(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 964536 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 964536

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/67 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **11.05.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.11.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **09.01.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **11.05.1995 PCT/US1995/006045**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

13.05.1994 US 243391 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Transkaryotic Therapies Inc., 195 Albany Street, Cambridge, MA 02139, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Treco, Douglas A., Arlington, MA 02174, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Heartlein, Michael W., Boxborough, MA 01719, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Selden, Richard F., Wellesley, MA 02181, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

DNA-rakenne homologisen rekombinaation suorittamiseksi ja sen käyttöjä

DNA-struktur för genomförande av homolog rekombination och användningar därav

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Keksintö koskee rakenteita, jotka sisältävät: a) kohdentavan sekvenssin; b) säätelysekvenssin; c) eksonin; ja d) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan. Keksintö koskee lisäksi menetelmää proteiinin tuottamiseksi in vitro tai in vivo, joka sisältää yllä kuvatun rakenteen homologisen rekombinaation solussa. Sitten homologisesti rekombinanttia solua pidetään yllä olosuhteissa, jotka sallivat transkription ja translaation, joka johtaa proteiinin ekspressioon. Esillä oleva keksintö sisältää lisäksi homologisesti rekombinantit solut sisältäen primaariset, sekundaariset tai kuolemattomiksi tehdyt selkärankaisen solut, menetelmät solujen valmistamiseksi, menetelmät homologiseen rekombinaatioon fuusiogeenien tuottamiseksi, menetelmät geenikespression muuttamiseksi soluissa ja menetelmät proteiinin valmistamiseksi solussa käyttäen keksinnön mukaisia rakenteita.
Uppfinningen avser strukturer, som omfattar a) en målsekvens, b) en reglerande sekvens; c) en exon; och d) ett donorsäte för oparig skarvning. Uppfinningen avser dessutom ett sätt för producering av protein in vitro eller in vivo, som omfattar den homologa rekombinationen av den ovan beskrivna strukturen i en cell. Förhållandena för den homologt rekombinerade cellen upprätthålles sedan så, att transkription och translation kan ske, vilket resulterar i expression av proteinet. Föreliggande uppfinning avser dessutom homologt rekombinerade celler inkluderande primära, sekundära och immortaliserade celler hos ryggradsdjur, sätt för framställning av cellerna, sätt för homolog rekombination för producering av fusionsceller, sätt för ändring av genexpressionen i cellerna och sätt för framställning av protein i en cell genom användande av strukturerna enligt uppfinningen.

DNA-rakenne homologisen rekombinaation suorittamiseksi ja sen käyttöjä

Keksinnön tausta

Tämänhetkiset lähestymistavat taudin hoitamiseksi antamalla terapeuttisia proteiineja sisältävät terapeuttisten proteiinien in vitro tuoton tavanomaista farmaseuttista antoa varten (esim. suonensisäinen, ihonalainen tai lihaksensisäisäinen injektio), ja viime aikoina geeniterapian.

Terapeuttisesti mielenkiintoiset proteiinit tuotetaan yleensä viemällä sopiviin soluihin sisälle ulkopuolinen DNA, joka koodittaa proteiinia, jolla on toivottu terapeuttinen mielenkiinto. Ulkopuolinen DNA, joka koodittaa haluttua terapeuttista proteiinia, viedään sisään esimerkiksi sellaisiin soluihin, kuten kuolemattomiksi tehtyihin soluihin, vektorissa, kuten plasmidissa, josta koooditettava proteiini ekspressoituu. Lisäksi on ehdotettu, että endogeenisiä solugeenejä ja niiden ekspressiota voidaan modifioida geenikohdennuksella. Katso esimerkiksi US-patentti 5 272 071, julkaisut WO 91/06 666, WO 91/06 667 ja WO 90/11 354.

Tällä hetkellä käytettävissä olevissa lähestymistavoissa geeniterapiaa varten käytetään infektiivisiä vektoreita, kuten retrovirusvektoreita, jotka sisältävät ekspressoitavan geneettisen materiaalin. Sellaisilla lähestymistavoilla on rajoituksensa, kuten mahdollisuus muodostaa replikaatioon kykenevä virus vektorituoton aikana; rekombinaatio terapeuttisen viruksen ja endogeenisten retrovirusgenomien välillä, joka muodostaa mahdollisesti infektiivisiä viruksia, joilla on uudet soluspesifisyydet, isäntäkirjo tai kohonnut virulenssi ja sytotoksisuus; riippumaton integraatio suuriin solumääriin, joka nostaa kasvaimen muodostavan insertion riskiä; retroviruksen rajoittunut kloonauskapasiteetti (joka rajoittaa terapeutti-

sia sovelluksia) ja halutun tuotteen lyhytaikainen in vivo ekspressio. Parempi lähestymistapa geenituotteiden muodostamiseksi, erityisesti sellainen, jossa vältetään tällä hetkellä käytettävissä olevien menetelmien rajoitukset ja riskit, olisi arvokas

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö koskee parannettuja menetelmiä terapeuttisten proteiinien in vitro tuottoa varten ja terapeuttisten proteiinien tuottamiseksi ja antamiseksi geeniterapialla. Esillä olevassa menetelmässä solussa olevan halutun kohdennetun geenin (se on, haluttu endogeeninen solugeeni) ekspressiota muutetaan homologisella rekombinaatiolla solun genomin ennalta valitussa kohdassa viemällä sisään DNA, joka sisältää ainakin säätelysekvenssin, eksonin ja silmukoinnin luovuttajakohdan. Nämä komponentit viedään sisään kromosomin DNA:han (genomiin) niin, että se johtaa vaikutukseltaan uuden transkriptioyksikön muodostumiseen (jossa DNA-rakenteessa läsnä olevat säätelysekvenssi, eksoni ja silmukoinnin luovuttajakohta on toiminnallisesti liitetty endogeeniseen geeniin). Kun nämä komponentit viedään sisään kromosomin DNA:han, on lopputulos se, että halutun endogeenisen geenin ekspressio muuttuu.

Muuttunut geenieksPressio tässä käytettynä sisältää sellaisen geenin aktivaation (tai sen, että se ekspressoituu), joka on normaalisti hiljainen (ekspressoitumaton), saadussa solussa, sellaisen geenin ekspression lisäämisen saadussa solussa, jota ei ekspressoida fysiologisesti merkittävinä tasoina, säätely- tai induktiokuvion muutoksen niin, että se on erilainen kuin solussa tavallisesti, ja sellaisen geenin ekspression alentamisen (sisältäen poiston kokonaan), jota ekspressoidaan solussa tavallisesti.

Esillä oleva keksintö sisältää edelleen DNA-rakenteet, jotka ovat käyttökelpoisia menetelmässä, jossa muutetaan kohdegeenin ekspressiota. DNA-rakenteet sisältävät: (a) kohdentavan sekvenssin; (b) säätelysekvenssin; (c)

eksonin; ja (d) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan. DNA-rakenteen kohdentava sekvenssi ohjaa elementtien (a) - (d) integroitumista solun kohdegeeniin niin, että elementit (b) - (d) liittyvät toiminnallisesti endogeenisen kohdegeenin sekvensseihin. Toisessa suoritustavassa DNA-rakenne sisältää: (a) kohdentavan sekvenssin, (b) säätelysekvenssin, (c) eksonin, (d) silmukoinnin luovuttajakohdan, (e) intronin ja (f) silmukoinnin vastaanottajakohdan, jossa kohdentava sekvenssi ohjaa elementtien (a) - (f) integroitumista niin, että elementit (b) - (f) liittyvät toiminnallisesti endogeeniseen geeniin. Kohdentava sekvenssi on homologinen sille ennalta valitulle kohdalle solun kromosomaalisessa DNA:ssa, jossa homologisen rekombinaation tarkoitetaan tapahtuvan. Rakenteessa eksoni on yleensä säätelysekvenssin 3'-puolella ja silmukoinnin luovuttajakohta on eksonin 3'-puolella.

Seuraava osa toimii kuvaten esillä olevan keksinnön kahta suoritustapaa, joissa ihmisen erytropoietiinigeenin [h(EPO)] ylävirran sekvenssit muutetaan niin, että sallitaan hEPO-geenin ekspressio primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä soluissa, jotka eivät ekspressoi EPO-proteiinia tunnistettavina määrinä niiden transfektoimattomassa tilassa. Suoritustavassa 1 kohdentava rakenne sisältää kaksi kohdentavaa sekvenssiä. Ensimmäinen kohdentava sekvenssi on homologinen sellaisille sekvensseille, jotka sijaitsevat toisen kohdentavan sekvenssin 5'-puolella, ja molemmat sekvenssit sijaitsevat ylävirtaan hEPO-geenin koodittavasta alueesta. Kohdentava rakenne sisältää myös säätelyalueen (mMT-1-promoottorin), eksonin [ihmisen kasvuhormonigeenin (hGH) eksonin 1] ja pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan. Tämän kohdentavan sekvenssin homologisella rekombinaatiolla saatu tuote on esitetty kuviossa 1.

Suoritustavassa 2 kohdentava sekvenssi sisältää myös kaksi kohdentavaa sekvenssiä. Ensimmäinen kohdentava

sekvenssi on homologinen sekvenseille hEPO-geenin endogeenisellä säätelyalueella ja toinen kohdentava sekvenssi on homologinen hEPO-geenin intronille 1. Kohdentava rakenne sisältää myös säätelyalueen (mMT-1-promoottorin), eksonin (hGH-geenin eksonin 1) ja pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan. Tämän kohdentavan rakenteen homologisella rekombinaatiolla saatu tuote on esitetty kuviossa 2.

Näissä kahdessa suoritustavassa kohdentavien tapahtumien tuotteet ovat kimeerisiä transkriptioyksiköitä, jotka muodostavat kypsän mRNA-molekyylin, jossa hGH-geenin ensimmäinen eksoni sijaitsee hEPO-geenin eksonien 2 - 5 ylävirrassa. Transkription, silmukoinnin ja translaation tuote on proteiini, jossa hEPO-signaalipeptidin aminohapot 1 - 4 on korvattu hGH-proteiinin aminohappojäännöksillä 1 - 3. Kaksi suoritustapaa eroavat sekä kohdentavan rakenteen insertoitujen säätelysekvenssien suhteellisten sijaintien että sen spesifisen silmukointikuvion suhteen, jonka täytyy tapahtua lopullisen prosessoidun transkriptin tuottamiseksi.

Keksintö koskee edelleen menetelmää proteiinin tuottamiseksi in vitro tai in vivo, joka sisältää vaiheen, jossa viedään isäntäsolun kromosomaaliseen DNA:han yllä kuvattu rakenne homologisella rekombinaatiolla niin, että tuotetaan homologinen rekombinanttisolu. Homologista rekombinanttisolua pidetään sitten yllä olosuhteissa, jotka sallivat transkription, translaation ja erityksen, joka johtaa halutun proteiinin tuottoon.

Esillä oleva keksintö koskee transfektoituja soluja, kuten transfektoituja primaarisia tai sekundaarisia soluja (se on, ei-kuolemattomia soluja) ja transfektoituja kuolemattomiksi tehtyjä soluja, jotka ovat käyttökelpoisia proteiinien, erityisesti terapeuttisten proteiinien, tuottamiseksi, menetelmiä sellaisten solujen tuottamiseksi, menetelmiä solujen käyttämiseksi in vitro proteiinin tuotossa ja geeniterapiamenetelmiä. Esillä olevan keksinnön

mukaiset solut ovat peräisin selkärankaisesta, erityisesti nisäkkäästä, ja vielä erityisemmin ihmisestä. Esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä tuotetut solut sisältävät DNA:ta, joka koodittaa terapeuttista tuotetta, DNA:ta, joka itsessään on terapeuttinen tuote ja/tai DNA:ta, joka aiheuttaa sen, että transfektoidut solut ekspressoivat geeniä korkeammalla tasolla tai sellaisella säätely- tai induktiokuviolla, joka on erilainen kuin on vastaavassa transfektoimattomassa solussa.

Esillä oleva keksintö koskee myös menetelmiä, joilla solut, kuten primaariset, sekundaariset ja kuolemattomiksi tehdyt solut, transfektoidaan niin, että niihin menee eksogeenistä geneettistä materiaalia, menetelmiä, joilla tuotetaan klonaalisia solukantoja tai heterogeenisiä solukantoja, ja menetelmiä, joilla immunisoidaan eläimiä tai tuotetaan vasta-aineita immunisoiduissa eläimissä käyttäen transfektoituja primaarisia, sekundaarisia tai kuolemattomiksi tehtyjä soluja.

Esillä oleva keksintö koskee erityisesti geenikohdennusmenetelmää tai homologista rekombinaatiota eukaryoottisissa soluissa, kuten home-, kasvi- tai eläinsoluissa, esim. selkärankaisen, erityisesti nisäkkään ja jopa erityisemmin ihmisen, soluissa. Se tarkoittaa, että se koskee menetelmää, jolla viedään DNA:ta sisään primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin selkärankaisen soluihin homologisella rekombinaatiolla niin, että DNA viedään primaaristen, sekundaaristen tai kuolemattomaksi tehtyjen solujen genomisen DNA:n ennalta valittuun kohtaan. Käytetyt kohdentavat sekvenssit valitaan perustuen kohtaan, johon kohdentavan DNA-rakenteen DNA aiotaan insertoida. Esillä oleva keksintö koskee edelleen homologisia primaarisia, sekundaarisia tai kuolemattomiksi tehtyjä rekombinanttisoluja, joihin viitataan nimillä homologisesti rekombinantit (HR) primaariset, sekundaariset tai kuolemattomiksi tehdyt solut, joita tuotetaan esillä

olevassa keksinnössä ja primaaristen, sekundaaristen tai kuolemattomiksi tehtyjen HR-solujen käyttöä.

Eräässä keksinnön suoritustavassa, jossa geenin ekspressiota muutetaan, geeni aktivoidaan. Se tarkoittaa, että primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä selkärankaisen soluissa läsnä oleva geeni, joka normaalisti ei ekspressoidu soluissa, aktivoituu ja sen tuloksena kooditettu proteiini ekspressoituu. Tässä suoritustavassa käytetään homologista rekombinaatiota korvaamaan, vaurioittamaan tai hajottamaan soluissa geeniin normaalisti liittynyt säätelyalue insertoimalla sellainen säätelysekvenssi, joka aiheuttaa sen, että geeni ekspressoituu korkeammilla tasoilla kuin on ilmeistä vastaavassa transfektoimattomassa solussa.

Eräässä suoritustavassa aktivoitua geeniä voidaan edelleen amplifioida sisällyttämällä amplifioituva selektiomerkkigeeni, jolla on sellainen ominaisuus, että solut, jotka sisältävät selektiomerkkigeenin amplifioituneet kopiot, voidaan selektoida viljelemällä soluja sopivan selektioaineen läsnä ollessa. Aktivoitunut endogeeninen geeni amplifioituu yhdessä amplifioituvan merkkigeenin kanssa. Monta kopiota aktivoitua endogeenistä geeniä sisältävät solut ovat käyttökelpoisia <u>in vitro</u> proteiinituottoon ja geeniterapiaan.

Esillä olevassa keksinnössä kuvattu geenikohdennus ja amplifikaatio ovat erityisen käyttökelpoisia sellaisten geenien ekspression aktivoimiseen, jotka muodostavat transkriptioyksiköitä, jotka ovat riittävän suuria niin, että niitä on vaikea eristää ja ekspressoida, sellaisten geenien aktivoimiseen, joiden koko proteiinia koodittava alue ei ole saatavissa tai sitä ei ole kloonattu.

Lisäsuoritustavassa geenin ekspressio saadussa solussa on tehostunut tai se sisältää säätely- tai induktiokuvion, joka on erilainen kuin vastaavassa transfektoimattomassa solussa. Toisessa suoritustavassa geenin ekspres-

sio saadussa solussa on alentunut (se on, vähentynyt tai poistunut kokonaan). Esillä oleva keksintö kuvaa myös menetelmän, jossa homologista rekombinaatiota käytetään muuttamaan geeni sellaiseksi cDNA-kopioksi, josta puuttuu intronit niin, että se voidaan siirtää hiivaan tai bakteeriin in vitro proteiinituottoa varten.

Esillä olevan keksinnön mukaiset transfektoidut solut ovat käyttökelpoisia useissa sovelluksissa ihmisillä ja eläimillä. Eräässä suoritustavassa solut voidaan istuttaa ihmiseen tai eläimeen proteiinin antamiseksi ihmiselle tai eläimelle. Esimerkiksi hGH-proteiinia, hEPO-proteiinia, ihmisen insulinotropiinia ja muita proteiineja voidaan antaa systeemisesti tai paikallisesti ihmisille terapeuttisia etuja varten. Lisäksi voidaan muodostaa kasvuhormonia, erytropoietiinia, insulinotropiinia ja muita eiihmisalkuperää olevia proteiineja tuottavia muita transfektoituja soluja kuin ihmissoluja.

Estokuoren sisältävät laitteet, jotka sisältävät sellaisia transfektoituja soluja, jotka ekspressoivat terapeuttista tuotetta, ja jonka terapeuttinen tuote vapaasti läpäisee, voidaan käyttää solujen pitämiseksi tietyssä kohdassa in vivo tai suojaamaan ja eristämään solut isännän immuunisysteemiltä. Estokuoren sisältävät laitteet ovat erityisen käyttökelpoisia ja sallivat transfektoitujen kuolemattomiksi tehtyjen solujen, transfektoitujen ksenogeenisten solujen tai transfektoitujen allogeenisten solujen istuttamisen ihmisen tai eläimen tautien hoitamiseksi tai maanviljelyskäyttöjä varten (esim. naudan kasvuhormoni meijerituottoon). Estokuoren sisältävät laitteet sallivat myös helpon lyhytaikaisen (se on, väliaikaisen) terapian muodostamalla helpon solujen poistosysteemin, silloin kun hoito keskeytetään jostain syystä. Lisäksi transfektoituja ksenogeenisiä ja allogeenisiä soluja voidaan käyttää estokuoren sisältävien laitteiden poissa ollessa lyhytaikaiseen geeniterapiaan niin, että solujen

tuottama geenituote muodostuu in vivo, kunnes isännän immuunisysteemi hylkii solut.

Esillä olevan keksinnön mukaiset transfektoidut solut ovat myös käyttökelpoisia vasta-ainetuoton herättämiseksi tai ihmisten tai eläinten immunisoimiseksi patogeeneja vastaan. Istutettuja transfektoituja soluja voidaan käyttää immunisoivien antigeenien antamiseksi, joka johtaa isännän soluvälitteisen ja humoraalisen immuunivasteen stimulaatioon. Nämä immuunivasteet voidaan suunnitella niin, että ne suojaavat isäntää tulevilta infektiiviltä aineilta (se on, rokotusta varten), stimuloivat ja lisäävät tautia vastaan suojaavia ominaisuuksia, jotka on suunnattu läsnä olevaa infektiota vastaan, tai sellaisten vasta-aineiden tuottamiseksi, jotka on suunnattu transfektoitujen solujen in vivo tuottamaa antigeenia vastaan, jotka voivat olla käyttökelpoisia terapeuttisia tai diagnostisia tarkoituksia varten. Poistettavissa olevia estokuoren sisältäviä laitteita, jotka sisältävät soluja, voidaan käyttää antigeenialtistuksen helppoa lopetusta varten. Vaihtoehtoisesti sellaisia soluja, jotka lopulta hyljitään (ksenogeeniset tai allogeeniset transfektoidut solut), voidaan käyttää antigeenialtistuksen rajoittamiseksi, koska antigeenituotto loppuu, kun solut on hyljitty.

Esillä olevan keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan käyttää tuottamaan primaariset, sekundaariset tai kuolemattomat solut, jotka tuottavat monia terapeuttisesti käyttökelpoisia tuotteita, jotka sisältävät (mutta eivät ole rajoittuneet): hormonit, sytokiinit, antigeenit, vasta-aineet, entsyymit, hyytymistekijät, kuljetusproteiinit, reseptorit, säätelyproteiinit, rakenneproteiinit, transkriptiotekijät, ribotsyymit tai anti-sense-RNA-molekyylit. Lisäksi esillä olevan keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan käyttää sellaisten solujen tuottamiseksi, jotka tuottavat ei-luonnollisesti esiintyviä ribotsyymejä, proteiineja tai nukleiinihappoja, jotka ovat käyttökelpoisia te-

rapeuttisen tuotteen in vitro tuottoa varten geeniterapiassa.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 on kaaviokuva hEPO-geenin transkription aktivaatiostrategiasta; paksut viivat, hiiren metallotioneiini I -promoottori; täplitetty laatikko, hGH-geenin transloimaton 5'-alue; musta laatikko, hGH-eksoni 1; juovitettu laatikko, hEPO-intronin 1 kymmenen emäsparin pituinen silmukoinnin luovuttajasekvenssi; ristiviivoitettu laatikko, hEPO-geenin transloimaton 5'-alue; valkoiset numeroidut laatikot, hEPO-geenin koodittavat sekvenssit, vinoviivoitettu laatikko, hEPO-geenin transloimattomat 3'-sekvenssit; HIII, HindIII-kohta.

Kuvio 2 on kaaviokuva hEPO-geenin transkription aktivaatiostrategiasta; paksut viivat, hiiren metallotioneiini I -promoottori; täplitetty laatikko, hGH-geenin transloimaton 5'-alue; musta laatikko, hGH-eksoni 1; valkoiset numeroidut laatikot, hEPO-geenin koodittavat sekvenssit, vinoviivoitettu laatikko, hEPO-geenin transloimattomat 3'-sekvenssit; HIII, HindIII-kohta.

Kuvio 3 on kaaviokuva plasmidista pXGH5, joka sisältää hGH-geenin hiiren metallotioneiinipromoottorin säätelyn alaisuudessa.

Kuvio 4 on kaaviokuva plasmidista pE3neoEPO. Ihmisen erytropoietiinigeenin ja neomysiinifosfotransferaasigeenin (neo) ja ampisilliiniresistenssigeenin (amp) sijainnit on esitetty. Nuolet osoittavat eri geenien transkriptiosuuntia. pmMT1 osoittaa hiiren metallotioneiinipromoottoria (ohjaa hEPO-ekspressiota) ja pKT osoittaa Herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasipromoottoria (ohjaa neoekspressiota). Kartan täplitetyt alueet osoittavat sellaisten sekvenssien sijainnit, jotka ovat peräisin ihmisen hypoksantiiniguaniinifosforibosyylitransferaasilokuksesta (HPRT). Restriktioendonukleaasien tunnistuskohtien suhteelliset sijainnit on osoitettu.

Kuvio 5 on kaaviokuva plasmidista pcDNEO, joka sisältää koodittavan neo-alueen (BamHI-BglII-fragmentti) plasmidista pSV2neo, joka on insertoitu plasmidin pCD BamHI-kohtaan, Amp-R- ja pBR322Ori-sekvenssit plasmidista pBR322, ja polyA-, 16 S silmukointiraja- ja aikaiset promoottorialueet SV40-viruksesta.

Kuvio 6 on kaaviokuva plasmidista pREPO4.

Kuvio 7 on graafinen esitys erytropoietiiniekspressiosta kohdennetussa ihmisen solulinjassa, joka on altistettu vaiheittaiselle selektiolle 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 ja 0,4 μM metotreksaatissa.

Kuvio 8 on kaaviokuva plasmidista pREPO15. Genomisista hEPO-sekvensseistä peräisin olevat fragmentit on esitetty täytetyillä laatikoilla. BamHI-kohdan (3 537) ja BglII'/HindIII'-kohdan välillä oleva alue vastaa sekvenssejä kohdilla 1 - 4 008 Genbank-tallenteessa HUMERPALU. BglII'/HindIII'-kohdan (11 463) välissä oleva alue vastaa DNA-sekvenssejä kohdilla 4 009 - 5 169 Genbank-tallenteessa HUMERPALU. HindIII-kohdan (11 463) ja XhoI-kohdan (624) välissä oleva alue sisältää sekvenssin, joka vastaa kohtia 7 - 624 Genbank-tallenteessa HUMERPA. CMV-promoottorisekvenssit on esitetty valkoisena laatikkona ja ne sisältävät sekvenssin nukleotidista 546 nukleotidiin 2 105 Genbank-sekvenssissä HS5MIEP. Neo-geeni esitetään valkoisena laatikkona nuolen kera. Neo-geeniä ohjaava tymidiinikinaasipromoottori (tk) on esitetty viivoitettuna laatikkona. Amp-geenin sisältävät pBSIISK+-sekvenssit on esitetty ohuella viivalla.

Kuvio 9A esittää restriktioentsyymikarttoja ja kaaviokuvia tuotteista, jotka havaittiin digestoimalla endogeeninen hEPO-geeni (yllä) ja aktivoitu hEPO-geeni, sen jälkeen kun homologinen rekombinaatio oli tapahtunut plasmidin pREPO15 kohdentavan fragmentin kanssa (alla).

Kuvio 9B edustaa restriktioentsyymidigestion ja Southern-hybridisaatioanalyysin tuloksia käsittelemättö-

mällä (HF) ja kohdennetulla (T1) ihmisen fibroblastikloonilla HF342-15 (katso esimerkki 7).

Kuvio 10 on kaaviokuva plasmidista pREPO18. Genomisista hEPO-sekvensseistä peräisin olevat fragmentit on esitetty täytetyillä laatikoilla. BamHI-kohdan (3 537) ja ClaI-kohdan (7 554) välillä oleva alue vastaa sekvenssejä kohdilla 1 - 4 008 Genbank-tallenteessa HUMERPALU. ATG-kohdan (12 246) ja HindIII-kohdan (13 426) välissä oleva alue vastaa DNA-sekvenssiä kohdilla 4 009 - 5 169 Genbank-tallenteessa HUMERPALU. HindIII-kohdan (13 426) ja XhoI-kohdan (624) välissä oleva alue sisältää sekvenssin, joka vastaa kohtia 7 - 624 Genbank-tallenteessa HUMERPA. CMV-promoottorisekvenssit on esitetty valkoisena laatikkona ja ne sisältävät sekvenssin nukleotidista 546 nukleotidiin 2 015 Genbank-sekvenssissä HS5MIEP. Dihydrofolaattireduktaasin (dhfr) transkriptioyksikkö esitetään täplitettynä laatikkona nuolen kera. Neo-geeni esitetään valkoisena laatikkona nuolen kera. Neo-geeniä ohjaava tymidiinikinaasipromoottori (tk) on esitetty viivoitettuna laatikkona. Amp-geenin sisältävät pBSIISK+-sekvenssit on esitetty ohuella viivalla.

Kuvio 11 on kaaviokuva keksinnön mukaisesta rakenteesta intronittoman geenin, α-interferonigeenin, aktivoimiseksi ja amplifioimiseksi, jossa rakenne sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin (1), amplifioituvan merkkigeenin (AM), selektiomerkkigeenin (SM), säätelysekvenssin, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan (SD), intronin (ohuet viivat), silmukoinnin vastaanottajakohdan (SA) ja toisen kohdentavan sekvenssin (2). Musta laatikko edustaa koodittavaa DNA:ta ja täplitetyt laatikot edustavat transloimattomia sekvenssejä.

Kuvio 12 on kaaviokuva keksinnön mukaisesta rakenteesta endogeenisen geenin aktivoimiseksi ja amplifioimiseksi, jossa ensimmäinen eksoni vastaa signaalipeptidiä, ihmisen GM-CSF-geeniä, jossa rakenne sisältää ensimmäisen

kohdentavan sekvenssin (1), amplifioituvan merkkigeenin (AM), selektiomerkkigeenin (SM), säätelysekvenssin, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan (SD) ja toisen kohdentavan sekvenssin (2). Mustat laatikot edustavat koodittavaa DNA:ta ja täplitetyt laatikot edustavat transloimattomia sekvenssejä.

Kuvio 13 on kaaviokuva keksinnön mukaisesta rakenteesta endogeenisen geenin aktivoimiseksi ja amplifioimiseksi, jossa ensimmäinen eksoni vastaa signaalipeptidiä, ihmisen G-CSF-geeniä, jossa rakenne sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin (1), amplifioituvan merkkigeenin (AM), selektiomerkkigeenin (SM), säätelysekvenssin, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan (SD) ja toisen kohdentavan sekvenssin (2). Mustat laatikot edustavat koodittavaa DNA:ta ja täplitetyt laatikot edustavat transloimattomia sekvenssejä.

Kuvio 14 on kaaviokuva keksinnön mukaisesta rakenteesta endogeenisen geenin aktivoimiseksi ja amplifioimiseksi, jossa ensimmäinen eksoni on ei-koodittava, ihmisen FSHß-geeni, jossa rakenne sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin (1), amplifioituvan merkkigeenin (AM), selektiomerkkigeenin (SM), säätelysekvenssin, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan (SD) ja toisen kohdentavan sekvenssin (2). Mustat laatikot edustavat koodittavaa DNA:ta ja täplitetyt laatikot edustavat transloimattomia sekvenssejä.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Keksintö perustuu havaintoon, että haluttujen endogeenisten geenien säätelyä tai aktiivisuutta solussa voidaan muuttaa insertoimalla solun genomin ennalta valittuun kohtaan homologisella rekombinaatiolla DNA-rakenteet, jotka sisältävät: (a) kohdentavan sekvenssin; (b) säätelysekvenssin; (c) eksonin ja (d) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan, jossa kohdentavat sekvenssit ohjaavat elementtien (a) - (d) integroitumista niin, että ne liite-

tään toiminnallisesti endogeeniseen geeniin. Toisessa suoritustavassa DNA-rakenteet sisältävät: (a) kohdentavan sekvenssin, (b) säätelysekvenssin, (c) eksonin, (d) silmukoinnin luovuttajakohdan, (e) intronin ja (f) silmukoinnin vastaanottajakohdan, jossa kohdentava sekvenssi ohjaa elementtien (a) - (f) integroitumista niin, että elementit (b) - (f) liitetään toiminnallisesti endogeenisen geenin ensimmäiseen eksoniin. Käytetyt koohdentavat sekvenssit valitaan sen kohdan mukaan, johon DNA aiotaan insertoida. Molemmissa suoritustavoissa kohdennustapahtumaa käytetään luomaan uusi transkriptioyksikkö, joka on kohdentavien DNA-rakenteiden tuomien sekvenssien ja endogeenisen solugeenin sekvenssien fuusiotuote. Kuten tässä on keskusteltu, uuden transkriptioyksikön muodostus sallii esimerkiksi transkriptionaalisesti hiljaisten geenien (geenit, jotka eivät ekspressoidu solussa ennen transfektiota) aktivoimisen isäntäsolussa viemällä sisään isäntäsolun genomiin esillä olevan keksinnön mukaiset DNA-rakenteet. Kuten tässä on myös keskusteltu, endogeenisen geenin, joka ekspressoituu saadussa solussa, ekspressio voidaan muuttaa niin, että sitä kohotetaan, alennetaan, joka sisältää poiston kokonaan, tai sen säätely- tai induktiokuviota voidaan muuttaa käyttämällä esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää ja DNA-rakenteita.

Yllä kuvattu esillä oleva keksintö koskee geenin tai DNA:n kohdennusmenetelmää eukaryoottisiin soluihin, kuten home-, kasvi- tai eläinsoluihin, kuten selkärankaisen, erityisesti nisäkkään ja vielä erityisemmin ihmisen, soluihin. Se on, se koskee menetelmää DNA:n viemiseksi soluun, kuten primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin selkärankaisen soluihin homologisella rekombinaatiolla tai sellaisen DNA:n kohdentamiseksi, joka viedään sisään solujen genomiseen DNA:han ennalta valittuun kohtaan. Se koskee erityisesti homologista rekombinaatiota, jossa endogeenisten geenien transkriptio- ja/tai

translaatiotuotteita modifioidaan käyttämällä DNA-rakenteita, jotka sisältävät kohdentavan sekvenssin, säätelysekvenssin, eksonin ja silmukoinnin luovuttajakohdan. Esillä oleva keksintö koskee edelleen homologisesti rekombinantteja soluja, jotka on tuotettu esillä olevalla menetelmällä ja homologisesti rekombinanttien solujen käyttöä.

Esillä oleva keksintö koskee myös menetelmää geenin aktivoimiseksi, joka on läsnä primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä selkärankaisen soluissa, mutta jota ei normaalisti ekspressoida näissä soluissa. Homologista rekombinaatiota tai kohdennusta käytetään viemään solun genomiin sekvenssit, jotka aiheuttavat geenin ekspressoitumisen vastaanottajasolussa. Lisäsuoritustavassa geenin ekspressiota solussa tehostetaan tai geenin säätely- tai induktiokuviota muutetaan viemällä sisään DNA-rakenne. Sen tuloksena kooditettua tuotetta ekspressoidaan korkeampina tasoina kuin vastaavassa transfektoimattomassa solussa. Esillä oleva menetelmä ja DNA-rakenteet ovat myös käyttökelpoisia sellaisten solujen tuottamiseksi, joissa haluttua tuotetta on vähemmän transfektoidussa solussa kuin vastaavassa transfektoimattomassa solussa. Se on, transfektoidussa solussa tuotetaan vähemmän proteiinia (sisältäen tilan, jossa ei tuoteta yhtään proteiinia) kuin soluissa tavallisesti.

Toisessa suoritustavassa normaalisti hiljainen haluttua tuotetta koodittava geeni aktivoidaan transfektoiduissa primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä soluissa ja amplifioidaan. Tämä suoritustapa on menetelmä, jolla viedään sisään homologisella rekombinaatiolla genomisen DNA:n kanssa sellaiset DNA-sekvenssit, jotka eivät normaalisti ole toiminnallisesti liitettyjä endogeeniseen geeniin ja (1) jotka insertoituina isännän genomiin endogeeniseen geeniin tai sen lähelle, toimivat muuttaen (esim. aktivoiden) endogeenisen geenin ekspressiota, ja edelleen (2) sallivat sellaisten solujen selek-

tion, joissa aktivoitunut endogeeninen geeni on amplifioitunut. Vaihtoehtoisesti sellaisen geenin ekspressio, jota normaalisti ekspressoidaan solussa, tehostetaan ja geeni amplifioituu.

Seuraavassa on kuvaus esillä olevan keksinnön mukaisista DNA-rakenteista, menetelmistä, joissa niitä käytetään transfektoitujen solujen tuottamiseksi, transfektoiduista soluista ja näiden solujen käytöistä.

DNA-rakenne

Esillä olevan keksinnön mukainen DNA-rakenne sisältää ainakin seuraavat komponentit: kohdentavan sekvenssin; säätelysekvenssin; eksonin ja pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan. Rakenteessa eksoni on säätelysekvenssin 3'-puolella ja pariutumaton silmukoinnin luovuttajakohta on eksonin 3'-puolella. Lisäksi eksonia ennen (5'-puolella) voi olla useita eksoneita ja/tai introneita, joiden vieressä on pariutumaton silmukoinnin luovuttajakohta. Kuten tässä on kuvattu, läsnä on usein lisärakennekomponentteja, kuten selektiomerkit tai amplifioituvat merkit.

DNA-rakennetta voidaan nimittää eksogeeniseksi. Termi "eksogeeninen" määritellään tässä DNA:ksi, joka viedään sisään soluun esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä, kuten tässä määritellyt DNA-rakenteet. Eksogeenisessä DNA:ssa voi olla sekvenssejä, jotka ovat identtisiä tai erilaisia solussa ennen transfektiota olevan endogeenisen DNA:n kanssa.

Kohdentava sekvenssi tai kohdentavat sekvenssit

Kohdentava sekvenssi tai kohdentavat sekvenssit ovat DNA-sekvenssejä, jotka sallivat laillisen homologisen rekombinaation valitun solun genomiin, joka sisältää halutun geenin. Kohdentavat sekvenssit ovat yleensä DNA-sekvenssejä, jotka ovat homologisia (se on, identtisiä tai riittävän samanlaisia solun DNA:n kanssa niin, että kohdentava sekvenssi ja solun DNA voivat läpikäydä homologisen rekombinaation) DNA-sekvensseille, joita on normaalis-

ti läsnä solun genomissa (esim. koodittavaa tai ei-koodittavaa DNA:ta, joka sijaitsee ylävirtaan halutun geenin transkription aloituskohdasta, transkriptioalueella tai alavirtaan transkription lopetuskohdasta, tai sekvenssit, jotka ovat läsnä genomissa johtuen aiemmasta modifikaatiosta). Käytetty kohdentava sekvenssi tai käytetyt kohdentavat sekvenssit valitaan riippuen siitä kohdasta, johon DNA-rakenteen DNA aiotaan insertoida.

Yhtä tai useampia kohdentavia sekvenssejä voidaan käyttää. Esimerkiksi renkaan muotoisessa plasmidissa tai DNA-fragmentissa käytetään suositeltavasti yksittäistä kohdentavaa sekvenssiä. Lineaarisessa plasmidissa tai DNA-fragmentissa käytetään suositeltavasti kahta kohdentavaa sekvenssiä. Kohdentava sekvenssi tai kohdentavat sekvenssit voivat olla toisistaan riippumattomasti halutussa geenissä (kuten eksoni- ja/tai intronisekvenssit) juuri halutun geenin vieressä (se on, ilman yhtään ylimääräisiä nukleotideja kohdentavan sekvenssin ja halutun geenin koodittavan alueen välissä), ylävirtaan halutusta geenistä (kuten ylävirran ei-koodittavat sekvenssit tai endogeeniset promoottorisekvenssit) tai kaukana geenin ylävirrassa (kuten sekvenssit ylävirtaan endogeenisestä promoottorista). Kohdentava sekvenssi tai kohdentavat sekvenssit voivat sisältää ne kohdegeenin alueet, jotka tällä hetkellä tunnetaan tai on sekvensoitu ja/tai alueet enemmän ylävirtaan, joita ei ole rakenteellisesti karakterisoitu, mutta jotka alan asiantuntija voi kartoittaa ja määrittää käyttäen restriktioentsyymejä.

Kuten tässä on esitetty, geenikohdennusta voidaan käyttää insertoimaan säätelysekvenssi, joka on eristetty eri geenistä, koottu komponenteista, jotka on eristetty eri solu- ja/tai viruslähteistä tai syntetisoitu, uudeksi säätelysekvenssiksi yhdistelmä-DNA-menetelmin endogeeniseen solun geeniin, juuri sen viereen, sen ylävirtaan tai sopivalle etäisyydelle siitä. Vaihtoehtoisesti tai lisäksi

sekvenssejä, jotka vaikuttavat tuotetun RNA-molekyylin tai proteiinin rakenteeseen tai stabiilisuuteen, voidaan korvata, poistaa tai muutoin modifioida kohdentamalla. Esimerkiksi RNA-stabiilisuuselementtejä, silmukointikohtia ja/tai RNA-molekyylien leader-sekvenssejä voidaan modifioida RNA-molekyylin toiminnan, stabiilisuuden ja/tai translatoitavuuden parantamiseksi tai muuttamiseksi. Proteiinisekvenssejä, kuten signaalisekvenssejä, propeptidisekvenssejä, aktiivisia kohtia ja/tai rakenteellisia sekvenssejä, voidaan myöskin muuttaa proteiinin kuljetuksen, erityksen tai toiminnallisten ominaisuuksien tehostamiseksi tai modifioimiseksi. Tämän menetelmän mukaisesti eksogeenisen DNA:n sisään vieminen johtaa muutoksiin geenin normaaleissa ekspressio-ominaisuuksissa ja/tai proteiinin tai RNA-molekyylin rakenteellisissa ominaisuuksissa.

Säätelysekvenssi

DNA-rakenteen säätelysekvenssi voi sisältää yhden tai useamman promoottorin (kuten konstitutiivisen tai indusoituvan promoottorin), tehostinsekvenssin, tuman runkorakenteeseen kiinnittyviä alueita tai tuman matriisiin kiinnittyviä alueita, negatiivisesti sääteleviä alueita, transkriptiotekijöiden sitoutumisalueita tai mainittujen sekvenssien yhdistelmiä.

Säätelysekvenssi voi sisältää indusoituvan promoottorin sillä tuloksella, että tuotetut solut tai yksilöön viedyt solut eivät ekspressoi tuotetta, mutta voidaan indusoida tekemään niin (se on, ekspressio indusoidaan sen jälkeen kun transfektoidut solut on tuotettu, mutta ennen istutusta tai istutuksen jälkeen). Haluttua tuotetta koodittava DNA voidaan tietysti viedä soluihin niin, että se ekspressoituu sisäänvietäessä (esim. konstitutiivisen promoottorin alaisuudessa). Säätelysekvenssi voidaan eristää solun tai viruksen genomista (sellaiset säätelysekvenssit sisältävät ne, jotka säätelevät SV40-viruksen aikaisten tai myöhäisten geenien, adenoviruksen pääasiallisten myö-

häisten geenien, hiiren metallotioneiini I -geenin, pidennystekijä 1α -geenin, sytomegaloviruksen geenien, kollageenigeenien, aktiinigeenien, immunoglobuliinigeenien tai HMG-CoA-reduktaasigeenin ekspressiota). Säätelysekvenssi sisältää suositeltavasti transkriptiotekijöiden sitoutumiskohdat, kuten TATA-box-, CCAAT-box-, AP1-, Sp1- tai NF-κB-sitoutumiskohdat.

DNA-rakenteen lisäelementit

DNA-rakenne sisältää lisäksi yhden tai useamman eksonin. Eksoni määritellään tässä DNA-sekvenssiksi, joka kopioituu RNA:han ja on läsnä kypsässä mRNA-molekyylissä. Eksonit voivat vaihtoehtoisesti sisältää DNA:n, joka koodittaa yhtä tai useampaa aminohappoa ja/tai koodittaa aminohappoa osittain (se on, yksi tai kaksi kodonin emästä). Vaihtoehtoisesti eksoni sisältää DNA:n, joka vastaa ei-koodittavaa 5'-aluetta. Kun eksogeeninen eksoni tai eksogeeniset eksonit koodittavat yhtä tai useampaa aminohappoa ja/tai osaa aminohaposta, DNA-rakenne suunnitellaan niin, että transkriptiossa ja silmukoinnissa lukuraami on oikeassa raamissa kohdegeenin toisen eksonin tai koodittavan alueen kanssa. Tässä käytettynä termi oikeassa raamissa tarkoittaa, että fuusioituessa ensimmäisen eksonin ja toisen eksonin koodittavat sekvenssit yhdistyvät nukleotiditasolla niin, että sopiva lukuraami ei muutu siltä mRNA-molekyylin osalta, joka on peräisin toisesta eksonista.

Kun kohdegeenin ensimmäinen eksoni sisältää ATG-sekvenssin translaation aloitukseen, rakenteen eksogeeninen eksoni sisältää suositeltavasti ATG-kodonin ja, jos tarvitaan, yhden tai useamman nukleotidin niin, että tuloksena syntynyt mRNA-molekyylin koodittava alue, joka sisältää kohdegeenin toisen eksonin ja sen jälkeiset eksonit, on oikeassa raamissa. Esimerkit sellaisista kohdegeeneistä, joissa ensimmäinen eksoni sisältää ATG-kodonin, sisältävät geenit, jotka koodittavat hEPO-proteiinia, hGH-proteiinia, ihmisen granulosyytti/makrofagien pesäkekasvua

stimuloivaa tekijää (hGM-CSF) ja ihmisen granulosyytti-pesäkekasvua stimuloivaa tekijää (hG-CSF).

Silmukoinnin luovuttajakohta on sekvenssi, joka ohjaa yhden eksonin silmukointia toiseen eksoniin. Tyypillisesti ensimmäinen eksoni sijaitsee toisen eksonin 5'-puolella ja ensimmäisen eksonin 3'-puolella oleva sen kanssa päällekkäin menevä ja sen vieressä oleva silmukoinnin luovuttajakohta tunnistaa silmukoinnin vastaanottajakohdan, joka sijaitsee toisen eksonin vieressä sen 5'-puolella. Silmukoinnin luovuttajakohdilla on ominainen konsensussekvenssi, jota edustaa: (A/C)AG GURAGU (jossa R on puriininukleotidi) niin, että neljännessä ja viidennessä kohdassa tarvitaan GU [Jackson, I.J. Nucleic Acids Research 19: 3715 - 3798 (1991)]. Silmukoinnin luovuttajan konsensuskohdan kolme ensimmäistä emästä ovat eksonin kolme viimeistä emästä. Silmukoinnin luovuttakajohdat määritellään toiminnallisesti niiden kyvyn suhteen saada aikaan sopiva reaktio mRNA-silmukointireitillä.

Pariutumaton silmukoinnin luovuttajakohta määritellään tässä silmukoinnin luovuttajakohdaksi, joka on läsnä kohdentavassa rakenteessa ja joka ei rakenteessa esiinny yhdessä silmukoinnin vastaanottajakohdan kanssa, joka sijaitsee pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan 3'-puolella. Pariutumaton silmukoinnin luovuttajakohta johtaa silmukointiin endogeenisen silmukoinnin vastaanottajakohdan kanssa.

Silmukoinnin vastaanottajakohta on sekvenssi, joka silmukoinnin luovuttajakohdan kaltaisesti ohjaa yhden eksonin silmukointia toiseen eksoniin. Toimien yhdessä silmukoinnin luovuttajakohdan kanssa silmukointikoneisto käyttää silmukoinnin vastaanottajakohtaa intronin poistamiseksi. Silmukoinnin vastaanottajakohdilla on ominainen sekvenssi, jota edustaa: YYYYYYYYYYNYAG, jossa Y on pyrimidiini ja N on mikä tahansa nukleotidi [Jackson, I.J. Nucleic Acids Research 19: 3715 - 3798 (1991)].

Intronin määritellään olevan sekvenssi, jossa on yksi tai useampi nukleotidi, joka sijaitsee kahden eksonin välissä ja joka poistetaan silmukoimalla esiaste-RNA-molekyylistä mRNA-molekyylin muodostuksen aikana.

Säätelysekvenssi on esimerkiksi toiminnallisesti liitetty ATG-aloituskodoniin, joka aloittaa translaation. Vaihtoehtoisesti CAP-kohta (spesifinen mRNA-aloituskohta, joka assosioituu sitä hyväksi käyttävään säätelyalueeseen) on toiminnallisesti liitetty säätelysekvenssiin ja ATG-aloituskodoniin. Vaihtoehtoisesti sitä hyväksi käyttävään säätelysekvenssiin assositoitunut CAP-kohta ei sisälly kohdentavaan rakenteeseen ja transkriptiokoneisto määrittelee uuden CAP-kohdan. Useimmille geeneille CAP-kohta löytyy tavallisesti noin 25 nukleotidia TATA-box-kohdan 3'-puolelta. Yhdessä suoritustavassa silmukoinnin luovuttajakohta sijoitetaan esimerkiksi juuri ATG-kohdan viereen niin, että yhden tai useamman nukleotidin läsnäoloa ei tarvita ekdogeenisen eksonin oikeaan lukuraamiin saamiseksi kohdegeenin toisen eksonin kanssa. Suositeltavasti DNA, joka koodittaa yhtä tai useampaa aminohappoa tai osaa aminohaposta oikeassa lukuraamissa kohdegeenin koodittavan sekvenssin kanssa, sijoitetaan juuri ATG-kohdan viereen sen 3'-puolelle. Sellaisessa suoritustavassa silmukoinnin luovuttajakohta sijoitetaan juuri koodittavan DNA:n viereen sen 3'-puolelle.

Toiminnallisesti liitetyn tai toiminnallisesti sijoitetun määritetään olevan konfiguraatio, jossa eksogeeninen säätelysekvenssi, eksoni, silmukoinnin luovuttajakohta ja vaihtoehtoisesti sekvenssi ja silmukoinnin vastaanottajakohta on sopivasti kohdennettu sellaiseen kohtaan endogeenisen geenin suhteen, että säätelysekvenssi ohjaa sellaisen primaarisen RNA-transkriptin tuottoa, joka alkaa CAP-kohdasta (vaihtoehtoisesti sisällytetty kohdentavaan rakenteeseen) ja joka sisältää sekvenssit, jotka vastaavat kohdennettavan rakenteen eksonia ja silmukoinnin

luovuttajakohtaa, DNA:ta, joka sijaitsee ylävirtaan endogeenisen geenin säätelyalueesta (jos läsnä), endogeenisen geenin säätelyaluetta (jos läsnä), endogeenisen geenin transkriptoimatonta 5'-aluetta (jos läsnä) ja endogeenisen geenin eksoneita ja introneita (jos läsnä). Toiminnallisesti liitetyssä konfiguraatiossa kohdentavan rakenteen silmukoinnin luovuttajakohta ohjaa silmukointitapahtuman endogeenisen geenin yhden eksonin vieressä olevaan silmukoinnin vastaanottajakohtaan niin, että haluttu proteiini voidaan tuottaa täysin silmukoidusta kypsästä transkriptista. Yhdessä suoritustavassa silmukoinnin vastaanottajakohta on endogeeninen niin, että silmukointitapahtuma ohjautuu endogeeniseen eksoniin, esimerkiksi endogeenisen geenin eksoniin. Toisessa suoritustavassa, jossa silmukoinnin vastaanottajakohta on sisällytetty kohdentavaan rakenteeseen, silmukointitapahtuma poistaa intronin, jonka kohdentava rakenne sisältää.

Käytetty koodittava DNA (esim. kohdentavan rakenteen eksonissa 1) voi vaihtoehtoisesti koodittaa yhtä tai useampaa aminohappoa ja/tai osaa aminohaposta, jotka ovat samoja kuin ne, jotka ovat endogeenisessä geenissä. Tässä käytetty koodittava DNA-sekvenssi voi esimerkiksi vastata halutun geenin ensimmäistä eksonia. Koodittava DNA voi vaihtoehtoisesti koodittaa yhtä tai useampaa aminohappoa tai osaa aminohaposta, jotka ovat erilaisia kuin halutun proteiinin ensimmäisessä eksonissa. Sellainen suoritustapa on erityisen mielenkiintoinen, silloin kun halutun proteiinin ensimmäisen eksonin aminohapot eivät ole kriittisiä proteiinin aktiivisuudelle tai aktiivisuuksille. Esimerkiksi, kun rakennetaan fuusioita endogeeniseen hEPO-geeniin, voidaan käyttää sekvenssejä, jotka koodittavat hGH-proteiinin ensimmäistä eksonia. Tässä esimerkissä hGH-geenin eksonin 1 fuusio hEPO-geenin eksoniin 2 johtaa toiminnallisen hybridisignaalipeptidin muodostumiseen. Vastaavissa rakenteissa voidaan käyttää mitä tahansa ihmis-

tai ei-ihmisalkuperää olevaa eksonia, jossa kooditetut aminohapot eivät estä hybridisignaalipeptidin toimintaa. Sukua olevassa suoritustavassa tätä menetelmää voidaan myös käyttää kohdegeenistä löytyneen mutaation korjaamiseksi.

Kun haluttu tuote on endogeenisen proteiinin ja kohdentavan rakenteen koodittavien sekvenssien fuusioproteiini, soluihin esillä olevalla menetelmällä inkorporoitu eksogeeninen koodittava DNA sisältää DNA:n, joka koodittaa yhtä tai useampaa eksonia, tai cDNA-sekvenssin, joka vastaa translaatio- tai transkriptiotuotetta, joka fuusioidaan endogeenisen kohdegeenin tuotteeseen. Tässä suoritustavassa kohdennusta käytetään kimeeristen tai monitoimisten proteiinien valmistamiseksi, joissa yhdistyvät yhteen polypeptidiin rakenteelliset, entsymaattiset tai ligandia tai reseptoria sitovat ominaisuudet kahdesta tai useammasta proteiinista. Eksogeeninen DNA voi esimerkiksi koodittaa membraaniankkuria kohdeproteiinille tai signaalipeptidiä niin, että saadaan aikaan solueritys tai parannetaan sitä, leader-sekvenssejä, entsymaattisia alueita, membraanin läpi kulkevien domeenien alueita, kofaktoreita sitovia alueita tai muita toiminnallisia alueita. Esimerkit proteiineista, joita ei normaalisti eritetä, mutta jotka voidaan fuusioida signaaliproteiiniin niin, että saadaan aikaan eritys, sisältävät dopadekarboksylaasin, transkription säätelyproteiinit, α-galaktosidaasin ja tyrosiinihydroksylaasin.

Kun kohdegeenin ensimmäinen eksoni vastaa ei-koodittavaa aluetta [esimerkiksi follikkelia stimuloiva ß-hormonigeeni (FSHß)], eksogeenistä ATG-kodonia ei tarvita ja jätetään suositeltavasti pois.

Rakenteen DNA voidaan saada lähteistä, joissa se esiintyy luonnollisesti tai se voidaan tuottaa käyttäen yhdistelmä-DNA-menetelmiä tai synteettisiä menetelmiä.

Kohdegeeni ja tuloksena syntynyt tuote

DNA-rakenne, kun se transfektoidaan soluihin, kuten primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin soluihin, voi säädellä halutun tuotteen, esimerkiksi proteiinin tai RNA-molekyylin aktiivista tai toiminnallista osaa, ekspressiota. Tuote voi olla esimerkiksi hormoni, sytokiini, antigeeni, vasta-aine, entsyymi, hyytymistekijä, kuljetusproteiini, reseptori, säätelyproteiini, rakenneproteiini, transkriptiotekijä, anti-sense-RNA tai ribotsyymi. Lisäksi tuote voi olla proteiini tai nukleiinihappo, joka ei esiinny luonnossa (se on, fuusioproteiini tai -nukleiinihappo).

Tässä kuvatulla menetelmällä voidaan tuottaa yksi tai useampi terapeuttinen tuote, kuten erytropoietiini, kalsitoniini, kasvuhormoni, insuliini, insulinotropiini, insuliinin kaltaiset kasvutekijät, lisäkilpirauhashormoni, interferoni-ß ja interferoni ß, hermokasvutekijät, FSHß, TGF-ß, kasvaimen nekroositekijä, glukagoni, luun kasvutekijä 2, luun kasvutekijä 7, TSH-ß, interleukiini 1, interleukiini 2, interleukiini 3, interleukiini 6, interleukiini 11, interleukiini 12, CSF-granulosyytti, CSF-makrofagi, CSF-granulosyytti/makrofagi, immunoglobuliinit, katalyyttiset vasta-aineet, proteiinikinaasi C, glukokerebrosidaasi, superoksididismutaasi, kudoksen plasminogeeniaktivaattori, urokinaasi, antitrombiini III, DNAasi, α-galaktosidaasi, tyrosiinihydroksylaasi, veren hyytymistekijä V, veren hyytymistekijä VII, veren hyytymistekijä VIII, veren hyytymistekijä IX, veren hyytymistekijä X, veren hyytymistekijä XIII, apolipoproteiini E tai apolipoproteiini A-I, globiinit, matalatiheyksinen lipoproteiinireseptori, IL-2-reseptori, IL-2-antagonistit, α-1-antitrypsiini, immuunivasteen modifioijat ja liukoinen CD4.

Selektiomerkit ja amplifikaatio

Kohdennustapahtuman tunnistusta voidaan helpottaa käyttämällä yhtä tai useampaa selektiomerkkigeeniä. Nämä

merkit voidaan sisällyttää kohdentavaan rakenteeseen tai ne voivat olla läsnä eri rakenteissa. Selektiomerkit voidaan jakaa kahteen ryhmään: positiivisesti selektoitavat ja negatiivisesti selektoitavat (toisin sanoen, merkit joko positiiviselle selektiolle tai negatiiviselle selektiolle). Positiivisessa selektiossa postiivisesti selektoitavaa merkkiä ekspressoivat solut kykenevät kestämään elossa käsittelyn selektioaineella [kuten neo, ksantiiniguaniinifosforibosyylitransferaasi (gpt), dhfr, adenosiinideaminaasi (ada), puromysiini (pac), hygromysiini (hyg), CAD, joka koodittaa karbamyylifosfaattisyntaasia, aspartaattitranskarbamylaasi ja dihydro-orotaasiglutamiinisyntetaasi (GS), monilääkeresistenssi 1 (mdr1) ja histidiini D (hisD)], jotka sallivat sellaisten solujen selektion, joissa kohdentava rakenne on integroitunut isäntäsolun genomiin. Negatiivisessa selektiossa solut, jotka ekspressoivat negatiivisesti selektoitavaa merkkiä, tuhoutuvat selektioaineen läsnä ollessa. Kohdennustapahtuman tunnistusta voidaan helpottaa käyttämällä yhtä tai useampaa merkkigeeniä, joilla on negatiivisen selektion ominaisuus niin, että negatiivisesti selektoitava merkki liitetään eksogeeniseen DNA:han, mutta joka kootaan niin, että negatiivisesti selektoitava merkki on kohdentavan sekvenssin vieressä ja niin, että oikea homologinen rekombinaatiotapahtuma isäntäsolun genomin sekvenssien kanssa ei johda negatiivisesti selektoitavan merkin stabiiliin integroitumiseen [Mansour, S.L. et al., Nature 336: 348 - 252 (1988)]. Tähän tarkoitukseen sopivat merkit sisältävät Herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasigeenin (TK) tai bakteerin gpt-geenin.

Erilaisia selektiomerkkejä voidaan inkorporoida primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin soluihin. Esimerkiksi selektiomerkkiä, joka muodostaa selektoitavan fenotyypin, kuten lääkeresistenssin, ravinneauksotrofian, resistenssin sytotoksiselle aineelle tai

pintaproteiinin ekspression, voidaan käyttää. Selektiomerkkigeenit, joita voidaan käyttää, sisältävät neo-, gpt-, dhfr-, ada-, pac-, hyg-, CAD-, GS-, mdr1- ja hisD-geenit. Muodostunut selektoitava fenotyyppi mahdollistaa vastaanottajasolujen tunnistuksen ja eristyksen.

Selektiomerkkiä koodittavilla amplifioituvilla geeneillä (esim. ada, GS, dhfr ja monitoiminnallinen CAD-geeni) on se lisäominaisuus, että ne mahdollistavat sellaisten solujen selektion, jotka sisältävät amplifioituneet kopiot selektiomerkistä, joka on insertoitu genomiin. Tämä ominaisuus esittää mekanismin, jolla voidaan merkittävästi kohottaa sellaisen viereisen tai liitetyn geenin kopiomäärää, jonka amplikaatio on toivottavaa. Näiden sekvenssien mutatoituneita muotoja, joilla on parantuneet selektioominaisuudet, ja muita amplifioituvia sekvenssejä voidaan myös käyttää.

Komponenttien järjestys DNA-rakenteessa voi vaihdella. Kun rakenne on ympyrän muotoinen plasmidi, syntyneen rakenteen elementtien järjestys voi olla: kohdentava sekvenssi - plasmidi DNA (koostuu sekvensseistä, joita käytetään kohdentavan plasmidin selektioon ja/tai replikaatioon mikrobi- tai muussa sopivassa isännässä) - selektiomerkki (selektiomerkit) - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta. Suositeltavasti plasmidi, joka sisältää kohdentavan sekvenssin ja eksogeeniset DNA-elementit, katkaistaan restriktioentsyymillä, joka katkaisee yhden tai useamman kerran kohdentavan sekvenssin sisältä niin, että muodostetaan lineaarinen tai aukkoinen molekyyli ennen sen viemistä vastaanottajasoluun niin, että vapaat DNA-päät kohottavat tässä kuvatun halutun homologisen rekombinaatiotapahtuman frekvenssiä. Lisäksi vapaita DNA-päitä voidaan käsitellä eksonukleaasilla niin, että muodostetaan esiintyöntyvät 5'- tai 3'-suhteen yli menevät yksijuosteiset DNA-päät halutun homologisen rekombinaatiotapahtuman ferkvenssin kohottamiseksi. Tässä suo-

ritustavassa homologinen rekombinaatio kohdentavan sekvenssin ja solukohteen välillä johtaa kahteen kohdentavan sekvenssin kopioon, jotka ovat niiden elementtien vieressä, jotka sisältyvät sisäänvietyyn plasmidiin.

Kun rakenne on lineaarinen, järjestys voi olla esimerkiksi: ensimmäinen kohdentava sekvenssi - selektiomerkki - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta - toinen kohdentava sekvenssi tai vaihtoehtoisesti ensimmäinen kohdentava sekvenssi - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta - selektiomerkkiä koodittava DNA - toinen kohdentava sekvenssi. Solut, joihin rakenne on integroitunut stabiilisti, säilyvät hengissä käsittelystä selektiivisellä aineella; osa stabiilisti transfektoituneista soluista on homologisesti rekombinantteja soluja. Homologisesti rekombinantit solut voidaan tunnistaa eri menetelmillä sisältäen PCR-menetelmän, Southern-hybridisaation ja fenotyyppisen seulonnan.

Toisessa suoritustavassa rakenteen järjestys voi olla: ensimmäinen kohdentava sekvenssi - selektiomerkki - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta - introni - silmukoinnin vastaanottajakohta - toinen kohdentava sekvenssi.

Vaihtoehtoisesti komponenttien järjestys DNA-rakenteessa voi olla esimerkiksi: ensimmäinen kohdentava sekvenssi - selektiomerkki 1 - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta - toinen kohdentava sekvenssi - selektiomerkki 2, tai vaihtoehtoisesti ensimmäinen kohdentava sekvenssi - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta - selektiomerkki 1 - toinen kohdentava sekvenssi - selektiomerkki 2. Tässä suoritustavassa selektiomerkillä 2 on negatiivinen selektio-ominaisuus. Se on, selektiomerkin 2 geenituote voidaan valita kasvun suhteen sopivassa alustaformulaatiossa, joka sisältää aineen (tyypillisesti lääke tai metaboliittianalogi), joka tappaa selektiomerkkiä 2 ekspressoivat solut. Rekombinaa-

tio selektiomerkin 1 vieressä olevien kohdentavien sekvenssien ja isäntäsolun genomin homologisten sekvenssien välillä johtaa selektiomerkin 1 kohdennettuun integraatioon, kun taas selektiomerkki 2 ei integroidu. Sellaiset rekombinaatiotapahtumat muodostavat solut, jotka ovat stabiilisti transfektoituja selektiomerkillä 1, mutta eivät stabiilisti transfektoituja selektiomerkillä 2, ja sellaiset solut voidaan valita kasvun suhteen alustassa, joka sisältää selektioaineen, joka selektoi selektiomerkin 1 suhteen ja selektioaineessa, joka selektoi selektiomerkin 2 suhteen.

DNA-rakenne voi sisältää myös positiivisesti selektoitavan merkin, joka sallii sellaisten solujen selektion, jotka sisältävät sen merkin amplioituneet kopiot. Sellaisen merkin amplifikaatio johtaa viereisten DNA-sekvenssien koamplifikaatioon. Tässä suoritustavassa rakenteen komponenttien järjestys on esimerkiksi: ensimmäinen kohdentava sekvenssi - amplifioituva positiivisesti selektoitava merkki - toinen selektiomerkki (vaihtoehtoinen) - säätelysekvenssi - eksoni - silmukoinnin luovuttajakohta - toinen kohdentava DNA-sekvenssi.

Tässä suoritustavassa aktivoitu geeni voidaan edelleen amplifioida sisällyttämällä selektiomerkkigeeni, jolla on sellainen ominaisuus, että selektiomerkkigeenin amplifioituneet kopiot sisältävät solut voidaan valita viljelemällä soluja sopivan selektioaineen läsnä ollessa. Aktivoitunut endogeeninen geeni amplifioituu yhdessä amplifioituvan selektiomerkkigeenin kanssa. Solut, jotka sisältävät useita kopioita aktivoitua endogeenista geeniä, voivat tuottaa hyvin korkeita tasoja haluttua proteiinia ja ovat käyttökelpoisia <u>in vitro</u> proteiinituottoon ja geeniterapiaan.

Missään suoritustavassa selektiomerkkigeenien ja amplifioituvien merkkigeenien ei tarvitse olla juuri toistensa vieressä.

DNA-rakenne voi vaihtoehtoisesti sisältää bakteerin replikaatio-origon ja bakteerin antibioottiresistenssimerkit tai muut selektiomerkit, jotka sallivat suurimittakaavaisen plasmidituoton bakteereissa tai muussa sopivassa kloonaus/isäntäsysteemissä. DNA-rakennetta, joka sisältää selektiomerkkiä koodittavan DNA:n yhdessä lisäsekvenssien, kuten promoottorin ja silmukoinnin rajakohtien, kanssa, voidaan käyttää muodostamaan selektoitava fenotyyppi transfektoituihin soluihin (esim. plasmidi pcDNEO, josta on kaaviokuva kuviossa 4). Sellainen DNA-rakenne voidaan yhteistransfektoida primaarisiin tai sekundaarisiin soluihin yhdessä kohdentavan DNA-sekvenssin kanssa käyttäen tässä kuvattuja menetelmiä.

Transfektio ja homologinen rekombinaatio

Esillä olevan menetelmän mukaisesti rakenne viedään sisään soluun, kuten primaariseen, sekundaariseen tai kuolemattomaksi tehtyyn soluun, yhtenä DNA-rakenteena tai erillisinä DNA-sekvensseinä, jotka inkorporoituvat transfektoituneen solun kromosomaaliseen tai tuman DNA:han.

Kohdentava DNA-rakenne, joka sisältää kohdentavat sekvenssit, säätelysekvenssin, eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan ja selektiomerkkigeenin (selektiomerkkigeenit), voidaan viedä sisään soluihin yhtenä DNA-rakenteena tai erillisinä rakenteina. DNA-rakenteen kokonaispituus vaihtelee riippuen komponenttien lukumäärästä (kohdentavat sekvenssit, säätelysekvenssit, eksonit, selektiomerkkigeeni ja muut elementit, esimerkiksi) ja näiden kunkin pituudesta. Koko rakenteen pituus on ainakin noin 200 nukleotidia. Lisäksi DNA voidaan viedä sisään lineaarisena, kaksijuosteisena (yhdessä yksijuosteisten alueiden kanssa toisessa tai molemmissa päissä tai ilman niitä), yksijuosteisena tai ympyrän muotoisena.

Mikä tahansa kuvatun keksinnön mukainen rakennetyyppi viedään sitten sisään soluun niin, että saadaan aikaan transfektoitu solu. Transfektoitua solua ylläpide-

tään olosuhteissa, jotka sallivat homologisen rekombinaation, kuten alalla tunnetaan [Capecchi, M.R. Science 244: 1288 -1292 (1982)]. Kun homologisesti rekombinanttia solua ylläpidetään olosuhteissa, jotka ovat riittäviä DNA:n transkriptioon, kohdentavan rakenteen tuoma säätelyalue aktivoi transkription, kuten on laita promoottorin tapauksessa.

DNA-rakenteet voidaan viedä soluihin erilaisilla fysikaalisilla tai kemiallisilla menetelmillä sisältäen elektroporaation, mikroinjektion, mikroammuspommituksen, kalsiumfosfaattisaostuksen ja liposomi-, polybreeni- tai DEAE-dekstraani-välitteisen transfektion. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää infektiivisiä vektoreita, kuten retroviruksen, herpesviruksen, adenoviruksen, adenovirukseen assosioituneita, sikotautiviruksen ja polioviruksen vektoreita, DNA:n sisäänviemiseksi.

Vaihtoehtoisesti kohdentava DNA voidaan viedä sisään soluun kahtena tai useampana DNA-fragmenttina. Tapauksessa, jossa käytetään kahta fragmenttia, näissä kahdessa fragmentissa on DNA-sekvenssihomologia (päällekkäinmenevyys) toisen fragmentin 3'-päässä ja toisen fragmentin 5'-päässä, kun taas toisessa on ensimmäinen kohdentava sekvenssi ja toisessa on toinen kohdentava sekvenssi. Kun viedään sisään soluun, nämä kaksi fragmenttia voivat läpikäydä homologisen rekombinaation niin, että ne muodostavat yhden fragmentin, jossa ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi ovat kahden alkuperäisen fragmentin päällekkäinmenevän alueen vieressä. Sitten tuotefragmentti on muodossa, joka on sopiva homologiselle rekombinaatiolle solun kohdesekvenssien kanssa. Useampaa kuin yhtä fragmenttia voidaan käyttää, jotka on suunniteltu niin, että ne läpikäyvät homologisen rekombinaation toistensa kanssa niin, että ne muodostavat lopulta tuotteen, joka on sopiva homologista rekombinaatiota varten solun kohdesekvenssien kanssa, kuten yllä on kuvattu.

Homologisesti rekombinantit solut

Kohdennustapahtuma johtaa kohdentavan rakenteen säätelysekvenssin insertioon, joka sijoittaa endogeenisen geenin niiden säätelyn alaisuuteen (esimerkiksi insertoimalla joko promoottori tai tehostaja, tai molemmat, endogeenisen geenin tai säätelyalueen ylävirtaan). Vaihtoehtoisesti kohdennustapahtuma voi samanaikaisesti johtaa endogeenisen säätelyelementin deleetioon, kuten kudosspesifisen negatiivisen säätelyelementin deleetioon. Kohdennustapahtuma voi korvata olemassa olevan elementin; esimerkiksi kudosspesifinen tehostaja voi korvautua tehostajalla, jolla on laajempi tai erilainen solutyyppispesifisyys kuin luonnollisesti esiintyvillä elementeillä, tai joka osoittaa sellaisen säätely- tai induktiokuvion, joka on erilainen vastaavan transfektoimattoman solun kuviosta. Tässä suoritustavassa luonnollisesti esiintyvät sekvenssit deletoidaan ja uudet sekvenssit lisätään. Vaihtoehtoisesti endogeenisia säätelyelementtejä ei poisteta tai korvata vaan ne hajotetaan tai niitä vaurioitetaan kohdennustapahtumalla, kuten kohdentamalla eksogeeniset sekvenssit endogeenisiin säätelyelementteihin.

Kun DNA on viety soluihin, solua ylläpidetään olosuhteissa, jotka ovat sopivia niin, että homologinen rekombinaatio tapahtuu genomisen DNA:n ja sisäänviedyn DNA:n osan kanssa, kuten alalla tunnetaan [Capecchi, M.R. Science 244: 1288 - 1292 (1989)].

Homologinen rekombinaatio genomisen DNA:n ja sisäänviedyn DNA:n välillä johtaa homologisesti rekombinanttiin soluun, kuten home-, kasvi- tai eläinsoluun, ja erityisesti primaariseen, sekundaariseen tai kuolemattomaksi tehtyyn ihmisen tai muun nisäkkään soluun, jossa sekvenssit, jotka muuttavat endogeenisen geenin ekspressiota, ovat toiminnallisesti liitettyjä tuotetta koodittavaan endogeeniseen geeniin, joka muodostaa uuden transkriptioyksikön, jolla on sellainen ekspressio- ja/tai koodauspo-

tentiaali, joka on erilainen kuin endogeenisen geenin vastaava. Erikoisesti keksintö sisältää homologisesti rekombinantin solun, joka sisältää säätelysekvenssit ja eksonin, joiden vieressä on silmukoinnin luovuttajakohta, jotka viedään sisään ennalta määrättyyn kohtaan kohdentavalla DNA-rakenteella, ja jotka liitetään toiminnallisesti endogeenisen geenin toiseen eksoniin. Vaihtoehtoisesti mihin tahansa endogeenisen geenin eksoniin voi olla toiminnallisesti liitettynä useita eksogeenisiä eksoneita (koodittavia tai ei-koodittavia) ja introneita. Tuloksena syntyneitä homologisesti rekombinantteja soluja viljellään olosuhteissa, joilla selektoidaan, jos on sopivaa, sen DNA:n amplikaatio, joka koodittaa amplifioituvaa merkkiä ja uutta transkriptioyksikköä. Amplifikaation kanssa tai ilman sitä tällä menetelmällä tuotettuja soluja voidaan viljellä olosuhteissa, jotka alalla tunnetaan, jotka ovat sopivia proteiinin ekspressiolle niin, että näin tuotetaan proteiinia in vitro, tai soluja voidaan käyttää terapeuttisen proteiinin in vivo antoon (se on, geeniterapiaan).

Tässä käytettynä termi primaarinen solu sisältää solut, jotka ovat läsnä sellaisessa solususpensiossa, joka on eristetty selkärankaisen kudoslähteestä (ennen niiden maljausta, se on, kiinnittymistä kudosviljelyalustaan, kuten maljaan tai pulloon), solut, jotka ovat läsnä kudoksesta saadussa kudosviljelmässä, molempien edellä olevien solutyyppien ollessa maljattu ensimmäistä kertaa, ja solususpensioissa, jotka ovat peräisin näistä maljatuista soluista. Termit sekudaarinen solu tai sekundaariset solukannat viittaavat soluihin, jotka ovat läsnä seuraavissa viljelyvaiheissa. Se tarkoittaa, että kun maljattu primaarinen solu poistetaan viljelyalustasta ensimmäistä kertaa ja maljataan uudelleen (nuorennetaan), sitä pidetään tässä sekundaarisena soluna, kuten pidetään soluja myöhemmissä nuorennusvaiheissa. Sekundaariset solut ovat solukantoja, jotka sisältävät sekundaarisia soluja, jotka on nuorennet-

tu yhden tai useamman kerran. Solukanta sisältää sekundaariset solut, jotka: 1) on nuorennettu yhden tai useamman kerran; 2) sisältävät tietyn keskimääräisen populaatiokahdentumisen määrän viljelmässä; 3) sisältävät kosketusinhibitio-, ankkurointiriippuvaiset kasvuominaisuudet (ankkurointiriippuvaisuus ei koske soluja, joita viljellään suspensioviljelmässä) ja 4) eivät ole tehty kuolemattomiksi.

Kuolemattomiksi tehdyt solut ovat solulinjoja (päinvastoin kuin solukannat niin, että termi "kanta" on varattu primaarisille ja sekundaarisille soluille), joiden kriittinen ominaisuus on se, että ne sisältävät ilmeisesti rajoittamattoman elinajan viljelmässä.

Esillä olevaa menetelmää varten valitut solut jakaantuvat neljäntyyppisiin ryhmiin: 1) solut, jotka eivät tavallisesti tee tai sisällä proteiinia tai tuotetta (kuten proteiinia, jota ei normaalisti ekspressoida solussa tai fuusioproteiinia, jota ei normaalisti löydetä luonnosta), 2) solut, jotka tekevät tai sisältävät proteiinia tai tuotetta, mutta määrinä, jotka ovat erilaisia kuin halutut (kuten määrinä, jotka ovat matalampia kuin fysiologisesti normaalit matalammat tasot kuin solulla tavallisesti), 3) solut, jotka tekevät proteiinia tai tuotetta fysiologisesti normaaleina tasoina solulle kuten tavallista, mutta joita lisätään tai tehostetaan niiden sisällön tai tuoton suhteen ja 4) solut, joissa halutaan muuttaa proteiinia koodittavan geenin säätely- tai induktiokuviota.

Esillä olevalla menetelmällä transfektoitavat primaariset, sekundaariset ja kuolemattomiksi tehdyt solut voidaan saada erilaisista kudoksista ja ne sisältävät kaikki solutyypit, joita voidaan ylläpitää viljelmässä. Esimerkiksi primaariset ja sekundaariset solut, jotka voidaan transfektoida esillä olevalla menetelmällä, sisältävät fibroblastit, keratinosyytit, epiteelisolut (esim. nisäkkään epiteelisolut, suolen epiteelisolut), endoteelisolut, gliasolut, hermosolut, veren muodostuneet elementit

(esim. lymfosyytit, luuydinsolut), lihassolut ja näiden somaattisten solutyyppien esiastemuodot. Kun homologisesti rekombinantteja soluja käytetään geeniterapiassa, primaariset solut muodostetaan suositeltavasti yksilöstä, jolle transfektoidut primaariset tai sekundaariset solut annetaan. Primaariset solut voidaan kuitenkin saada saman lajin luovuttajasta (muusta kuin vastaanottajasta).

Homologisesti rekombinantit kuolemattomiksi tehdyt solut voidaan tuottaa myös esillä olevalla menetelmällä ja niitä voidaan käyttää joko proteiinin tuottoon tai geeniterapiaan. Esimerkit kuolemattomiksi tehdyistä ihmisen solulinjoista, jotka ovat käyttökelpoisia proteiinin tuottoon tai geeniterapiaan esillä olevan keksinnön mukaisesti, sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, HT1080-solut (ATCC CCL 121), HeLa-solut ja HeLa-solujen johdannaiset (ATCC CCL 2, 2.1 ja 2.2), MCF-7-rintasyöpäsolut (ATCC BTH 22), K-562-leukemiasolut (ATCC CCL 243), KB-karsinoomasolut (ATCC CCL 17), munasarjan 2780AD-karsinoomasolut [Van der Blick, A.M. et al. Cancer Res. 48: 5927 - 5932 (1988)], Raji-solut (ATCC CCL 86), Jurkat-solut (ATCC TIB 152), Namalwa-solut (ATCC CRL 1432), HL-60-solut (ATCC CCL 240), Daudi-solut (ATCC CCL 213), RPMI 8226 -solut (ATCC CCL 155), U-937-solut (ATCC CRL 1593), Bowes-melanoomasolut (ATCC CRL 9607), WI-38VA13-solujen alalinjan 2R4-solut (ATCC CLL 75.1) ja MOLT-4-solut (ATCC CRL 1582) kuten myös heterohybridoomasolut, jotka on tuotettu fuusioimalla ihmisen solut ja toisen lajin solut. Sekundaarisia ihmisen fibroblastikantoja, kuten WI-38 (ATCC CCL 75) ja MRC-5 (ATCC CCL 171), voidaan käyttää. Lisäksi primaarisia, sekundaarisia tai kuolemattomiksi tehtyjä ihmisen soluja kuten myös primaarisia, sekundaarisia tai kuolemattomiksi tehtyjä muiden lajien soluja, joilla on geeniamplifikaatio-ominaisuus in vitro, voidaan käyttää in vitro proteiinin tuottoon tai geeniterapiaan.

Menetelmä geenin muuttamiseksi cDNA-kopioksi

Esillä oleva keksintö koskee myös menetelmää, jossa käytetään homologista rekombinaatiota muutettaessa geeni cDNA-kopioksi (geenikopio, jossa ei ole introneita). cDNA-kopio voidaan siirtää hiivaan tai bakteeriin in vitro proteiinituottoa varten, tai cDNA-kopio voidaan insertoida nisäkässoluun in vitro tai in vivo proteiinituottoa varten. Jos cDNA siirretään mikrobisoluihin, kaksi DNA-rakennetta, jotka sisältävät kohdentavat sekvenssit, viedään sisään homologisella rekombinaatiolla, yksi rakenne ylävirtaan terapeuttista proteiinia koodittavasta ihmisen geenistä ja toinen alavirtaan. Esimerkiksi sekvenssit, jotka viedään ylävirtaan, sisältävät DNA-sekvenssit, jotka ovat homologisia genomisille DNA-sekvensseille, jotka sijaitsevat DNA:ssa, joka koodittaa kypsän prosessoidun terapeuttisen proteiinin ensimmäistä aminohappoa, tai sen ylävirrassa; retroviruksen pitkän terminaalisen toisto-alueen (LTR); sekvenssit, jotka koodittavat selektiomerkkiä mikrobisoluille; säätelyelementin, joka toimii mikrobisoluissa ja DNA:n, joka koodittaa leader-peptidiä, joka edistää eritystä mikrobisoluista, yhdessä silmukoinnin luovuttajakohdan kanssa. Ylävirtaan viedyt sekvenssit viedään lähelle sitä genomista DNA:ta ja sen ylävirtaan, joka koodittaa kypsän prosessoidun terapeuttisen proteiinin ensimmäistä aminohappoa. Alavirtaan viedyt sekvenssit sisältävät DNA-sekvenssit, jotka ovat homologisia niille genomisille DNA-sekvensseille, jotka sijaitsevat siinä DNA-kohdassa tai alavirtaan siitä DNA-kohdasta, joka koodittaa kypsän prosessoidun proteiinin viimeistä aminohappoa; mikrobien transkription lopetussekvenssin; sekvenssit, jotka kykenevät ohjaamaan DNA:n replikaatiota mikrobisoluissa ja retroviruksen LTR-alueen. Alavirtaan viedyt sekvenssit viedään sellaisen DNA:n viereen ja alavirtaan siitä, joka koodittaa kypsän prosessoidun terapeuttisen proteiinin lopetuskodonia. Kun nämä kaksi DNA-rakennetta on viety

sisään soluihin, tuloksena syntyneitä soluja ylläpidetään olosuhteissa, jotka ovat sopivia homologiselle rekombinaatiolle sisään viedyn ja genomisen DNA:n välillä niin, että tuotetaan homologisesti rekombinantit solut. Vaihtoehtoisesti toinen tai molemmat DNA-rakenteista voivat koodittaa yhtä tai useampaa merkkiä sellaisten solujen joko positiivista tai negatiivista selektiota varten, jotka sisältävät DNA-rakenteen, ja selektiovaihe voidaan lisätä menetelmään niin, että se tapahtuu sen jälkeen kun toinen tai molemmat DNA-rakenteista on viety sisään soluihin. Vaihtoehtoisesti mikrobisolujen selektiomerkkiä ja sellaisten sekvenssien, jotka kykenevät ohjaamaan DNA-replikaatiota mikrobisoluissa, koodittavat sekvenssit voivat olla läsnä joko ylävirtaan tai alavirtaan kohdentuvassa rakenteessa tai mikrobisolujen selektiomerkki voi olla läsnä alavirtaan kohdentuvassa rakenteessa ja sekvenssit, jotka kykenevät ohjaamaan DNA-replikaatiota mikrobisoluissa, voivat olla läsnä ylävirtaan kohdentuvassa rakenteessa. Sitten homologisesti rekombinantteja soluja viljellään olosuhteissa, jotka ovat sopivia LTR-alueen välityksellä ohjatulle transkriptiolle, prosessoinnille ja terapeuttista proteiinia koodittavan geenin RNA-tuotteen käänteiskopiointireaktiolle. Käänteiskopiointireaktion tuote on DNA-rakenne, joka sisältää intronittoman DNA-kopion, joka koodittaa terapeuttista proteiinia, joka on toiminnallisesti liitetty DNA-sekvensseihin, jotka sisältävät yllä kuvatut kaksi eksogeenistä DNA-rakennetta. Esillä olevalla menetelmällä tuotettu introniton DNA-rakenne viedään sitten mikrobisoluun. Sitten mikrobisolua viljellään olosuhteissa, jotka ovat sopivia terapeuttisen proteiinin ekspressiolle ja eritykselle.

Proteiinin <u>in</u> <u>vivo</u> tuotto

Esillä olevan keksinnön mukaiset homologisesti rekombinantit solut ovat käyttökelpoisia homologisesti rekombinanttien solulinjojen populaatioina, homologisesti rekombinanttien primaaristen tai sekundaaristen solujen

populaatioina, homologisesti rekombinantteina klonaalisina solukantoina tai solulinjoina, homologisesti rekombinantteina heterogeenisinä solukantoina tai solulinjoina ja soluseoksina, joissa on läsnä ainakin yksi edustava solu yhdestä edellä olevasta neljästä homologisesti rekombinantista soluryhmästä. Sellaisia soluja voidaan käyttää kuljetussysteeminä sellaisen yksilön hoitamiseksi, jolla on epänormaali tai epätoivottava tila, joka respondoi terapeuttisen tuotteen antoon, joka on joko: 1) terapeuttinen proteiini (esim. proteiini, jota ei ole, jota tuotetaan normaalia vähemmän suhteessa yksilön fysiologisille tarpeille, joka on defektiivinen tai tehottomasti tai epäsopivasti käytetty yksilössä; proteiini, jolla on uudet toiminnot, kuten entsymaattiset tai kuljetustoiminnot) tai 2) terapeuttinen nukleiinihappo (esim. RNA, joka inhiboi geeniekspressiota tai jolla on sisäistä entsymaattista aktiivisuutta). Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä, jossa esitetään terapeuttinen proteiini tai nukleiinihappo, homologisesti rekombinantteja primaarisia soluja, klonaalisia solukantoja tai heterogeenisiä solukantoja annetaan yksilölle, jolla olevaa epänormaalia tai epätoivottavaa tilaa hoidetaan tai se estetään, riittävässä määrin ja sopivalla reitillä niin, että proteiinia tai eksogeenistä DNA:ta ekspressoidaan tai se tehdään saatavaksi fysiologisesti relevanteilla tasoilla. Fysiologisesti relevantti taso on sellainen, joka on suurin piirtein sama taso, jolla tuotetta normaalisti tuotetaan kehossa, tai joka johtaa epänormaalin tai epätoivottavan tilan paranemiseen. Tässä kuvatun keksinnön suoritustavan mukaisesti annettavat homologisesti rekombinantit kuolemattomiksi tehdyt solulinjat voidaan sulkea yhteen tai useampaan puoliläpäisevän estokuoren sisältävään laitteeseen. Laitteen läpäisevyysominaisuudet ovat sellaiset, että soluja estetään poistumasta laitteesta istutettaessa ne eläimeen, mutta terapeuttinen tuote läpäisee vapaasti ja voi poistua

estokuoren sisältävästä laitteesta ja saapua paikalliseen tilaan, joka ympäröi istutetta tai saapua systeemiseen verenkiertoon. Esimerkiksi hGH-proteiinia, hEPO-proteiinia, ihmisen insulinotropiinia, hGM-CSF-proteiinia, hG-CSF-proteiinia, ihmisen α-interferonia tai ihmisen FSHß-proteiinia voidaan antaa systeemisesti ihmisille terapeuttisia vaikutuksia varten.

Estokuoren sisältävät laitteet ovat erityisen käyttökelpoisia ja sallivat sen, että homologisesti rekombinantit kuolemattomiksi tehdyt solut, homologisesti rekombinantit toisen lajin solut (homologisesti rekombinantit ksenogeeniset solut) tai histokompatibiliteetin suhteen yhteensopimattomasta luovuttajasta peräisin olevat solut (homologisesti rekombinantit allogeeniset solut) voidaan istuttaa ihmisen tai eläimen tautien hoitamiseksi tai maanviljelyskäyttöjä varten (se on, lihan tuotto ja meijerituotto). Estokuoren sisältävät laitteet sallivat myös helpon lyhytaikaisen (se on, väliaikaisen) terapian esittämällä helpon menetelmän solujen poistamiseksi, silloin kun hoito lopetetaan jostain syystä.

Useita synteettisiä, puolisynteettisiä tai luonnollisia suodatinmembraaneja voidaan käyttää tähän tarkoitukseen sisältäen, mutta ei rajoittuen, selluloosan, selluloosa-asetaatin, nitroselluloosan, polysulfonin, polyvinylideenidifluoridin, polyvinyylikloridipolymeerit ja polyvinyylikloridijohdannaisten polymeerit. Estokuoren sisältäviä laitteita voidaan käyttää primaaristen, sekundaaristen tai kuolemattomiksi tehtyjen muiden lajien solujen käytön sallimiseksi ihmisten geeniterapiassa.

In vitro proteiinin tuotto

Tämän keksinnön mukaisia ihmisestä tai muusta lajista kuin ihmisestä peräisin olevia homologisesti rekombinantteja soluja voidaan myös käyttää in vitro proteiinin tuottoon. Soluja ylläpidetään alalla tunnetuissa olosuhteissa, jotka johtavat proteiinin ekspressioon. Kuvatuilla

menetelmillä ekspressoidut proteiinit voidaan puhdistaa solulysaateista tai solusupernatanteista halutun proteiinin puhdistamiseksi. Tämän menetelmän mukaisesti tehdyt proteiinit sisältävät terapeuttiset proteiinit, joita voidaan antaa ihmiselle tai muulle eläimelle kuin ihmiselle, tavanomaisilla farmaseuttisilla reiteillä, jotka alalla tunnetaan (se on, suun kautta, suonensisäisesti, lihaksensisäisesti, nenän kautta tai ihonalaisesti). Sellaiset proteiinit sisältävät hGH-proteiinin, hEPO-proteiinin ja ihmisen insulinotropiinin, hGM-CSF-proteiinin, hG-CSF-proteiinin, FSHß-proteiinin tai α-interferonin. Nämä solut voivat olla kuolemattomiksi tehtyjä, primaarisia tai sekundaarisia soluja. Muiden lajien solujen käyttö voi olla toivottavaa tapauksissa, joissa muut kuin ihmisen solut ovat edullisia proteiinin tuottotarkoituksia varten, joissa muun kuin ihmisen proteiini on terapeuttisesti tai kaupallisesti käyttökelpoinen, esimerkiksi sellaisten solujen käyttö, jotka ovat peräisin lohesta lohen kalsitoniinin tuottamiseksi, sellaisten solujen käyttö, jotka ovat peräisin sioista sian insuliinin tuottamiseksi ja naudan solujen käyttö naudan kasvuhormonin tuottamiseksi.

Edut

Esillä olevan keksinnön mukaiset menetelmät, DNA-rakenteet, solut ja tuloksena syntyneet proteiinit sisältävät monimuotoisuuden ja monia muita etuja niihin menetelmiin verrattuna, joita tällä hetkellä käytetään geenikohdennuksen alalla. Kyky aktivoida endogeeninen geeni sijoittamalla eksogeeninen säätelysekvenssi eri kohtiin vaihdellen juuri halutun geenin vierestä (suoraan fuusioitu normaalin geenin transkriptoituun alueeseen) 30 kiloemäksen päähän tai ylemmäksi endogeenisen geenin transkriptoidusta alueesta tai endogeenisen geenin introniin, on edullista geenilekspressiolle soluissa. Sitä voidaan käyttää esimerkiksi sijoittamaan säätelyelementti ylävirtaan tai alavirtaan alueista, jotka normaalisti hiljentä-

vät tai negatiivisesti säätelevät geeniä. Säätelyelementin sijoittaminen ylävirtaan tai alavirtaan sellaisesta alueesta voi kumota sellaiset dominantit negatiiviset vaikutukset, jotka normaalisti inhiboivat transkriptiota. Lisäksi sellaiset DNA-alueet, jotka normaalisti inhiboivat transkriptiota tai joilla on muutoin tuhoisa vaikutus geenin ekspressioon, voidaan deletoida käyttäen kohdentavia rakenteita, jotka tässä on kuvattu.

Lisäksi, koska promoottoritoiminnan tiedetään riippuvan vahvasti paikallisesta ympäristöstä, suurta määrää erilaisia sijainteja voidaan tutkia sellaisten paikallisten ympäristöjen löytämiseksi, jotka ovat optimaalisia toiminnalle. Kuitenkin, koska ATG-aloituskodonit löydetään usein nisäkkään DNA:sta (noin yhden kerran per 48 emäsparia), transkriptio ei voi yksinkertaisesti alkaa missä tahansa kohdassa geenin ylävirrassa ja tuottaa transkriptia, joka sisältää pitkän leader-sekvenssin, joka edeltää oikeaa ATG-aloituskodonia, koska ATG-kodonien tiheä esiintyminen sellaisessa leader-sekvenssissä estää oikean geenituotteen translaation ja tekee lähetistä käyttökelvottoman. Näin ollen eksogeenisen eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan ja vaihtoehtoisesti intronin ja silmukoinnin vastaanottajakohdan inkorporaatio kohdentaviin rakenteisiin, jotka sisältävät säätelyalueen, sallivat geenieksspression optimoimisen tunnistamalla optimaalinen alue säätelyalueen toiminnalle ilman rajoitusta, jonka aiheuttaa tarve välttää epäsopivia ATG-aloituskodoneita tuotetussa mRNA-molekyylissä. Tämä esittää merkittävästi kohonneen joustavuuden rakenteen sijoittamisessa ja tekee mahdolliseksi useampien eri geenien aktivoimisen. Esillä olevan keksinnön mukaiset DNA-rakenteet ovat myös käyttökelpoisia esimerkiksi menetelmissä, joissa tehdään fuusioproteiineja, joita koodittavat rekombinanttisekvenssit, tai eksogeeniset sekvenssit, ja endogeeniset sekvenssit.

Yllä kuvattu geenikohdennus ja amplifikaatio ovat erityisen käyttökelpoisia muuttamaan sellaisten geenien ekspressiota, jotka muodostavat transkriptioyksiköt, jotka ovat riittävän suuria niin, että niitä on vaikea eristää ja ekspressoida, tai herättämään geenit, joiden koko proteiinia koodittava alue ei ole saatavissa tai jota ei ole kloonattu. Näin ollen yllä kuvatut DNA-rakenteet ovat käyttökelpoisia eksogeenisten säätelyelementtien toiminnalliseksi liittämiseksi endogeenisiin geeneihin tavalla, joka tarkasti määrittää transkriptioyksikön, antaa lopullisesti joustavuutta eksogeenisten säätelyelementtien ja endogeenisten geenien suhteellisen sijainnin suhteen, mahdollistaa erittäin säädellyn systeemin terapeuttista mielenkiintoa sisältävien geenien saamiseksi ja säätelemiseksi.

Esimerkkien selitys

Kuten tässä on kuvattu, patentinhakijat ovat osoittaneet, että DNA voidaan viedä sisään soluihin, kuten primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin selkärankaissoluihin, ja integroida transfektoitujen solujen genomiin homologisella rekombinaatiolla. He ovat edelleen osoittaneet, että eksogeenisellä DNA:lla on haluttu toiminta homologisesti rekombinanteissa (HR) soluissa ja että oikein kohdennetut solut voidaan tunnistaa perustuen tunnistettavaan fenotyyppiin, jonka oikein kohdentunut DNA saa aikaan.

Patentinhakijat kuvaavat plasmidirakenteen, joka on käyttökelpoinen kohdennettaessa tiettyyn lokukseen (HPRT-lokus) ihmisen genomissa, ja selektion, joka perustuu lääkeresitenttiin fenotyyppiin (esimerkki 1a). Tämän plasmidin nimi on pE3Neo ja sen integraatio solun genomissa HPRT-lokukseen tuottaa solut, joiden fenotyyppi on hprt$^-$, 6-TG-resistentti, ja jotka ovat myös G418-resistenttejä. Kuten on kuvattu, he ovat osoittaneet, että pE3Neo toimii oikein geenikohdennuksessa vakiintuneessa ihmisen fibro-

blastisolulinjassa (esimerkki 1b) osoittamalla vakiintuneisiin soluihin viedyn DNA:n sijoittumisen HPRT-geenin eksoniin 3.

Lisäksi patentinhakijat osoittavat geenikohdennuksen primaarisissa ja sekundaarisissa ihmisen ihon fibroblasteissa käyttäen plasmidia pE3Neo (esimerkki 1c). Esillä oleva patenttihakemus osoittaa lisäksi, että DNA:n päiden modifikaatio tehostaa DNA:n kohdentumista genomiseen DNA:han (esimerkit 1c ja 1e). Patentinhakijat kuvaavat myös menetelmät, joilla geeni voidaan insertoida ennalta valittuun kohtaan solun, kuten primaarisen, sekundaarisen tai kuolemattomaksi tehdyn solun, genomissa geenikohdennuksella (esimerkki 1d).

Lisäksi esillä oleva keksintö koskee menetelmää proteiinin tuottamiseksi transfektoituja soluja käyttäen. Menetelmä sisältää vaiheen, jossa solut, kuten primaariset, sekundaariset tai kuolemattomiksi tehdyt solut, transfektoidaan eksogeenisellä DNA:lla, joka koodittaa terapeuttista tuotetta tai DNA:lla, joka riittää kohdentumaan endogeeniseen geeniin, joka koodittaa terapeuttista tuotetta. Esimerkiksi esimerkit 1g, 1h, 1j, 1k, 2, 3, 4 ja 6 - 9 kuvaavat proteiinintuottoa kohdentamalla valittuun endogeeniseen geeniin DNA-sekvenssielementit, jotka muuttavat endogeenisen geenin ekspressiota.

Patentinhakijat kuvaavat myös DNA-rakenteen ja menetelmät sellaisen endogeenisen solugeenin amplifioimiseksi, joka on aktivoitu geenikohdennuksella (esimerkit 3, 6, 8 ja 9).

Esimerkit 1f - 1h, 2, 4 ja 6 kuvaavat suoritustapoja, joissa ihmisen EPO-geenin ylävirrassa olevat normaalit säätelysekvenssit muutetaan niin, että sallitaan hEPO-proteiinin ekspressio primaarisissa tai sekundaarisissa fibroblastikannoissa, jotka eivät ekspressoi EPO-proteiinia tunnistettavina tasoina transfektoitumattomassa tilassaan. Eräässä suoritustavassa kohdennuksen tuote jättää normaa-

lin EPO-proteiinin koskemattomaksi, mutta hiiren metallotioneiinipromoottorin säätelyn alaiseksi. Esimerkit 1i ja 1j osoittavat samanlaisten kohdentavien rakenteiden käytön aktivoimaan endogeenisen kasvuhormonigeenin primaarisissa tai sekundaarisissa ihmisen fibroblasteissa. Muissa suoritustavoissa, jotka on kuvattu EPO-ekspression aktivoimiseksi ihmisen fibroblasteissa, kohdentavien tapahtumien tuotteet ovat kimeerisiä transkriptioyksiköitä, joissa ihmisen kasvuhormonigeenin ensimmäinen eksoni on sijoitettu EPO-geenin eksonien 2 - 5 ylävirtaan. Transkription (jota säätelee hiiren metallotioneiinipromoottori), silmukoinnin ja translaation tuote on proteiini, jossa hEPO-signaalipeptidin aminohapot 1 - 4 on korvattu hGH-proteiinin aminohappojäännöksillä 1 - 3. Tämän proteiinin kimeerinen osa, signaalipeptidi, poistetaan ennen eritystä soluista. Esimerkissä 5 kuvataan kohdentavat rakenteet ja menetelmät sellaisten solujen tuottamiseksi, joissa geeni (intronei-den kanssa) muuttuu sen geenin ekspressoitavaksi cDNA-kopioksi (ilman intron eita), ja sellaisten ekspressoitavien cDNA-molekyylien talteenoton mikrobisoluihin (esim. hiiva- tai bakteerisolut). Esimerkissä 6 kuvataan kohdentavan vektorin rakennus, jolle on annettu nimi pREPO4, sellaisten solujen kaksoisselektoimiseksi, joissa dhfr-geeni on amplifioitunut. Plasmidia pREPO4 on käytetty ihmisen EPO-lokuksen (hEPO) amplifioimiseksi HT1080-soluissa (kuolemattomaksi tehty ihmisen solulinja), sen jälkeen kun endogeeninen hEPO-geeni on aktivoitu homologisella rekombinaatiolla. Kuten on kuvattu, vaiheittainen selektio metotreksaattia sisältävässä alustassa johti 70-kertaiseen kohoamiseen hEPO-tuotossa soluissa, jotka olivat resistenttejä 0,4 μM metotreksaatille.

Esimerkeissä 7 ja 8 kuvataan menetelmät säätelysekvenssin insertoimiseksi ylävirtaan normaalista EPO-promoottorista ja menetelmät EPO-proteiinin tuottamiseksi sellaista rakennetta käyttäen. Lisäksi esimerkissä 8 kuva-

taan kohdennetun EPO-geenin, joka on tuotettu esimerkin 7 menetelmällä, amplifikaatio. Esimerkissä 9 kuvataan menetelmät ihmisen α-interferoni-, GM-CSF-, G-CSF- ja FSHß-geenin kohdentamiseksi niin, että muodostetaan solut, jotka ovat käyttökelpoisia proteiinin tuotossa.

Esimerkit esittävät menetelmät endogeenisten geenien aktivoimiseksi, tai aktivoimiseksi ja amplifioimiseksi geenikohdennuksella, joka ei vaadi kohdegeenien proteiinia koodittavien alueiden manipulaatiota tai muita käyttöjä. Tässä esitettyjä menetelmiä ja DNA-rakenteita tai plasmideja tai niiden modifikaatioita, jotka ovat ilmeisiä alan asiantuntijalle, käyttäen voidaan geeniekspressiota muuttaa soluissa, joilla on sellaiset ominaisuudet, jotka ovat toivottavia in vitro proteiinituotolle (esim. farmaseuttisten proteiinien) tai in vivo proteiinikuljetusmenetelmille (esim. geeniterapia). Kuvioissa 5 ja 6 kuvataan kaksi strategiaa hEPO-geenin transkriptionaaliseksi aktivoimiseksi.

Käyttäen tässä esitettyjä menetelmiä ja DNA-rakenteita tai plasmideja tai niiden modifikaatioita, jotka ovat ilmeisiä alan asiantuntijalle, voidaan eksogeeninen DNA, joka koodittaa terapeuttista tuotetta (esim. proteiinia, ribotsyymiä, anti-sense-RNA-molekyyliä), insertoida ennalta valittuihin kohtiin selkärankaisen (esim. nisäkäs, sekä ihminen että muu kuin ihminen) primaaristen tai sekundaaristen solujen genomiin.

Esillä oleva keksintö kuvataan nyt seuraavin esimerkein, joiden ei ole tarkoitettu olevan millään tavoin rajoittavia.

Esimerkit

Esimerkki 1

Transfektoitujen solukantojen tuotto geenikohdennuksella

Geenikohdennus tapahtuu, kun transfektoitava DNA joko integroituu kromosomaalisiin DNA-sekvensseihin tai

osittain korvaa kromosomaalisia DNA-sekvenssejä homologisella rekombinaatiotapahtumalla. Samalla kun sellaiset tapahtumat voivat tapahtua minkä tahansa annetun transfektiokokeen tapauksessa, ne yleensä peittyvät siihen suureen ylimäärään tapahtumia, joissa plasmidi-DNA integroituu ei-homologisella, tai laittomalla, rekombinaatiolla.

a. Rakenteen, joka on käyttökelpoinen geenikohdennustapahtumien selektoimiseksi ihmisen soluissa, rakennus

Eräs lähestymistapa kohdennustapahtumien selektoimiseksi on geneettinen selektio geenitoiminnan häviämisen suhteen, joka johtuu transfektoivan DNA:n integroitumisesta. Ihmisen HPRT-lokus koodittaa hypoksantiinifosforibosyylitransferaasientsyymiä. Hprt$^-$-solut voidaan selektoida kasvun suhteen alustassa, joka sisältää 6-tioguaniini-nukleosidianalogia (6-TG); solut, joilla on villityypin alleeli (HPRT+), kuolevat 6-TG-yhdisteen johdosta, kun taas solut, joilla on mutanttialleelit (hprt$^-$), voivat jäädä eloon. Solut, joissa on tapahtunut kohdennustapahtumat, jotka hakottavat HPRT-geenitoimintaa, ovat sen vuoksi selektoitavissa 6-TG-alustassa.

HPRT-lokukseen kohdentuvan plasmidin rakentamiseksi 6,9 kb:n HinIII-fragmentti, joka sijaitsee HPRT-sekvenssin kohdissa 11 960 - 18 869 [Genebank-nimi HUMHPRTB; Edwards, A. et al. Genomics 6: 593 - 608 (1990)] ja joka sisältää HPRT-geenin eksonit 2 ja 3, jatkokloonataan pUC12-plasmidin HindIII-kohtaan. Tuloksena syntynyt klooni katkaistaan HPRT-geenifragmentin uniikista XhoI-kohdasta eksonissa 3 ja 1,1 kb:n SalI-XhoI-fragmentti, joka sisältää neo-geenin plasmidista pMC1Neo (Stratagene) insertoidaan, joka hajottaa eksonin 3 koodittavan sekvenssin. Orientaatio, jossa neo-geenin transkription suunta oli päinvastainen kuin HPRT-geenin transkription suunta, valittiin ja sille annettiin nimi pE3Neo. Normaalin HPRT-geenin eksonin 3 korvaaminen neo-geenillä hajotetulla muodolla johtaa hprt$^-$,

6-TG-resistenttiin fenotyyppiin. Sellaiset solut ovat myös G418-resistenttejä.

b. Geenikohdennus vakiintuneeseen ihmisen fibroblastisolulinjaan

Osoitukseksi kohdennuksesta kuolemattomaksi tehdyissä solulinjoissa ja myöskin sen osoittamiseksi, että pE3Neo toimii oikein geenikohdennuksessa, ihmisen fibrosarkoomasolulinja HT1080 (ATCC CCL 121) transfektoitiin pE3Neo-plasmidilla elektroporaatiolla.

HT1080-soluja ylläpidettiin HAT-alustassa (hypoksantiini/aminopteriini/ksantiini), johon oli lisätty DMEM-alustaa yhdessä 15-prosenttisen vasikanseerumin (Hyclone) kanssa ennen elektroporaatiota. Kaksi vuorokautta ennen elektroporaatiota solut muutettiin samaan alustaan ilman aminopteriiniä. Eksponentiaalisesti kasvavat solut trypsinoitiin ja ne laimennettiin alustaan, joka oli DMEM/15 % vasikanseerumi, sentrifugoitiin ja suspendoitiin PBS:ään (fosfaatilla puskuroitu suolaliuos) niin, että lopullinen solutilavuus oli 13,3 miljoonaa solua per ml. Plasmidi pE3Neo digestoitiin HindIII-entsyymillä, joka erotti 8 kb:n pituisen HPRT-Neo-fragmentin pUC12-rungosta, puhdistettiin fenoliuutolla ja etanolisaostuksella ja suspendoitiin uudelleen konsentraatioksi 600 µg/ml. 50 µl (30 µg) lisättiin elektroporaatiokyvettiin (0,4 cm:n elektrodiväli; Bio-Rad Laboratories) yhdessä 750 µl:n kanssa solususpensiota (10 miljoonaa solua). Elektroporaatio suoritettiin 450 voltilla, 250 µfaradilla (Bio-Rad Gene Pulser; Bio-Rad Laboratories). Kyvettien sisältö lisättiin välittömästi DMEM-alustaan, jossa oli 15 % vasikanseerumia niin, että saatiin aikaan solususpensio, jossa oli miljoona solua per 25 ml alustaa. 25 ml käsiteltyä solususpensiota maljattiin 150 mm:n läpimittaisille kudosviljelymaljoille ja niitä inkuboitiin 37 °C:ssa, 5-%:isessa CO_2:ssa. 24 tuntia myöhemmin lisättiin G418-liuos suoraan maljoille niin, että saatiin lopullinen konsentraatio, joka oli 800

µg G418-yhdistettä/ml. Viisi vuorokautta myöhemmin alusta korvattiin liuoksella, joka oli DMEM/15 % vasikanseerumi/ 800 µg G418-yhdistettä/ml. Yhdeksän vuorokautta elektroporaation jälkeen alusta korvattiin liuoksella, joka oli DMEM/15 % vasikanseerumi/800 µg G418-yhdistettä/ml ja 10 µM 6-tioguaniini. G418- ja 6-TG-yhdisteelle resistentit pesäkkeet poimittiin käyttäen kloonaussylintereitä 14 - 16 vuorokautta sen jälkeen, kun kaksoisselektio aloitettiin.

Viiden edustavan kohdennuskokeen tulokset HT1080-soluilla on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Transfektio	Käsiteltyjen solujen määrä	$G418^r$ $6\text{-}TG^r$ kloonien määrä
1	1×10^7	32
2	1×10^7	28
3	1×10^7	24
4	1×10^7	32
5	1×10^7	66

Transfektiossa 5 verrokkimaljat, jotka oli suunniteltu niin, että niillä määritettiin $G418^r$-pesäkkeiden kokonaissaanto, osoittivat, että 1×10^7 alkuperäisestä käsitellystä solusta voitiin muodostaa 33 700 $G418^r$-pesäkettä. Näin ollen kohdennettujen tapahtumien suhde ei-kohdennettuihin tapahtumiin on 66/33 700 tai 1:510. Viidessä yhdistetyssä kokeessa kohdennetut tapahtumat syntyvät frekvenssillä $3{,}6 \times 10^6$ tai 0,00036 % käsiteltyjä soluja.

Restriktioentsyymi- ja Southern-hybridisaatiokokeet käyttäen koettimia, jotka olivat peräisin neo- ja HPRT-geeneistä, sijoittivat neo-geenin HPRT-lokukseen ennustettuun kohtaan HPRT-eksonissa 3.

c. Geenikohdennus primaarisissa ja sekundaarisissa ihmisen ihon fibroblasteissa

Plasmidi pE3Neo digestoitiin HindIII-entsyymillä, joka erottaa 8 kb:n pituisen HPRT-neo-fragmentin pUC12-rungosta, ja puhdistettiin fenoliuutolla ja etanolisaostuksella. DNA suspendoitiin konsentraatioksi 2 mg/ml. Kolme miljoonaa sekundaarista ihmisen esinahkan fibroblastisolua 0,5 ml tilavuudessa elektroporoitiin 250 voltilla ja 960 µfaradilla käyttäen 100 µg:aa HindIII-digestoitua pE3Neo-plasmidia (50 µl). Suoritettiin kolme eri transfektiota niin, että yhteensä käsiteltiin yhdeksän miljoonaa solua. Solut prosessoitiin ja selektoitiin G418-resistenssin suhteen. 500 000 solua per 150 mm:n viljelymalja maljattiin G418-selektiota varten. Kun on ollut 10 vuorokautta selektiossa, viljelyalusta korvataan ihmisen fibroblastiravintoalustalla, joka sisältää 400 µg G418-yhdistettä/ml ja 10 µM 6-TG-yhdistettä. Selektiota kahden lääkkeen yhdistelmällä jatketaan 10 lisävuorokautta. Maljat skandeerataan mikroskooppisesti sellaisten ihmisen fibroblastipesäkkeiden paikantamiseksi, jotka ovat resistenttejä molemmille lääkkeille. $G418^r$ $t\text{-}TG^r$ -pesäkkeiden fraktio on neljä yhdeksässä miljoonassa käsitellyssä solussa. Nämä pesäkkeet muodostavat 0,0001 % (tai yhden miljoonasta) kaikista soluista, jotka kykenevät muodostamaan pesäkkeitä. Verrokkimaljat, jotka suunniteltiin niin, että niillä määritettiin $G418^r$-pesäkkeiden kokonaismäärä, osoittivat, että 9×10^6 alkuperäisestä käsitellystä solusta voitiin muodostaa 2 850 $G418^r$-pesäkettä. Näin ollen kohdennustapahtumien suhde ei-kohdennustapahtumiin on 4/2 850 tai 1:712. Restriktioentsyymi- ja Southern-hybridisaatiokokeet käyttäen koettimia, jotka olivat peräisin neo- ja HPRT-geeneistä, käytettiin paikantamaan neo-geeni HPRT-lokuksen ennustettuun kohtaan HPRT-eksonissa 3 ja ne osoittivat, että kohdentuminen oli tapahtunut näissä neljässä klonaalisessa solukannassa. Molemmille lääkkeille resistentit

pesäkkeet on myös eristetty transfektoimalla primaariset solut ($1/3,0 \times 10^7$).

Useiden pE3Neo-kohdennuskokeiden tuloksista on yhteenveto taulukossa 2. HindIII-digestoitu pE3Neo transfektoitiin joko suoraan tai sitä käsiteltiin eksonukleaasi III -entsyymillä niin, että muodostettiin yksijuosteiset ylimenevät 5'-juosteet, ennen transfektiota (katso esimerkki 1c). DNA-valmisteet, joiden yksijuosteiset alueet vaihtelivat pituudeltaan 175 - 930 emäsparin välillä, testattiin. Käyttäen sellaista plasmidia pE3Neo yksinään, joka oli digestoitu HindIII-entsyymillä, tunnistettiin 1/799 G418-resistenttiä pesäkettä restriktioentsyymi- ja Southern-hybridisaatioanalyysillä, joissa neo-geenin insertio oli kohdentunut HPRT-lokukseen (yhteensä 24 kohdennettua kloonia eristettiin). Kohdennus stimuloitui maksimaalisesti (noin 10-kertainen stimulaatio), kun käytettiin ylimeneviä juosteita päissä, joiden pituus oli 175 bp niin, että 1/80 $G418^r$-pesäkettä sisälsivät restriktiofragmentit, jotka osoittavat kohdentumisen tapahtuneen HPRT-geeniin (yhteensä yhdeksän kohdentunutta kloonia eristettiin). Näin ollen käyttäen tässä kuvattuja olosuhteita ja yhdistelmä-DNA-rakenteita, kohdennus on helppo tunnistaa normaaleissa ihmisen fibroblasteissa ja kohdennuksen kokonaisfrekvenssi (kohdennettujen kloonien määrä jaettuna sellaisten kloonien kokonaismäärällä, jotka on stabiilisti transfektoitu G418-resistenteiksi) voidaan stimuloida transfektoimalla sellaisilla kohdentavilla rakenteilla, jotka sisältävät yksijuosteiset ylimenevät hännät, esimerkissä 1e kuvatulla menetelmällä.

Taulukko 2

Kohdennus HPRT-lokukseen ihmisen fibroblasteissa

pE3neo-käsittely	Kokeiden määrä	Kohdentuneet per $G418^r$-pesäke -määrä	Kohdennettujen kloonien kokonaismäärä
HindIII-digesti	6	1/799	24
175 bp:n yksijuosteinen osa	1	1/80	9
350 bp:n yksijuosteinen osa	3	1/117	20
930 bp:n yksijuosteinen osa	1	1/144	1

d. Terapeuttisesti mielenkiintoisen geenin ihmisen genomiin kohdennettua insertiota varten käytettävän rakenteen muodostus ja sen käyttö geenikohdennuksessa

Plasmidin pE3Neo muunnosta, jossa terapeuttista mielenkiintoa oleva geeni on insertoitu HPRT-geenin koodittavalle alueelle neo-geenin viereen tai lähelle sitä, voidaan käyttää kohdentamaan terapeuttista mielenkiintoa sisältävä geeni spesifiseen kohtaan vastaanottajan primaarisen tai sekundaarisen solun genomiin. Sellainen plasmidin pE3Neo muunnos voidaan rakentaa hGH-geenin kohdentamiseksi HPRT-lokukseen.

Plasmidi pXGH5 (kaaviokuva kuviossa 3) digestoidaan EcoRI-entsyymillä ja 4,1 kb:n pituinen fragmentti, joka sisältää hGH-geenin ja siihen liitetyn hiiren metallotioneiinipromoottorin (mMT), eristetään. EcoRI-kohdan ylimenevät juosteet täytetään E. coli DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla. Plasmidi pE3Neo digestoidaan erikseen XhoI-entsyymillä, joka katkaisee neo-fragmentin ja HPRT-eksonin 3 rajakohdasta (eksoniin 3 tehdyn insertion 3'-rajakohdasta). Linearisoidun plasmidin XhoI-kohdan ylimenevät juosteet täytetään E. coli DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla ja tuloksena syntynyt fragmentti ligatoidaan 4,1 kb:n

pituiseen tasapäistettyyn hGH-mMT-fragmenttiin. Ligaatioseoksesta saadut bakteeripesäkkeet seulotaan restriktioentsyymianalyysillä hGH-mMT-fragmentin yksittäiskopioinsertin suhteen ja valitaan sellainen orientaatio, jossa hGH-geeni transkriptoidaan samaan suuntaan kuin neo-geeni, ja sille annetaan nimi pE3Neo/hGH. Plasmidi pE3Neo/hGH digestoidaan HindIII-entsyymillä, joka vapauttaa 12,1 kb:n pituisen fragmentin, joka sisältää HPRT-, neo- ja mMT-hGH-sekvenssit. Digestoitua DNA:ta käsitellään ja se transfektoidaan primaarisiin tai sekundaarisiin ihmisen fibroblasteihin, kuten on kuvattu esimerkissä 1c. $G418^r$ TG^r -pesäkkeet selektoidaan ja analysoidaan HPRT-geeniin kohdentuneiden mMT-hGH- ja neo-sekvenssien insertion suhteen, kuten on kuvattu esimerkissä 1c. Yksittäiset pesäkkeet testataan hGH-ekspression suhteen käyttäen kaupallisesti saatavaa immuunitestiä (Nichols Institute).

Sekundaariset ihmisen fibroblastit transfektoitiin pE3Neo/hGH-rakenteella ja tioguaniiniresistentit pesäkkeet analysoitiin stabiilin hGH-ekspression suhteen ja restriktioentsyymi- ja Southern-hybridisaatioanalyysillä. 13:sta analysoidusta TG^r-pesäkkeestä kahdeksassa pesäkkeessä tunnistettiin hGH-geenin insertio endogeeniseen HPRT-lokukseen. Kaikki kahdeksan kantaa ekspressoivat stabiilisti merkittäviä määriä hGH-proteiinia niin, että keskimääräinen ekspressiotaso oli 22,7 $\mu g/10^6$ solua/24 tuntia. Vaihtoehtoisesti kuvion 4 mukaista plasmidia pE3neoEPO voidaan käyttää kohdentamaan EPO-geeni ihmisen HPRT-lokukseen.

Homologisen rekombinaation käyttö kohdentamaan terapeuttista mielenkiintoa sisältävä geeni spesifiseen kohtaan solun genomista DNA:ta voidaan laajentaa ja tehdä käyttökelpoiseksi tuotteiden tuottamiseksi terapeuttisia tarkoituksia varten (esim. farmaseuttisia aineita, geeniterapia) insertoimalla geeni, jonka avulla solut, jotka sisältävät geenin amplifioituneet kopiot, voidaan selektoida altistamalla solut sopivalle lääkeselektio-ohjelmal-

le. Esimerkiksi rakennetta pE3neo/hGH (esimerkki 1d) voidaan modifioida insertoimalla dhfr-, ada- tai CAD-geeni kohtaan, joka sijaitsee juuri hGH- tai neo-geenien vieressä rakenteessa pE3neo/hGH. Primaariset, sekundaariset tai kuolemattomiksi tehdyt solut transfektoidaan sellaisella plasmidilla ja oikein kohdentuneet tapahtumat tunnistetaan. Näitä soluja käsitellään edelleen kohoavilla konsentraatioilla lääkkeitä, jotka sopivat sellaisten solujen selektoimiseksi, jotka sisältävät amplifioituneet geenit [dhfr-geeniä varten selektioaine on metotreksaatti, CAD-geeniä varten selektioaine on N-fosfonasetyyli)-L-aspartaatti (PALA) ja ada-geeniä varten selektioaine on adeniininukleosidi (esim. alanosiini)]. Tällä tavalla terapeuttista mielenkiintoa sisältävän geenin integraatio amplifioituu yhtä aikaa yhdessä sellaisen geenin kanssa, jonka amplifioituja kopioita selektoidaan. Näin ollen solujen geneettistä manipulaatiota niin, että ne tuottavat geenejä terapeuttisia tarkoituksia varten, voidaan helposti kontrolloida valitsemalla ennalta kohta, johon kohdentava rakenne integroituu ja jossa amplifioituneet kopiot sijaitsevat amplifioituneissa soluissa.

e. DNA:n päiden modifikaatio kohdennuksen tehostamiseksi

Useat erilaiset todisteet antavat ehdottaa, että tiettyihin homologisiin rekombinaatioreitteihin E. coli -bakteerissa, bakteriofagissa, S. cerevisiae -hiivassa ja Xenopus laevis -organismissa ottaa osaa ylimenevät 3'-juosteet päissä. Xenopus laevis -oosyyteissä molekyylit, joissa on useiden satojen emäsparien pituiset ylimenevät 3'-juosteet, läpikävivät rekombinaation samalla tavalla käsiteltyjen molekyylien kanssa paljon nopeammin mikroinjektion jälkeen kuin molekyylit, joissa oli hyvin lyhyet ylimenevät juosteet päissä (4 bp), jotka oli muodostettu restriktioentsyymidigestiolla. Hiivassa useiden satojen emäsparien pituisten ylimenevien 3'-juosteiden muodostus

päihin tuntuu olevan nopeutta rajoittava vaihe meioottisessa rekombinaatiossa. Mitään todistetta ylimenevien 3'-juosteiden osallistumisesta rekombinaatioon ihmisen soluissa ei ole julkaistu ja yhdessäkään tapauksessa ei minkäänlaisen modifioidun DNA-substraatin ole osoitettu edistävän kohdennusta (yksi homologisen rekombinaation muoto) yhdessäkään lajissa. Seuraavassa esimerkissä ja esimerkissä 1c kuvattu koe antaa ehdottaa, että ylimenevät 5'-juosteet päissä ovat tehokkaita stimuloimaan kohdennusta primaarisissa, sekundaarisissa ja kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen fibroblasteissa.

Ei ole mitään julkaisuja kohdennuksen tehostamisesta transfektoivien DNA-molekyylien päitä modifioimalla. Tämä esimerkki toimii kuvaten, että lineaaristen DNA-molekyylien päiden modifikaatio muuttamalla molekyylien päät kaksijuosteisesta muodosta yksijuosteiseen muotoon voi stimuloida kohdennusta primaaristen ja sekundaaristen ihmisen fibroblastien genomiin.

1 100 µg plasmidia pE3Neo (esimerkki 1a) digestoidaan HindIII-entsyymillä. Tätä DNA:ta voidaan käyttää suoraan fenoliuuton ja etanolisaostuksen jälkeen, tai 8 kb:n HindIII-fragmentti, joka sisältää ainoastaan HPRT- ja neogeenin, voidaan erottaa pUC12-vektorin sekvensseistä geelielektroforeesilla. HindIII-digestoidun DNA:n eksoIII-digestio johtaa laajaan eksonukleolyyttiseen digestioon kummassakin päässä niin, että se alkaa kummassakin vapaassa 3'-päässä ja jättää ylimenevät 5'-juosteet päihin. Eksonukleolyyttisen toiminnan laajuutta ja sen vuoksi tuloksena syntyneiden ylimenevien 5'-juosteiden pituutta voidaan kontrolloida vaihtelemalla eksoIII-digestion aikaa. Suoritetaan eksoIII-digestio 100 µg:lla HindIII-digestoitua pE3Neo-plasmidia valmistajan suosittelemissa olosuhteissa ajat, jotka ovat 30 s, 1 min, 1,5 min, 2 min, 2,5 min, 3 min, 3,5 min, 4 min, 4,5 min ja 5 min. Digestion laajuuden tarkkailemiseksi kustakin aikapisteestä olevaa

pientä määrää, joka sisältää 1 μg:n eksoIII-käsiteltyä DNA:ta, käsitellään mungopavun nukleaasilla (Promega) valmistajan suosittelemissa olosuhteissa, ja näytteet fraktioidaan geelielektroforeesilla. Ero koossa käsittelemättömän HindIII-digestoidun pE3Neo-plasmidin ja samojen molekyylien kesken, joita on käsitelty eksoIII-entsyymillä ja mungopavun nukleaasilla, mitataan. Tämä kokoero jaettuna kahdella antaa ylimenevän 5'-juosteen keskimääräisen pituuden kummassakin päässä molekyyliä. Käyttäen yllä kuvattuja aikapisteitä ja digestiota 30 °C:ssa tuotettujen ylimenevien 5'-juosteiden tulisi olla pituudeltaan 100 - 1 000 emästä.

60 μg eksoIII-käsiteltyä DNA:ta (pE3Neo-plasmidin HindIII-kokonaisdigesti) kustakin aikapisteestä puhdistetaan ja elektroporoidaan primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin ihmisen fibroblasteihin esimerkissä 1c kuvatuissa olosuhteissa. Se taso, jolla kohdennus tehostuu kullakin eksoIII-käsitellyllä valmisteella, määritetään laskemalla $G418^r$ 6-TG^r -pesäkkeiden määrä ja vertaamalla näitä määriä niihin, jotka saatiin sellaisen HindIII-digestoidun pE3Neo-rakenteen kohdennuksella, jota ei käsitelty eksoIII-entsyymillä.

Ylimenevien 3'-juosteiden vaikutus voidaan myös määrittää käyttäen analogista systeemisä. Tässä tapauksessa HindIII-digestoitua pE3Neo-plasmidia käsitellään bakteriofagi T7 geeni 6 -eksonukleaasilla (United States Biochemicals) vaihtelevia aikajaksoja valmistajan suosittelemissa olosuhteissa. Digestion laajuuden määritys (ylimenevien 3'-juosteiden keskimääräinen pituus per pää) ja elektroporaatio-olosuhteet olivat, kuten on kuvattu eksoIII-käsitellylle DNA:lle. Se taso, jolla kohdennus tehostuu kullakin T7 geeni 6 -eksonukleaasi -käsitellyllä valmisteella, määritetään laskemalla $G418^r$ 6-TG^r -pesäkkeiden määrä ja vertaamalla näitä määriä niihin, jotka saatiin sellaisen HindIII-digestoidun pE3Neo-rakenteen koh-

dennuksella, jota ei käsitelty T7 geeni 6 -eksonukleaasientsyymillä.

Muut menetelmät ylimenevien 5'- ja 3'-juosteiden muodostamiseksi päihin ovat mahdollisia, esimerkiksi kahden lineaarisen molekyylin, jotka menevät osittain päällekkäin toistensa kanssa, denaturaatio ja hybridisaatio muodostavat molekyylien seoksen, joista kussakin molekyylissä on ylimenevät 3'-juosteet molemmissa päissä tai ylimenevät 5'-juostet molemmissa päissä, kuten myös uudelleenhybridisoituneet fragmentit, joita ei voi erottaa lineaarisista aloitusmolekyyleistä. Ylimenevien juosteiden pituudet määritetään sellaisen DNA:n pituutena, joka ei ole yhteistä näiden kahden DNA-fragmentin välillä.

f. Kohdentavien plasmidien rakentaminen ihmisen erytropoietiinigeenin sijoittamiseksi hiiren metallotioneiinipromoottorin säätelyn alaisuuteen primaarisissa, sekundaarisissa ja kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen fibroblasteissa

Seuraava toimii kuvaten yhtä esillä olevan keksinnön suoritustapaa, jossa normaalit positiiviset ja negatiiviset säätelysekvenssit ihmisen erytropoietiinigeenin (hEPO) ylävirrassa muutetaan niin, että sallitaan ihmisen erytropoietiinigeenin ekspressio primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen fibroblasteissa, jotka eivät ekspressoi hEPO-proteiinia merkittävissä määrin tavallisesti.

Alue, joka sijaitsee yksinomaan ylävirtaan ihmisen EPO-geenin kodittavasta alueesta, voidaan amplifioida PCR-menetelmällä. Kolme alukesarjaa, jotka ovat käyttökelpoisia tähän tarkoitukseen, suunniteltiin ihmisen julkaistun EPO-sekvenssin analyysin jälkeen [Genbank koodinimi HUMERPA; Lin, F.K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7580 - 7584 (1985)]. Nämä alukkeet voivat monistaa fragmentit, joiden pituudet ovat 609 bp, 603 bp tai 590 bp.

Taulukko 3

Aluke	Kohta HUMERPA-sekvenssissä	Sekvenssi	Fragmentin koko
F1	2 → 20	5' AGCTTCTGGGCTTCCAGAC (SEQ ID NO 1)	
R2	610 → 595	5' GGGGTCCCTCAGCGAC (SEQ ID NO 2)	609 bp
F2	8 → 24	5' TGGGCTTCCAGACCCAG (SEQ ID NO 3)	
R2	610 → 595	5' GGGGTCCCTCAGCGAC	603 bp
F3	21 → 40	5' CCAGCTACTTTGCGGAACTC (SEQ ID NO 4)	
R2	610 → 595	5' GGGGTCCCTCAGCGAC	590 bp

Nämä kolme fragmenttia menevät oleellisesti päällekkäin ja ovat keskenään vaihdettavissa esillä olevia tarkoituksia varten. 609 bp:n fragmentin, joka ulottuu kohdasta -623 kohtaan -14 suhteessa translaation aloituskohtaan (HUMERPA-sekvenssin nukleotidikohdat 2 - 610), molempiin päihin ligatoidaan ClaI-linkkerit. Tuloksena syntynyt ClaI-linkkeröity fragmentti digestoidaan ClaI-entsyymillä ja insertoidaan ClaI-kohtaan plasmidissa pBluescript II SK/+ (Stratagene) sellaiseen orientaatioon, että HUMERPA-nukleotidikohta 610 on plasmidin polylinkkerialueen SalI-kohdan vieressä. Tämä plasmidi p5'EPO voidaan katkaista erikseen uniikeista FspI- tai SfiI-kohdista ihmisen EPO-fragmentin ylävirrassa (HUMERPA-nukleotidikohdat 150 ja 405, vastaavasti) ja ligatoida hiiren metallotioneiinipromoottoriin. Tyypillisesti 1,8 kb:n pituinen EcoRI-BglII-fragmentti mMT-I-geenistä [joka ei sisällä yhtään mMT-geenin koodittavia sekvenssejä; Hamer, D.H. ja Walling, M., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273 - 288 (1982); tämä

fragmentti voidaan eristää myös tunnetuilla menetelmillä hiiren genomisesta DNA:sta käyttäen PCR-alukkeita, jotka on suunniteltu niitä mMT-sekvenssejä analysoimalla, jotka ovat saatavissa kokoelmasta Genbank; se on, MUSMTI-, MUSMTIP-, MUSMTIPRM-sekvenssit] tehdään tasapäiseksi tunnetuilla menetelmillä ja ligatoidaan SfiI-entsyymillä digestoituun (tehty myös tasapäiseksi) tai FspI-entsyymillä digestoituun plasmidiin p5'EPO. Tuloksena syntyneiden kloonien orientaatiot analysoidaan ja niitä, joissa edellinen mMT-sekvenssin BglII-kohta on plasmidin polylinkkerialueen SalI-kohdan suhteen proksimaalinen, käytetään kohdennukseen primaarisiin ja sekundaarisiin ihmisen fibroblasteihin. Tämä orientaatio ohjaa mMT-transkription kohti HUMERPA-nukleotidikohtaa 610 lopullisessa rakenteessa. Tuloksena syntyneet plasmidit nimetään plasmideiksi p5'EPO-mMTF ja p5'-EPO-mMTS, joissa mMT-sekvenssi on insertoitu FspI- ja SfiI-kohtiin, vastaavasti.

Ylimääräiset ylävirran sekvenssit ovat käyttökelpoisia tapauksissa, joissa on toivottavaa modifioida, deletoida ja/tai korvata negatiiviset säätelyelementit tai tehostajasekvenssit, jotka sijaitsevat ylävirtaan alkuperäisestä kohdesekvenssistä. EPO-tapauksessa negatiivinen säätelyelementti, joka inhiboi EPO-ekspressiota maksan ja munuaisten ulkopuolisissa kudoksissa [Semenza, G.L. et al., Mol. Cell. Biol. 10: 930 - 938 (1990)], voidaan deletoida. Valmistetaan sarja deleetioita 6 kb:n fragmentin sisälle. Deletoidut alueet voidaan korvata tehostajalla, jolla on laaja isäntäsoluaktiivisuus [esim. tehostajasekvenssi sytomegaloviruksesta (CMV)].

609 bp:n pituisen 5'EPO-fragmentin orientaatio vektorissa pBluescript II SK/+ valittiin, koska HUMERPA-sekvenssejä edeltää niiden 5'-päässä BamHI-kohta (distaalinen) ja HindIII-kohta (proksimaalinen). Näin ollen 6 kb:n pituinen BamHI-HindIII-fragmentti, joka normaalisti sijaitsee 609 bp:n pituisen fragmentin ylävirrassa [Semenza,

G.L. et al., Mol. Cell. Biol. 10: 930 - 938 (1990)], voidaan eristää genomisesta DNA:sta tunnetuilla menetelmillä. Esimerkiksi bakteriofagi-, kosmidi- tai hiivan keinotekoisen kromosomin kirjasto voidaan seuloa käyttäen 609 bp:n pituista PCR-menetelmällä monistettua fragmenttia koettimena. Halutussa kloonissa on 6 kb:n pituinen BamHI-HindIII-fragmentti ja sen identiteetti voidaan varmistaa vertaamalla sen restriktiokarttaa siihen restriktiokarttaan, joka on määritetty ihmisen EPO-geenin ympäriltä tunnetuilla menetelmillä. Vaihtoehtoisesti rakentamalla ihmisen EPO-geenin ylävirrassa olevan genomisen alueen restriktiokartta käyttäen 609 bp:n pituista fragmenttia koettimena, voidaan tunnistaa entsyymit, jotka muodostavat fragmentin, joka on peräisin HUMERPA-kohtien 2 ja 609 välistä ja joka ulottuu ylävirran BamHI-kohdan yli; tämä fragmentti voidaan eristää geelielektroforeesilla sopivasta ihmisen genomisen DNA:n digestistä ja ligatoida bakteerin tai hiivan kloonausvektoriin. Oikea klooni hybridisoituu 609 bp:n pituiseen 5'EPO-koettimeen ja sisältää 6 kb:n pituisen BamHI-HindIII-fragmentin. Eristetty 6 kb:n pituinen fragmentti insertoidaan oikeaan orientaatioon p5'EPO-, p5'EPO-mMTF- tai p5'EPO-mMTS-rakenteisiin (niin, että HindIII-kohta on HUMERPA-nukleotidikohdan 2 vieressä). Ylimääräiset ylävirran sekvenssit voidaan eristää tunnetuilla menetelmillä käyttäen kromosomikävelymenetelmiä tai eristämällä hiivan keinotekoiset kromosomit, jotka hybridisoituvat 609 bp:n pituiseen 5'EPO-koettimeen.

Yllä kuvatut kloonausstrategiat sallivat EPO-geenin ylävirran sekvenssien modifioimisen <u>in vitro</u> myöhempää kohdennettua transfektiota varten primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin ihmisen fibroblasteihin. Strategioissa kuvataan yksinkertaiset insertiot mMT-promoottoriin kuten myös negatiivisesti säätelevän alueen deleetion, ja negatiivisesti säätelevän alueen deleetion

ja sen korvaamisen tehostajalla, jolla on laaja isäntäsoluaktiivisuus.

g. Ihmisen EPO-geenin aktivaatio ja kohdennettujen primaaristen, sekundaaristen ja kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen fibroblastien eristys seulonnalla

Kohdennusta varten plasmidit katkaistaan restriktioentsyymeillä, jotka vapauttavat insertin plasmidin rungosta. Plasmidin p5'EPO-mMTS tapauksessa HindIII- ja SalI-digestio vapauttaa kohdentavan 2,4 kb:n pituisen fragmentin, joka sisältää 1,8 kb:n pituisen mMT-promoottorin, jonka vieressä 5'- ja 3'-puolilla on 405 bp:n ja 204 bp:n DNA-sekvenssit, vastaavasti, tämän rakenteen kohdetamiseksi ihmisen EPO-geenin säätelyalueelle. Tämä DNA tai 2,4 kb:n kohdentava fragmentti yksinään puhdistetaan fenoliuutolla ja etanolisaostuksella ja se transfektoidaan primaarisiin tai sekundaarisiin ihmisen fibroblasteihin esimerkissä 1c kuvatuissa olosuhteissa. Transfektoidut solut maljataan 150 mm:n maljoille ihmisen fibroblastiravinnealustaan. 48 tuntia myöhemmin solut maljataan 24-kuoppaisille maljoille tiheytenä, joka on 10 000 solua/cm^2 [noin 20 000 solua per kuoppa; jos kohdentuminen tapahtuu nopeudella 1 tapahtuma per 10^6 kloonattavaa solua (esimerkki 1c), täytyy testata noin 50 kuoppaa yhden ekspressoivan pesäkkeen eristämiseksi]. Solut, joissa transfektoitava DNA on kohdentunut homologiselle alueelle ihmisen EPO-geenin ylävirtaan, ekspressoivat hEPO-proteiinia mMT-promoottorin säätelyn alaisuudessa. Kymmenen vuorokauden kuluessa kokosolusupernatantit testataan EPO-ekspression suhteen käyttäen kaupallisesti saatavaa immuunitestikäyttöpakkausta (Amgen). Solut sellaisista kuopista, joissa on hEPO-synteesiä, eristetään käyttäen tunnettuja menetelmiä, tyypillisesti testaamalla heterogeenisten solupopulaatioiden fraktioita, jotka on erotettu erillisiin kuoppiin tai erillisille maljoille, testaamalla näiden positiivisten solujen fraktiot ja toistamalla tarpeen mukaan niin, että

lopulta eristetään kohdennettu pesäke seulomalla 96-kuoppaisilla mikrotiitterilevyillä, joihin on ympätty yksi solu per kuoppa. DNA koko maljan lysaateista voidaan myös analysoida PCR-menetelmällä fragmentin monistumisen suhteen käyttäen mMT-spesifistä aluketta yhdessä sellaisen alukkeen kanssa, joka sijaitsee HUMERPA-nukleotidikohdan 1 ylävirrassa. Tämän alukeparin tulisi monistaa DNA-fragmentti, jonka koko on tarkasti ennustettu perustuen DNA-sekvenssiin. Positiiviset maljat trypsinoidaan ja ne maljataan uudelleen peräkkäin madaltuvilla laimennoksilla ja DNA:n valmistus-ja PCR-vaiheet toistetaan tarpeen mukaan kohdennettujen solujen eristämiseksi.

Tässä kuvattuja kohdennuskaavioita voidaan myös käyttää hGH-geenin ekspression aktivoimiseksi kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen soluissa [esimerkiksi HT1080-soluissa (ATCC CCL 121), HeLa-soluissa ja HeLa-solujen johdannaisissa (ATCC CCL2, 2.1 ja 2.2), MCF-7-rintasyöpäsoluissa (ATCC HBT 22), K-562-leukemiasoluissa (ATCC CCL 232), KB-karsinoomasoluissa (ATCC CCL 17), 2780AD-munasarjakarsinoomasoluissa (Van der Blick, A.M. et al., Cancer Res. 48: 5927 - 5932 (1988), Raji-soluissa (ATCC CCL 86), Jurkat-soluissa (ATCC TIB 152), Namalwa-soluissa (ATCC CRL 1432), HL-60-soluissa (ATCC CCL 240), Daudi-soluissa (ATCC CCL 213), RPMI 8226 -soluissa (ATCC CCL 155), U-937-soluissa (ATCC CRL 1593), Bowes-melanoomasoluissa (ATCC CRL 9607), WI-38VA13-solujen alalinjan 2R4-soluissa (ATCC CLL 75.1), MOLT-4-soluissa (ATCC CRL 1582) ja erilaisissa heterohybridoomasoluissa] hGH-proteiinin tuottamiseksi helppoa farmaseuttista antoa varten.

h. Ihmisen EPO-geenin aktivaatio ja kohdennettujen primaaristen, sekundaaristen ja kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen fibroblastien eristys positiivisella tai yhdistetyllä positiivisella/negatiivisella selektiosysteemillä

Plasmidien p5'EPO-mMTF, p5'EPO-mMTS ja niiden johdannaisten, joissa on ylimääräinen 6 kb:n pituinen ylävir-

ran BamHI-HindIII-fragmentti, rakennusstrategiaa voidaan seurata lisäten yksi lisävaihe, jossa insertoidaan neogeeni mMT-promoottorin viereen. Lisäksi negatiivinen selektiomerkki, esimerkiksi gpt [plasmidista pMSG (Pharmacia) tai muusta sopivasta lähteestä], voidaan insertoida HUMERPA-sekvenssien viereen plasmidin pBluescriptIISK/+ polylinkkerialueelle. Edellisessä tapauksessa eristetään $G418^r$-pesäkkeet ja seulotaan kohdennettujen pesäkkeiden tunnistamiseksi PCR-amplifikaatiolla tai restriktioentsyymi- ja Southern-hybridisaatioanalyyseillä käyttäen DNA:ta, joka on valmistettu pesäkkeiden pooleista. Jälkimmäisessä tapauksessa $G418^r$-pesäkkeet sijoitetaan alustaan, joka sisältää 6-tioksantiinia gpt-geenin integraation selektoimiseksi [Besnard, C. et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4139 - 4141 (1987)]. Lisäksi HSV-TK-geeni voidaan sijoittaa insertissä vastakkaiseen kohtaan kuin gpt, joka sallii selektion neoyhdisteen suhteen sekä gpt- että TK-sekvenssejä vastaan kasvattamalla soluja ihmisen fibroblastiravinnealustassa, joka sisältää 400 µg G418-yhdistettä/ml, 100 µM 6-tioksantiinia ja 25 µg gansyklovir-yhdistettä/ml. Kaksoisnegatiiviselektion tulisi muodostaa lähes täydellinen selektio oikein kohdennettujen tapahtumien suhteen ja Southern blot -analyysi muodostaa lopullisen varmistuksen.

Tässä kuvattuja kohdennuskaavioita voidaan myös käyttää hEPO-geenin ekspression aktivoimiseksi kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen soluissa [esimerkiksi HT1080-soluissa (ATCC CCL 121), HeLa-soluissa ja HeLa-solujen johdannaisissa (ATCC CCL2, 2.1 ja 2.2), MCF-7-rintasyöpäsoluissa (ATCC HBT 22), K-562-leukemiasoluissa (ATCC CCL 232), KB-karsinoomasoluissa (ATCC CCL 17), 2780AD-munasarjakarsinoomasoluissa (Van der Blick, A.M. et al., Cancer Res. 48: 5927 - 5932 (1988), Raji-soluissa (ATCC CCL 86), Jurkat-soluissa (ATCC TIB 152), Namalwa-soluissa (ATCC CRL 1432), HL-60-soluissa (ATCC CCL 240), Daudi-soluissa (ATCC CCL 213), RPMI 8226 -soluissa (ATCC CCL 155), U-937-so-

luissa (ATCC CRL 1593), Bowes-melanoomasoluissa (ATCC CRL 9607), WI-38VA13-solujen alalinjan 2R4-soluissa (ATCC CLL 75.1), MOLT-4-soluissa (ATCC CRL 1582) ja erilaisissa heterohybridoomasoluissa] hEPO-proteiinin tuottamiseksi helppoa farmaseuttista antoa varten.

i. Kohdennetavien plasmidien rakentaminen ihmisen kasvuhormonigeenin sijoittamiseksi hiiren metallotioneiinipromoottorin säätelyn alaisuuteen primaarisissa, sekundaarisissa ja kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen fibroblasteissa

Seuraava esimerkki toimii kuvaten yhtä esillä olevan keksinnön suoritustapaa, jossa normaalit säätelysekvenssit ihmisen kasvuhormonigeenin ylävirrassa muutetaan niin, että sallitaan ihmisen kasvuhormonin ekspressio primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen fibroblasteissa.

Muodostetaan samanlaiset kohdentavat molekyylit kuin ne, jotka on kuvattu esimerkissä 1f EPO-geenin säätelyalueelle kohdentamiseksi, käyttäen kloonattuja DNA-fragmentteja, jotka ovat peräisin ihmisen kasvuhormonin N-geenin 5'-päästä. Noin 1,8 kb:n pituinen fragmentti, joka sijaitsee HUMGHCSA-sekvenssin (Genbank Entry) nukleotidikohdissa 3 787 - 5 432 (kahden EcoNI-kohdan sijainnit, jotka muodostavat sopivan kokoisen fragmentin kloonausta varten tai sellaisten alakloonien diagnostista digestiota varten, joissa on tämä fragmentti), monistetaan PCR-alukkeilla, jotka on suunniteltu tämän alueen HUMGHCSA-sekvenssin analyysillä. Tämä alue ulottuu hGH-geenin N intronin 1 keskikohdalta ylävirran kohtaan, joka on noin 1,4 kb translaation aloituskohdasta ylävirtaan. Plasmidi pUC12 digestoidaan EcoRI- ja BamHI-entsyymillä, käsitellään Klenow-entsyymillä niin, että muodostetaan tasajuosteiset päät, ja ligatoidaan uudelleen ympyrän muotoon laimeissa olosuhteissa, joka johtaa plasmideihin, joista EcoRI- ja BamHI-kohdat ovat hävinneet. Tälle plasmidille annetaan

nimi pUC12XEB. HindIII-linkkerit ligatoidaan monistettuun hGH-fragmenttiin ja tuloksena syntynyt fragmentti digestoidaan HindIII-entsyymillä ja ligatoidaan HindIII-digestoituun plasmidiin pUC12XEB. Tuloksena syntynyt plasmidi pUC12XEB-5'hGH digestoidaan EcoRI- ja BamHI-entsyymeillä niin, että poistetaan 0,5 kb:n pituinen fragmentti, joka sijaitsee juuri ylävirtaan hGH-transkription aloituskohdasta. Digestoitu DNA ligatoidaan 1,8 kb:n pituiseen EcoRI-BglII-fragmenttiin mMT-I-geenistä [joka ei sisällä yhtään mMT-geenin koodittavia sekvenssejä; Hamer, D.H. ja Walling, M., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273 - 288 (1982); fragmentti voidaan myös eristää tunnetuilla menetelmillä hiiren genomisesta DNA:sta käyttäen PCR-alukkeita, jotka on suunniteltu analysoimalla mMT-sekvenssejä, jotka ovat saatavissa kokoelmasta Genbank; se on, MUSMTI-, MUSMTIP-, MUSMTIPRM-sekvenssit]. Tässä plasmidissa p5'hGH-mMT on mMT-promoottori, jonka vieressä on molemmin puolin hGH-geenin ylävirran sekvenssejä.

Yllä kuvatut kloonausstrategiat sallivat hGH-geenin ylävirran sekvenssien modifioimisen <u>in vitro</u> myöhempää kohdennettua transfektiota varten primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin ihmisen fibroblasteihin. Strategioissa kuvataan yksinkertaiset mMT-promoottorin insertiot. Muita strategioita voidaan suunnitella, kuten esimerkiksi sellaisia, joissa tehostaja, jolla on laaja isäntäsoluaktiivisuus, insertoidaan insertoidun mMT-sekvenssin ylävirtaan.

j. Ihmisen hGH-geenin aktivaatio ja kohdennettujen primaaristen, sekundaaristen ja kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen fibroblastien eristys seulonnalla

Kohdennusta varten plasmidit katkaistaan restriktioentsyymeillä, jotka vapauttavat insertin plasmidin rungosta. Plasmidin p5'hGH-mMTS tapauksessa HindIII-digestio vapauttaa kohdentavan 2,9 kb:n pituisen fragmentin, joka sisältää 1,8 kb:n pituisen mMT-promoottorin, jonka vieres-

sä 5'- ja 3'-puolilla on DNA-sekvenssit tämän rakenteen kohdentamiseksi ihmisen hGH-geenin säätelyalueelle. Tämä DNA tai 2,9 kb:n kohdentava fragmentti yksinään puhdistetaan fenoliuutolla ja etanolisaostuksella ja se transfektoidaan primaarisiin tai sekundaarisiin ihmisen fibroblasteihin esimerkissä 11 kuvatuissa olosuhteissa. Transfektoidut solut maljataan 150 mm:n maljoille ihmisen fibroblastiravinnealustaan. 48 tuntia myöhemmin solut maljataan 24-kuoppaisille maljoille tiheytenä, joka on 10 000 solua/ cm^2 [noin 20 000 solua per kuoppa; jos kohdentuminen tapahtuu nopeudella 1 tapahtuma per 10^6 kloonattavaa solua (esimerkki 1c), täytyy testata noin 50 kuoppaa yhden ekspressoivan pesäkkeen eristämiseksi]. Solut, joissa transfektoitava DNA on kohdentunut homologiselle alueelle ihmisen hGH-geenin ylävirtaan, ekspressoivat hGH-proteiinia mMT-promoottorin säätelyn alaisuudessa. Kymmenen vuorokauden kuluttua kokosolusupernatantit testataan hGH-ekspression suhteen käyttäen kaupallisesti saatavaa immuunitestikäyttöpakkausta (Nichols). Kloonit sellaisista kuopista, joissa on hGH-synteesiä, eristetään käyttäen tunnettuja menetelmiä, tyypillisesti testaamalla heterogeenisten solupopulaatioiden fraktioita, jotka on erotettu erillisiin kuoppiin tai erillisille maljoille, testaamalla näiden positiivisten solujen fraktiot ja toistamalla tarpeen mukaan niin, että lopulta eristetään kohdennettu pesäke seulomalla 96-kuoppaisilla mikrotiitterilevyillä, joihin on ympätty yksi solu per kuoppa. DNA koko maljan lysaateista voidaan myös analysoida PCR-menetelmällä fragmentin monistumisen suhteen käyttäen mMT-spesifistä aluketta yhdessä sellaisen alukkeen kanssa, joka sijaitsee HUMGHCSA-nukleotidikohdan 5432 alavirrassa. Tämän alukeparin tulisi monistaa DNA-fragmentti, jonka koko on tarkasti ennustettu perustuen DNA-sekvenssiin. Positiiviset maljat trypsinoidaan ja ne maljataan uudelleen peräkkäin madaltuvilla lai-

mennoksilla ja DNA:n valmistus- ja PCR-vaiheet toistetaan tarpeen mukaan kohdennettujen solujen eristämiseksi.

Tässä kuvattuja kohdennuskaavioita voidaan myös käyttää hGH-geenin ekspression aktivoimiseksi kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen soluissa [esimerkiksi HT1080-soluissa (ATCC CCL 121), HeLa-soluissa ja HeLa-solujen johdannaisissa (ATCC CCL2, 2.1 ja 2.2), MCF-7-rintasyöpäsoluissa (ATCC HBT 22), K-562-leukemiasoluissa (ATCC CCL 232), KB-karsinoomasoluissa (ATCC CCL 17), 2780AD-munasarjakarsinoomasoluissa (Van der Blick, A.M. et al., Cancer Res. 48: 5927 - 5932 (1988), Raji-soluissa (ATCC CCL 86), Jurkat-soluissa (ATCC TIB 152), Namalwa-soluissa (ATCC CRL 1432), HL-60-soluissa (ATCC CCL 240), Daudi-soluissa (ATCC CCL 213), RPMI 8226 -soluissa (ATCC CCL 155), U-937-soluissa (ATCC CRL 1593), Bowes-melanoomasoluissa (ATCC CRL 9607), WI-38VA13-solujen alalinjan 2R4-soluissa (ATCC CLL 75.1), MOLT-4-soluissa (ATCC CRL 1582) ja erilaisissa heterohybridoomasoluissa] hGH-proteiinin tuottamiseksi helppoa farmaseuttista antoa varten.

k. Ihmisen hGH-geenin aktivaatio ja kohdennettujen primaaristen, sekundaaristen ja kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen fibroblastien eristys positiivisella tai yhdistetyllä positiivisella/negatiivisella selektiosysteemillä

Plasmidin p5'hGH-mMT rakennusstrategiaa voidaan seurata lisäten yksi lisävaihe, jossa insertoidaan neogeeni mMT-promoottorin viereen. Lisäksi negatiivinen selektiomerkki, esimerkiksi gpt [plasmidista pMSG (Pharmacia) tai muusta sopivasta lähteestä], voidaan insertoida HUMGHCSA-sekvenssien viereen plasmidin pUC12 polylinkkerialueelle. Edellisessä tapauksessa eristetään $G418^r$-pesäkkeet ja seulotaan kohdennettujen pesäkkeiden tunnistamiseksi PCR-amplifikaatiolla tai restriktioentsyymi- ja Southern-hybridisaatioanalyyseillä käyttäen DNA:ta, joka on valmistettu pesäkkeiden pooleista. Jälkimmäisessä tapauksessa $G418^r$-pesäkkeet sijoitetaan alustaan, joka sisäl-

tää tioksantiinia gpt-geenin integraation selektoimiseksi [Besnard, C. et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4139 - 4141 (1987)]. Lisäksi HSV-TK-geeni voidaan sijoittaa insertin vastakkaiselle puolelle kuin gpt, joka sallii selektion neo-yhdisteen suhteen sekä gpt- että TK-sekvenssejä vastaan kasvattamalla soluja ihmisen fibroblastiravinnealustassa, joka sisältää 400 μg G418-yhdistettä/ml, 100 μM 6-tioksantiinia ja 25 μg gansyklovir-yhdistettä/ml. Kaksoisnegatiiviselektion tulisi muodostaa lähes täydellinen selektio oikein kohdennettujen tapahtuminen suhteen. Southern hybridisaatio -analyysi on varmistava.

Tässä kuvattuja kohdennuskaavioita voidaan myös käyttää hGH-geenin ekspression aktivoimiseksi kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen soluissa [esimerkiksi HT1080-soluissa (ATCC CCL 121), HeLa-soluissa ja HeLa-solujen johdannaisissa (ATCC CCL2, 2.1 ja 2.2), MCF-7-rintasyöpäsoluissa (ATCC HBT 22), K-562-leukemiasoluissa (ATCC CCL 232), KB-karsinoomasoluissa (ATCC CCL 17), 2780AD-munasarjakarsinoomasoluissa (Van der Blick, A.M. et al., Cancer Res. 48: 5927 - 5932 (1988), Raji-soluissa (ATCC CCL 86), Jurkat-soluissa (ATCC TIB 152), Namalwa-soluissa (ATCC CRL 1432), HL-60-soluissa (ATCC CCL 240), Daudi-soluissa (ATCC CCL 213), RPMI 8226 -soluissa (ATCC CCL 155), U-937-soluissa (ATCC CRL 1593), Bowes-melanoomasoluissa (ATCC CRL 9607), WI-38VA13-solujen alalinjan 2R4-soluissa (ATCC CLL 75.1), MOLT-4-soluissa (ATCC CRL 1582) ja erilaisissa heterohybridoomasoluissa] hGH-proteiinin tuottamiseksi tavanomaista farmaseuttista antoa varten.

Esimerkeissä 1f ja 1i kuvatut kohdentavat rakenteet ja ne, joita on käytetty esimerkeissä 1g, 1h, 1j ja 1k, voidaan modifioida niin, että ne sisältävät amplifioituvan selektiomerkin (esim. ada, dhfr tai CAD), joka on käyttökelpoinen sellaisten solujen selektiossa, joissa aktivoitu endogeeninen geeni ja amplifioituva selektiomerkki ovat amplifoituneet. Sellaisia soluja, jotka ekspressoivat tai

kykenevät ekspressoimaan endogeenista geeniä, joka koodittaa terapeuttista tuotetta, voidaan käyttää proteiinien (esim. hGH- ja hEPO-proteiinien) tuottamiseksi tavanomaista farmaseuttista antoa tai geeniterapiaa varten.

1. Primaaristen ja sekundaaristen fibroblastien transfektio eksogeenisella DNA:lla ja selektiomerkkigeenillä käyttäen elektroporaatiota

Eksponentiaalisesti kasvavat tai varhaisessa stationäärivaiheessa olevat fibroblastit trypsinisoidaan ja huuhdellaan muovipinnasta ravinnealustalla. Pieni määrä solususpensiota poistetaan laskua varten ja jäljelle jäävät solut altistetaan sentrifugaatiolle. Supernatantti imetään pois ja pelletti suspensoidaan uudelleen 5 ml:aan elektroporaatiopuskuria (20 mM HEPES, pH 7,3, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4, 6 mM dekstroosi). Solut sentrifugoidaan uudelleen, supernatantti imetään pois ja solut suspendoidaan uudelleen elektroporaatiopuskuriin, joka sisältää 1 mg:n asetyloitua naudan seerumialbumiinia/ml. Lopullinen solususpensio sisältää noin 3 x 10^6 solua/ml. Elektroporaatio tulisi suorittaa välittömästi uudelleen suspendoinnin jälkeen.

Superkiertyneessä muodossa oleva plasmidi-DNA lisätään steriiliin kyvettiin, jossa on 0,4 cm:n elektrodiväli (Bio-Rad). Lopullinen DNA-konsentraatio on yleensä ainakin 120 μg/ml. 0,5 ml solususpensiota (joka sisältää noin 1,5 x 10^6 solua) lisätään sitten kyvettiin ja solususpensio- sekä DNA-liuokset sekoitetaan varovasti. Elektroporaatio suoritetaan Gene-Pulser-laitteella (Bio-Rad). Kapasitanssi ja volttimäärä asetetaan arvoihin 960 μF ja 250 - 300 V, vastaavasti. Kun volttimäärä kohoaa, solujen elinkyky alenee, mutta se eloonjääneiden solujen prosenttimäärä, joka stabiilisti inkorporoi sisään viedyn DNA:n genomiinsa, kohoaa dramaattisesti. Näiden parametrien suhteen tulisi käyttää pulssiaikaa, joka on noin 14 - 20 ms.

Elektroporoituja soluja pidetään huoneenlämpötilassa noin 5 min, ja sitten kyvettien sisältö poistetaan varovasti steriilillä siirtopipetillä. Solut lisätään suoraan 10 ml:aan esilämmitettyä ravintoalustaa (kuten yllä niin, että sisältää 15 % naudan seerumia) 10 ml:n maljalle ja niitä inkuboidaan, kuten yllä on kuvattu. Seuraavana päivänä alusta imetään pois ja korvataan 10 ml:lla tuoretta alustaa ja inkuboidaan lisää 16 - 24 tuntia. Solujen jatkoviljely kloonaustehokkuuden määrittämiseksi ja G418-resistenttien pesäkkeiden selektoimiseksi suoritetaan seuraavana päivänä. Solut trypsinisoidaan, lasketaan ja maljataan; tyypillisesti fibroblastit maljataan tiheytenä 10^3 solua/10 cm:n malja kloonaustehokkuuden määrittämiseksi ja 1 - 2 x 10^4 solua/10 cm:n malja G418-selektioon.

Ihmisen fibroblastit selektoidaan G418-resistenssin suhteen alustassa, joka sisältää 300 - 400 μg G418-yhdistettä/ml (genetisiinin disulfaattisuola, jonka vahvuus on noin 50 %; Gibco) fibroblastiravinnealustaa (mukana 15 % naudan seerumia). Kloonaustehokkuus määritetään G418-yhdisteen poissa ollessa. Maljattuja soluja inkuboidaan 12 - 14 vuorokautta, jolloin pesäkkeet kiinnitetään formaliinilla, värjätään kristalliviolettivärillä ja lasketaan (kloonaustehokkuusmaljat) tai eristetään käyttäen kloonaussylintereitä (G418-maljoille). Kanin fibroblastien elektroporaatio ja selektio suoritetaan oleellisesti, kuten on kuvattu ihmisen fibroblasteille lukuun ottamatta käytettyjä selektio-olosuhteita. Kanin fibroblastit selektoidaan G418-resistenssin suhteen alustassa, joka sisältää 1 g:n G418-yhdistettä/ml.

Fibroblastit eristettiin juuri leikatuista ihmisen esinahoista. Viljelmiin ympättiin 50 000 solua/cm alustaan, joka oli DMEM + 10 % naudan seerumi. Kun viljelmistä tuli konfluentteja, fibroblastit kerättiin trypsinisoimalla ja transfektoitiin elektroporaatiolla. Elektroporaatio-olosuhteet arvioitiin transfektoimalla plasmidilla pcDNEO

(kuvio 5). Edustava elektroporaatiokoe, jossa käytettiin lähes optimaalisia olosuhteita (60 µg plasmidia pcDNEO niin, että elektroporaation volttimäärä oli 250 volttia ja kapasitanssiasetus oli 960 µF), johti yhteen G418-resistenttiin pesäkkeeseen per 588 käsiteltyä solua (0,17 % kaikista käsitellyistä soluista) tai yhteen G418-pesäkkeeseen per 71 kloonattavaa solua (1,4 %).

Kun suoritettiin yhdeksän erillistä elektroporaatiokoetta lähes optimaalisissa olosuhteissa (60 µg plasmidia pcDNEO niin, että elektroporaation volttimäärä oli 300 volttia ja kapasitanssiasetus oli 960 µF), havaittiin keskimäärin yksi G418-pesäke per 1899 käsiteltyä solua (0,05 %) niin, että vaihteluväli oli 1/882 - 1/7 500 käsiteltyä solua. Tämä vastaa keskimäärin yhtä G418-pesäkettä per 38 kloonattavaa solua (2,6 %).

Muutaman kerran nuorennetut primaariset ihmisen fibroblastit muutettiin hGH-proteiinia ekspressoiviksi soluiksi plasmidien pcDNEO ja pXGH5 yhteistransfektiolla. Tyypillisesti 60 µg näiden kahden plasmidin ekvimolaarista seosta transfektoitiin lähes optimaalisissa olosuhteissa (elektroporaation volttimäärä oli 300 volttia ja kapasitanssiasetus 960 µF). Sellaisen kokeen tulokset johtivat yhteen G418-pesäkkeeseen per 14 705 käsiteltyä solua.

Näiden ja muiden samanlaisissa transfektio-olosuhteissa eristettyjen solujen hGH-ekspressiotulosten yhteenveto on alla. Lopulta 98 % kaikista $G418^r$-pesäkkeistä voitiin laajentaa massaviljelmien muodostamiseksi.

Analysoitujen $G418^r$-kloonien määrä	154
$G418^r$/hGH-ekspressoivien kloonien määrä	65
Keskimääräinen hGH-proteiinin ekspressiotaso	2,3 μg hGH-proteiinia/10^6 solua/24 tuntia
Maksimaalinen hGH-proteiinin ekspressiotaso	23,0 μg hGH-proteiinia/10^6 solua/24 tuntia

On myös muodostettu stabiilit transfektantit elektroporoimalla primaariset tai sekundaariset ihmisen fibroblastit plasmidilla pXGH301, joka on DNA-rakenne, jossa neo- ja hGH-geenit ovat läsnä samassa plasmidimolekyylissä. Plasmidi pXGH301 rakennettiin kaksivaiheisella menetelmällä. Plasmidin pBR322 SalI-ClaI-fragmentti (kohdat 23 - 651 plasmidissa pBR322) eristettiin ja se insertoitiin SalI-ClaI-digestoituun plasmidiin pcDNEO muodostamalla näin BamHI-kohta aikaisen SV40-promoottorialueen ylävirtaan plasmidissa pcDNEO. Tämä plasmidi pBNEO digestoitiin BamHI-entsyymillä ja 2,1 kb:n pituinen fragmentti, joka sisälsi neo-geenin aikaisen SV40-promoottorin säätelyn alaisuudessa, eristettiin ja se insertoitiin BamHI-digestoituun plasmidiin pXGH5. Eristettiin plasmidi, jossa oli yksi 2,1 kb:n pituisen BamHI-fragmentin insertio, jossa neo- ja hGH-sekvenssit transkriptoidaan samaan suuntaan suhteessa toisiinsa. Tälle plasmidille annettiin nimi pXGH301. Esimerkiksi 1,5 x 10^6 solua elektroporoitiin 60 μg plasmidia pXGH301 niin, että asetukset olivat 300 volttia ja 960 μF. G418-resistentit pesäkkeet eristettiin transfektoiduista sekundaarisista fibroblasteista frekvenssillä 652 G418-resistenssiä pesäkettä per 1,5 x 10 käsiteltyä solua (1 per 2 299 käsiteltyä solua). Noin 59 % näistä pesäkkeistä ekspressoi hGH-proteiinia.

Esimerkki 2

Sellaisten kohdentuvien plasmidien rakennus, jotka johtavat kimeerisiin transkriptioyksiköihin, joissa on fuusioitu ihmisen kasvuhormoni- ja erytropoietiinisekvenssit

Seuraavassa kuvataan esillä olevan keksinnön kahta lisäsuoritustapaa, joissa ihmisen EPO-geenin ylävirrassa olevat normaalit säätelysekvenssit muutetaan niin, että sallitaan hEPO-geenin ekspressio primaarisissa tai sekundaarisissa fibroblastikannoissa, jotka eivät ekspressoi hEPO-geeniä tunnistettavissa määrin transfektoimattomassa tilassaan tavallisesti. Näissä suoritustavoissa kohdennustapahtumien tuotteet ovat kimeerisiä transkriptioyksiköitä, joissa ihmisen kasvuhormonigeenin ensimmäinen eksoni sijaitsee hEPO-eksonien 2 - 5 ylävirrassa. Transkription, silmukoinnin ja translaation tuote on proteiini, jossa hEPO-signaalipeptidin aminohapot 1 - 4 on korvattu hGH-proteiinin aminohappojäännöksillä 1 - 3. Nämä kaksi suoritustapaa eroavat sekä vieraiden insertoitujen säätelysekvenssien suhteellisen sijainnin suhteen että sen spesifisen silmukointikuvion suhteen, jonka täytyy tapahtua lopullisen prosessoidun transkriptin tuottamiseksi.

Plasmidi pXEPO-10 suunnitellaan korvaamaan hEPO-geenin eksoni 1 hGH-geenin eksonilla 1 geenikohdennuksella endogeeniseen hEPO-geeniin ihmisen kromosomissa 7. Plasmidi pXEPO-10 rakennetaan seuraavasti. Ensiksi rakennetaan välimuotoplasmidi pT163 insertoimalla 6 kb:n pituinen HindIII-BamHI-fragmentti (katso esimerkki 1f), joka sijaitsee hEPO-geenin koodittavan alueen ylävirrassa, HindIII-BamHI-digestoituun plasmidiin pBluescriptIISK+ (Stratagene, LaJolla, CA). Tämän ligaation tuote digestoidaan XhoI- ja HindIII-entsyymeillä ja ligatoidaan 1,1 kb:n pituiseen HindIII-XhoI-fragmenttiin plasmidista pMClneo-PolyA [Thomas, K.R. ja Capecchi, M.R., Cell 51: 503 - 512 (1987), saatavissa valmistajalta Stratagene, LaJolla, CA]

plasmidin pT163 valmistamiseksi. Oligonukleotideja 13.1 - 13.4 käytetään polymeraasiketjureaktioissa niin, että muodostetaan fuusiofragmentti, jossa hiiren metallotioneiini 1 -promoottori (mMT-I) - hGH-geenin eksonin 1 sekvenssit on fuusioitu edelleen hEPO-geenin intronin 1 sekvenssei-hin. Ensiksi oligonukleotideja 13.1 ja 13.3 käytetään amplifioimaan noin 0,73 kb:n pituinen mMT-I-promoottori - hGH-geenin eksonin 1 fragmentti plasmidista pXGH5 (kuvio 5). Seuraavaksi oligonukleotideja 13.2 ja 13.4 käytetään amplifioimaan noin 0,57 kb:n pituinen fragmentti, joka sisältää pääasiassa hEPO-geenin intronin 1 sekvenssit, ihmisen genomisesta DNA:sta. Lopuksi nämä kaksi amplifioitua fragmenttia sekoitetaan ja lisäamplifioidaan oligonukleotideilla 13.1 ja 13.4 niin, että muodostetaan lopullinen fuusiofragmentti (fuusiofragmentti 3), jonka vieressä on SalI-kohta mMT-I-osan 5'-puolella ja XhoI-kohta hEPO-geenin intronin 1 sekvenssin 3'-puolella. Fuusiofragmentti 3 digestoidaan XhoI- ja SalI-entsyymeillä ja ligatoidaan XhoI-digestoituun plasmidiin pT163. Ligaatioseos transformoidaan E. coli -bakteeriin ja klooni, joka sisältää yksittäisen fuusiofragmentin 3 insertion, jossa XhoI-kohta on muodostunut uudelleen hEPO-geenin intronin 1 sekvenssin 3'-puolelle, tunnistetaan ja sille annetaan nimi pXEPO-10.

13.1 5' **TTTTGTCGAC GGTACCTTGG TTTTTAAAAC C**
SalI KpnI
(SEQ ID NO 5)

13.2 5' **CCTAGCGGCA ATGGCTACAG GTGAGTACTC GCGGGCTGGG CG**
(SEQ ID NO 6)

13.3 5' **CGCCCAGCCC GCGAGTACTC ACCTGTAGCC ATTGCCGCTA GG**
(SEQ ID NO 7)

13.4 5' **TTTTCTCGAG CTAGAACAGA TAGCCAGGCT G**
XhoI
(SEQ ID NO 8)

Oligon 13.1 paksuntamaton alue on identtinen mMT-I-promoottorille niin, että luonnollinen KpnI-kohta

on sen 5'-rajakohdassa. Paksunnoksella merkitty sekvenssi osoittaa hännän, joka sisältää SalI-kohdan, jolla 5'-puolen rajakohta muutetaan SalI-kohdaksi. Oligojen 13.2 ja 13.3 paksunnoksella merkitty alue osoittaa hGH-sekvenssejä, kun taas paksuntamattomat alueet ovat intronin 1 sekvenssejä hEPO-geenistä. Oligon 13.4 paksuntamaton alue on identtinen hEPO-geenin intronin 1 viimeisille 25:lle emäkselle. Paksunnettu alue sisältää hännän, joka sisältää XhoI-kohdan, jolla amplifioidun fragmentin 3'-rajakohta muutetaan XhoI-kohdaksi.

Plasmidi pXEPO-11 suunnitellaan sijoittamaan geenikohdennuksella mMT-I-promoottori ja hGH-geenin eksoni 1 hEPO-rakennegeenin ja promoottorialueen ylävirtaan endogeeniseen hEPO-lokukseen ihmisen kromosomissa 7. Plasmidi pXEPO-11 rakennetaan seuraavasti. Oligonukleotideja 13.1 ja 13.5 - 13.7 käytetään polymeraasiketjureaktioissa niin, että muodostetaan fuusiofragmentti, jossa hiiren metallotioneiini 1 -promoottori (mMT-I) - hGH-geenin eksonin 1 sekvenssit on fuusioitu edelleen hEPO-geenin sekvensseihin, jotka sijaitsevat kohdalla -1 - -630 suhteessa hEPO-geenin koodittavaan alueeseen. Ensiksi oligonukleotideja 13.1 ja 13.6 käytetään amplifioimaan noin 0,75 kb:n pituinen mMT-I-promoottori - hGH-geenin eksonin 1 fragmentti plasmidista pXGH5 (kuvio 5). Seuraavaksi oligonukleotideja 13.5 ja 13.7 käytetään amplifioimaan ihmisen genomisesta DNA:sta noin 0,65 kb:n pituinen fragmentti, joka sisältää pääasiassa hEPO-geenin sekvenssit, jotka sijaitsevat kohdalla -1 - -620 suhteessa hEPO-geenin kodittavaan alueeseen. Sekä oligo 13.5 että 13.6 sisältävät 10 bp:n pituisen linkkerisekvenssin, joka sijaitsee hGH-geenin intronin 1 - hEPO-promoottorin alueella, joka vastaa luonnollista hEPO-geenin intronin 1 silmukoinnin luovuttajakohtaa. Lopuksi nämä kaksi amplifioitua fragmenttia sekoitetaan ja lisäamplifioidaan oligonukleotideilla 13.1 ja 13.7 niin,

että muodostetaan lopullinen fuusiofragmentti (fuusiofragmentti 6), jonka vieressä on SalI-kohta mMT-I-osan 5'-puolella ja XhoI-kohta hEPO-geenin promoottorialueen 3'-puolella. Fuusiofragmentti 6 digestoidaan XhoI- ja SalI-entsyymeillä ja ligatoidaan XhoI-digestoituun plasmidiin pT163. Ligaatioseos transformoidaan E. coli -bakteeriin ja klooni, joka sisältää yksittäisen fuusiofragmentin 6 insertion, jossa XhoI-kohta on muodostunut uudelleen hEPO-geenin promoottorisekvenssien 3'-puolelle, tunnistetaan ja sille annetaan nimi pXEPO-11.

13.5 5' **GACAGCTCAC CTAGCGGCAA TGGCTACAG*G TGAGTACTC***
AAGCTTCTGG GCTTCCAGAC CCAG (SEQ ID NO 9)
HindIII

13.6 5' **CTGGGTCTGG AAGCCCAG*AA GCTTGAGTAC TCA*CCTGTAG**
HindIII
CCATTGCCGC TAGGTGAGCT GTC (SEQ ID NO 10)

13.7 5' **TTTTCTCGAG CTCCGCGCCT GGCCGGGGTC CCTC**
XhoI
(SEQ ID NO 11)

Oligojen 13.5 ja 13.6 paksunnetut alueet osoittavat hGH-sekvenssejä. Kursivoidut alueet vastaavat hEPO-geenin intronin 1 kymmentä ensimmäistä emäsparia. Jäljelle jäävä osa oligoista vastaa hEPO-sekvenssejä, jotka sijaitsevat kohdilla -620 - -597 suhteessa hEPO-geenin kodittavaan alueeseen. Oligon 13.7 paksuntamaton alue on identtinen emäksien -1 - -24 kanssa suhteessa hEPO-geenin koodittavalle alueelle. Paksunnettu alue sisältää hännän, joka sisältää XhoI-kohdan amplifioidun fragmentin 3'-rajakohdan muuttamiseksi XhoI-kohdaksi.

Plasmidia pXEPO-10 voidaan käyttää geenikohdennukseen digestoimalla se BamHI- ja XhoI-entsyymeillä niin, että vapautetaan 7,3 kb:n fragmentti, joka sisältää mMT-I/

hGH-fuusion, jonka vieressä molemmilla puolilla on hEPO-sekvenssit. Tämä fragmentti (kohdentava fragmentti 1) ei sisällä yhtään hEPO-geenin koodittavia sekvenssejä, vaan sisältää ainoastaan sekvenssit, jotka sijaitsevat kohtien -620 ja noin -6 620 välissä ylävirtaan hEPO-geenin koodittavasta alueesta, ja hEPO-geenin intronin 1 sekvenssit kohdentumisen ohjaamiseksi ihmisen EPO-lokukseen. Kohdentava fragmentti 1 transfektoidaan primaarisiin tai sekundaarisiin ihmisen ihon fibroblasteihin käyttäen samanlaisia olosuhteita kuin ne, jotka on kuvattu esimerkissä 1c. G418-resistentit pesäkkeet poimitaan yksittäisiin kuoppiin 96-kuoppaisille maljoille ja ne seulotaan EPO-ekspression suhteen ELISA-testillä (R & D Systems, Minneapolis, MN). Solut, joissa transfektoitu DNA integroituu umpimähkäisesti ihmisen genomiin, eivät voi tuottaa EPO-proteiinia. Solut, joissa transfektoitava DNA on käynyt läpi homologisen rekombinaation endogeenisen hEPO-geenin intronin 1 ja hEPO-geenin ylävirran sekvenssien kanssa, sisältää kimeerisen geenin, jossa mMT-I-promoottori ja ei-transkriptoitavat sekvenssit ja hGH-geenin transloimattomat 5'-sekvenssit ja hGH-geenin eksoni 1 korvaavat normaalin hEPO-promoottorin ja hEPO-geenin eksonin 1 (katso kuvio 1). Muut kuin hEPO-sekvenssit kohdentavassa fragmentissa 1 liittyvät hEPO-sekvensseihin alavirtaan hEPO-geenin intronista 1. Normaalin hEPO-geenin säätelyalueen korvaus mMT-I-promoottorilla aktivoi EPO-geenin fibroblasteissa, jotka eivät normaalisti ekspressoi hEPO-proteiinia. hEPO-geenin eksonin 1 korvaus hGH-geenin eksonilla 1 johtaa proteiiniin, jossa hEPO-signaalipeptidin ensimmäiset neljä aminohappoa on korvattu hGH-proteiinin aminohapoilla 1 - 3, joka muodostaa toiminnallisen kimeerisen signaalipeptidin, joka poistetaan translaation jälkeisellä prosessoinnilla kypsästä proteiinista ja eritetään ekspressoivista soluista.

Plasmidia pXEPO-11 voidaan käyttää geenikohdennukseen digestoimalla se BamHI- ja XhoI-entsyymeillä niin, että vapautetaan 7,4 kb:n fragmentti, joka sisältää mMT-I/hGH-fuusion, jonka vieressä molemmilla puolilla on hEPO-sekvenssit. Tämä fragmentti (kohdentava fragmentti 2) ei sisällä yhtään hEPO-geenin koodittavia sekvenssejä, vaan sisältää ainoastaan sekvenssit, jotka sijaitsevat kohtien -1 ja noin -6 620 välissä ylävirtaan hEPO-geenin koodittavasta alueesta, kohdentumisen ohjaamiseksi ihmisen EPO-lokukseen. Kohdentava fragmentti 2 transfektoidaan primaarisiin tai sekundaarisiin ihmisen ihon fibroblasteihin käyttäen samanlaisia olosuhteita kuin ne, jotka on kuvattu esimerkissä 1g. G418-resistentit pesäkkeet poimitaan yksittäisiin kuoppiin 96-kuoppaisille maljoille ja ne seulotaan EPO-ekspression suhteen ELISA-testillä (R & D Systems, Minneapolis, MN). Solut, joissa transfektoitu DNA integroituu umpimähkäisesti ihmisen genomiin, eivät voi tuottaa EPO-proteiinia. Solut, joissa transfektoitava DNA on käynyt läpi homologisen rekombinaation endogeenisen hEPO-geenin promoottorin ja ylävirran sekvenssien kanssa, sisältävät kimeerisen geenin, jossa mMT-I-promoottori ja ei-transkriptoitavat sekvenssit, hGH-geenin transloimattomat 5'-sekvenssit ja hGH-geenin eksoni 1 ja kymmenen emäsparin pituinen linkkeri, joka sisältää ensimmäiset kymmenen emästä hEPO-geenin intronista 1, insertoidaan HindIII-kohtaan, joka sijaitsee kohdassa -620 suhteessa hEPO-geenin koodittavaan alueeseen (katso kuvio 2). mMT-I-promoottorin läsnäolo ylävirtaan normaalisti hiljaisesta hEPO-promoottorista ohjaa sellaisen lähetin synteesiä primaarisissa tai sekundaarisissa ihon fibroblasteissa, joka lukee (5' - 3' -suuntaan) ei-transloitavat metallotioneiini- ja hGH-sekvenssit, hGH-geenin eksonin 1, kymmenen DNA-emästä, jotka ovat identtisiä hEPO-geenin intronin 1 ensimmäiselle kymmenelle emäsparille ja normaalin hEPO-promoottorin ja hEPO-geenin eksonin 1 (-620 - +13 suhteessa

hEPO-geenin koodittavaan alueeseen). Kymmenen emäsparin pituinen linkkerisekvenssi hEPO-geenin intronista 1 toimii silmukoinnin luovuttajakohtana, joka fuusioi hGH-geenin eksonin 1 seuraavaan alavirrassa olevaan silmukoinnin vastaanottajakohtaan, joka sijaitsee juuri ylävirtaan hEPO-geenin eksonista 2. Tuloksena syntyneen transkriptin prosessointi silmukoi sen vuoksi ulos hEPO-promoottorin, eksonin 1 ja intronin 1 sekvenssit. hEPO-geenin eksonin 1 korvaus hGH-geenin eksonilla 1 johtaa proteiiniin, jossa ensimmäiset neljä hEPO-signaalipeptidin aminohappoa korvataan hGH-geenin aminohapoilla 1 - 3, joka johtaa toiminnalliseen kimeeriseen signaalipeptidiin, joka poistetaan translaation jälkeisellä prosessoinnilla kypsästä proteiinista ja eritetään ekspressoivista soluista.

Sarja rakenteita, jotka ovat sukua plasmideille pXEPO-10 ja pXEPO-11, voidaan rakentaa käyttäen tunnettuja menetelmiä. Näissä rakenteissa mMT-I-promoottorin ja hGH-sekvenssien suhteellisia sijainteja kuin myös kohtaa, jossa mMT-I/hGH-sekvenssit insertoidaan hEPO-geenin ylävirran sekvensseihin, muutellaan sellaisten vaihtoehtoisten kimeeristen transkriptioyksiköiden muodostamiseksi, jotka helpottavat geenikohdennusta, johtavat tehokkaampaan fuusiotranskriptien ekspressioon tai joilla on muita toivottavia ominaisuuksia. Sellaiset rakenteet antavat samanlaiset tulokset niin, että hGH-hEPO-fuusiogeeni sijoitetaan eksogeenisen promoottorin säätelyn alaisuuteen geenikohdennuksella normaaliin hEPO-lokukseen. Esimerkiksi 6 kb:n pituisessa HindIII-BamHI-fragmentissa hEPO-geenin ylävirrassa (katso esimerkki 1f) on useita restriktioentsyymien tunnistussekvenssejä, joita voidaan käyttää neo-geenin ja mMT-I-promoottori/hGH-fuusiofragmentin insertiokohtina. Yksi sellainen kohta on BglII-kohta, joka sijaitsee noin 1,3 kb ylävirtaan HindIII-kohdasta, on tällä alueella uniikki ja voidaan käyttää yhden tai useamman selektiomerkin insertioon ja sellaisen säätelyalueen insertioon, joka

on peräisin toisesta geenistä, joka toimii aktivoiden hEPO-ekspressiota primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen soluissa.

Ensiksi rakennetaan välimuotoplasmidi pT164 insertoimalla 6 kb:n HindIII-BamHI-fragmentti (esimerkki 1f), joka sijaitsee ylävirtaan hEPO-geenin koodittavalta alueelta, HindIII-BamHI-digestoituun plasmidiin pBluescriptIISK+ (Stratagene, LaJolla, CA). Plasmidi pMC1neo-PolyA [Thomas, K.R. ja Capecchi, M.R., Cell 51: 503 - 512 (1987); saatavissa valmistajalta Stratagene, LaJolla, CA] digestoidaan BamHI- ja XhoI-entsyymeillä, tasapäistetään käsittelemällä E. coli DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla, ja tuloksena syntynyt 1,1 kb:n pituinen fragmentti puhdistetaan. Plasmidi pT164 digestoidaan BglII-entsyymillä ja tasapäistetään käsittelemällä E. coli DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla. Kaksi edellä olevaa tasapäistettyä fragmenttia ligatoidaan yhteen ja transformoidaan kompetentteihin E. coli -soluihin. Kloonit, joissa on yksi 1,1 kb:n pituinen neo-fragmentin insertti, eristetään ja analysoidaan restriktioentsyymianalyysillä niiden kloonien tunnistamiseksi, joissa BglII-kohta on muodostunut uudelleen tasapäisten XhoI- ja BglII-kohtien fuusiolla sijaiten 1,3 kb:n päässä uniikista HindIII-kohdasta, joka on läsnä plasmidissa pT164. Tuloksena syntynyt plasmidi pT165 voidaan nyt katkaista uniikista BglII-kohdasta, joka on neo-transkriptioyksikön 5'-puolen vieressä.

Oligonukleotideja 13.8 ja 13.9 käytetään polymeraasiketjureaktioissa niin, että muodostetaan fragmentti, jossa hiiren metallotioneiini 1 -promoottori (mMT-I) - hGH-geenin eksonin 1 sekvenssit on edelleen fuusioitu kymmenen emäsparin pituiseen fragmenttiin, joka sisältää silmukoinnin luovuttajakohdan. Valittu silmukoinnin luovuttajakohta vastaa luonnollista hEPO-geenin intronin 1 silmukoinnin luovuttajakohtaa, vaikka suurempaa määrää silmukoinnin luovuttajakohtia tai silmukoinnin konsensusluovut-

tajakohtia voidaan käyttää. Oligonukleotideja (13.8 ja 13.9) käytetään amplifioimaan noin 0,73 kb:n pituinen mMT-I-promoottori - hGH-geenin eksonin 1 fragmentti plasmidista pXGH5 (kuvio 5). Amplifioitu fragmentti (fragmentti 7) digestoidaan BglII-entsyymillä ja ligatoidaan BglII-digestoituun plasmidiin pT165. Ligaatioseos transformoidaan E. coli -bakteeriin ja klooni, joka sisältää yksittäisen fragmentin 7 insertion, jossa mMT-I-promoottorin KpnI-kohta on neo-geenin 5'-pään vieressä ja mMT-I-promoottori on orientoitunut niin, että transkriptio suuntautuu uniikkia HindIII-kohtaa kohden, tunnistetaan ja sille annetaan nimi pXEPO-12.

13.8 5' **AAAAAGATCT GGTACCTTGG TTTTTAAAAC CAGCCTGGAG**
BglII KpnI
(SEQ ID NO 12)

Oligon 13.8 paksuntamaton alue on identtinen mMT-I-promoottorille niin, että sen 5'-rajakohdassa on luonnollinen KpnI-kohta. Paksunnettu kohta osoittaa hännän, jossa on BglII-kohta, joka muuttaa 5'-rajakohdan BglII-kohdaksi.

13.9 5' **TTTTAGATCT *GAGTACTCAC* CTGTAGCCAT TGCCGCTAGG**
BglII
(SEQ ID NO 13)

Oligon 13.9 paksunnettu alue osoittaa hGH-sekvenssit. Kursivoitu alue vastaa hEPO-geenin intronin 1 kymmentä ensimmäistä emäsparia. Alleviivattu BglII-kohta on lisätty plasmidin rakennustarkoituksia varten.

Plasmidia pXEPO-12 voidaan käyttää geenikohdennukseen digestoimalla se BamHI- ja HindIII-entsyymeillä niin, että vapautetaan 7,9 kb:n fragmentti, joka sisältää neo-geenin ja mMT-I/hGH-fuusion, jonka vieressä molemmilla puolilla on hEPO-sekvenssit. Tämä fragmentti (kohdentava

fragmentti 3) ei sisällä yhtään hEPO-geenin koodittavia sekvenssejä, vaan sisältää ainoastaan sekvenssit, jotka sijaitsevat kohtien noin -620 ja noin -6 620 välissä ylävirtaan hEPO-geenin koodittavasta alueesta, kohdentumisen ohjaamiseksi ihmisen EPO-lokuksen ylävirtaan. Kohdentava fragmentti 3 transfektoidaan primaarisiin, sekundaarisiin tai kuolemattomiksi tehtyihin ihmisen ihon fibroblasteihin käyttäen samanlaisia olosuhteita kuin ne, jotka on kuvattu esimerkeissä 1b ja 1c. G418-resistentit pesäkkeet poimitaan yksittäisiin kuoppiin 96-kuoppaisille maljoille ja ne seulotaan EPO-ekspression suhteen ELISA-testillä (R & D Systems, Minneapolis, MN). Solut, joissa transfektoitu DNA integroituu umpimähkäisesti ihmisen genomiin, eivät voi tuottaa EPO-proteiinia. Solut, joissa transfektoitava DNA on käynyt läpi homologisen rekombinaation endogeenisen hEPO-geenin promoottorin ja ylävirran sekvenssien kanssa, sisältävät kimeerisen geenin, jossa mMT-I-promoottori ja ei-transkriptoitavat sekvenssit, hGH-geenin transloimattomat 5'-sekvenssit ja hGH-geenin eksoni 1 ja kymmenen emäsparin pituinen linkkeri, joka sisältää ensimmäiset kymmenen emästä hEPO-geenin intronista 1, insertoidaan BglII-kohtaan, joka sijaitsee kohdassa noin -1 920 suhteessa hEPO-geenin koodittavaan alueeseen. mMT-I-promoottorin läsnäolo ylävirtaan normaalisti hiljaisesta hEPO-promoottorista ohjaa sellaisen lähetin synteesiä primaarisissa, sekundaarisissa tai kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen fibroblasteissa (tai muissa ihmisen soluissa), joka lukee (5' - 3' -suuntaan) ei-transloitavat metallotioneiini- ja hGH-sekvenssit, hGH-geenin eksonin 1, kymmenen DNA-emästä, jotka ovat identtisiä hEPO-geenin intronin 1 ensimmäiselle kymmenelle emäsparille, ja hEPO-geenin ylävirran alueen ja hEPO-geenin eksonin 1 (noin kohdasta -1 920 kohtaan +13 suhteessa EPO-geenin koodittavaan sekvenssiin). Kymmenen emäsparin pituinen linkkerisekvenssi hEPO-geenin intronista 1 toimii silmukoinnin luovuttajakohtana,

joka fuusioi hGH-geenin eksonin 1 alavirrassa olevaan silmukoinnin vastaanottajakohtaan, joka sijaitsee juuri ylävirtaan hEPO-geenin eksonista 2. Tuloksena syntyneen transkriptin prosessointi silmukoi sen vuoksi ulos hEPO-geenin ylävirta-alueet, promoottorialueen, eksonin 1 ja intronin 1 sekvenssit. Kun käytetään plasmideja pXEPO-10, -11 ja -12, lähetin transkription jälkeistä prosessointia voidaan parantaa käyttämällä in vitro mutageneesia niiden silmukoinnin vastaanottajakohtien poistamiseksi, jotka sijaitsevat hEPO-geenin ylävirran sekvensseissä mMT-I-promoottorin ja hEPO-geenin eksonin 1 välissä, jotka alentavat produktiivisten silmukointitapahtumien määrää, joka tarvitaan halutun lähetin muodostamiseksi. hEPO-geenin eksonin 1 korvaus hGH-geenin eksonilla 1 johtaa proteiiniin, jossa ensimmäiset neljä hEPO-signaalipeptidin aminohappoa korvataan hGH-geenin aminohapoilla 1 - 3, joka johtaa toiminnalliseen kimeeriseen signaalipeptidiin, joka poistetaan translaation jälkeisellä prosessoinnilla kypsästä proteiinista ja eritetään ekspressoivista soluista.

Esimerkki 3

Kohdennetun geenin ylävirran sekvenssien kohdennettu modifikaatio ja kohdennetun geenin amplifikaatio

Ihmisen solut, joissa hEPO-geeni on aktivoitu edellä kuvatuilla menetelmillä, voidaan indusoida monistamaan neo/mMT-I/EPO-transkriptioyksikkö, jos kohdentava plasmidi sisältää merkkigeenin, joka voi muodostaa resistenssin sytotoksisen aineen korkealle tasolle geenimonistusilmiöllä. Selektiomerkkigeenien, kuten dihydrofolaattireduktaasigeenin (dhfr, selektiivinen aine on metotreksaatti), monitoimisen CAD-geenin [koodittaa karbamyylifosfaattisyntaasia, aspartaattitranskarbamylaasia ja dihydro-orotaasia; selektiivinen aine on N-(fosfonoasetyyli)-L-aspartaatti (PALA)], glutamiinisyntetaasigeenin, selektiivinen aine on metioniinisulfoksimiini (MSX) ja adenosiinideaminaasigeenin (ada; selektiivinen aine on adeniininukleosidi), on

dokumentoitu muiden geenien muassa olevan amplifioituvia kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen solulinjoissa [Wright, J.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1791 - 1795 (1990); Cockett, M.I. et al., Bio/Technology 8: 662 - 667 (1990)]. Näissä tutkimuksissa geeniamplifikaation on julkaistu tapahtuvan useissa kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen solulinjoissa. HT1080-solut, HeLa-solut, MCF-7-rintasyöpäsolut, K-562-leukemiasolut, KB-karsinoomasolut tai 2780AD-munasarjakarsinoomasolut muiden muassa osoittavat amplifikaation sopivissa selektio-olosuhteissa.

Plasmidit pXEPO-10 ja pXEPO-11 voidaan modifioida insertoimalla normaali tai mutantti dhfr-geeni näiden plasmidien uniikkiin HindIII-kohtaan. Sen jälkeen kun HT1080-solut on transfektoitu sopivalla DNA:lla, selektoitu G418-resistenssin suhteen (jonka muodostaa neo-geeni) ja tunnistettu sellaiset solut, joissa hEPO-geeni on aktivoitunut neo-, dhfr- ja mMT-I-sekvenssien geenikohdennuksella oikeaan kohtaan hEPO-geenin ylävirtaan, nämä solut voidaan altistaa vaiheittaiselle selektiolle metotreksaatissa (MTX) dhfr-sekvenssin amplifikaation ja siihen liittyneiden neo-, mMT-I- ja hEPO-sekvenssien koamplifikaation selektoimiseksi [Kaufman, R.J., Technique 2: 221 - 236 (1990)]. Käytetään vaiheittaista selektiota, jossa solut altistetaan ensin matalille MTX-tasoille (0,01 - 0,08 μM), jonka jälkeen altistetaan peräkkäin inkrementaalisille MTX-konsentraatioiden nousuille, joissa MTX-konsentraatio on jopa 250 μM tai korkeampi. MTX:n lineaariset lisäysvaiheet 0,04 - 0,08 μM ja peräkkäiset 2-kertaiset nousut MTX-konsentraatioissa ovat tehokkaita amplifioituneiden transfektoitujen solulinjojen selektiossa, vaikka erilaiset suhteellisen matalat lisäykset ovat myös tehokkaita. Amplifikaatiota tarkkaillaan nousuina dhfr-geenin kopiomäärässä ja se varmistetaan mittaamalla in vitro hEPO-ekspressio. Tällä strategialla voidaan saada aikaan oleellinen hEPO-proteiinin yliekspressio sellaisten sekvenssien

kohdennetulla modifikaatiolla, jotka sijaitsevat täydellisesti hEPO-geenin koodittavan alueen ulkopuolella.

Samanlaiset rakenteet kuin on kuvattu (esimerkit 1f, 1h, 1i, 1k, 2 ja 7) hGH-ekspression aktivoimiseksi ihmisen soluissa voidaan myös edelleen modifioida niin, että niihin sisällytetään dhfr-geeni sellaisten solujen saamiseksi, jotka yliekspressoivat hGH-geeniä, geenikohdennuksella ei-koodittaville alueille ja sen jälkeisellä amplifikaatiolla.

Esimerkki 4

Kohdennus ihmisen EPO-lokukseen ja sen aktivointi kuolemattomaksi tehdyssä ihmisen fibroblastilinjassa

Kohdentava rakenne pXEPO-13 valmistettiin sen hypoteesin testaamiseksi, että endogeeninen hEPO-geeni voitaisiin aktivoida ihmisen fibroblastisolussa. Ensiksi rakennettiin plasmidi pT22.1, joka sisältää 63 emäsparia genomista hEPO-sekvenssiä ylävirtaan hEPO-geenin ensimmäisestä kodonista fuusioituna hiiren metallotioneiini-1-promoottoriin (mMT-I). Oligonukleotideja 22.1 - 22.4 käytettiin PCR-menetelmässä fuusioimaan mMT-I- ja hEPO-sekvenssit. Näiden alukkeiden ominaisuudet ovat seuraavat: 22.1 on 21 emäksen pituinen oligonukleotidi, joka on homologinen segmentille mMT-I-promoottorissa, joka alkaa 28 emäsparia ylävirtaan mMT-I-sekvenssin KpnI-kohdasta; 22.2 ja 22.3 ovat 58 nukleotidin pituisia komplementaarisia alukkeita, jotka määrittävät hEPO- ja mMT-I-sekvenssien fuusion niin, että fuusio sisältää 28 emäsparia hEPO-sekvenssiä, joka alkaa 35 emästä ylävirtaan hEPO-geenin ensimmäisestä kodonista, ja mMT-I-sekvenssit, jotka alkavat oligonukleotidin 22.2 emäksestä 29, joka sisältää mMT-I-sekvenssin luonnollisen BglII-kohdan ja ulottuu 30 emäksen verran mMT-I-sekvenssiin; 22.4 on 21 nukleotidin pituinen ja homologinen hEPO-sekvensseille, jotka alkavat 725 emäsparia alavirtaan hEPO-geenin ensimmäisestä kodonista. Näitä alukkeita käytettiin monistamaan 1,4 kb:n pituinen DNA-

fragmentti, joka sisälsi mMT-I- ja hEPO-sekvenssien fuusion, kuten yllä on kuvattu. Tuloksena syntynyt fragmentti digestoitiin KpnI-entsyymillä (PCR-fragmentti sisälsi kaksi KpnI-kohtaa: yhden luonnollisen KpnI-kohdan mMT-I-promoottorin alueella ja yhden luonnollisen KpnI-kohdan hEPO-sekvenssissä) ja puhdistettiin. Plasmidi pXEPO1 digestoitiin myös KpnI-entsyymillä, joka vapautti 1,4 kb:n pituisen fragmentin ja 6,4 kb:n pituisen fragmentin. 6,4 kb:n pituinen fragmentti puhdistettiin ja se ligoitiin 1,4 kb:n pituiseen KpnI-PCR-fuusiofragmenttiin. Tuloksena syntyneelle rakenteelle annettiin nimi pT22.1. Toinen välimuoto, pT22.2, rakennettiin ligatoimalla noin 6 kb:n pituinen HindIII-BamHI-fragmentti, joka sijaitsee hEPO-rakennegeenin ylävirrassa (katso esimerkki 1f), BamHI- ja HindIII-entsyymeillä digestoituun plasmidiin pBSIISK+ (Stratagene, LaJolla, CA). Kolmas välimuoto, pT22.3, rakennettiin ensin irrottamalla 1,1 kb:n pituinen XhoI/BamHI-fragmentti plasmidista pMCINEOpolyA (Stratagene, LaJolla, CA), joka sisälsi neomysiinifosfotransferaasigeenin. Sitten fragmentti tasapäistettiin DNA polymeraasi I -entsyymin Klenow-fragmentilla (New England Biolabs). Sitten tämä fragmentti ligatoitiin HincII-kohtaan plasmidissa pBSIISK+ (tehtiin samalla tavalla tasapäiseksi DNA polymeraasi I -entsyymillä) plasmidin pT22.3 tuottamiseksi. Neljäs välimuoto, pT22.4, tehtiin puhdistamalla 1,1 kb:n pituinen XhoI/HindIII-fragmentti, joka sisälsi neo-geenin plasmidista pT22.3, ja ligatoimalla tämä fragmentti XhoI- ja HindIII-entsyymeillä digestoituun plasmidiin pT22.2. Plasmidi pT22.4 sisältää näin ollen neo-geenin ylävirran hEPO-geenin BamHI-HindIII-fragmentin HindIII-kohdan vieressä. Lopuksi plasmidi pXEPO-13 muodostettiin irrottamalla ensin 2,0 kb:n pituinen EcoRI/AccI-fragmentti plasmidista pT22.1. Tämän fragmentin EcoRI-kohta määrittää mMT-I-promoottorin 5'-rajakohdan, kun taas tämän fragmentin AccI-kohta on hEPO-geenin eksonin 5 sisällä. Näin ollen AccI/EcoRI-fragmentti

sisältää lähes täydellisen hEPO-ekspressioyksikön, josta puuttuu ainoastaan osa eksonia 5 ja luonnollinen polyadenylaatiokohta. Tämä 2,0 kb:n pituinen EcoRI/AccI-fragmentti puhdistettiin, tasapäistettiin käsittelemällä DNA polymeraasi I -entsyymin Klenow-fragmentilla ja ligatoitiin XhoI-entsyymillä digestoituun tasapäistettyyn plasmidiin pT22.4.

HT1080-solut transfektoitiin PvuI-BamHI-digestoidulla plasmidilla pXEPO-13. Tällä tavalla digestoitu plasmidi pXEPO-13 muodostaa kolme fragmenttia; 1 kb:n pituisen vektorifragmentin, joka sisältää osan amp-geeniä, 1,7 kb:n pituisen fragmentin, jossa on jäljelle jäävät vektorisekvenssit ja noin 9 kb:n pituisen fragmentin, joka sisältää hEPO-, neo- ja mMT-I-sekvenssit. Tämä noin 9 kb:n pituinen BamHI/PvuI-fragmentti sisälsi seuraavat sekvenssit järjestyksessä BamHI-kohdasta: noin 5,2 kb:n pituisen sekvenssin ylävirtaan hEPO-geenin genomisesta sekvenssistä, 1,1 kb:n pituisen neo-transkriptioyksikön, 0,7 kb:n pituisen mMT-I-promoottorin ja 2,0 kb:n pituisen fragmentin, joka sisälsi hEPO-geenin koodittavan sekvenssin, jossa oli lyhentynyt eksoni 5. 45 µg tällä tavalla digestoitua plasmidia pXEPO-13 käytettiin elektroporoitaessa 12 miljoonaa solua (elektroporaatio-olosuhteet olivat, kuten on kuvattu esimerkissä 1b). Tämä elektroporaatio toistettiin yhteensä kahdeksan kertaa, joka johti yhteensä 96 miljoonan solun elektroporaatioon. Solut sekoitettiin alustaan niin, että saatiin solutiheys, joka oli miljoona solua per ml, ja 1 ml:n määrät jaettiin yhteensä 96:lle 150 mm:m kudosviljelymaljalle (Falcon), joista kukin sisälsi vähintään 35 ml alustaa, joka oli DMEM/15 % naudan seerumi. Seuraavana päivänä alusta imettiin pois ja se korvattiin tuoreella alustalla, joka sisälsi 0,8 mg G418-yhdistettä/ml (Gibco). Kymmenen vuorokauden inkubaation jälkeen kunkin maljan alustasta otettiin näyte hEPO-proteiinin ELISA-analyysiin (R & D Systems). Kuusi 96:sta maljasta sisälsi ainakin

10 mU hEPO-proteiinia/ml. Yksi näistä maljoista, numero 18, valittiin hEPO-ekspressoivien pesäkkeiden puhdistusta varten. Kukin 96:sta 150 mm:n maljasta sisälsi noin 600 G418-resistenttiä pesäkettä (arvioitu G418-resistenttien pesäkkeiden kokonaismäärä oli 57 600 kaikilla 96 maljalla). Noin 600 maljalla numero 18 olevaa pesäkettä trypsinoitiin ja ne maljattiin uudelleen tiheytenä 50 solua/ml 364-kuoppaisille maljoille (Sterilin). Yhden viikon inkubaation jälkeen yksittäiset pesäkkeet olivat havaittavissa määränä, joka oli noin kymmenen pesäkettä per suuri kuoppa 364-kuoppaisilla maljoilla (nämä maljat sisältävät 16 pientä kuoppaa kussakin 24 suuressa kuopassa). Kukin kuoppa seulottiin hEPO-ekspression suhteen tässä vaiheessa. Kaksi suurista kuopista sisälsi alustaa, jossa oli ainakin 20 mU hEPO-proteiinia/ml. Kuopan A2 havaittiin sisältävän 15 pesäkettä, jotka olivat jakaantuneet 16 pienen kuopan kesken. Kunkin näiden pienen kuopan sisältö trypsinoitiin ja ne siirrettiin 16 yksittäiseen kuoppaan 96-kuoppaiselle maljalle. Seitsemän vuorokauden inkubaation jälkeen kunkin näiden kuopan alustasta otettiin näyte hEPO-proteiinin analysoimiseksi ELISA-menetelmällä. Ainoastaan yksi kuoppa, kuoppa numero 10, sisälsi hEPO-proteiinia. Tälle solukannalle annettiin nimi HT165-18A2-10 ja sitä laajennettiin viljelmässä kvantitatiivista hEPO-analyysiä, RNA-eristystä ja DNA-eristystä varten. hEPO-tuoton kvantitatiivinen mittaus johti arvoon 2 500 mU/miljoona solua/24 tuntia.

DNA-koetinta, jonka pituus oli 0,2 kb, joka ulottui hEPO-geenin eksonin 5 AccI-kohdasta transloimattoman 3'-alueen BglII-kohtaan, käytettiin sellaisen RNA:n hybridisaatiossa, joka eristettiin HT165-18A2-10-soluista. Kohdentava rakenne pXEPO-13, joka on lyhentynyt eksonin 5 AccI-kohdasta, ei sisällä näitä AccI/BglII-sekvenssejä ja sen vuoksi on diagnostinen hEPO-lokukseen kohdentumisesta. Ainoastaan solukannat, joissa luonnollisten hEPO-sekvens-

sien kanssa on tapahtunut homologinen rekombinaatio, tuottavat hEPO-mRNA-molekyylejä, jotka sisältävät sekvenssin, joka on homologinen AccI/BglII-sekvensseille. HT165-18A2-10-solujen havaittiin ekspressoivan mRNA-molekyylejä, jotka olivat ennustetun kokoisia ja hybridisoituivat ^{32}P-leimattuun AccI/BglII-hEPO-koettimeen Northern blot -analyysissä. Restriktioentsyymi- ja Southern blot -analyysit vahvistivat, että neo-geeni ja mMT-I-promoottori olivat kohdentuneet toiseen kahdesta hEPO-alleelista HT165-18A2-10-soluissa.

Nämä tulokset osoittavat, että homologista rekombinaatiota voidaan käyttää kohdentamaan säätelyalue geeniin, joka on normaalisti hiljainen ihmisen fibroblasteissa, joka johtaa sen geenin toiminnalliseen aktivaatioon.

22.1 5' CACCTAAAAT GATCTCTCTG G (SEQ ID NO 14)

22.2 5' CGCGCCGGGT GACCACACCG GGGGCCCTAG ATCTGGTGAA GCTGGAGCTA CGGAGTAA (SEQ ID NO 15)

22.3 5' TTACTCCGTA GCTCCAGCTT CACCAGATCT AGGGCCCCCG GTGTGGTCAC CCGGCGCG (SEQ ID NO 16)

22.4 5' GTCTCACCGT GATATTCTCG G (SEQ ID NO 17)

Esimerkki 5

Intronittomien geenien tuotto

Geenikohdennusta voidaan käyttää myös tuottamaan prosessoituja geenejä, joista puuttuu intronit, hiivaan tai bakteeriin siirtoa varten geenin ekspressomiseksi ja in vitro proteiinin tuottoon. Esimerkiksi hGH-proteiinia voidaan tuottaa hiivassa alla kuvatulla lähestymistavalla.

Muodostetaan kaksi erillistä kohdentavaa rakennetta. Kohdentava rakenne 1 (TC1) sisältää retroviruksen LTR-sekvenssin, esimerkiksi Moloney Murine Leukemia -viruksen (MoMLV) LTR-sekvenssin, selektiomerkin ihmisen soluja varten (esim. neo-geeni Tn5-sekvenssistä), selektiomerkin

hiivaa varten (esim. hiivan URA3-geeni), säätelyalueen, joka kykenee ohjaamaan geenieksprессiota hiivassa (esim. GAL4-promoottorin) ja vaihtoehtoisesti sekvenssin, joka fuusioituna hGH-geeniin, sallii hGH-proteiinin erityksen hiivasoluista (leader-sekvenssin). Vektori voi sisältää myös DNA-sekvenssin, joka sallii retroviruksen pakkauksen ihmisen soluissa. Rakenne on organisoitu niin, että yllä olevien sekvenssien vieressä on molemmin puolin genomiset hGH-sekvenssit, jotka homologisen rekombinaation aikana genomisen hGH-geenin N sekvenssien kanssa integroituvat TC1-rakenteen eksogeenisiin sekvensseihin juuri ylävirtaan hGH-geenin N kodonista 1 (vastaa aminohappokohtaa 1 kypsässä prosessoidussa proteiinissa). DNA-sekvenssien järjestys integraatiossa on: hGH-geenin ylävirran sekvenssit ja säätelysekvenssit, neo-geeni, LTR, URA3-geeni, GAL4-promoottori, hiivan leader-sekvenssi, hGH-sekvenssit sisältäen kypsän proteiinin aminohapon 1 ja sen alavirran sekvenssit. Kohdentava rakenne 2 (TC2) sisältää sekvenssit, jotka riittävät plasmidin replikaatioon hiivassa (esim. 2 μ -plasmidin tai ARS-sekvenssit), hiivan transkription lopetussekvenssin, viruksen LTR-alueen ja merkkigeenin ihmisen soluissa tapahtuvaa selektiota varten (esim. bakteerin gpt-geenin). Rakenne on organisoitu niin, että yllä olevien sekvenssien vieressä on molemmin puolin genomiset hGH-sekvenssit, jotka genomisen hGH-geenin N sekvenssien kanssa tapahtuneen homologisen rekombinaation aikana integroituvat TC2-rakenteen eksogeenisiin sekvensseihin juuri alavirtaan hGH-geenin N lopetuskodonista. DNA-sekvenssien järjestys integraation aikana on: hGH-geenin eksonin 5 sekvenssit, hiivan transkription lopetussekvenssit, hiivaplasmidin replikaatiosekvenssit, LTR, gpt-geeni, hGH-geenin transloimattomat 3'-sekvenssit.

TC1- ja TC2-rakenteista peräisin olevat lineaariset fragmentit kohdennetaan peräkkäin niiden vastaaviin kohtiin, jotka ovat hGH-geenin vieressä. Näiden solujen su-

perinfektion jälkeen auttajaretroviruksilla, LTR-alueen ohjaama transkriptio tämän alueen läpi johtaa RNA-molekyyliin, jossa on LTR-sekvenssit molemmissa päissä. Tämän RNA-molekyylin silmukointi muodostaa molekyylin, jossa normaalit hGH-intronit poistetaan. Prosessoidun transkriptin käänteiskopiointireaktio johtaa prosessoidun hGH-fuusiogeenin kaksijuosteisten DNA-kopioiden kerääntymiseen. DNA eristetään kaksoiskohdennetuista retroviruksella infektoiduista soluista ja digestoidaan entsyymillä, joka katkaisee transkriptioyksikön kerran LTR-alueen sisältä. Digestoitu materiaali ligatoidaan olosuhteissa, jotka sallivat ligaation itsensä kanssa, viedään sisään hiivasoluihin ja sen jälkeen solut altistetaan selektiolle URA3-geenin suhteen. Ainoastaan solut, joihin on mennyt sisään URA3-geeni (joka on liitetty sekvenssiin, joka on TC1- ja TC2-rakenteissa, ja prosessoidussa hGH-geenissä), voivat kasvaa. Nämä solut sisältävät plasmidin, joka ekspressoi hGH-proteiinia indusoitaessa galaktoosilla ja erittävät hGH-proteiinia soluista johtuen fuusioidusta hiivan leader-peptidisekvenssistä, joka katkaistaan erityksen aikana niin, että muodostetaan kypsä biologisesti aktiivinen hGH-molekyyli.

Ekspressio bakteerisoluissa saadaan aikaan yksinkertaisesti korvaamalla TC1- ja TC2-rakenteissa hiivan URA3-geeni plasmidin pBR322 ampisilliiniresistenssigeenillä, hiivan GAL4-promoottori tac-promoottorilla [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21 - 25 (1983)], hiivan leader-sekvenssi bakteerin leader-sekvenssillä, 2 μ -plasmidin tai ARS-sekvenssin replikaatio-origo plasmidin pBR322 replikaatio-origolla ja hiivan transkription lopetussekvenssi bakteerin transkription lopetussekvenssillä [esim. trpA-transkription lopetussekvenssi; Christie, G.E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4180 - 4184 (1981)]. Samalla tavalla hEPO-geeniä voidaan ekspressoida hiivassa ja bakteerissa yksinkertaisesti korvaamalla hGH-geeniin

kohdentavat sekvenssit hEPO-geeniin kohdentavilla sekvenseillä niin, että hiivan tai bakteerin leader-sekvenssi sijoitetaan juuri ylävirtaan hEPO-geenin kodonista 1 (joka vastaa aminohappokohtaa 1 kypsässä prosessoidussa proteiinissa).

Esimerkki 6

EPO-geenin aktivointi ja sen amplifikaatio kuolemattomaksi tehdyssä ihmisen solulinjassa

Dhfr-ekspressioyksikön inkorporaatio plasmidin pXEPO-13 uniikkiin HindIII-kohtaan (katso esimerkki 4) johtaa uuteen kohdentavaan vektoriin, joka kykenee kaksoisselektioon ja sellaisten solujen selektioon, joissa dhfr-geeni on amplifioitunut. Plasmidin pXEPO-13 uniikki HindIII-kohta määrittää neo-geenin ja ihmisen EPO-geenin ylävirrassa luonnollisesti olevan genomisen sekvenssin rajakohdan. Dhfr-geenin sijoittaminen tähän kohtaan muodostaa rakenteen, jossa neo- ja dhfr-geenejä ympäröi DNA-sekvenssi, joka on peräisin luonnollisesta hEPO-lokuksesta. Kuten plasmidi pXEPO-13, ne johdannaiset, joissa dhfr-geeni on insertoitu, ovat käyttökelpoisia kohdentamaan hEPO-lokukseen homologisella rekombinaatiolla. Sellainen rakenne, jolle on annettu nimi pREPO4, on esitetty kuviossa 6. Plasmidi sisältää ihmisen EPO-geenin eksonit 1 - 4 ja osan eksonista 5 kuin myös HindIII-BamHI-fragmentin, joka sijaitsee ylävirtaan hEPO-geenin koodittavasta alueesta. Sekvenssit pSVe, pTK ja pmMT-I vastaavat promoottoreita SV40-viruksen aikaiselta alueelta, herpes simplex -viruksen (HSV) tymidiinikinaasigeenistä (TK) ja hiiren metallotioneiini-I-geenistä. Se muodostettiin seuraavasti: HindIII-entsyymillä digestoitu plasmidi pXEPO-13 puhdistettiin ja tasapäistettiin DNA polymeraasi I -entsyymin Klenow-fragmentilla. Dhfr-ekspressioyksikön saamiseksi plasmidirakenne pF8CIS9080 [Eaton et al., Biochemistry 25: 8343 -8347 (1986)] digestoitiin EcoRI- ja SalI-entsyymeillä. 2 kb:n pituinen fragmentti, joka sisäl-

tää dhfr-ekspressioyksikön, puhdistettiin tästä digestiosta ja tehtiin tasapäiseksi DNA polymeraasi I -entsyymin Klenow-fragmentilla. Tämä dhfr-sekvenssin sisältävä fragmentti ligatoitiin sitten tasapäistettyyn HindIII-kohtaan plasmdissa pXEPO-13. Pieni määrä tätä ligaatiota transformoitiin E. coli -soluihin ja maljattiin ampisilliiniselektiomaljoille. Kun oli inkuboitu yli yön 37 °C:ssa, havaittiin erilliset bakteeripesäkkeet, ne poimittiin ja kasvatettiin. Plasmidien minivalmisteet valmistettiin näistä viljelmistä ja sitten tuloksena syntynyt DNA altistettiin restriktioentsyymidigestiolle BglII-HindIII-entsyymeillä ja SfiI-entsyymillä insertoituneiden dhfr-fragmenttien orientaation määrittämiseksi. Plasmidi-DNA:n yhdestä näistä valmisteista havaittiin sisältävän sellaisen 2 kb:n pituisen dhfr-fragmentin insertion. Dhfr-ekspressioyksikön transkription orientaation tässä plasmidissa havaittiin olevan päinvastainen kuin viereisen neo-geenin. Tälle rakenteelle annettiin nimi pREPO4.

Plasmidia pREPO4 käytettiin amplifioimaan hEPO-lokus soluissa, sen jälkeen kun endogeeninen hEPO-geeni oli aktivoitu homologisella rekombinaatiolla. Geeniaktivaatio tällä rakenteella sallii kohonneen DHFR-ekspression selektion käyttämällä metotreksaattilääkettä (MTX). Tyypillisesti kohonnut DHFR-ekspressio tapahtuu kohonneen kopiomäärän välityksellä DNA-amplifikaatiolla. Nettotulos on aktivoituneen hEPO-geenin koamplifikaatio yhdessä dhfr-sekvenssien kanssa. Aktivoituneen EPO-lokuksen koamplifikaatio johtaa kohonneeseen EPO-ekspressioon.

Kohdennuskokeet suoritettiin HT1080-soluissa plasmidilla pREPO4. hEPO-proteiinia ekspressoiva linja HTREPO-52 eristettiin. Tämä linja analysoitiin kvantitatiivisesti EPO-proteiinin tuoton suhteen ja Southern- ja Northern blot -analyyseillä. Tämän kannan havaittiin olevan kohdentuneen yhdellä kopiolla dhfr/neo/mMT-I-sekvenssiä. Ekspressiotasot, jotka saatiin käyttäen G418-yhdistettä se-

lektiossa määränä 0,8 mg/ml, olivat noin 1 300 mU/miljoona solua/vuorokausi. Koska kohdennettu EPO-lokus sisälsi dhfr-ekspressioyksikön, oli mahdollista selektoida kohonneen DHFR-ekspression suhteen käyttäen antifolaattilääkettä MTX. Sen vuoksi tämä kanta altistettiin vaiheittaiselle selektiolle MTX-konsentraatioissa, jotka olivat 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 ja 0,4 μM. Tämän kannan alkuperäisen selektion tulokset on esitetty taulukossa 4 ja kuviossa 7.

Taulukko 4

Solulinja	MTX (μM)	mU/miljoonaa solua/ 24 tuntia
52C20-5-0	0	1 368
52C20-5-.01	0,01	1 744
52C20-5-.02	0,02	11 643
52C20-5-0.05	0,05	24 449
52-3-5-0.10	0,1	37 019
52-3-2-0.20	0,2	67 867
52-3-2-0.4B	0,4	99 919

Selektio kohoavilla MTX-tasoilla onnistui kohottamaan hEPO-ekspressiota linjassa HTREPO-52 niin, että solulinjassa, joka oli resistentti 0,4 μM MTX-yhdisteelle, havaittiin 70-kertainen kohoaminen hEPO-tuotossa. hEPO-lokuksen amplifioitumisen varmistus suoritettiin Southern blot -analyysillä MTX-resistenteissä solulinjoissa, joka paljasti noin 10-kertaisen kohoamisen aktivoituneen hEPO-lokuksen kopiomäärässä verrattuna hEPO-emoalleeliin (ei-kohdentunut).

Esimerkki 7

hEPO-fuusiogeenin tuotto insertoimalla CMV-promoottori 1,8 kb:n päähän ylävirtaan hEPO-geenin genomisesta koodittavasta alueesta

Kohdentavan plasmidin pREPO15 rakentaminen

Plasmidi pREPO15 rakennettiin fuusioimalla ensin CMV-promoottori hGH-geenin eksoniin 1 PCR-amplifikaatiolla. 1,6 kb:n pituinen fragmentti amplifoitiin hGH-ekspressiorakenteesta pXGH308, jossa on CMV-promoottorialue, joka alkaa nukleotidista 546 ja loppuu nukleotidiin 2105 Genbank-sekvenssissä HS5MIEP, fuusioituna hGH-sekvenssiin, joka alkaa nukleotidista 5225 ja loppuu nukleotidiin 7 322 Genbank-sekvenssissä HUMGHCSA, käyttäen oligonukleotideja 20 ja 35. Oligo 20 (35 bp, SEQ ID -numero 18) hybridisoitui CMV-promoottoriin kohtaan -614 suhteessa cap-kohtaan (Genbank-sekvenssissä HEHCMVP1) ja sisälsi SalI-kohdan 5'-päässään. Oligo 35 (42 bp, SEQ ID -numero 19) hybridisoitui CMV-promoottoriin kohdalle +966 ja viereiseen hGH-geenin eksoniin 1 ja sisälsi ensimmäiset kymmenen emäsparia hEPO-geenin intronista 1 (joka sisälsi osan silmukoinnin luovuttajakohdasta) ja HindIII-kohdan 5'-päässään. Tuloksena syntynyt PCR-fragmentti digestoitiin HindIII- ja SalI-entsyymeillä ja puhdistettiin geelissä. Plasmidi pT163 (esimerkki 2) digestoitiin XhoI- ja HindIII-entsyymeillä ja noin 1,1 kb:n pituinen fragmentti, joka sisälsi neo-ekspressioyksikön, puhdistettiin geelissä. 1,6 kb:n pituinen CMV-promoottori/hGH-eksoni1/silmukoinnin luovuttajakohta -fragmentti ja 1,2 kb:n pituinen neo-fragmentti ligatoitiin yhteen ja insertoitiin HindIII-kohtaan plasmidissa pBSIISK+ (Stratagene, Inc.). Tuloksena syntynyt välimuotoplasmidi (jolle annettiin nimi pBNCHS) sisälsi neo-ekspressioyksikön sellaisessa transkription orientaatiossa, joka oli päinvastainen verrattuna CMV-promoottori/hGH-eksoni 1/silmukoinnin luovuttajakohta -fragmentin vastaavaan. Toinen välimuoto pREPO5deltaHindIII rakennettiin di-

gestoimalla ensin plasmidi pREPO5 HindIII-entsyymillä. Tämä vapautti kaksi fragmenttia, joiden pituudet olivat 1,9 kb ja 8,7 kb, ja 8,7 kb:n pituinen fragmentti, joka sisälsi kohdentavat EPO-seksenssit, puhdistettiin geelissä ja ligatoitiin itsensä kanssa kiinni. Tuloksena syntynyt plasmidi pREPO5deltaHindIII, joka sisälsi ainoastaan ne ei-koodittavat genomiset DNA-sekvenssit, jotka normaalisti sijaitsevat ylävirtaan hEPO-geenistä. Tämä sisälsi sekvenssin kohdasta -5 786 kohtaan -1 suhteessa EPO-geenin eksoniin 1. 2,8 kb:n pituinen fragmentti, joka sisälsi neo-, CMV-promoottori-, hGH-geenin eksonin 1 ja silmukoinnin luovuttajakohdan sekvenssit, irrotettiin plasmidista pBNCHS HindIII-entsyymillä ja puhdistettiin geelissä. Tämä fragmentti tasapäistettiin DNA polymeraasi I -entsyymin Klenow-fragmentilla (New England Biolabs, Inc.) ja ligatoitiin BglII-digestoituun ja tasapäistettyyn plasmidiin pREPO5deltaHindIII. BglII katkaisee kohdasta -1 779 ylävirtaan hEPO-geenin eksonista 1 plasmidissa pREPO5Δ-HindIII. Tuloksena syntynyt rakenne pREPO15 (kuvio 8) sisälsi EPO-geenin ylävirran sekvenssit -5 786 - -1 779 suhteessa hEPO-geenin koodittavaan alueeseen, neo-ekspressioyksikön, CMV-promoottorin, hGH-geenin eksonin 1, silmukoinnin luovuttajakohdan ja sekvenssit -1 778 - -1 ylävirtaan hEPO-geenin koodittavalta alueelta niin, että eri elementit koottiin luetellussa järjestyksessä 5' - 3'-suuntaan suhteessa hEPO-geenin ylävirran alueen nukleotidisekvenssille. Ihmisen solujen transfektiota varten plasmidi pREPO15 transfektoitiin NotI- ja PvuI-entsyymeillä 8,6 kb:n pituisen kohdentavan fragmentin vapauttamiseksi. Kohdentava fragmentti sisälsi 4,0 kb:n ja 1,8 kb:n pituisen ensimmäisen ja toisen kohdentavan sekvenssin, vastaavasti, joilla oli homologiaa hEPO-geenin ylävirran DNA:lle.

Soluviljely, transfektio ja EPO-proteiinia ekspressoivien kohdennettujen kloonien tunnistus

Kaikkia soluja ylläpidettiin 37 °C:n lämpötilassa 5 %:n CO_2-ilmakehässä ja 98 %:n kosteudessa DMEM-alustassa, joka sisälsi 10 % naudan seerumia (DMEM/10, HyClone Laboratories). Ihmisen esinahan sekundaaristen fibroblastien transfektio suoritettiin elektroporoimalla 12 x 10^6 solua PBS:ssä (GIBCO) käyttäen 100 µg DNA:ta, 250 voltilla ja 960 µF:lla. Käsitellyt solut ympättiin tiheytenä 1 x 10^6 solua per 150 mm:n malja. Seuraavana päivänä alusta muutettiin alustaksi, joka oli DMEM/10, joka sisälsi 0,8 mg G418-yhdistettä (GIBCO)/ml. Selektiota suoritettiin 14 vuorokautta, jolloin alustasta otettiin näyte EPO-proteiinin tuottoa varten. Kaikki pesäkkeet sellaisilla maljoilla, joilla oli merkittävät hEPO-tasot (> 5 mU/ml) määritettynä EPO-ELISA-testillä (Genzyme Inc.), eristettiin steriileillä lasikloonaussylintereillä (Bellco) ja siirrettiin yksittäisiin kuoppiin 96-kuoppaisella levyllä. Kun oli inkuboitu 1 - 2 vuorokautta, näistä kuopista otettiin näyte hEPO-tuottoa varten ELISA-testiin. Tuloksena syntyneet hEPO-proteiinia tuottavat solukannat laajennettiin viljelmässä jäädytystä, nukleiinihappoeristystä ja EPO-tuoton kvantitointia varten.

HT1080-solujen (ATCC CCL 121) transfektio suoritettiin käsittelemällä 12 x 10^6 solua PBS:ssä (GIBCO) 45 µg:lla DNA:ta 450 voltilla ja 250 µF:lla. Kloonien kasvatus ja tunnistus tehtiin, kuten yllä on kuvattu ihmisen esinahan fibroblasteille. hEPO-proteiinia tuottavien klonaalisten solulinjojen eristys tapahtui rajoittavalla laimennuksella. Tämä suoritettiin maljaamalla ensin pesäkkeet, jotka oli kerätty alkuperäisiltä selektiomaljoilta, 10 - 15 pesäkkeen pooleihin per kuoppa 24-kuoppaiselle maljalle. Sitten hEPO-proteiinia tuottavat poolit maljattiin solutiheyksinä, jotka johtivat tiheyteen, joka oli < 1 pesäke per kuoppa 96-kuoppaisella maljalla. Yksittäi-

set pesäkkeet laajennettiin lisäanalyysejä varten, kuten on kuvattu ihmisen esinahan fibroblasteille yllä.

EPO-proteiinia ekspressoivien kloonien karakterisointi

Plasmidista pREPO15 puuttuu kaikki hEPO-geenin koodittavat sekvenssit. Kun neo/CMV-promoottori/hGH-geenin eksoni 1/silmukoinnin luovuttaja -fragmentti kohdennetaan ylävirtaan hEPO-geenin eksonista 1, hEPO-ekspressio tapahtuu transkription aloituksella CMV-promoottorista, joka tuottaa primaarisen transkriptin, joka sisältää CMV-sekvenssit, hGH-geenin eksonin 1 ja silmukoinnin luovuttajakohdan, 1,8 kb:n hEPO-geenin ylävirtasekvenssejä ja normaalit hEPO-geenin eksonit, intronit ja transloimattomat 3'-sekvenssit. Tämän transkriptin silmukointi tapahtuu silmukoinnin luovuttajakohdasta, joka on hGH-geenin eksonin 1 vieressä, seuraavaan alavirrassa olevaan silmukoinnin vastaanottajakohtaan, joka sijaitsee hEPO-geenin eksonin 2 vieressä. Tämä johtaa tehokkaasti uuteen introniin, joka sisältää hEPO-geenin ylävirran genomiset sekvenssit, normaalin hEPO-promoottorin, hEPO-geenin eksonin 1 ja hEPO-geenin intronin 1. Kypsässä transkriptissa hGH-geenin eksoni 1 korvaa hEPO-geenin eksonin 1. hEPO-geenin eksoni 1 koodittaa ainoastaan ensimmäistä neljää aminohappoa ja kolmatta osaa 26 aminohapon pituisen signaalipeptidin aminohapoista, joka katkaistaan pois esiasteproteiinista ennen sen eritystä solusta. hGH-geenin eksoni 1 koodittaa ensimmäistä kolmea aminohappoa ja kolmatta osaa hGH-signaalipeptidin aminohapoista, joka myös katkaistaan pois esiasteproteiinista ennen sen eritystä solusta. Sellaisen lähetin translaatio, jossa hGH-geenin eksoni 1 korvaa hEPO-geenin eksonin 1, johtaa näin ollen proteiiniin, jossa signaalipeptidi on hGH- ja hEPO-sekvenssien kimeeri. Signaalipeptidin poisto normaalilla translaation jälkeisellä katkaisutapahtumalla tuottaa kypsän hEPO-molekyylin,

jonka primaarisekvenssiä ei voida erottaa normaalista tuotteesta.

Plasmidin pREPO15 transfektio ihmisen fibroblasteihin johti EPO-ekspressioon näissä soluissa. Taulukossa 5 esitetään tulokset kohdennuskokeista, joissa käytettiin plasmidia pREPO15 ja ihmisen fibroblasteja ja HT1080-soluja. Kohdennusfrekvenssin normaaleissa ihmisen fibroblasteissa havaittiin olevan 1/264 $G418^r$-pesäkettä ja kohdennusfrekvenssin HT1080-soluilla havaittiin olevan 1/450 $G418^r$-pesäkettä. hEPO-proteiinin tuottotasot kustakin näistä solukannoista kvantitoitiin. Ihmisen fibroblastien transfektiolla saadun hEPO-tuottajan havaittiin erittävän 7 679 $mU/10^6$ solua/vuorokausi (taulukko 5). Aktivoitu hEPO-solulinja HT1080-soluista tuotti 12 582 $mU/10^6$ solua/vuorokausi (taulukko 5). Nämä tulokset osoittivat, että hEPO-lokuksen aktivointi oli tehokas ja aiheutti hEPO-proteiinin tuoton konstitutiivisesti suhteellisen korkeina tasoina. Restriktioentsyymianalyysiä ja Southern blot -hybridisaatioanalyysiä käytettiin sen varmistamiseksi, että kohdennustapahtumat olivat tapahtuneet EPO-lokuksessa.

Suoritettiin Southern blot -analyysi ihmisen sellaisilla fibroblasteilla ja HT1080-klooneilla, jotka oli kohdennettu plasmidilla pREPO15. Kuviossa 9A esitetään hEPO-emolokuksen ja kohdennetun lokuksen restriktiokartta, ja kuviossa 9B esitetään tulokset ihmisen kohdennetun fibroblastikloonin restriktioentsyymianalyysistä ja Southern-hybridisaatioanalyysistä. BglII/EcoRI- ja BamHI-digestit paljastivat 5,9 ja 6,6 kb:n pituiset fragmentit, vastaavasti, tuloksena kohdennustapahtumasta hEPO-lokuksessa (kaistat T1). Molemmat näistä fragmenteista johtuivat 2,7 kb:n pituisen DNA:n, joka sisälsi neo-geenin ja CMV-promoottorisekvenssit, insertiosta. Koska ainoastaan toinen kahdesta hEPO-alleelista oli kohdennettu, 4,3 kb:n (BglII/EcoRI) tai 10,6 kb:n (BamHI) pituiset fragmentit, jotka heijastivat muuttumatonta hEPO-lokusta, havaittiin näissä

kannoissa ja emo-DNA:ssa (kaistat HF). Nämä tulokset varmistavat, että homologinen rekombinaatiotapahtuma oli tapahtunut hEPO-lokuksessa johtaen uuden transkriptioyksikön tuottoon, joka ohjasi ihmisen erytropoietiinin tuottoa.

Oligonukleotidi	Sekvenssi
20	5' TTTTCTCGAG TCGACGACAT TGATTATTGA CTAGT (SEQ ID NO: 18)
35	5'TTTTAAGCTT GAGTACTCAC CTGTAGCCAT GGTGGATCCC GT (SEQ ID NO: 19)

Taulukko 5

Plasmidin pREPO15 transfektio ja hEPO-geenin ekspression aktivointi ihmisen soluissa

Transfektoitu solutyyppi	Käsitellyt solut	[a]G418^r-pesäkkeet	[b]Maljat, joissa EPO-ekspressoijia	hEPO-ekspressoijia per G418^r-pesäke	hEPO-ekspressoijia per käsitelty solu	[c]hEPO-ekspressio (mU/10^6 solua/24 h
Ihmisen fibroblastit	3,3 x 10^7	264	1	1/264	1/3,3 x 10^7	7 679
HT1080-solut	3,1 x 10^7	2 700	6	1/450	1/5,2 x 10^6	12 582

[a] Arvioitu laskemalla pesäkkeet kahdelta maljalta, laskemalla tulosten keskiarvo ja ekstrapoloimalla maljojen kokonaismäärään

[b] Alustasta maljoilta, joilla oli G418^r-pesäkkeitä, otettiin näyte EPO-ELISA-analyysiin ja ne, joissa oli korkeammat hEPO-tasot kuin 5 mU/ml, laskettiin tapahtumiksi, joissa EPO oli aktivoitunut

[c] Kvantitatiivinen hEPO-tuotto määritettiin ihmisen fibroblastikannasta HF342-15 tai HT1080-solulinjasta HTREPO15-1-6-6

Esimerkki 8

hEPO-fuusiogeenin tuotto ja amplifikaatio insertoimalla CMV-promoottori 1,8 kb:n päähän ylävirtaan hEPO-geenin genomisesta koodittavasta alueesta

Kohdentavan plasmidin pREPO18 rakentaminen

Plasmidi pREPO18 (kuvio 10) rakennettiin insertoimalla dhfr-ekspressioyksikkö ClaI-kohtaan, joka sijaitsee plasmidin pREPO15 neo-geenin 5'-päässä. Dhfr-ekspressioyksikön saamiseksi plasmidirakenne pF8CIS9080 [Eaton et al., Biochemistry 25: 8343 - 8347 (1986)] digestoitiin EcoRI- ja SalI-entsyymeillä. 2 kb:n pituinen fragmentti, joka sisältää dhfr-ekspressioyksikön, puhdistettiin tästä digestiosta ja tehtiin tasapäiseksi DNA polymeraasi I -entsyymin Klenow-fragmentilla. ClaI-linkkeri (New England Biolabs) ligatoitiin sitten tasapäistettyyn dhfr-fragmenttiin. Tämän ligaation tuotteet digestoitiin sitten ClaI-entsyymillä ja ligatoitiin ClaI-digestoituun plasmidiin pREPO15. Pieni määrä tätä ligaatiota transformoitiin E. coli -soluihin ja maljattiin ampisilliiniselektiomaljoille. Bakteeripesäkkeet analysoitiin restriktioentsyymidigestiolla insertoituneen dhfr-fragmentin orientaation määrittämiseksi. Yksi klooni, jossa dhfr-fragmentin transkription orientaatio oli päinvastainen kuin neo-geenin vastaava, nimettiin plasmidiksi pREPO18(-). Toinen plasmidi, jossa dhfr-fragmentin transkription orientaatio oli sama kuin neo-geenin vastaava, nimettiin plasmidiksi pREPO18(+).

Soluviljely, transfektio ja EPO-proteiinia ekspressoivien kohdennettujen kloonien tunnistus

Kaikkia soluja ylläpidettiin 37 °C:ssa 5 %:n CO_2-ilmakehässä ja 98 %:n kosteudessa DMEM-alustassa, joka sisälsi 10 % naudan seerumia (DMEM/10, HyClone Laboratories). HT1080-solujen (ATCC CCL 121) transfektio tapahtui käsittelemällä 12 x 10^6 solua PBS:ssä (GIBCO) käyttäen 45 µg DNA:ta, 450 voltilla ja 250 µF:lla. Käsitellyt solut

ympättiin tiheytenä 1 x 10^6 solua per 150 mm:n malja. Seuraavana päivänä alusta muutettiin alustaksi, joka oli DMEM/10, joka sisälsi 0,8 mg G418-yhdistettä (GIBCO)/ml. Selektiota suoritettiin 14 vuorokautta, jolloin alustasta otettiin näyte hEPO-proteiinin tuottoa varten. Maljat, joilla oli merkittävät hEPO-tuottotasot (> 5 mU/ml) määritettynä hEPO-ELISA-testillä (Genzyme Inc.), trypsinoitiin ja solut maljattiin uudelleen kloonin eristystä varten. hEPO-proteiinia tuottavien klonaalisten solulinjojen eristys tapahtui rajoittavalla laimennoksella niin, että ensin maljattiin kloonit 10 - 15 pesäkkeen pooleina per kuoppa 24-kuoppaiselle maljalle, ja seuraavaksi maljattiin solut hEPO-proteiinia tuottavista pooleista solutiheyksiin, jotka olivat pienempiä kuin 1 pesäke per kuoppa, 96-kuoppaiselle maljalle. Yksittäiset kloonit laajennettiin viljelmässä jäädytystä, nukleiinihappoeristystä ja hEPO-proteiinin tuoton kvantitointia varten.

Amplifioidut dhfr-sekvenssit sisältävien solujen eristys metotreksaattiselektiolla

Kohdennetut G418^r-solulinjat, jotka tuottivat hEPO-proteiinia sen jälkeen, kun ne oli transfektoitu pREPO18-plasmidilla, maljattiin erilaisilla solutiheyksillä metotreksaatilla (MTX) tapahtuvaa selektiota varten. Kun uusia pesäkkeitä ilmaantui selektoitaessa yhdessä MTX-konsentraatiossa, ne testattiin hEPO-proteiinin tuoton suhteen ja maljattiin uudelleen erilaisilla solutiheyksillä suuremmassa MTX-konsentraatiossa (tavallisesti kaksinkertainen aiempaan konsentraatioon verrattuna). Tätä menetelmää toistettiin, kunnes haluttu hEPO-tuottotaso saavutettiin. Kussakin MTX-resistenssivaiheessa DNA ja RNA eristettiin vastaavaa Southern blot- ja Northern blot -analyysiä varten.

EPO-proteiinia ekspressoivien kloonien karakterisointi

Plasmidi pREPO18, jossa oli kaksi erilaista dhfr-sekvenssin orientaatiota, transfektoitiin HT1080-soluihin.

Ennen transfektiota plasmidit pREPO18(-) ja pREPO18(+) digestoitiin XbaI-entsyymillä, joka vapautti 7,9 kb:n pituisen kohdentavan fragmentin, joka sisälsi, seuraavassa järjestyksessä, 2,1 kb:n pituisen genomisen DNA:n alueen hEPO-geenin eksonin 1 ylävirrasta (kohdasta -3 891 kohtaan -1 779 suhteessa hEPO-geenin ATG-aloituskodoniin), 2 kb:n pituisen alueen, joka sisältää dhfr-geenin, 1,1 kb:n pituisen alueen, joka sisältää neo-geenin, 1,5 kb:n pituisen alueen, joka sisältää CMV-promoottorin fuusioituna hGH-geenin eksoniin 1, kymmenen emäsparia hEPO-geenin intronista 1 (joka sisältää silmukoinnin luovuttajakohdan), jota seurasi 1,1 kb:n pituinen alue hEPO-geenin eksonin 1 ylävirran aluetta (kohdasta -1 778 kohtaan -678 suhteessa EPO-geenin ATG-aloituskodoniin). Transfektio- ja kohdennusfrekvenssit kahdesta kokeesta on esitetty taulukossa 6. Viisi primaarista $G418^r$-kloonia eristettiin näistä kokeista. Nämä laajennettiin viljelyllä hEPO-ekspression kvantitatiivista analyysiä varten (taulukko 7). Koska plasmidi pREPO18 sisältää dhfr-geenin, on mahdollista selektoida sellaisten solujen suhteen, jotka sisältävät amplifioituneet kopiot kohdentuvaa rakennetta, käyttämällä MTX-yhdistettä, kuten on kuvattu esimerkissä 6. $G418^r$-kloonit, joiden varmistettiin olevan kohdentuneita hEPO-lokukseen restriktioentsyymianalyysillä ja Southern-hybridisaatioanalyysillä, altistettiin vaiheittaiselle selektiolle MTX-yhdisteessä, kuten on kuvattu.

Taulukko 6

Plasmidin pREPO18 kohdentuminen HY1080-soluissa

Rakenne	DNA-digestio	Käsiteltyjä soluja	$G418^r$-pesäkkeitä	Maljat, joissa hEPO-ekspressoijia	hEPO-ekspressoijia/ $G418^r$-pesäke	Analysoidut primaarikloonit
pREPO18 (-)	XbaI	36×10^6	16 980	39	1/435	1
pREPO18 (+)	XbaI	36×10^6	19 290	41	1/470	4

Taulukko 7

Plasmidilla pREPO18 kohdennettujen HT1080-solulinjojen hEPO-proteiinin tuotto

Solulinja	Rakenne	hEPO mU/10^6 solua/24 h
18B3-147	pREPO18 (+)	24 759
18B4-181	pREPO18 (+)	20 831
18B3-145	pREPO18 (+)	17 586
18B3-168	pREPO18 (+)	5 293
18A3-119	pREPO18 (-)	2 881

Esimerkki 9

Endogeenisten α-interferoni-, GM-CSF-, G-CSF- ja FSHß-geenien aktivointi ja amplifiointi kuolemattomiksi tehdyissä ihmisen soluissa

Useat erilaiset endogeeniset solugeenit voidaan aktivoida ja amplifioida käyttäen keksinnön mukaisia menetelmiä ja DNA-rakenteita. Seuraavassa kuvataan yleinen strategia ihmisen α-interferoni- (leukosyytti-interferonin), GM-CSF- (granulosyytti/makrofaagien pesäkekasvua stimuloiva tekijä), G-CSF- (granulosyyttien pesäkekasvua stimuloiva tekijä) ja FSHß-geenien (follikkelia stimuloivan hormonin ß-alayksikkö) aktivoimiseksi ja amplifioimiseksi.

α-interferoni

Ihmisen α-interferonigeeni (Genbank-sekvenssi HUMIFNAA) koodittaa 188 aminohapon pituista esiasteproteiinia, joka sisältää 23 aminohapon pituisen signaalipeptidin. Geeni ei sisällä introneita. Kuvio 11 on kaaviokuva yhdestä strategiasta, jolla aktivoidaan α-interferonigeeni. Kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologi-

nen geenin ylävirran sekvensseille, amplifioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin, silmukoinnin vastaanottajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä, jotka ovat alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä. Toisen kohdentavan sekvenssin ei tulisi ulottua kauemmaksi kuin kohtaan -107 asti suhteessa normaaliin aloituskodoniin, jotta vältettäisiin eitoivotut ATG-aloituskodonit.

Tässä strategiassa ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi sijaitsevat juuri toistensa vieressä normaalissa kohdegeenissä, mutta se ei ole vaadittavaa (katso alla). Amplifioituvat merkkigeenit ja selektiomerkkigeenit, jotka ovat sopivia selektioon, on kuvattu tässä. Amplifioituva merkkigeeni ja selektiomerkkigeeni voi olla sama geeni, niiden sijannit voidaan vaihtaa ja toinen tai molemmat voivat sijaita kohdentavan rakenteen intronissa. Selektiomerkkigeeni on vaihtoehtoinen ja amplifioituva merkkigeeni tarvitaan ainoastaan silloin kun halutaan amplifikaatio. Spesifisen CAP-kohdan inkorporaatio on vaihtoehtoista. Vaihtoehtoisesti eksonisekvenssit muusta geenistä voidaan sisällyttää silmukoinnin vastaanottajakohdan 3'-puolelle ja toisen kohdentavan sekvenssin 5'-puolelle kohdentavassa rakenteessa. Säätelyalue, CAP-kohta, silmukoinnin luovuttajakohta, introni ja silmukoinnin vastaanottajakohta voidaan eristää täydellisenä yksikkönä ihmisen elongaatiotekijä-1α-geenistä (EF-1α; Genbank-sekvenssi HUMEF1A) tai sytomegaloviruksen (CMV; Genbank-sekvenssi HEHCMVP1) erittäin aikaiselta alueelta tai nämä komponentit voidaan kasata sopivista komponenteista, jotka on eristetty eri geeneistä.

Genominen DNA, joka vastaa α-interferonigeenin ylävirran aluetta, jota käytetään kohdentavina sekvensseinä, ja kohdentavan rakenteen kokoaminen voidaan suorittaa käyttäen alan asiantuntijan tuntemia yhdistelmä-DNA-mene-

sisältää 17 aminohapon pituisen signaalipeptidin. Geeni sisältää neljä eksonia ja kolme intronia ja esiasteen N-pään 50 aminohappoa ovat ensimmäisen eksonin koodittamia. Kuvio 12 on kaaviokuva strategiasta, jolla aktivoidaan GM-CSF-geeni. Tässä strategiassa kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen geenin ylävirran sekvensseille, amplifioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, eksonin, joka koodittaa aminohapposekvenssiä, joka on identtinen tai toiminnallisesti ekvivalentti GM-CSF-proteiinin ensimmäisen 50 aminohapon vastaavalle, silmukoinnin luovuttajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä, jotka ovat alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä. Tällä strategialla homologisesti rekombinantit solut tuottavat mRNA-molekyylin esiasteen, joka vastaa eksogeenistä eksonia ja silmukoinnin luovuttajakohtaa, toista kohdentavaa sekvenssiä, mitä tahansa sekvenssejä, jotka ovat toisen kohdentavan sekvenssin ja GM-CSF-geenin aloituskodonin välissä, ja GM-CSF-geenin eksoneita, intronеita ja transloimatonta 3'-aluetta (kuvio 11). Tämän lähetin silmukointi johtaa eksogeenisen eksonin fuusioon endogeenisen GM-CSF-geenin eksoniin 2, joka transloituna tuottaa GM-CSF-proteiinia.

Tässä strategiassa ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi sijaitsevat juuri toistensa vieressä normaalissa kohdegeenissä, mutta se ei ole vaadittavaa (katso alla). Amplifioituvat merkkigeenit ja selektiomerkkigeenit, jotka ovat sopivia selektioon, on kuvattu tässä. Amplifioituva merkkigeeni ja selektiomerkkigeeni voi olla sama geeni, niiden sijannit voidaan vaihtaa. Selektiomerkkigeeni on vaihtoehtoinen ja amplifioituva merkkigeeni tarvitaan ainoastaan silloin, kun halutaan amplifikaatio. Selektiomerkkigeeni ja/tai amplifioituva merkki voidaan sijoittaa silmukoinnin luovuttajakohdan ja toisen kohdentavan sek-

venssin väliin kohdentavassa rakenteessa. Spesifisen CAP-kohdan inkorporaatio on vaihtoehtoista. Säätelyalue, CAP-kohta ja silmukoinnin luovuttajakohta voidaan eristää täydellisenä yksikkönä ihmisen elongaatiotekijä-1α-geenistä (EF-1α; Genbank-sekvenssi HUMEF1A) tai sytomegaloviruksen (CMV; Genbank-sekvenssi HEHCMVP1) erittäin aikaiselta alueelta tai nämä komponentit voidaan kasata sopivista komponenteista, jotka on eristetty eri geeneistä (kuten mMT-I-promoottorista ja CAP-kohdasta ja hGH- ja hEPO-geenien eksonista 1 ja silmukoinnin luovuttajakohdasta).

Muita lähestymistapoja voidaan käyttää, esimerkiksi ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi voivat vastata sekvenssejä GM-CSF-geenin ensimmäisessä intronissa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kohdentavaa rakennetta, joka on samanlainen kuin on kuvattu α-interferonia varten, jossa kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen GM-CSF-geenin ylävirran sekvensseille, amplifioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin, silmukoinnin vastaanottajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä.

Missään tapauksessa toisen kohdentavan sekvenssin ei tarvitse sijaita juuri ensimmäisen kohdentavan sekvenssin vieressä tai sen lähellä normaalissa geenissä niin, että osa geenin normaalista ylävirran alueesta deletoituu homologisen rekombinaation aikana. Lisäksi useita ei-koodittavia tai koodittavia eksoneita voi olla läsnä kohdentavassa rakenteessa. Genominen DNA, joka vastaa ihmisen GM-CSF-geenin ylävirran tai intronien alueita, joita käytetään kohdentavina sekvensseinä, ja kohdentavan rakenteen kokoaminen voidaan suorittaa käyttäen alan asiantuntijan tuntemia yhdistelmä-DNA-menetelmiä. Kuten tässä on kuvattu, useita selektiomerkkejä ja amplifioituvia merkkejä

voidaan käyttää kohdentavissa rakenteissa ja aktivointi ja amplifikaatio voidaan suorittaa suuressa määrässä solutyyppejä. Primaaristen, sekundaaristen tai kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen solujen transfektio ja homologisesti rekombinanttien solujen, jotka ekspressoivat GM-CSF-proteiinia, eristys voidaan suorittaa käyttäen esimerkissä 4 kuvattuja menetelmiä käyttäen ELISA-testiä ihmisen GM-CSF-proteiinille (R & D Systems, Minneapolis, MN). Vaihtoehtoisesti homologisesti rekombinantit solut voidaan tunnistaa PCR-seulonnalla, kuten on kuvattu yllä. Sellaisten solujen, jotka sisältävät amplifioituneet kopiot amplifioituvasta merkkigeenistä ja aktivoituneesta GM-CSF-lokuksesta, eristys suoritetaan, kuten on kuvattu yllä.

G-CSF

Ihmisen G-CSF-geeni (Genbank-sekvenssi HUMGCSFG) koodittaa 204 - 207 aminohapon pituista esiasteproteiinia, joka sisältää 30 aminohapon pituisen signaalipeptidin. Geeni sisältää viisi eksonia ja neljä intronia. Ensimmäinen eksoni koodittaa 13:a signaalipeptidin aminohappoa. Kuvio 13 on kaaviokuva strategiasta, jolla aktivoidaan G-CSF-geeni. Kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen geenin ylävirran sekvensseille, amplifioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, eksonin, joka koodittaa aminohapposekvenssiä, joka on identtinen tai toiminnallisesti ekvivalentti G-CSF-proteiinin signaalipeptidin ensimmäiselle 13:lle aminohapolle, silmukoinnin luovuttajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä, jotka ovat alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä. Tällä strategialla homologisesti rekombinantit solut tuottavat mRNA-molekyylin esiasteen, joka vastaa eksogeenistä eksonia ja silmukoinnin luovuttajakohtaa, toista kohdentavaa sekvenssiä, mitä tahansa sekvenssejä, jotka ovat toisen kohdentavan sekvenssin ja G-CSF-geenin aloituskodonin välissä, ja

G-CSF-geenin eksoneita, introneita ja transloimatonta 3'-aluetta (kuvio 13). Tämän lähetin silmukointi johtaa eksogeenisen eksonin fuusioon endogeenisen G-CSF-geenin eksoniin 2, joka transloituna tuottaa G-CSF-proteiinia. Kyky toiminnallisesti substituoida normaalin G-CSF-signaalipeptidin ensimmäiset 13 aminohappoa niillä, jotka ovat läsnä eksogeenisessä eksonissa, sallivat modifikaatioiden muodostuksen signaalipeptidiin ja sen vuoksi tuotetun proteiinin erittymisominaisuuksiin.

Tässä strategiassa ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi sijaitsevat juuri toistensa vieressä normaalissa kohdegeenissä, mutta se ei ole vaadittavaa. Toisen kohdentavan sekvenssin ei tarvitse olla juuri ensimmäisen kohdentavan sekvenssin vieressä tai lähellä sitä normaalissa geenissä niin, että osa geenin ylävirran alueesta deletoituu homologisen rekombinaation aikana. Amplifioituva merkkigeeni ja selektiomerkkigeeni voi olla sama geeni, niiden sijannit voidaan vaihtaa. Selektiomerkkigeeni on vaihtoehtoinen ja amplifioituva merkkigeeni tarvitaan ainoastaan silloin, kun halutaan amplifikaatio. Selektiomerkkigeeni ja/tai amplifioituva merkki voidaan sijoittaa silmukoinnin luovuttajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin väliin kohdentavassa rakenteessa. Spesifisen CAP-kohdan inkorporaatio on vaihtoehtoista. Säätelyalue, CAP-kohta ja silmukoinnin luovuttajakohta voidaan eristää täydellisenä yksikkönä ihmisen elongaatiotekijä-1α-geenistä (EF-1α; Genbank-sekvenssi HUMEF1A) tai sytomegaloviruksen (CMV; Genbank-sekvenssi HEHCMVP1) erittäin aikaiselta alueelta tai nämä komponentit voidaan kasata sopivista komponenteista, jotka on eristetty eri geeneistä (kuten mMT-I-promoottorista ja CAP-kohdasta ja hGH- ja EPO-geenien eksonista 1 ja silmukoinnin luovuttajakohdasta). Useita eksogeenisiä eksoneja, jotka ovat koodittavia tai ei-koodittavia, voidaan käyttää kohdentavassa rakenteessa niin kauan kuin

ATG-aloituskodoni, joka silmukoitaessa on lukuraamissa kypsässä proteiinissa, sisältyy yhteen eksoneista.

Muita lähestymistapoja voidaan käytää, esimerkiksi ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi voivat vastata sekvenssejä G-CSF-geenin ensimmäisessä intronissa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kohdentavaa rakennetta, joka on samanlainen kuin on kuvattu α-interferonia varten, jossa kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen G-CSF-geenin ylävirran sekvensseille, amplifioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin, silmukoinnin vastaanottajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä.

Genominen DNA, joka vastaa ihmisen G-CSF-geenin ylävirran tai intronien alueita, joita käytetään kohdentavina sekvensseinä, ja kohdentavan rakenteen kokoaminen voidaan suorittaa käyttäen alan asiantuntijan tuntemia yhdistelmä-DNA-menetelmiä. Kuten tässä on kuvattu, useita selektiomerkkejä ja amplifioituvia merkkejä voidaan käyttää kohdentavissa rakenteissa ja aktivointi voidaan suorittaa suuressa määrässä solutyyppejä. Primaaristen, sekundaaristen tai kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen solujen transfektio ja homologisesti rekombinanttien solujen, jotka ekspressoivat G-CSF-proteiinia, eristys voidaan suorittaa käyttäen esimerkissä 4 kuvattuja menetelmiä käyttäen ELISA-testiä ihmisen G-CSF-proteiinille (R & D Systems, Minneapolis, MN). Vaihtoehtoisesti homologisesti rekombinantit solut voidaan tunnistaa PCR-seulonnalla, kuten on kuvattu yllä. Sellaisten solujen, jotka sisältävät amplifioituneet kopiot amplifioituvasta merkkigeenistä ja aktivoituneesta α-interferonilokuksesta, eristys suoritetaan, kuten on kuvattu yllä.

FSHß

Ihmisen FSHß-geeni (Genbank-sekvenssi HUMFSH1) koodittaa 129 aminohapon pituista esiasteproteiinia, joka sisältää 16 aminohapon pituisen signaalipeptidin. Geeni sisältää kolme eksonia ja kaksi intronia niin, että ensimmäinen eksoni on ei-koodittava. FSHß-geenin aktivaatio voidaan saada aikaan useilla strategioilla. Yksi strategia on kuvattu kuviossa 14. Tässä strategiassa kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen geenin ylävirran sekvensseille, amplifioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä, jotka ovat alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä. Tällä strategialla homologisesti rekombinantit solut tuottavat mRNA-molekyylin esiasteen, joka vastaa eksogeenistä eksonia ja silmukoinnin luovuttajakohtaa, toista kohdentavaa sekvenssiä, mitä tahansa sekvenssejä, jotka ovat toisen kohdentavan sekvenssin ja FSHß-geenin aloituskodonin välissä, ja FSHß-geenin eksoneita, introneita ja transloimatonta 3'-aluetta (kuvio 14). Tämän lähetin silmukointi johtaa eksogeenisen eksonin fuusioon endogeenisen FSHß-geenin eksoniin 2, joka transloituna tuottaa FSHß-proteiinia. Tässä strategiassa ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi ovat aivan vierekkäin normaalissa kohdegeenissä, mutta se ei ole vaadittavaa (katso alla).

Muita lähestymistapoja voidaan käyttää, esimerkiksi ensimmäinen ja toinen kohdentava sekvenssi voivat vastata sekvenssejä FSHß-geenin ensimmäisessä intronissa. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kohdentavaa rakennetta, joka on samanlainen kuin on kuvattu α-interferonia varten. Tässä strategiassa kohdentava rakenne suunnitellaan niin, että se sisältää ensimmäisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen FSHß-geenin ylävirran sekvensseille, ampli-

fioituvan merkkigeenin, selektiomerkkigeenin, säätelyalueen, CAP-kohdan, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin, silmukoinnin vastaanottajakohdan ja toisen kohdentavan sekvenssin, joka vastaa sekvenssejä alavirtaan ensimmäisestä kohdentavasta sekvenssistä. Toisen kohdentavan sekvenssin ei tulisi ulottua enempää ylävirtaan kuin kohtaan -40 suhteessa normaaliin FSHß-geenin transkription aloituskohtaan, jotta vältettäisiin ei-toivotut ATG-aloituskodonit. Homologisesti rekombinanteissa soluissa tuotetaan mRNA-molekyylin esiaste, joka sisältää eksogeenisen eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin, silmukoinnin vastaanottajakohdan, toisen kohdentavan sekvenssin ja ihmisen FSHß-geenin koodittavan eksonin, intronin ja transloimattomat 3'-sekvenssit. Tämän lähetin silmukointi tuottaa toiminnallisen mRNA-molekyylin, joka voidaan transloida tuottamaan ihmisen FSHß-proteiinia. Intronin kokoa ja sen vuoksi säätelyalueen sijaintia suhteessa geenin koodittavaan alueeseen voidaan vaihdella säätelyalueen toiminnan optimoimiseksi.

Missään aktivointistrategiassa toisen kohdentavan sekvenssin ei tarvitse sijaita juuri ensimmäisen kohdentavan sekvenssin vieressä tai sen lähellä normaalissa geenissä niin, että osa geenin normaalista ylävirran alueesta deletoituu homologisen rekombinaation aikana. Lisäksi yksi kohdentava sekvenssi voi sijaita geenin ylävirrassa ja yksi voi olla FSHß-geenin eksonissa tai intronissa.

Amplifioituva merkkigeeni ja selektiomerkkigeeni voivat olla sama geeni, niiden sijannit voidaan vaihtaa ja toinen tai molemmat voivat sijaita kohdentavan rakenteen intronissa. Amplifioituvat merkkigeenit ja selektiomerkkigeenit, jotka ovat sopivia selektioon, on kuvattu tässä. Selektiomerkkigeeni on vaihtoehtoinen ja amplifioituva merkkigeeni tarvitaan ainoastaan silloin, kun halutaan amplifikaatio. Spesifisen CAP-kohdan inkorporaatio on vaihtoehtoista. Vaihtoehtoisesti eksonisekvenssit toisesta

geenistä voidaan sisällyttää silmukoinnin vastaanottajakohdan 3'-puolelle ja toisen kohdentavan sekvenssin 5'-puolelle kohdentavassa rakenteessa. Säätelyalue, CAP-kohta, eksoni, silmukoinnin luovuttajakohta, introni ja silmukoinnin vastaanottajakohta voidaan eristää täydellisenä yksikkönä ihmisen elongaatiotekijä-1α-geenistä (EF-1α; Genbank-sekvenssi HUMEF1A) tai sytomegaloviruksen (CMV; Genbank-sekvenssi HEHCMVP1) erittäin aikaiselta alueelta tai nämä komponentit voidaan kasata sopivista komponenteista, jotka on eristetty eri geeneistä. Kaikissa tapauksissa eksogeeninen eksoni voi olla sama tai eri kuin normaalin FSHß-geenin ensimmäinen eksoni ja useita eksoneita voi olla läsnä kohdentavassa rakenteessa.

Genominen DNA, joka vastaa FSHß-geenin ylävirran aluetta, jota käytetään kohdentavina sekvensseinä, ja kohdentavan rakenteen kokoaminen voidaan suorittaa käyttäen alan asiantuntijan tuntemia yhdistelmä-DNA-menetelmiä. Kuten tässä on kuvattu, useita selektiomerkkejä ja amplifioituvia merkkejä voidaan käyttää kohdentavissa rakenteissa ja aktivointi voidaan suorittaa suuressa määrässä solutyyppejä. Jos halutaan, aktivoidun FSHß-geenin tuote voidaan tuottaa solutyypissä, joka ekspressoi ihmisen glykoproteiinin α-alayksikköä, jonka tuote muodostaa heterodimeerin FSHß-geenin tuotteen kanssa. Tämä voi olla luonnollisesti esiintyvä solukanta tai solulinja. Vaihtoehtoisesti ihmisen α-glykoproteiinin α-alayksikön geeniä (Genbank-sekvenssi HUMGLYCA1) voidaan koekspressoida FSHß-geenin tuotteen kanssa niin, että sellainen koekspressio saadaan aikaan ekspressoimalla ihmisen glykoproteiinin α-alayksikön geeniä tai cDNA:ta sopivan promoottorin säätelyn alaisuudessa, tai aktivoimalla ihmisen glykoproteiinin α-alayksikön geeni tässä kuvatuilla menetelmillä. Primaaristen, sekundaaristen tai kuolemattomiksi tehtyjen ihmisen solujen transfektio ja homologisesti rekombinanttien solujen, jotka ekspressoivat FSHß-proteiinia, eristys voi-

daan suorittaa käyttäen yllä kuvattuja menetelmiä käyttäen ELISA-testiä ihmisen FSHß-proteiinille (Accurate Chemical and Scientific, Westbury, NY). Vaihtoehtoisesti homologisesti rekombinantit solut voidaan tunnistaa PCR-seulonnalla, kuten on kuvattu yllä. Sellaisten solujen, jotka sisältävät amplifioituneet kopiot amplifioituvasta merkkigeenistä ja aktivoituneesta α-interferonilokuksesta, eristys suoritetaan, kuten on kuvattu yllä.

Ekvivalentit

Alan asiantuntijat tunnistavat, tai kykenevät toteamaan käyttäen ainoastaan rutiinikokeita, monia ekvivalentteja tässä kuvatun keksinnön spesifisille suoritustavoille. Sellaisten ekvivalenttien on tarkoitettu sisältyvän seuraaviin patenttivaatimuksiin.

Patenttivaatimukset:

1. DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se muuttaa kohdegeenin ekspressiota solussa, kun DNA on homologisesti rekombinoitunut kohdealueeseen solun kromosomaalisessa DNA:ssa, joka DNA-rakenne käsittää:

(a) kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen kohdealueelle;

(b) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(c) eksonin; ja

(d) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

jolloin seuraavassa kohdennetun sekvenssin homologisessa rekombinaatiossa kohdealueen kanssa solun kromosomaalinen DNA käsittää rakenteesta peräisin olevan eksonin kaikkien kohdegeenin endogeenisten eksoneiden lisäksi ja kohdegeeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu γ-interferonista, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että rakenteesta peräisin oleva eksoni käsittää DNA-sekvenssin, joka on erilainen kuin kohdennetun geenin ensimmäisen endogeenisen eksonin DNA-sekvenssi.

3. DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se muuttaa kohdegeenin ekspressiota solussa, kun DNA on homo-

logisesti rekombinoitunut kohdealueeseen solun kromosomaalisessa DNA:ssa, joka DNA-rakenne käsittää:

(a) kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen kohdealueelle;

(b) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(c) eksonin; ja

(d) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

jolloin seuraavassa kohdennetun sekvenssin homologisessa rekombinaatiossa kohdealueen kanssa (b) - (d) ovat sijoitetut ylävirtaan geenin transkription aloituskohdasta ja kohdennettu geeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu γ-interferonista, interleukiini 1:sta, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että eksoni käsittää DNA-sekvenssin, joka on erilainen kuin kohdennetun geenin ensimmäisen eksonin DNA-sekvenssi.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa α-galaktoosidaasia.

6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että rakenteesta peräisin oleva eksoni on sama kuin FSHβ-geenin ensimmäinen eksoni.

7. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa GM-CSF:ää.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että rakenteesta peräisin oleva eksoni koodittaa GM-CSF-esiasteproteiinin 50:tä ensimmäistä aminohappoa.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että rakenteesta peräisin oleva eksoni koodittaa sekvenssiä, joka käsittää toiminnallisen signaalipeptidin.

10. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa G-CSF:ää.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että rakenteesta peräisin oleva eksoni koodittaa G-CSF-signaalipeptidin 13:a ensimmäistä aminohappoa.

12. DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se muuttaa kohdennetun geenin ekspressiota solussa, kun DNA on homologisesti rekombinoitunut kohdealueeseen solun kromosomaalisessa DNA:ssa, joka DNA-rakenne käsittää:

(a) kohdealueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(b) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(c) eksonin; ja

(d) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

jolloin seuraavassa kohdennetun sekvenssin homologisessa rekombinaatiossa kohdealueen kanssa (b) - (d) ovat sijoitetut ylävirtaan kohdennetun geenin transkription aloituskohdasta ja eksogeeninen säätelysekvenssi on adenovirusgeenin säätelysekvenssi, kollageenigeenin säätelysekvenssi, aktiinigeenin säätelysekvenssi, HMG-CoA-reduktaasigeenin säätelysekvenssi tai EF-1α-geenin säätelysekvenssi.

13. DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se muuttaa kohdennetun geenin ekspressiota solussa, kun DNA-rakenne on homologisesti rekombinoitunut kohdealueeseen solun kromosomaalisessa DNA:ssa, joka kohdealue sijaitsee ylävirtaan kohdennetun geenin endogeenisestä transkription aloituskohdasta, joka DNA-rakenne käsittää:

(a) kohdealueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(b) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(c) eksonin;

(d) silmukoinnin luovuttajakohdan;

(e) intronin; ja

(f) silmukoinnin vastaanottajakohdan;

jolloin homologisessa rekombinaatiossa eksogeenisen säätelyalue on sijoitettu ohjaamaan sekvenssin transkriptiota, joka sekvenssi käsittää (c) - (f) sekä koko kohdennetun geenin koodaavan sekvenssin.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että seuraavassa homologisessa rekombinaatiossa (b) - (f) ovat sijoitetut ylävirtaan kohdennetun geenin endogeenisestä säätelysekvenssistä.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että rakenne käsittää lisäksi toisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen kohdennetun geenin endogeenisesta säätelysekvenssistä ylävirtaan sijaitsevalle sekvenssille.

16. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa terapeuttista proteiinia.

17. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa hormonia, sytokiiniä, antigeeniä, vasta-ainetta, entsyymiä, hyytymistekijää, kuljetusproteiinia, reseptoria, säätelyproteiinia, rakenneproteiinia tai transkriptiotekijää.

18. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa

proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu kalsitoniinista, kasvuhormonista, insuliinista, insulinotropiinista, insuliinin kaltaisista kasvutekijöistä, lisäkilpirauhashormonista, α-interferonista, ß-interferonista, γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHß:sta, TGF-ß:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSH-ß:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosyytistä, CSF-makrofagista, CSF-granulosyytti/makrofagista, immunoglobuliineista, katalyyttisistä vasta-aineista, proteiinikinaasi C:stä, glukokerebrosidaasista, superoksididismutaasista, kudoksen plasminogeeniaktivaattoreista, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijän V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä VIII:stä, veren hyytymistekijä IX:stä, veren hyytymistekijä X:stä, veren hyytymistekijä XIII:stä, apolipoproteiini E:stä, apolipo-proteiini A-I:stä, globiineista, matalatiheyksisestä lipoproteiinireseptorista, IL-2-reseptorista, IL-2-antagonistista, alfa-1 antitrypsiinistä, immuunivasteenmodifioijista ja liukoisesta CD4:stä.

19. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa α-galaktoosidaasia.

20. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa α-interferonia.

21. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa glukokerebrosidaasia.

22. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on promoottori, vahvistin, scaffold-kiinnittymisalue tai transkriptiotekijän sitoutumiskohta.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi toisen säätelysekvenssin.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on adenovirusgenin säätelysekvenssi, SV-40 -geenin säätelysekvenssi tai sytomegalovirusgeenin säätelysekvenssi.

25. Patenttivaatimuksen 22 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on hiiren metallotioniini I-geenin säätelysekvenssi, kollageenigeenin säätelysekvenssi, aktiinigeenin säätelysekvenssi, immunoglobuliinigeenin säätelysekvenssi, HMG-CoA-reduktaasigeenin säätelysekvenssi tai EF-1α-geenin säätelysekvenssi.

26. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi geenin.

27. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi yhden tai useampia selektiomerkkigeenejä.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi amplifioitavan merkkigeenin.

29. Patenttivaatimuksen 13 mukainen DNA-rakenne, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa erytropoietiinia.

30. Menetelmä kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi solussa, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) otetaan solu, jonka genomi käsittää:

(i) kohdennetun geenin, jolla on endogeeninen säätelyalue; ja

(ii) kohdealueen;

(b) otetaan DNA-rakenne, joka käsittää:

(i) kohdealueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(ii) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(iii) eksonin; ja

(iv) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

(c) transfektoidaan solu DNA-rakenteella tuottaen siten transfektoitu solu;

(d) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jonka genomi käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, rakenteesta peräisin olevan eksonin ja rakenteesta peräisin olevan silmukoinnin luovuttajakohdan kaikkien kohdennetun geenin endogeenisten eksonien lisäksi; ja

(e) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua eksogeenisen säätelysekvenssin ohjaamalle transkriptiolle sopivissa olosuhteissa transkriptin tuottamiseksi rakenteesta peräisin olevasta eksonista, kohdennetusta geenistä ja mistä tahansa rakenteesta peräisin olevan eksonin ja kohdennetun geenin välissä sijaitsevasta sekvenssistä, jolloin rakenteesta peräisin olevaa silmukoinnin luovuttajakohtaa vastaava transkriptin RNA ohjaa silmukoinnin transkriptissa silmukoinnin vastaanottajakohtaan, joka vastaa kohtaa kohdennetussa geenissä ja jolloin kohdennettu geeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi vaiheet, joissa:

(f) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua transkriptin silmukoimiselle ja translaatiolle sopivissa olosuhteissa; ja

(g) varmennetaan, että transkriptin translaatiotuote on tuotettu.

32. Menetelmä kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi solussa, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) otetaan solu, jonka genomi käsittää:

(i) kohdennetun geenin, jolla on endogeeninen säätelyalue; ja

(ii) kohdealueen;

(b) otetaan DNA-rakenne, joka käsittää:

(i) kohdealueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(ii) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(iii) eksonin; ja

(iv) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

(c) transfektoidaan solu DNA-rakenteella tuottaen siten transfektoitu solu;

(d) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jonka genomi käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, rakenteesta peräisin olevan eksonin ja rakenteesta peräisin olevan silmukoinnin luovuttajakohdan, jotka kaikki sijaitsevat ylävirtaan kohdennetun geenin transkription aloituskohdasta; ja

(e) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua eksogeenisen säätelysekvenssin ohjaamalle transkriptiolle sopivissa olosuhteissa transkriptin tuottamiseksi rakenteesta peräisin olevasta eksonista, kohdennetusta geenistä ja mistä tahansa rakenteesta peräisin olevan ek-

sonin ja kohdennetun geenin välissä sijaitsevasta sekvenssistä, jolloin rakenteesta peräisin olevaa silmukoinnin luovuttajakohtaa vastaava transkriptin RNA ohjaa silmukoinnin transkriptissa silmukoinnin vastaanottajakohtaan, joka vastaa kohtaa kohdennetussa geenissä ja jolloin kohdennettu geeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

33. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi vaiheet, joissa:

(f) pidetään homologisesti rekombinanttia solua transkriptin silmukoimiselle ja translaatiolle sopivissa olosuhteissa; ja

(g) varmennetaan, että transkriptin translaatiotuote on tuotettu.

34. Menetelmä kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi solussa, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) otetaan solu, jonka genomi käsittää:

(i) kohdennetun geenin, jolla on endogeeninen säätelyalue; ja

(ii) kohdealueen;

(b) otetaan DNA-rakenne, joka käsittää:

(i) kohdealueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(ii) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(iii) eksonin; ja

(iv) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

(c) transfektoidaan solu DNA-rakenteella tuottaen siten transfektoitu solu;

(d) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jonka genomi käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, rakenteesta peräisin olevan eksonin ja rakenteesta peräisin olevan silmukoinnin luovuttajakohdan, jotka kaikki sijaitsevat ylävirtaan kohdennetun geenin transkription aloituskohdasta; ja

(e) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua eksogeenisen säätelysekvenssin ohjaamalle transkriptiolle sopivissa olosuhteissa transkriptin tuottamiseksi rakenteesta peräisin olevasta eksonista, kohdennetusta geenistä ja mistä tahansa rakenteesta peräisin olevan eksonin ja kohdennetun geenin välissä sijaitsevasta sekvenssistä, jolloin rakenteesta peräisin olevaa silmukoinnin luovuttajakohtaa vastaava transkriptin RNA ohjaa silmukoinnin transkriptissa silmukoinnin vastaanottajakohtaan, joka vastaa kohtaa kohdennetussa geenissä ja jolloin eksogeeninen säätelysekvenssi on adenovirusgeenin säätelysekvenssi, kollageenigeenin säätelysekvenssi, aktiinigeenin säätelysekvenssi, immunoglobuliinigeenin säätelysekvenssi, HMG-CoA -reduktaasigeenin säätelysekvenssi tai EF-1α-geenin säätelysekvenssi.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi vaiheet:

(f) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua transkriptin silmukoimiselle ja translaatiolle sopivissa olosuhteissa; ja

(g) varmennetaan, että transkriptin translaatiotuote on tuotettu.

36. Menetelmä kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi solun genomissa, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

a) transfektoidaan solu DNA-rakenteella, joka sisältää:

(i) kohdentavan sekvenssin;

(ii) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(iii) eksonin;

(iv) silmukoinnin luovuttajakohdan;

(v) intronin; ja

(vi) silmukoinnin vastaanottajakohdan;

tuottaen siten transfektoitu solu;

(b) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa, tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jossa eksogeeninen säätelysekvenssi on sijoitettu ohjaamaan sekvenssin transkriptiota, joka sekvenssi käsittää (iii) - (vi) sekä koko kohdennetun geenin koodittavan sekvenssin; ja

(c) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua eksogeenisen säätelyaleen ohjaamalle transkriptiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten transkripti.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eksoni käsittää CAP-kohdan.

38. Patenttivaatimuksen 37 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eksoni käsittää ATG-nukleotidisekvenssin.

39. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdistava sekvenssi on homologinen sekvenssille, joka sijaitsee ylävirtaan kohdennetun geenin endogeenisestä säätelysekvenssistä.

40. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakenne käsittää lisäksi toisen kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen kohdenne-

tun geenin endogeenisesta säätelysekvenssistä ylävirtaan sijaitsevalle sekvenssille.

41. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solu on ihmisen solu.

42. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa terapeuttista proteiinia.

43. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa hormonia, sytokiiniä, antigeeniä, vasta-ainetta, entsyymiä, hyytymistekijää, kuljetusproteiinia, reseptoria, säätelyproteiinia, rakenneproteiinia tai transkriptiotekijää.

44. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu kalsitoniinista, kasvuhormonista, insuliinista, insulinotropiinista, insuliinin kaltaisista kasvutekijöistä, lisäkilpirauhashormonista, α-interferonista, ß-interferonista, γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHß:sta, TGF-ß:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSH-ß:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosyytistä, CSF-makrofagista, CSF-granulosyytti/makrofagista, immunoglobuliineista, katalyyttisistä vasta-aineista, proteiinikinaasi C:stä, glukokerebrosidaasista, superoksididismutaasista, kudoksen plasminogeeniaktivaattoreista, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä VIII:stä, veren hyytymistekijä IX:stä, veren hyytymistekijä X:stä, veren hyytymistekijä XIII:stä, apolipoproteiini E:stä, apolipoproteiini A-I:stä, globiineista, matalatiheyksisestä lipoproteiinireseptorista, IL-2-reseptorista, IL-2-antagonistista, alfa-1 antitrypsii-

nistä, immuuniresponssimodifioijista ja liukoisesta CD4:stä.

45. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa α-galaktoosidaasia.

46. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa α-interferonia.

47. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa glukokerebrosidaasia.

48. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa erytropoietiinia.

49. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on promoottori, vahvistin, scaffold-kiinnittymisalue tai transkriptiotekijän sitoutumiskohta.

50. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakenne sisältää lisäksi toisen säätelysekvenssin.

51. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on adenovirusgeenin säätelysekvenssi, SV-40 -geenin säätelysekvenssi tai sytomegalovirusgeenin säätelysekvenssi.

52. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on hiiren metallotioniini I -geenin säätelysekvenssi, kollageenigeenin säätelysekvenssi, aktiinigeenin säätelysekvenssi, immunoglobuliinigeenin säätelysekvenssi, HMG-CoA-reduktaasigeenin säätelysekvenssi tai EF-1α-geenin säätelysekvenssi.

53. Patenttivaatimuksen 36 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää lisäksi vaiheet, joissa:

(f) pidetään homologisesti rekombinanttia solua transkriptin silmukoimiselle ja translaatiolle sopivissa olosuhteissa; ja

(g) varmennetaan, että transkriptin translaatiotuote on tuotettu.

54. Menetelmä kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi solussa, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) transfektoidaan solu DNA-rakenteella, joka sisältää:

(i) kohdentavan sekvenssin;

(ii) säätelysekvenssin;

(iii) eksonin;

(iv) silmukoinnin luovuttajakohdan;

(v) intronin; ja

(vi) silmukoinnin vastaanottajakohdan;

tuottaen siten transfektoitu solu;

(b) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jossa eksogeeninen säätelysekvenssi on sijoitettu ohjaamaan sekvenssin transkriptiota, joka sekvenssi käsittää (iii) - (vi) sekä koko kohdennetun geenin koodittavan sekvenssin; ja

(c) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua eksogeenisestä säätelysekvenssistä aiheutuvalle ekspressiolle sopivissa olosuhteissa.

55. Menetelmä kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi solussa, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) otetaan solu, jonka genomi käsittää:

(i) kohdennetun geenin; ja

(ii) kohdealueen kohdennetussa geenissä tai siitä ylävirtaan;

(b) otetaan DNA-rakenne, joka käsittää:

(i) kohdentavan sekvenssin, joka on homologinen kohdealueelle; ja

(ii) promoottorin nisäkkään aktiini- tai kollogeenigeenistä;

(c) tranfektoidaan solu DNA-rakenteella tuottaen siten transfektoitu solu; ja

(d) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jonka genomi käsittää promoottorin, joka on sijoitettu ohjaamaan kohdennetun geenin transkriptiota; ja

(e) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua promoottorin ohjaaman kohdennetun geenin transkriptiolle sopivissa olosuhteissa.

56. Viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että sen genomiin on inkorporoitu transkriptioyksikkö, joka käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, eksogeenisen eksonin ja silmukoinnin luovuttajakohdan eksogeenisen eksonin 3'-päässä, jotka kaikki sijaitsevat ylävirtaan endogeenisen geenin endogeenisesta transkription aloituskohdasta, joka silmukoinnin luovuttajakohta on liitetty toiminnallisesti geenin toisen endogeenisen eksonin endogeeniseen silmukoinnin vastaanottajakohtaan ja jolloin endogeeninen geeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

57. Viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että sen genomiin on inkorporoitu transkriptioyksikkö, joka käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, eksogeenisen eksonin ja silmukoinnin luovuttajakohdan eksogeenisen eksonin 3'-päässä, joka silmukoinnin luovuttajakohta on liitetty toiminnallisesti endogeenisen geenin toisen endogeenisen eksonin endogeeniseen silmukoinnin vastaanottajakohtaan, jolloin solu käsittää eksogeenisen eksonin kaikkien endogeenisessä geenissä olevien endogeenisten eksonien lisäksi ja endogeeninen geeni koodittaa proteiinia, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

58. Patenttivaatimuksen 57 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu valitaan ryhmästä, joka koostuu HT1080-soluista, HeLa-soluista, HeLa-solujen johdannaisista, MCF-7 -rintasyöpäsoluista, K-562 -leukemiasoluista, KB -karsinoomasoluista, Raji-soluista, Jurkat-soluista, Namalwa-soluista, HL-60 -soluista, Daudi-soluista, RPMI 8226 -soluista, U-937 -soluista, Bowesin melanoomasoluista, WI-38VA13 alalinjan 2R4 soluista ja MOLT-4 -soluista.

59. Patenttivaatimuksen 57 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on adenovirusgeenin säätelysekvenssi, kollageenigeenin säätelysekvenssi, aktiinigeenin säätely-

sekvenssi, immunoglobuliinigeenin säätelysekvenssi, HMG-CoA reduktaasigeenin säätelysekvenssi tai EF-1α-geenin säätelysekvenssi.

60. Viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että sen genomiin on inkorporoitu transkriptioyksikkö, joka käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, eksogeenisen eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin ja silmukoinnin vastaanottajakohdan, jotka kaikki sijaitsevat ylävirtaan endogeenisen geenin endogeenisesta transkription aloituskohdasta siten että endogeeninen säätelysekvenssi on sijoitettuna ohjaamaan sekvenssin transkriptiota, joka sekvenssi käsittää eksogeenisen eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin ja silmukoinnin vastaanottajakohdan ja kohdennetun geenin koodittavan sekvenssin ja tuotetaan siten transkripti.

61. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on peräisin nisäkkäästä.

62. Patenttivaatimuksen 61 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on primäärinen tai sekundäärinen nisäkässolu.

63. Patenttivaatimuksen 61 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on primäärinen tai sekundäärinen ihmisen solu.

64. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on kuolemattomaksi tehty nisäkässolu.

65. Patenttivaatimuksen 64 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on kuolemattomaksi tehty ihmisen solu.

66. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu valitaan ryhmästä, joka koostuu HeLa-soluista, HeLa-solujen johdannaisista, MCF-7 -rintasyöpäsoluista, K-562 -leukemiasoluista, KB -karsinoomasoluista, 2780AD munasarjakarsinoomasoluista, Raji-soluista, Jurkat-soluista, Namalwa-

soluista, HL-60 -soluista, Daudi-soluista, RPMI 8226 -soluista, U-937 -soluista, Bowesin melanoomasoluista, WI-38VA13 alalinjan 2R4 soluista ja MOLT-4 -soluista.

67. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on HT1080 -solu.

68. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että solu ekspressoi terapeuttista proteiinia, joka on tuotettu transkription translaatiolla.

69. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on promoottori, vahvistin, scaffold-tarttumisalue tai transkriptiotekijän sitoutumiskohta.

70. Patenttivaatimuksen 69 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on adenovirusgeenin säätelysekvenssi, SV-40 -geenin säätelysekvenssi tai sytomegalovirusgeenin säätelysekvenssi.

71. Patenttivaatimuksen 69 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi on hiiren metallotioniinigeenin säätelysekvenssi, kollageenigeenin säätelysekvenssi, aktiinigeenin säätelysekvenssi, immunoglobuliinigeenin säätelysekvenssi, HMG-CoA reduktaasigeenin säätelysekvenssi tai EF-1α-geenin säätelysekvenssi.

72. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että kohdennettu geeni koodittaa erytropoietiinia.

73. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että eksoni käsittää CAP-kohdan.

74. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että eksogeeninen säätelysekvenssi, eksogeeninen eksoni ja silmukoinnin

luovuttajakohta ovat ylävirtaan endogeenisen geenin koodittavasta sekvenssistä.

75. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeenisen geenin endogeeninen säätelysekvenssi on poistettu.

76. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeenisen geenin ensimmäinen endogeeninen eksoni on poistettu.

77. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeeninen geeni koodittaa hormonia, sytokiiniä, antigeeniä, vasta-ainetta, entsyymiä, hyytymistekijää, kuljetusproteiinia, reseptoria, säätelyproteiinia, rakenneproteiinia tai transkriptiotekijää.

78. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeeninen geeni koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu kalsitoniinista, kasvuhormonista, insuliinista, insulinotropiinista, insuliinin kaltaisista kasvutekijöistä, lisäkilpirauhashormonista, α-interferonista, β-interferonista, γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF),immunoglobuliinista, katalyyttisistä vasta-aineista, proteiinikinaasi C:stä, glukokerebrosidaasista, superoksididismutaasista, kudoksen plasminogeeniaktivaattoreista, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, hyytymistekijä VIII:stä, veren hyytymistekijä IX:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, apolipoproteiini E:stä, apolipoproteiini A-I:stä, globiineista, matalatiheyksisestä lipoprote-

iinireseptorista, IL-2-reseptorista, IL-2-antagonistista, alfa-1 antitrypsiinistä, immuunivasteenmodifioijista ja liukoisesta CD4:stä.

79. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeeninen geeni koodittaa α-interferonia.

80. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeeninen geeni koodittaa α-galaktoosidaasia.

81. Patenttivaatimuksen 60 mukainen viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että endogeeninen geeni koodittaa glukokerebrosidaasia.

82. Viljelty kasvista tai sienestä peräisin oleva solu, t u n n e t t u siitä, että sen genomiin on inkorporoitu transkriptioyksikkö, joka käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, eksogeenisen eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin ja silmukoinnin vastaanottajakohdan, jotka kaikki sijaitsevat ylävirtaan endogeenisen geenin endogeenisesta transkription aloituskohdasta siten, että endogeeninen säätelysekvenssi on sijoitettu ohjaamaan sekvenssin transkriptiota, joka sekvenssi käsittää eksogeenisen eksonin, silmukoinnin luovuttajakohdan, intronin ja silmukoinnin vastaanottajakohdan ja kohdennetun geenin koodittavan sekvenssin ja tuotetaan siten transkripti.

83. Viljelty selkärankaisen solu, t u n n e t t u siitä, että sen genomiin on inkorporoitu uusi transkriptioyksikkö, joka käsittää eksogeenisen aktiini- tai kollageenipromoottorin, joka on sijoitettu ohjaamaan endogeenisen geenin transkriptiota, jolloin endogeeninen geeni ei koodita aktiinia eikä kollageenia.

84. Viljelty kasvista tai sienestä peräisin oleva solu, t u n n e t t u siitä, että sen genomiin on inkorporoitu transkriptioyksikkö, joka käsittää eksogeenisen säätelysekvenssin, eksogeenisen eksonin ja silmukoinnin luovuttajakohdan eksogeenisen eksonin 3'-päässä, jotka kaikki sijoittuvat ylävirtaan endogeenisen geenin endogee-

nisestä transkription aloituskohdasta silmukoinnin luovuttajakohdan ollessa liitetty toiminnallisesti endogeenisen silmukoinnin vastaanottajakohtaan endogeenisen geenin eksonissa.

85. Menetelmä solun kromosomaalisessa DNA:ssa olevan kohdennetun geenin ekspression muuttamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) transfektoidaan solu DNA-rakenteella, joka sisältää:

(i) genomisen DNA:n kohdennetun geenin koodaavalle alueelle tai siitä ylävirtaan olevalle alueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(ii) aktiini- tai kollageenipromoottorin;

(iii) eksonin; ja

(iv) pariutumattoman silmukoinnin luovuttajakohdan eksonin 3'-päässä;

(b) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu; ja

(c) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua promoottorin ohjaaman kohdennetun geenin ekspressiolle sopivissa olosuhteissa.

86. Menetelmä homologisesti rekombinantin solun valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) otetaan solu, jonka genomi käsittää, joissa:

(i) kohdennetun geenin, jolla on endogeeninen säätelyalue; ja

(ii) kohdealueen kohdennetussa geenissä tai siitä ylävirtaan;

(b) otetaan DNA-rakenne, joka käsittää:

(i) kohdealueelle homologisen kohdentavan sekvenssin;

(ii) eksogeenisen säätelysekvenssin;

(iii) eksonin;

(iv) silmukoinnin luovuttajakohdan;

(v) intronin; ja

(vi) silmukoinnin vastaanottajakohdan

(c) transfektoidaan solu DNA-rakenteella tuottaen siten transfektoitu solu;

(d) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu, jonka genomi käsittää (ii) - (vi) kaikkien kohdennetun geenin endogeenisten eksonien lisäksi.

87. Patenttivaatimuksen 86 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että saatava solu ekspressoi ihmisen glykoproteiinin α-alayksikköä.

88. Patenttivaatimuksen 86 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solu ekspressoi ihmisen glykoproteiinin α-alayksikkögeeniä eksogeenisen promoottorin ohjaamana.

89. Homologisesti rekombinantti solu, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu patenttivaatimuksen 86 määrittelemällä menetelmällä.

90. Menetelmä proteiinin valmistamiseksi muuttamalla proteiinia solussa koodittavan kohdennetun geenin ekspressiota, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

(a) transfektoidaan solu DNA-rakenteella, joka käsittää:

(i) genomisen DNA:n kohdennetun geenin koodaavalle alueelle tai siitä ylävirtaan olevalle alueelle homologisen kohdentavan sekvenssin; ja

(ii) aktiini- tai kollageenipromoottorin,

tuottaen siten transfektoitu solu;

(b) ylläpidetään transfektoitua solua homologiselle rekombinaatiolle sopivissa olosuhteissa tuottaen siten homologisesti rekombinantti solu; ja

(c) ylläpidetään homologisesti rekombinanttia solua promoottorin ohjaaman kohdennetun geenin transkrip-

tiolle sopivissa olosuhteissa, jolloin kohdennettu geeni ei koodita aktiinia eikä kollageenia.

91. Menetelmä proteiinin tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä

(a) otetaan HT1080 -solu, joka sisältää DNA:ta, joka käsittää eksogeenisen säätelyalueen, joka on liitetty toiminnallisesti proteiinia koodittavaan sekvenssiin;

(b) viljellään solua proteiinin tuotolle sopivissa olosuhteissa proteiinin tuottamiseksi; ja

(c) varmistetaan, että proteiinia on tuotettu,

jolloin proteiini on valittu ryhmästä, joka koostuu α-interferonista, β-interferonista, γ-interferonista, hermon kasvutekijöistä, FSHβ:sta, TGF-β:sta, tuumorinekroositekijästä, glukagonista, luun kasvutekijä 2:sta, luun kasvutekijä 7:stä, TSHβ:sta, interleukiini 1:stä, interleukiini 2:sta, interleukiini 3:sta, interleukiini 6:sta, interleukiini 11:sta, interleukiini 12:sta, CSF-granulosytistä (G-CSF), CSF-makrofagista (M-CSF), CSF-granulosyytti/makrofagista (GM-CSF), proteiinikinaasi C:stä, urokinaasista, antitrombiini III:sta, DNAasista, α-galaktoosidaasista, tyrosiinihydroksylaasista, veren hyytymistekijä V:stä, veren hyytymistekijä VII:stä, veren hyytymistekijä X:stä; veren hyytymistekijä XIII:stä, IL-2 antgonisteista ja liukoisesta CD4:stä.

92. Patenttivaatimuksen 91 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA, joka käsittää:

(i) eksogeenisen säätelyalueen; ja

(ii) proteiinia koodittavan sekvenssin,

on tuotu transfektiolla HT1080-solun edeltäjään.

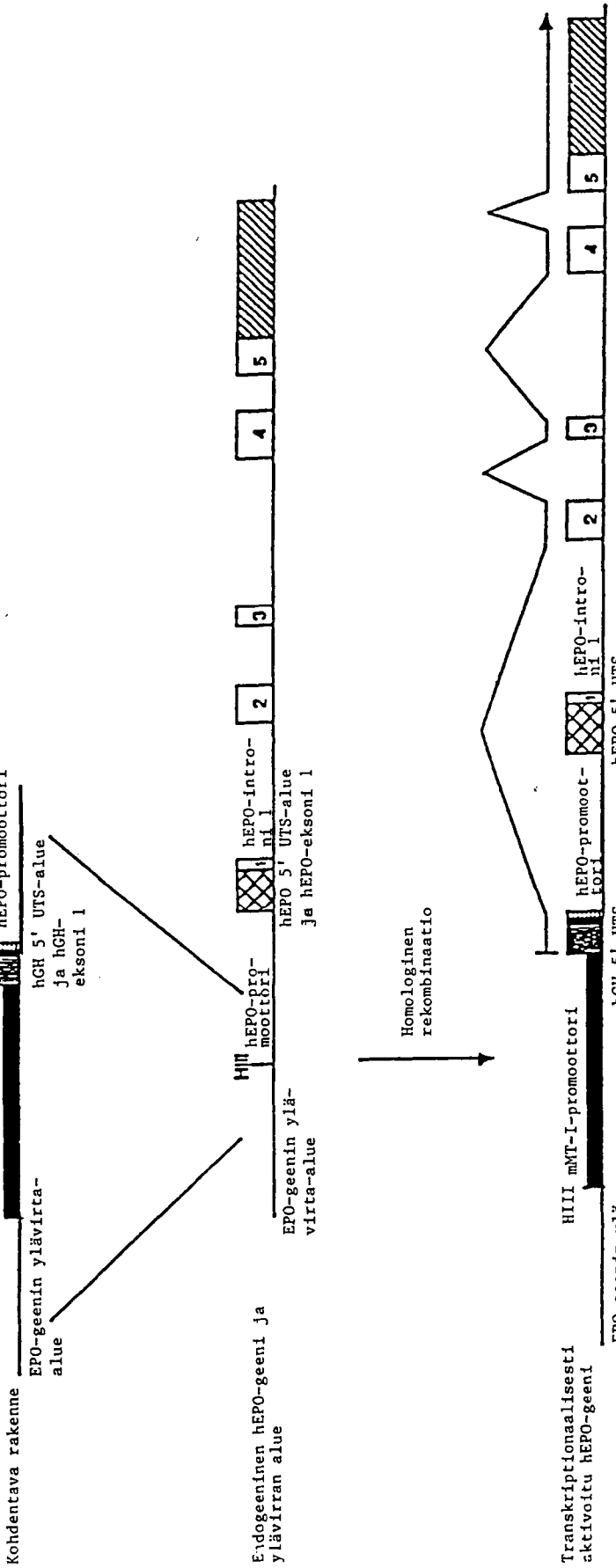
93. Patenttivaatimuksen 91 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on veren hyytymistekijä VIII.

94. Patenttivaatimuksen 91 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiini on veren hyytymistekijä IX.

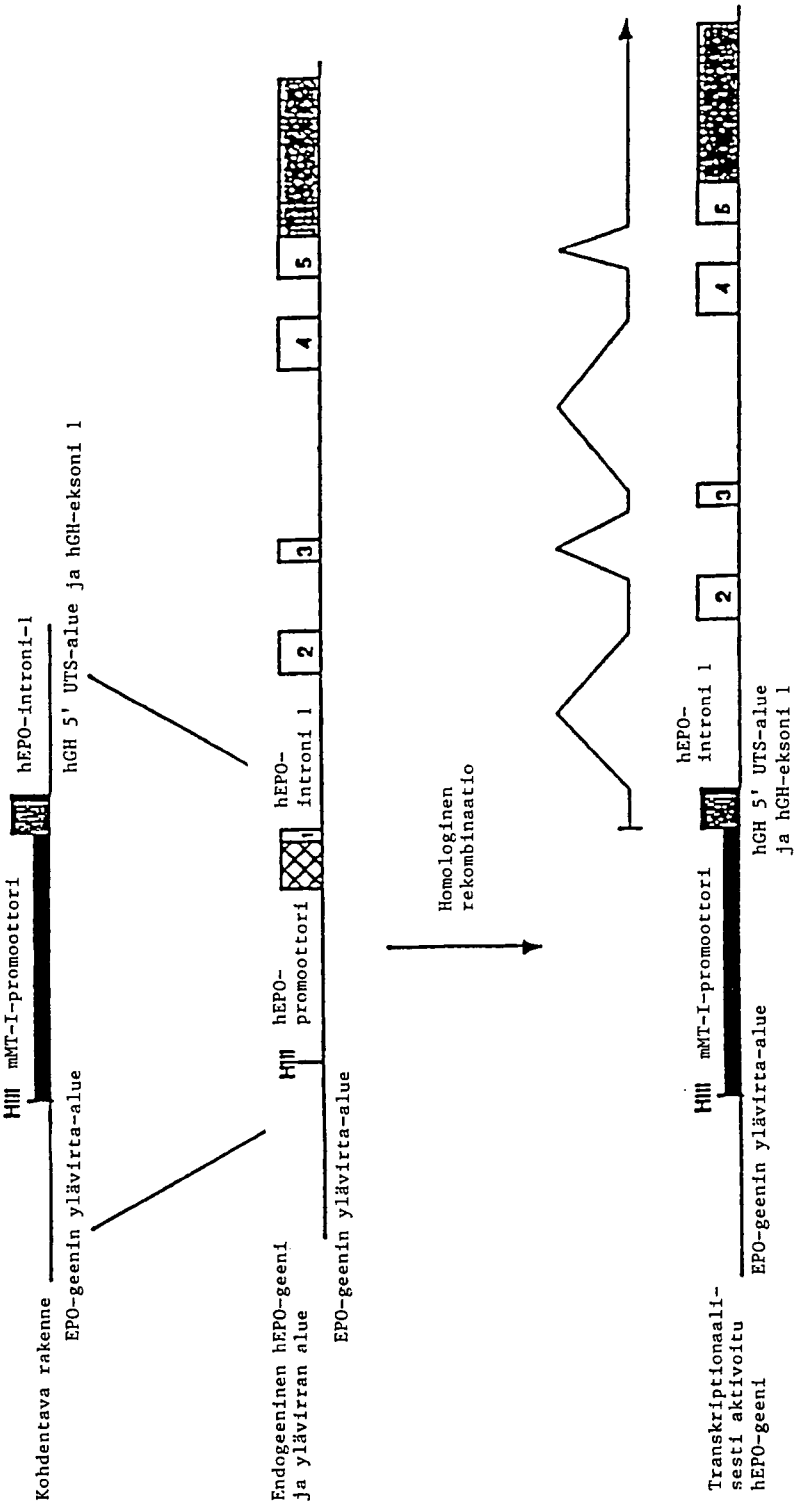
95. DNA-plasmidi, t u n n e t t u siitä, että se on pREPO18.

96. Fuusioproteiini, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu patenttivaatimuksen 43 määrittelemällä menetelmällä ja käsittää ensimmäiseksi DNA-rakenteen eksonin koodittaman aminohapposekvenssin ja toiseksi kohdennetun geenin koodittaman aminohapposekvenssin.

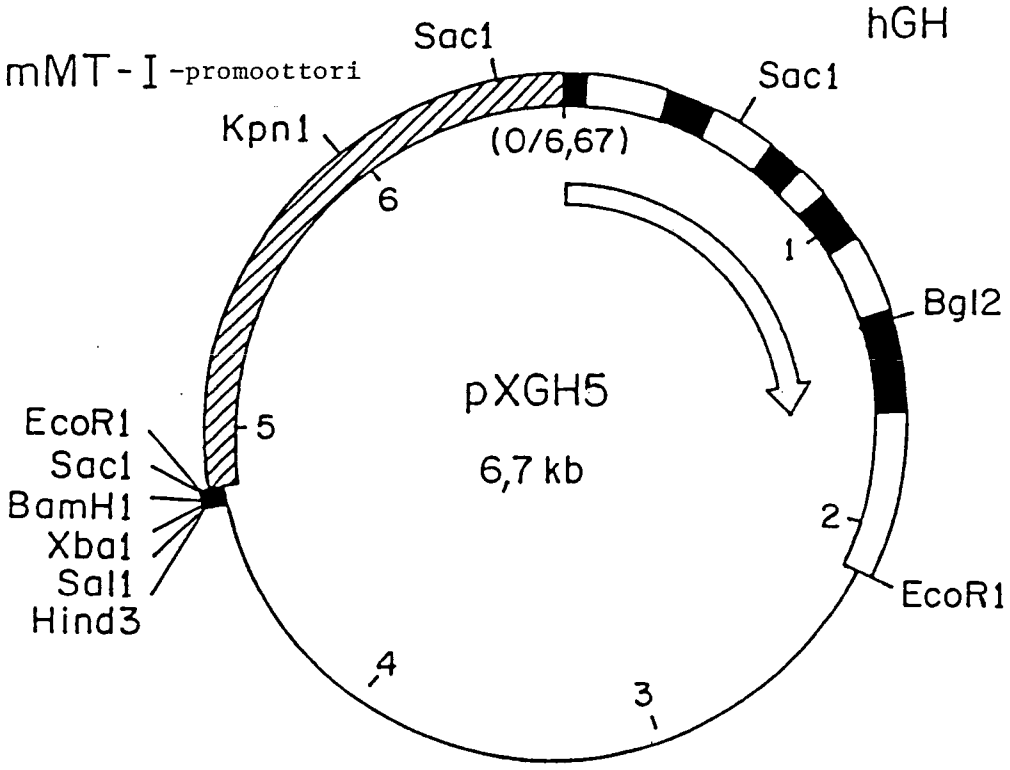
97. Glukokerebrosidaasi, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu patenttivaatimuksessa 58 määritellyllä menetelmällä.


Kohdentava rakenne
HIII
mMT-I-promoottori
hEPO-promoottori
EPO-geenin ylävirta-alue
hGH 5' UTS-alue ja hGH-eksoni 1
Endogeeninen hEPO-geeni ja ylävirran alue
hEPO-promoottori
hEPO-introni 1
hEPO 5' UTS-alue ja hEPO-eksoni 1
EPO-geenin ylävirta-alue
Homologinen rekombinaatio
Transkriptionaalisesti aktivoitu hEPO-geeni
HIII
mMT-I-promoottori
hGH 5' UTS-alue ja hGH-eksoni 1
hEPO-promoottori
hEPO-introni 1
hEPO 5' UTS-alue ja hEPO-eksoni 1
EPO-geenin ylävirta-alue
1
2
3
4
5

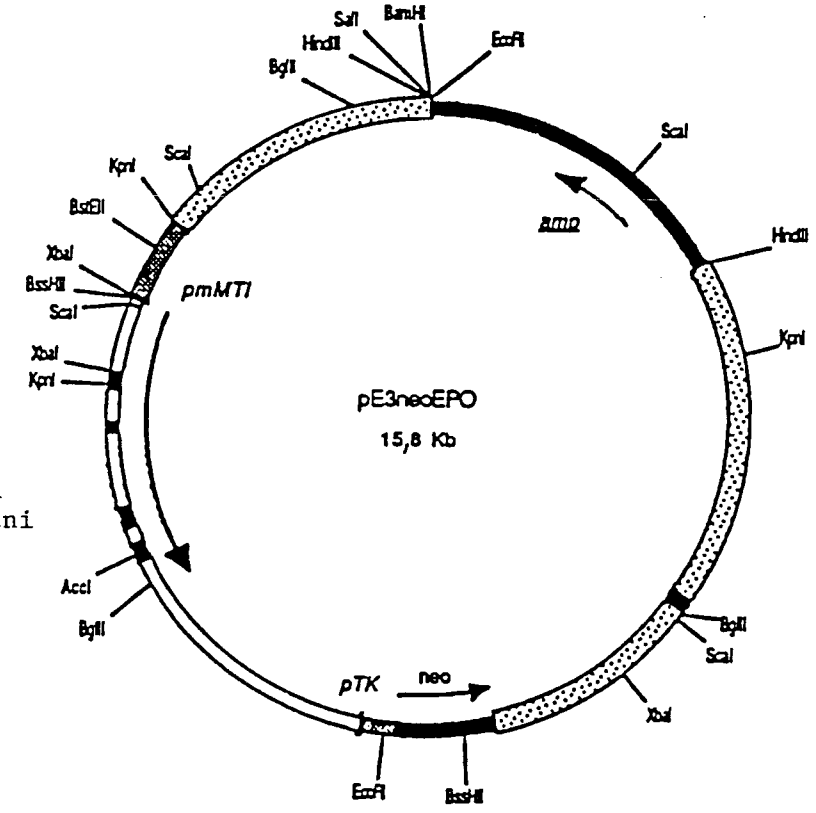
Kuvio 1


Kohdentava rakenne
EPO-geenin ylävirta-alue
mMT-I-promoottori
hEPO-introni-1
hGH 5' UTS-alue ja hGH-eksoni 1
Endogeeninen hEPO-geeni ja ylävirran alue
EPO-geenin ylävirta-alue
hEPO-promoottori
hEPO-introni 1
1
2
3
4
5
Homologinen rekombinaatio
Transkriptionaalisesti aktivoitu hEPO-geeni
EPO-geenin ylävirta-alue
mMT-I-promoottori
hEPO-introni 1
hGH 5' UTS-alue ja hGH-eksoni 1
2
3
4
5

Kuvio 2

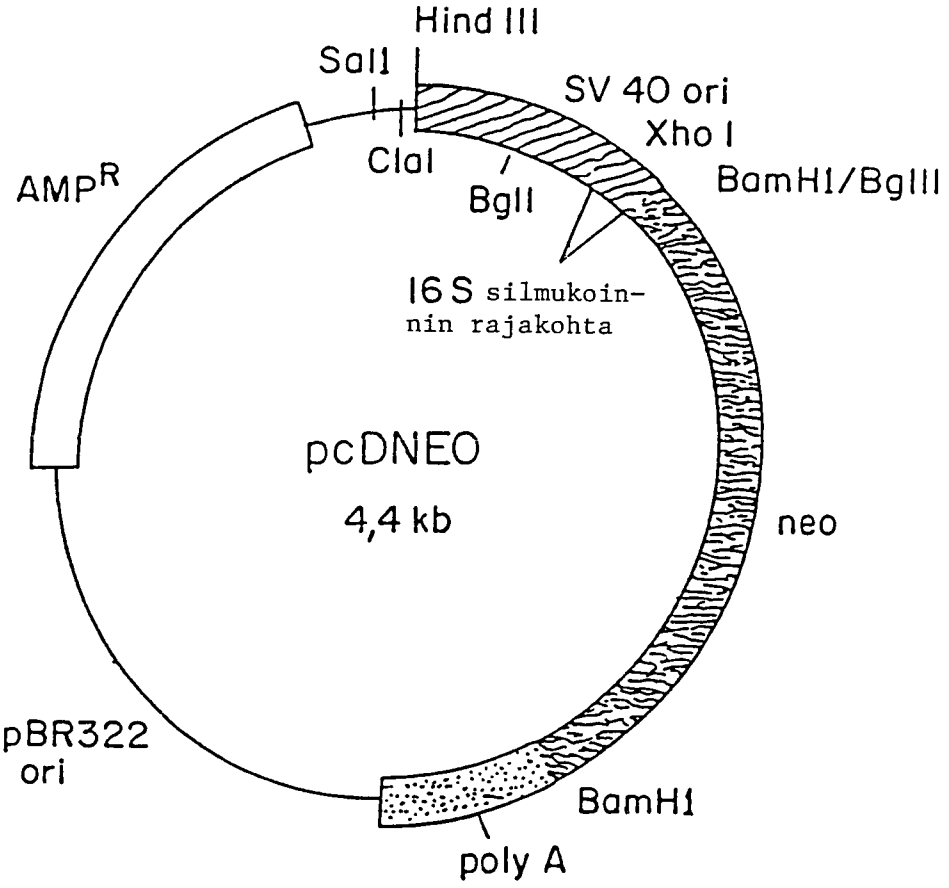

mMT-I-promoottori
Sac1
hGH
Sac1
Kpn1
(0/6,67)
6
1
Bgl2
pXGH5
6,7 kb
EcoR1
Sac1
BamH1
Xba1
Sal1
Hind3
5
2
EcoR1
4
3

Kuvio 3

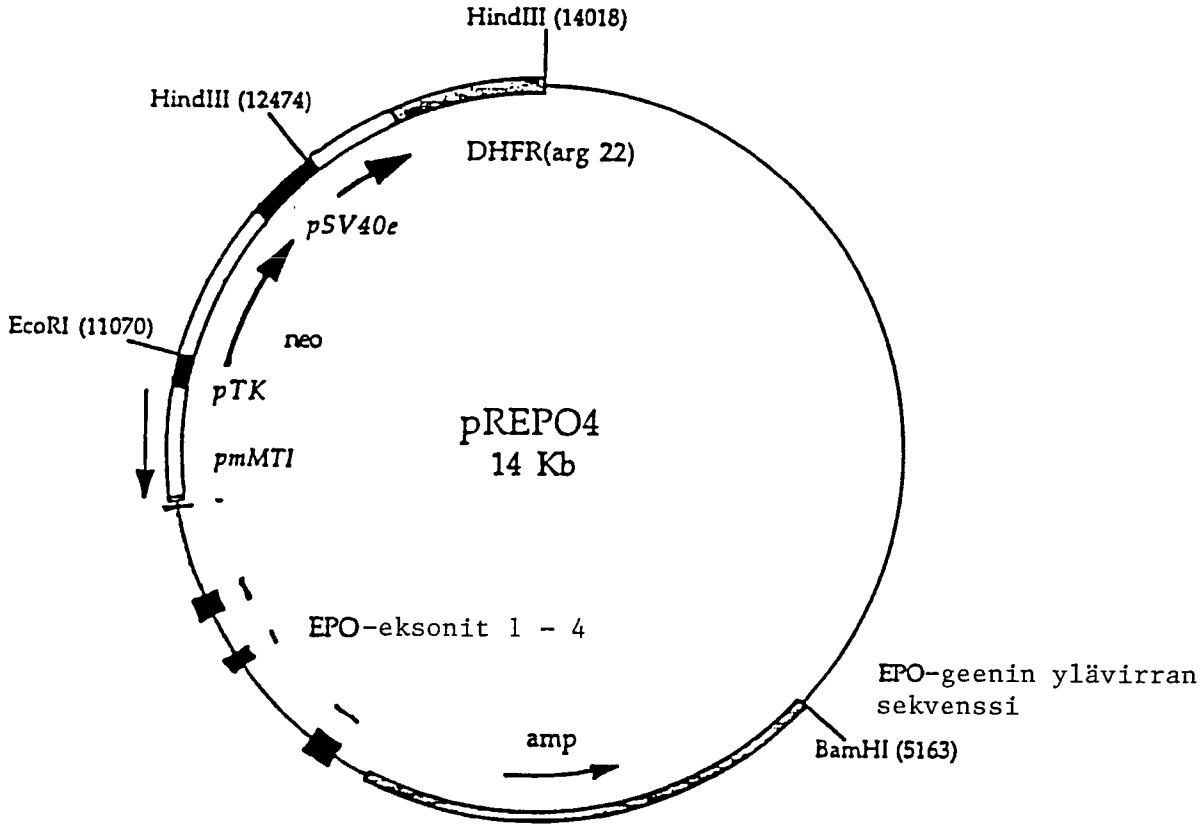


Ihmisen
EPO-geeni

Kuvio 4

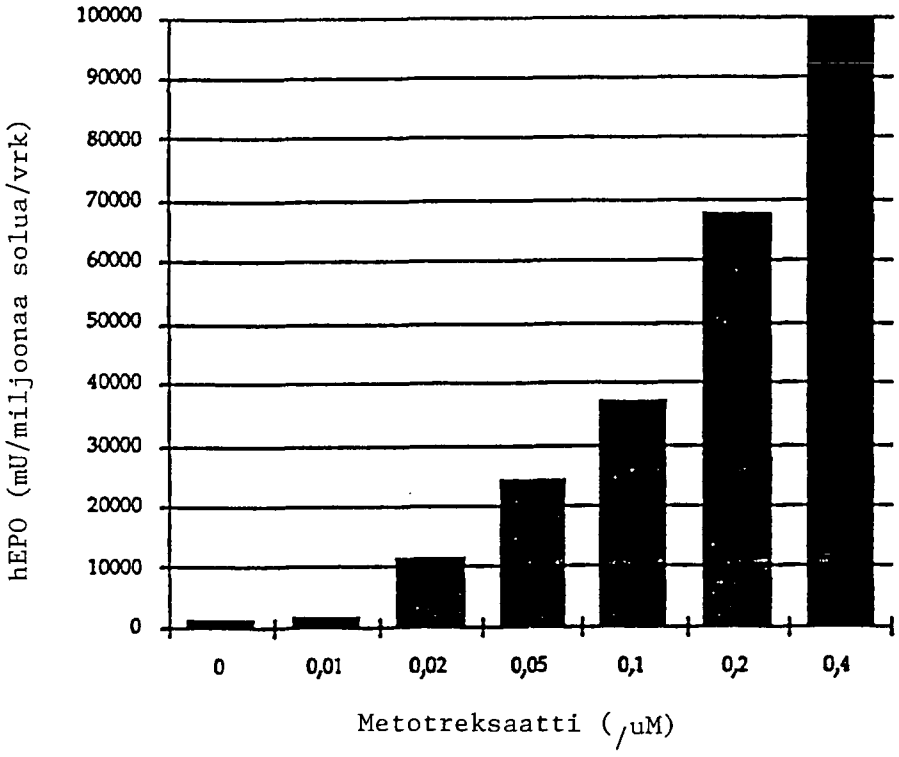

Hind III
SalI
SV 40 ori
Xho I
ClaI
BamHI/BglII
BglI
AMP^R
16 S silmukoin-
nin rajakohta
pcDNEO
4,4 kb
neo
pBR322
ori
BamHI
poly A

Kuvio 5

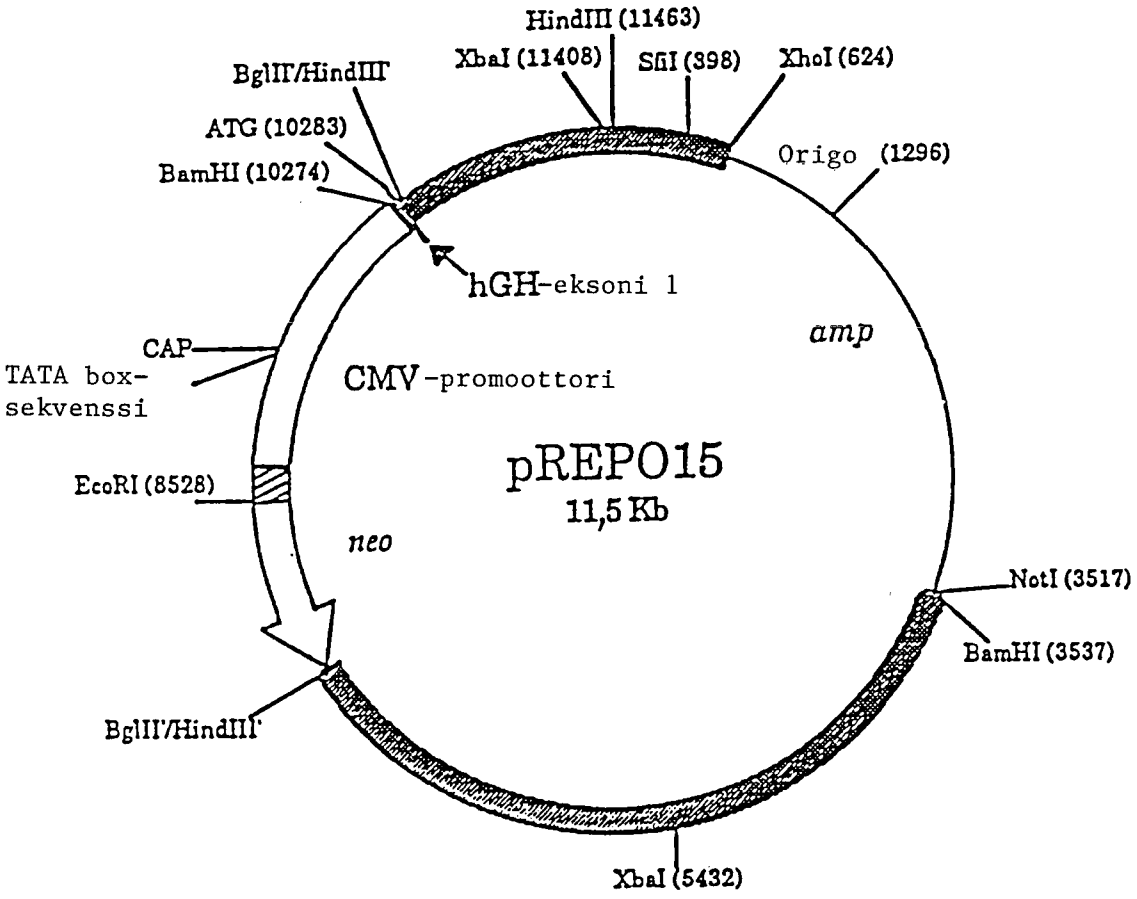

HindIII (14018)
HindIII (12474)
DHFR(arg 22)
pSV40e
EcoRI (11070)
neo
pTK
pmMTI
pREPO4
14 Kb
EPO-eksonit 1 - 4
EPO-geenin ylävirran
sekvenssi
amp
BamHI (5163)

Kuvio 6

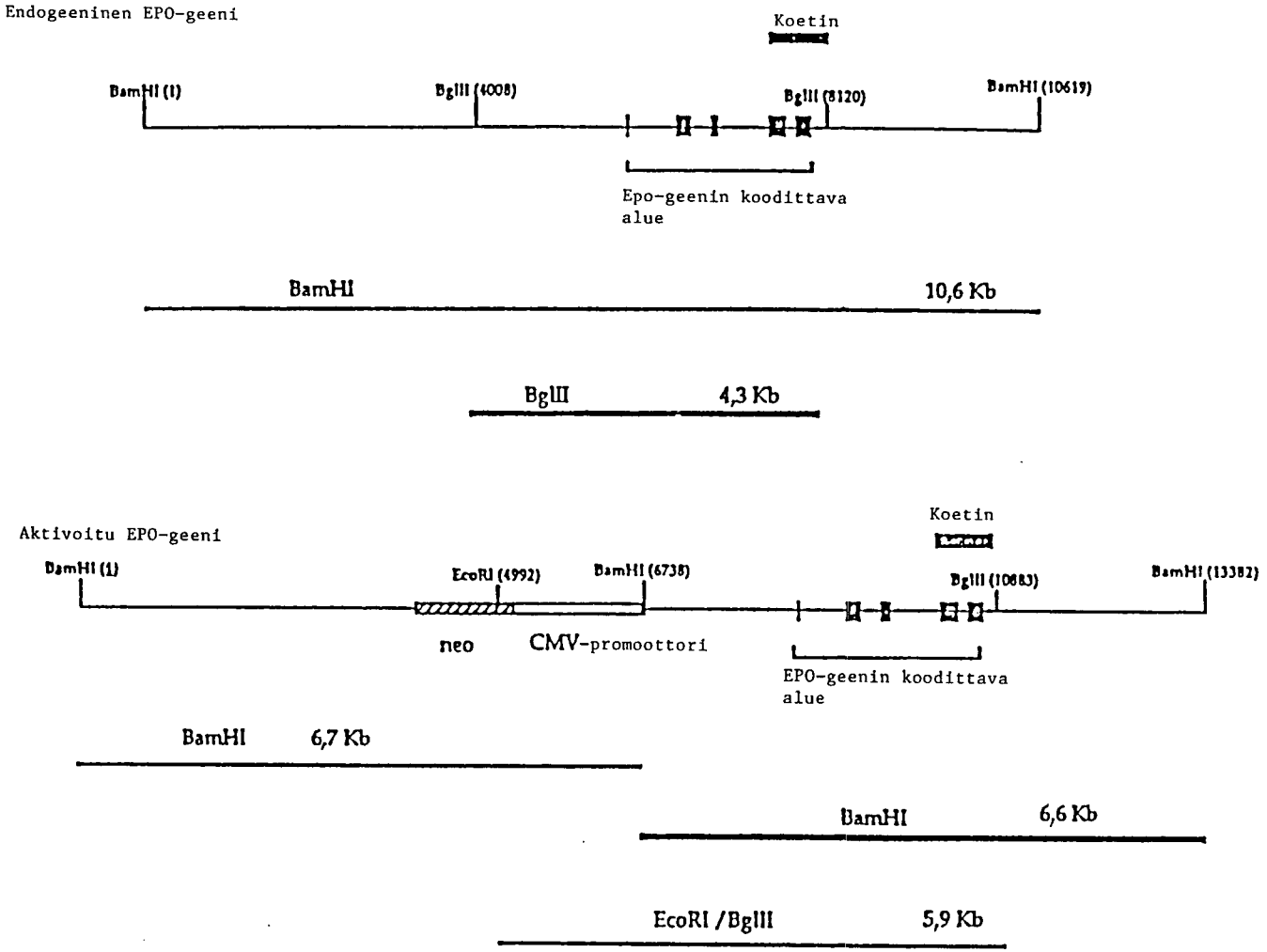
EPO-proteiinin tuotto kohdennetussa HT1080-solulinjassa 52 MTX-selektiossa



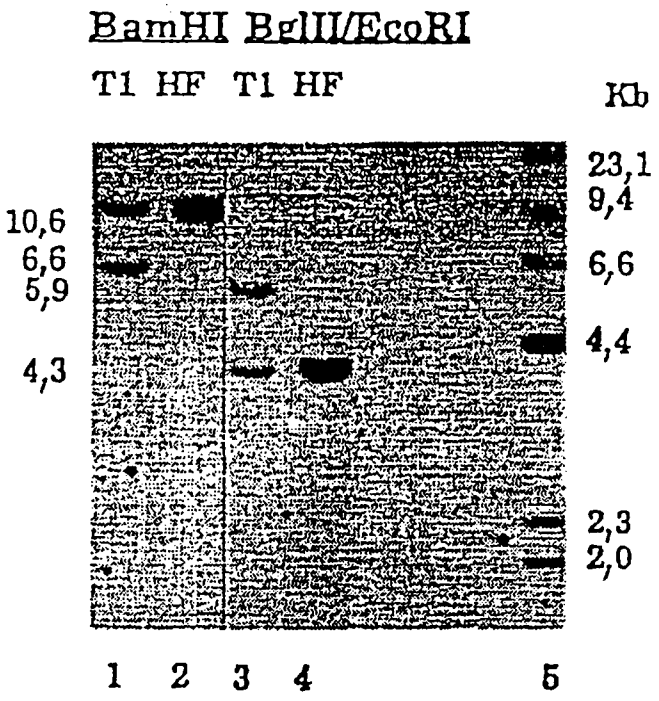
Kuvio 7


HindIII (11463)
XbaI (11408)
SñI (398)
XhoI (624)
BglII/HindIII
ATG (10283)
BamHI (10274)
Origo (1296)
hGH-eksoni 1
amp
CAP
TATA box-
sekvenssi
CMV-promoottori
pREPO15
11,5 Kb
EcoRI (8528)
neo
NotI (3517)
BamHI (3537)
BglII/HindIII
XbaI (5432)

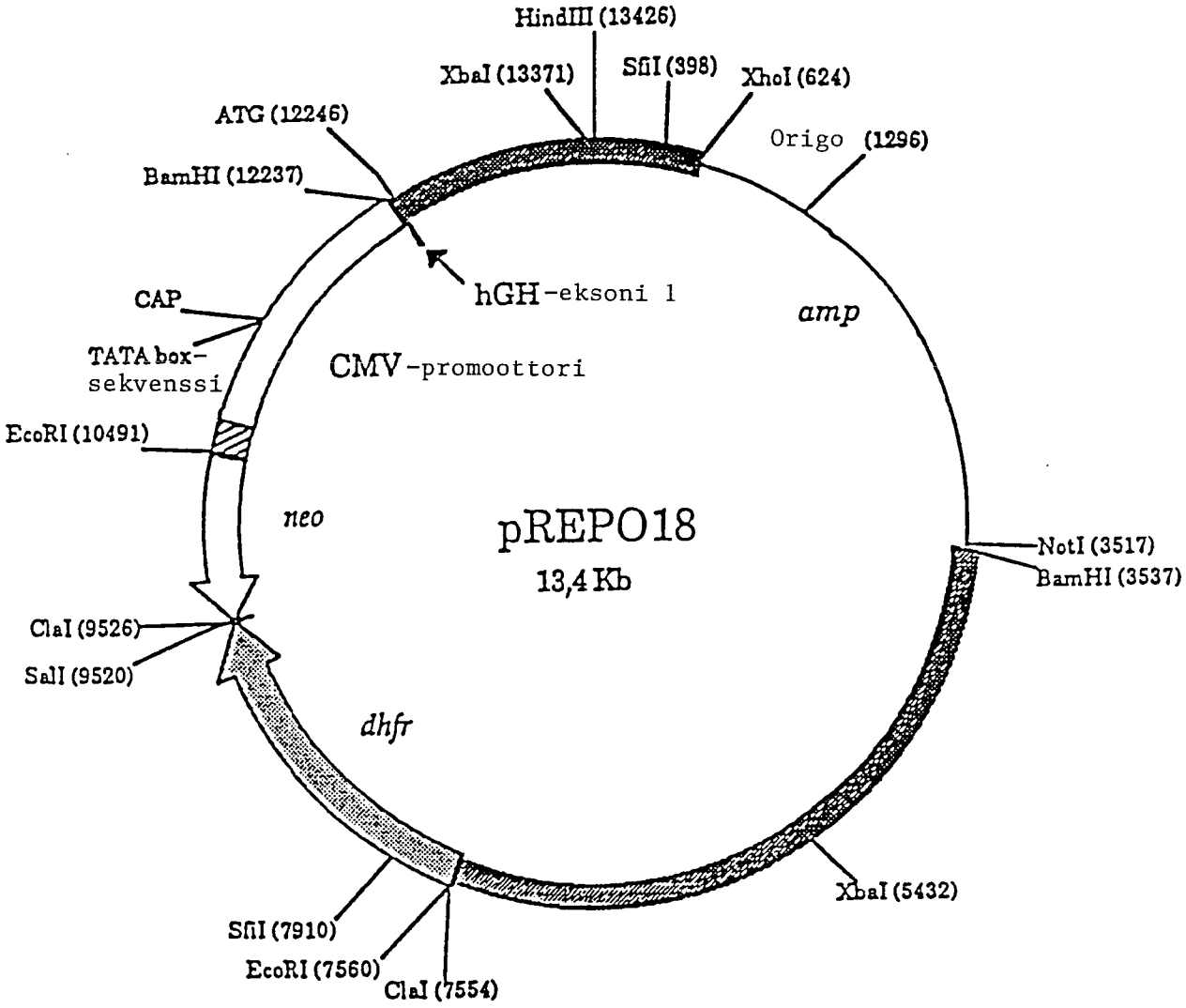
Kuvio 8


Endogeeninen EPO-geeni
Koetin
BamHI (1)
BglII (4008)
BglII (8120)
BamHI (10619)
Epo-geenin koodittava alue
BamHI
10,6 Kb
BglII
4,3 Kb
Aktivoitu EPO-geeni
Koetin
BamHI (1)
EcoRI (4992)
BamHI (6738)
BglII (10683)
BamHI (13382)
neo
CMV-promoottori
EPO-geenin koodittava alue
BamHI
6,7 Kb
BamHI
6,6 Kb
EcoRI /BglII
5,9 Kb

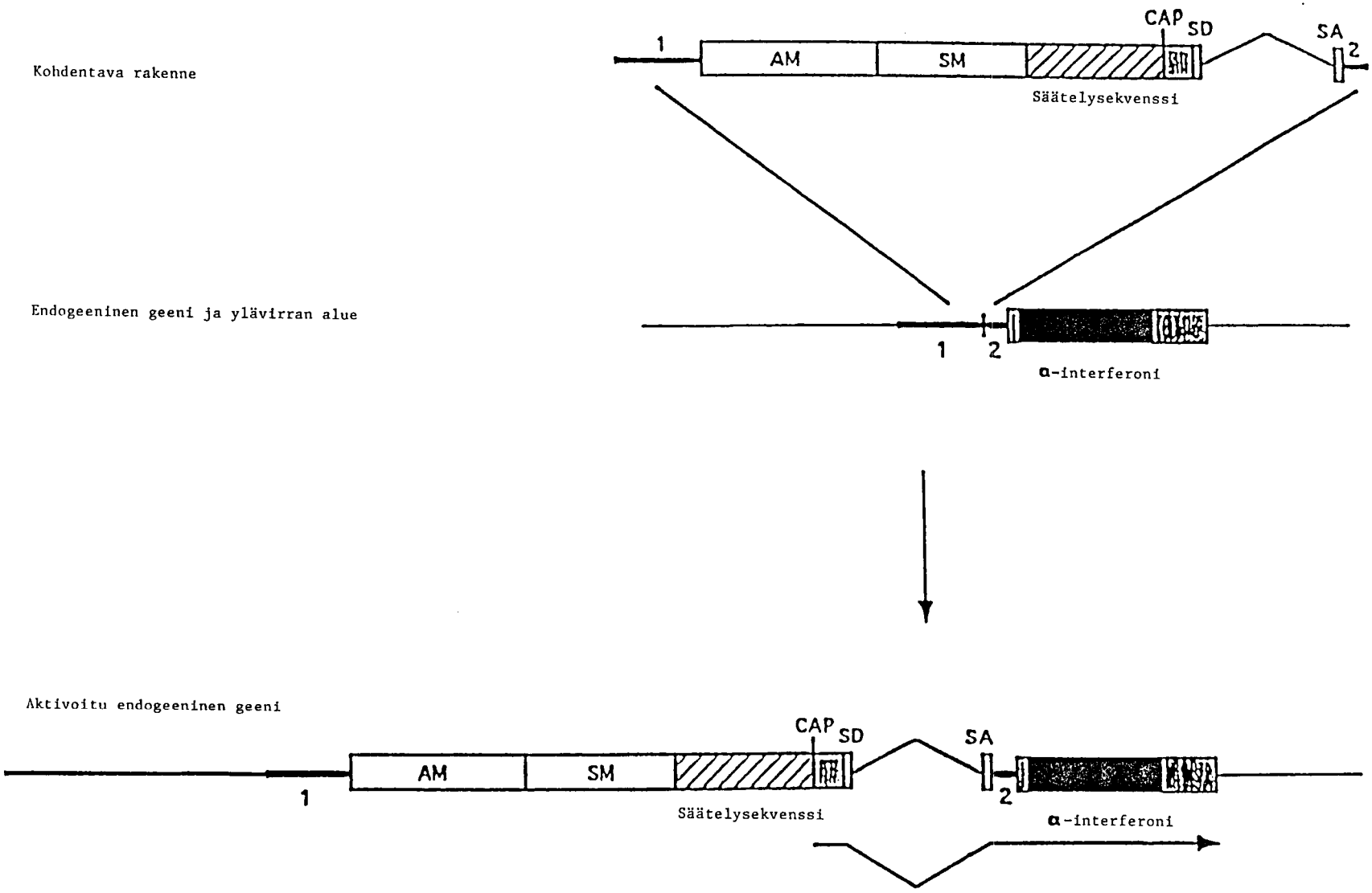
Kuvio 9A


BamHI BglII/EcoRI
T1 HF T1 HF
Kb
23,1
9,4
6,6
4,4
2,3
2,0
10,6
6,6
5,9
4,3
1 2 3 4 5

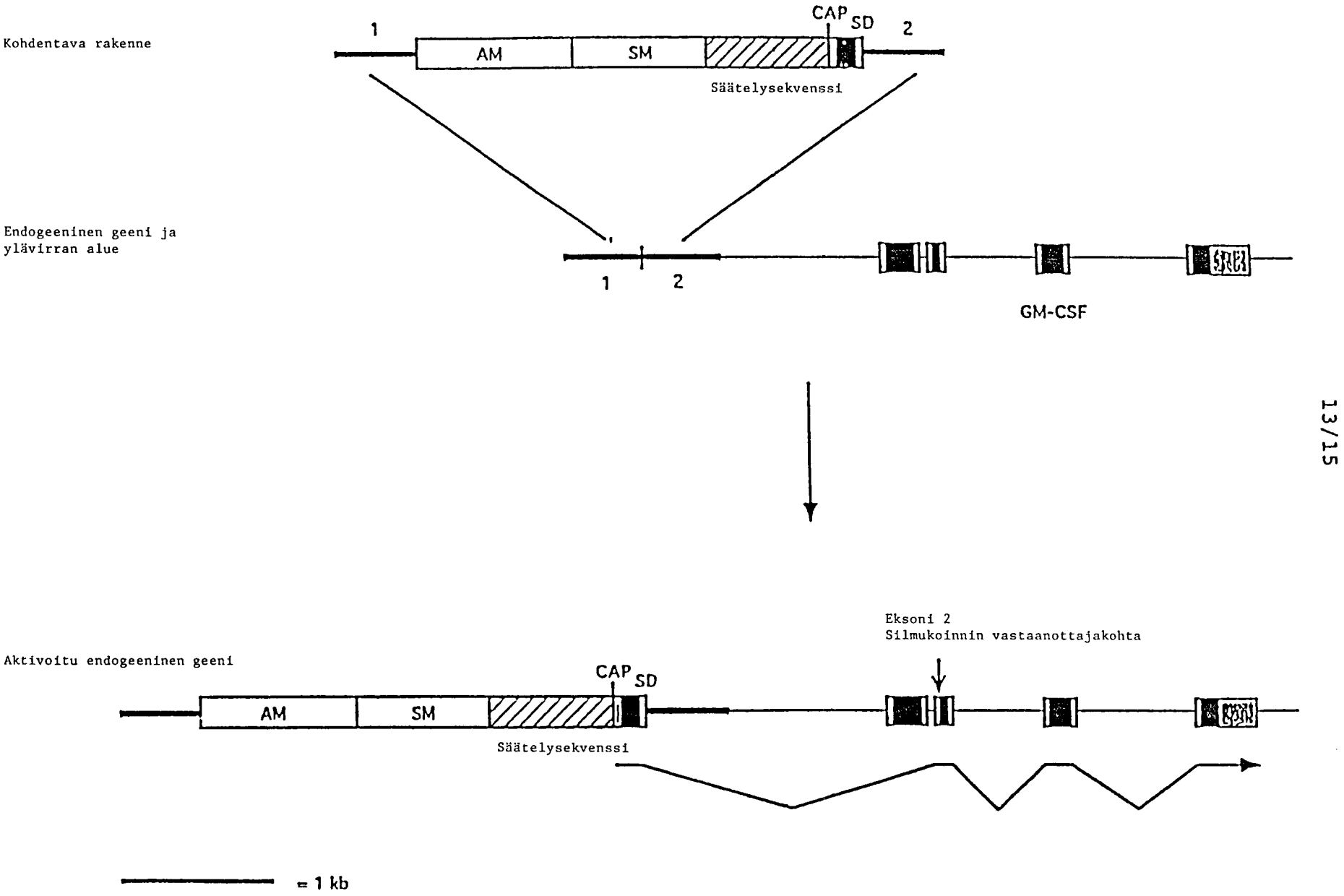
Kuvio 9B


HindIII (13426)
XbaI (13371)
SfiI (398)
XhoI (624)
ATG (12246)
Origo (1296)
BamHI (12237)
hGH-eksoni 1
CAP
amp
TATA box-
sekvenssi
CMV-promoottori
EcoRI (10491)
neo
pREPO18
13,4 Kb
NotI (3517)
BamHI (3537)
ClaI (9526)
SalI (9520)
dhfr
XbaI (5432)
SfiI (7910)
EcoRI (7560)
ClaI (7554)

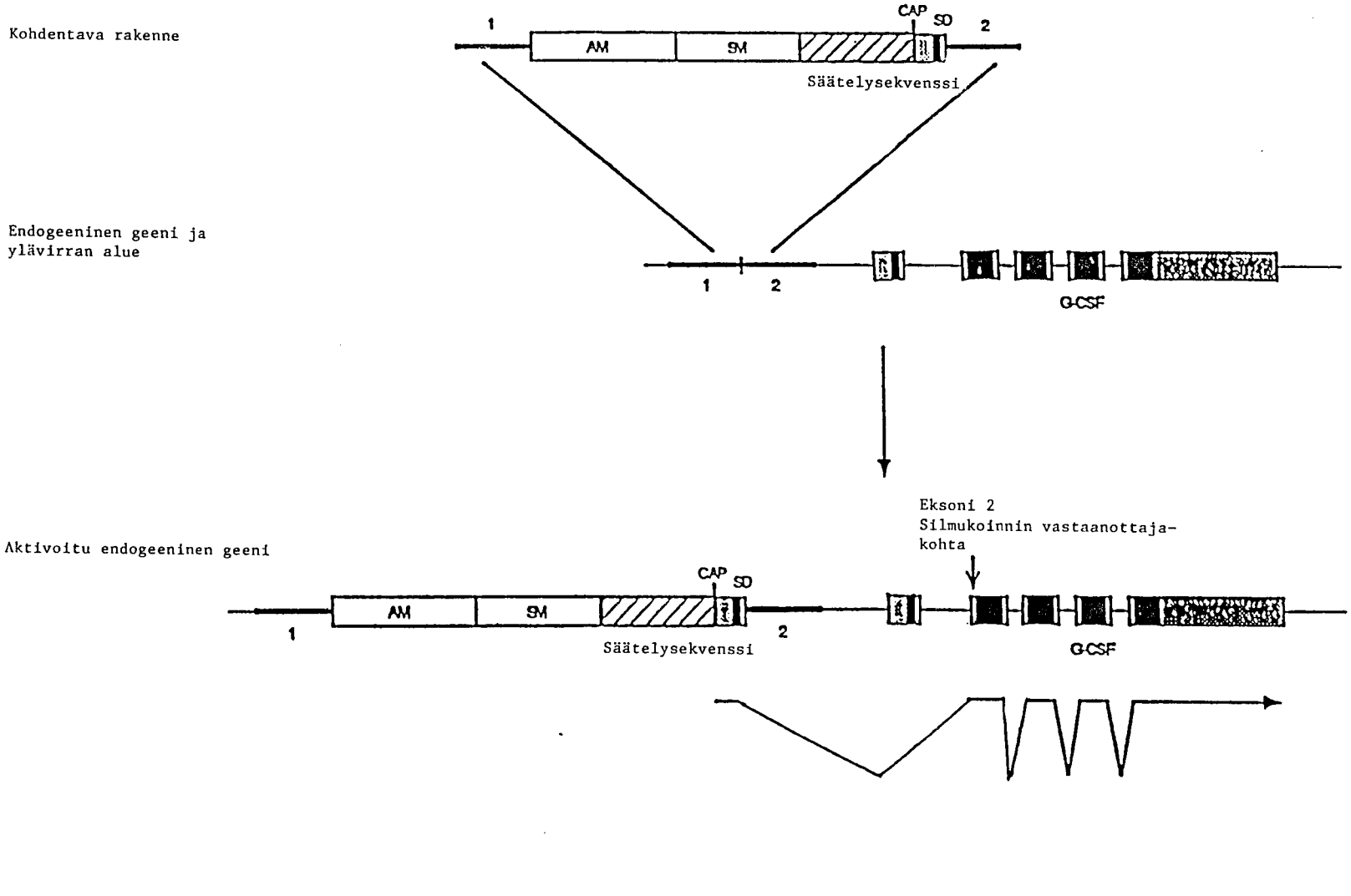
Kuvio 10


Kohdentava rakenne
CAP
SD
SA
1
AM
SM
2
Säätelysekvenssi
Endogeeninen geeni ja ylävirran alue
1
2
α-interferoni
Aktivoitu endogeeninen geeni
CAP
SD
SA
AM
SM
1
2
Säätelysekvenssi
α-interferoni
= 1 kb

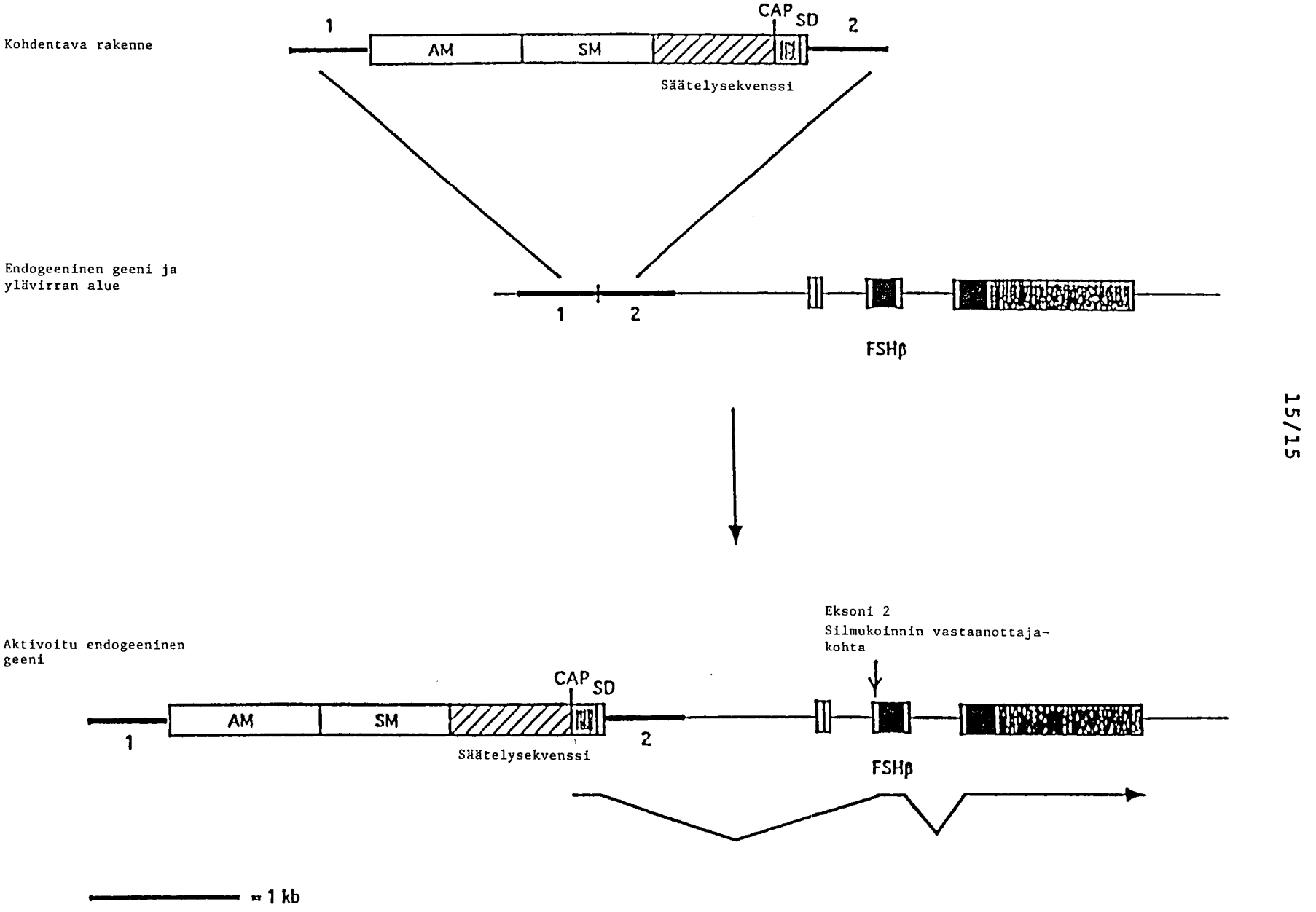
Kuvio 11


Kohdentava rakenne
1
AM
SM
CAP
SD
2
Säätelysekvenssi
Endogeeninen geeni ja
ylävirran alue
1
2
GM-CSF
Aktivoitu endogeeninen geeni
Eksoni 2
Silmukoinnin vastaanottajakohta
AM
SM
CAP
SD
Säätelysekvenssi
= 1 kb

Kuvio 12


Kohdentava rakenne
1
CAP
SD
2
AM
SM
Säätelysekvenssi
Endogeeninen geeni ja
ylävirran alue
1
2
G-CSF
Aktivoitu endogeeninen geeni
Eksoni 2
Silmukoinnin vastaanottaja-
kohta
CAP
SD
AM
SM
1
2
Säätelysekvenssi
G-CSF
= 1 kb

Kuvio 13


Kohdentava rakenne
1
AM
SM
CAP
SD
2
Säätelysekvenssi
Endogeeninen geeni ja ylävirran alue
1
2
FSHβ
Aktivoitu endogeeninen geeni
Eksoni 2
Silmukoinnin vastaanottaja-kohta
CAP
SD
AM
SM
1
2
Säätelysekvenssi
FSHβ
= 1 kb

Kuvio 14