1) a (2) bude zahrnovat první serie konstruktů, které obsahují DNA sekvence, kodující chimérní DNA sekvence, kodující chimérní proteiny, obvykle obsahující od jednoho do tří, běžně jeden až dva, různé konstrukty. Systém bude obvykle také obsahovat druhé serie konstruktů, které budou poskytovat expresi jednoho nebo více genů, obvykle exogenní gen. "Exogenním genem" je míněn gen, který není jinak normálně exprimován buňkou, např. kvůli charakteru buňky, pro genetický defekt buňky, protože gen je jiného druhu nebo je to mutovaný nebo syntetický gen, nebo podobně. Takový gen může kodovat protein, pozitivní molekulu, ribozym atd., nebo to může být DNA sekvence, obsahující expresní kontrolní sekvenci spojenou nebo mající být spojenou s endogenním genem, který s expresní kontrolní sekvencí není normálně spojen. Jak tedy je uvedeno výše, mohou konstrukty obsahovat exogenní nebo rekombinantní expresní kontrolní sekvenci pro ligandem indukovanou expresi endogenního genu.

Chimérní protein kodovaný konstrukty skupin (1), (2) a (3) může mít, jak je to často preferováno, intracelulární

cílovou doménu, obsahující sekvenci, která směřuje chimérní protein do požadovaného prostoru, např. povrchové membrány, jádra, vesikulární membrány, nebo na jiné místo, kde může být požadovaná fyziologická aktivita iniciována ligandem zprostředkovanou oligomerizací, při alespoň dimerizaci chimérního proteinu.

Chimérní protein obsahuje druhou ("vazebnou" nebo "receptorovou") doménu, která je schopna vazby k alespoň jedné ligandové molekule. Protože ligand může obsahovat více než jedno vazebné místo nebo epitop, může tvořit diméry nebo homo- nebo hetero-oligomery vyššího řádu s chimérními proteiny podle vynálezu. Vazebná doména chimérního proteinu může mít jedno nebo více vazebných míst, takže homooligomerizace může proběhnout se dvojvazným ligandem. Tímto způsobem ligand může oligomerizovat chimérní protein tím, že má dva nebo více epitopů, ke kterým se druhá doména může vázat a vzniká tak oligomerizace chimérního proteinu vyššího řádu.

Chimérní protein také obsahuje třetí ("akční") doménu schopnou iniciovat biologickou aktivitu při ligandem zprostředkované oligomerizaci molekul chimérního proteinu přes vazebné domény. Takto může být akční doména spojena s transdukcí signálu jako výsledkem ligandem zprostředkované oligomerizace. Takový signál, například, by mohl vést k iniciaci transkripce jednoho nebo více genů, v závislosti na jednotlivých meziproductových složkách zúčastněných v signální transdukcii. Viz obr. 15, který znázorňuje ilustrativní chimérní protein, ve kterém intracelulární cílová doména obsahuje myristátovou skupinu; receptorová doména obsahuje tři FKBP12 skupiny a akční doména obsahuje zeta podjednotku. V jiných chimérních proteinech mohou akční

domény obsahovat transkripční faktory, které za oligomerizace vedou k iniciaci transkripce jednoho nebo více cílových genů, endogenních a/nebo exogenních. Akční domény mohou obsahovat proteiny nebo jejich části, které jsou spojeny s fúzí vesiklových membrán s povrchem nebo jinou membránou, např. proteiny SNAP a SNARE skupin (viz Sollner a spol., (1993) 362, 318 a 353; Cell (1993) 72, 43).

A. Povrchový membránový receptor

Chiménní proteiny podle jednoho aspektu tohoto vynálezu jsou zahrnuty v povrchové membráně a jsou schopny vyvolat signál vedoucí k transkripci jednoho nebo více genů. Proces zahrnuje mnoho pomocných proteinův seriích interakcí vrcholících vazbou transkripčních faktorů k promotorovým regionům spojeným s cílovým genem (geny). V případech, kdy se transkripční faktory vážou k promotorovým oblastem spojeným s jinými geny, je tak iniciována transkripce. Konstrukt, kodující chiménní protein podle tohoto provedení vynálezu, může kodovat signální sekvenci, která může být podrobena zpracování a proto nemůže být přítomna ve zralém chiménním proteinu. Chiménní protein bude v každém případě obsahovat (a) vazebnou doménu schopnou vazby předem stanoveného ligandu, (b) popřípadě (i když v mnoha provedeních výhodně) membránovou vazebnou doménu, která zahrnuje transmembránovou doménu nebo propojený lipid pro translokaci fuzního proteinu k buněčnému povrchu/membráně a zajištění proteinu navázaného k buněčné povrchové membráně a (c) akční doménu, cytoplasmickou signální iniciační doménu. Cytoplasmická signální iniciační doména je schopna iniciace signálu, který vede k transkripci genu, majícího rozpoznávací sekvenci pro iniciovaný signál v transkripční iniciační oblasti.

Gen, jehož exprese je regulována signálem z chiménního

proteinu je zde označován jako "cílový" gen, který je gen exogenní nebo endogenní pod expresní kontrolou endogenní nebo exogenní (nebo hybridní) expresní kontrolní sekvence.

Molekulární část chimérodního proteinu, která poskytuje vazbu k membráně, je také označována jako "retenční doména". Vhodné retenční domény zahrnují skupiny, které se přímo vážou k lipidové vrstvě membrány, jako přes lipidovou součást membrány nebo rozložením membránou, nebo podobně. V takových případech je protein translokován k a váže se k membráně, zejména buněčné membráně, jak je znázorněno na obr. 15.

B. Jaderné transkripční faktory

Jiný první konstrukt koduje chimérodní protein, obsahující buněčnou cílovou sekvenci, která umožňuje, aby protein byl translokován k jádru. Tato ("signální konsensus") sekvence má mnoho bázeických aminokyselin, označovaných jako dvojdielné bázeické opakování (popsáno v práci Garcia-Bustos a spol., *Biochimica et Biophysica Acta* (1991) 1071, 83-101). Tato sekvence se může objevovat v jakékoliv části molekuly uvnitř nebo blízko N- nebo C-konce a vede k tomu, že chimérodní protein je mimo jádro. Prakticky bude jedno z provedení tohoto vynálezu obsahovat alespoň dva ("první serie") chimérodních proteinů: (1) jeden, mějící akční doménu, která se váže k DNA transkripční iniciační oblasti spojené s cílovým genem a (2) odlišný chimérodní protein, obsahující akční doménu, transkripční aktivační doménu schopnou, ve spojení s DNA vazebnou doménou prvního chimérodního proteinu, iniciace transkripce cílového genu. Dvě akční domény nebo transkripční faktory mohou být odvozeny od stejné nebo odlišné proteinové molekuly.

Transkripční faktory mohou být endogenní nebo exogenní k buněčnému hostiteli. Jsou-li transkripční faktory exogenní,

ale funkční s hostitelem a mohou kooperovat s endogenní RNA polymerasou (spíše než vyžadovat exogenní RNA polymerázu, pro ktero by mohl být gen zaveden), potom může být poskytnut exogenní promotorový prvek funkční s fuzovanými transkripčními faktory s druhým konstruktem pro regulaci transkripce cílového genu. Tímto způsobem může být iniciace transkripce omezena na gen(y) spojené s exogenní promotorovou oblastí, tj. cílovým genem(geny).

Je známo velké množství transkripčních faktorů, které vyžadují dvě podjednotky pro aktivitu. Alternativně v případech, kde může být jediný transkripční faktor rozdělen do dvou separátních funkčních domén (např. transkripční aktivátorou doménu a DNA-vazebnou doménu), takže každá doména je sama o sobě neaktivní; jestliže se však uvedou do vzájemné velmi těsné blízkosti, je transkripční aktivita obnovena. Transkripční faktory, které mohou být použity, zahrnují kvasinky GAL4, které budou rozděleny do dvou domén jak popsal Fields a Song., supra. Autoři použili fúzi GAL4(1-147)-SNF a SNF4-GAL4(768-881), kde SNF1 a -4 může být nahrazen subjektem vázajícím proteiny jako vazebnými doménami. Může být použita kombinace GAL4 a VP16 nebo HNF-1. Jiné transkripční faktory jsou členy Jun, Fos a ATF/CREB rodin, Oct1, Sp1, HNF-3, steroid receptorové superrodiny a podobně.

Jako alternativa k použití kombinace DNA vazebné domény a přirozeně se vyskytující aktivační domény nebo její modifikované formy, může být aktivační doména nahrazena jedním z vazebných proteinů spojených se spojem mezi transkripční aktivační doménou a RNA polymerásou, zahrnující, ale neomezující se na RNA polymerázu II. Tyto proteiny zahrnují proteiny označené jako TAF, TFII proteiny, zejména B a D a podobně. Je tak možno použít jakéhokoliv jednoho nebo

kombinace proteinů, například fuzovaných proteinů nebo jejich vazebných motivů, které slouží ve spoji mezi DNA vazebným proteinem a RNA polymerasou a umožňují iniciaci transkripce. Výhodně bude použit protein nejbližší k RNA polymeráse ve spojení s DNA vazebnou doménou pro umožnění iniciace transkripce. Je-li to žádoucí, mohou být tyto konstrukty poskytnuty pro tři nebo více, obvykle ne více než asi 4, proteiny, které společně poskytnou transkripční iniciační komplex.

Spíše než transkripční aktivační doména jako je akční doména, může být použita inaktivační doména jako je ssr-6/TUP-1 nebo supresorová doména Krüppelovy rodiny. Tímto způsobem vede regulace ke přerušení transkripce genu, který je konstitutivně exprimován. Například v případě genové terapie může být poskytnuta konstitutivní exprese hormonu jako je růstový hormon, krevní proteiny, imunoglobuliny atd. Při použití konstruktů, kodujících jeden chimerní protein, obsahující DNA vazebnou doménu připojenou k ligandové vazebné doméně a další chimerní protein, obsahující inaktivační doménu připojenou k ligandové vazebné doméně, může být exprese genu inhibována přes ligandem zprostředkovanou oligomerizaci.

Jsou navrženy konstrukty, kodující chimerní protein, obsahující inter alia ligandovou vazebnou doménu fuzovanou k transkripční aktivační doméně nebo podjednotce, transkripční inaktivační doméně nebo DNA vazebné doméně a sestaveny stejným způsobem jak je popsáno pro jiné konstrukty. Často bude N-konec transkripčního faktoru navázán k C-konci ligand-vazebné domény, i když v některých případech bude opak pravdou, například tam, kde jsou dvě jednotlivé domény jediného transkripčního faktoru rozděleny mezi dvě

různé chiméry.

III. Exocystosa

Dalším použitím liganem zprostředkovaného oligomerizačního mechanismu je exocystosa, kde je kontrolován ligandem spíše export proteinu než transkripce. Toto může být použito ve spojení s expresí jednoho nebo více proteinů, které jsou středem zájmu, jako alternativa k dosažení sekrece proteinu(ů), které jsou středem zájmu přes sekreční signální sekvenci. Toto provedení zahrnuje dva různé první konstrukty. Jeden konstrukt koduje chimérický protein, který směřuje protein k vesiklu proto, aby byl integrován do vesikulární membrány jak je popsáno Sollnerem a spol., supra. Proteiny mohou být použity jako vesikulární vazebný protein, obsahující VAMP (synaptobrevin), SNC2, rab3, SEC4, synaptotagmin atd., jednotlivě nebo v kombinaci. Buněčný membránový protein může zahrnovat syntaxin, SS01, SS02, neurexin atd., jednotlivě nebo v kombinaci. Jiný konstrukt umožňuje transport k povrchové membráně a využívá myristoyl signální sekvenci, jinou plasmovou membránovou cílovou sekvenci (např. pro prenylaci) nebo transmembránovou retenční doménu jako je popsána výše. Kodované proteiny jsou popsány ve výše citovaných odkazech a celé nebo jako funkční část, mohou sloužit jako akční domény. Tyto konstrukty by mohly být použity ve spojení s expresí exogenního proteinu, správně kodovaného pro transport k vesiklu nebo pro endocytotický endogenní protein, pro zvýšení exportu endogenního proteinu.

Pro exocystosu mohou být použity různé mechanismy. V závislosti na buněčném typu a proteinu, který je limitující pro exocystosu v buňce, může být jeden nebo více konstruktů, majících citlivý prvek, který je aktivován ligandem. Zvláště zajímavá je kombinace VAMP a syntaxinu. Alternativně, může

být konstrukt poskytnut pro konstruktivní expresi neomezujících proteinů řídících exocystosu a být poskytnut pro ligandem regulovanou expresi exocystosu omezujícího proteinu. Konečně, může být konstrukt poskytnut pro konstitutivní expresi chimérních proteinů spojených s exocystosou takže je exocystosa řízena oligomerací chimérních proteinů s ligandem. Použitím vhodných vazebných domén, je možno poskytnout konstrukty pro rozdílné chimérní proteiny, které budou oligomerovat na povrchu vesiklu za tvorby aktivního komplexu a/nebo spojení vesiklového proteinu(ů) s proteinem povrchu buněčné membrány přes ligand. Chimérní proteiny nesmí poskytovat exocystosu za nepřítomnosti ligandu díky modifikacím v ligandu, které podstatně redukují vazebnou afinitu mezi proteiny řídícími exocystosu, jako jsou delece, mutace atd. Tyto modifikace mohou být snadno stanoveny využitím přesahujících fragmentů jednotlivých proteinů a stanovením, které proteiny zachovávají aktivitu. Fragmenty mohou být dále modifikovány použitím alaninových substitucí pro stanovení jednotlivých aminokyselin, které v podstatě ovlivňují vazbu (Boehncke a spol., J.Immunol. (1993)150, 331-334; Evavold a spol., ibid (1992) 148, 347-353).

Proteiny sestavené v lumen vesiklu, jakož i fuzované proteiny spojené s exocystosou mohou být exprimovány konstitutivně nebo inducibilně, jak je popsáno výše. V závislosti na účelu exocystosy, zda jsou zahrnuty endogenní nebo exogenní proteiny, zda proteiny, které jsou exportovány jsou exprimovány konstitutivně nebo inducibilně, zda může být stejný ligand použit pro iniciaci transkripce fuzovaných proteinů spojených s exocystosou a proteiny, které budou exportovány, nebo zda jsou různé proteiny subjektem pro různé inducibilní signály, mohou determinovat způsob, kterým je exprese řízena. V jednom aspektu by měl mechanismus

exocystosy být řízen pouze ligandem. V jiných aspektech, jak exprese alespoň jednoho proteinu a exocystosa mohou být pod kontrolou ligandu.

Různé proteiny mohou být modifikovány zavedením buněčné cílové sekvence pro translokaci proteinu do vesiklu bez ztráty fyziologické aktivity proteinu. Při použití exocystosy jako doručovacího mechanismu, mohou být relativně vysoké dávky doručovány během krátké časové periody za získání vysoce lokalizované hladiny proteinu nebo vysoké koncentrace ve vaskulárním systému, v závislosti na charakteru hostitele. Proteiny, které jsou středem zájmu, zahrnují např. inzulin, aktivátor tkáňového plasminogenu, cytokiny, erythropoietin, faktory stimulující kolonie, růstové faktory, zánělivé peptidy, faktory buněčné migrace.

Kodující sekvence pro řízení proteinů k vesiklu jsou dostupné z vesiklových vazebných proteinů spojených s exocystosou. Viz například Sollner a spol., supra.

Dalším použitím oligomerizačního mechanismu je kontrola proteinové degradace nebo inaktivace. Například relativně stabilní chimérický protein nebo protein s dlouhou životností podle vynálezu mohou být destabilizovány nebo cíleny pro degradaci ligandem zprostředkované oligomerizace s rozdílným chimérickým proteinem podle tohoto vynálezu, který má relativně krátký poločas životnosti nebo který jinak destabilizuje nebo cílí oligomer pro degradaci. V tomto provedení ligandem zprostředkovaná oligomerizace reguluje biologické působení proteinu tím, že zkracuje jeho poločas životnosti. Posledně uvedený chimérický protein může obsahovat doménu cílení proteinu k lysozomu nebo doménu, činící protein náchylný k proteolytickému štěpení v cytosolu nebo jádru nebo

nelysosomální organele.

Poločas života proteinů v buňkách je determinován mnoha faktory, které zahrnují přítomnost krátkých aminokyselinových sekvencí v uvedeném proteinu bohatých na aminokyselinové zbytky prolinu, kyseliny glutamové, serinu a threoninu, odtud "PEST", jiné sekvence s podobnou funkcí, místa citlivá ke štěpení proteázou a stav ubiquitinizace. Ubiquitinizace je modifikace proteinu jednou nebo více jednotkami krátkého polypeptidového řetězce, ubiquitinu, který cílí proteiny pro degradaci. Rychlost ubiquitinizace proteinů je považována za omezenou zejména identitou N-terminální aminokyseliny zpracovávaného proteinu a jedním nebo více unikátními lysinovými zbytky blízkými aminokonci.

IV. Jiné regulátorové systémy

Jiné biologické funkce, které mohou být kontrolovány oligomerizací jednotlivých aktivit spojených s individuálními proteiny jsou protein kinasová nebo fosfatásová aktivita, reduktásová aktivita, cyklooxygenasová aktivita, proteasová aktivita nebo jakékoliv jiné enzymatické reakce závislé na subjednotkové asociaci. Také může poskytovat asociaci G-proteinů s receptorovým proteinem spojeným s buněčným cyklem, např. cycliny a cdc kinázy, multijednotkovými detoxifikačními enzymy.

V. Složky konstruktů

Druhý nebo další konstrukty (cílové geny) spojené se skupinou (1) a (2) chimérních proteinů zahrnují transkripční iniciační region, mající indikující cílovou rozpoznávací sekvenci nebo odpovídající element, takže budou odpovídat na

signál iniciace z aktivovaného receptoru nebo aktivovaných transkripčních faktorů, což vede k tomu, že alespoň jeden gen, který je středem zájmu, je transkribován s sekvencí(i), které jsou středem zájmu, obvykle mRNA, jehož transkripce a, výhodně, translace, mohou vést k expresi proteinu a/nebo regulaci jiných genů, např. antisense, expresi transkripčních faktorů, expresi membránových fuzních proteinů atd.

Pro různé účely a různá místa budou použity různé vazebné domény a různé cytoplasmické domény. Pro chimérické proteinové receptory spojené s povrchovou membránou, je-li ligand vázající doména extracelulární, mohou být chimérické proteiny konstruovány tak, aby obsahovaly extracelulární doménu vybranou z mnoha povrchových membránových proteinů. Podobně mohou být použity různé cytoplasmické nebo intracelulární domény povrchových membránových proteinů, které jsou schopné převádět signál, v závislosti na kterých jsou regulovány endogenní geny cytoplasmickou částí. Tam, kde je chimérický protein vnitřní, vnitřní k povrchovému membránovému proteinu nebo spojen s organelou, např. jádrem, vesiklem atd., bude ligand vázající doména proteinu omezena na domény, které mohou vázat molekuly, které mohou zesíťovat povrchovou membránu nebo jinou membránu, podle potřeby. Proto se tyto vazebné domény budou obecně vázat k malým přirozeně se vyskytujícím nebo syntetickým ligandovým molekulám, které nezahrnují proteiny nebo nukleové kyseliny.

A. Cytoplasmické domény

Chimérický proteinový receptor skupiny (1) může obsahovat cytoplasmickou doménu jednoho z různých buněčných povrchových membránových receptorů, včetně jejich muteinů, kde rozpoznávací sekvence zahrnutá v iniciaci transkripce spojené

s cytoplasmickou doménou je známá nebo je znám gen, odpovídající takové sekvenci. Mutantové receptory, které jsou středem zájmu, budou disociovat transkripční aktivaci cílového genu z aktivace genů, které mohou být spojeny s nežádoucími vedlejšími účinky, jako je deregulovaný buněčný růst nebo nevhodné uvolnění cytokinů. S receptorem spojené cytoplasmické domény, které jsou zvláště zajímavé, budou mít následující charakteristiky: aktivace receptoru vede k iniciaci transkripce relativně málo (žádoucí je méně než 100) a obecně neškodných genů v buněčném hostiteli; jiné faktory nezbytné pro transkripci iniciovanou receptorovou aktivací jsou přítomny v buněčném hostiteli; geny, které jsou aktivovány jinými než cílovými geny nebudou ovlivňovat zamýšlený účel, pro který by tyto buňky měly být použity; oligomerizace cytoplasmické domény nebo jiného dostupného mechanismu vede k iniciaci signálu; a spojení cytoplasmické domény k požadované ligand-vázající doméně nebude interferovat se signalizací. Je známo mnoho různých cytoplasmických domén. Mnohé z těchto domén jsou tyrosin kinázy nebo jsou komplexovány s tyrosin kinásami, např. CD3 , IL-2R, IL-3R atd. Přehled viz Cantley a spol., Cell(1991)64, 281. Receptory tyrosin kinázy, které jsou aktivovány zesíťovací vazbou, anpř. dimerizací (podle nomenklatury poprvé navržené Yardenem a Ulrichem, Annu.Rev.Biochem.(1988)57, 443, zahrnují podtřídu I: EGF-R, ATR2(neu, HER2/neu, HER3/c-erbB-3, Xmrk; podtřídu II: inzulin-R, IGF-1-R řreceptor inzulinu podobného růstového faktoru, IRR; podtřídu III: PDGF-R-A, PDGF-R-B, CSF-1-R (M-CSF/c-Fms), c-kit, STK-1/Flk-2 a podtřídu IV: FGR-R, fig kysely FGF, bek bázičky FGF; neurotrofni tryosin kinázy; Trk rodinu, zahrnující NGF-R, Ror1,2. Receptory, které asociují s tyrosin kinásami při zesíťení, zahrnují CD3 -rodinu: CD3 a CD3 (nalezeny zejména v T buňkách, spojené s Fyn); β a

řetězce Fc RI (nacházené zejména v obrovských buňkách a basofilech); řetězec Fc RII/CD16 (nacházen zejména v makrofázích, neurofilech a přirozených zabíječských buňkách; CD3gama, - δ a - ϵ (nacázený zejména v T buňkách); Ig- α /MB-1 a Ig- β /B29 (nacházený zejména v B buňkách). Mnoho receptorů cytokinu a růstového faktoru asociuje s běžnými β podjednotkami, které interagují s tyrosin kinásami a /nebo jinými signálními molekulami a mohou být použity jako cytoplasmické domény v chimérických proteinech podle vynálezu. Tyto zahrnují (1) běžnou β podjednotku sdílenou GM-CSF, IL-3 a IL-5 receptory; (2) β řetězec gp 130 spojený s IL-6, leukemii inhibující faktor (LIF), ciliární neurotrofní faktor (CNTF), oncostatin M a IL-11 receptory; (3) IL-2 receptor gama podjednotku asociovanou také s receptory pro IL-4, IL-7 a IL-3 (a možná IL-9) a (4) β řetězec IL-2 receptoru, který je homologní k cytoplasmické doméně G-CSF receptoru.

Jako zdroje cytoplasmických domén mohou být rovněž použity receptory interferonové rodiny, které zahrnují interferony α/β a gama (které mohou aktivovat jednoho nebo více členů JAK, Tyk rodiny tyrosin kinás) jakož i receptory pro růstový hormon, erythropoietin a prolaktin (které také mohou aktivovat JAK2).

Jiné zdroje cytoplasmických domén zahrnují TGF- β rodinu buněčných povrchových receptorů (viz Kongsley D., Genes and Development 1994 8 133). Tato rodina receptorů obsahuje serin/threonin kinásovou aktivitu ve svých cytoplasmických doménách, o kterých se předpokládá, že budou aktivovány zesílením.

Tyrosin kinázy spojené s aktivací a inaktivací

transkripčních faktorů jsou zvláště zajímavé při poskytnutí specifických drah, které mohou být kontrolovány a mohou být použity pro iniciaci nebo inhibici exprese exogenního genu.

Následující tabulka poskytuje mnoho receptorů a charakteristik spojených s receptorem a jeho jadernými odovídacími prvky, které aktivují geny. Seznam není omezující, ale poskytuje příklady systémů pro použití v předloženém vynálezu.

V mnoha situacích mohou být získány mutované cytoplasmické domény, kde signál, který je převáděn se může lišit od standardního typu, což vede k omezené nebo jiné dráze ve srovnání s drahami (drahou) standardního typu. Například, v případě růstových faktorů jako je EGF a FGF, byly uvedeny mutace, kde signál je nekopulován z buněčného růstu, ale je ještě udržován s c-fos (Peters a spol., Nature (1992) 358, 678).

Tyrosin kinásové receptory mohou být v lidském těle nalezeny na mnoha různých buňkách. Naopak, CD3 -rodina, Ig rodina a rodina lymfokin β -řetězcového receptoru jsou nacházeny zejména na hematopoietických buňkách, zejména T-buňkách, B-buňkách, obrovských buňkách, basofilů, makrofágů, neutrofilů a přírodních zabíječských buňkách. Signály vyžadované pro NF-AT transkripci pocházejí převážně ze zeta () řetězce antigen receptoru a v menším rozsahu zasahují CD3gamma, δ , zeta.

Tabulka 1

Ligand	DNA element	vazebné faktor(y)	gen	odkaz
inzulin a jiné	cAMP citlivý prvek (cre)	LRFI	jun-B mnoho genů	Mol.Cell Biol.(1992),12, 4654 PNAS,83,3439
PDGF FGF, TGF a jiné	SRE	SRF/SR EBP	c-fos	Mol.Cell Biol.(1992),12, 4769
EGF	VL30 RSFR		RVL-3 virus c-jun	Mol.Cell.Biol.(1992),12, 2793 do.(1992),12, 4472
IFN- α	ISRE	ISGF-3		Gene Dev.(1989)3, 1362
IFN-	GAS	GAF	GBP	Mol.Cell.Biol.(1991)11, 182
PMA a TCR		AP-1	mnoho genů	Cell (1987) 49, 729-739
TNF		NFkB	mnoho genů	Cell(1990)62, 1019-1029
anti- gen	ARRE-1	OAP/O ct-1	mnoho genů	Mol.Cell.Biol.(1988)8,1715
anti-	ARRE-2	NFAT	IL-2 enhancer	Science (1988) 241, 202

Cytoplasmická doména, jak existuje v přírodě nebo jak může být zkrácena, modifikována nebo mutována, bude mít alespoň asi 10, obvykle alespoň asi 30 aminokyseliny, méně obvykle alespoň asi 50 aminokyselin a obecně ne více než asi 400 aminokyselin, obvykle ne více než asi 200 aminokyselin být použity jakékoliv druhy, jsou obvykle preferovány druhy endogenní k hostitelské buňce. Nicméně v jakémkoliv případě, může být účinně použita cytoplasmická doména z odlišných druhů. Jakokoliv z výše uvedených cytoplasmických domén může být použita, jakož i jiné, které jsou v současnosti známy nebo mohou být následně objeveny.

Většinou se jiné chimérické proteiny spojené s transkripčními faktory, se budou zejména lišit v tom, že mají buněčnou cílovou sekvenci, která směřuje chimérický protein ke vnitřnímu povrchu jaderné membrány a mají transkripční faktory nebo jejich části jako akční domény. Obvykle akční domény transkripčního faktoru mohou být rozděleny na "DNA vazebné domény" a "aktivační domény". Může být poskytnuta DNA vazebná doména s jednou nebo více ligand vázajícími doménami. V této cestě může být DNA vazebná doména kopulována k mnoha vazebným doménám a/nebo aktivačním doménám. Jinak je diskuse pro chimérický protein spojený s povrchovou membránou pro signální transdukcí aplikovatelná na chimérické proteiny pro přímou vazbu ke genomové DNA. Podobně se bude chimérický protein spojený s exocytosou rozlišovat zejména proteiny spojené s fúzí vesikulové membrány s buněčnou membránou, místo transdukce cytoplasmických proteinů.

B. Buněčné cílové domény

Signální peptid nebo sekvence poskytuje transport chimérického proteinu k buněčné povrchové membráně, kde stejné

nebo jiné sekvence mohou kodovat vazbu chimérodního proteinu k buněčné povrchové membráně. Protože je zde obecný motiv signálních sekvencí, dvě nebo tři N-terminální polární aminokyseliny následované asi 15-20 zejména hydrofobními aminokyselinami, mohou být jednotlivé aminokyseliny v širokém rozsahu měněny. Proto může být použit v podstatě jakýkoliv signální peptid, který je funkční v hostiteli a může nebo nemusí být spojen s jednou z dalších domén chimérodního proteinu. Normálně je zpracován signální peptid a nebude ve zralém chimérodním proteinu zachován. Sekvence, kodující signální peptid je na 5'-konci kodující sekvence a bude obsahovat iniciační methioninový kodon.

Volba membránové retenční domény není kritická pro tento vynález, protože bylo zjištěno, že takové membránové retenční domény jsou v podstatě zaměnitelné a není zde žádná podstatná aminokyselina vyžadovaná pro vazbu nebo navázání k jiným membránovým regionům pro aktivaci. Membránová retenční doména tak může být izolována z jakéhokoliv povrchového membránového nebo cytoplasmického proteinu, ať je či není endogenní k hostitelské buňce.

Jsou zde alespoň dvě rozdílné membránové retenční domény: transmembránová retenční doména, kterou je aminokyselinová sekvence, která se prostírá přes membránu a lipidová membránová retenční doména, která lipidy spojuje s lipidy buněčné povrchové membrány.

Většinou, pro snadnost konstrukce, mohou být použity transmembránová doména cytoplasmické domény nebo receptorová doména, , kter mají sklon zjednodušit konstrukci fuzovaného proteinu. Nicméně u lipidové membránové retenční domény bude obvykle zpracovávající signál přidán na 5' konec kodující

sekvence pro N-terminální vazbu k membráně a nejbližší ke 3' konci pro C-terminální vazbu. Lipidová membránová retenční doména bude mít lipid od asi 12 do 24 atomů uhlíku, zejména 14 atomů uhlíku, zvláště myristoyl, připojený ke glycinu. Signální sekvence pro lipidovou vazebnou doménu je N-terminální sekvence a může být v širokém rozsahu měněna, a má obvykle glycin na zbytku 2 a lysin nebo arginin na zbytku 7 (Kaplan a spol., Mol.Cell.Biol.(1988)8, 2435). Peptidové sekvence, obsahující posttranslační zpracování pro poskytnutí lipidové membránové vazby jsou popsány Carrem a spol., PNAS USA (1988) 79, 6128; Aitken a spol., FEBS Lett.(1982)150, 314, Henderson a spol., PNAS USA (1983)80, 319, Schulz a spol., Virology (1984), 123, 2131, Dellman a spol., Nature (198) 314, 374 a přehled v Ann.Rev.of Biochem. /(1988) 57, 69. Aminokyselinová sekvence, která je středem zájmu, zahrnuje sekvenci M-G-S-S-K-S-K-P-K-D-P-S-Q-R. Mohou být použity různé DNA sekvence pro kodování takové sekvence ve fuzovaném receptorovém proteinu.

Obecně bude mít transmembránová doména asi 18 až 30 aminokyselin, obvykleji asi 20-30 aminokyselin, kde centrální část budou zejména neutrální, nepolární aminokyseliny a konec domény budou polární aminokyseliny, často nabitě aminokyseliny, obecně mající asi 1-2 nabitě, převážně báze aminokyseliny na konci transmembránové domény následované zbytkem přetržené šroubovice, např. pro- nebo gly-.

C. Ligandová vazebná doména

Ligandová vazebná ("dimerizační") doména chimérického proteinu podle tohoto vynálezu může být běžná doména, která umožňuje pro indukci využití přírodního nebo nepřírodního ligandu, výhodně nepřírodního syntetického ligandu. Vazebná

doména může být vnitřní nebo vnější k buněčné membráně, v závislosti na charakteru konstruktu a volbě ligandu. Je známo mnoho vazebných proteinů, obsahujících receptory, zahrnující vazebné proteiny spojené s cytoplasmickými regiony uvedenými výše. Zvláště zajímavé jsou vazebné proteiny pro které jsou ligandy (výhodně malé organické ligandy) známy nebo mohou být snadno produkovány. Tyto receptory nebo ligand vazebné domény zahrnují FKBP a cyclofilinové receptory, steroidní receptory, tetracyklinové receptory, jiné receptory uvedené výše a podobně jakož i "nepřirození" receptory, které mohou být získány z protilátek, zejména podjednotek těžkých nebo lehkých řetězců, náhodných aminokyselinových sekvencí získaných stochastickými postupy, kombinatorními syntézami a podobně. Většinou budou receptorové domény mít nejvýše asi 500 aminokyselin a méně než asi 350 aminokyselin, obvykle méně než 200 aminokyselin, buď jako přirozené domény nebo jejich zkrácené aktivní části. Výhodně budou vazebné domény malé (<25 kDa, pro umožnění účinné transfekce ve virálních vektorech), monomerní (toto neplatí v systému avidin-biotin) a měly by být synteticky dostupné, permeabilní pro buňky, netoxické ligandy, které mohou být konfigurovány pro dimerizaci.

Receptorová doména může být intracelulární nebo extracelulární v závislosti na dezénu konstruktu, kodujícího chimérický protein a dostupná pro vhodný ligand. Pro hydrofobní ligandy může být vazebná doména na jedné straně membrány, ale pro hydrofilní ligandy, zejména proteinové ligandy, bude vazebná doména obvykle vnější k buněčné membráně, pokud zde není transportní systém pro internalizaci ligandu do formy, ve které je dostupná pro vazbu. U intracelulárního receptoru konstrukt může kodovat signální peptid a transmembránovou doménu 5' nebo 3' receptorové doménové sekvence nebo mít

lipidovou připojenou signální sekvenci 5' receptorové doménové sekvence. Je-li receptorová doména mezi signálním peptidem a transmembránovou doménou, bude receptorová doména extracelulární.

Část konstruktů, kodujících receptor, může být podrobena mutagenesi z různých důvodů. Mutagenizovaný protein může poskytovat vyšší vazebnou afinitu, umožňovat diskriminaci ligandem přirozeně se vyskytujícího receptoru, poskytovat protějšky k dezeréptor-ligandového páru nebo podobně. Změna v receptoru může zahrnovat změny v aminokyselinách známé jako jsoucí na vazebném místě, náhodnou mutagenesi za použití kombinatorních technik, kde kodony aminokyselin spojené s vazebným místem nebo jiných aminokyselin spojených s konformačními změnami mohou být subjektem mutagenese změnou kodonu(ů) pro jednotlivou aminokyselinu, buď se známou změnou nebo náhodnou, exprimující výsledné proteiny ve vhodném prokaryontním hostiteli a pak screening výsledných proteinů na vazbu. Ilustrativní pro tuto situaci je modifikace Phe36 v FKBP12' na Ala a/nebo Asp37 na Gly nebo Ala pro přizpůsobení substituentu v polohách 9 nebo 10 FK506 nebo FK520. Zejména skupiny mutantů FKBP12, které obsahují Val, Ala, Gly, Met nebo jiné malé aminokyseliny místo jednoho nebo více Tyr26, Phe36, Asp37, Tyr82 a Phe99, jsou zvláště zajímavé jako receptorové domény pro ligandy typů FK506 a FK520, obsahující modifikace na C9 a/nebo C10.

Podjednotky protilátek, např. těžký nebo lehký řetězec, zejména fragmenty, zvláště celý nebo část variabilního regionu, nebo fúze těžkého a lehkého řetězce pro vytvoření vysoce afinitní vazby, mohou být použity jako vazebná doména. Protilátky mohou být připraveny proti hapténickým molekulám, které jsou fyziologicky přijatelné a jednotlivé protilátkové

podjednotky byly screenovány na vazebnou afinitu. cDNA, kodující podjednotky může být izolována a modifikována delecí konstantního regionu, částí variabilního regionu, mutagenesí variabilního regionu, pro získání vazebné proteinové domény, která má vhodnou afinitu pro ligand. V tomto postupu, většinou může být použita jakákoliv fyziologicky přijatelná haptická sloučenina jako ligand nebo pro poskytnutí epitopu pro ligand. Místo protilátkových jednotek mohou být použity přírodní receptory, kde je vazebná doména známá a je vhodná jako ligand pro vazbu.

Schopnost použít in vitro mutagenesi nebo kombinační modifikace sekvencí, kodujících proteiny umožňují produkci knihoven proteinů, které mohou být screenovány na vazebnou afinitu pro různé ligandy. Například je možno zcela náhodně zpracovat sekvenci 1 až 5, 10 nebo více kodonů, na jednom nebo více místech v DNA sekvenci kodující vazebný protein, vyrobit expresní konstrukt a zavést expresní konstrukt do jednobuněčného mikroorganismu a vyvinout knihovnu. Je možno knihovnu screenovat na vazebnou afinitu k jednomu, je-li to žádoucí k více ligandům. Nejlepší afinitní sekvence, které jsou kompatibilní s buňkami, do kterých by měly být zavedeny, mohou být pak použity jako vazebná doména. Ligand by měl být screenován s hostitelskými buňkami, které se používají pro stanovení hladiny vazby ligandu k endogenním proteinům. Vazebný profil by mohl být definován zhodnocením poměru vazebné afinity k mutagenizované vazebné doméně s vazebnou afinitou k endogenním proteinům. Tyto ligandy, které mají nejlepší vazebný profil by pak mohly být použity jako ligand. Při provedení výše uvedeného je možno použít techniky zobrazování fágů, které jsou uvedeny jako neomezující příklad.

D. Multimerizace

Převodový signál bude normálně vznikat z ligandem zprostředkované oligomerizace chimérních proteinových molekul, tj. jako výsledek oligomerizace po ligandové vazbě, i když pro iniciaci signálu mohou být použity i jiné vazebné momenty, například allosterická aktivace. Konstrukt chimérního proteinu se bude měnit podle uspořádání různých domén a podle počtu opakování jednotlivých domén. Pro extracelulární receptorovou doménu ve směru 5'-3' transkripce, bude konstrukt kodovat protein, obsahující signální peptid, receptorovou doménu, transmembránovou doménu a signální iniciační doménu, kde poslední doména bude intracelulární (cytoplasmická). Nicméně je-li receptorová doména intracelulární, mohou být použita různá uspořádání, kde signální peptid může být následován buď receptorovou nebo signální iniciační doménou, následovanou zbývajícím doménou nebo s více receptorovými doménami, signální iniciační doména může být uložena mezi receptorovými doménami. Obvykle bude aktivní místo signální iniciační domény vnitřní vzhledem k sekvenci a nevyžaduje volný karboxylový konec. Kterákoliv z domén může být multimerizována, zejména receptorová doména, obvykle nemající více než asi 5 opakování, obvykleji ne více než asi 3 opakování.

Pro multimerizaci receptoru bude ligand pro receptorové domény chimérních povrchových membránových proteinů obvykle multimerizován v tom smyslu, že bude mít alespoň dvě vazebná místa, s každým vazebným místem schopným vazby k receptorové doméně. Je žádoucí, aby tyto ligandy byly dimer nebo vyšší oligomer, obvykle ne větší než asi tetramer, malých syntetických organických molekul, kde jednotlivé molekuly typicky jsou velikosti alespoň asi 150 D a menší než asi 5

kD, obvykle menší než asi 3 kD. Mohou být použity různé páry syntetických ligandů a receptorů. Na příklad, v provedeních, zahrnujících přirozené receptory, může být použit dimerní FK506 s FKBP receptorem, dimerizovaný cyclosporin A může být použit s cyclofilinovým receptorem, dimerizovaný estrogen s estrogenovým receptorem, dimerizované glukokortikoidy s glukokortikoidovým receptorem, dimerizovaný tetracyklin s tetracyklinovým receptorem, dimerizovaný vitamin D s vitamin D receptorem a podobně. Alternativně mohou být použita vyšší uspořádání ligandů, např. trimery. V provedeních, zahrnujících nepřirodní receptory, např. protilátkové podjednotky, modifikované protilátkové podjednotky nebo modifikované receptory a podobně, mohou být použity jakékoliv velké variace sloučenin. Signifikantní charakteristikou těchto ligandových jednotek je, že vážou receptor s vysokou afinitou (výhodně s $K_d < 10^{-8} \text{M}$) a jsou schopny být dimerizovány chemicky.

Ligand může mít různé receptor vázající molekuly s různými epitopy (označované také jako "HED" činidla), protože tyto mohou zprostředkovat heterodimerizaci nebo heterooligomerizaci chimérních proteinů, majících stejné nebo rozdílné vazebné domény. Například může ligand obsahovat skupiny typu FK506 nebo FK506 a skupinu typu CsA nebo cyklosporinu. Obě skupiny jsou kovalentně připojeny k obvyklé linkerové skupině. Takový ligand by mohl být vhodný pro zprostředkování oligomerizace prvního a druhého chimérního proteinu, kde první chimérní protein obsahuje receptorovou doménu jako je FKBP12, která je schopna vazby ke skupině typu FK506 a druhý chimérní protein obsahuje receptorovou doménu jako je cyklofilin, který je schopen vazby ke skupině typu cyklosporinu A.

VI. Buňky

Buňky mohou být prokaryotní, ale výhodně jsou eukaryotní zahrnující buňky rostlinné, kvasinkové, červů, hmyzu a savců. Zvláště preferováno je, aby byly buňky savčí, zejména primátů, zvláště lidí, ale mohou být asociovány s jakýmikoliv zajímavými živočichy, zejména domestikovanými zvířaty jako jsou vepři, myši, psi, kočky atd. Z těchto druhů mohou být použity různé typy buněk, jako jsou buňky hematopietické, neurální, mesenchymální, kutánní, mukosální, stromální, svalové, slezinové, retikuloendotheliální, epitheliální, endotheliální, jaterní, ledvinové, gastrointestinální, plicní atd. Zvláště zajímavé jsou hematopoietické buňky, které zahrnují jakékoliv jaderné buňky, které mohou být zahrnuty v lymfoidních nebo myelomonocytických spojeních. Zvláště zajímavé jsou membrány T- a B-buněčného spojení, makrofágy a monocyty, myoblasty a fibroblasty. Zvláště zajímavé jsou také kmenové a progenitorové buňky jako jsou hepatopoietické, neurální, stromální, muskulární, jaterní, plicní, gastrointestinální atd.

Buňky mohou být autologní buňky, syngenní buňky, allogenní buňky a v některých případech i xenogenní buňky. Buňky mohou být modifikovány změnou hlavního histokompatibilního komplexního ("MHC") profilu, při inaktivaci β_2 -mikroglobulinu pro zabránění tvorby molekul funkční třídy I MHC, inaktivaci molekul třídy II, za poskytnutí exprese jedné nebo více MHC molekul, zvýšení nebo inaktivace cytotoxických schopností zvýšením nebo inhibicí exprese genů spojených s cytotoxickou aktivitou a podobně.

V některých případech mohou být zajímavé specifické klony nebo oligoklonální buňky, kde buňky mají zvláštní

specifitu, jako jsou T buňky a B buňky, mající specifickou antigenní specifitu nebo specifitu usazení do cílového místa.

VII. Ligandy

Mnoho různých ligandů, zahrnujících jak přirozeně se vyskytující tak syntetické substance, může být použito v tomto vynálezu pro ovlivnění oligomerizace molekul chimérních proteinů. Použitelnými a snadno sledovatelnými nebo měřitelnými kritérii pro výběr ligandu jsou: (A) ligand je fyziologicky přijatelný (např. postrádá toxicitu vůči buňkám nebo živočichovi, pro které je použit), (B) má přiměřený terapeutický dávkový rozsah, (C) je žádoucí (pro použití v celých živočiších, zahrnujících genové terapeutické aplikace), aby mohl být podáván orálně (je stabilní v gastrointestinálním systému a absorbován do vaskulárního systému), (D) může zesíťovat buněčné a jiné membrány je-li to nezbytné a (E) váže se k receptorové doméně s odpovídající afinitou pro požadovanou aplikaci. Prvním žádoucím kritériem je, že sloučenina je relativně fyziologicky inertní, ale je schopná aktivace s receptory. Čím méně ligandu se váže k přírodním receptorům a čím menší je podíl celého ligandu, který se váže k přírodním receptorům, tím lepší bude normální odezva. Zvláště by ligand neměl mít silný biologický vliv na nativní proteiny. Z větší části budou ligandy nepeptidická a nenukleová kyselina.

Tyto sloučeniny budou mít většinou dvě nebo více jednotek, kde jednotky mohou být stejné nebo rozdílné, spojené spolu přes centrální spojovací skupinu. "Jednotky" budou jednotlivé skupiny (např. FK506, FK520, cyklosporin A, steroid atd.) schopné vázat receptorovou doménu. Každá z těchto jednotek bude obvykle připojena ke spojovací skupině

přes stejné reaktivní skupiny, alespoň v homodimerech nebo vyšších homooligomerech.

Jak je výše uvedeno, existuje mnoho přirozeně se vyskytujících receptorů pro malé neproteinové organické molekuly, kde malé organické molekuly splňují výše uvedená kritéria a mohou být dimerizovány na různých místech za poskytnutí ligandu podle předloženého vynálezu. Možné jsou podstatné modifikace těchto sloučenin, pokud je zachována jejich vazebná kapacita a s požadovanou specifitou. Mnohé z těchto sloučenin budou makrocyclické, např. makrolidy. Vhodné vazebné afinity budou zobrazeny v Kd hodnotách pod 10^{-4} , výhodně pod 10^{-6} , výhodněji pod asi 10^{-7} , i když jsou možné i afinity pod 10^{-9} nebo 10^{-10} a v některých případech budou nejžádanější.

V současnosti preferované ligandy zahrnují oligomery, výhodně dimery, sloučenin schopných vazby k FKBP proteinu a/nebo cyklofilin proteinu. Takové ligandy zahrnují homo- a heteromultimery (obvykle 2-4, obvykleji 2-3 jednotky) cyklosporinu A, FK506, FK520 a rapamycinu a jejich derivátů, které si zachovávají svoji vazebnou schopnost k přírodním nebo mutagenizovaným vazebným doménám. Mnohé deriváty těchto sloučenin jsou již známé, včetně syntetických vysoce afinitních FKBP ligandů, které mohou být použity v praktickém provedení tohoto vynálezu. Viz např. Holt a spol., J.Am.Chem.Soc. 1993, 115, 9925-9935. Zajímavá místa pro napojení FK506 a jeho analogů zahrnují polohy zahrnující kruhové uhlíkové atomy od asi 17 do 24 a polohy substituentů navázané k těmto kruhovým atomům, např. 21 (allyl), 22,37,38,39 a 40 nebo 32 (cyklohexyl), zatímco tytéž polohy s výjimkou 21 jsou zajímavé pro FK520. Pro cyklosporin jsou zajímavými místy MeBmt, poloha 3 a poloha 8.

Zvláště zajímavé jsou modifikace ligandu, které mění jeho vazebné charakteristiky, zejména s ohledem na ligandový přirozeně se vyskatující receptor. Průvodním jevem je, že by mohl být měněn vazebný protein pro přizpůsobení se změně v ligandu. Například je možno modifikovat skupiny v poloze 9 nebo 10 FK506 (viz Van Duyne a spol.(1991) Science 252, 839) tak, že se zvyšuje jejich sterický požadavek, nahrazením hydroxylu skupinou, mající větší sterické nároky nebo modifikací karbonylu v poloze 10, nahrazením karbonylu skupinou, mající větší sterické nároky nebo funkcionalizací karbonylu, např. tvorbou N-substituované Schiffovy báze nebo iminu, pro zvětšení objemu v této poloze. Různé funkčnosti, které mohou být běžně zavedeny na tato místa jsou alkylové skupiny pro tvorbu etherů, acylamidorskupiny, N-alkylované aminy, kde 2-hydroxyethylimin může také tvořit 1,3-oxazolin nebo podobně. Obecně budou substituenty mít od asi 1 do 6, výhodně 1 až 4 a výhodněji 1 až 3 atomy uhlíku s 1 až 3, výhodně 1 až 2 heteroatomy, kterými ovkykle budou kyslík, síra, dusík a podobně. Při použití derivátů bázecké struktury je možno vytvořit rozdílné ligandy s různými strukturními požadavky na vazbu. U mutagenizovaných receptorů mohou mít různé receptory v podstatě stejnou sekvenci, mající rozdílné afinity pro modifikované ligandy významně se nelišící ve struktuře.

Jinými ligandy, které mohou být použity jsou steroidy. Steroidy mohou být oligomerizovány, takže je jejich přirozená biologická aktivita v podstatě potlačena bez ztráty jejich vazebné schopnosti k chimérickému proteinu, obsahujícímu jednu nebo více steroid receptorových domén. Jako neomezující příklady je možno uvést lukokortikoidy a estrogeny. Mohou být také použita různá léčiva, kde je o léčivu známo, že se váže k jednotlivému receptoru s vysokou afinitou. Toto je zejména

tam, kde vazebná doména receptoru je známá, což umožňuje použít v chimérických proteinech podle vynálezu pouze vazebné domény, spíše než celého nativního receptorového proteinu. Pro tento účel mohou být použity enzymy a inhibitory enzymů.

A. Linkery

Ve spojení mohou být zahrnuty různé funkčnosti, jako jsou amidové skupiny, zahrnující deriváty kyseliny uhličitě, ethery, estery, zahrnující organické a anorganické estery, amino nebo podobně. Proposkytnutí spojení může být jednotlivý monomer modifikován oxidací, hydroxylací, substitucí, redukcí atd., za poskytnutí místa pro kondenzaci. V závislosti na monomeru mohou být zvolena různá místa jako místa kondenzace.

Multimerní ligandy mohou být syntetizovány jakýmkoliv obvyklými způsoby, kde spojovací skupina bude v místě, které neinterferuje s navázáním vazebného místa ligandu k receptoru. Jestliže se aktivní místo pro fyziologickou aktivitu a vazebné místo k receptorové doméně liší, bude obvykle žádoucí připojit aktivní místo pro inaktivaci ligandu. Různé spojovací skupiny mohou být použity, obvykle o 1-30, výhodněji od asi 1 do 20 atomů v řetězci mezi dvěma molekulami (jiné než vodík), kde spojovací skupiny budou převážně složeny z uhlíku, dusíku, vodíku, síry a fosforu. Spojovací skupiny mohou obsahovat mnoho různých funkčností, jako jsou amidy a estery, jak organické tak anorganické, aminy, ethery, thioethery, disulfidy, kvarterní amoniové soli, hydraziny atd. Řetězec může obsahovat alifatické, alicyklické, aromatické nebo heterocyklické skupiny. Řetězec bude vybrán podle snadnosti syntézy a stability multimerního ligandu. Jestliže je žádoucí udržet dlouhodobou aktivitu, bude použit relativně inertní řetězec, takže multimerní

ligandové spoj nebude štěpen. Alternativně, je-li požadována pouze krátkodobá životnost v krevním proudu, pak mohou být použity různé skupiny, které se snadno štěpí, jako jsou estery a amidy, zejména peptidy, kde cirkulující a/nebo intracelulární proteázy mohou štěpit spojovací skupinu.

Jako spojovací skupina mezi ligandy mohou být použity různé skupiny jako je alkylen, obvykle se 2 až 20 atomy uhlíku, azalkylen (kde dusík bude obvykle mezi dvěma atomy uhlíku), výhodně mající od 4 do 18 atomů uhlíku), N-alkylenazalkylen(viz výše), s obvykle 6 až 24 atomy uhlíku, arylen, obvykle se 6 až 18 atomy uhlíku, ardialkylen, obvykle s 8 až 24 atomy uhlíku, bis-karboxamidoalkylen s asi 8 až 36 atomy uhlíku atd. Ilustrativní skupiny zahrnují decylen, oktadecylen, 3-azapentylen, 5-azapentylen, N-butylen-5-azanonylen, fenylen, xylylen, p-dipropylenbenzen, bis-benzoyl-1,8-diaminoktan a podobně. Multivalentní nebo jiné (viz dále) ligandové molekuly, obsahující linkerové skupiny jak jsou popsány výše, mohou být hodnoceny chimérními proteiny podle předloženého vynálezu, nesoucími odpovídající receptorové domény za použití materiálů a metod popsaných v příkladech, které následují.

B. Charakteristiky ligandů.

Pro intracelulární vazebné domény bude ligand vybrán tak, aby byl schopen být transferován přes membránu v bioaktivní formě, ti jest, aby byl prostupný membránou. Různé ligandy jsou hydrofobní nebo mohou být vyrobeny za vhodné modifikace lipofilními skupinami . Výhodně může spojovací můstek sloužit ke zvýšení lipofilicity ligandu poskytnutím alifatického postranního řetězce, majícího asi 12 až 24 atomů uhlíku. Alternativně, mohou být poskytnuty jedna nebo více

skupin, které budou zvyšovat transport membránou a jak je žádoucí bez tvorby endosomů.

V některých případech není nutné používat multimerní ligandy. Například mohou být použity molekuly, kde jsou poskytnuta dvě rozdílná vazebná místa pro dimerizaci receptoru. V jiných případech může navázání ligandu vést ke konformační změně, vedoucí k aktivaci, např. oligomerizaci, receptoru. Jiný mechanismus může být také použitelný pro indukci signálu, jako je vazba jediného receptoru se změnou v konformaci vedoucí k aktivaci cytoplasmické domény.

C. Antagonisté ligandů

Pro odvrácení účinku multimerního ligandu mohou být použity monomerní ligandy, tj. pro inhibici nebo přerušení nebo udržování tvorby oligomeru. Jestliže je třeba rychle ukončit vliv buněčné aktivace, může být použit monomerní ligand. Běžně může být rodičovská ligandová skupina modifikována na stejných místech jako multimer, za použití stejného postupu s výjimkou náhrady monofunkční sloučeniny za polyfunkční sloučeninu. Místo polyaminů mohou být použity monoaminy, zejména mající od 2 do 20 (i když mohou být delší) a obvykle mající 2 až 12 atomů uhlíku, jako je ethylamin, hexylamin, benzylamin atd. Alternativně může být použita monovalentní rodičovská sloučenina, v případech, ve kterých rodičovská sloučenina neposkytuje nežádoucí fyziologickou aktivitu (např. imunosupresi, mitogenesi, toxicitu atd.).

D. Ilustrativní heterooligomerizující (HED) a homooligomerizující (HOD) činidla s "hrboly", které se mohou vázat k mutantovým receptorům, obsahujícím kompenzátorové mutace

Jak je uvedeno výše, je možno připravit HED/HOD, která se budou vázat ke svým receptorům standardního typu (např. FKBP12) díky přítomnosti substituentů ("hrbolů") na čínidlech, které stéricky srážejí se zbytky postranního řetězce v receptorové vazebné kapse. Je také možno připravit odpovídající receptory, které obsahují mutace interferujících zbytků ("kompenzátorové mutace") a proto získávají schopnost vázat ligandy hrboly. Použitím "hrbolatých" ligandových skupin a receptorových domén, nesoucích kompenzátorové mutace, by měla být zvýšena specifita a tak potence našich čínidel. Čínidla s hrboly by se neměla vázat k endogenním receptorům standardního typu, které jinak mohou působit jako "pufr" vůči dimerizaci založené na přírodních ligandových skupinách. Navíc by generování nových párů receptor-ligand mohlo současně vést k získání HED čínidel, která budou použita, je-li vyžadována heterodimerizace. Například regulované vesiklové fúze může být dosaženo indukci heterodimerizace syntaxinu (plasmový membránový fuzní protein) a synaptobrevinu (vesiklový membránový fuzní protein) za použití HED čínidla. Toto by mohlo nejen poskytovat výzkumný nástroj, ale mělo by také sloužit jako základ genové terapeutické léčby diabetu za použití vhodně modifikovaných sekrečních buněk.

Jak je ilustrováno "hrbolatými FK1012", jsme připravili C10 acetamidové a formamidové deriváty FK506. Viz obr. 16A a naše zpráva, Spencer a spol., "Controlling Signal Transduction with Synthetic Ligands", Science 262, 5136 (1993): 1019-1024 pro další podrobnosti zahrnující syntézy FK1012 A-C a FK506M. Zvolili jsme vytvoření dvou tříd hrbolatých FK1012: jednu s hrbolem na C10 a jednu na C9. R- a S-isomery C10 acetamidu a formamidu FK506 byly syntetizovány podle reakční sekvence na obr. 05B. Tyto hrbolaté deriváty

mají alespoň o tři řády menší svoji vazebnou afinitu k FKBP12 (obr.16B). Afinity jsou determinovány měřením schopnosti derivátů inhibovat rotamasaové aktivity FKBP12.

Ilustrativní člen druhé třídy C9-hrbolatých derivátů je spiro-epoxid (znázorněn na obr. 16C), který byl připraven úpravou známých postupů. Viz např. Fisher a spol., J.Org.Chem. 56 8(1991):2900-7 a Edmunds a spol., Tet.Lett. 32, 48(1991):819-820. Zvláště zajímavé serie C9 derivátů jsou charakterizovány jejich sp³ hybridizací a redukčně oxidačním stavem na C9. Některé takové sloučeniny byly syntetizovány podle reakcí uvedených na obr. 16C.

Je třeba, aby heterodimery (a jiné heterooligomery) byly konstruovány rozdílně od homodimerů, alespoň pro aplikace, kde by homodimerová kontaminace mohla nežádoucím způsobem ovlivnit jejich úspěšné použití. Ilustrativní strategie vyvinutá pro překonání tohoto problému je znázorněna na obr. 16D. Kondenzací mono alloc-chráněného 1,6-hexandiaminu (Stahl a spol., J.Org.Chem. 43 11 (1978): 2285-6) s derivatizovanou formou FK506 v methylenchloridu s přebytkem triethylaminu za získání alloc-amin-substituovaného FK506 ve 44% výtěžku. Tento meziprodukt může být nyní použit v kondenzaci s jakoukoliv aktivovanou FK506 (nebo hrbolatou FK-506) molekulou. Odchránění s katalytickým tetrakis-trifenylfospalladiem za přítomnosti dimedonu při t.m. v THF odstraňuje chránicí skupinu aminoskupiny. Bezprostřední zpracování s aktivovaným FK506 derivátem s následující desilylací vede k dimernímu produktu. Tato technika může být použita k syntetizování ilustrovaných HOD a HED činidel.

E. Ilustrativní činidla na bázi cyklosporinu

cyklosporin A (CsA) je cyklický undekapeptid, který se váže s vysokou afinitou (6nM) ke svému intracelulárnímu receptoru cyklofilinu, 18 kDa monomerní protein. Výsledný komplex, podobný komplexu FKBP12-FK506, se vážek a inaktivuje protein fosfatázu calcineurin, což vede k imunosupresivním vlastnostem léčiva. Pro další ilustraci tohoto vynálezu jsme dimerizovali CsA přes jeho MeBmt1 postranní řetězec v 6 stupních a 35% celkovém výtěžku (CsA)₂ (obr. 17, stupně 1-4 byly provedeny jak je uvedeno v Eberle a spol., J.Org.Chem. 57 9 (1992): 2689-91). Jako s FK1012, místo pro dimerizaci bylo zvoleno tak, že výsledný dimer se může vázat ke dvěma molekulám cyklofilinu a ještě se nemůže vázat ke calcineurinu po vazbě cyklofilinu. Demonstrovali jsme, že (CsA)₂ se váže k cyklofilinu se stechiometrií 1:2. Proto (CsA)₂ podobně jako FK1012 neinhibuje signální dráhy a není tak ani imunosupresivní ani toxický.

VIII. Cílové geny

Druhý konstrukt nebo druhá serie konstruktů budou mít citlivý prvek v 5' regionu, který odpovídá na ligandem zprostředkovanou oligomerizaci chimérického receptorového proteinu, pravděpodobně přes generaci a transdukcí transkripčního iniciačního signálu jak popsáno infra. Proto bude nutné znát alespoň jeden transkripční iniciační systém, např. faktor, který je aktivovat buď přímo nebo nepřímo, cytoplasmickou doménou nebo může být aktivován spojením dvou domén. Bude také nezbytné znát alespoň jeden promotorový region, který odpovídá na výsledný transkripční iniciační systém. Je třeba znát buď promotorovou oblast nebo gen pod nímž probíhá kontrola transkripce. Jinými slovy, akční doména může být vybrána pro chimérické proteiny (kodované "prvními" seriemi konstruktů) na základě úlohy takové akční domény v

iniciaci transkripce přes daný promotor nebo citlivý prvek. Viz např. sekce V(A) - "cytoplasmické domény" výše.

Jestliže je znám citlivý prvek, může být zahrnut v cílovém genovém konstruktě za poskytnutí expresní kazety pro integraci do genomu (episomální nebo chromosomální inkorporací). Není nutné, aby byla izolována jednotlivá sekvence citlivého prvku, pokud je znám gen, který je transkripčně aktivován cytoplasmickou doménou za přirozené ligandové vazby k proteinu, obsahujícímu cytoplasmickou doménu. Homologní rekombinace by mohly pak být použity pro inzerci zájmového genu po směru od promotorového regionu aby byl pod transkripční kontrolou endogenního promotorového regionu. Je-li známa specifická sekvence citlivého prvku, může být použita ve spojení s různými transkripčními iniciačními oblastmi, které mohou mít jiné aspekty, jako je vysoká nebo nízká aktivita jako je rychlost transkripce, vazba jednotlivých transkripčních faktorů a podobně.

Expresní konstrukt bude proto mít na svém 5'konci ve směru transkripce, cílivý prvek a promotorovou sekvenci, která umožňuje indukovanou transkripční iniciaci zájmového cílového genu, obvykle terapeutického genu. Transkripční terminační region není důležitý a může být použit pro zvýšení životnosti nebo výroby mRNA s krátkým poločasem životnosti inzertováním AU sekvencí, které slouží ke snížení stability mRNA a tím omezení periody působení proteinu. Jakýkoliv region může být použit, který poskytuje nezbytné transkripční zakončení a podle potřeby, zakončení translace.

Citlivý prvek může být jediná sekvence nebo může být oligomerizován, obvykle nemá více než asi 5 opakování a obvykle má asi 3 opakování.

Homologní rekombinace může být také použita pro odstranění nebo inaktivaci endogenních transkripčních kontrolních sekvencí, obsahujících promotor a/nebo citlivé prvky, které jsou odpovědné za oligomerizaci a/nebo pro inzert takových citlivých transkripčních kontrolních sekvencí ve směru od požadovaného endogenního genu.

B. Produkt

Jako cílových genů je možno použít velmi mnoha genů jako cílový gen, zahrnujících geny, které kodují zájmový protein nebo kladnou zájmovou sekvenci nebo zájmový ribozym. Cílový gen může být jakákoliv zájmová sekvence, která poskytuje požadovaný fenotyp. Cílový gen může exprimovat protein povrchové membrány, sekretovaný protein, nebo to může být více cílových genů, které mohou exprimovat různé typy produktů. Cílový gen může být kladná sekvence, která může modulovat jednotlivou dráhu inhibicí transkripčního regulačního proteinu nebo spustit jednotlivou dráhu inhibicí translace inhibitoru dráhy. Cílový gen může kodovat ribozym, který může modulovat jednotlivou dráhu interferováním, na úrovni RNA, expresí relevantního transkripčního regulátoru nebo expresí inhibitoru jednotlivé dráhy. Proteiny, které jsou exprimovány, jednotlivě nebo v kombinaci, mohou zahrnovat usazení, cytotoxicitu, proliferaci, imunitní odezvu, zánětlivou odpověď, tvorbu nebo rozpuštění vmetků, hormonální regulaci a podobně. Exprimované proteiny by měly být přirozeně se vyskytující, mutanty přirozeně se vyskytujících proteinů, unikátní sekvence, nebo jejich kombinace.

Genem může být jakýkoliv gen, který je sekretován buňkou, takže kodovaný produkt může být vyroben dostupný

podle potřeby kdykoliv je to žádoucí nebo nezbytné u hostitele. Různé sekretované produkty zahrnují hormony jako je inzulin, lidský růstový hormon, glukagon, faktor spouštějící porod, ACTH, melanotropin, relaxin atd.; růstové faktory jako je EGF, IGF-1, TGF- α , - β , RDGF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, FGF, erythropoietin, megakaryotické stimulační a růstové faktory atd; interleukiny jako je IL-1 až -13; TNF- α , - β atd.; a enzymy jako je tkáňový plasminogenový aktivátor, členové komplementové kaskády, perforiny, superoxid dismutasa, koagulační faktory, antithrombin-II, faktor VIIIC, faktor VIIIVW, α -anti-trypsin, protein C, protein S, endorfiny, dynorfiny, kostní morfogenetický protein, CFTR atd.

Gen může být jakýkoliv gen, který je přirozený protein povrchové membrány nebo vyroben zavedením vhodného signálního peptidu a transmembránové sekvence. Různé proteiny zahrnují usazovací receptory např. L-selektin (Mel-14), proteiny získané z krve, mající zejména kringle strukturu, např. faktor VIIIC, faktor VIIIVW, hematopoietické buněčné markery např. CD3, CD4, CD8, B buněčný receptor, TCB podjednotky α , β , gama, δ , CD10, CD19, CD28, CD33, CD38, CD41 atd., receptory jako jsou interleukin receptory IL-2R, IL-4R, atd, kanálkové proteiny, pro influx nebo eflux iontů, např, H^+ , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- atd a podobně, CFTR, motiv aktivace tyrosinu, zeta aktivační protein atd.

proteiny mohou být modifikovány pro transport k vesiklu pro exocystosis. Při přidání sekvence, který je z proteinu, který je směřován k vesiklu, kde je sekvence modifikována blízko k jednomu nebo druhému konci, nebo umístěna v analogické poloze k proteinovému zdroji, bude modifikovaný protein směřován ke Golgiho aparátu pro zahrnutí do vesiklu. Tento proces ve spojení s přítomností chimérních proteinů pro

exocystosu umožňují rychlý transfer proteinů k extracelulárnímu mediu a relativně vysokou místní koncentraci.

Také mohou být zajímavé intracelulární proteiny, jako jsou proteiny v metabolických drahách, regulátorové proteiny, steroidní receptory, transkripční faktory atd., zejména v závislosti na charakteru hostitelské buňky. Některé z proteinů uvedených výše mohou také sloužit jako intracelulární proteiny.

Následuje několik málo ilustrací různých genů. V T-buňkách je možno požadovat zavedení genů, kodujících jeden nebo oba řetězce T-buněčného receptoru. U B-buněk by mohly být poskytnuty těžké a lehké řetězce pro imunoglobulin pro sekreci. Pro kutánní buňky, např. keratinocyty, zejména kmenové buňky keratinocyty, by mohly být poskytnuty pro ochranu před infekcí, sekretováním α -, β - nebo gama interferonu, antischmotaktických faktorů, proteás specifických pro proteiny bakteriální buněčné stěny atd.

Navíc pro poskytnutí exprese genu, majícího terapeutickou hodnotu, zde může být mnoho situací, kde je žádoucí řídit buňku na jednotlivé místo. Místo může zahrnovat anatomické místo, jako jsou lymfatické uzliny, mukosní tkáň, kůže, synovium, plíce nebo jiné vnitřní orgány nebo funkční místa, jako jsou sraženiny, poškozená místa, místa chirurgických zásahů, zánět, infekce atd. Při poskytnutí exprese povrchových membránových proteinů, které budou řídit hostitelskou buňku k jednotlivému místu poskytnutím vazby k hostitelskému cílovému místu k přirozeně se vyskytujícímu epitopu, je možno dosáhnout místních koncentrací sekretovaného produktu. Zájmové proteiny zahrnují usazovací

receptory, např. L-selektin, GMP140, CLAM-1 atd., nebo addeessiny, např. ELAM-1, PNAd, LNA d atd, proteiny, vázající se ke sraženině, nebo buněčné povrchové proteiny, které odpovídají na lokalizované gradienty chemotaktických faktorů. Je zde mnoho situací, kde by mohlo být žádoucí řídit buňky k jednotlivému místu, kde by uvolnění terapeutického produktu mohlo mít velký význam.

V mnoha situacích by mohlo být žádoucí, aby bylo možno zabít modifikované buňky, jestliže je žádoucí ukončit léčbu, buňky se staly neoplastickými, ve výzkumu, kdy nepřítomnost po jejich přítomnosti je zajímavá nebo v jiných případech. Pro tento účel může být poskytnut pro expresi Fas antigen nebo TNF receptor fuzovaný k vazebné doméně. (Watanable-Fukunaga a spol., Nature (1992), 356, 314-317). V originální modifikaci mohou být poskytnuty pro konstitutivní expresi takové konstrukty, že modifikované buňky mají takové proteiny na svém povrchu nebo přítomné ve své cytoplasmě. Alternativně může být poskytnuta řízená exprese, kde může stejný nebo rozdílný ligand iniciovat expresi a iniciovat apoptosis. Poskytnutím cytoplasmických částí Fas antigenu nebo TNF receptoru v cytoplasmě napojený k vazebným regionům lišícím se od vazebných regionů spojených s expresí zájmového cílového genu, je možno usmrcovat modifikované buňky za řízených podmínek.

C. Ilustrativní příklady

Pro ilustraci byly kardiaci nebo pacienti náchylní k mrtvici, léčení následovně Pacientům byly podány buňky modifikované jak popsáno výše a po určitý čas udržovány. Ilustrativní buňky zahrnují plasmové buňky, B-buňky, T-buňky nebo jiné hematopoietické buňky. Buňky by měla být

modifikována tak, aby exprimovala protein, který se váže ke krevní sraženině, mající kringler doménovou strukturu nebo adhezivní interaktivní protein, např. CD41 a pro expresi proteinu, rozpouštějícího krevní sraženinu, např. aktivátoru tkáňového plasminogenu, streptokinasy atd.

V tomto způsobu při ligandem zprostředkované oligomerizaci, by se buňky měly akumulovat na místě sraženina a poskytnout vysoce lokalizované koncentrace trombolytického proteinu. Jiným způsobem je reperfuzní poškození. Buňky omezené životnosti by mohly být použity, např. makrofágy nebo polymorfojaderné leukocyty ("neutrofily"). Buňky by mohly mít k neutrofilovým směřující receptor k řízení buněk k místu reperfuzního poškození. Buňky by také měly exprimovat superoxid dismutasu pro likvidaci jednoduchého kyslíku a inhibovat radikálový atak na tkáň.

Třetím příkladem je autoimunitní choroba. Mohou být použity buňky prodloužené životnosti, např. T-buňky. Konstrukty by měly poskytovat zaváděcí receptor pro zavedení k místu autoimunního poškození a pro cytotoxický atak na buňky, vyvolávající poškození. Terapie by pak měla být řízena proti buňkám, vyvolávajícím takové poškození. Alternativně by mohly poskytovat sekreci rozpustných receptorů nebo peptidu nebo proteinu, kde by produkt sekrece inhiboval aktivaci poškození vyvolaného buňkami nebo indukovat anergii. Jiné alternativy by mohly sekretovat protizánětlivý produkt, který by mohl sloužit ke zmírnění degenerativních účinků.

Čtvrtý příklad zahrnuje ošetření chronické bolesti s endorfinem přes ankapsulaci. Zásobní lidské fibroblasty se transfekují konstruktem, ve kterém chimérní transkripční regulátorový protein kontroluje transkripci lidského

endorfinu. DNA konstrukt obsahuje tři kopie vazebného místa pro HNF-1* transkripční faktor GTTAAGTTAAC ve směru od TATAAA místa a transkripční iniciační místo. Endorfin cDNA by mohla být inzertována ve směru iniciačního místa a ve směru od polyadenylační a terminační sekvence. Výhodně je endorfin cDNA vybavena "PEST" sekvencemi, které činí protein nestabilním nebo AUUA sekvencemi ve 3' netranslatovaném regionu mRNA umožňujícími, aby byla rychle degradována.

Fibroblasty jsou také transfektovány konstruktem, majícím dvě transkripční jednotky z nichž jedna by měla kodovat HNF-1* cDNA osekánu tak, aby kodovala právě DNA vazebné sekvence od aminokyselin 1 až 250 kondenzované k trimerní FKBP vazebné doméně za transkripční a translační kontrol regulátorových iniciačních a terminačních regionů funkčních ve fibroblastech. Konstrukt by měl obsahovat další transkripční jednotku nesenou stejnými regulátorovými regiony řídící produkci transkripční aktivační domény odvozené z HNF-4 kondenzované ke trimerní FKBP'. (Prvotním záměrem je změněný FKBP, který se váže v nM koncentraci k modifikovanému FK506. Modifikace inhibuje vazbu k endogennímu FKBP).

tyto geneticky modifikované buňky by měly být enkapsulovány pro inhibici imunitního pznání a umístěny pod pacientovu kůži nebo na jiné obvyklé vnitřní místo. Jestliže pacient vyžaduje medikaci bolesti, podává se pacientovi dimerní ligand FK506-FK506', přičemž by asi 1 µg až 1 mg ,ěl být dostačujícíTímto způsobem by mohla být zmírněna bolest bez injekcí nebo nebezpečí návyku.

Pátým příkladem je léčba osteoporosy. Lymfocyty mohou být klonáln vyvinuty nebo kožní fibroblasty v kulturách od

pacienta, který je léčen. Buňky by měly být transfektovány jak je popsáno výše, kde cDNA gen kostního morfogenního faktoru by měl nahradit endorfinový gen. Pro lymfocyty by měly být použity antigen specifické klony, které by měly umožnit jejich destrukci protilátkami k idiotypu sIg. Navíc podání antigenu pro sIg by mohlo rozšířit buněčnou populaci pro zvýšení množství proteinu, který má být doručován. Lymfocytové klony by měly být podávány infuzí a ligand podáván podle potřeby pro produkci kostního morfogenního faktoru. Při sledování odpovědi na ligand je možno upravit množství kostního morfogenního faktoru, který je produkován tak, že se upraví dávka na požadovanou hladinu.

Sestá situace má obecné použití ve spojení s genovými terapiemi, zahrnujícími buňky, jejichž zničení může být žádoucí. Například se modifikované buňky mohou stát kancerogenními nebo vést k jinému patologickému stavu. Konstrukty mohou být transfektovány do modifikovaných buněk, mající nezbytné transkripční a translační regulátorové regiony a kodující protein, který za oligomerizace vede k buněčné smrti, např. apoptosis. Například fas antigen nebo Apo-1 antigen indukuje apoptosis ve většině buněčných typů (Trauth a spol.(1989) Science 245, 301-305; Watanaba-Fukunaga a spol. (1992) Nature 356, 314). Tímto způsobem pro kotransfekci protektivních konstruktů do buněk použitých pro genovou terapii nebo jiné účely, kde může být nezbytné dosáhnout smrti části nebo všech buněk, mohou být buňky modifikovány pro poskytnutí kontrolované cytotoxicity pomocí ligandu.

další situace je modifikace antigen specifických T-buněk, kde je možno aktivovat expresi proteinu produktu pro aktivaci buněk. T buněčný receptor by mohl být řízen proti

nádorovým buňkám, patogenům, buňkám, zprostředkujícím autoimunitu a podobně. Při poskytnutí pro aktivaci buněk, například, by mohl být poskytnut interleukin jako je iL-2 pro expanzi modifikovaných T buněk v odezvě na ligand. Jiné použití modifikovaných T buněk by mohlo zahrnovat expresi usměrňujících receptorů pro řízení T buněk ke specifickým místům, kde by byla žádoucí cytotoxicita, přeregulace povrchového membránového proteinu cílových buněk, např. endotheliálních buněk.

Alternativně je možno toto očekávat při doručení vysokých dávek cytotoxických faktorů k cílovému místu. Například při rozpoznávání nádorových antigenů přes usměrňovací receptor, mohou být nádorová infiltrující lymfocyty (TIL) spuštěny pro doručení toxických koncentrací TNF nebo jiných podobných produktů.

Jinou alternativou je exportování hormonů nebo faktorů, které jsou exocytosovány. Při zvýšené exocytosis bude exportováno větší množství hormonu nebo faktoru; navíc jestliže je zde mechanismus zpětné vazby založen na množství hormonu nebo faktoru v cytoplasmě, bude docházet ke zvýšené produkci hormonu nebo faktoru. Nebo může být poskytnuta indukovaná exprese hormonu nebo faktoru tak, že exprese a export mohou být indukovány současně.

Mohou být také poskytnuty proteiny v zadržených tělesných kapalinách, např. vaskulárním systému, lymfatickém systému, cerebrospinální kapalině atd. Při modifikaci buněk, které mohou mít prodlouženou životnost v hostiteli, např. hematopoietických buněk, keratinocytů, svalových buněk atd. zejména kmenových buněk, mohou být proteiny udrženy v kapalinách po prodlouženou časovou periodu. Buňky mohou být

modifikovány konstrukty, které poskytují sekreci nebo endocytosis. Konstrukty pro sekreci by měly mít translokační doménu, signální peptid a pak jako v případě chimérních proteinů, vazebnou doménu a akční doménu. Akční domény mohou být odvozeny od stejných nebo odlišných proteinů. Například s tkáňovým plasminogenovým aktivátorem, by měly mít sraženinový vazebný region jako jednu akční doménu a plasminogenové aktivní místo jako odlišnou akční doménu. Alternativně by mohla být poskytnuta zvýšená blokáda usměrnění tím, že je přítomen vazebný protein, jako je LFA-1 jako jedna akční doména a selekce jako druhá akční doména. Při modifikaci podjednotek proteinů, např. integrinů, T-buněčný receptor, slg nebo podobně, by mohly poskytovat rozpustné formy povrchových membránových proteinů, které by se mohly spolu vázat k molekule. Jinou vhodnou příležitostí jsou komplementové proteiny, destičkové membránové proteiny obsažené ve sraženině, autoantigeny na povrchu buněk a patogenní molekuly na povrchu infekčních činitel.

IX. Zavedení konstruktů do buněk

Konstrukty mohou být zavedeny jako jedna nebo více DNA molekul nebo konstruktů, kde tyto budou obvykle mít alespoň jeden marker a musí mít dva nebo více markerů, které umožní selekci hostitelských buněk, které obsahují konstrukt(y). Konstrukty mohou být připraveny obvyklými postupy, kdy geny a regulátorové regiony mohou být izolovány, podle potřeby, ligovány, klonovány ve vhodném klonovacím hostiteli, analyzovány restrikcí nebo sekvenováním nebo jinými obvyklými prostředky. Obvykle za použití PCR, mohou být izolovány jednotlivé fragmenty zahrnující celé nebo části unikénní jednotky, kde může být zavedena jedna nebo více mutací za použití "primer opravy", ligací, in vitro mutagenesí atd.

podle potřeby. Konstruk(y) takto kompletované a doložené, že mají vhodné sekvence pak mohou být zavedeny do hostitelské buňky jakýmkoliv obvyklými prostředky. Konstrukty mohou být integrovány a uzavřeny do nereplikujících, defektních virálních genomů podobných Adenoviru, adeno-asociovanému viru (AAV) nebo Herpes simplex viru (HSV) nebo jiných, zahrnujících retrovirální vektory, pro infekci nebo transdukcii do buněk. Konstrukty mohou obsahovat virální sekvence pro transfekci, je-li to žádoucí. Alternativně může být konstrukt zaveden fuzí, elektroporací, biolisticky, transfekcí, lipofekcí nebo podobně. Hostitelská buňka bude obvykle růst a expandovat v kultuře před zavedením konstruktu(ů), s následujícím vhodným ošetřením pro zavedení konstruktu(ů) a integraci konstruktu(ů). Buňky budou pak expandovat a být screenovány pomocí markeru přítomného v konstruktu. Různé markery, které mohou být použity zahrnují hprt, neomycinovou rezistenci, thymidin kinázu, hygromycin rezistenci atd.

V některých případech může zde být cílové místo pro homologní rekombinaci, je-li žádoucí, aby byl konstrukt integrován na jednotlivý lokus. Například může vyřadit endogenní gen a nahradit jej (na témže místě nebo někde jinde) genem, kodujícím v konstruktu za použití materiálů a metod, které jsou známy v oboru pro homologní rekombinaci. Alternativně, místo poskytnutí genu, je možno modifikovat transkripční iniciační region endogenního genu aby byl odpovídající k signální iniciační doméně, takových provedení, transkripcí endogenního genu jako je EPO, tPA, SOD nebo podobně by mohla být kontrolována podáním ligandu. Pro homologní rekombinaci je možno použít buď Ω nebo O-vektory. Viz například Thomas a Capecchi, Cell (1987) 51, 503-512; Mansour a spol., Nature (1988) 336, 348-352 a Joyner a spol.,

Nature (1989) 338, 153-156.

Konstrukty mohou být zavedeny jako jediná DNA molekula, kodující všechny geny nebo různé molekuly, mající jeden nebo více genů. Konstrukty mohou být zavedeny současně nebo postupně, každý se stejnými nebo rozdílnými markery. V ilustrativním příkladu by měl jeden konstrukt obsahovat terapeutický gen pod kontrolou specifického odpovídajícího elementu (např. NFAT), další kodující receptorový fuzní protein, obsahující signální region fuzovaný k ligandové receptorové doméně (např. jako v MZF3E). Může být také zavedena třetí DNA molekula, kodující usměrňující receptor nebo jiný produkt, který zvyšuje účinnost doručení terapeutického produktu.

Vektory, obsahující vhodné prvky jako bakteriálního nebo kvasinkového původu replikace, selektující a/nebo amplifikující markery, prvky promotor/enhancer pro expresi v prokaryotech nebo eukaryotech, atd. které mohou být použity pro přípravu zásobních konstruktových DNA a pro provedení transfekce, jsou dobře známé v oboru a mnoho z nich je obchodně dostupných.

X. Podání buněk a ligandů

Buňky, které byly modifikovány DNA konstrukty pak rostou v kultuře za selektivních podmínek a buňky, které jsou vybrány jako mající konstrukt mohou pak být expandovány a dále analyzovány za použití například polymerázové řetězové reakce pro stanovení přítomnosti konstruktů v hostitelské buňce. Jakmile byla hostitelská buňka identifikována, může pak být použita podle záměru, např. pěstována v kultuře nebo zavedena do hostitelského organismu.

Podle charakteru buněk mohou být buňky zavedeny do hostitelského organismu, např. savce, mnoha způsoby. Hematopoietické buňky mohou být podány injekcí do vaskulárního systému, obvykle v množství alespoň asi 10^4 buněk a obecně ne více než asi 10^{10} , obvykleji ne více než asi 10^8 buněk. Počet buněk, které se použijí bude záviset na mnoha okolnostech, účelu podání, životnosti buněk, použitém protokolu, například počtu podání, schopnosti buněk se pomnožovat, stabilitě terapeutického činidla, fyziologické potřebě terapeutického činidla a podobně. Alternativně, u kožních buněk, které mohou být použity jako transplantáty, bude počet buněk záviset na velikosti vrstvy, která má být aplikována na spáleninu nebo jinou lézi. Obecně pro myoblasty nebo fibroblasty bude počet buněk alespoň asi 10^4 a ne více než asi 10^8 a tyto mohou být aplikovány jako disperze, obecně injekcí nebo blízko zájmového místa. Buňky obvykle budou ve fyziologicky přijatelném mediu.

Místo modifikace buněk ex vivo je v mnoha případech žádoucí modifikovat buňky in vivo. Pro tento účel byly vyvinuty různé techniky pro modifikaci cílové tkáně a buněk in vivo. Bylo vyvinuto mnoho virových vektorů, jako je adenovirus a retroviry, které umožňují transfekci a náhodnou integraci viru do hostitele. Viz např. Dubensky a spol. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 7529-7533; Kaneda a spol., (1989) Science 243, 375-378; Hiebrt a spol. (1989) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86, 3594-3598; Hatzoglu a spol. (1990) J.Biol.Chem. 265, 17285-17293 a Ferry a spol. (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 8377-8381. Vektor může být podán injekčně, např. intravaskulárně nebo intramuskulárně, inhalací nebo parenterálním způsobem.

V souladu s in vivo genetickou modifikací bude způsob modifikace záviset na charakteru tkáně, účinnosti vyžadované buněčné modifikace, počtu příležitostí k modifikaci jednotlivých buněk, dosažitelnosti tkáně, ke které bude DNA přípravek zaváděn a podobně. Při použití zeslabeného nebo modifikovaného retroviru nesoucího cílový transkripční iniciační region, je možno virus aktivovat použitím jednoho z konstruktů transkripčních faktorů tak, že virus může být produkován a transfektovat připojené buňky.

Zavedení DNA nemusí vést k integraci v každém případě. V některých situacích může být dostačující přechodné uchování zavedené DNA. V tomto postupu zde bude krátkodobý účinek, kdy buňky by měly být zavedeny do hostitele a pak obráceny v předem stanovené době, například, po té, co buňky byly schopny se usadit na jednotlivé místo.

Ligand poskytující aktivaci cytoplasmické domény pak může být podán, je-li to žádoucí. V závislosti na vezebné afinitě ligandu, požadované odezvě, způsobu podání, poločasů života, počtu přítomných buněk, mohou být použity různé protokoly. Ligand může být podán parenterálně nebo orálně. Počet podání bude záviset na výše popsaných faktorech. Ligand může být přijímán orálně jako pilulka, prášek nebo disperze; bukálně; sublinguálně; injektován intravaskulárně, intraperitoneálně, subkutánně; inhalací nebo podobně. Ligand (a monomerní sloučenina) mohou být formulovány za použití obvyklých metod a materiálů známých v oboru pro různé způsoby podání. Přesná dávka a jednotlivá metoda podání budou záviset na výše uvedených faktorech a budou stanoveny příslušným lékařem nebo humánním nebo veterinárním ošetřovatelem. Většinou bude způsob podání stanoven empiricky.

konkrétní potřeba pacienta, která se může měnit s časem a okolnostmi, rychlost ztráty buněčné aktivity jako výsledek ztráty buněk nebo expresní aktivity jednotlivých buněk a podobně. Proto se očekává, že pro každého jednotlivého pacienta, ikdyž se použije univerzálních buněk, které by mohly být podávány rozsáhlé populaci, bude každý pacient sledován pro určení správné dávky pro jednotlivce.

Předložená metodologie a kompozice mohou být použity pro léčbu různých stavů a indikací. Například B- a T-buňky mohou být použity pro léčbu rakoviny, infekčních chorob, metabolických poruch, kardiovaskulárních chorob, dědičných koagulačních nedostatků, autoimunitních chorob, kloubových degenerativních chorob např. arthrititis, plicních chorob, ledninových chorob, endokrinních abnormalit atd. Různé buňky obsažené ve struktuře, jako jsou fibroblasty a myoblasty, mohou být použity v léčbě genetických poruch jako jsou nedostatečnost pojivové tkáně, arthrititis, jaterní onemocnění atd. Hepatocyty by mohly být použity v případech, kdy musí být vyrobena velká množství proteinu pro doplnění nedostatku nebo pro doručení terapeutického produktu k játrům nebo portálnímu oběhu.

Následující příklady slouží pouze k ilustraci a v žádném případě ne k omezení.

Příklady provedení vynálezu

Buněčná transformace a hodnocení

Příklad 1

Indukce izolovaný IL-2 enhancer-vazebné transkripční faktory zesílením CD3 řetězce T-buněčného receptoru

Plasmid pSXNeo/IL2 (IL2-SX)(obr. 1), který obsahuje gen placentálně sekretované alkalické fosfatázy pod kontrolou lidského IL-2 promotoru (-325 až +47; MCB(86),6, 3042) a příbuzné plasmidové varianty (např. NFAT-SX, NF B-SX, OAP/Oct1-SX a AP-1-SX), ve kterých je reporterový gen pod transkripční kontrolou minimálně IL-2 promotoru (-325 až -294 a -72 až +47) kombinované se syntetickými oligomery, obsahujícími různé promotorové elementy (tj. NFAT, NK B, OAP/Oct-1 a AP1) byly vyrobeny třemi ligacemi 1) pPL/SEAP (Berger a spol., Gene (1988) 66,1) za štěpení s SspI a HindIII; 2) pSV2/Neo (Southern a Berg, J.Mol.Appl.Genet. (1982)1,332), štěpen s NdeI, ztupen Klenowem, potom štěpen s PvuI a 3) různé promotor obsahující plasmidy (tj. NFAT-CD8, B-CD8, cx12lacZ-Oct-1, AP1-LUCIF3H, nebo cx15IL2)(popsány dále) štěpeny s PvuI a HindIII. NFAT-CD8 obsahuje 3 kopie NFAT-vazebného místa (-286 až -257; Genes a Dev.(1990)4, 1823) a cx12lacZ-Oct obsahuje 4 kopie OAP/Oct-1 (ARRE-1) vazebného místa (MCB,(1988)8,1715) z lidského IL-2 enhanceru; B-CD8 obsahuje 3 kopie NF B vazebného místa z myšího lehkého řetězce (EMBO (1990)9, 4425) a AP1-LUCIF3H obsahuje 5 kopií AP-1 místa (5'-TGACTCAGCGC-3') z metalothioninového promotoru.

V každé transfekci bylo 5 µg expresního vektoru, pCDL-SR (MCB 8,466-72)(Tac-IL-2-receptor-řetězec), kodujícího chimérní receptor TAC/TAC/Z (TTZ)(PNAS 88, 8905-8909), bylo kotransfektováno spolu s různými sekretujícími reporterovými plasmidy na bázi alkalické fosfatázy (viz mapa pSXNeo/IL2 na obr. 1) v TAg Jurkat buňkách (deriváty lidské T-buněčné leukemické linie Jurkat stabilně transfektované s SV40 velkým T antigenem (Northrup a spol., J.Biol.Chem.[1993]. Každý reporterový plasmid obsahuje více oligonukleotidů vazebného

místa pro rozlišení IL-2 enhancer-vazba transkripčního faktoru v kontextu s minimálním IL-2 promotorem nebo, alternativně, celý IL-2 enhancer/promotor proti směru reporterového genu. Po 24 hodinách byly podíly buněk (přibližně 10^5) umístěny do mikrotitračních jamek, obsahujících log ředění navázaného anti-TAC (CD25) mAB (33B3,1; AMAC, Westbrook, ME). Jako pozitivní kontrola a pro kontrolu účinnosti transfekce byl přidán ionomycin ($1 \mu\text{M}$) a PMA (25 mg/ml) k podílům z každé transfekce. Po dalších 14 hodinách inkubace byly supernatanty zkoušeny na aktivitu alkalické fosfatázy a tyto aktivity byly vyjádřeny ve vztahu k aktivitám pozitivních kontrolních vzorků. Přídavek 1 ng/ml FK506 potlačuje všechnu aktivitu díky NFAT na základní hladinu, což demonstruje, že deaktivace jsou ve stejné dráze jako je ta, která je blokována FK506. Každá získaná hodnota je průměr ze dvou vzorků a pokus byl proveden několikrát s podobnými výsledky. Viz obr. 5. Uvedené hodnoty ukazují, že se známým extracelulárním receptorem je možno získat vhodnou odpověď s reporterovým genem a různými enhancery. Podobné výsledky byly získány jestliže se použije MAb proti TcR komplexu (tj. OKT3).

Příklad 2

Inhibiční aktivita imunosupresantových léčiv FK506 a cyklosporinu A (CsA) nebo dimerních příbuzných sloučenin FK1012A (8), FK1012B (5) a CsA dimeru (PB-1-218)

Ionomycin ($1 \mu\text{M}$) a PMA (25 ng/ml) byly přidány k 10^5 TAg-Jurkat buňkám. Dále byly přidány titrace různých léčiv. Po 5 hodinách byly buňky lyzovány v mírném detergentu (tj. Tritonu X-100) a extrakty byly inkubovány s β -galaktosidázovým substrátem, MUG

(methylgalaktosidylumbelliferon) po 1 hodinu. Byl přidán glycin/EDTA stop pufr a extrakty byly zkoušeny na fluorescenci. Každý údaj byl průměr ze dvou vzorků a pokus byl několikrát proveden se stejnými výsledky. Je kuriozní, že FK1012B projevuje přírůstek aktivity slabý při nejvyšší koncentraci (tj. 5 $\mu\text{g/ml}$), avšak kontrolní pokusy ukazují, že FK1012B je samotný nestimulační. Viz obr. 6.

Příklad 3

Aktivita dimerního FK506 derivátu, FK1012A, k chiméřnímu FKBP12/CD3 (1FK3) receptoru

5 μg eukaryotického expresního vektoru, pBJ5 (na bázi pCDL-SR s polylinkerem inzertovaným mezi 165 štěpné místo a poly A místo), obsahujícího chimerní receptor (1FK3), byl kotransfektován se 4 μg NFAT-indukovaně alkalickou fosfatázu sekretujícího reporterového plasmidu, NFAT-SX. Jako kontrola bylo použito 5 μg pBJ5 místo 1FK3/pBJ5, v paralelní transfekci. Po 24 hodinách byly podíly každé transfekce, obsahující přibližně 10^5 buněk inkubovány s log ředěními léčiva, FK1012A, jak je uvedeno. Jako pozitivní kontrola a pro kontrolu transfekční účinnosti byly přidány ionomycin (1 μm) a PMA (25 ng/ml) k podílům z každé transfekce. Po dalších 14 hodinách inkubace byly supernatanty zkoušeny na aktivitu alkalické fosfatázy a tyto aktivity byly vyjádřeny ve vztahu k aktivitám pozitivních kontrolních vzorků. Přídavek 2 ng/ml FK506 snižuje stimulace na základní hladiny, což demonstruje, že aktivace jsou ve stejné dráze jako je ta, která je blokována FK506. Proto FK506 nebo cyklosporin budou sloužit jako účinná antidota k použití těchto sloučenin. Všechny získané hodnoty jsou průměr ze dvou vzorků a pokus byl proveden několikrát s podobnými výsledky. Viz obr. 7.

Příklad 4A

Aktivita dimerního FK506 derivátu, FK1012B, na myristoylovaném chimerním CD3/FKBP12 (MEF3E) receptoru

Úspěšně jsme demonstrovali mnoho přiblížení k ligandovému deženu, zahrnující pozitivní výsledky s HOD činidly na bázi FK506 činidly pojmenovanými "FK1012". Bylo zjištěno, že FK1012 dosahuje vysokou afinitu, 2:1 vazebnou stechiometrii ($K_d(2) = 0,8 \text{ nM}$) a neinhibuje calcineurin-zprostředkovanou TCR signalizaci. Ligandy nejsou ani "imunosupresivní" ani toxické (až do 0,1 mM v buněčné kultuře). Podobně jsme připravili homodimerizační inidlo na bázi cyklosporinu A, "(CsA)₂", které se váže k CsA receptoru, cyklofylin, se stechiometrií 1:2, ale neváže se ke calcineurinu. Takto podobně jako FK1012, (CsA)₂ neinhibuje signální dráhy a není proto ani imunosupresivní ani toxická.

Tyto a jiné naše příklady ligandem zprostředkované proteinové asociace vedou ke kontrole signální transdukční dráhy. V ilustrativním případě je toto uskutečněno vytvořením intracelulárního receptoru, obsahujícího malý fragment Src dostačující pro posttranslační myristoylaci (M), cytoplasmický konec zeta (Z; složka B buněčného receptoru byla také použita), tři po sobě jdoucí FKBP12(F3) a flu pitop tag (E). Při expresi konstruktů MZF3E (obr.18) v lidských (Jurkat) T buňkách, jsme potvrdili, že kodovaný chimerní protein prochází FK1012- zprostředkovanou oligomerizací. Doprovodná agregace zeta řetězce vede k signalizaci přes endogenní TCR-signální dráhu (obr. 15), jak je zřejmé při sekreci alkalické fosfatázy (SEAP) v dpovědi na FK1012

Výsledek kontroly Fas dráhy by mohl mít důležité implikace pro biologický výzkum a medicínu v budoucnosti. Transgenní zvířata by mohla být vytvořena se "smrtí" responder genů pod kontrolou buněčně specifických promotorů. Cílové buňky by pak mohly být chemicky ablatovány v dospělém zvířeti při ošetření s HOD činidlem. V této cestě by mohla být hodnocena úloha specifických mozkových buněk v paměti nebo poznání nebo imunitních buněk ve vyvolání a udržení autoimunitních poruch. Smrt responder genů by mohla být zavedena do nádorů za použití humánních genových terapeutických technik vyvinutých M.Blaesem a spolupracovníky (Culver a spol., Science 256 5063(1992):1550-2) a potom být následně aktivovány ošetřením pacienta s HOD činidlem (analogicky k "gancyclovirovým" genové terapeutickým klinickým pokusům v současnosti uváděným pro léčbu mozkových nádorů). Nakonec jsme uvažovali o složce genové terapie v budoucnosti, která by měla zahrnout spolené podání smrt-responder genu spolu s terapeutickým genem. Toto by mohlo poskytnout "proti selhání bezpečnou (failsafe)" složku pro genovou terapii. Jestliže bylo něco provedeno špatně (obvyklá diskuse se týká integrace-indukované ztráty nádorového supresorového genu vedoucí k rakovině), genová terapie pacienta by mohla způsobit "protiselhání bezpečnou" pilulku, která by mohla usmrtit všechny transfektované buňky. Tento koncept vyvolal potřebu zaměřit se na vývoj orthogonálního systému HOD činidel. Byl tedy potřebný druhý set činidel, která nemají možnost křížové reakce s prvními, která by mohla být použita pro uzavření nebo spuštění transkripce terapeutických genů.

Chimérní cDNA, obsahující tři FKBP12 domény fuzované k cytoplasmické signální doméně Fas antigenu (obr. 20) byly konstruovány. Tento konstrukt, ~~je-li~~ ~~je-li~~ exprimován v lidských

Jurkat a myších D10 T buňkách, mohou být indukovány k dimerizaci FK1012 činidlem a iniciovat signální kaskádu vedoucí k FK1012-závislé apoptosis. LD₅₀ pro FK1012A-zprostředkovanou smrt buněk přechodně transfektovaných s MFF3E je 15 nM stanoveno ztrátou aktivity reporter genu (obr. 20, diskuse ke zkoušce viz legenda k obr.21). Tato data jsou v souladu s měřeními buněčné smrti ve stabilně transfektovaných buněčných liniích. Protože stabilní transfektanti představují homogenní populaci buněk, byli použiti ke zjištění, že smrt je způsobena apoptosou spíše než nekrosou (membránové puchýřkování, nukleosomální DNA fragmentace). Nicméně protokol přechodné transfekce vyžaduje mnohem méně práce a byl proto použit jako počáteční zkušební systém jak je popsáno dále.

Příklad 4(C)

Regulace programované buněčné smrti s cyclofilin-Fas antigen chimérami

Připravili jsme serie konstruktů cyclofilin C-Fas antigen a studovali jsme jejich schopnost indukovat (CsA)2-závislou apoptosis ve studii přechodné exprese (obr.21A). Dále (CsA)2-závislá apoptosis byla demonstrována s lidskými Jurkat T buňkami stabilně transfektovanými nejaktivnějším konstruktem v seriích, MC3FE (M= myristoylační doména Src, C= cyclofilinové doména, F=cytoplasmický konec Fas, E-flu epitop tag). Cytoplasmický konec Fas byl fuzován buď před nebo po 1,2,3 nebo 4 po sobě jdoucích cyclofilinových doménách. Dva kontrolní konstrukty byly také připraveny, které postrádají Fas doménu. V tomto případě jsme pozorovali, že signalizační doména působí pouze je-li umístěna po dimerizačních doménách. (Zeta řetězcové konstrukty signalizují jsou-li umístěny buď před nebo po dimerizačních

doménách). Obě expresní hladiny osmi signálních konstruktů, byly hodnoceny Western blottingem a jejich aktivity se kvantitativně liší (obr.21B). Jako optimální systém byl takto hodnocen MC3FE. LD₅₀ pro (CsA)2-zprostředkovanou buněčnou smrt s MC3FE je ≈ 200 nM. Tyto údaje demonstrují použitelnost interakcí cyclofilin-cyclosporin pro regulaci intracelulární proteinové asociace a ilustrují orthogonální činidlový systém, který nebude křížově reagovat se systémem FKBP12-FK1012. Dále v tomto případě údaje ukazují, že pouze dimerizace a ne agregace je vyžadována pro iniciaci signální transdukce Fas cytoplasmickým koncem.

Mutace N-terminálního myristoylačního signálu k alaninu brání myristoylaci a tím membránové lokalizaci. také jsme pozorovali, že mutovaný konstrukt (MFF3E) byly stejně potentní jako induktor FK1012-závislé apoptosis, což indikuje, že membránová lokalizace není nezbytná pro Fas-zprostředkovanou buněčnou smrt.

Příklad 5

Konstrukce myšího signalizačního chimérického proteinu

Byly získány různé proteiny za použití primerů popsaných na obr.4. Při uvádění čísel primerů je třeba odkázat na obr.4.

Přibližně 1,2 kb cDNA fragment, obsahující I-E řetězec myšího třída II MHC receptoru (Cell, 32, 745) byl použit jako zdroj signálního peptidu za použití P#6048 a P#6049 za získání 70 bp SacII-XhoI fragmentu za použití PCR jak je popsáno dodavatelem (Promega). Druhý fragment byl získán za použití plasmidu, obsahujícího Tac (IL2 receptorový řetězec), připojeného k transmembránovým acytoplasmickým doménám CD3

(PNAS, 88, 8905). Za použití P#6050 a P#6051 byl získán XhoI-EcoRI fragment PCR, obsahující transmembránové a cytoplasmické domény CD3. Tyto dva fragmenty byly ligovány a inzertovány do SacII-EcoRI štěpeného pBluescript (Stratagene) pro poskytnutí plasmidu, SPZ/KS.

K získání vazebné domény pro FK506, byl použit plasmid rhFKBP (poskytnut S.Schreiberem, Nature(1990) 346, 674) s P#6052 a P#6053 pro získání 340 bp HhoI-SalI fragmentu, obsahujícího lidský FKBP12. Tento fragment byl inzertován do pBluescript štěpeného s XhoI a SalI pro poskytnutí plasmidu FK12/KS, který byl zdrojem pro FKBP12 vazebnou doménu. SPZ/KS byl štěpen s XhoI, fosfatázován (buněčná intestinální alkalická fosfatáza; CIP) k zabránění samoteplotní hybridizaci a spojen s 10násobným molárním přebytkem XhoI-salI FKBP12-obsahujícím fragment z FK12/KS. Byly izolovány klony, obsahující monomery, dimery a trimery FKBP12 ve správné orientaci. Klony 1FK1/KS, 1FK2/KS a 1FK3/KS zahrnují ve směru transkripce; signální peptid z myšího MHC třída II genu I-E, monomer, dimer nebo trimer lidského FKBP12 a transmembránové a cytoplasmické podíly CD3. Nakonec byly SacII-EcoRI fragmenty vyříznuty z pBluescript za použití restričních enzymů a ligovány do polylinkeru pBJ5 štěpeného s SacII a EcoRI pro vytvoření plasmidů 1FK1/pBJ5, 1FK2/pBJ5 a 1FK3/pBJ5. Viz obr.3 a 4.

Příklad 6

A. Konstrukce intracelulární signální chiméry

Myristoylační sekvence z c-src byla získána od Pellmana a spol., Nature 314,374 a napojena ke komplementární sekvenci CD3 za získání primeru, který byl komplementární k sekvenci 3 z transmembránové domény, jmenovitě P#8908. Tento primer má

SacII místo připojené k 5' konci a XhoI sekvenci připojenou k myristoylační sekvenci. Druhý primer P#8462 má SalI rozponávací místo 3' ze sekvence komplementární ke 3' konci CD3, stop kodon a EcoRI rozpoznávací místo. Použitím PCR byl získán 450 bp SacII-EcoRI fragment, který obsahuje myristoylační sekvenci a CD3 sekvenci fuzované ve směru od 5' ke 3'. Tento fragment byl ligován do SacII/EcoRI štěpeného pBJ5(XhoI)(SalI) a klonován za vzniku plasmidu MZ/pBJ5. Nakonec byl MZ/pBJ5 štěpen se SalI, fosfatásován a spojen s 10molárním přebytkem XhoI-SalI FKBP12-obsahujícím fragment z FK12/KS a ligován. Po klonování plasmidy obsahující požadované konstrukty, mající myristoylační sekvenci, CD3 a FKBP12 multimery ve směru 5'-3' byly izolovány a ověřeny, zda mají správnou strukturu. Viz obr.2 a 4

B Konstrukce expresních kazet pro intracelulární signální chiméry.

Konstruk MZ/pBJ5 (MZE/pBJ5) je štěpen s restrikčními enzymy XhoI a SalI, TCR fragment je odstraněn a výsledný vektor je ligován s 10násobným přebytkem monomeru, dimeru, trimeru nebo vyššího multimeru FKBP12 za vzniku MF1E, MF2E, MF3E nebo MF_nE/pBJ5. Aktivní domény tvarované tak, že obsahují kompatibilní přiléhající restrikční místa (t. XhoI a SalI) pak byly klonovány do jedinečných XhoI nebo SalI restrikčních míst MF_nE/pBJ5.

Příklad 7

Konstrukce jaderné chiméry

A. GAL4 DNA vazebná doména - FKBP doména(y)-epitop tag.

Gal4 DNA vazebná doména (aminokyseliny 1-147) byla amplifikována PCR za použití 5' primeru (#37), který obsahuje SacII místo proti směru Kozak sekvence a translační start místo a 3' primeru (#38), který obsahuje SalI místo. PCR produkt byl izolován, štěpen s SacII a ligován do úBluescript II KS(+) na SacII a SalI místech, za vzniku konstruktů pBS-GAL4. Konstrukt byl ověřen sekvenováním. SacII/SalI fragment z pBS-GAL4 byl izolován a ligován do IFK1/pBJ5 a IFK3/pBJ5 konstruktů (obsahujících myristoylační sekvenci, viz příklad 6) na SacII a XhoI místa, za vzniku konstruktů GF1E, GF2E a GF3E.

5' konec PCR amplifikovaného produktu:

```

          SacII          |----Gal4(1-147)---->
                        M K L L S S I
5'   CGACACCGCGGCCACCATGAAGCTACTGTCTTCTATCG
          Kozak

```

3' konec PCR amplifikovaného produktu:

```

          <<----Gal4(1-147)----)|
          R Q L T V S
5'   GACAGTTGACTGTATCGGTCGACTGTCTG
3'   CTGTCAACTGACATAGCCAGCTGACAGC
          SalI

```

B. NF1 dimerizační/DNA vazebná doména - FKBP doména(y) - tag.

HNFla dimerizační/DNA vazebná doména (aminokyseliny 1-282) byla amplifikována PCR za použití 5' primeru (#39), který obsahuje SacII místo proti směru Kozak sekvence a translační start místo, a 3' primetu (#40), který obsahuje

SalI místo. PCR produkt byl izolován, štěpen s SacI a SalI a ligován do pBluescript II KS(+) na místa SacII a SalI, za vzniku konstruktů pBS-HNF. Konstrukt byl ověřen sekvenováním. SacII/SalI frgment z pBS-HNF byl izolován a ligován k IFK1/pBJ5 a IFK/pBJ5 konstruktům na SacII a XhoI místa za vzniku konstruktů HF1E, HF2E a HF3E.

5' konec PCR amplifikovaného produktu:

```

SacII      |--HNF1(1-281)-->>
            M V S K L S
5'  CGACACCGCGGCCACCATGGTTTCTAAGCTGAGC
      _____
      Kozak

```

3' konec PCR amplifikovaného produktu:

```

<<----- HNF1 (1-282) -----|
A F R H K L
5'  CCTTCCGGCACAAGTTGGTCGACTGTCTG
3'  GGAAGGCCGTGTTCAACCAGCTGACAGC
      _____
      SalI

```

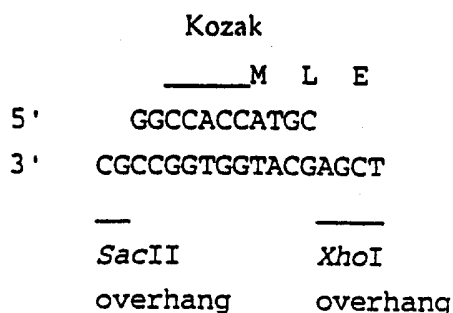
C. FKBP doména(y)-VP16 transkrip.aktivační doména(y)-epitop tag.

Tyto konstrukty byly vyrobeny ve dvou stupních: (i) byl vytvořen konstrukt z IFK3/pBJ5, ve kterém byla myristoylační sekvence nahrazena start místem bezprostředně proti směru od XhoI místa, za vzniku konstruktů SF3E; (ii) jaderně lokalizující sekvence byla izertována do XhoI místa za vzniku

konstruktu NF3E; (ii) VP16 aktivační doména byla klonována do SalI místa NF3E za vzniku konstruktů NF3V1E.

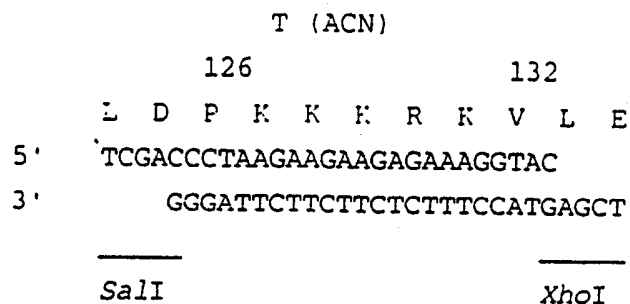
(i) Komplementární oligonukleotidy (#45 a #46), kodující Kozak sekvenci a start místo přiléhající k SacII a XhoI místům byly teplotně hybridizovány, fosforylovány a ligovány do SacII a XhoI místa MF3E, za vzniku konstruktů SF3E.

Inzerce generického start místa



(ii) Komplementární oligonukleotidy (#47 a #48), kodující SV40 T antigen jaderně lokalizující sekvence přiléhající k 5' SalI místu a 3' XhoI místu byly teplotně hybridizovány, fosforylovány a ligovány do XhoI místa SF1E, za vzniku konstruktů NF1E. Konstrukt byl ověřen DNA sekvenováním. Konstrukt, obsahující mutant nebo defektní formu jaderně lokalizující sekvence, ve které threonin nahrazuje lysin v poloze 128, byl také izolován. Tento je označen NF1E-M. Multimery FKBP12 domény byly získány izolací FKBP12 sekvence jako XhoI/SalI fragmentu z pBS-FKBP12 a ligací tohoto fragmentu do NF1E linearizován s XhoI. Toto vedlo k poskytnutí konstruktů NF2E a NF3E.

Inzerce NLS do generického start místa



Threonin v poloze 128 vede k defektní NLS.

(iii) VP16 transkripční aktivační doména (aminokyseliny 413-490) byla amplifikována PCR za použití 5' primeru (#43), který obsahuje SalI místo a 3' primeru (#44), který obsahuje XhoI místo. PCR produkt byl izolován, štěpen s SalI a XhoI a ligován do MF3E na XhoI a SalI místa, za poskytnutí konstruktů MV1E. Konstrukt byl ověřen sekvenováním. Multimerizované VP16 domény byly vytvořeny izolací jednotlivé VP16 sekvence jako XhoI/SalI fragmentu z MV1E a ligací tohoto fragmentu do MV1E linearizovaného s XhoI. Konstrukty MV2E, MV3E a MV4E byly generovány tímto způsobem. DNA fragmenty, kodující jednu nebo více VP16 domén byly izolovány jako XhoI/SalI fragmenty z MV1E nebo MV2E a ligovány do NF1E linearizovaného s SalI, za vzniku konstruktů NF1V1E a NF1V3E. Multimery FKBP12 domény byly získány izolací FKBP12 sekvence jako XhoI/SalI fragment z pBS-FKBP12 a ligací tohoto fragmentu do NF1V1E linearizovaného s XhoI. Toto vede k vytvoření konstruktů NF2V1E a NF3V1E.

5' konec PCR amplifikovaného produktu:

*Sal*I |--VP16(413-490)--->>
 _____ A P P T D V
 5' CGACAGTCGACGCCCCCGACCGATGTC

3' konec PCR amplifikovaného produktu:

<<-- VP16(413-490)----|
 D E Y G G
 5' GACGAGTACGGTGGGCTCGAGTGTCG
 3' CTGCTCATGCCACCCGAGCTCACAGC

 *Xho*I

Oligonukleotidy:

#37 38mer/0.2um/OFF 5'CGACACCGCGGCCACCATGAAGCTACTGTCTT
 CTATCG
 #38 28mer/0.2um/OFF 5'CGACAGTCGACCGATACAGTCAACTGTC
 #39
 34mer/0.2um/OFF 5'CGACACCGCGGCCACCATGGTTTCTAAGCTGAGC
 #40 28mer/0.2um/OFF 5'CGACAGTCGACCAACTTGTGCCGGAAGG
 #43 29mer/0.2um/OFF 5'CGACAGTCGACGCCCCCGACCGATGTC
 #44 26mer/0.2um/OFF 5'CGACACTCGAGCCCACCGTACTCGTC
 #45 26mer/0.2um/OFF 5'GGCCACCATGC
 #46 18mer/0.2um/OFF 5'TCGAGCATGGTGGCCGC
 #47 27mer/0.2um/OFF 5'TCGACCCTAAGA-(C/A)-GAAGAGAAAGGTAC
 #48 27mer/0.2um/OFF 5'TCGAGTACCTTTCTCTTC-(G/T)-TCTTAGGG

Příklad 8

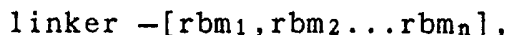
Demonstrace transkripční indukce

Jurkat TAg buňky byly transfektovány s uvedenými konstrukty (5 μ g každého konstruktu) elektroporací (960 μ F, 250 V). Po 24 hodinách byly buňky resuspendovány v čtvrtém mediu a odebrány podíly. Polovina každé transfekce byla inkubována s dimerním FK506 derivátem (příklad 14) za konečné koncentrace 1 μ M. Po 12 hodinách byly buňky promyty a buněčné extrakty byly připraveny opakovaným zmražením-táním. Chloramfenikol acetyltransferásová (CAT) aktivita byla měřena podle standardních protokolů. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook a spol., vyd. (1989) CSH Laboratory, str. 16-59. Data (obr. 22) dokládají CAT aktivitu přítomnou v 70 μ l extraktu (celkový objem extraktu byl 120 μ l) po inkubaci při 37 °C po 18 hodin. Vzorky použité ve zkoušce jsou následující:

1. G5E4TCAT (GAL4-CAT reporter plasmid)
2. G5E4TCAT, GAL4-VP16
3. G5E4TCAT, NF3V1E
4. G5E4TCAT, GF2E
5. G5E4TCAT, GF2E, NF3V1E
6. G5E4TCAT, GF3E, NF3V1E

Příklady chemické syntéza

Jak již bylo jinde uvedeno, zvláště sloučeniny zvláště zajímavé jako oligomerizační činidla, mají následující strukturu:



kde "linker" je linkerová skupina jak je zde popsána, která je kovalentně navázána k "n" (celé číslo od 2 do asi 5, obvykle 2 nebo 3) receptor vázajícím skupinám ("rbm"), které jsou stejné nebo rozdílné. Jak již zde bylo na jiném místě uvedeno, receptor vázající skupinou je ligand (nebo jeho analog) pro známý receptor, jak jsou uvedeny v Sekci V(C) a zahrnují FK506, FK520, rapamycin a jeho analogy, které jsou schopny vazby k FKBP jakož i cyklosporiny, tetracykliny, jiná antibiotika a makrolidy a steroidy, které jsou schopny se vázat k příslušným receptorům.

Linker je bi- nebo multi-funkční molekula schopná být kovalentně navázána ("—") ke dvěma nebo více receptor vázajícím skupinám. Ilustrativní linkerové skupiny jsou popsány v Sekci VI(A) a v různých příkladech a zahrnují mezi jinými C2-C20alkylen, C4-C18azalkylen, C6-C24 N-alkylenazalkylen, C6-C18 ardialkylen a C8-C36 bis-karboxamidoalkylen.

Tyto sloučeniny mohou být připraveny za použití komerčně dostupných materiálů a/nebo postupů v oboru známých. Zpracované receptory pro tyto sloučeniny mohou být získány jak popsáno výše. Zvláště zajímavé sloučeniny jsou ty, které se vážou k receptoru s K_d menší než 10^{-6} , výhodně menší než asi 10^{-7} a výhodněji menší než 10^{-8} .

Jedna podtřída oligomerizačních činidel jsou ty, ve kterých je jednou nebo více receptor vázajícími skupinami FK506, sloučeniny typu FK506 nebo její deriváty, kde receptor vázající skupiny jsou kovalentně připojeny k linkerové skupině přes allylskupinu na C21 (použito číslování FK506) jako za pomoci sloučeniny 5 nebo 13 na obr.23A nebo přes cyklohexylový kruh (C29-C34), např. přes C32 hydroxyl jako u sloučenin 8,16,17 na obr.23B. Sloučeniny této třídy mohou být připraveny úpravou metod zde popsanych, uvedených v následujících příkladech.

Další podtřída zajímavých oligomerizačních činidel je ta, ve které alespoň jedna z receptor vázajících skupin je FK520 nebo její derivát, kde molekuly FK520 nebo jejich deriváty jsou kovalentně připojeny k linkerové skupině jako je FK1040A nebo FK1040B na obr. 10. Sloučeniny této třídy mohou být připraveny úpravou schema 1 na obr.10, schema 2 na obr.11A a 11B nebo schema 3 na obr.12 a obr.13.

Další podtřída zajímavých oligomerizačních činidel, ve kterých alespoň jednou z receptor vázajících skupin je cyclosporin A nebo jeho derivát.

Je třeba chápat, že tato a jiná oligomerizační činidla podle vynálezu mohou být homo-oligomerizační činidla (kde rbm jsou stejné) nebo hetero-oligomerizační činidla (kde rbm jsou rozdílné). Hetero-oligomerizační činidla mohou být připravena analogicky zde uvedeným postupům, zahrnutým ve schema 3 na obr.13 a jinde zde popsáním.

Následující syntetické příklady jsou míněny jako ilustrativní.

A. Obecné postupy

Všechny reakce byly provedeny ve skle vysušeném v sušárně za pozitivního tlaku dusíku nebo argonu. Vzduch a sloučeniny citlivé k vlhkosti byly zaváděny přes stříkačku nebo kanylu přes gumovou přepážku.

B. Fyzikální údaje.

Spektra protonové magnetické rezonance (^1H NMR) byla zaznamenána na spektrometrech Bruker AM-500 (500 MHz) a AM-400 (400 MHz). Chemické posuny jsou uváděny v ppm tetramethylsilanu za použití rezonance rozpouštědla jako vnitřního standardu (chloroform, 7,27 ppm). Hodnoty jsou uváděny takto: chemický posun, multiplicita (s= singlet, d= dublet, t= triplet, q= kvartet, br= rozšířený, m= multiplet), kopulační konstanty (Hz), integrace. Byla získána nízko a vysokorozlišující hmotová spektra.

C. Chromatografie

Reakce byly sledovány chromatografií na tenké vrstvě (TLC) za použití E.Merck silikagel 60F skleněných desek (0,25 mm). Složky byly vizualizovány osvětlením dlouhovlnovým ultrafialovým světlem, vystavením jodovým parám a/nebo ponořením do vodného roztoku molybdenátu ceritoamonného s následujícím zahřátím. Rozpouštědla pro chromatografii byla čistoty HPLC. Kapalinová chromatografie byla provedena za použití zesíleného toku (rychlá chromatografie) uvedeného rozpouštědlového systému na E-Merck silikagelu 60 (230-400 mesh).

D. Rozpouštědla a činidla.

Všechna použitá činidla a rozpouštědla byla analytické čistoty a byla použita jak byla získána s následujícími výjimkami. Tetrahydrofuran (THF), benzen, toluen diethylether byly destilovány z kovový sodík benzofenon ketylu. Triethylamin a acetonitril byly destilovány z hydridu vápníku. Dichlormethan byl destilován z oxidu fosforečného. Dimethylformamid (DMF) byl destilován z hydridu vápníku za sníženého tlaku a uchováván nad molekulovým sítem 4 Angstromy.

Příprava FK506 derivátů

Příklad 9

Hydroborace/oxidace FK506-TBS₂ (1 až 2)

Hydroborace byla provedena podle postupu Evanse (Evans a spol., JACS (1992) 114, 6679; ibid (1992) 6679-6685). (Viz Harding a spol., Nature (1989) 341, 758 pro číslování). 10ml baňka byla naplněna 24,32-bi[(terc.butyldimethylsilyl)oxy]-FK506 (33,8 mg, 0,033 mmol) a [Rh(nbd)(difos-4)]BF₄ (3,1 mg, 0,004 mmol, 13 % mol.). Oranžová směs byla rozpuštěna v toluenu (2,0 ml) a rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku během čtyř hodin. Baňka byla pečlivě profouknuta dusíkem a naoranžovělý olej byl rozpuštěn v THF (3,0 ml, 10 M konečná koncentrace) a ochlazen na 0 °C v lázni ledové vody. Katecholboran (98 µl, 0,098 mmol, 1,0M roztok v THF, 3,0 ekv.) byl přidán přes stříkačku a výsledný roztok byl míchán při 0 °C 45 minut. Reakce byla přerušena při 0 °C 0,2 ml THF/EtOH (1:1) a pak 0,2 ml pufru pH 7,0 (Fisher, 0,05M fosfát) a pak 0,2 ml 30% H₂O₂. Roztok byl míchán při teplotě místnosti alespoň 12 h.

Rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku a zbylý olej byl rozpuštěn v benzenu (10 ml) a promyt nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Fáze se oddělí a vodná fáze se zpětně extrahuje benzenem (2 x 10 ml). Organické fáze se spojí a promyjí se jednou nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Benzenová fáze se suší MgSO_4 , zahustí a podrobí rychlé chromatografii (2:1 hexan:ethylacetát) a získá se požadovaný primární alkohol jako čirý, bezbarvý olej (12,8 mg, 0,012 mmol, 37 %).

Příprava směsného karbonátu (2 až 3).

Příprava směsného karbonátu byla provedena metodou Ghoshe (Ghosh a spol. *Tetrahedron Lett.* (1992) 33, 2781–2784. 10 ml baňka byla naplněna primárním alkoholem (29,2 mg, 0,028 mmol) a benzenem (4 ml). Rozpouštědlo bylo odstraněno za sníženého tlaku během 60 minut. Olej byl rozpuštěn v acetonitrilu (2,0 ml, 14 mM konečná koncentrace) a míchán při 20 °C při přidávání triethylaminu (77 μl , 0,56 mmol). N,N'-disukcinimidylkarbonát (36 mg, 0,14 mmol) byl přidán najednou a roztok byl míchán při 20 °C 46 hodin. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem a promyta nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Fáze byly odděleny a vodná vrstva byla zpětně extrahována dichlormethanem (2 x 10 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 až 1:1 hexan:ethylacetát). Požadovaný směsný karbonát byl izolován jako čirý, bezbarvý olej (16,8 mg, 0,014 mmol, 51%).

Dimerizace FK506 (3 až 4). Suchá, 1 ml konická lahvička (Kontes Scientific Glassware) byla naplněna směsným karbonátem (7,3 mg, 0,0061 mmol) a acetonitrilem (250 μl , 25 mM konečná koncentrace). Byl přidán triethylamin (10 μl , 0,075

mmol) a pak p-xylylendiamin (8,3 μ l, 0,0027 mmol, 0,32M roztok v DMF). Reakce byla míchána 22 h při 20 °C a pak byla přerušena zředěním dichlormethanem (10 ml). Roztok byl promyt nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Fáze byly odděleny a vodná vrstva byla zpětně extrahována dichlormethanem (2 x 10 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 až 1:1 hexan:ethylacetát) za poskytnutí požadovaného chráněného dimeru jako čirého, bezbarvého oleje (4,3 mg, 1,9 μ mmol, 70 %).

Odchránění FK506 dimeru (4 až 5). Chráněný dimer (3,3 mg, 1,4 μ mol) byl umístěn do 1,5ml polypropylenové zkumavky opatřené vysoustruženým průzorem. Acetonitril (0,5 ml, 3 mM onečná koncentrace) byl přidán a roztok byl míchán při 20 °C při přidávání HF (55 μ l, 48% vodný roztok, Fisher). Roztok byl míchán 18 h při teplotě místnosti. Odchráněný FK506 derivát byl pak rozdělen mezi dichlormethan a nasycený vodný hydrogenuhličitan v 15,1 zkušební zkumavce. Zkumavka byla intenzivně míchána pro promísení fází a po oddělení byla organická fáze odstraněna pipetou. Vodná byla zpětně extrahována dichlormethanem (4 x 2 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (1: 1:1 hexan:THF:ether až 1:1 THF:ether) za poskytnutí požadovaného dimeru jako čirého, bezbarvého oleje (1,7 mg, 0,93 μ mmol, 65 %).

Ve výše uvedených postupech mohou být použity jiné monoaminy a diaminy jako je benzylamin (14) oktamethylendiamin, dekamethylendiamin atd.

Příklad 10

Redukce FK506 s L-selectridem (FK506 až 6)

Danishevsky a spolupracovníci prokázali, že zpracování FK506 s L-selectridem poskytuje 22-dihydro-FK506 s boronátovým esterem upoutaným na C24 a C22 hydroxylové skupiny (Coleman a Danishevsky, *Heterocycles* (1989) 28, 157-161; Fisher a spol., *J.Org.Chem.* (1991) 56, 2900-2907).

Příprava směsného karbonátu (6 až 7) 10ml baňka byla naplněna 22-dihydro-FK506-sek.butykboronátem (125,3 mg, 0,144 mmol) a acetonitrilem (3,0 ml, 50 mM konečná koncentrace) a míchána při teplotě místnosti při přidávání triethylaminu (200 μ l, 1,44 mmol, 10 ekv.) k čirému roztoku. N,N'-Disukcinimidylkarbonát (184,0 mg, 0,719 mmol) byl přidán najednou a čirý roztok byl míchán při teplotě místnosti 44 h. Roztok byl zředěn ethylacetátem (20 ml) a promyt nasyceným hydrogenuhličitanem sodným (10 ml) a fáze byly odděleny. Vodná fáze pak byla zpětně extrahována ethylacetátem (2 x 10 ml) a organické fáze byly spojeny, sušeny (MgSO_4) a výsledný olej byl podroben rychlé chromatografii (1:1 až 1:2 hexan:ethylacetát) za poskytnutí požadovaného směsného karbonátu jako čirého, bezbarvého oleku (89,0 mg, 0,088 mmol, 61 %).

Dimerizace FK506 směsného karbonátu (7 až 8).

Suchá, 1ml konická skleněná lahvička (Kontes Scientific Glassware) byla naplněna směsným karbonátem (15,0 mg, 0,0148 mmol) a dichlormethanem (500 μ l, 30 mM konečná koncentrace). Roztok byl míchán při teplotě místnosti při přidávání triethylaminu (9 μ l, 0,067 mmol, 10 ekv.) s následujícím

přidáváním p-xylylendiaminu (0,8 mg, 0,0059 mmol). Reakce byla míchána 16 h při 20 °C a byla přerušena zředěním dichlormethanem (5 ml). Roztok byl promyt nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu (5 ml). Fáze byly odděleny a vodná vrstva byla zpětně extrahována dichlormethanem (2 x 5 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (1:1 až 1:2 hexan:ethylacetát) za poskytnutí požadovaného dimeru jako čirého bezbarvého oleje (7,4 mg, 3,8 μmol , 65 %).

Ve výše uvedeném postupu je možno použít jiné monoaminy, diaminy nebo triaminy místo xylylendiaminu, jako je benzylamin (15), oktylendiamin, dekamethylendiamin(16), bis-p-dibenzylamin, N-methyldiethylenamin, tris-aminoethylamin(17), tris-aminopropylamin, 1,3,5-triaminomethylcyklohexan atd.

Příklad 11

Oxidativní štěpení a redukce FK506 (1 až 9).

Osmylace byla provedena podle postupu Kellyho (VanRheenen a spol., Tetrahedron Lett. (1976) 17, 1973-1976). Štěpení bylo provedeno podle postupu Danishefsky-ho (Zell a spol., J.Org.Chem.(1986) 51,5032-5036). Aldehydová redukce byla provedena podle postupu Krishnamurthy-ho (J.Org.Chem. (1981)46,4628-4691). 10ml baňka byla naplněna 24,32-bis[terc.butyldimethylsilyloxy]-FK506 (84,4 mg, 0,082 mmol), 4-methylmorfolinem (48 mg, 0,41 mmol, 5 ekv.) a THF (2,0 ml, 41 mM konečná koncentrace). Oxid osmičelý (45 μl , 0,08 mmol, 0,1 ekv) byl přidán stříkačkou. Čirý, bezbarvý roztok byl míchán při teplotě místnosti 5 hodin. Reakce pak byla zředěna 50% vodným methanolem (1,0 ml) a najednou byl

přidán jodistan sodný (175 mg, 0,82 mmol, 10 ekv.). Kalná směs byla míchána 40 min při teplotě místnosti, zředěna etherem (10 ml) a promyta nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného (5 ml). Fáze byly odděleny a vodná vrstva byla zpětně extrahována dichlormethanem (2 x 5 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zpracovány se siřičitanem sodným (50 mg). Organická fáze pak byla filtrována a zahuštěna a olej byl podroben rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 hexan:ethylacetát) za poskytnutí meziprojektu, nestabilního aldehydu (53,6 mg) jako čirého bezbarvého oleje. Aldehyd byl ihned rozpuštěn v THF (4,0 ml) a ochlazen na -78°C pod atmosférou dusíku a zpracován s lithium-tris[(3-ethyl-3-pentyl)oxy]aluminiumhydridem (0,60 ml, 0,082 mmol, 0,14 M roztok v THF, 1,0 ekv.). Čirý roztok byl ponechán míchat 10 min při -78°C pak přerušen zředěním etherem (4 ml) a přidavkem nasyceného voného chloridu amonného (0,3 ml). Směs byla ponechána ohřát na teplotu místnosti a k suchému roztoku byl přidán pevný síran sodný. Směs pak byla filtrována a zahuštěna a výsledný olej byl podroben rychlé chromatografii (2:1 hexan:ethylacetát) za poskytnutí požadovaného alkoholu jako čirého, bezbarvého oleje (39,5 mg, 0,038 mmol, 74 %).

Příprava směsného karbonátu (9 až 10).

Příprava směsného karbonátu byla provedena metodou Ghoshe a spol., Tetrahedron Lett. (1992) 33, 2781-2784). 10 ml baňka byla naplněna primárním alkoholem (38,2 mg, 0,0369 mmol) a acetonitrilem (2,0 ml, 10 mM konečná koncentrace) a míchána při teplotě místnosti za přidávání 2,6-lutidinu (43 μl , 0,37 mmol, 10 ekv.). N,N'-disukcinimidylkarbonát (48 mg, 0,18 mmol) byl přidán najednou a roztok byl míchán při teplotě místnosti 24 hodin. Reakční směs byla zředěna etherem

(10 ml) a promyta nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Fáze byly odděleny a vodná vrstva byla zpětně extrahována etherem (2 x 10 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (2:1 až 1:1 hexan:ethylacetát). Požadovaný směsný karbonát byl izolován jako čirý, bezbarvý olej (32,6 mg, 0,028 mmol, 75 %).

Příprava benzylkarbamátu (10 až 11).

Suchá, 1ml konická skleněná lahvička (Kontes Scientific Glassware) byla naplněna směsným karbonátem 10 (8,7 mg, 0,0074 mmol) a acetonitrilem (500 μl , 15 mM konečná koncentrace). Roztok byl míchán při teplotě místnosti při přidávání triethylaminu (10 μl , 0,074 mmol, 10 ekv.) a pak benzylamidu (1,6 μl , 0,015 mmol, 2 ekv.). Reakce byla míchána 4 h při teplotě místnosti. Rozpouštědlo bylo odstraněno v proudě suchého dusíku a olej byl přímo podroben rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 hexan:ethylacetát) za poskytnutí požadovaného chráněného monomeru jako čirého, bezbarvého oleje (6,2 mg, 5,3 μmol , 72 %).

Chráněný monomer (0,2 mg, 5,3 μmol) byl umístěn do 1,5ml propylenové zkumavky opatřené vysoustruženým průřezem. Acetonitril (0,5 ml, 11 mM konečná koncentrace) byl přidán a roztok byl míchán při teplotě místnosti při přidávání HF (55 μl , 48 % vodný roztok; Fisher, 3,0N konečná koncentrace). Roztok byl míchán 18 h při teplotě místnosti. Odchráněný FK506 derivát se pak rozdělil mezi dichlormethan a nasycený vodný hydrogenuhličitan sodný v 15ml zkušební zkumavce. Zkumavka byla intenzivně míchána pro promísení fází a po oddělení byla oorganická fáze odstraněna pipetou. Vodná vrstva byla zpětně extrahována dichlormethanem (4 x 2

ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (1:1 až 0:1 hexan:ethylacetát) za poskytnutí požadovaného odchráněného benzylkarbamátu jako čirého, bezbarvého oleje (3,9 mg, 4,1 μmol , 78 %).

Nahrazením benzylaminu diaminem jako je xylylendiamin (12), hexamethylendiaminem, oktamethylendiaminem, dekamethylendiaminem (13) nebo jinými diaminy se připraví dimerní sloučeniny podle předloženého vynálezu.

Příklad 12

Příprava směsného karbonátu FK506 (12).

10ml baňka byla naplněna 24,32-bis[(terc.butyldimethylsilyl)oxy]-FK506 (339,5 mg, 0,329 mmol), 4-methylmorfolin-N-oxidem (193 mg, 1,64 mmol, 5 ekv.), vodou (0,20 ml) a THF (8,0 ml, 41 mN konečná koncentrace). Oxid osmičelý (0,183 ml, 0,033 mmol, 0,1 ekv., 0,18M rozt. ve vodě) byl přidán stříkačkou. Čirý, bezbarvý roztok byl míchán při teplotě místnosti 4,5 hodiny. Reakce byla zředěna 50% vodným methanolem (4,0 ml) a najednou byl přidán jodistan sodný (700 mg, 3,29 mmol, 10 ekv.). Kalná směs byla míchána 25 min při teplotě místnosti, zředěna etherem (20 ml) a promyta nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml). Fáze byly odděleny a vodná vrstva zpětně extrahována etherem (2 x 10 ml). Spojené organické vrstvy byly sušeny nad MgSO_4 a pevným síranem sodným (50 mg). Organická fáze pak byla filtrována a zahuštěna a výsledný aldehyd byl ihned rozpuštěn v THF (8,0 ml) a ochlazen na -78°C pod atmosférou dusíku a zpracován s lithium tris[(3-ethyl-3-pentyl)oxy]aluminiumhydridem (2,35 ml, 0,329 mmol, 0,14M roztok v THF, 1,0 ekv.). Čirý roztok byl

ponechán míchat 60 min při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sledován pomocí TLC) a pak přerušen při $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zředěním s etherem (5 ml) a přidavkem nasyceného vodného chloridu amonného (0,3 ml). Směs byla ponechána ohřát na teplotu místnosti a pro sušení roztoku byl přidán pevný síran amonný. Směs byla míchána 20 min, odfiltrována, zahuštěna a výsledný olej byl ihned rozpuštěn v acetonitrilu (10 ml). K roztoku vzniklého primárního alkoholu v CH_3CN byl přidán 2,6-lutidin (0,380 ml, 3,3 mmol, 10 ekv.) a N,N'-disukcininidylkarbonát (420 mg, 1,65 mmol, 5 ekv.). Heterogenní směs byla míchána při teplotě místnosti 19 hodin, pak byl roztok zředěn etherem (30 ml) a promyt nasyceným vodným hydrogenuhlíčitanem sodným (20 ml). Vodná vrstva byla zpětně extrahována etherem (2 x 10 ml). Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 až 1:1 hexan:ethylacetát). Požadovaný směsný karbonát 12 byl izolován jako čirý, bezbarvý olej (217 mg, 0,184 mmol, 56 % pro všechny 4 stupně).

Příklad 13

Příprava 24, 24', 32,
32'-tetrakis[(terc.butyldimethylsilyl)oxy]-FK1012-A.
(p-Xylylendiaminový můstek)

Suchá, 1ml konická nádobka byla naplněna směsným karbonátem (23,9 mg, 0,0203 mmol) a acetonitrilem (500 μl , 41 mM konečná koncentrace). Byl přidán triethylamin (28 μl , 0,20 mmol, 10 ekv) a pak p-xylylendiamin (46 μl , 0,0101 mmol, 0,22M oztok v DMF). Reakce byla míchána 18 h při teplotě místnosti, rozpouštědlo bylo odstraněno proudem suchého dusíku a olej byl přímo podroben rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 až 1:1 hexan/ethylacetát) za poskytnutí požadovaného

chráněného dimeru jako čirého, bezbarvého oleje (11,9 mg, 5,3 μmol , 52 %).

Příklad 14

Příprava FK1012-A (p-xylylendiaminový můstek)(13).

chráněný dimer (11,0 mg, 4,9 μmol) byl umístěn do 1,5ml polypropylenové zkumavky opatřené vysoustruž ženým zářezem. Byl přidán acetonitril (0,50 ml, 10 mM konečná koncentrace) a roztok byl míchán při 20 °C při přidávání HF (55 μl , 88% vodný roztok, Fisher, 3,0N konečná koncentrace). Roztok byl míchán 16 h při teplotě místnosti. Odchráněný FK506 derivát byl pak rozdělen mezi dichlormethan a nasycený vodný hydrogenuhličitán sodný v 15ml zkušební zkumavce. Zkumavka byla míchána pro promísení fází a po oddělení byla organická fáze odstraněna pipetou. Vodná fáze byla zpětně extrahována dichlormethanem (4x2 ml) a spojené organické fáze byly sušena (MgSO_4), zahustěny a podrobeny rychlé chromatografii (1:1:1 hexan/THF/ether až 1:1 THF/ether) za poskytnutí FK1012 jako bezbarvého, čirého oleje (5,5 mg, 3,0 μmol , 63 %).

Příklad 15

Příprava 24, 24', 32,

32'-tetrakis[(terc.butyldimethylsilyl)oxy]-FK1012-B.

(diaminodekanový můstek)

Suchá, 1ml konická skleněná lahvička byla naplněna směsným karbonátem (53,3 mg, 0,0453 mmol) a acetonitrilem (2,0 ml, 11 mM konečná koncentrace). Triethylamin (16 μl , 0,11 mmol, 5 ekv.) byl přidán s následujícím přídatkem diaminodekanu (61 μl , 0,0226 mmol, 0,37 M roztok v DMF). Reakce se míchá 12 h při teplotě místnosti, rozpouštědlo se odstraní proudem suchého dusíku a olej se přímo podrobí

rychlé chromatografii (3:1 až 2:1 až 1:1 hexan/ethylacetát) a získá se požadovaný dimer jako čirý, bezbarvý olej (18,0 mg, 7,8 μmol , 35 %).

Příklad 16

Příprava FK1012-B)Diaminodekan-1,10 můstek)(14)

Chráněný imer(18,0 mg, 7,8 μmol) byl umístěn do 1,5ml polypropylenové zkumavky opatřené vysoustruženým výřezem. Acetonitril (0,45 ml, 16 mM konečná koncentrace) byl přidán a roztok byl míchán při teplotě místnosti při přidávání HF (55 μl , 48% voný roztok ; 3,6N konečná koncentrace). Roztok byl míchán 17 h při 23 °C. Produkt FK1012-B byl pak rozdělen mezi dichlormethan a nasycený vodný hydrogenuhličitan sodný v 15ml zkušební zkumavce. Zkumavka byla míchána intenzivně pro promísení fází a po oddělení byla organická fáze odstraněna pipetou. Vodná vrstva byla zpětně extrahována dichlormethanem (4x2 ml).Organické fáze byly spojeny a sušeny (MgSO_4), zahuštěny a podrobeny rychlé chromatografii (100% ethylacetát až 20:1 ethylacetát/methanol).Získá se FK1012-B jako čirý, bezbarvý olej (5,3 mg, 2,9 μmol , 37 %).

Příklad 17

Příprava 24, 24', 32,

32'-tetrakis[(terc.butyldimethylsilyl)oxy]-FK1012-C.

(his-p-aminomethylbenzoyldiaminodekanový můstek)

Suchá 25ml slzovitě tvarovaná nádobka byla naplněna diaminovým linkerem (15,1 mg, 0,0344 mmol) a 1,0 ml DMF. V oddlené nádobě byly směsný karbonát a triethylamin (0,100 ml, 20 ekv.) rozpuštěny ve 2,0 ml dichlormethanu a pak pomalu přidány (4x50 ml) k míchanému roztoku his-p-aminomethylbenzoyl,diaminodekanu-1,10. Nádoba

obsahující směsný karbonát 12 byla promyta dichlormethanem (2 x 0,50 ml) pro dosažení kompletního převedení směsného karbonátu 12. Reakce se míchá 16 h při 23 °C, rozpouštědlo se odstraní proudem suchého dusíku a olej se přímo podrobí rychlé chromatografii (1:1 až 1:2 hexan/ethylacetát) a získá se požadovaný chráněný dimer jako čistý, bezbarvý olej (29,6 mg, 11,5 μ mol, 34 %).

Příklad 18

Příprava FK1012-C (15)

Chráněný dimer (29,6 mg, 11,5 μ mol)(17) se umístí do 1,5ml polypropylenové zkumavky opatřené míchací tyčkou. Přidá se acetonitril (0,45 ml, 23 mM konečná koncentrace) a roztok se míchá při teplotě místnosti při přidávání HF (55 μ l, 48% vodný roztok; Fisher, 3,6 N konečná koncentrace). Roztok se míchá 17 h při teplotě místnosti. Požadovaný symetrický dimer se pak rozdělí mezi dichlormethan a nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného v 15ml zkušební zkumavce. Zkumavka se intenzivně míchá pro promísení fází a po oddělení se organická fáze odstraní pipetou. Vodná fáze se zpětně extrahuje dichlormethanem (4 x 2 ml) a spojené organické fáze se suší ($MgSO_4$), zahustí a podrobí se rychlé chromatografii (100% ethylacetát až 15:1 ethylacetát/methanol) a získá se FK1012-C jako čistý, bezbarvý olej (11,5 mg, 5,5 μ mol, 47 %).

Příprava CsA derivátů

Příklad 19

MeBmt(OAc)--OH¹CsA (2).

MeBmt(OAc)--OAc¹CsA (1) (161 mg, 124 mmol) viz Ebrle a Nuninger, J.Org.Chem. (1992)57, 2689) se rozpustí v methanolu

(10 ml). KOH (196 mg) se rozpustí ve vodě (8 ml). 297 ml KOH roztoku (0,130 mmol, 1,05 ekv.) se přidá k roztoku (1) v MeOH. Tento nový roztok se míchá při teplotě místnosti pod inertní atmosférou po 4 hodiny a pak se reakce přeruší kyselinou octovou (2 ml). Reakční směs se čistí HPLC s reverzní fází za použití 5 cm x 25 cm, 12 μ , 100 Å, C18 kolony při 70 °C za eluce 70% acetonitrilem/vodou, obsahujícím 0,1 % (obj./obj.) kyseliny trifluoroctové za získání 112 mg (72 %) požadovaného monoacetátu (2).

MeBmt(OAc)--OCOIm¹CsA (3) MeBmt(OAc)--OH¹CsA (2) (57 mg, 45,5 μ mol) a karbonyldiimidazol (15 mg, 2 ekv., 91 μ mol) se přenesou do 50ml baňky s kulatým dnem a rozpustí se v suchém THF (6 ml). Přidá se diisopropylethylamin (32 μ l, 4 ekv., 182 μ mol) a pak se rozpouštědlo odstraní na rotační odparce při teplotě místnosti. Zbytek se čistí rychlou chromatografií na silikagelu za použití ethylacetátu jako elučního činidla a získá se 45 mg (73 %) požadovaného karbamátu (3).

Tris-(2-aminoethyl)amin CsA trimer triacetát (6).

MeBmt(OAc)--OCOIm¹CsA (3) (7,5 mg, 5,54 μ mol, 3,1 ekv.) se rozpustí v THF (100 μ l). Přidá se diisopropylethylamin (62 μ l, 5 ekv., 8,93 μ mol roztok, obsahující 100 μ l aminu ve 4 ml THF) a potom tris(2-aminoethyl)amin (26 μ l, 1,79 μ mol, 1 ekv. roztoku obsahuje 101 mg tris- aminu v 10 ml THF). Tento roztok se míchá pod atmosférou dusíku 5 dnů. Reakční směs se odpaří a pak se čistí rychlou chromatografií na silikagelu za použití 0-5 % methanolu v chloroformu a získá se 4,1 mg požadovaného produktu (6).

Příklad 20

Diaminodekan CsA dimer (8)

Pevný kovový Na (200 mg, přebytek) se nechá reagovat se suchým methanolem (10 ml) při 0 °C. Diaminodekan CsA dimer diacetát (5) (4,0 mg) se rozpustí v MeOH (5 ml). 2,5 ml NaOMe roztoku se přidá k roztoku (5). Po 2,5 hodinách míchání při teplotě místnosti pod inertní atmosférou, roztok se rozloží s kyselinou octovou (2 ml) a produkt se čistí pomocí HPLC s reverzní fází za použití 5 mm x 25 mm, 12 μ , 100 Å, C18 kolona při 70 °C za eluce 70-95% acetonitrilem/vodou během 20 minut, obsahujícím 0,1 % (obj./obj.) kyseliny trifluoroctové a získá se 2,5 mg (60 %) požadovaného diolu.

Diaminodekan CsA dimer diacetát (5) byl připraven nahrazením tris(2-aminoethyl)aminu 0,45 ekv. 1,10-diaminodekanu.

Příklad 21

p-Xylylendiamin CsA dimer (4).

p-Xylendiamin CsA dimer (4) se připraví nahrazením tris(2-aminoethyl)aminu 0,45 ekv. p-xylylendiaminu.

Postupy popsány v literatuře se připraví jiné deriváty cyclofilinu spojením na jiném místě než 1(MeBmt 1).

Polohové 8 D-isomerové analogy se vyrobí zásobováním produkčního organismu D-aminoanalogem pro získání inkorporace specificky na toto místo. Viz Patchett a spol., J. Antibiotics (1992) 45, 943 (β -MeSO)D-Ala⁸CsA); Traber a spol., ibid (1989) 42, 591). Polohové 3 analogy se připraví poly-lithiací/alkylací CsA, specificky na -uhlíku SaC3. Viz Wenger, Transplant Proceeding (1986) 18, 213, supp.5 (pro cyclofilinový vazebný a aktivní profil, zejména D-MePhe³-CsA); Seebach, US patent č. 4703033, vydaný 27. října

1987 (pro přípravu derivátů).

Místo cyklosporinu A mohou být podle výše uvedených postupů multimerizovány jiné přirozeně se vyskytující varianty CsA pro použití v předloženém vynálezu.

Příklad 22

(A) Tvarování struktury a syntéza FK1012-"hrbolatých" sloučenin a FKBP12 s kompenzátorovými mutacemi

Substituenty na C9 a C10 FK506, které mohou být a byly zavedeny syntézou, se liší různými vedlejšími zbytky v FKBP12. Jedna třída mutantových receptorů pro takové ligandy by měla obsahovat odlišné modifikace, jednu vytvořením kompenzátorového otvoru pro C10 substituent a jednu pro C9 substituent. Uhlík 10 byl selektivně modifikován aby měl buď acetyl nebo N-formylskupinu vycházející z uhlíku (vs. hydroxylová skupina v FK506). Vazebné vlastnosti těchto derivátů jasně prokazují, že tyto C10 hrboly účinně ruší vazbu k nativnímu FKBP12. Obr. 23 znázorňuje schema pro syntézu FK506-typových skupin, obsahujících další C9 hrboly. Při sestavení takových ligandů s linkerovými skupinami podle vynálezu je možno konstruovat HED a HOD (a antagonisty) činidla pro chimerní proteiny, obsahující odpovídající vazebné domény, nesoucí kompenzátorové mutace. Ilustrativní HED činidlo je znázorněno na obr. 23 a nese modifikace na C9 a C10'.

Tento vynález také zahrnuje třídu sloučenin typu FK-506, obsahující skupinu typu FK-506, která obsahuje, na jednom nebo obou C9 a C10, funkční skupinu, obsahující -OR, -R, -(CO)OR, -NH(CO)H nebo -NH(CO)R, kde R je substituovaný nebo nesubstituovaný, alkyl nebo arylalkyl, který může být

přímý, rozvětvený nebo cyklický, zahrnující substituované nebo nesubstituované peroxidy a karbonáty. "Skupiny typu FK506" zahrnují FK506, FK520 a jejich syntetické nebo přirozeně se vyskytující varianty, analogy a deriváty (zahrnující rapamycin), které zachovávají alespoň (substituovanou nebo nesubstituovanou) C12 až C15 část kruhové struktury FK-506 a jsou schopny se vázat s přirozeným nebo modifikovaným FKBP, výhodně s Kd hodnotou asi 10^{-6} .

Tento vynález dále zahrnuje homo- a heterodimery a vyšší oligomery, obsahující jednu nebo více takových sloučenin typu FK-506 kovalentně navázaných k linkerové skupině podle tohoto vynálezu. Monomery těchto sloučenin typu FK-506 jsou také zajímavé ať nekovalentně připojené k linkerové skupině nebo jinak modifikované bez narušení jejich vazebné afinity pro odpovídající FKBP. Takové monomerní sloučeniny mohou být použity jako oligomerizační antagonistická činidla, tj. jako antagonisté pro oligomerizační činidla na bázi podobných sloučenin typu FK-506. Výhodně sloučeniny a oligomery, které je obsahují, se podle tohoto vynálezu vážou k přirozeným nebo výhodně mutantním, FKBP s afinitou alespoň 0,2 % a výhodně alespoň asi 1 % a ještě výhodněji alespoň asi 10 % ve srovnání s afinitou FK506 pro FKBP12. Viz např. Holt a spol., infra.

Receptorové domény pro tyto a jiné ligandy podle tohoto vynálezu mohou být získány metodami strukturních, místně řízených nebo náhodných mutagenézí. Sledovali jsme rodinu FKBP12 skupin, která obsahuje Val, Ala, Gly, Met nebo jiné malé aminokyseliny místo jedné nebo více Tyr26, Phe36, Asp37, Tyr82 a Phe99 jako receptorové domény pro ligandy typu FK506 a FK520, obsahující modifikace na C9 a/nebo C10.

Mítně řízená mutagenese může být provedena za použití protokolu megaprimerové mutagenese (viz např. Sakar a Sommer, *BioTechniques* 8 4 (1990): 404-407). cDNA sekvenování se provede sekvenásovým kitem. Exprese mutantu FKBP12 může být provedena v plasmidu pHN1+ protože mnoho FKBP12 mutantů bylo v tomto systému účinně exprimováno. Mutantové proteiny mohou být běžně čištěny frakcionací nad DE52 aniontovýměnnou pryskyřicí s následujícím dělením podle velikosti na SEpharose jak jinde popsáno. Viz např. Aldape a spol., *J.Biol.Chem.* 267 23 (1992): 16029-32 a Park a spol., *J.Biol.Chem.* 267 5 (1992): 3316-3324. Vazebné konstanty mohou být snadno stanoveny jednou nebo dvěma metodami. Jestliže si mutantní FKBP udržují dostatečnou rotamasovou aktivitu, může být použita standardní rotamasová zkouška. Viz např. Galat a spol., *Biochemistry* 31 (1992): 2427-2434. Jinak mutantní FKBP12 mohou být podrobeny vazebné zkoušce za použití LH20 pryskyřice a radioaktivně značený T2-dihydroFK506 a T2-dihydroCsA, které jsme dříve použili s FKBP a cyclofiliny. Bierer a spol., *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87 4 (1993): 555-69.

(B) Výběr kompenzátorových mutací v FKBP12 pro hrbolové-FK506 za použití kvasinkového dvouhybridního systému

Jednou z možností získat varianty receptorových proteinů nebo domén, zahrnujících FKBP12 je účinný kvasinkový "dvouhybridní" nebo "interakce zachycující" systém. Dvouhybridní systém byl použit pro detekci proteinů, které interagují vzájemně. "Návnadový" fuzní protein obsahující cílový protein fuzovaný k transkripční aktivační doméně je ko-exprimován s cDNA knihovnou potenciálních "háčků" fuzovaných k DNA-vazebné doméně. Interakce protein-protein (návnada-háček) je detegována objevením se reporter genového produktu, jehož syntéza vyžaduje spojení DNA-vazebné a

aktivační domény. Kvasinkový dvouhybridní systém zde zmíněný byl původně vyvinut Elledgem a spolupracovníky. Durfee a spol., *Genes and Development* 7 4 (1993):555-69 a Harper a spol., *Cell* 75 4 (1993):805-816.

Protože dvouhybridní systém per se nemůže poskytovat proniknutí do interakcí receptor-ligand, zahrnujících malé molekuly, organické ligandy, vyvinuli jsme nový, FK1012-indukující transkripční aktivační systém (popsaný dále). Použitím takového systému je možno rozšířit dvouhybridní systém tak, že mohou být hodnoceny malé molekuly (např. FK506 nebo FK1012 nebo FK506-typy molekul podle tohoto vynálezu). Nejprve se generuje cDNA knihovna FKBP (háčky) s mutacemi, které jsou regionálně lokalizovány na místa obklopující C9 a C10 FK506. Pro návnadu mohou být zvoleny dvě rozdílné strategie. První používá schopnost FK06 se vázat k FKBP12 a tvořit kompozitní povrch, který se váže ke calcineurinu. Sekvenčně- specifický transkripční aktivátor je takto složen z: DNA-vazebná doména-mutant FKBP12---hrbol-FK506---kalcineurin A-aktivační doména (kde --- označuje nekovlentní vazebnou interakci). Druhá strategie používá schopnost FK1012 se vázat ke dvěma FKBP současně. HED verze FK1012 může být použita pro prohledání následující sestavy: DNA-vazebná doména-mutant FKBP12---hrbol-FK506-normální FK506---standardní FKBP12-aktivační doména.

1. Kalcineurin-Gal4 aktivační doménová fuze jako návnada:

Byl zkonstruován derivát pSE1107, který obsahuje Gal4 aktivační doménu a kalcineurin A podjednotkový fuzní konstrukt. Jeho schopnost působit jako návnada v navrženém způsobu byla ověřena studiemi využívajícími dvouhybridní systém pro mapování kalcineurinového FKBP-FK506 vazebného místa.

2. hFKBP12 aktivační doménová fuze jako návnada: hFKBP12 cDNA může být vyříznuta jako EcoRI-HindIII fragment, který pokrývá celý otevřený čtecí ráměček, tupě zakončený a ligovaný k tupě zakončenému Xho I místo pSE1107 pro generování celé délky hFKBP-Gal4 aktivační doménové proteinové fuze.

3. Mutantní hFKBP12 cDNA knihovny

hFKBP12 může být štěpen s EcoRI a HindIII, zatupen a klonován do pAS1 (Durfee spol., supra), který byl štěpen s NcoI a zatupen. Tento plasmid je dále štěpen s NdeI pro odstranění NdeI fragmentu mezi NdeI místem polylinkerové sekvence pAS1 a 5' konce hFKBP12 a religován. Toto generuje hFKBP12-Gal4 DNA vazebnou doménovou proteinovou fuzi. hFKBP byl reamplifikován s primery #11206 a #11210, primerová tabulka:

11206
 5NdfK: 5'-GGAATTC CAT ATG GGC GTG CAG G-3'
 H M G V Q

11207
 3SmFK37: 5'-CTGTC CCG GGA NNN NNN NNN TTT CTT TCC ATC TTC AAG C-
 R S X X X K K G D E L

11208
 3SmFK27: 5'-CTGTC CCG GGA GGA ATC AAA TTT CTT TCC ATC TTC AAG CA'
 R S S D F K K G D E L M
 NNN NNN NNN GTG CAC CAC GCA GG-3'
 X X X H V V C

11209
 3BmFK98: 5'-CGC GGA TCC TCA TTC CAG TTT TAG AAG CTC CAC ATC NNN
 END E L K L L E V D X
 NNN NNN AGT GGC ATG TGG-3'
 X X T A H P

11210
 3BmFK: 5'-CGC GGA TCC TCA TTC CAG TTT TAG AAG C-3'
 END E L K L L

Primerová tabulka: Primery použité v konstrukci regionálně lokalizované hFKBP12 cDNA knihovny pro použití ve screeningu pro kompenzátorové mutace.

Mutantní hFKBP12 cDNA fragmenty pak byly připraveny za použití primerů uvedených dále, které obsahují náhodně mutantní sekvence hFKBP v definovaných polohách polymerasovou řetězcovou reakcí a byly inzertovány do Gal4 DNA vazebná doména-hFKBP(NdeI/BamHI) konstruktů.

4. Kvasinkový kmen *S.Cerevisiae* Y153 nese dva selektující markerové geny (*his3*/ β -galaktosidasa), které jsou integrovány do genomu a jsou nesený Gal4 promotory (Durfee, supra).

Použití kalcineurin-Gal4 aktivační domény jako návnady FKBP12-FK506 komplex se váže s vysokou afinitou ke

kalcineurinu, typ 2B protein fosfatázy. Protože jsme použili C9- nebo C10-hrbolaté ligandy proto, aby sloužily jako můstek ve dvouhybridním systému, pouze ty FKBP z cDNA knihovny, které obsahují kopenzátorové mutace generují transkripční aktivátor. Obvykle je možno připravit alespoň tři odlišné knihovny (za použití primerů 11207-11209, primerová tabulka), které obsahují každý 8000 mutantů FKBP. Náhodná místa byla zvolena prozkoumáním struktury FKBP12-FK506, které potvrzuje klastry zbytků, jejichž mutace umožňují vazbu chybných C9 nebo C10 substituentů na hrbolaté FK506. Knihovny pak byly individuálně screenovány za použití jak C9- tak C10-hrbolatých FK506. Interakce mezi hrbolatým FK506 a kopenzátorovým hFKBP12 mutantem mohou být detegovány schopností hostitelské kvasinky růst ve his potlačeném mediu a expresí β -galaktosidázového genu. Protože tato selekce je závislá na přítomnosti hrbolatého FK506, může být falešná pozitivita eliminována substraktivním screeningem s replika plotnami, které jsou doplněny nebo nejsou hrbolatými-FK506 ligandy.

Použití hFKBP12-Gal14 aktivační domény jako návnady

Použití kalcineurin A-Gal4 aktivační domény pro screening hFKBP12 mutantních cDNA knihoven je jednoduchou cestou k identifikaci kopenzátorových mutací na FKBP12. Nicméně mutace, které umožňují hrbolatý-FK506 vázat k hFKBP12 mohou přerušit interakci mezi komplexem mutant FKBP12---hrbolatý-FK506 a kalcineurinem. Jestliže počáteční screening s kalcineurinem jako návnadou selže, může místo něj být použita standardní hFKBP12-Gal4 aktivační doména. FK1012 HED činidlo, obsahující: nativní FK506-hrbolatý-FK506 (obr.16) může být syntetizován a použit jako háček. FK506 skupina z FK1012 může vázat FKBP12-Gal4 aktivační doménu. Interakce mezi hrbolatou-FK506 skupinou z FK1012 a

kompenzátorovým mutantem FKBP12 umožní hostitelské kvasince růst na his potlačeném mediu a pro expresi β -galaktosidázy. Tímto způsobem je výběr založen pouze na schopnosti hFKBP12 mutantů k interakci s hrboletým-FK506. Stejná substraktivní screeningová strategie může být použita pro odstranění falešně pozitivních výsledků.

Navíc k in vitro vazebné zkoušce právě diskutované může být použita in vivo zkouška ke stanovení vazebné afinity hrboletých-FK506 ke kompenzátorovým hFKBP12 mutantům. Ve kvasinkovém dvouhybridním systému, β -gal aktivita se stanoví jako stupeň interakce mezi "návnadou" a "dravcem". Takto, afinita mezi hrboletým-FK506 a kompenzátorovými FKBP12 mutanty, může být hodnocena odpovídajícími β -galaktosidázovými aktivitami produkoványi hostitelskými kvasinkami při různých HED (nativní-FK506-hrboletý-FK506) koncentracích.

Použitím stejné strategie mohou být vytvořeny další náhodně mutované FKBP12 cDNA knihovny v jiných hrbole-kontaktních zbytcích s nízkofinitními kompenzátorovými FKBP12 mutanty jako templáty a mohou být jednoduše screenovány.

Fágový display screening pro vysoce afinitní kompenzátorové FKBP mutace

Některé vysoce afinitní hFKBP12 mutanty pro hrbole-FK506 mohou obsahovat několik kombinovaných bodů mutace v diskrétních regionech proteinu. Velikost knihovny, která obsahuje vhodně kombinované mutace může být příliš velká pro kapacitu kvasinkového dvouhybridního systému (např. nad 10^8 mutací). Použití bakteriofága jako vehikula pro vystavení celým funkčním proteinům by měla značně zvýšit schopnost

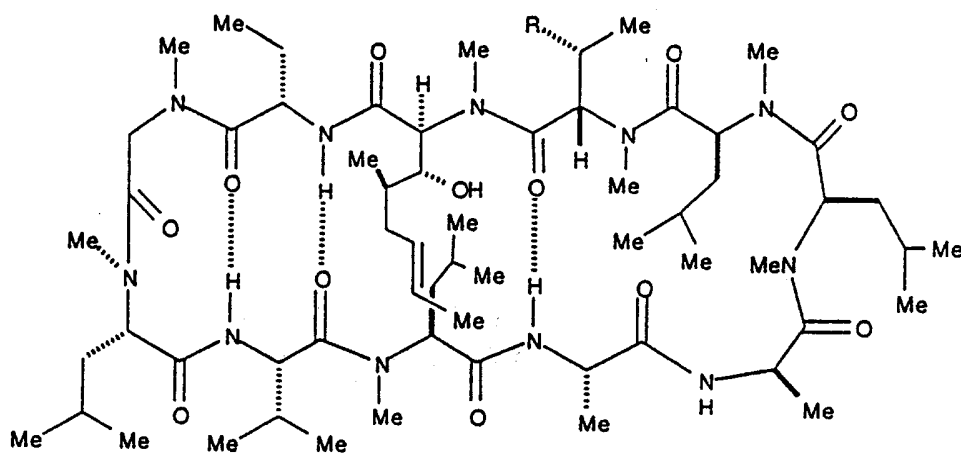
screeningu velkého počtu mutací. Vz. např. Bass a spol., Proteins: Structure, Function and Genetics 8 4 (1990):309-14; McCafferty a spol., Nature 348 6301(1990): 552-4 a Hoogenboom, Nucl Acids Res 19,15 (1991): 4133. Jestliže vysoceafinitní kompenzátorové mutanty nejsou identifikovatelné kvasinkovým dvouhybridním systémem, může být vytvořen velký počet mutací na hFKBP12 s fágovým vektorem jako nosičem. Mutantní hFKBP12 fuzní fágy mohou být screenovány s hrbolatou-FK506-Sepharosou jako matricí, která může být syntetizována analogicky k našim originálním afinitním matricím na bázi FK506. Fretz a spol., J.Am.Chem.Soc. 113 4 (1991): 1409-1411. Opakované běhy vazebné a fágové amplifikace by měly vést k identifikaci vysoceafinitních kompenzátorových mutantů.

(C) Syntéza "hrbolatých(CsA)₂": Modifikace MeVal(11)CsA

jak je detailně uvedeno výše, demonstrovali jsme proveditelnost použití cyklofilinu jako dimerizační domény a (CsA)₂ jako HOD činidla v kontextu buněčnou smrt signalizující dráhy. Nicméně pro další optimalizaci buněčné aktivity (CsA)₂ činidla je možno se spoléhat na podobné strategie jak jsou popsány u FJ1012. Takto modifikovaná(hrbolatá) oligomerizující činidla na bázi CsA by měla být preferována v aplikacích, kde je zvláště žádoucí, aby činidlo bylo schopno rozlišovat svůj cíl, umělé proteinové konstrukty od endogenních cyklofilinů.

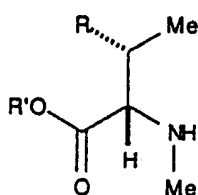
Jednou třídou modifikovaných CsA derivátů podle vynálezu jsou CsA analogy, ve kterých (a) NMeVal11 je nahrazen NMePhe (který může být substituován nebo nesubstituován) nebo NMeThr (který může být substituován nebo nesubstituován na threoninové betahydroxylové skupině) nebo (b) pro-S methylová

skupina NMeVal11 je nahrazena objemnou skupinou s alespoň 2 atomy uhlíku, výhodně třemi nebo více, která může být přímá, rozvětvená a/nebo obsahuje cyklickou skupinu a může být alkyl(ethyl,propyl, butyl, včetně terc.butylu a tak dále), aryl nebo arylalkyl. Tyto sloučeniny zahrnují ty CsA analogy, které obsahují NMeLeu, NMeIle, NMePhe nebo specificky nepřirozený NMe[betaMePhe] místo MeVal11. "(b)" CsA sloučeniny mají vzorec 2, kde R představuje funkční skupinu jak je popsána výše.



1 (R = Me) : CsA

2 (R ≠ Me) : Modif. [MeVal¹¹]CsA

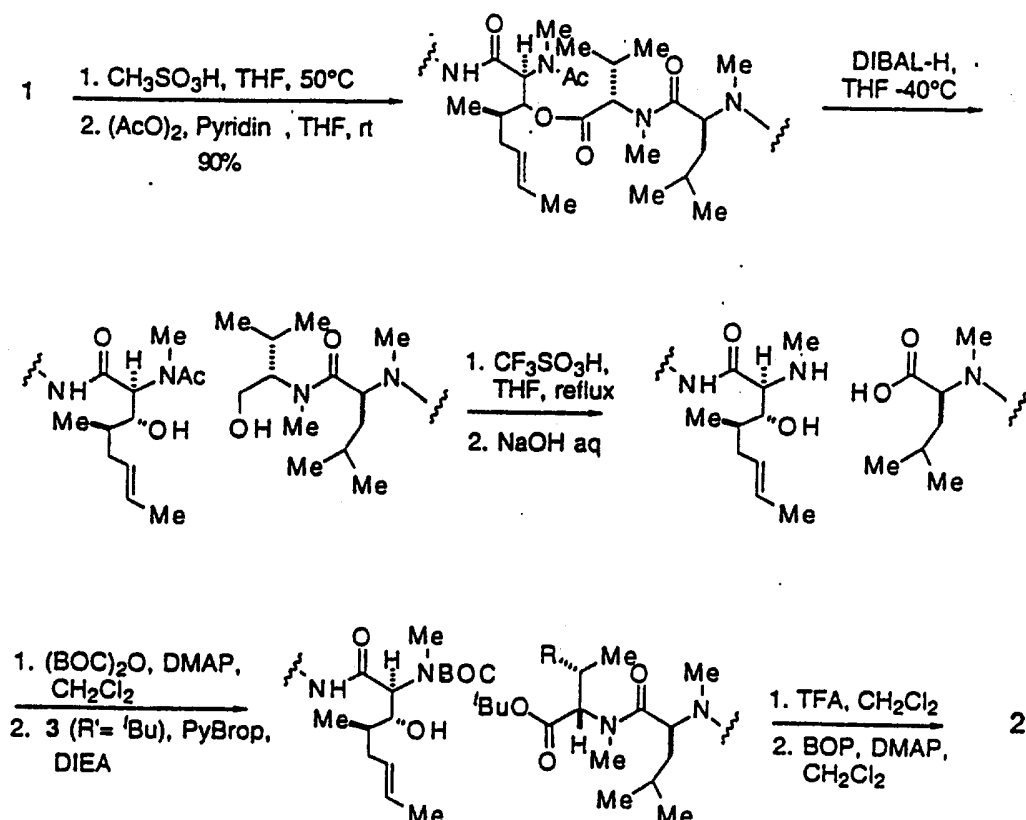


3

Tento vynález dále zahrnuje homo-a hetero-dimery a vyšší oligomery, obsahující jeden nebo více takových CsA analogů.

Výhodně se sloučeniny a oligomery, obsahující tyto v souladu s předloženým vynálezem, vážou k přírodním nebo výhodně mutantním, cyklofilinovým proteinům s afinitou alespoň 0,1 % a výhodně alespoň asi 1 % a ještě výhodněji alespoň asi 10 % vzhledem k hodnotě afinity CsA pro cyklofilin.

Dvoustupňová strategie může být použita pro přípravu modifikovaných [MeVal¹¹]CsA derivátů, při které se vychází z CsA. V prvním stupni se odstraní zbytek MeVal¹¹ z makrocyklu. Ve druhém stupni se zavede vybraná aminokyselina na (dřívější) MeVal¹¹ místo a lineární peptid je cyklizován. Výhoda této strategie je snadný přístup k některým modifikovaným [MeVal¹¹]CsA derivátům ve srovnání s celkovou syntézou. Schema syntézy je následující:



Pro rozlišení amidových vazeb byl dosažen N,O posun mezi amino a hydroxylovými skupinami od MeBmt1 za vzniku Isocsa (Ruegger a spol., *Helv.Chim.Acta* 59 4 (1976): 1075-92 (viz schema výše). Reakce byla provedena v THF za přítomnosti methansulfonové kyseliny. (Oliyai a spol., *Pharm.Res.* 9 5 (1992): 617-622). Volná aminokyselina byla chráněna acetylovou skupinou s pyridinem a acetanhydridem v postupu v jedné nádobě. Celkový výtěžek N-acetyl chráněného IsoCsa je 90 %. Ester MeBmt1-MeVal11 vazba se pak redukuje selektivně za přítomnosti N-methylamidových vazeb, např. použitím DIBAL-H. Výsledný diol se pak transformuje na odpovídající diester jinou kyselinou vyvolaným N,O posunem. Takto se připraví jak N-acetylová skupina tak MeVal11 zbytky pro odstranění hydrolýzou nově vytvořených esterů s vodnou bází.

Pro chránění volné aminoskupiny se nový aminokyselinový zbytek zavede např. PyBrop kondenzačním činidlem. Odchránění a cyklizace lineárního peptidu s BOP za přítomnosti DMAP (Alberg a Schreiber, *Science* 262 5131 (1993):248-250) dokončuje syntézu 2. vazba hrboletých Csa k cyklofilinu může být hodnocena stejnými metodami jak byly popsány pro FK506 a FK1012. Jakmile jsou cyklofiliny identifikovány s kompenzátorovými mutacemi,, mohou být syntetizována hrboletá (Csa)₂ HED a HOD činidla metodami popsány dříve. Zvláště zajímavé jsou hrboleté Csa sloučeniny, které mohou tvořit dimery, které se samy mohou vázat k cyklofilinovému proteinu se stechiometrií 1:2. Homodimery a vyšší homoligomery, heterodimery a heterovyšší oligomery, obsahující alespoň jednu takovou Csa nebo modifikovanou Csa skupinu mohou být tvarovány a hodnoceny metodami vyvinutými pro FK1012A a (Csa)₂ a optimalizovat linkerový element analogicky k FK1012 studiím.

Mohou nyní být připtaveny mutantní cyklofiliny, které vážou naši polohu 11 CsA variant (2) nahromaděním extraobjemu na ligandu. Cyklofiliny s těmito kompenzátorovými mutacemi mohou být identifikovány screeningovými protokoly na struktuře založených místně řízených a náhodných mutagenesí popsaných v FK1012 studiích.

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že předložená metoda a kompozice poskytnuté pro velkou přizpůsobivost v produkci buněk pro široký rozsah účelů. Při použití předložených konstruktů je možno použít buňky pro terapeutické účely, kde buňky mohou zůstávat neaktivní pokud je potřeba a pak být aktivovány podáním bezpečného léčiva. Protože buňky mohou mít široký rozsah životnosti v hostiteli, je zde příležitost k léčbě jak chronických tak akutních indikací tak, že se dosáhne krátkodobé nebo dlouhodobé ochrany. Navíc je možno poskytnout buňky, které budou řízeny k jednotlivému místu jako je anatomické místo nebo funkční místo.

Mohou být poskytnuty buňky, které povedou k sekreci velmi rozsáhlého množství proteinů, kterémohou sloužit po opravu deficitu nebo inhibici nežádoucího výsledku, jako je aktivace cytolytických buněk, pro inaktivaci destruktivního činidla, pro usmrcení omezené buněčné populace nebo podobně. Jsou-li buňky přítomny v hostiteli během definovaného časového období, mohou být buňky snadno aktivovány přijetím léčiva v dávce, která může vést k rychlé odezvě buněk v hostiteli. Mohou být poskytnuty buňky, kde je exprimovaný chimérní receptor intracelulární, s vyloučením jakékoliv imunitní odezvy k cizímu proteinu na buněčném povrchu. Dále intracelulární chimérní receptorový protein poskytuje účinnou signální transdukcí při ligandové vazbě, zjevně účinnější než

je receptorová vazba na extracelulární receptorovou doménu.

Při použití relativně jednoduchých molekul, které se vážou k chimérním membránovým vazebným receptorům, dojde k expresi zájmových produktů nebo inhibici exprese produktů a lze tak dosáhnout celulárního terapeutického ošetření. Sloučeniny, které mohou být podávány jsou bezpečné, mohou být podávány mnoha způsoby a mohou dosáhnout velmi specifické odezvy, takže nedochází k homeostasis.

Všechny publikace a patentové přihlášky citované v tomto popise jsou zde zahrnuty jako odkazy, vždy pro každou jednotlivou publikaci nebo patentovou přihlášku bylo specificky aa jednotlivě uvedeno, že je zde zahrnuta jako odkaz.

I když byl předložený vynález popsán podrobně pro ilustraci a příklady pro usnadnění pochopení, bude zřejmé pro odborníky v oboru na základě tohoto vynálezu, že mohou být provedeny určité změny a modifikace, aniž by došlo k narušení ducha a rozsahu připojených nároků.

č.j.	7 1 1 6 2
D0Š10	10. XI. 95
UŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. DNA konstrukt, kodující chimérní protein, obsahující (a) alespoň jednu receptorovou doménu, schopnou se vázat k vybranému ligandu, fuzovanou k (b) heterologní další proteinové doméně schopné iniciace biologického procesu při vystavení ligandu, kde uvedený ligand je schopen vazby ke dvěma nebo více chimérním proteinovým molekulám.
2. DNA konstrukt podle nároku 1, kde chimérní protein dále obsahuje intracelulární cílovou doménu schopnou řízení chimérního proteinu k požadované buněčné části.
3. DNA konstrukt podle nároku 2, kde intracelulární cílová doména obsahuje sekreční leader sekvenci, membránovou překlenovací doménu, membránovou vazebnou doménu nebo sekvenci, řídící protein ke spojení s vesiklem nebo s jádrem.
4. DNA konstrukt podle nároku 1, kde chimérní protein má K_d hodnotu pro vazbu k vybranému ligandu menší nebo rovnou asi 10^{-6} M.
5. DNA konstrukt podle nároku 1, kde vybraný ligand má molekulovou hmotnost menší než asi 5 kDa.
6. DNA konstrukt podle nároku 1, kde heterologní další proteinová doména obsahuje:
(a) proteinovou doménu schopnou, při vystavení ligandu, iniciace detegovatelného intracelulárního signálu,

- (b) DNA-vazebný protein nebo
- (c) transkripční aktivační doménu.

7. DNA konstrukt podle nároku 6, kde intracelulární signál je schopen aktivační transkripce genu pod transkripční kontrolou transkripčního kontrolního prvku citlivého k uvedené oligomerizaci.

8. DNA konstrukt podle nároku 7, kde uvedenou další proteinovou doménou je zeta podjednotka CD3.

9. DNA konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, kde chimérní protein je schopen vazby k ligandu typu FK506, ligandu typu cyklosporinu A, tetracyklinovému nebo steroidnímu ligandu.

10. DNA konstrukt, kodující cílový gen pod transkripční kontrolou transkripčního kontrolního prvku citlivého k oligomerizaci chimérního proteinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9.

11. DNA konstrukt podle nároku 10, ve kterém cílový gen není přirozený pod transkripční kontrolou citlivého transkripčního kontrolního prvku.

12. DNA konstrukt, obsahující (a) transkripční kontrolní prvek citlivý k oligomerizaci chimérního proteinu podle nároků 1 až 9 a (b) přiléhající DNA sekvence z cílového genu, umožňující homologní rekombinaci transkripčního kontrolního prvku do hostitelské buňky ve spojení s cílovým genem.

13. DNA konstrukt podle nároků 10 až 12, kde cílový gen koduje povrchový membránový protein, sekretovaný protein,

cytoplasmický protein nebo ribozymovou nebo pozitivní sekvenci.

14. DNA vektor, obsahující DNA konstrukt podle kteréhokoliv znároků 1 až 13 a selektující marker, umožňující transfekci DNA konstruktů do hostitelských buněk a výběr transfektantů, obsahujících konstrukt.

15. DNA vektor podle nároku 14, kde vektorem je virální vektor.

16. Virální vektor podle nároku 15, kterým je adeno-, adeno spojený- nebo retrovirální vektor.

17. Chimerní protein, kodovaný DNA konstruktem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9.

18. Buňka, obsahující a schopná exprese alespoň jednoho DNA konstruktů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 13.

19. Buňka podle nároku 18, kterou je savčí buňka.

20. Buňka podle nároku 18, která obsahuje

(a) první DNA konstrukt, kodující chimerní protein, obsahující (i) alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k vybranému ligandu a (ii) další proteinovou doménu, heterologní vzhledem k receptorové doméně, ale sschopnou, při oligomerizaci s jednou nebo více jinými podobnými doménami, spuštění aktivace transkripce cílového genu pod transkripční kontrolou transkripčního kontrolního prvku citlivého k uvedené oligomerizaci a

(b) cílový gen pod expresní kontrolou transkripčního

kontrolního prvku citlivého k uvedené oligomerizaci

a která po vystavení vybranému ligandu exprimuje cílový gen.

21. Buňka podle nároku 18, která obsahuje první sadu DNA konstruktů, kodujících

(a) první chimérní protein, obsahující DNA vazebnou doménu a alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k první vybrané ligandové skupině a

(b) druhý chimérní protein, obsahující transkripční aktivační doménu a alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k druhému vybranému ligandu (který může být stejný nebo rozdílný od první vybrané ligandové skupiny) a

druhý DNA konstrukt, kodující cílový gen pod transkripční kontrolou heterologní transkripční kontrolní sekvence, , která se váže s DNA-vazebnou doménou a je citlivá k transkripční aktivační doméně,

kde tato buňka exprimuje cílový gen po vystavení substanci, obsahující vybrané ligandové skupiny(u).

22. DNA kompozice, obsahující

(a) první DNA konstrukt, kodující chimérní protein, obsahující (i) alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k vybranému ligandu, fuzovanou k (ii) heterologní další proteinové doméně schopné iniciace biologického procesu po vystavení ligandu a

(b) druhý DNA konstrukt, kodující cílový gen pod transkripční kontrolou transkripčního kontrolního prvku citlivého k oligomerizaci chimérního proteinu.

23. DNA kompozice, obsahující

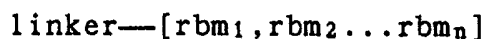
(a) DNA konstrukt, kodující první chiméřní protein, obsahující (i) alespoň jednu první receptorovou doménu schopnou vazby k vybrané první ligandové skupině, fuzovanou k (ii) heterologní další proteinové doméně schopné iniciace biologického procesu při vystavení ligandu za přítomnosti druhého chiméřního proteinu a

(b) DNA konstrukt, kodující druhý chiméřní protein, obsahující (i) alespoň jednu receptorovou doménu schopnou vazby k vybrané druhé ligandové skupině, fuzovaný k (ii) heterologní další proteinové doméně schopné iniciace biologického procesu při vystavení ligandu za přítomnosti prvního chiméřního proteinu,

kde první a druhá receptorová skupina mohou být stejné nebo rozdílné a první a druhé vybrané ligandové skupiny mohou být stejné nebo rozdílné a

(c) cílový DNA konstrukt, kodující cílový gen pod transkripční kontrolou transkripčního kontrolního prvku citlivého k oligomerizaci chiméřního proteinu.

24. Ligand schopný se vázat ke dvěma nebo více chiméřním proteinovým molekulám podle nároků 1 až 19 za tvorby jejich oligomeru, kde uvedený ligand má vzorec



kde n je celé číslo od 2 do asi 5, $\text{rbm}(1)$ – $\text{rbm}(n)$ jsou receptorové vazebné skupiny, které mohou být stejné nebo rozdílné a které jsou schopny vázat se k chiméřnímu

proteinu(ům), kde uvedené rbm skupiny jsou kovalentně připojeny k linkerové skupině, kterou je bi- nebo multifunkční molekula schopná být navázána kovalentně ("—") ke dvěma nebo více rbm skupinám.

25. Ligand podle nároku 24, který má molekulovou hmotnost menší než asi 5 kDa.

26. Ligand podle nároku 24, kde rbm skupiny jsou stejné nebo rozdílné a zahrnují skupiny typu FK506, skupiny typu cyklosporinu, steroidu nebo tetracyklinu.

27. Ligand podle nároku 24, který se váže k přirozeně se vyskytujícímu receptoru s K_d hodnotou větší než asi 10^{-5} .

28. Ligand podle nároku 24, kde alespoň jeden rbm obsahuje molekulu FK506, FK520, rapamycinu nebo jeho derivátu, modifikovanou na C9, C10 nebo na obou těchto uhlicích.

29. Použití ligandu podle nároku 24, pro přípravu farmaceutického přípravku pro aktivaci transkripce cílového genu.

30. Způsob aktivace transkripce cílového genu v buňkách, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje

(a) poskytnutí buněk, obsahujících a schopných exprese (i) alespoň jednoho DNA konstruktů podle nároku 7 a (ii) cílového genu pod expresní kontrolou transkripčního kontrolního prvku citlivého k oligomerizaci uvedeného DNA konstruktů a

(b) vystavení buněk ligandu schopnému se vázat k chimérickému proteinu kodovanému DNA konstruktem v množství účinném pro

expresi cílového genu.

31. Způsob podle nároku 30,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky rostou v kultivačním mediu a vystavení se provede přidáním ligandu ke kultivačnímu mediu.

~~32~~ 32. Způsob podle nároku 30,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že buňky jsou přítomny v hostitelském organismu a vystavení se provede podáním ligandu hostitelskému organismu.

~~33~~ 33. Způsob podle nároku 32,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že hostitelským organismem je savec a ligand je podáván orálně, bukálně, sublinguálně, transdermálně, subkutánně, intramuskulárně, intravenózně, intrakloubově nebo inhalací ve vhodném vehikulu.

~~34~~ 34. Způsob poskytnutí savce citlivého k ligandu podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje zavedení buňky podle nároku 18 do hostitelského savce.

~~35~~ 35. Způsob poskytnutí savce citlivého k ligandu podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje zavedení alespoň jednoho vektoru podle nároku 14 do hostitelského savce za podmínek, umožňujících transfekci jedné nebo více buněk hostitelského savce.

36. Kit, obsahující alespoň jeden DNA konstrukt podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9.

37. Kit podle nároku 36, který dále obsahuje ligand, ke kterému se váže jeden nebo více chimérních proteinů

kodovaných DNA konstruktem(y).

38. Kit podle nároku 37, který dále obsahuje monomerní ligandové činidlo jako antagonistu pro vazbu ligand-chimérní protein.

39. Kit podle nároku 36, který dále obsahuje alespoň jeden DNA konstrukt podle nároků 10 až 13.

40. Kit, obsahující první DNA konstrukt, kodující chimérní protein, obsahující alespoň jednu receptorovou doménu (schopnou vazby k vybranému ligandu), fuzovanou k transkripční aktivátorové doméně; druhý DNA konstrukt, kodující druhý chimérní protein, obsahující alespoň jednu receptorovou doménu (schopnou vazby k vybranému ligandu), fuzovanou k DNA vazebné doméně a třetí DNA konstrukt, kodující cílový gen pod kontrolou transkripčního kontrolního prvku, obsahujícího DNA sekvenci, ke které se váže DNA vazebná doména a která je transkripčně aktivována vystavením ligandu za přítomnosti prvního a druhého chimérního proteinu.

41. Kit podle nároků 36 až 38, ve kterém jeden nebo více DNA konstruktů obsahuje klonovací místo místo akční domény nebo cílového genu.

42. Kit podle nároku 39, který dále obsahuje pozitivní kontrolní buňky stabilně transformované DNA konstruktem(y), které jsou poskytnuty v kitu.

43. Hostitelský organismus, obsahující buňku podle nároku 18.

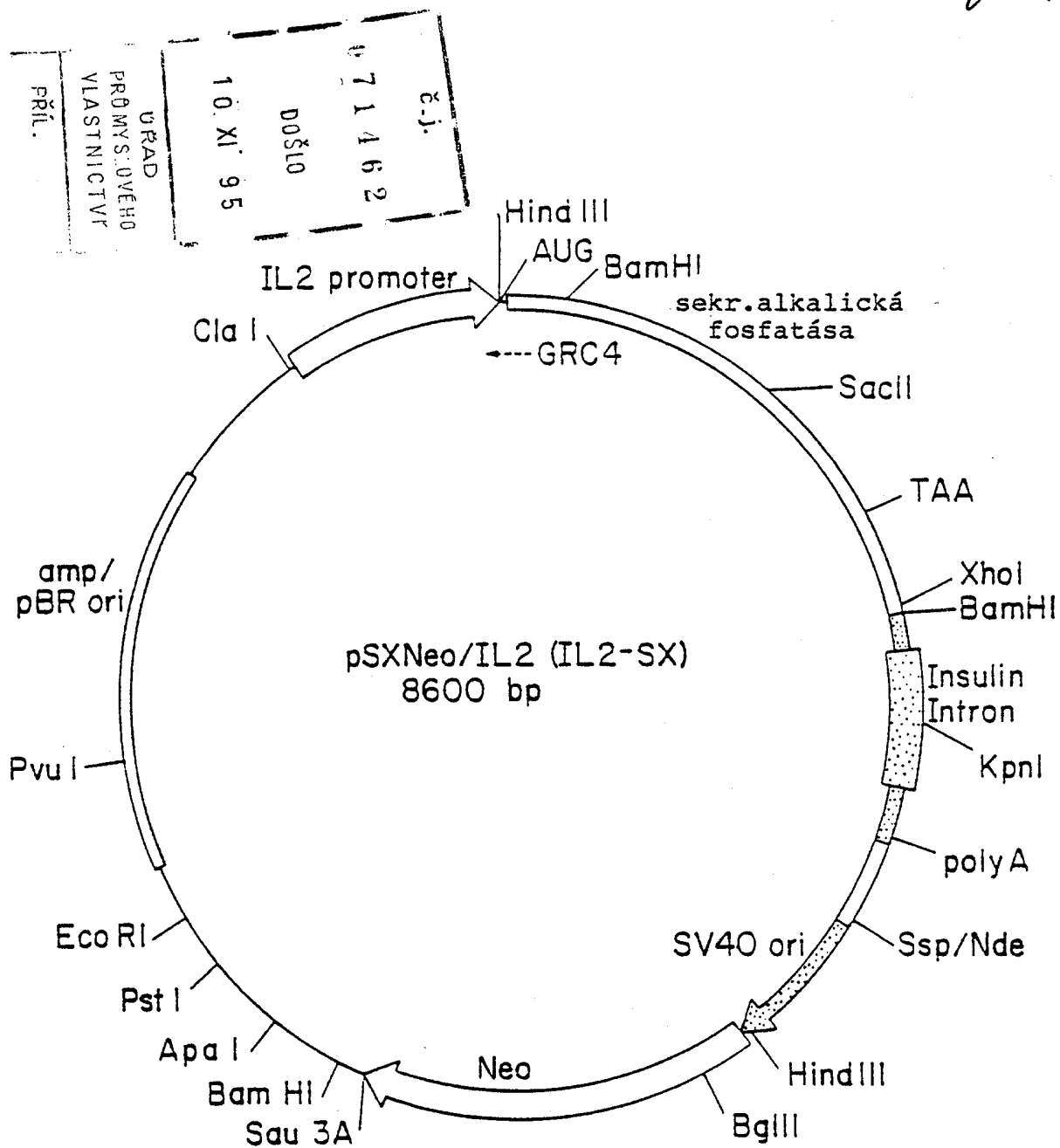
44. Hostitelský organismus podle nároku 43, kterým je rostlinný nebo živočišný organismus.

45. Živočich podle nároku 44, kterým je červ, hmyz nebo savec.

46. Savec podle nároku 45, kterým je myš nebo jiný hlodavec nebo člověk.

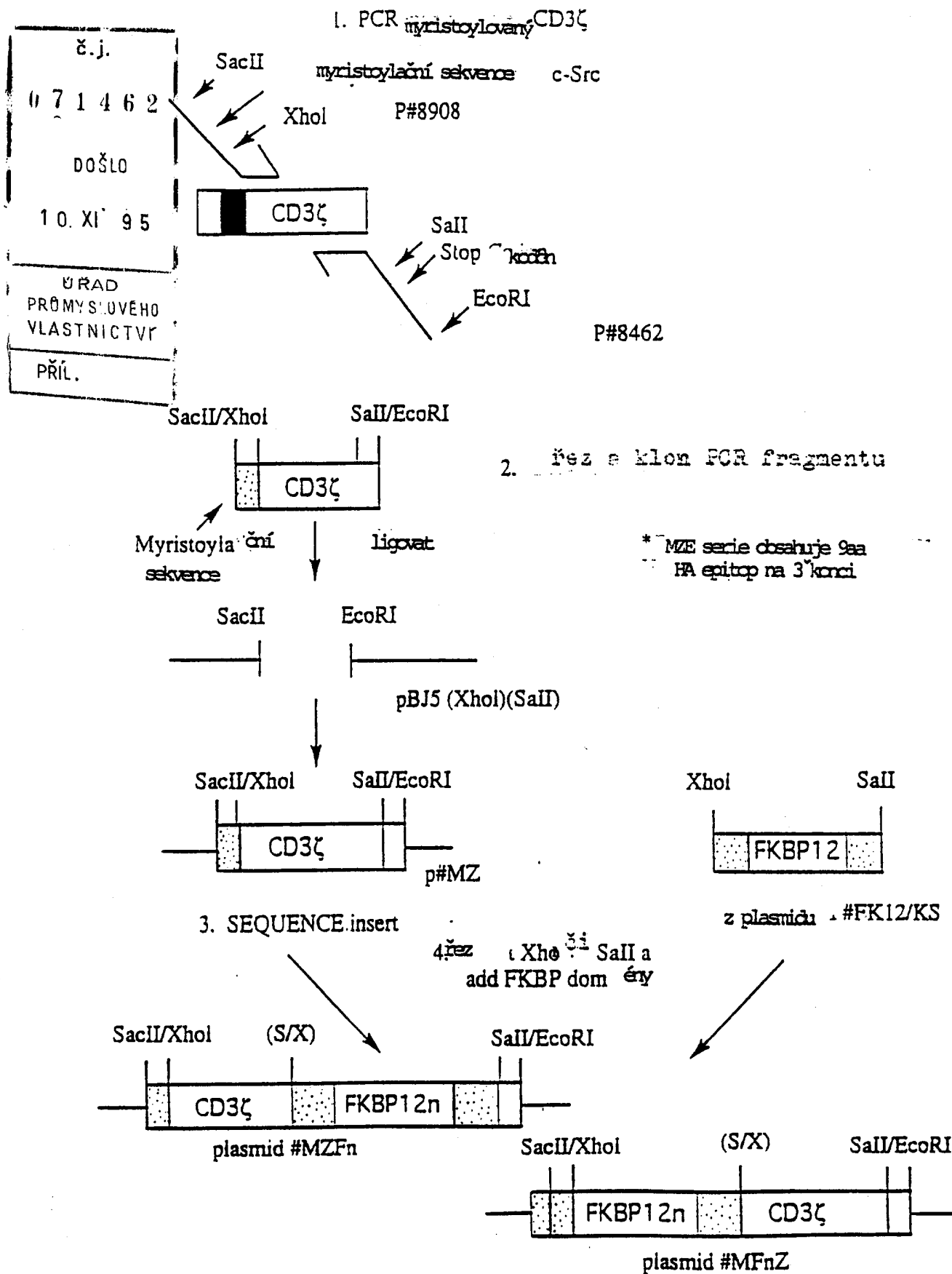
47. Ligand podle nároku 24, kde linkerová skupina obsahuje C2-C20 alkylen, C4-C18 azalkylen, C6-C24 N-alkylen azalkylen, C6-C18 arylen, C8-C24 ardialkylen nebo C8-C36 bis-karboxamidoalkylenovou skupinu.

48. Kit podle kteréhokoliv z nároků 36-38, ve kterém je každý DNA konstrukt připojen k selekčnímu markeru, který může být stejný nebo odlišný od každého odlišného DNA konstruktu, umožňující selekci buněk, které obsahují uvedený DNA konstrukt(y).



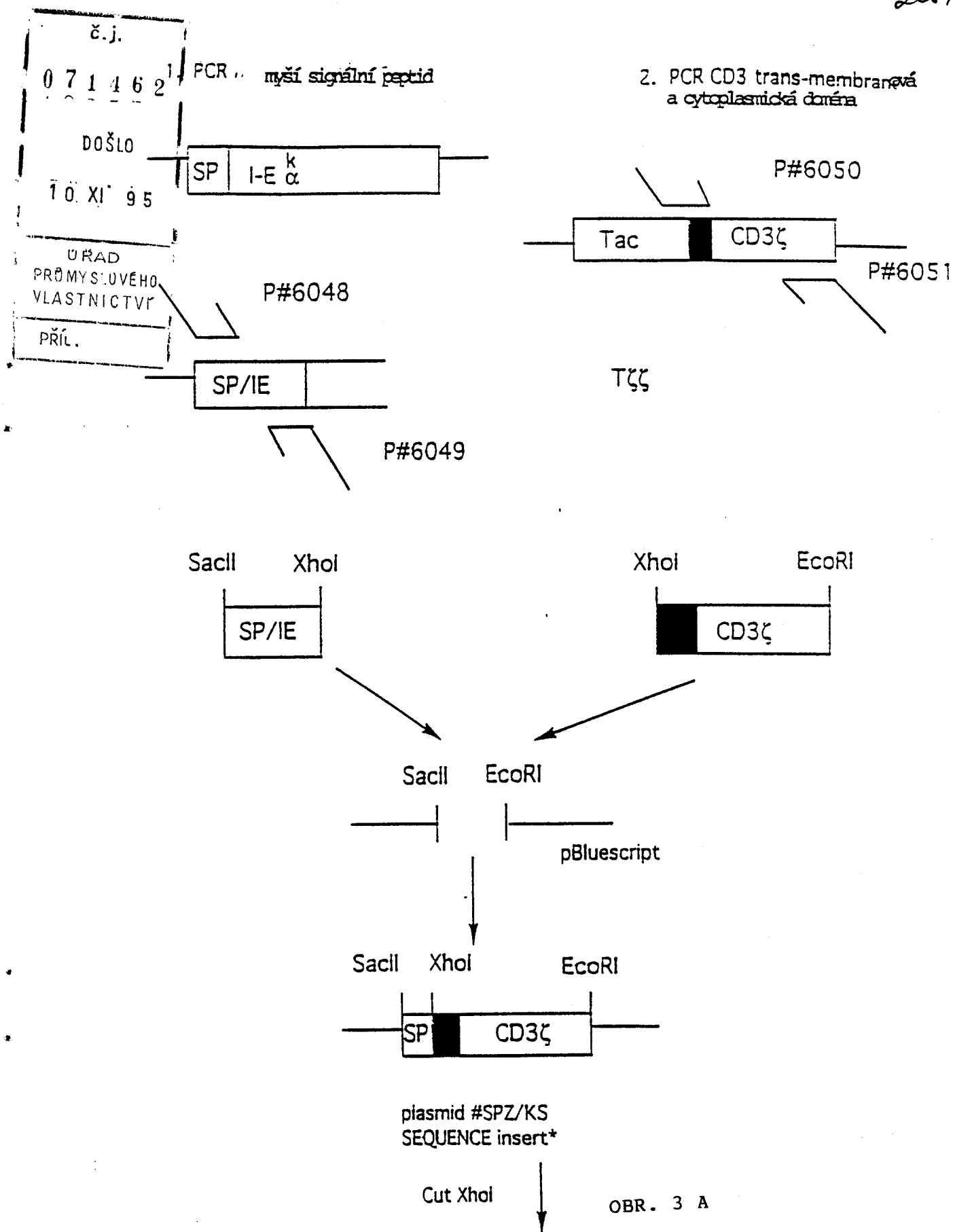
OBR. 1

náhradní list

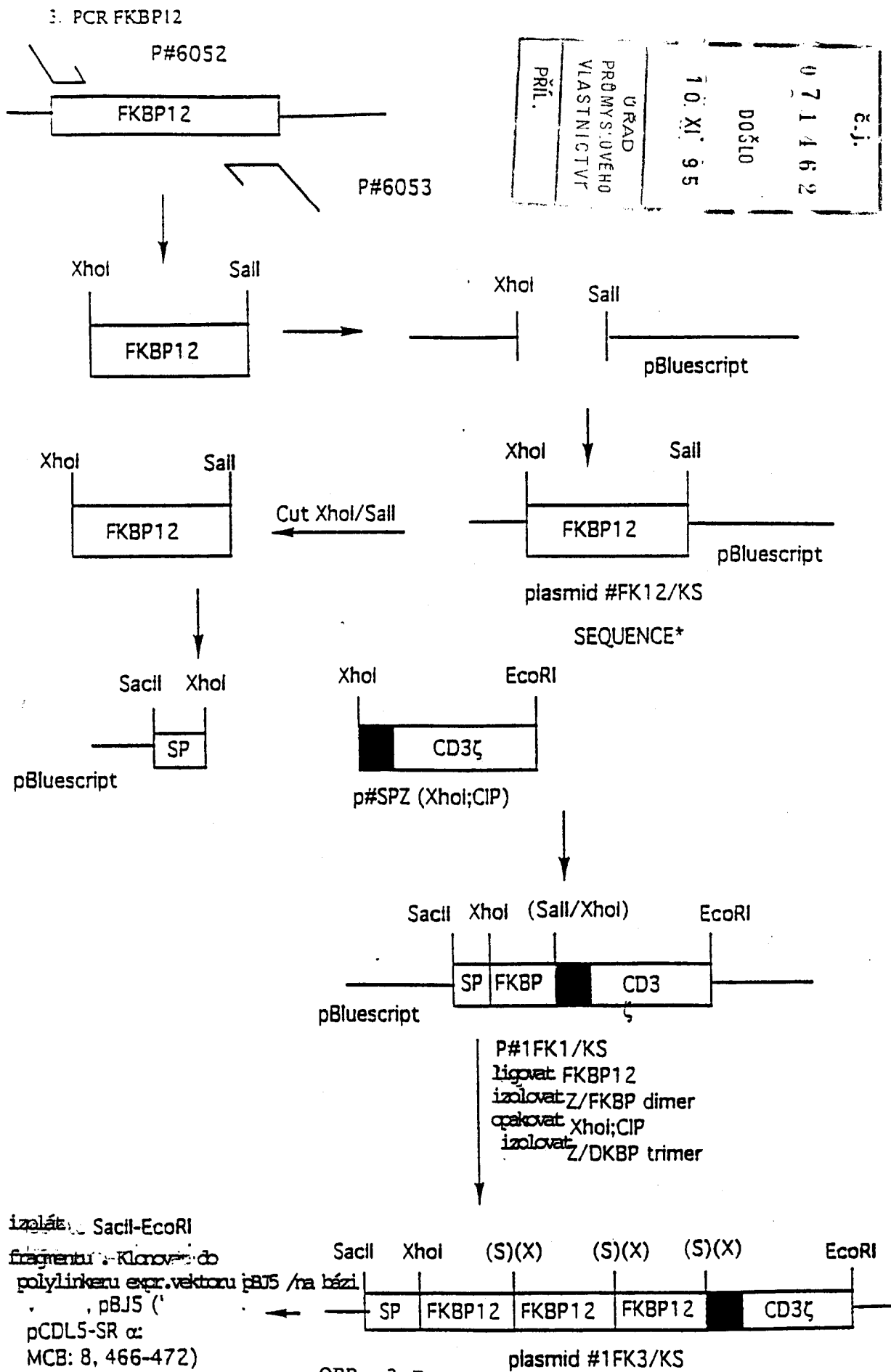


nahr.list

OBR. 2



nahr.list



Cys-Gly #2
 7129: 5' GGGCTCGAGCTCGGCTACTTGCTAG-3'
 L G Y L L

homolog₂
 XhoI *
 *T to G

CYCC

XhoI homolog^{ie}

OBR. 4 B

6568: 5'-CGACACTCGAGGTGACGGACAAGGTC-3'

Sall homolog^{ie}

6569: 5'-CGACAGTCGACCCAATCAGGGACCTC-3'

č.j.

071462

DOŠLO

10. XI. 95

EPITOPE

XhoI

BsiWI

7850: 5'-TCGAGTATCCGTACGACGTACCAGACTACGCAG-3'

Y P Y D V P D Y A

ÚŘAD

PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

Sall

7851: 5'-TCGACTGCGTAGTCTGGTACGTCGTACGGATAC-3'

PŘÍL.

EPITOPE: 5SEP, 3XEP

Sall

8922: 5'-TCGACTATCCGTACGACGTACCAGACTACGCAC-3'

XhoI

8923: 5'-TCGAGTGCGTAGTCTGGTACGTCGTACGGATAG-3'

Myristoylase ad c-src 5SMXZ

SacII

8908: 5'-CGACACCGCGGCCACCATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCT
KOZAK M G S S K S K P

XhoI

ζ-homolog^{ie}AAGGACCCCAGCCAGCGCCTCGAGAGGAGTGCAGAGACTG-3'
K D P S Q R L E R S A E T

SXTZ

Tac

CD3ζ

homolog^{ie}

XhoI

8912: 5'-CGACACTCGAGGAGCTCTGTGACGATG-3'
E L C D D

návr.list

č.j.

Asp-Lys #4

0714806:

DOŠLO

10. XI. 95 #4 Extension

8907:

URAD
PRŮMYŠLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

PŘÍL.

TAG-Tm #3

7220:

homolog_{ie}

XhoI

5'-CGACACTCGAGCTCTGCTACTTGCTAAAGGGAATCCTCTTC-3'

E L C Y L L K G I L F

homolog_{ie} *GATtoAAG

XhoI

5'-CGACACTCGAGCTGCTGGAT.CCGAAGCTCTGCTACTTGCTAAAG-3'

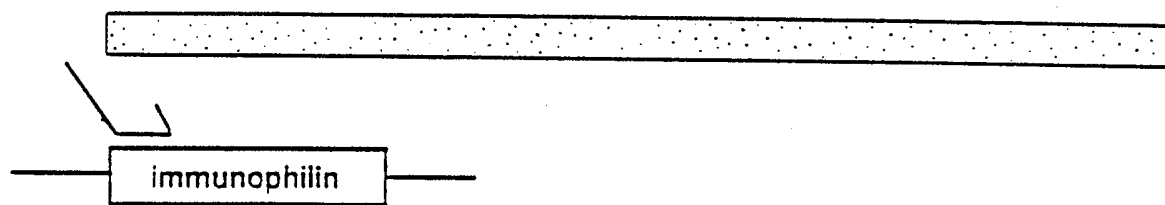
E L L D P K L C Y L L K

homolog_{ie}

XhoI

5'-CGACACTCGAGACAACAGAGTACCAGGTAGC-3'

E T T E Y Q V



FKBP12

homolog_{ie}

XhoI

6052: 5'-CGACACTCGAGGGCGTG CAGGTGGAGAC-3'

E G V Q V E

homolog_{ie}

Sall

6053: 5'-CGACAGTCGACTTCCAGTTTTAGAAAGC-3'

V E L K L L

FKBP13

homolog_{ie}

XhoI

8460: 5'-TCGACACTCGAGACGGGGGCCGAGGGC-3'

E T G A E G

homolog_{ie}

Sall

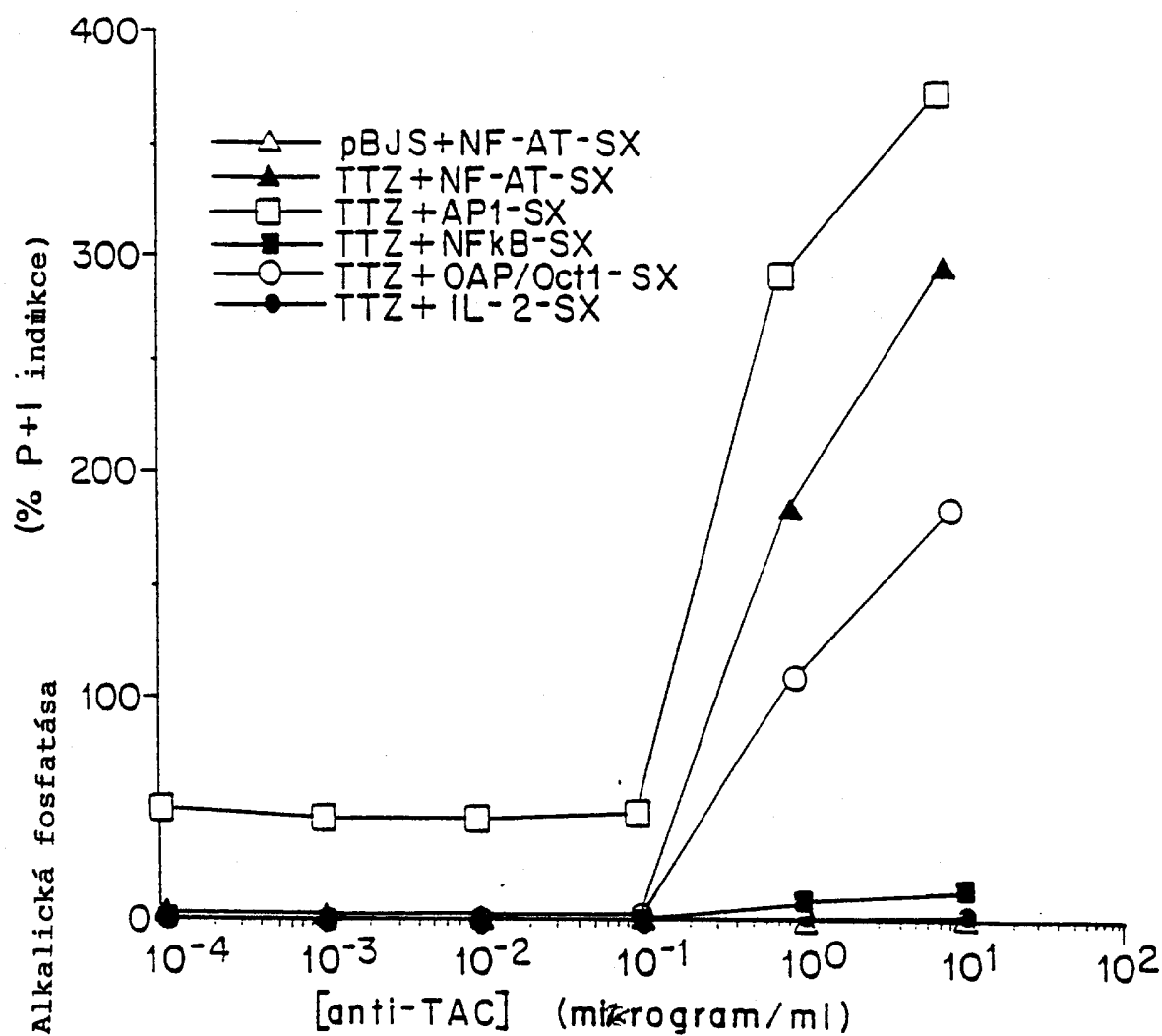
8461: 5'-CCGACAGTCGACCTCTATTTT GAGCAGC-3'

V E I

OBR. 4 C

nár.list

č.j.	7 1 4 6 2
DOŠLO	10. XI. 95
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ PŘÍL.	

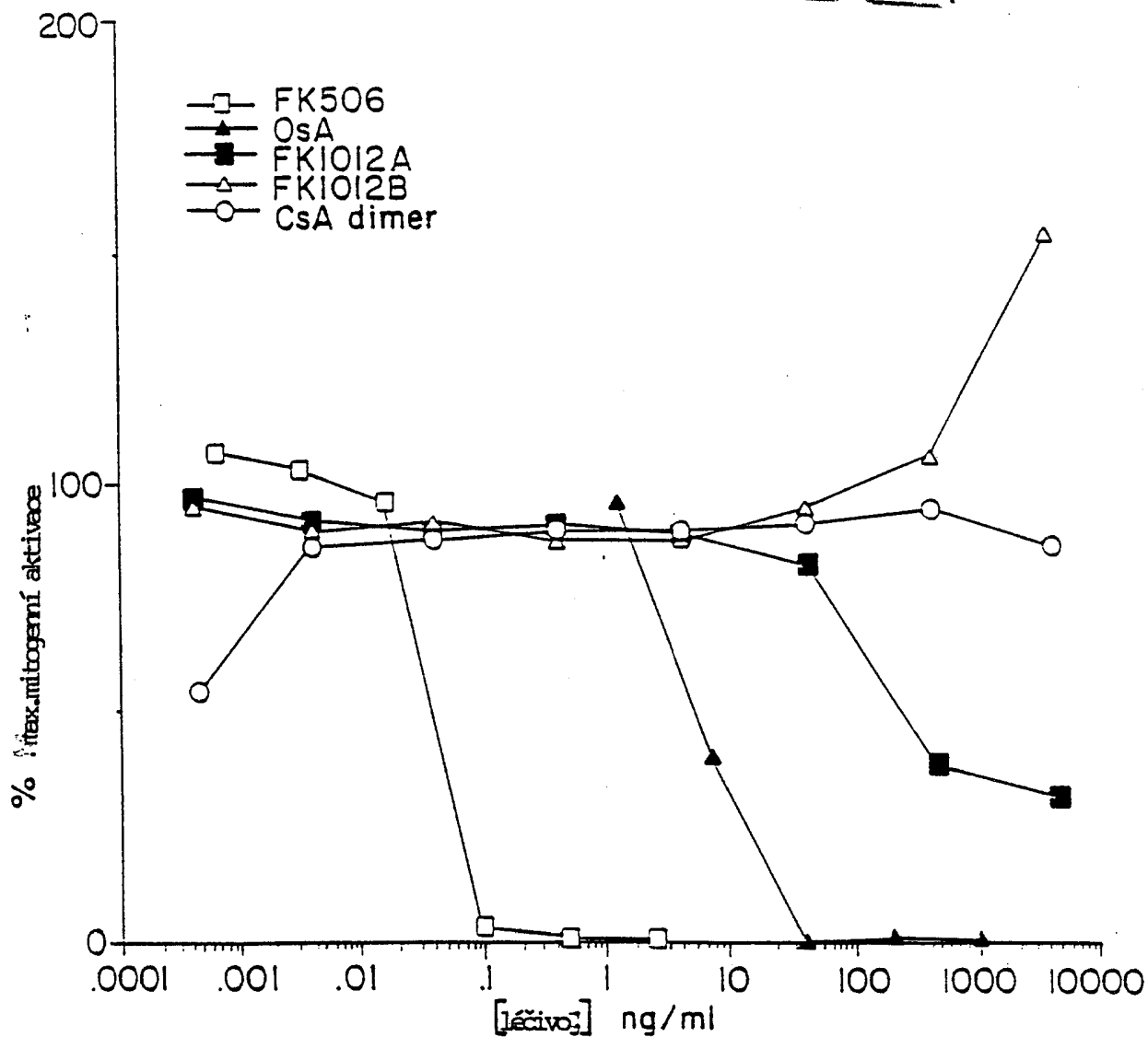


OBR. 5

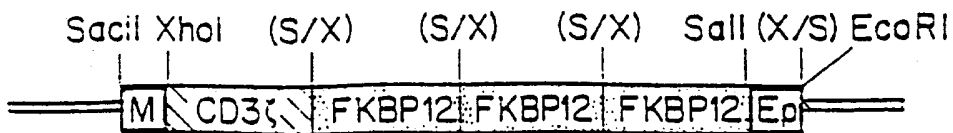
2081-98

náhr.list

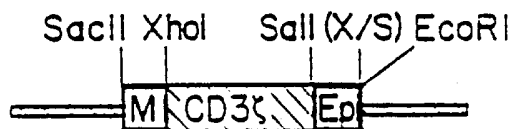
č.j.	071462
DOŠLO	
10. XI. 95	
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	



OBR. 6 A

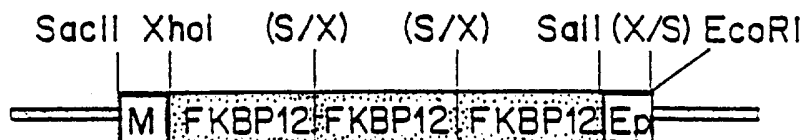


MZF3E

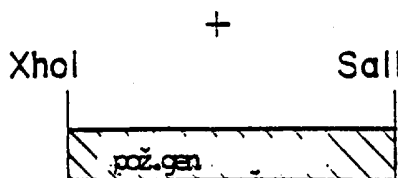
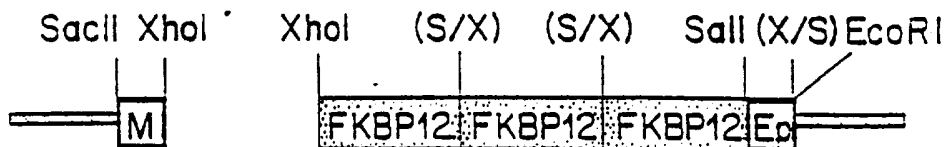


MZE

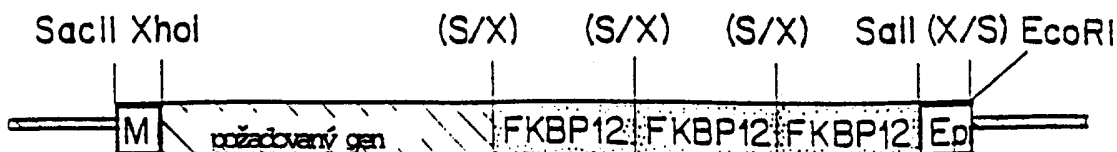
Cut XhoI/SalI: CIP: +FKBP12 X 3



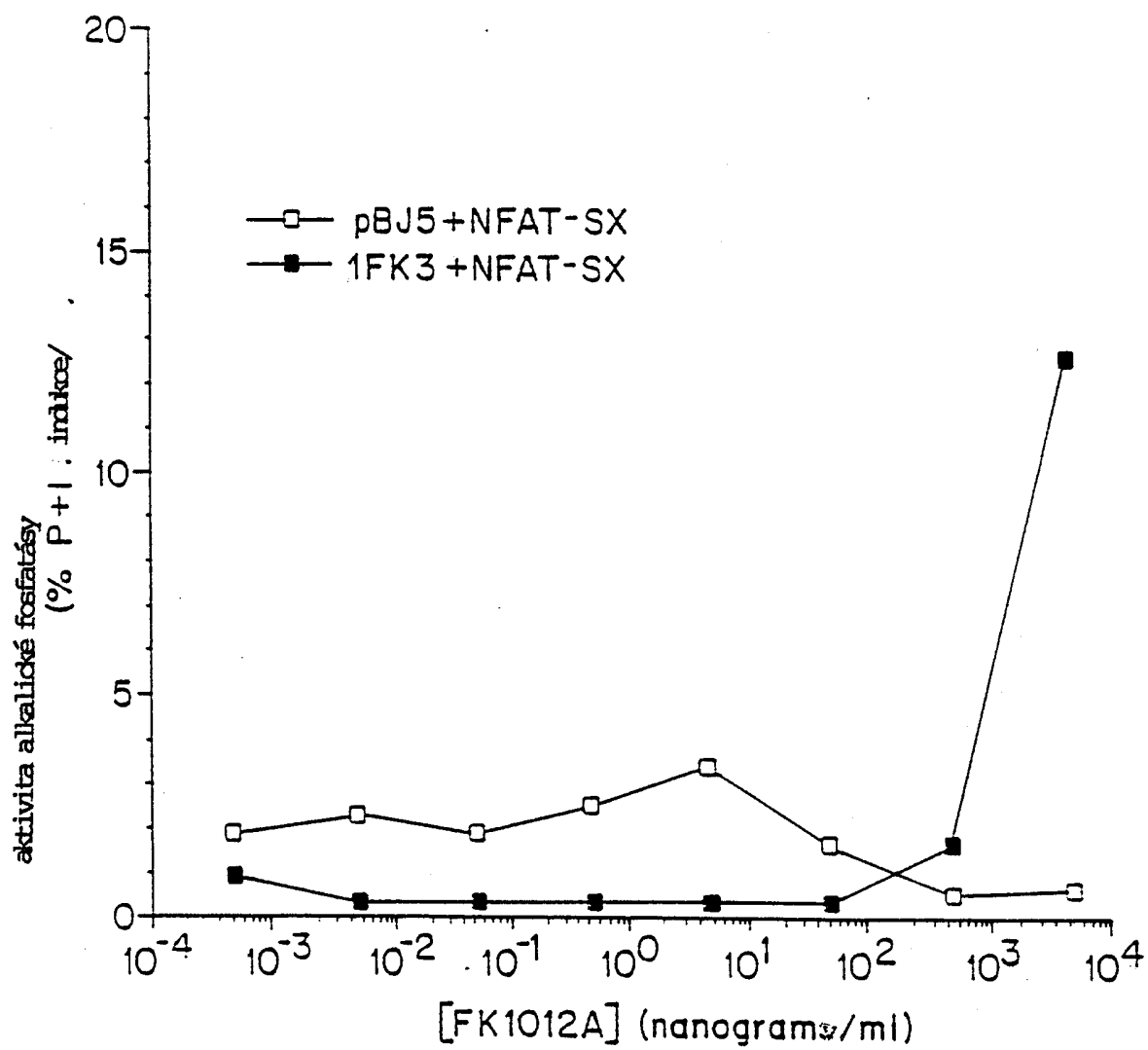
MF3E



1. cytoplasmická skupina povrch. receptoru
2. tyrosin kináza
3. transkripční faktor
4. jiné



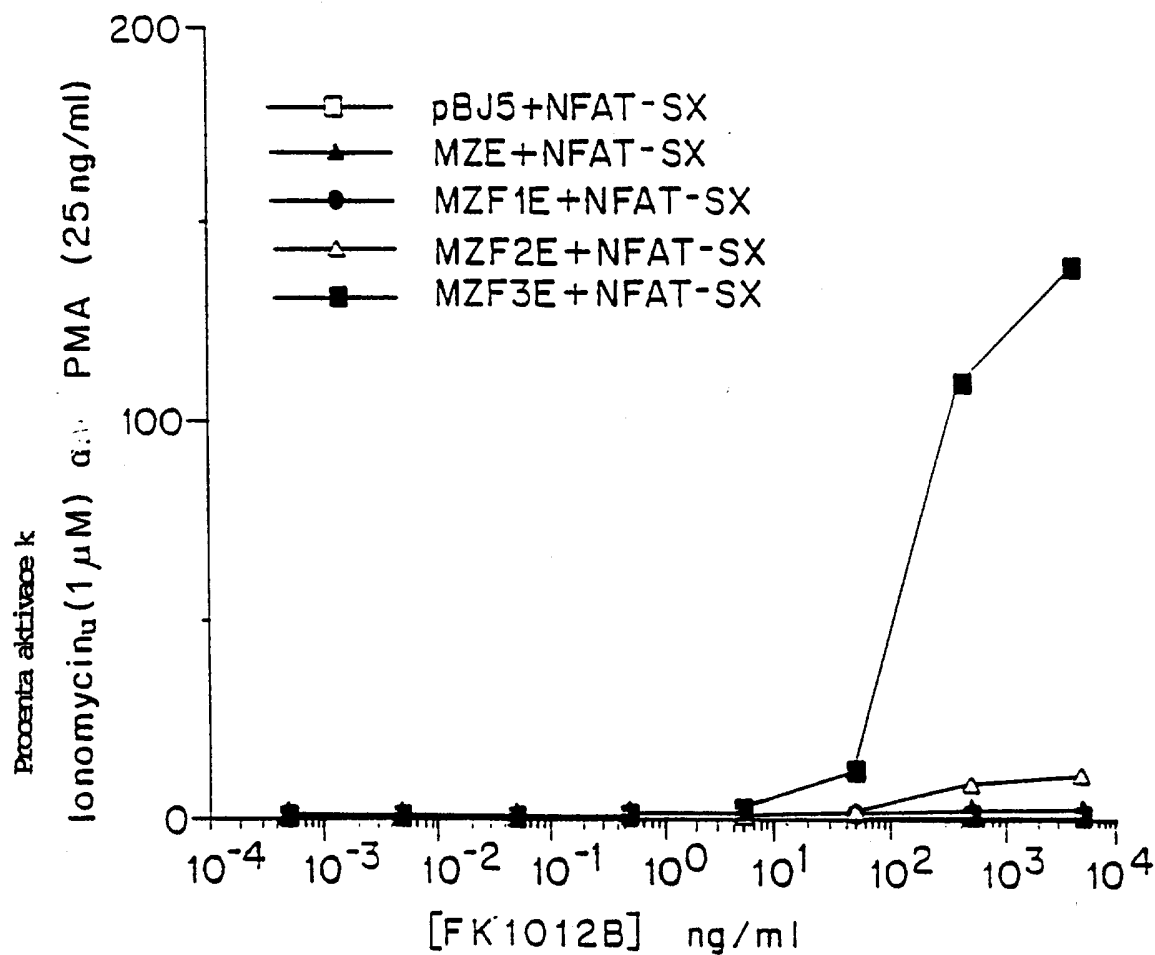
č.j.	71162
DOŠLO	10. XI. 95
URAD	PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.	



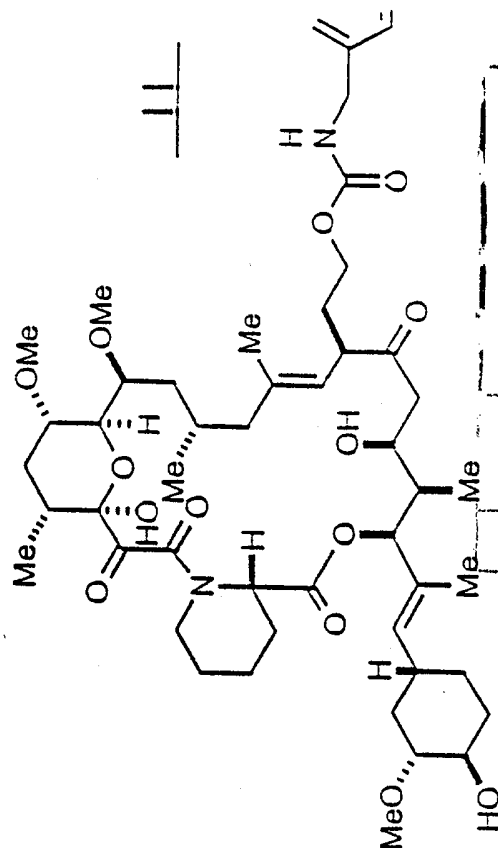
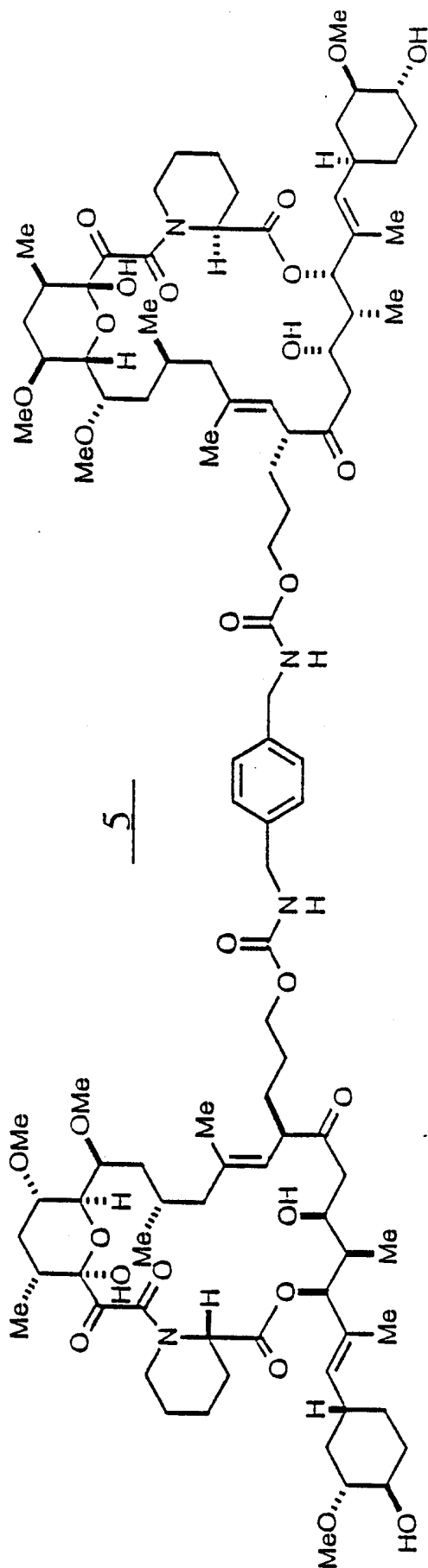
OBR. 7

natr.list

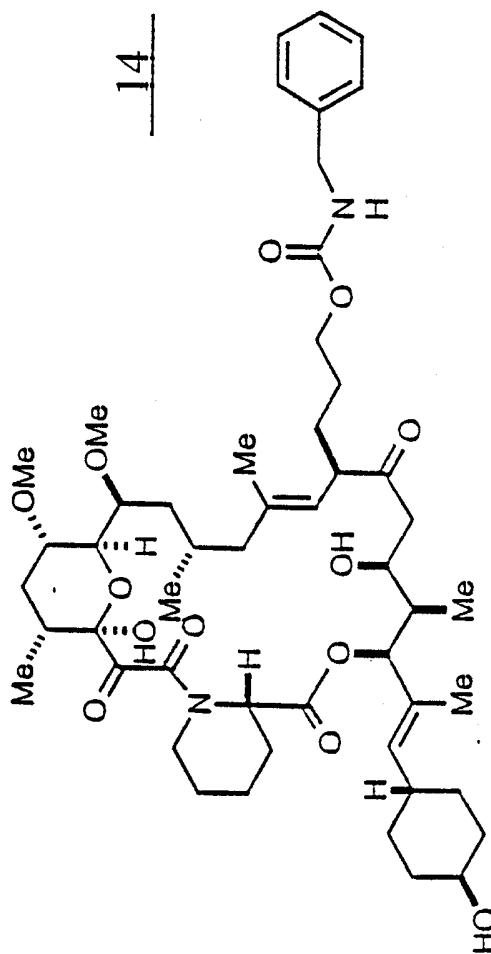
č.j.	471462
DOŠLO	
10. XI. 95	
URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	



OBR. 8



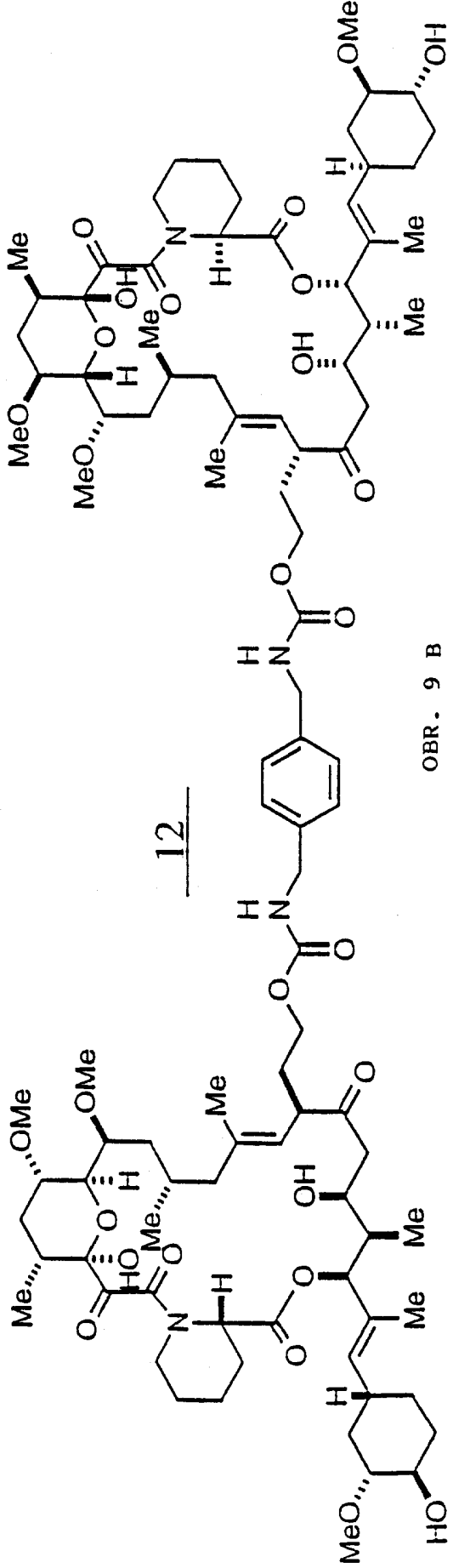
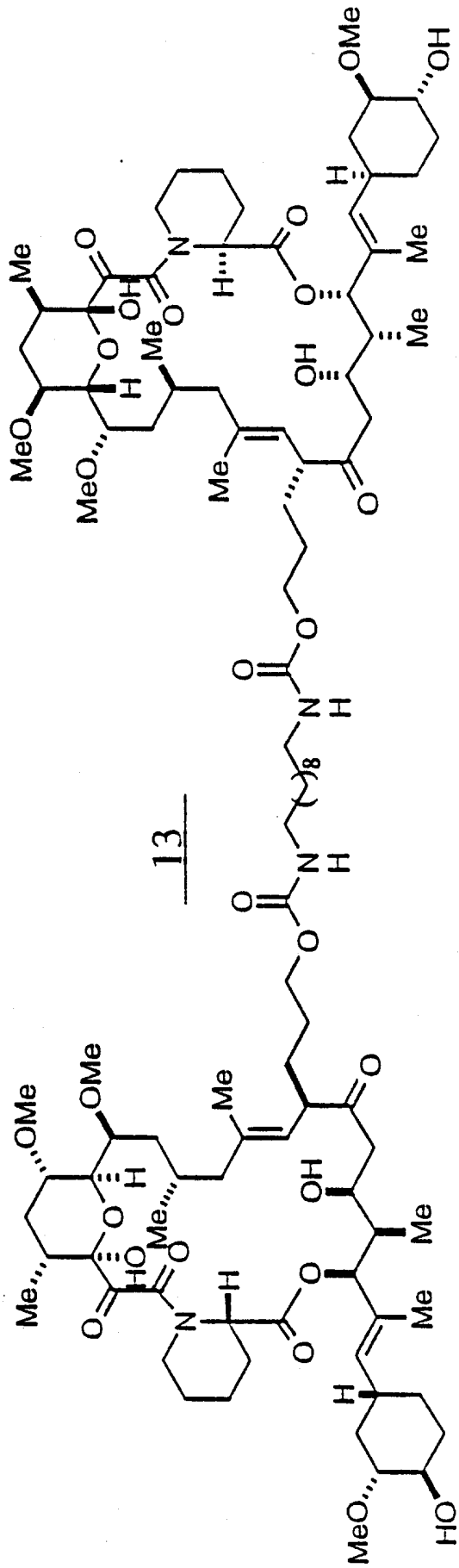
č.j.
71462
DOŠLO
10. XI. 95
ÚŘAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



OBR. 9 A

nátr.list

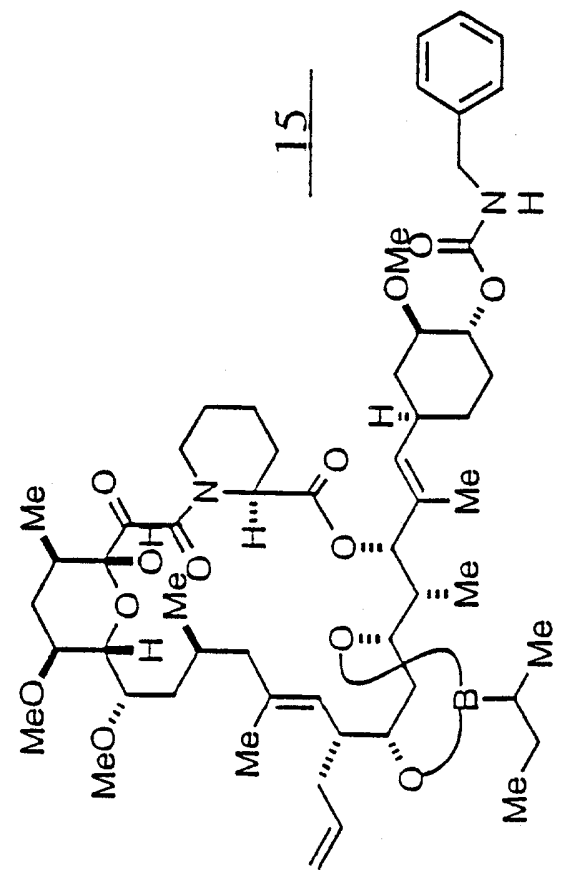
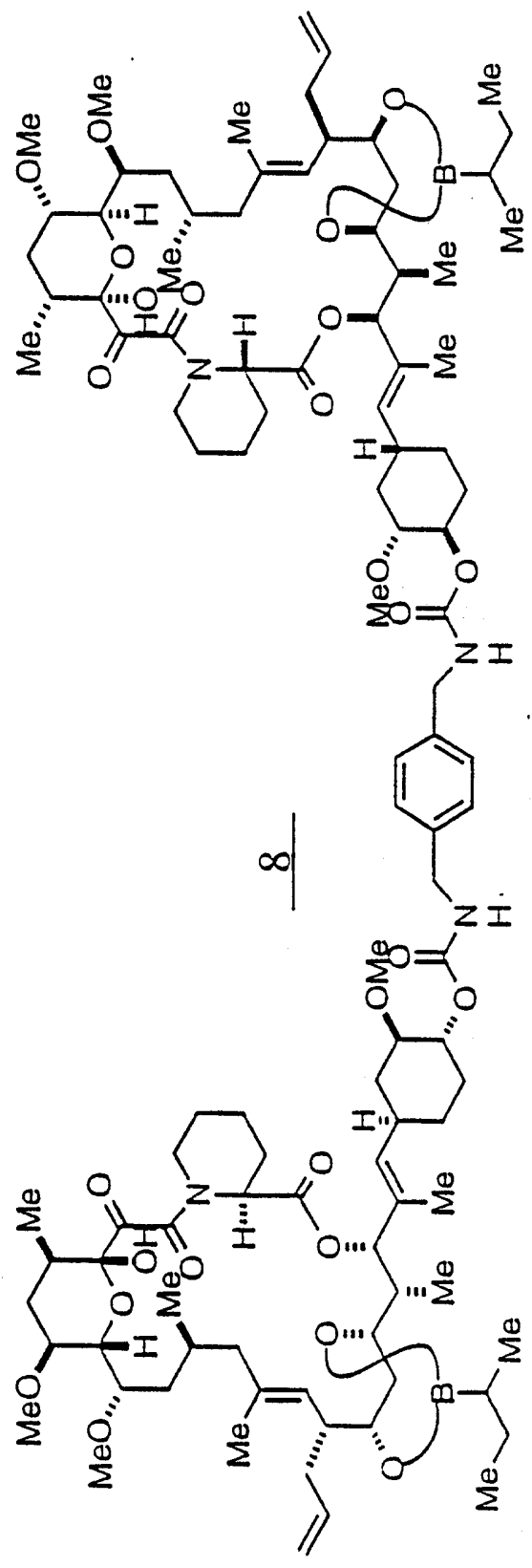
2. j. 7 1 1 2
00510
10. XI. 95
URAD
PRŮMYSL. OVĚHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



OBR. 9 B

nár. list

č. j.	0 7 1 4 6 2
DOŠLO	
10. XI 95	
UŘAD PRŮMYSL. VĚHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	



OBR. 9 C

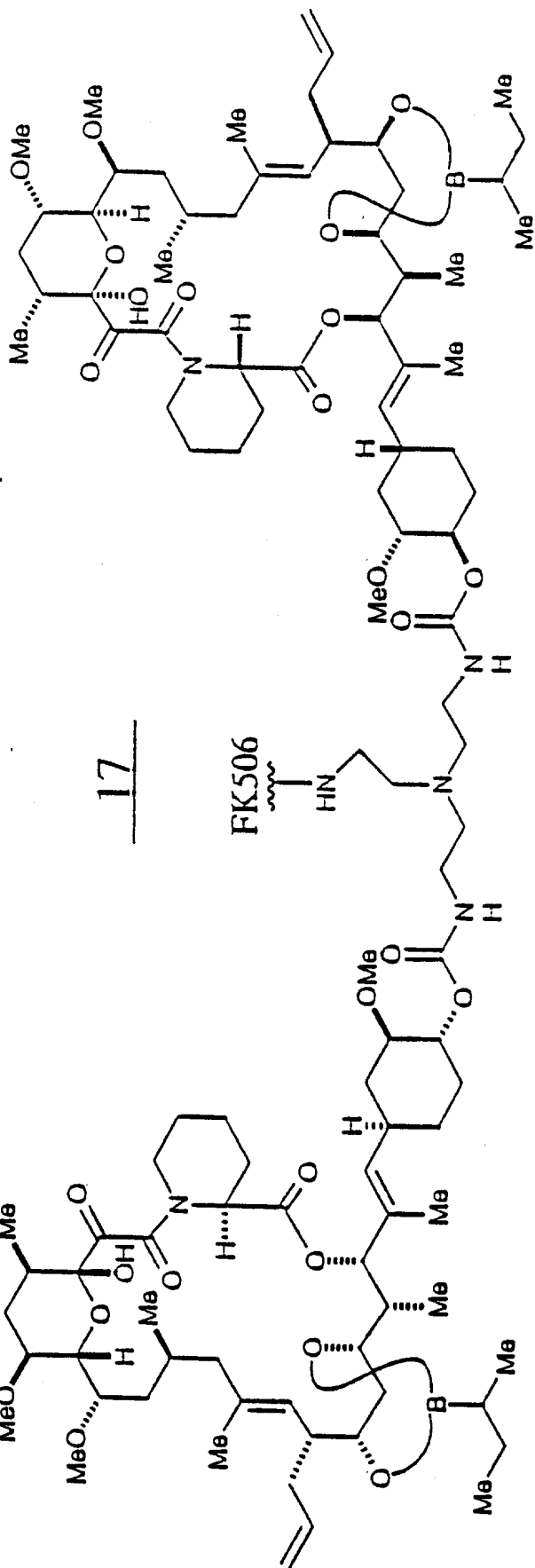
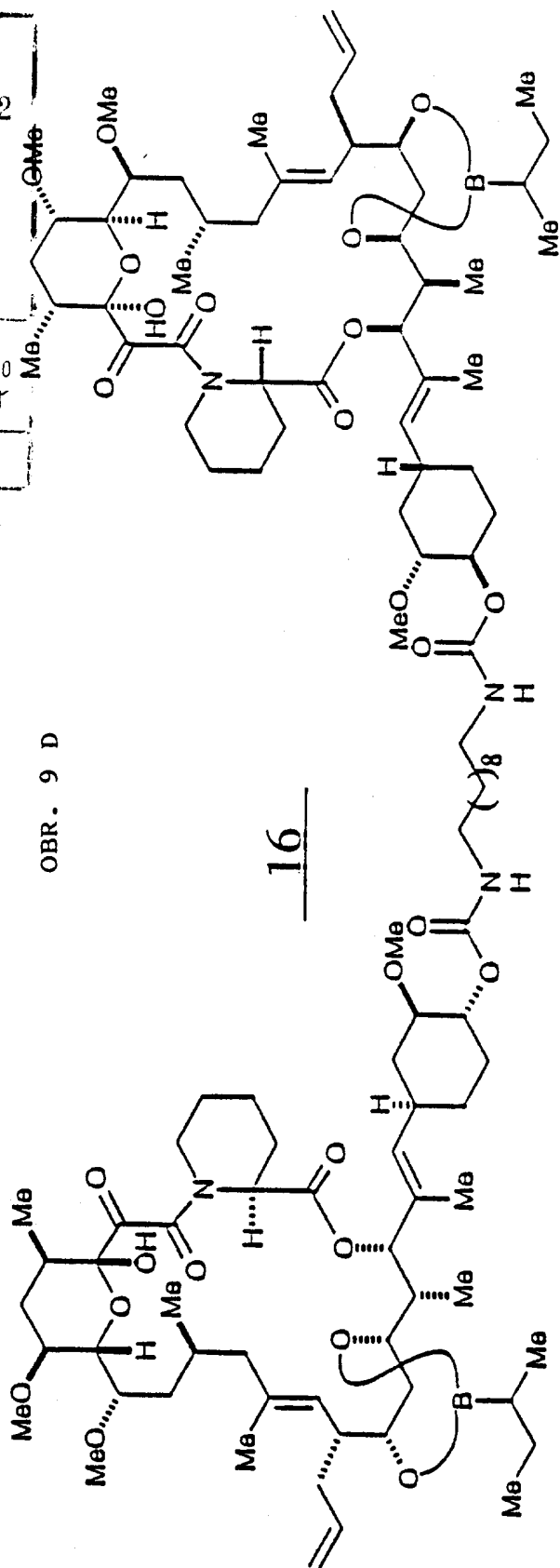
náhr. list

1081-95

č.j.
0 7 1 4 6 2
DOŠLO
10. XI 95
ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

nátr.list

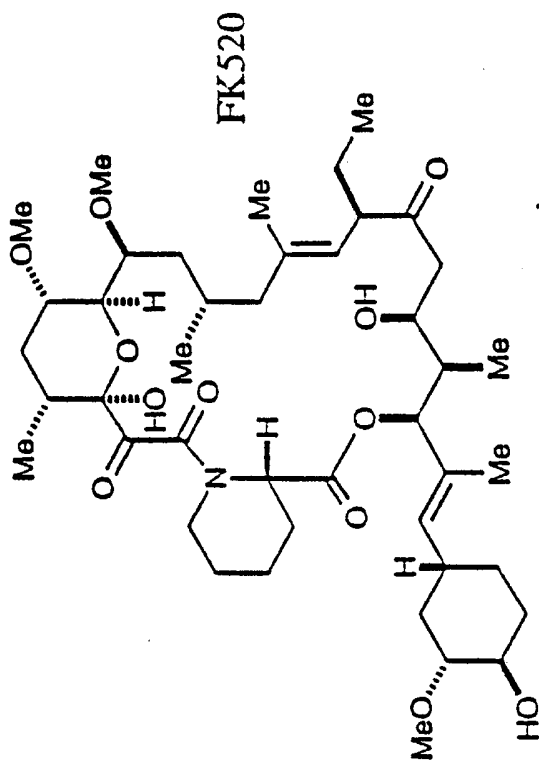
OBR. 9 D



2061-95

náhr. list

č.j.	7 1 4 6 2
Dodáno	10. XI. 95
UŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	

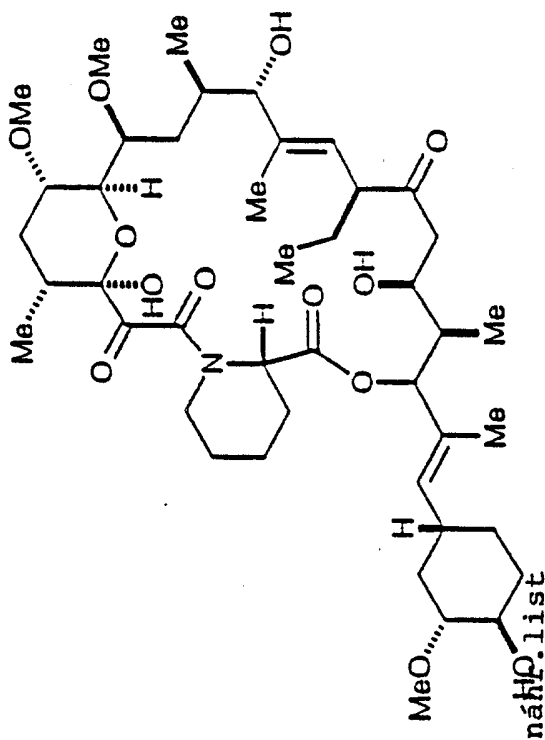


L-selectride



OBR. 10 A

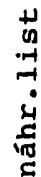
SeO₂



Schema 1

náhr. list

č.j.
7 1 1 6 2
DOŠLO
10. XI. 95
URAD
PRŮMYŠLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

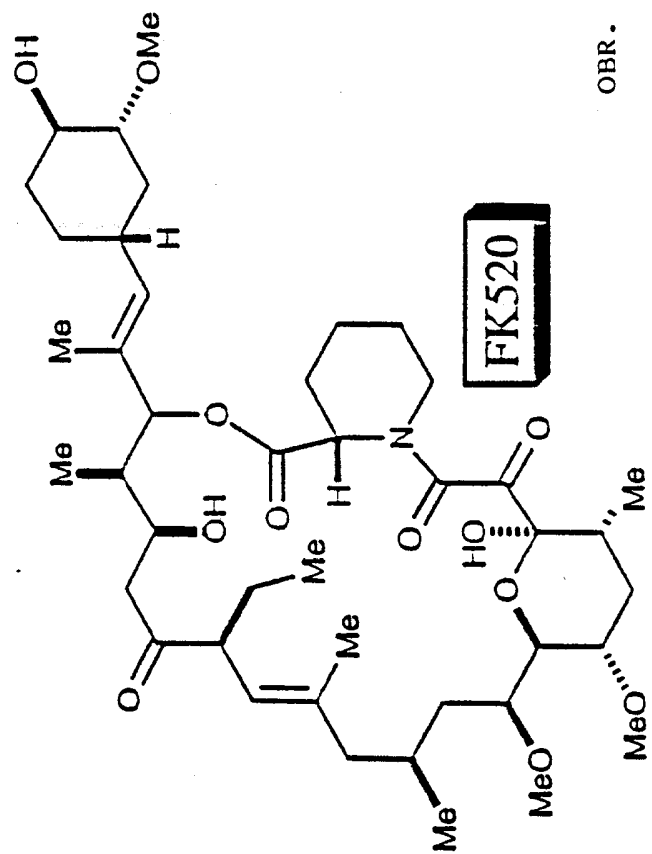


Příklady linkerů viz schema 2

2081-95

náhr.líst

OBR. 11 A



TBS-OTf



č.j.	0 7 1 4 6 2
DOŠLO	
10. XI 95	
URAD	
PRŮMYSLOVÉHO	
VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

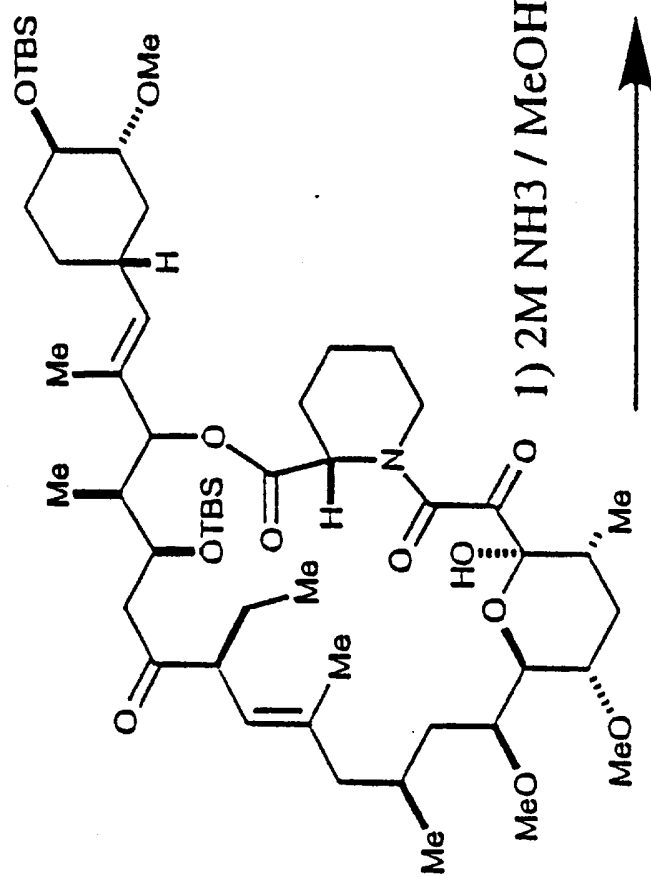
U RAD
OMYSLOVEHO
ASTINICTIV
IL.

56 IX 01

01500

29 1 12

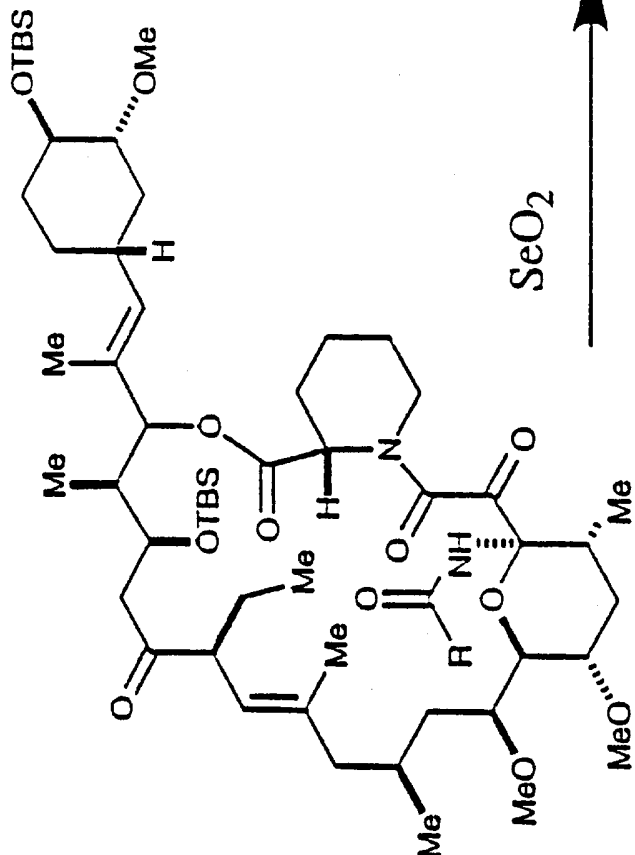
12



1) 2M NH₃ / MeOH



2) kys. mravenčí/acetanhydrid
nebo acetanhydrid



SeO₂



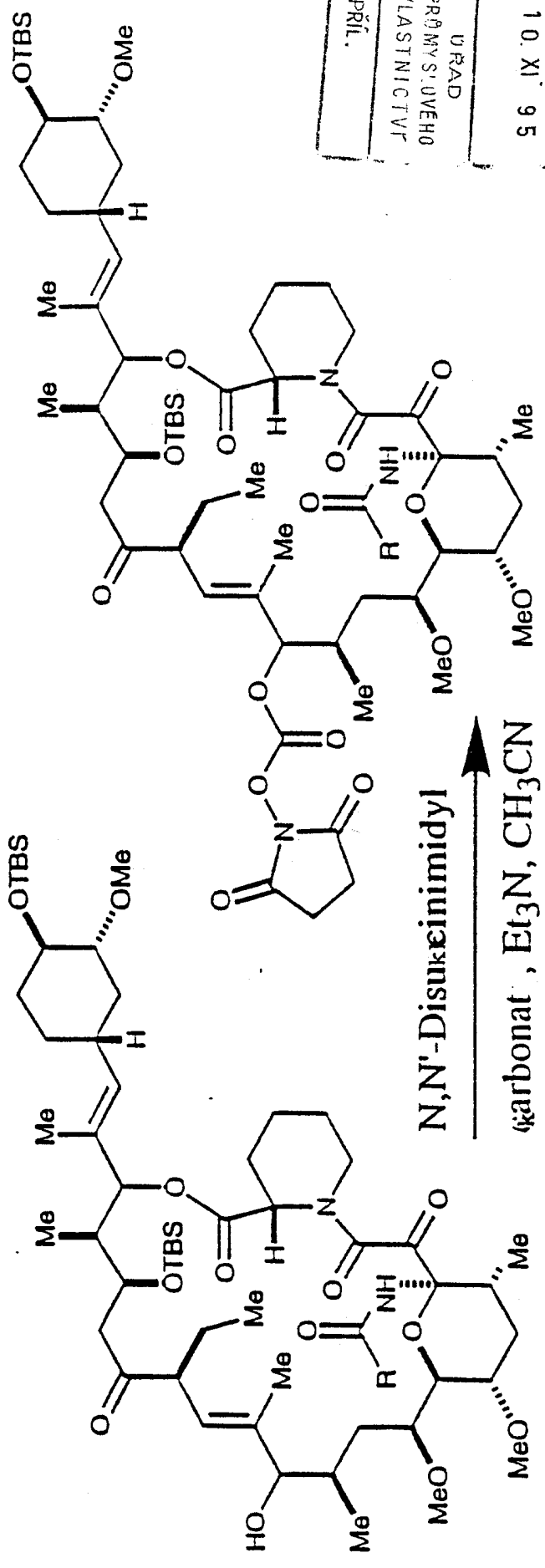
Lit ref: N.H. Sigal &
F.J. Dumont, Ann. Rev.
Immunol. p519 1992

OBR. 11 B

náhr.list

2081-91

č.j.	7 1 4 6 2
DOŠLO	
10. XI. 95	
UŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

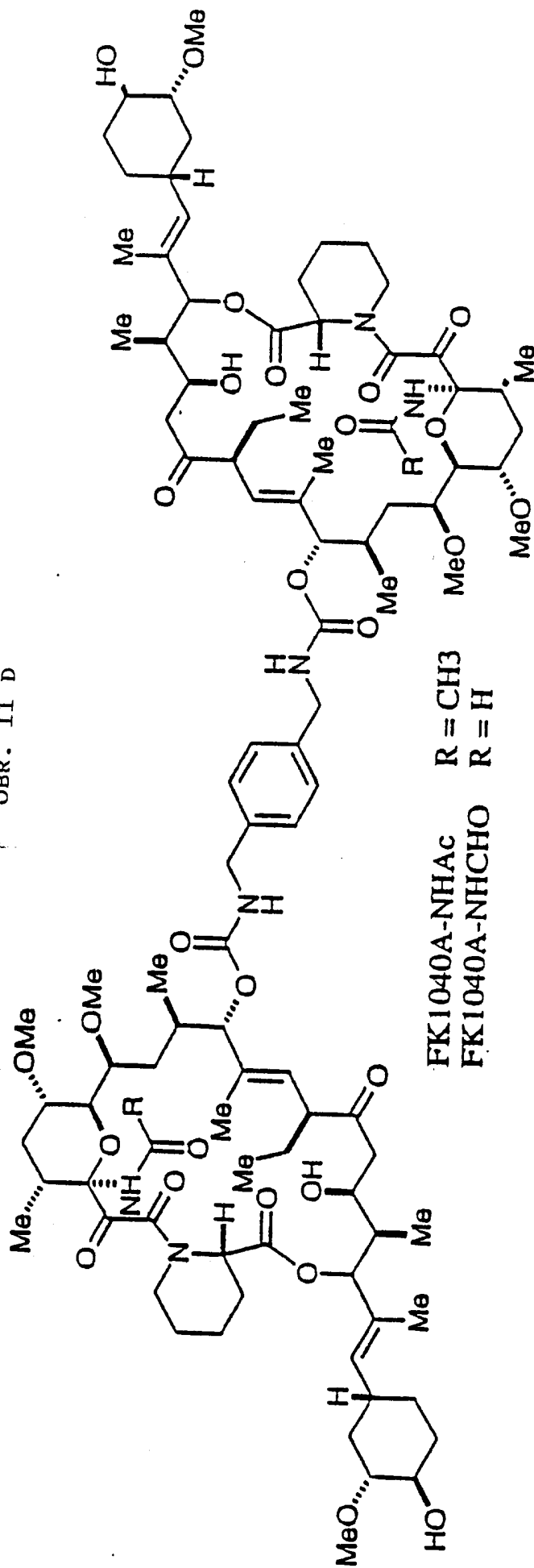


OBR. 11 C

náhr. list

2001-98

náhr. list



OBR. 11 D

č.j.

071162

došlo

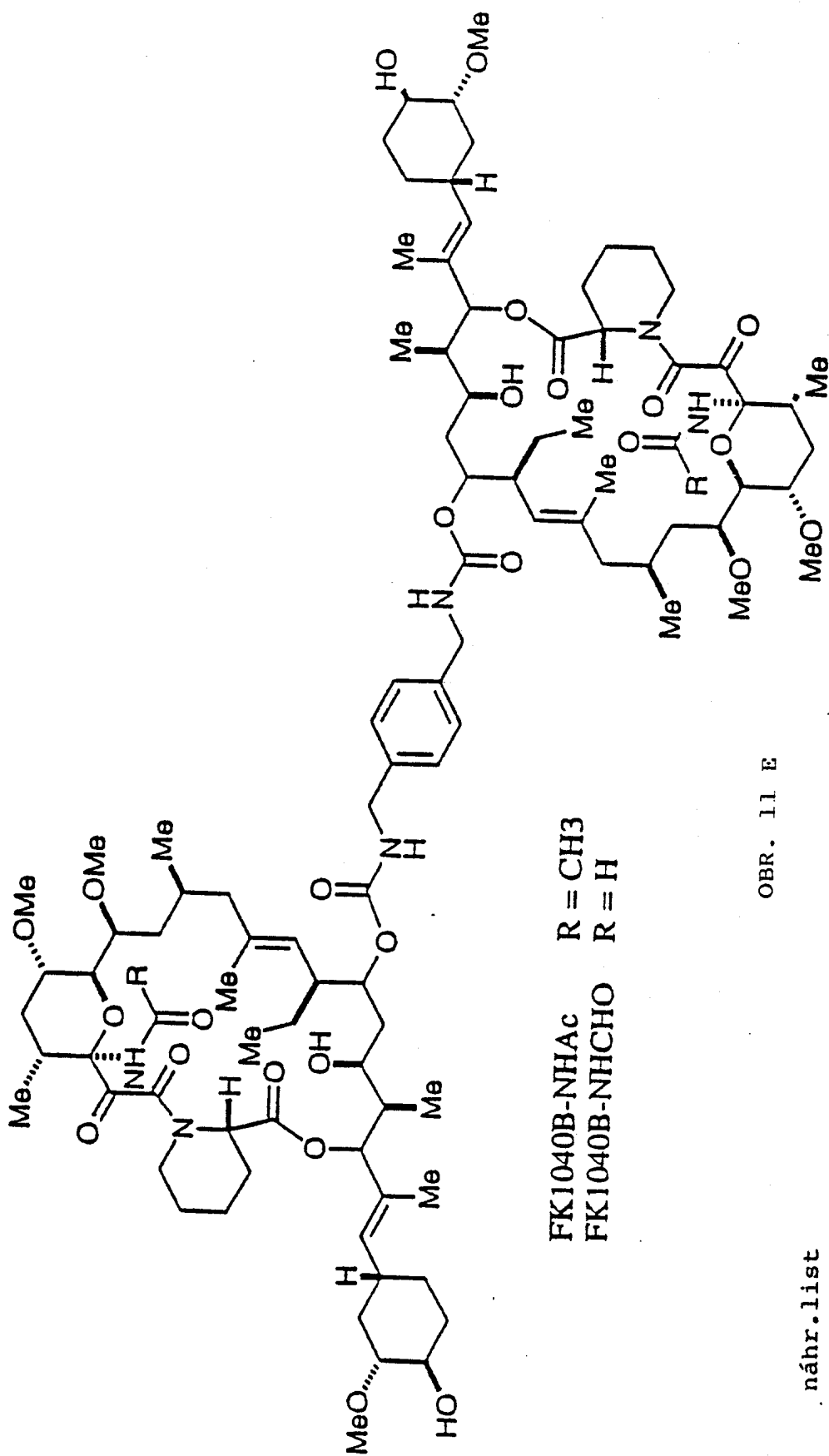
10. XI. 95

URAD

PRŮMYSLOVÉHO
 /LASTNICTVÍ

Příl

č.j.	071462
DOŠLO	10. XI. 95
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	

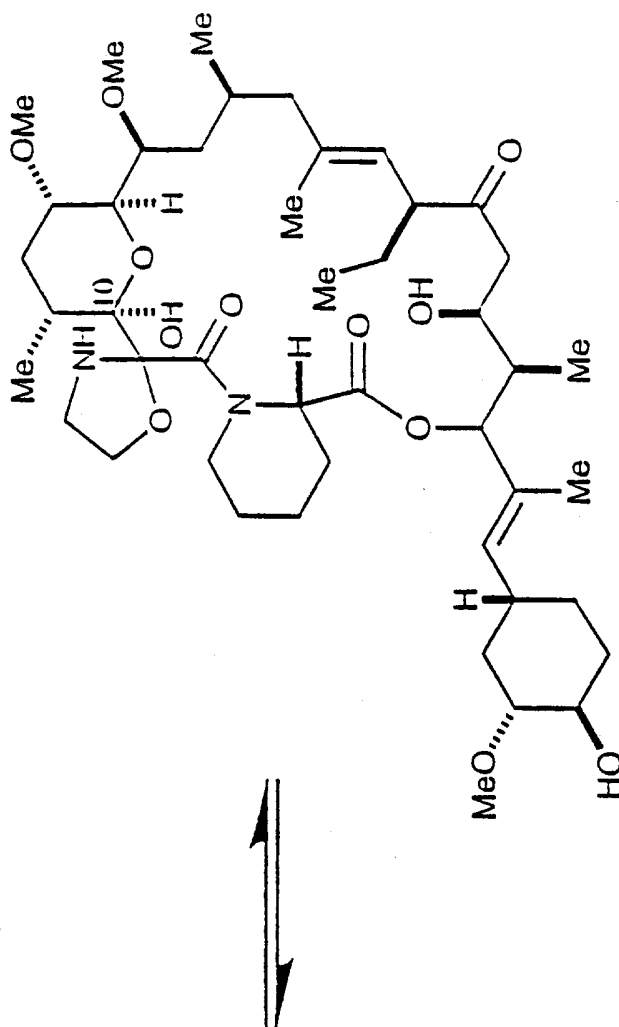


OBR. 11 E

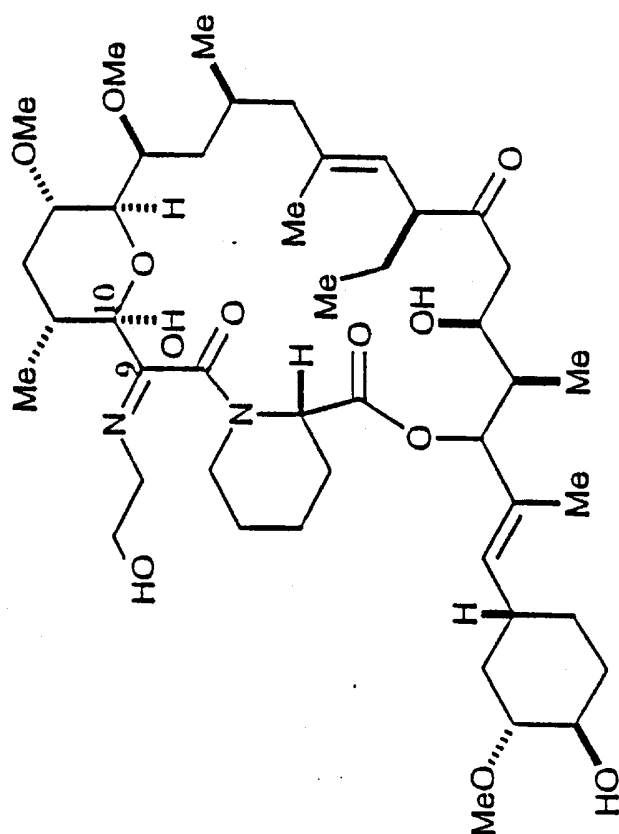
náhr. list

961-95

č.j.
071462
DOŠLO
10. XI. 95
ÚRAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



OBR. 11 F



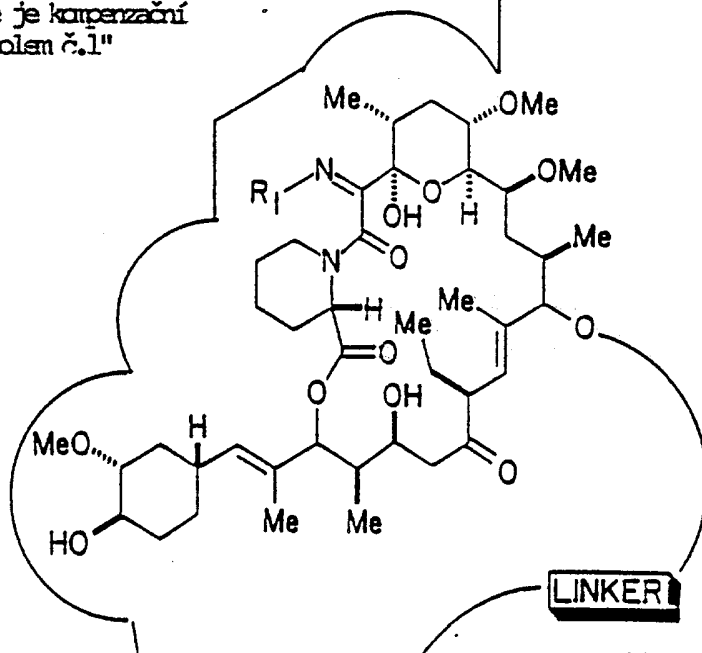
náhr. list

2081-9.

č.j.
0 7 1 4 6 2
DOŠLO
10. XI. 95
ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

FKBP mutant #1

mutace je kompenzační
s "hibolem č.1"

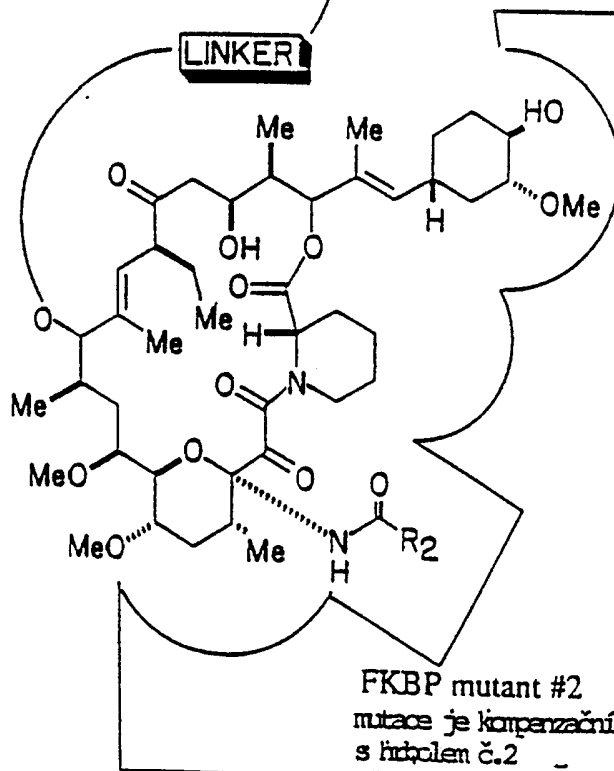


Pozn.:

Hibol č.1 brání vazbě k
wt FKBP12 a k mutantu č.2

Hibol č.2 brání vazbě k
wt FKBP12 a k
mutantu č.1

OBR. 12



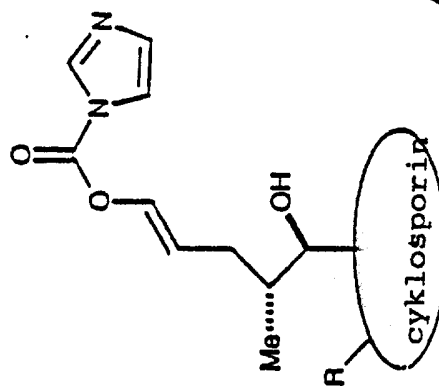
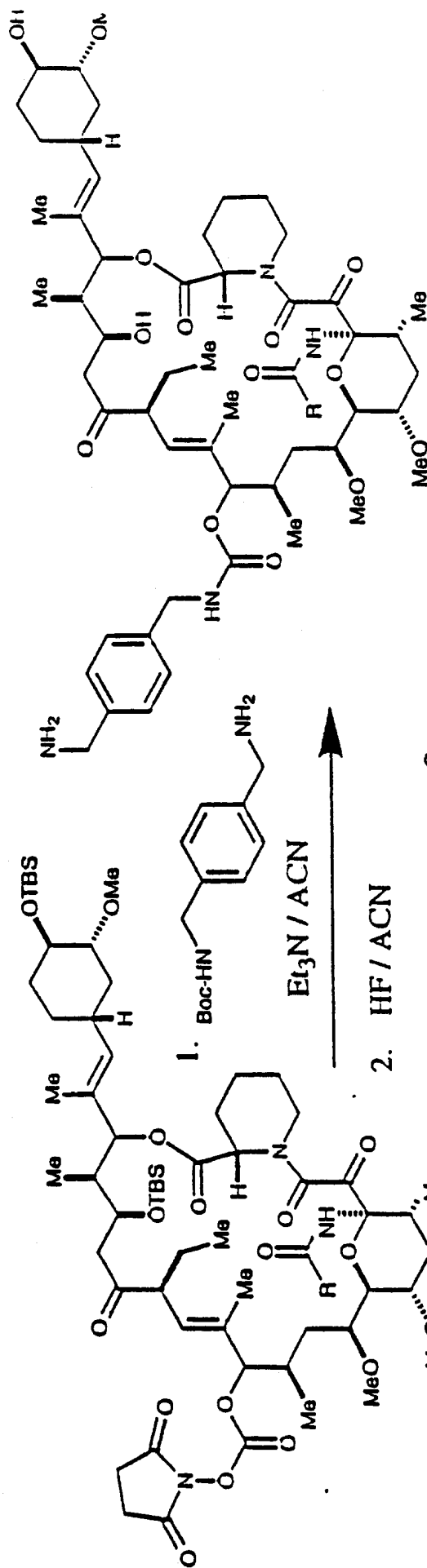
FKBP mutant #2
mutace je kompenzační
s hibolem č.2

náhr.list

2014-95

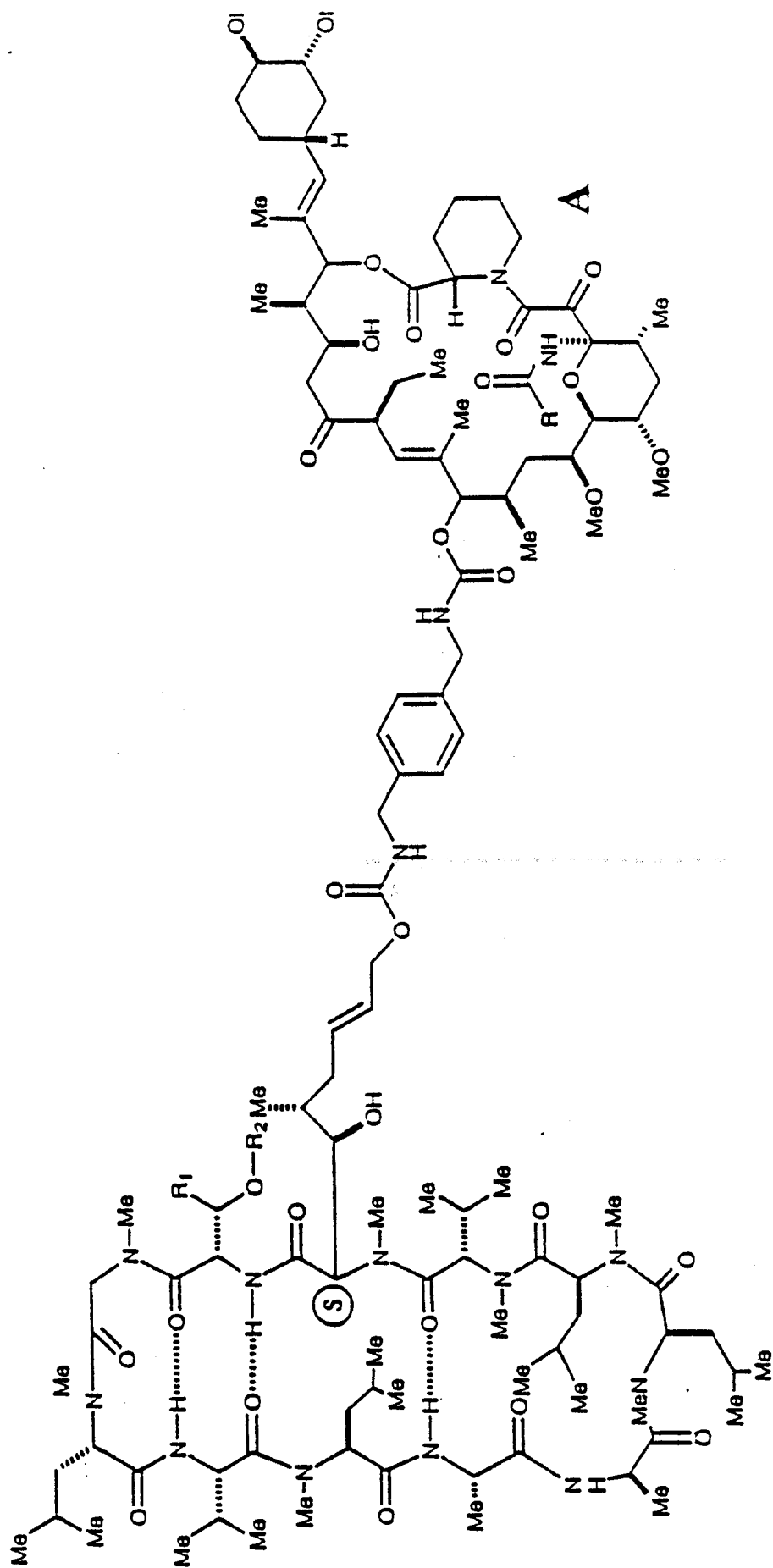
č.j.
071462
DOŠLO
10. XI. 95
ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

Et₃N / ACN



OBR. 13 A

náhr. list



náhr. list

OBR. 13 B

2081-95

č.j.

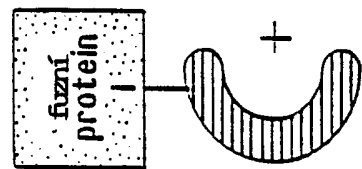
071462

DOŠLO

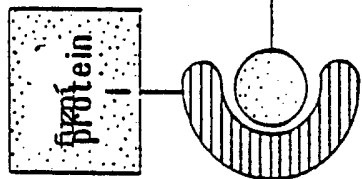
10. XI. 95

ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

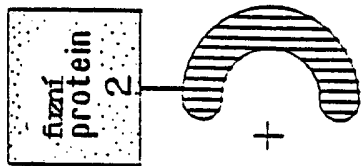
PŘÍL.



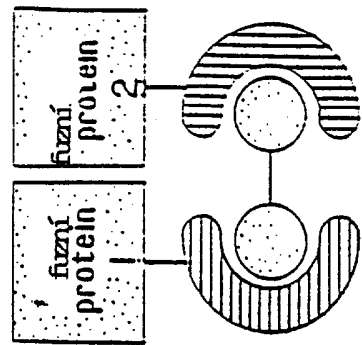
Immunophilin
/fuzní
protein/



dimerní
ligand
(HED/
HOD)



1:1 komplex:
modifikovaná efektorová
doména prání vazbě ke kalcineurin



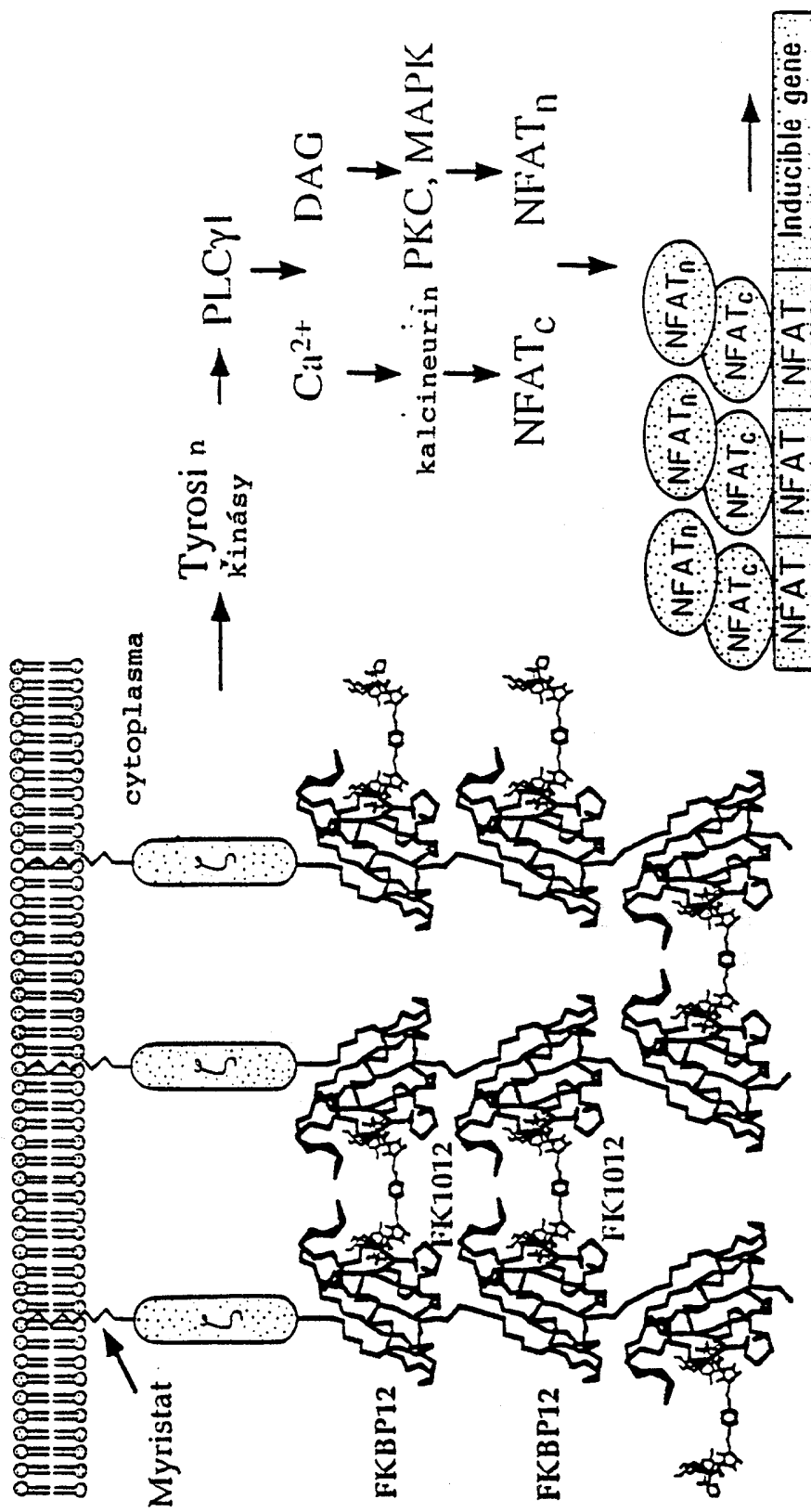
2:1 komplex:
ligandem induk.
proteinová dimerizace

OBR. 14

náhr.list

2081-95

č.j.
0 7 1 4 6 2
DOŠLO
10. XI. 95
ÚŘAD PRŮMYSLÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

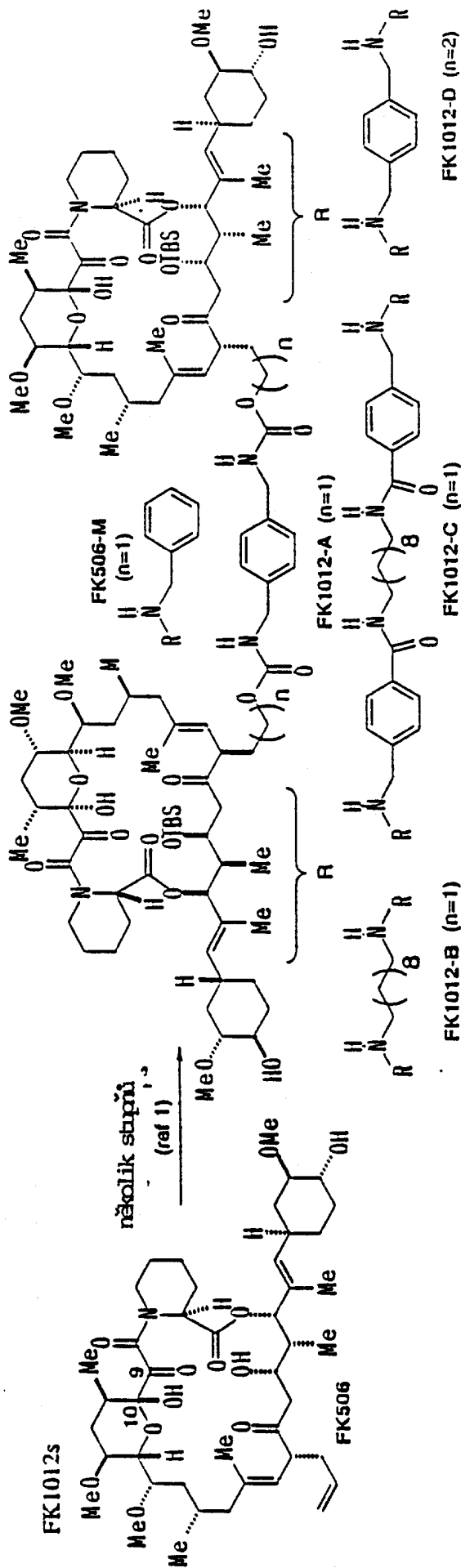


OBR. 15

náhr.list

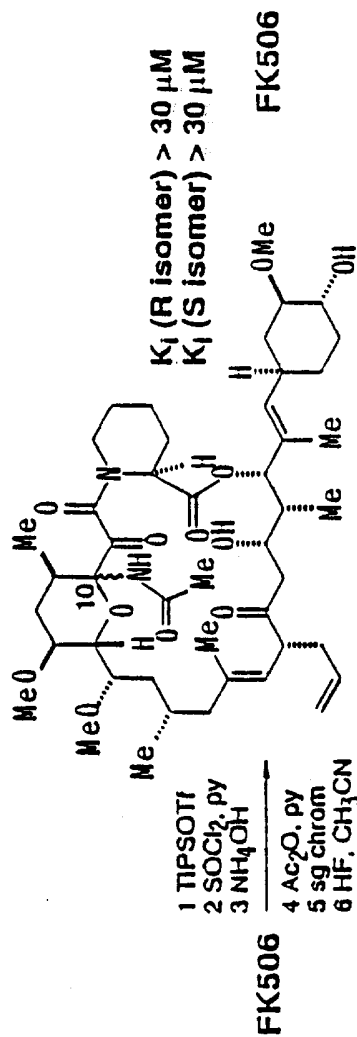
1-28

č. j.
0 7 1 4 6 2
DOŠLO
1 0. XI 9 5
ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



OBR. 16 A

FK506 Monomer s Cl₂ bólem



OBR. 16 B

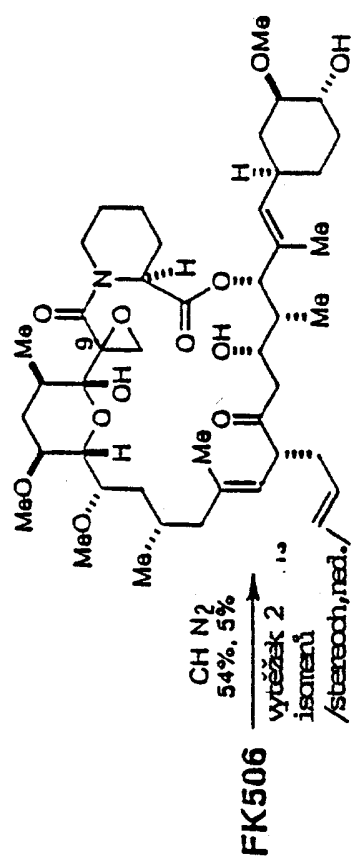
2061-95

č. j.
0 7 1 4 6 2
DOŠLO
10. XI 95
ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

2061-91

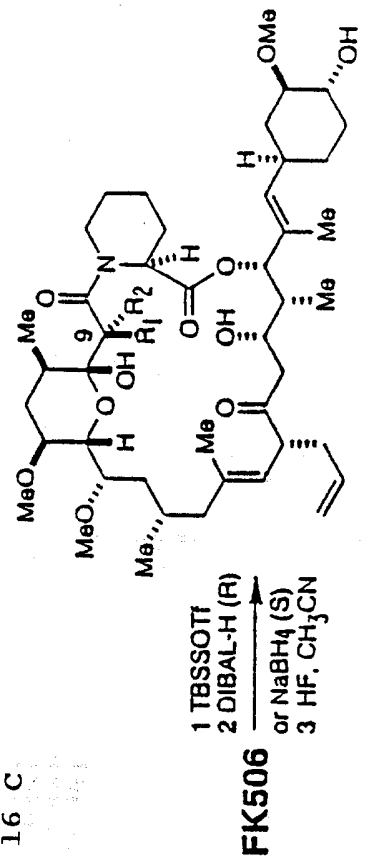
č.j.	0 7 1 4 6 2
00ŠLO	
10. XI. 95	
URAD	
PRŮMYŠLOVÉHO	
VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

FK506 isomer s C9 hrdlem



nátr. list

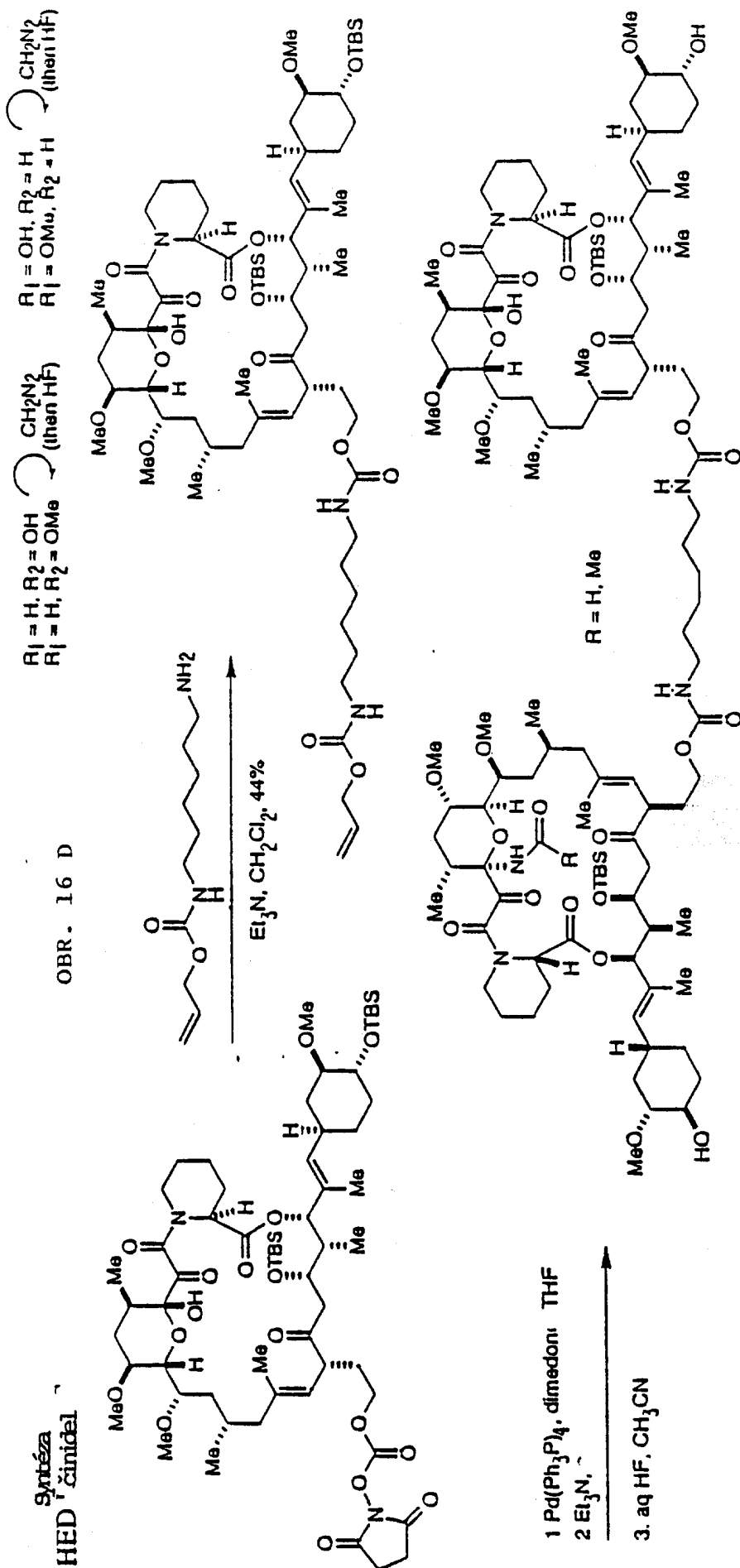
OBR. 16 C



2061-95

Syntéza
HED činidel

OBR. 16 D



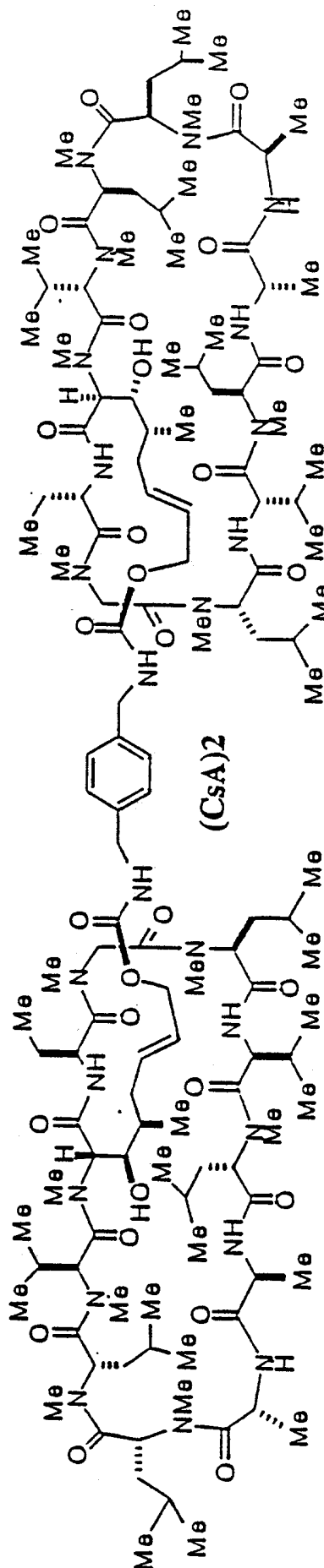
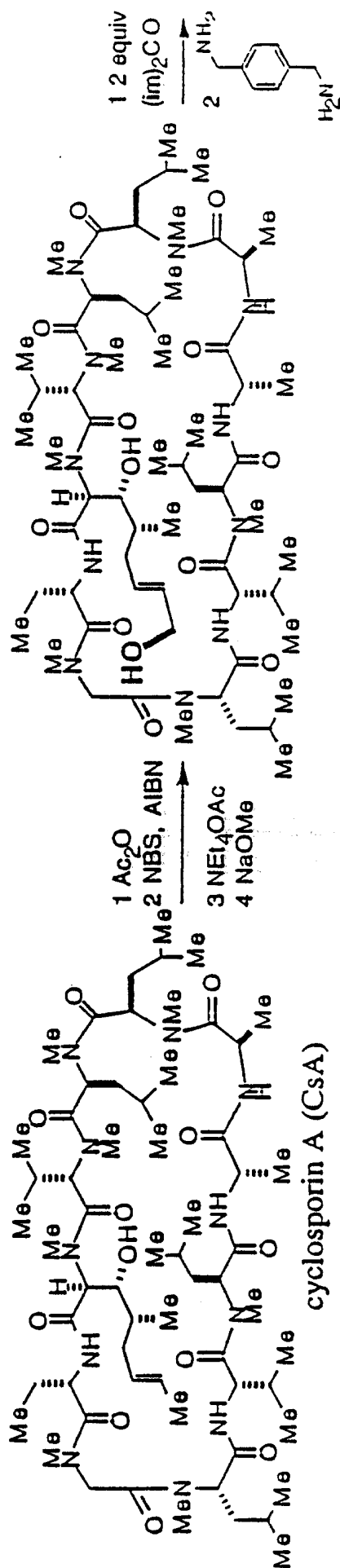
nátr.list

č.j.
071462
DOŠLO
10. XI. 95
ÚŘAD PRŮMYSLUVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

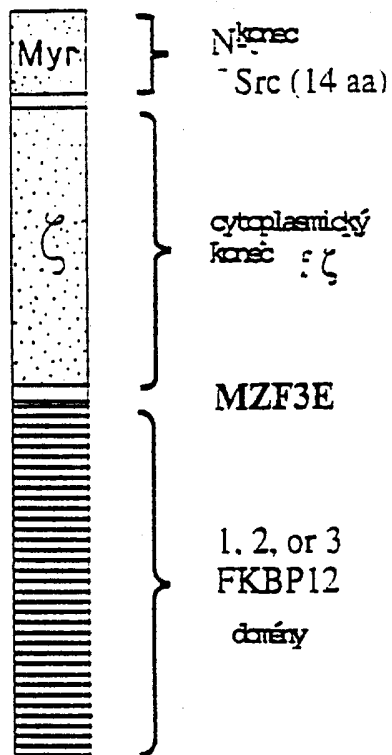
PŘÍL.

OBR. 17

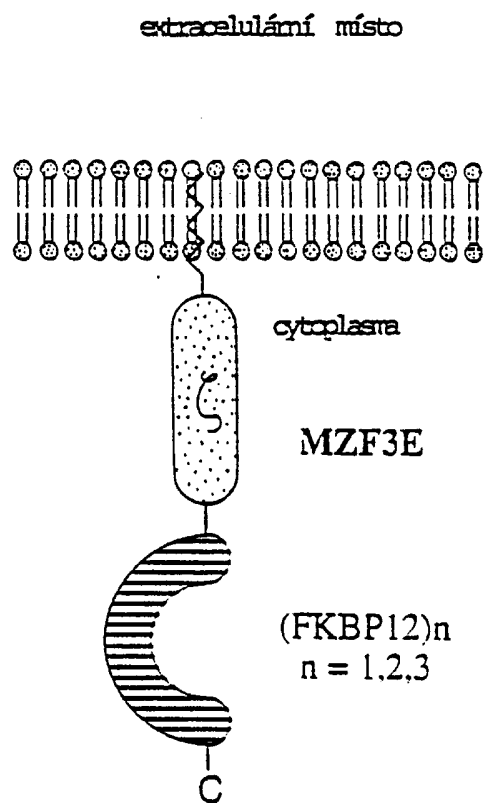
nähr.list



č.j.	7 1 4 6 2
DOŠLO	10. XI. 95
URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	



OBR. 18 A



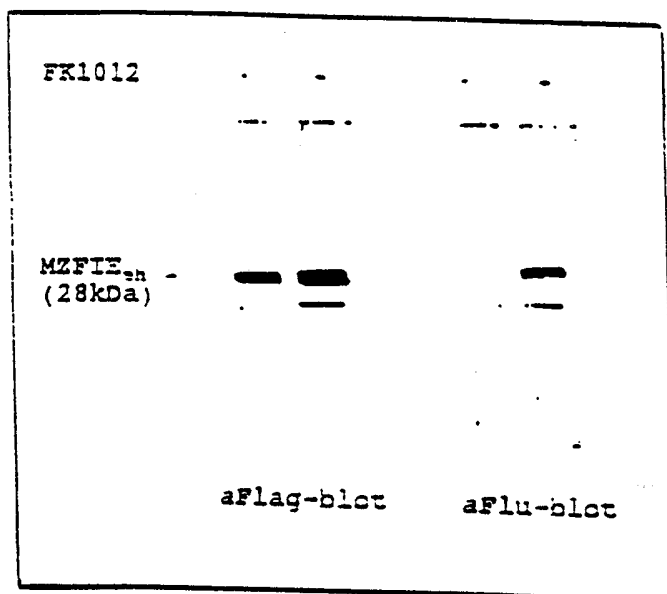
OBR. 18 B

návr.list

2061-95

nřr.list

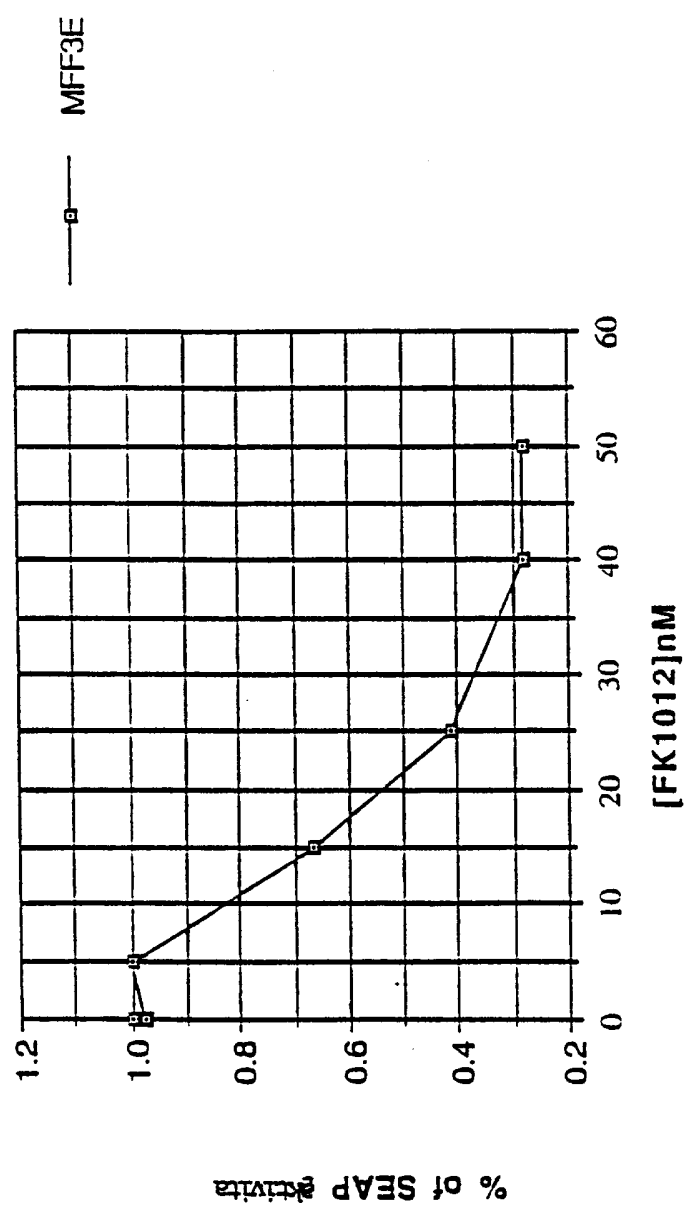
č.j.	0 7 1 4 6 2
DOŠLO	
10. XI. 95	
URAD	
PRŮMYSL. OVEHO	
VLASTNICTVÍ	
Příl.	



OBR. 19

2001-95

č.j.	71462
DOŠLO	
10. XI. 95	
URAD	
PRŮMYSLOVÉHO	
VLASTNICTVÍ	
PŘÍL.	

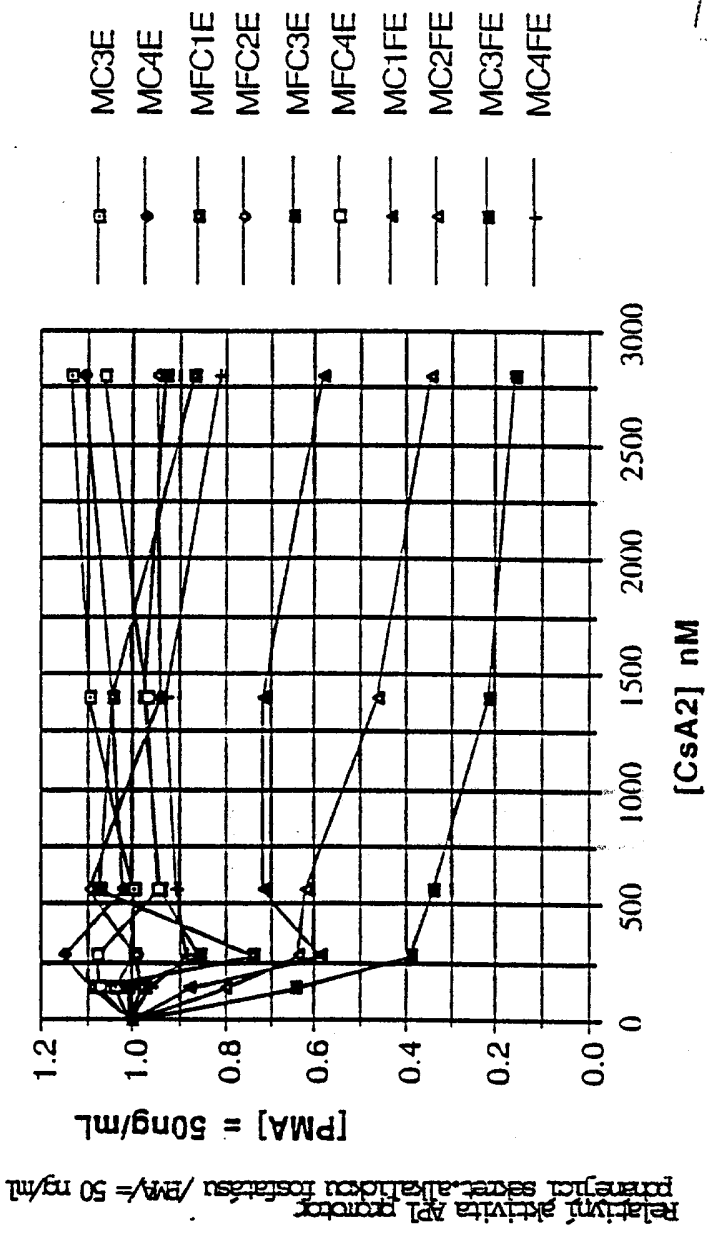


OBR. 20

nár.list

2014-9-

č.j.	291124
DOŠLO	10.XI.95
URAD	PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ	PRŮMYSLOVÉHO
PRŮMYSLOVÉHO	PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ	PRŮMYSLOVÉHO
PRŮMYSLOVÉHO	PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ	PRŮMYSLOVÉHO



OBR. 21 A

nár.list

LD50 Jurkat
relativní
proteinová
exprese

OBR. 21 B

MFF3E	Myr	Fas	FKBP	FKBP	Ep	15 nM	+		
MFC1E	Myr	Fas	CypC	Ep		NA	-		
MFC2E	Myr	Fas	CypC	CypC	Ep	NA	-		
MFC3E	Myr	Fas	CypC	CypC	CypC	Ep	NA	-	
MFC4E	Myr	Fas	CypC	CypC	CypC	CypC	Ep	NA	-
MC1FE	Myr	CypC	Fas	Ep		500 nM	+		
MC2FE	Myr	CypC	CypC	Fas	Ep	300 nM	+		
MC3FE	Myr	CypC	CypC	CypC	Fas	Ep	200 nM	+	
MC4FE	Myr	CypC	CypC	CypC	CypC	Fas	Ep	NA	+/-
MC3E	Myr	CypC	CypC	CypC	Ep	>30 uM	+++		
MC4E	Myr	CypC	CypC	CypC	CypC	Ep	>30 uM	++++	

OBR. 21 C

nár.list

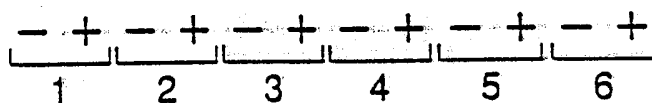
Figure 21B/23

U RAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PRÍL.
56 IX 01	01500
071120	791120
1-2	1-2

2051-90

201-9

č.j.	7 1 4 6 2
DOŠLO	
10. XI. 95	
ÚRAD PRŮMYSLového VLAŠTNICTVÍ	
Příl.	



OBR. 22

. nár.list

201-9

URAD
PRŮMYŠLOVÉHO
VLASTNICTVÍ
PRÍL.

10. XI. 95

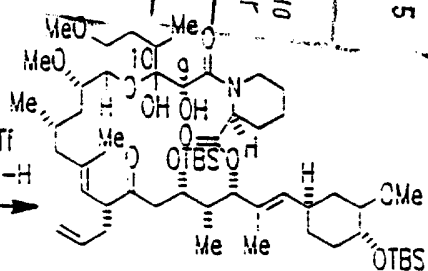
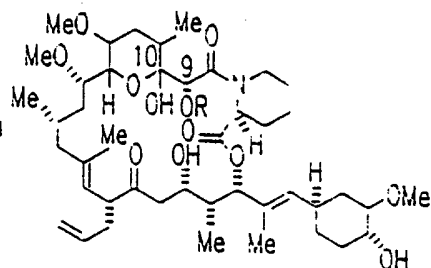
DOŠLO

7 1 4 6 2

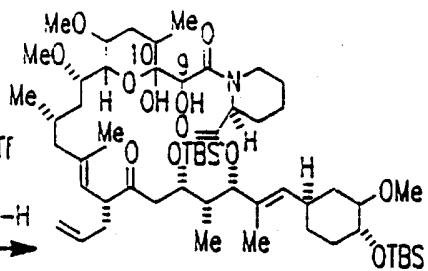
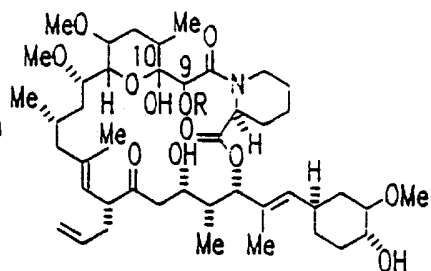
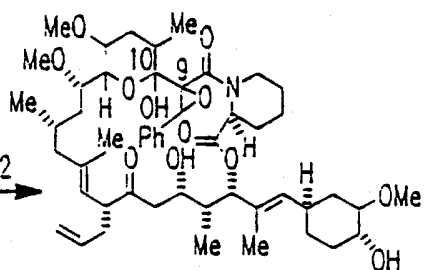
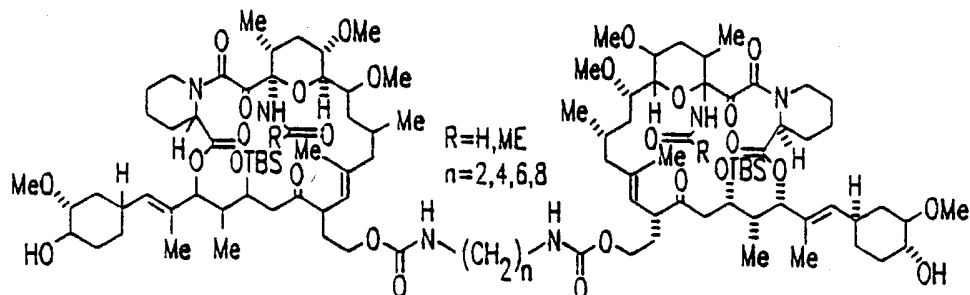
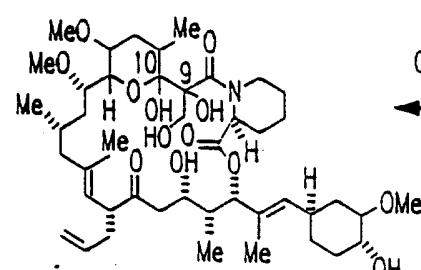
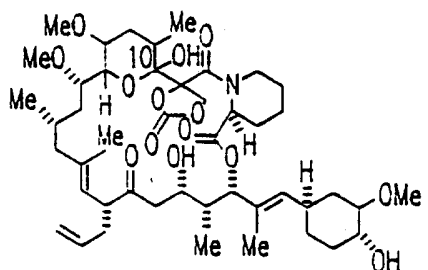
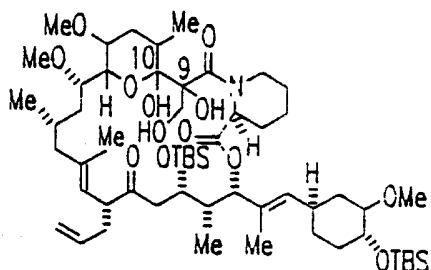
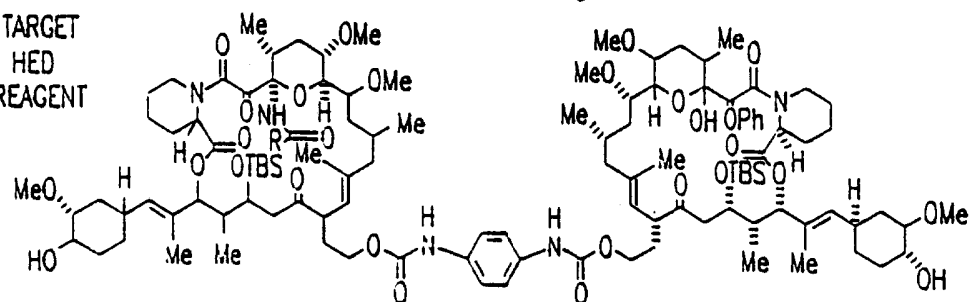
č.j.

1 TBSOTf
2 DIBAL-H

FK506

1 PhCH₂N₂
2 HF, CH₃CN
R=CH₂Ph1 Ph₃Bi(OAc)₂
2 HF, CH₃CN
R=Ph1 TBSOTf
2 NaBH
3 DIBAL-H

FK506

1 PhCH₂N₂
2 HF, CH₃CN
R=CH₂Ph1 Ph₃Bi(OAc)₂
2 HF, CH₃CN
R=PhPhCHN₂
FK5061 TBSOTf
2 CH₂N₂
3 TFAOH
FK506
1 CO(im)₂
2 HF, CH₃CNTARGET
HED
REAGENT

OBR. 23

narr.list