SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

1461-96

(22) Dátum podania: 11.05.95

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/243 391

(32) Dátum priority: 13.05.94

(33) Krajina priority: US

(40) Dátum zverejnenia: 04.02.98

(86) Číslo PCT: PCT/US95/06045, 11.05.95

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

C 12N 15/67,
C 12N 15/90,
C 12N 15/85,
C 12N 15/62,
C 12NN 5/06,
C 07K 14/505,
C 07K 14/61,
A 61K 48/00

(71) Prihlasovateľ: Transkaryotic Therapies, Inc., Cambridge, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Treco Douglas A., Arlington, MA, US;
Heartlein Michael W., Boxborough, MA, US;
Selden Richard F., Wellesley, MA, US;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Konštrukt DNA, homológne rekombinantná bunka a spôsob jej prípravy, DNA plazmid, spôsob pozmeňovania expresie génu a spôsob targetingu génu erytropoetínu**

(57) Anotácia:
Je opísaný konštrukt DNA schopný meniť expresiu targetovaného génu po vložení do chromozomálnej DNA bunky, ktorý obsahuje a) targetingovú sekvenciu a prípadne druhú targetingovú sekvenciu; b) regulačnú sekvenciu; c) exón a buď d) nepárové donorové miesto zostrihu, alebo e) donorové miesto zostrihu, intrón a akceptorové miesto zostrihu. Ďalej je opísaná homológne rekombinantná bunka obsahujúca exogénnu regulačnú sekvenciu, exogénny exón a donorové miesto zostrihu operatívne pripojené k druhému exónu targetovaného endogénneho génu (ktorého prvý exón je napríklad vypustený), pričom exogénna regulačná oblasť, exogénny exón a donorové miesto zostrihu sú prípadne umiestnené pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou alebo endogénnou regulačnou sekvenciu (ktorá je napríklad vypustená) endogénneho génu a spôsob jej prípravy. Ďalej je opísaný DNA plazmid, spôsob pozmeňovania expresie génu a spôsob targetingu génu erytropoetínu v cicavčích, napríklad ľudských bunkách, transfekciou týchto buniek použitím uvedeného DNA konštruktu.

PV 1461-96

Konštrukt DNA, homológne rekombinantná bunka a spôsob jej prípravy, DNA plazmid, spôsob pozmieňania expresie génu a spôsob targetingu génu erytropoetínu

Oblasť techniky

Vynález sa týka konštruktu DNA schopného meniť expresiu targetovaného génu po vložení do chromozomálnej DNA bunky, homológne rekombinantnej bunky a spôsobu jej prípravy, DNA plazmidu, spôsobu pozmieňania expresie génu a spôsobu targetingu génu erytropoetínu v cicavčích, napríklad ľudských, bunkách transfekciou týchto buniek pri použití vyššie uvedeného konštruktu.

Doterajší stav techniky

Súčasné prístupy k liečeniu chorôb podávaním terapeutických proteínov zahrnujú in vitro produkciu terapeutických proteínov pre konvenčnú farmaceutickú dodávku (napríklad formou intravenóznych, subkutánnych alebo intramuskulárnych injekcií) a nedávno tiež génovú terapiu.

Proteíny, na ktoré je zameraný terapeutický záujem, sú všeobecne produkované zavedením exogénnej DNA kódujúcej daný protein, ktorý je predmetom terapeutického záujmu, do príslušných buniek. Tak napríklad sa exogénna DNA kódujúca požadovaný terapeutický protein zavedie do buniek, ako sú imortalizované bunky, vo vektore, ako plazmide, z ktorého je kódovaný proteín exprimovaný. Ďalej bolo navrhnuté modifikovať endogénne bunkové gény a ich expresiu génovým targetingom (pozri napríklad US patent č. 5 272 071, WO 91/06666, WO 91/06667 a WO 90/11354).

V súčasnosti dostupné prístupy ku génovej terapii používajú infekčné vektory, ako retrovírusové vektory, ktoré zahrnujú genetický materiál, ktorý má byť exprimovaný. Takéto prístupy majú svoje obmedzenia, ako je potenciál vytvorenia replikačne kompetentného vírusu počas produkcie vírusu; rekombináciu medzi

terapeutickým vírusom a endogénnymi retrovírusovými genómami, potenciálnu tvorbu infekčných činidiel s novými bunkovými špecificitami, hostiteľské rozmedzie alebo zvýšenú virulenciu a cytotoxicitu; nezávislú integráciu do veľkého počtu buniek, zvýšenie rizika tumorigénnej inzerčnej príhody; obmedzenú klonovaciu kapacitu v retrovíruse (ktorá obmedzuje terapeutickú aplikovateľnosť) a krátku životnosť in vivo expresie produktu, ktorý je predmetom záujmu. Lepší prístup k zaisteniu génových produktov, predovšetkým taký prístup, ktorý by sa vyhýbal obmedzeniam a rizikám spojeným s metódam, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii, by bol veľmi cenný.

Podstata vynálezu

Vynález sa týka zlepšených metód in vitro produkcie terapeutických proteínov a produkcie a dodávky terapeutických proteínov génovou terapiou. Pri spôsobe podľa vynálezu sa expresia požadovaného tergetovaného génu v bunke (tj. požadovaného endogénneho bunkového génu) modifikuje zavedením DNA, ktorá zahrnuje aspoň regulačnú sekvenciu, exón a donorové miesto zostrihu, prostredníctvom homológnej rekombinácie do bunkového genómu na dopredu zvolenom mieste. Vyššie uvedené zložky sa zavádzajú do chromozomálnej (genómovej) DNA takým spôsobom, že to má za následok produkciu novej transkripčnej jednotky (v ktorej sú regulačné sekvencie, exón a donorové miesto zostrihu prítomné v konštrukte DNA operatívne pripojené k endogénnemu génu). V dôsledku zavedenia týchto zložiek do chromozomálnej DNA dôjde k pozmeneniu expresie požadovaného endogénneho génu.

Pozmenená expresia génu, ktorá sa podľa vynálezu používa, zahrnuje aktiváciu (vyvolanie expresie) génu, ktorý je normálne tichý (nie je exprimovaný) v bunke, ako sa získa, zvýšenie expresie génu, ktorý nie je exprimovaný na fyziologicky významnej úrovni v bunke, ako sa získa, zmenu charakteristiky regulácie alebo indukcie tak, aby sa líšila od bunky, ako sa získa a redukciu (vrátane eliminácie) expresie génu, ktorý je exprimovaný

v bunke, ako sa získa.

Tento vynález sa ďalej tiež týka konštruktov DNA, ktoré sú užitočné pri spôsobe pozmieňania expresie cieľového génu. Tieto konštrukty DNA zahrnujú: a) tergetingovú sekvenciu; b) regulačnú sekvenciu; c) exón; a d) nepárové donorové miesta zostrihu. Targetingová sekvencia v konštrukte DNA riadi integráciu prvkov a) až d) do cieľového génu v bunke tak, že prvky b) až d) sú operatívne pripojené k sekvenciám endogénneho cieľového génu. V inej realizácii konštrukty DNA zahrnujú: a) tergetingovú sekvenciu; b) regulačnú sekvenciu; c) exón; d) donorové miesto zostrihu; e) intrón a f) akceptorové miesto zostrihu, pričom targetingová sekvencia riadi integráciu prvkov a) až f) tak, aby boli prvky b) až f) operatívne pripojené k endogénnemu génu. Targetingová sekvencia je homológna k dopredu zvolenému miestu v bunkovej chromozomálnej DNA, s ktorou má dôjsť k homológnej rekombinácii. V konštrukte je exón obvykle prítomný v smere k 3' od regulačnej sekvencie a donorové miesto zostrihu je umiestené v smere 3' od exónu.

V ďalšom texte sú ilustrované dve realizácie tohoto vynálezu, v ktorých sú sekvencie pred (proti smeru expresie) génom humánneho erytropoetínu h(EPO) pozmenené, aby umožňovali expresiu hEPO v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných bunkách, ktoré neexprimujú EPO v detegovateľných množstvách v netransfekovanom stave, v akom sa získajú. V prvej realizácii obsahuje targetingový konštrukt dve targetingové sekvencie. Prvá targetingová sekvencia je homológna k sekvenciám umiestenýmv smere k 5' od druhej targetingovej sekvencie a obidve sekvencie sú umiestené pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou hEPO. Targetingový konštrukt tiež obsahuje regulačnú oblasť (promótor mMT-1), exón (ľudský rastový hormón (hGH)) exón 1) a nepárové donorové miesto zostrihu. Produkt homológnej rekombinácie s týmto targetingovým konštruktom je znázornený na obr. 1.

V druhej realizácii obsahuje targetingový konštrukt tiež dve targetingové sekvencie. Prvá tergetingová sekvencia je homológna

k sekvenciám v endogénnej regulačnej oblasti hEPO a druhá targetingová sekvencia je homológna k hEPO intrónu 1. Targetingový konštrukt tiež obsahuje regulačnú oblasť (promótor mMT-1ä, exón (hGH exón 1) a donorové miesto zostrihu. Produkt homológnej rekombinácie s týmto targetingovým konštruktom je znázornený na obr. 2.

V týchto dvoch realizáciách sú produkty targetingu chimerické transkripčné jednotky vytvárajúce maturovanú mRNA, v ktorej je prvý exón génu hGH umiestený pred (proti smeru expresie) hEPO exóny 2-5. Produktom transkripcie, zostrihu a translácie je proteín, v ktorom sú aminokyseliny 1-4 hEPO signálneho peptidu nahradený aminokyselinovými zvyškami 1-3 z hGH. Tieto dve realizácie sa odlišujú ako relatívnymi polohami regulačných sekvencií targetingového konštruktu, ktoré sú vkladané, tak aj špecifickou charakteristikou zostrihu, ku ktorej musí dôjsť, aby vznikol konečný upravený transkript.

Vynález sa tiež týka spôsobu produkcie proteínu in vitro alebo in vivo zavedením vyššie popísaného konštruktu do chromozomálnej DNA hostiteľskej bunky homológnou rekombináciou s cieľom produkcie homológne rekombinantnej bunky. Homológne rekombinantná bunka sa potom udržiava pri podmienkach umožňujúcich transkripciu, transláciu a sekréciu, pričom dochádza k produkcii proteínu, ktorý je predmetom záujmu.

Vynález sa ďalej týka transfekovaných buniek, ako sú transfekované primárne alebo sekundárne bunky (tj. neimortalizované bunky) a transfekovaných imortalizovaných buniek, ktoré sú užitočné pre produkciu proteínov, predovšetkým terapeutických proteínov, spôsobov produkcie takýchto buniek, spôsobu používania takýchto buniek pre in vitro produkciu proteínu a spôsobov génovej terapie. Bunky podľa tohto vynálezu pochádzajú zo stavovcov, predovšetkým cicavcov a najmä potom majú ľudský pôvod. Bunky vytvorené spôsobom podľa tohto vynálezu obsahujú DNA, ktorá kóduje terapeutický produkt, DMA, ktorá je sama terapeutickým produktom a/alebo DNA, ktorá vyvoláva u transfekovaných buniek

expresiu génu na vyššej úrovni alebo s inou charakteristikou regulácie alebo indukcie, ako je charakteristika, ku ktorej dochádza u príslušnej netransfekovanej bunky.

Vynález sa tiež týka spôsobov, ktorými sú bunky, ako sú primárne, sekundárne a imortalizované bunky, imortalizované tak, aby obsahovali exogénny genetický materiál, spôsobov produkcie klonálnych bunkových kmeňov alebo heterogénnych bunkových kmeňov a spôsobov očkovania zvierat alebo produkcie protilátok v očkovaných zvieratách použitím transfekovaných primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek.

Vynález sa týka predovšetkým spôsobov génového targetingu alebo homológnej rekombinácie v eukaryotických bunkách, ako sú bunky hubového, rastlinného alebo živočíšneho pôvodu, napríklad bunky stavovcov, predovšetkým cicavcov a najmä potom ľudské bunky. Vynález sa teda týka spôsobu zavádzania DNA do primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek pochádzajúcich zo stavovcov homológnou rekombináciou, pri ktorej dochádza k zavedeniu DNA do genómovej DNA primárnych, sekundárnych alebo imoratalizovaných buniek v dopredu zvolenom mieste. Targetingové sekvencie sa volia s ohľadom na miesto, do ktorého má byť DNA targetingového DNA konštruktu vložená. Vynález sa ďalej týka homológne rekombinantných primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek označovaných ako homológne rekombinantné HR primárne, sekundárne alebo imortalizované bunky, produkovaných spôsobom podľa vynálezu a ďalej tiež použitia HR primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek.

V jednej realizácii tohoto vynálezu, pri ktorej je pozmenená expresia génu, je gén aktivovaný. Gén prítomný v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných bunkách pochádzajúcich zo stavovcov, ktorý normálne nie je exprimovaný v bunkách, ako sa získajú, je teda teda aktivovaný a v dôsledku toho sa exprimuje kódovaný protein. Pri tejto realizácii sa homológna rekombinácia používa na nahradenie, zneschopnenie alebo rozbitie regulačnej oblasti, ktorá je normálne asociovaná s génom v bunkách, tak ako

sa získajú, prostredníctvom inzercie regulačnej sekvencie, ktorá spôsobuje, že je gén exprimovaný na vyššej úrovni, ako je úroveň zistená u príslušných netransfekovaných buniek.

Podľa jednej realizácie sa aktivovaný gén môže ďalej amplifikovať včlenením amplifikovateľného selektovateľného markerového génu, ktorý má takú vlastnosť, že bunky obsahujúce amplifikované kópie selektovateľného markerového génu môžu byť selektované prostredníctvom kultivácie buniek za prítomnosti vhodného selekčného činidla. Aktivovaný endogénny gén sa amplifikuje v tandéme s amplifikovateľným selektovateľným markerovým génom. Bunky obsahujúce mnoho kópií aktivovaného endogénneho génu sú užitočné pre produkciu proteínu in vitro a pre génovú terapiu. Targeting génu a amplifikácie, ktoré sú popísané v tomto popise, sú veľmi užitočné pre aktiváciu expresie génov vytvárajúcich transkripčné jednotky s takou dostatočnou veľkosťou, že je ťažké ich izolovať a exprimovať, alebo pre aktiváciu génov, u ktorých nie je celá oblasť kódujúca protein k dispozícii alebo nebola klonovaná.

V ďalšej realizácii sa expresia génu, ktorý je exprimovaný v bunke, ako sa získa, zvyšuje alebo modifikuje tak, aby bola charakteristika regulácie alebo indukcie odlišná do charakteristiky pozorovanej u príslušných netransfekovaných buniek. V inej realizácii sa expresia génu, ktorý má byť exprimovaný v bunke ako sa získa, redukuje (tj. znižuje alebo odstraňuje). Predmetom vynálezu je tiež spôsob, pri ktorom sa homológna rekombinácia používa na konverziu génu na kópiu cDNA bez obsahu intrónov, pre prenos do kvasiniek alebo baktérií s cieľom in vitro produkcie proteínu.

Transfekované bunky podľa vynálezu sú užitočné pri mnohých aplikáciách u človeka a zvierat. V jednej realizácii sa môžu bunky implantovať človeku alebo zvieraťu s cieľom dodávky proteínu organizmu človeka alebo zvieraťa. Tak napríklad je možné človeku, s cieľom dosiahnutia terapeutického úžitku, systémovo alebo lokálne dodávať hGH, hEPO, humánny inzulinotropín a iné

proteíny. Okrem toho sa môžu produkovať transfekované nehumánne bunky produkujúce rastový hormón, erytropoetín, inzulínotropín alebo iné proteíny nehumánneho pôvodu.

Na zadržanie buniek vo fixovanej polohe in vivo alebo na ochranu a izoláciu buniek pred imunitným systémom hostiteľa sa môžu používať bariérové zariadenia obsahujúce transfekované bunky, ktoré exprimujú terapeutický produkt. Takéto bariérové zariadenia sú síce nepriepustné pre bunky, ale terapeutický produkt cez ne môže voľne prechádzať. Bariérové zariadenia sú predovšetkým užitočné z toho dôvodu, že umožňujú implantovať transfekované imortalizované bunky, transfekované xenogénne bunky alebo transfekované alogénne bunky s cieľom liečenia chorôb človeka alebo zvierat alebo pre poľnohospodárske aplikácie (napríklad pri potrebe dodávky hovädzieho rastového hormónu s cieľom intenzifikácie produkcie mlieka). Bariérové zariadenia tiež umožňujú účelnú krátkodobú (tj. transientnú) terapiu tým, že sú bunky ľahko dostupné a môžu sa odstrániť, keď je potrebné liečebný režim z dajakého dôvodu zastaviť. Transfekované xenogénne a alogénne bunky sa môžu tiež používať za neprítomnosti bariérového zariadenia pri krátkodobej génovej terapii. V poslednom uvedenom prípade bude génový produkt produkovaný bunkami dodávaný in vivo tak dlho, dokiaľ nebudú bunky imunitným systémom hostiteľa odmietnuté.

Transfekované bunky podľa vynálezu sú tiež užitočné pre vyvolanie produkcie protilátok alebo pre imunizáciu človeka a zvierat proti patogénnym činidlám. Pri dodávke imunizačných antigénov stimulujúcich bunkové a humorálne imunitné odpovede hostiteľa sa môžu používať implantované transfekované bunky. Cieľové imunitné odpovede môžu slúžiť na ochranu hostiteľa pred infekčnými činidlami, ktorým bude hostiteľ pravdepodobne vystavený (napríklad v prípade očkovania), na stimuláciu a zvýšenie schopnosti bojovať s chorobou v prípade infekcie, ktorá už prebieha alebo na produkciu protilátok zameraných proti antigénu exprimovanému in vivo transfekovanými bunkami, čo môže byť užitočné pre terapeutické alebo diagnostické účely.

Odstraniteľné bariérové zariadenia obsahujúce bunky sa môžu používať ako prostriedok umožňujúci jednoduché ukončenie expozície antigénu. Alternatívne je možné na obmedzenie expozície antigénu používať bunky, ktoré sú nakoniec odmietnuté (xenogénne alebo alogénne transfekované bunky), keďže produkcia antigénu je pri odmietnutí buniek prerušená.

Spôsoby podľa vynálezu je možné používať pri produkcii primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek exprimujúcich širokú paletu terapeuticky užitočných produktov. Ako neobmedzujúce príklady takýchto produktov je možné uviesť hormóny, cytokíny, antigény, protilátky, enzýmy, zrážacie faktory, transportné proteíny, receptory, regulačné proteíny, štruktúrne proteíny, transkripčné faktory, ribozómy a antimediátorové RNA. Spôsoby podľa vynálezu je tiež možné použiť na produkciu buniek exprimujúcich ribozómy, proteíny alebo nukleové kyseliny, ktoré sa nevyskytujú v prírode. Takéto bunky sú užitočné pre in vitro produkciu terapeutického produktu alebo pre génovú terapiu.

Popis obr. na výkresoch

Na obr. 1 je znázornený schematický diagram stratégie použitej pre transkripčnú aktiváciu génu hEPO; hrubé čiary, myšací promótor metalotioneín I; bodkovaný obdĺžnik, 5' nepreložená oblasť hGH; vyčiernený obdĺžnik, hGH exón 1; prúžkovaný obdĺžnik, 10bp donorová sekvencia zostrihu z hEPO intrónu 1; mriežkovaný obdĺžnik, 5' nepreložená oblasť hEPO; prázdne očíslované obdĺžniky, kódujúce sekvencie hEPO; diagonálne šrafovaný obdĺžnik, 3' nepreložené sekvencie hEPO; HIII, miesto HindIII.

Na obr. 2 je znázornený schematický diagram stratégie použitej pre transkripčnú aktiváciu génu hEPO; hrubé čiary, myšací promótor metalotioneín I; bodkovaný obdĺžnik, 5' nepreložená oblasť hGH; vyčiernený obdĺžnik, hGH exón 1; prázdne očíslované obdĺžniky, kódujúce sekvencie hEPO; diagonálne

šrafovaný obdĺžnik, 3' nepreložené sekvencie hEPO; HIII, miesto HindIII.

Na obr. 3 je schematicky znázornený plazmid pXGH5, ktorý zahrnuje gén hGH pod kontrolou myšacieho metalotioneínového promótora.

Na obr. 4 je schematicky znázornený plazmid pE3neoEPO. Sú tu označené polohy humánneho erytropoetínového génu a génu neomycín fosfotransferázy (neo) a génov rezistencie voči ampicilínu (amp). Šípky ukazujú smery transkripcie rôznych génov. Šifrou pmMT-1 je označená myšací metalotioneínový promótor (poháňajúci expresiu hEPO) a šifrou pTK je označený tymidín kinázový promótor z vírusu Herpes simplex (poháňajúci expresiu neo). Bodkované oblasti mapy označujú polohy sekvencií odvodených z loku humánnej hypoxantín--guanín-fosforibozyl transferázy (HPRT). Sú tu označené relatívne polohy miest rozpoznávaných reštrikčnou endonukleázou.

Na obr. 5 je schematicky znázornený plazmid pcDNEO, ktorý zahrnuje kódujúcu oblasť neo (fragment BamHI-BglII) z plazmidu pSV2neo vloženú do miesta BamHI z plazmidu pcD; sekvencie Amp-R a pBR3220ri z pBR322; a polyA, 16S spoj zostrihu a skoré promótorové oblasti z SV40.

Na obr. 6 je schematicky znázornený plazmid pREPO4.

Na obr. 7 je uvedená grafická reprezentácia expresie erytropoetínu v cieľovej humánnej bunkovej línii podrobenej stupňovitej selekcii v 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 a 0,4 uM metotrexátu.

Na obr. 8 je schematicky znázornený plazmid pREPO15. Fragmenty pochádzajúce z genómových sekvencií hEPO sú označené vyčiernenými obdĺžnikmi. Oblasť medzi BamHI (3537) a BglII'/HindIII' zodpovedá sekvenciám v polohách 1-4008 v sekvencii HUMERPALU (podľa Genbank). Oblasť medzi BglII'/HindIII' (11463) zodpovedá sekvenciám DNA v polohách 4009-5169 v sekvencii HUMERPALU (podľa Genbank). Oblasť medzi HindIII (11463) a XhoI

(624) obsahuje sekvenciu zodpovedjúcu polohám 7 až 624 sekvencie HUMERPALU (podľa Genbank). Sekvencie promótora CMW sú znázornené ako prázdny obdĺžnik; tieto sekvencie obsahujú sekvenciu nukleotidov 546 až 2105 sekvencie HS5MIEP (podľa Genbank). Gén neo je znázornený ako prázdny obdĺžnik so šípkou. Tymidín kinázový (tk) promótor poháňajúci gén neo je znázornený ako šrafovaný obdĺžnik. Sekvencie pBSIISK+ zahrnujúce gén amp sú označené tenkou čiarou.

Na obr. 9A sú znázornené reštrikčné enzýmové mapy a schematické zobrazenia produktov pozorovaných po štiepení endogénneho génu hEPO (hore) a aktivovaného génu hEPO po homológnej rekombinácii s targetingovým fragmentom z pREPO15 (dole).

Na obr. 9B sú uvedené výsledky štiepenia reštrikčným enzýmom a analýzy hybridizáciou Southern neupraveného (HF) a cieľového (T1) klonu humánnych fibroblastov HF342-15 (pozri príklad 7).

Na obr. 10 je schematicky znázornený plazmid pREPO18. Fragmenty pochádzajúce z genómových sekvencií hEPO sú označené vyčiernenými obdĺžnikmi. Oblasť medzi BamHI (3537) a ClaI (7554) zodpovedá sekvenciám v polohách 1-4008v sekvencii HUMERPALU (podľa Genbank). Oblasť medzi ATG (12246) a HindIII' (13426) zodpovedá sekvenciám DNA v polohách 4009-5169 v sekvencii HUMERPALU (podľa Genbank). Oblasť medzi HindIII (13426) a XhoI (624) obsahuje sekvenciu zodpovedajúcu polohám 7 až 624 sekvencie HUMERPALU (podľa Genbank). Sekvencie promótora CMW sú znázornené ako prázdny obdĺžnik; tieto sekvencie obsahujú sekvenciu nukleotidov 546 až 2015 sekvencie HS5MIEP (Genbank). Dihydrofolát reduktázová (dhfr) transkripčná jednotka je znázornená ako bodkovaný obdĺžnik so šípkou. Gén neo je znázornený ako prázdny obdĺžnik so šípkou. Tymidín kinázový (tk) promótor poháňajúci gén neo je znázornený ako šrafovaný obdĺžnik. Sekvencie pBSIISK+ zahrnujúce gén amp sú označené tenkou čiarou.

Na obr. 11 je schematicky ilustrovaný konštrukt podľa

vynálezu pre aktiváciu a amplifikáciu benzintrónového génu, alfa-interferónového génu. Tento konštrukt zahrnuje prvú targetingovú sekvenciu (1), amplifikovateľný markerový gén (AM), selektovateľný merkerový gén (SM), regulačnú sekvenciu, miesto CAP, donorové miesto zostrihu (SD), intrón (tenké čiary), akceptorové miesto zostrihu (SA) a druhú targetingovú sekvenciu (2). Čierny obdĺžnik znázorňuje kódujúcu DNA a bodkované obdĺžniky znázorňujú nepreložené sekvencie.

Na obr. 12 je schematicky ilustrovaný konštrukt podľa vynálezu pre aktiváciu a amplifikáciu endogénneho génu, kde prvý exón prispieva k signálnemu peptidu, humánnemu génu GM-CSF. Tento konštrukt zahrnuje prvú targetingovú sekvenciu (1), amplifikovateľný markerový gén (AM), selektovateľný merkerový gén (SM), regulačnú sekvenciu, miesto CAP, donorové miesto zostrihu (SD) a druhú targetingovú sekvenciu (2). Čierny obdĺžnik znázorňuje kódujúcu DNA a bodkované obdĺžniky znázorňujú nepreložené sekvencie.

Na obr. 13 je schematicky ilustrovaný konštrukt podľa vynálezu pre aktiváciu a amplifikáciu endogénneho génu, kde prvý exón prispieva k signálnemu peptidu, humánnemu génu G-CSF. Tento konštrukt zahrnuje prvú targetingovú sekvenciu (1), amplifikovateľný markerový gén (AM), selektovateľný merkerový gén (SM), regulačnú sekvenciu, miesto CAP, donorové miesto zostrihu (SD) a druhú targetingovú sekvenciu (2). Čierny obdĺžnik znázorňuje kódujúcu DNA a bodkované obdĺžniky znázorňujú nepreložené sekvencie.

Na obr. 14 je schematicky ilustrovaný konštrukt podľa vynálezu pre aktiváciu a amplifikáciu endogénneho génu, kde prvý exón je nekódujúci, humánnemu génu FSHbeta. Tento konštrukt zahrnuje prvú targetingovú sekvenciu (1), amplifikovateľný markerový gén (AM), selektovateľný merkerový gén (SM), regulačnú sekvenciu, miesto CAP, donorové miesto zostrihu (SD) a druhú targetingovú sekvenciu (2). Čierny obdĺžnik znázorňuje kódujúcu DNA a bodkované obdĺžniky znázorňujú nepreložené sekvencie.

Nasleduje podrobný popis vynálezu.

Vynález je založený na objave, že regulácia aktivity endogénnych génov, ktoré sú predmetom záujmu, v bunke môže byť pozmenená vložením do bunkového genómu v dopredu zvolenom mieste prostredníctvom homológnej rekombinácie konštruktov DNA zahrnujúcich a) targetingovú sekvenciu, b) regulačnú sekvenciu, c) exón a d) nepárové donorové miesto zostrihu, pričom targetingová sekvencia riadi integráciu prvkov a) až d) tak, že prvky b) až d) sú operatívne pripojené k endogénnemu génu.

V inej realizácii zahrnujú konštrukty DNA a) targetingovú sekvenciu, b) regulačnú sekvenciu, c) exón a d) donorové miesto zostrihu, e) intrón a f) akceptorové miesto zostrihu, pričom targetingová sekvencia riadi integráciu prvkov a) až f) tak, že prvky b) až f) sú operatívne pripojené k prvému exónu endogénneho génu.

Použité targetingové sekvencie sa volia s ohľadom na miesto, do ktorého má byť vložená DNA. Pri obidvoch realizáciách sa targeting používa na vytvorenie novej transkripčnej jednotky, ktorá predstavuje produkt fúzie sekvencií zavedených targetingovými DNA konštruktmi a endogénneho bunkového génu. Ako je tu vysvetlené, vytvorenie novej transkripčnej jednotky napríklad umožňuje, aby boli transkripčne tiché gény (gény, ktoré pred transfekciou nie sú v bunke exprimované) aktivované v hostiteľských bunkách tým, že sa do genómu hostiteľských buniek zavedú konštrukty DNA podľa tohoto vynálezu. Ako je v tomto popise tiež vysvetlené, expresia endogénneho génu, ktorý je exprimovaný v bunke tak, ako sa normálne získa, môže byť pozmenená, tj. zvýšená, znížená a tiež odstránená, alebo môže byť zmenený profil regulácie alebo indukcie použitím spôsobu a konštruktov DNA podľa tohoto vynálezu.

Ako je uvedené vyššie, vynález sa týka targetingu génu alebo DNA v bunkách eukaryotického pôvodu, ako sú hubové, rastlinné

alebo živočíšne bunky, ako napríklad bunky pochádzajúce zo stavovcov, predovšetkým cicavcov a najmä potom človeka. Vynález sa teda týka spôsobu zavádzania DNA do bunky, ako sú primárne, sekundárne alebo imortalizované bunky pochádzajúce zo stavovcov homológnou rekombináciou, tj. targetingom DNA, ktorá sa zavádza do genómovej DNA týchto buniek v dopredu zvolenom mieste. Konkrétne sa týka homológnej rekombinácie, pri ktorej sa produkty transkripcie a/alebo translácie endogénnych génov modifikujú použitím konštruktov DNA obsahujúcich targetingovú sekvenciu, regulačnú sekvenciu, exón a donorové miesto zostrihu. Ďalej sa vynález tiež týka homológne rekombinantných buniek vyrobených spôsobom podľa vynálezu a ich použitia.

Vynález sa tiež týka spôsobu aktivácie génu, ktorý je prítomný v primárnych bunkách, sekundárnych bunkách alebo imortalizovaných bunkách pochádzajúcich zo stavovcov, ale pri normálnych podmienkach nie je v týchto bunkách exprimovaný. Homológne rekombinácie, tj. targeting, sa používajú na zavádzanie sekvencií spôsobujúcich expresiu génu v recipientných bunkách do genómu týchto buniek. V ďalšej realizácii sa expresia génu v bunke zvyšuje alebo sa pozmieňa profil regulácie alebo indukcie génu zavádzaním konštruktu DNA. V dôsledku toho je kódovaný produkt exprimovaný na vyššej úrovni, ako je úroveň pozorovaná u príslušných netransfekovaných buniek. Spôsob a konštrukty DNA podľa vynálezu sú tiež užitočné pre produkciu buniek, v ktorých je expresia požadovaného produktu nižšia v porovnaní s príslušnými netransfekovanými bunkami. V transfekovaných bunkách je v takomto prípade produkované menšie množstvo proteínu (alebo tiež žiadny proteín) v porovnaní s bunkami, ako sa normálne získajú.

V ešte ďalšej realizácii sa pri normálnych podmienkach tichý gén kódujúci požadovaný produkt aktivuje v transfekovaných primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných bunkách a amplifikuje. Táto realizácia predstavuje spôsob zavádzania sekvencií DNA, ktoré nie sú normálne funkčne pripojené k endogénnemu génu a ktoré 1) po vložení do genómu hostiteľa v

mieste alebo v blízkosti miesta endogénneho génu slúžia na pozmenenie (napríklad aktiváciu) expresie tohoto endogénneho génu a ďalej 2) umožňujú selekciu buniek, v ktorých je tento aktivovaný endogénny gén amplifikovaný, prostredníctvom homológnej rekombinácie s genómovou DNA. Alternatívne sa zvyšuje expresia génu, ktorý je normálne exprimovaný v bunke, tak ako sa získa, a gén sa amplifikuje.

Nasleduje popis konštruktov DNA podľa tohoto vynálezu, spôsobov pri ktorých sa tieto konštrukty používajú pre produkciu transfekovaných buniek, transfekovaných buniek samotných a ich použitie.

Konštrukt DNA

Konštrukt DNA podľa vynálezu zahrnuje aspoň tieto zložky: targetingovú sekvenciu, regulačnú sekvenciu, exón a nepárové donorové miesto zostrihu. V konštrukte je exón umiestený smerom k 3' od regulačnej sekvencie a nepárové donorové miesto zostrihu je umiestené smerom k 3' od exónu. Okrem toho môže konštrukt obsahovať niekoľko exónov a/alebo intrónov pred (smerom k 5') exónom lemovaným nepárovým donorovým miestom zostrihu. Ako je uvedené v tomto popise, konštrukt často obsahuje ešte prídavné zložky, ako sú selektovateľné markery alebo amplifikovateľné markery.

DNA v konštrukte je možné označovať za exogénnu. Pod označením "exogénna" sa tu rozumie, že táto DNA je zavedená do bunky spôsobom podľa vynálezu, totiž použitím konštruktov DNA charakterizovaných v tomto popise. Exogénna DNA môže obsahovať sekvencie, ktoré sú totožné s endogénnou DNA prítomnou v bunke pred transfekciou, alebo ktoré sa od nej odlišujú.

Targetingová sekvencia alebo targetingové sekvencie

Pod označením "targetingová sekvencia" alebo "targetingové sekvencie" sa rozumejú sekvencie DNA, ktoré umožňujú legitímnu

homológnu rekombináciu do genómu zvolenej bunky s obsahom génu, ktorý je predmetom záujmu. Targetingovými sekvenciami sú všeobecne sekvencie DNA, ktoré sú homológne (tj. identické alebo dostatočne podobné bunkovej DNA, aby mohlo dôjsť k homológnej rekombinácii targetingovej sekvencie a bunkovej DNA) vzhľadom na sekvencie DNA normálne prítomné v genóme buniek, ako sa získajú (napríklad kódujúcej alebo nekódujúcej DNA ležiacej pred miestom štartu transkripcie, v mieste alebo za miestom konca transkripcie génu, ktorý je predmetom záujmu, alebo sekvencie prítomné v genómu v dôsledku predchádzajúcej modifikácie). Targetingová alebo targetingové sekvencie, ktoré sa používajú, sa volia s ohľadom na miesto, do ktorého má byť DNA v konštrukte DNA vložená.

Môže sa používať jedna alebo viac targetingových sekvencií. Tak napríklad kružnicový plazmid alebo fragment DNA prednostne obsahuje len jednu targetingovú sekvenciu. V lineárnom plazmide alebo fragmente DNA sa prednostne používajú dve targetingové sekvencie. Targetingová alebo targetingové sekvencie môžu byť nezávisle umiestené v géne, ktorý je predmetom záujmu (ako napríklad v sekvencii exónu a/alebo intrónu), bezprostredne vedľa génu, ktorý je predmetom záujmu (v tomto prípade nie sú medzi targetingovou sekvenciou a kódujúcou oblasťou génu, ktorý je predmetom záujmu, prítomné žiadne prídavné nukleotidy), pred (proti smeru expresie) génom, ktorý je predmetom záujmu (tj. v sekvenciách nekódujúcich oblasti alebo endogénnych promótorových sekvenciách pred génom), alebo v značnej vzdialenosti pred (proti smeru expresie) génom (ako napríklad v sekvenciách pred endogénnym promótorom). Targetingová alebo targetingové sekvencie môžu obsahovať oblasti targetovaného génu, ktoré sú v súčasnosti známe alebo sekvencované a/alebo oblasti ďalej k 5'- koncu, ktoré nie sú štruktúrne charakterizované, ale je možné ich mapovať použitím reštrikčných enzýmov a určiť.

Targeting génu je možné použiť na vloženie regulačnej sekvencie izolovanej z odlišného génu, zostavenej zo zložiek izolovaných z odlišných bunkových a/alebo vírusových zdrojov

alebo novo syntetizovanej pomocou metód génového inžinierstva buď v, bezprostredne vedľa, pred (proti smeru expresie) alebo v značnej vzdialenosti pred (proti smeru expresie) endogénnym bunkovým génom. Alternatívne alebo prídavne je pri targetingu možné nahradiť, odstrániť, pridať alebo inak modifikovať sekvencie ovplyvňujúce štruktúru alebo stabilitu RNA alebo produkovaného proteínu. Tak napríklad je možné modifikovať prvky stability RNA, miesta zostrihu a/alebo vedúce sekvencie molekúl RNA s cieľom zlepšenia alebo pozmenenia funkcie, stability a/alebo schopnosti translácie molekuly RNA. Tiež je možné pozmeniť sekvencie proteínu, ako signálne sekvencie, propeptidové sekvencie, aktívne miesta a/alebo štruktúrne sekvencie s cieľom zvýšenia alebo modifikácie transportu, sekrécie alebo funkčných vlastností proteínu. Pri tomto spôsobe má zavádzanie exogénnej DNA za následok pozmenenie normálnych vlastností expresie génu a/alebo štruktúrnych vlastností proteínu alebo RNA.

Regulačná sekvencia

Regulačná sekvencia konštruktu DNA môže zahrnovať jeden alebo viac promótorov (ako konštitutívny alebo indukovateľný promótor), enhancérov, oblastí pripojených v podobe lešenia (scaffold-attachment) alebo miest pripojenia matrice, negatívnych regulačných prvkov, miest väzby faktoru transkripcie alebo kombinácie takýchto sekvencií.

Regulačná sekvencia môže obsahovať indukovateľný promótor, ktorý sa prejavuje tak, že bunky, tak ako sú produkované alebo zavedené do indivídua, neexprimujú produkt, ale môžu byť k tejto expresii indukované (tj. expresia sa indukuje po produkcii transfekovaných buniek, ale pred implantáciou alebo po nej). DNA kódujúca požadovaný produkt sa samozrejme môže do buniek zavádzať takým spôsobom, že je exprimovaná po zavedení (napríklad pod kontrolou konštitutívneho promótora). Regulačná sekvencia sa môže izolovať z bunkového alebo vírusového genómu (takéto regulačné sekvencie zahrnujú sekvencie, ktoré regulujú expresiu SV40 skorých alebo neskorých génov, hlavných neskorých génov

adenovírusu, myšacieho génu metalotioneínu-I, génu elongačného faktora-1alfa, génov cytomegalovírusu, génov kolagénu, génov aktínu, génov imunoglobulínu alebo génu HMG-CoA reduktázy). Regulačná sekvencia prednostne obsahuje miesta väzby transkripčného faktora, ako sú väzbové miesta TATA Box, CCAAT Box, AP1, Sp1 alebo NF-*k*B.

Prídavné prvky konštruktu DNA

Konštrukt DNA ďalej obsahuje jeden alebo viac exónov. Exón je tu definovaný ako sekvencia DNA, ktorá je kopírovaná do RNA a je prítomná v maturovanej molekule mRNA. Exóny môžu poprípade obsahovať DNA kódujúcu jeden alebo viac aminokyselín a/alebo čiastočne kódujúcu aminokyselinu (tj. jednu alebo dve bázy kodónu). Alternatívne obsahuje exón DNA, ktorá zodpovedá 5' nekódujúcej oblasti. Ak exogénny exón alebo exóny kódujú jednu alebo viac aminokyselín a/alebo časť aminokyseliny, zostavuje sa konštrukt DNA tak, aby pri transkripcii a zostrihu bol čítací rámec v rámci s druhým exónom alebo kódujúcou oblasťou targetovaného génu. Pod označením "v rámci! sa tu rozumie, že kódujúca sekvencia prvého exónu a druhého exónu po fúzii majú spoločné nukleotidy spôsobom, ktorý nemení vhodný čítací rámec časti mRNA s pôvodom z druhého exónu.

Ak prvý exón targetovaného génu obsahuje sekvenciu ATG pre iniciáciu translácie, obsahuje exogénny exón konštruktu prednostne ATG a ak to je žiadúce, jeden alebo viac nukleotidov tak, že výsledná kódujúca oblasť mRNA, ktorá zahrnuje druhý exón a nasledujúce exóny targetovaného génu sú v rámci. Ako príklady takýchto targetovaných génov, v ktorých prvý exón obsahuje ATG je možné uviesť gény kódujúce hEPO, hGH, humánny faktor stimulujúci kolónie - granulocyt/makrofág (hGM-CSF) a humánny faktor stimulujúci kolónie - granulocyt (hG-CSF).

Donorové miesto zostrihu je sekvencia, ktorá riadi zostrih jedného exónu k druhému. Prvý exón obvykle leží v smere k 5' od druhého exónu a donorové miesto zostrihu, ktoré prekrýva prvý

exón a lemuje ho na svojej 3' strane rozpoznáva akceptorové miesto zostrihu lemujúce druhý exón na jeho 5' strane. Donorové miesta zostrihu vykazujú charakteristickú konvenčnú sekvenciu, ktorá sa dá znázorniť takto: (A/C)AG GURAGU (kde R predstavuje purínový nukleotid), kde GU musí byť v 4. a 5. polohe (Jackson I.J., Nucleic Acids Research 19: 3715 až 3798 (1991)). Prvé tri bázy konvenčných donorových miest zostrihu sú funkčne definované schopnosťou uskutočniť vhodnú reakciu v rámci zostrihovej dráhy mRNA.

Nepárové donorové miesto zostrihu je tu definované ako donorové miesto zostrihu, ktoré je prítomné v targetingovom konštrukte a ktoré nie je v konštrukte sprevádzané miestom zostrihu umiestneným v smere k 3' od nepárového donorového miesta zostrihu. Nepárové donorové miesto zostrihu sa prejavuje zostrihom k endogénnemu akceptorovému miestu zostrihu.

Akceptorové miesto zostrihu je sekvencia, ktorá podobne ako donorové miesto zostrihu riadi zostrih jedného exónu k druhému. Tým, že aparát zostrihu pôsobí v kombinácii s donorovým miestom zostrihu, môže tento aparát použiť akceptorové miesto zostrihu na odstránenie intrónu. Akceptorové miesta zostrihu vykazujú charakteristické sekvencie, ktoré sa dajú znázorniť takto: YYYYYYYYYYNYAG, kde Y predstavuje akýkoľvek pyrimidín a N predstavuje akýkoľvek nukleotid (Jackson I.J., Nucleic Acids Research 19: 3715 až 3798 (1991)).

Intrón je definovaný ako sekvencia jedného alebo viacerých nukleotidov ležiaca medzi dvoma exónmi, ktorá sa pri zostrihu odstráni z prekurzorovej molekuly RNA za vzniku mRNA.

Regulačná sekvencia je napríklad operatívne pripojená k ATG štart kodónu, ktorý iniciuje transláciu. K regulačnej sekvencii a ATG štart kodónu je poprípade operatívne pripojené miesto CAP (špecifické miesto iniciácie mRNA), ktoré je pripojené k regulačnej oblasti a je touto oblasťou využívané. Alternatívne nie je miesto CAP, ktoré je pripojené k regulačnej sekvencii a je

touto sekvenciou využívané, súčasťou targetingového konštruktu a transkripčný aparát potom definuje nové miesto CAP. Vo väčšine génov leží miesto CAP obvykle približne vo vzdialenosti 25 nukleotidov od TATA Box ku koncu 3'. Podľa jednej realizácie je donorové miesto zostrihu umiestené v tesnom susedstve s ATG, napríklad keď prítomnosť jedného alebo viacerých nukleotidov nie je nutná, aby bol exogénny exón v rámci s druhým exónom targetovaného génu. Prednostne sa bezprostredne vedľa ATG na jeho 3' strane umiesti DNA kódujúca jednu alebo viac aminokyselín alebo časti aminokyseliny v rámci s kódujúcou sekvenciou targetovaného génu. V takejto realizácii je donorové miesto zostrihu umiestené bezprostredne vedľa kódujúcej DNA na jej 3' strane.

Pod pojmom "operatívne pripojený" alebo "funkčne umiestený" sa rozumie konfigurácia, v ktorej sú exogénne regulačné sekvencie, exón, donorové miesto zostrihu a poprípade sekvencie a akceptorové miesto zostrihu vhodne targetované v takej polohe, vzhľadom na endogénny gén, aby regulačný prvok riadil produkciu primárneho RNA transkriptu, ktorý iniciuje v mieste CAP (poprípade zahrnutom v targetingovom konštrukte) a zahrnuje sekvencie zodpovedajúce exónu a donorovému miestu zostrihu targetingového konštruktu, DNA ležiacej pred regulačnou oblasťou (ak je prítomná) endogénneho génu, 5' neprepísanú oblasť (ak je prítomná) endogénneho génu, exóny a intróny (ak sú prítomné) endogénneho génu. V operatívne pripojenej konfigurácii riadi donorové miesto zostrihu targetingového konštruktu zostrih k akceptorovému miestu zostrihu lemujúcemu jeden z exónov endogénneho génu tak, že úplne zostrihnutý maturovaný transkript môže produkovať požadovaný protein. V jednej realizácii je akceptorové miesto zostrihu endogénne, takže zostrih je riadený k endogénnemu exónu, napríklad endogénnemu génu. V inej realizácii, v ktorej je akceptorové miesto zostrihu včlenené do targetingového konštruktu, dochádza pri zostrihu k odstráneniu intrónu zavedeného targetingovým konštruktom.

Použitá kódujúca DNA (napríklad exón 1 targetingového

konštruktu) môže poprípade kódovať jednu alebo viac aminokyselín a/alebo časť aminokyseliny, ktoré sú rovnaké ako aminokyseliny endogénneho proteínu. Použitá kódujúca sekvencia DNA môže napríklad zodpovedať prvému exónu génu, ktorý je predmetom záujmu. Kódujúca DNA môže alternatívne kódovať jednu alebo viac aminokyselín alebo časť aminokyseliny, ktoré sa líšia od prvého exónu proteínu, ktorý je predmetom záujmu. Posledná uvedená realizácia je veľmi zaujímavá, ak aminokyseliny prvého exónu proteínu, ktorý je predmetom záujmu, rozhodujúcim spôsobom neovplyvňujú účinnosť alebo účinnosti tohoto proteínu. Ak sa napríklad skonštruujú fúzie k endogénnemu génu hEPO, môžu sa použiť sekvencie kódujúce prvé exón hGH. V tomto príklade fúzia exónu 1 hGH k exónu 2 hEPO má za následok vytvorenie hybridného signálneho peptidu, ktorý je funkčný. V príbuzných konštruktoch sa môže použiť akýkoľvek exón humánneho alebo nehumánneho pôvodu, v ktorom kódované aminokyseliny nezabraňujú funkciu hybridného signálneho peptidu. V podobnej realizácii sa táto techniky tiež môže použiť na opravu mutácie zistenej v cieľovom géne.

Ak je požadovaným produktom fuzionovaný proteín endogénneho proteínu a kódujúcich sekvencií targetingového konštruktu, obsahuje exogénna kódujúca DNA zavedená do buniek spôsobom podľa vynálezu, DNA, ktorá kóduje jeden alebo viac exónov alebo sekvenciu cDNA zodpovedajúcu translačnému alebo transkripčnému produktu, ktorý má byť fuzionovaný k produktu endogénneho targetovaného génu. V tejto realizácii sa targeting používa na prípravu chimerických alebo multifunkčných proteínov, v ktorých sú kombinované štruktúrne, enzymatické vlastnosti alebo väzbové vlastnosti pre ligand alebo receptor z dvoch alebo viacerých proteínov do jedného polypeptidu. Tak napríklad exogénna DNA môže kódovať kotvu (anchor) k membráne pre targetovaný proteín alebo signálny peptid s cieľom zaistenia alebo zlepšenia bunkovej sekrécie, vedúcej sekvencie, enzymatickej oblasti, oblasti transmembránovej domény, oblasti viažúcej ko-faktor alebo inej funkčnej oblasti. Ako príklady proteínov, ktoré normálne nie sú vylučované, ale ktoré by bolo možné fuzionovať k signálnemu proteínu s cieľom zaistenia sekrécie, je možné uviesť

dopa-dekarboxylázu, transkripčné regulačné proteíny, alfa--galaktozidázu a tyrozín hydroxylázu.

Ak prvý exón targetovaného génu zodpovedá nekódujúcej oblasti (napríklad prvý exón génu hormónu stimulujúceho folikuly beta (FSHbeta)), exogénna ATG nie je nutná a prednostne sa vypúšťa.

DNA konštruktu je možné získať zo zdrojov, v ktorých sa nachádza v prírode alebo je možné ju produkovať pomocou techník génového inžinierstva alebo syntetických postupov.

Targetovaný gén a výsledný produkt

Konštrukt DNA po transfekcii do buniek, ako sú primárne, sekundárne alebo imortalizované bunky, môže regulovať expresiu požadovaného produktu, napríklad pokiaľ ide o aktívne či funkčné časti proteínu alebo RNA. Produktom môže byť napríklad hormón, cytokín, antigén, protilátka, enzým, zrážací faktor, transportný proteín, transkripčný faktor, antimediátorová RNA alebo ribozym. Prídavne môže byť produktom proteín alebo nukleová kyselina, ktorá sa nevyskytuje v prírode, tj. fuzionovaný proteín alebo nukleová kyselina.

Pomocou spôsobu popísaného v tomto texte je možné produkovať jeden alebo viac terapeutických produktov, ako je erytropoetín, kalcitonín, rastový hormón, inzulín, inzulinotropín, rastové faktory podobné inzulínu, paratyroidný hormón, interferón beta a interferón beta, faktory rastov nervov, FSHbeta, TGF-beta, faktor nekrózy nádorov, glukagón, faktor-2 rastu kostí, faktor-7 rastu kostí, TSH-beta, interleukín 1, interleukín 2, interleukín 3, interleukín 6, interleukín 11, interleukín 12, CSF-granulocyt, CSF-makrofág, CSF-granulocyt/makrofág, imunoglobulíny, katalytické protilátky, proteín kináza C, glukocerebrozidáza, superoxid dismutáza, aktivátor tkanivového plazminogénu, urokináza, antitrombín III, DNAáza, alfa-galaktozidáza, tyrozín hydroxyláza, zrážací faktor krvi V, zrážací faktor krvi VII, zrážací faktor

krvi VIII, zrážací faktor krvi IX, zrážací faktor krvi X, zrážací faktor krvi XIII, apolipoproteín E alebo apolipoproteín A-I, globíny, receptor nízkohustotného lipoproteínu, receptor IL-2, antagonisti IL-2, antitrypsín alfa-1, modifikátory imunitnej odpovede a rozpustný CD4.

Selektovateľné markery a amplifikácia

Identifikácia targetingu môže byť uľahčená použitím jedného alebo viacerých selektovateľných markerových génov. Tieto markery je možné včleniť do targetingového konštruktu alebo môžu byť prítomné v rôznych konštruktoch.

Selektovateľné markery je možné rozdeliť do dvoch kategórií: pozitívne a negatívne selektovateľné (inými slovami, markery buď pre pozitívnu selekciu alebo negatívnu selekciu). Pri pozitívnej selekcii sú bunky exprimujúce pozitívne selektovateľný marker schopné prežiť spracovanie selekčným činidlom, ako je neo, xantín-guanín fosforibozyl transferáza (gpt), dhfr, adenozín deamináza (ada), puromycín (pac), hygromycín (hyg), CAD kódujúci karbamyl fosfát syntázu, aspartát transkarbamylázu a dihydro-orotáza glutamín syntetázu (GS), "multidrug rezistencia 1" (mdr1) a histidín D (hisD). To umožňuje selekciu buniek, v ktorých je targetingový konštrukt integrovaný do genómu hostiteľskej bunky. Pri negatívnej selekcii sú bunky exprimujúce negatívne selektovateľný marker za prítomnosti selekčného činidla zničené.

Identifikáciu targetingu je možné uľahčiť použitím jedného alebo viacerých markérových génov vykazujúcich vlastnosť negatívnej selekcie. Pritom je negatívny selektovateľný markér pripojený k exogénnej DNA, ale v takej konfigurácii, že negatívne selektovateľný markér lemuje targetingovú sekvenciu a tak, že správna homológna kombinácia so sekvenciami v genóme hostiteľskej bunky nemá za následok stabilnú integráciu negatívne selektovateľného markera (Mansour S.L. et al., Nature 336: 348 až 352 (1988)). Markery užitočné pre tento cieľ zahrnujú gén tymidín

kinázy (TK) z vírusu Herpes simplex alebo bakteriálny gén gpt.

Do primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek je možné zaviesť rôzne selektovateľné markery. Tak napríklad je možné použiť selektovateľný marker udeľujúci selektovateľný fenotyp, ako je rezistencia voči liečivu, nutričná auxotrofia, rezistencia voči cytotoxickému činidlu alebo expresia povrchového proteínu. Selektovateľné markerové gény, ktoré sa dajú použiť, zahrnujú: neo, gpt, dhfr, ada, pac, hyg, CAD, GS, mdr1, a hisD. Udelený selektovateľný fenotyp umožňuje identifikovať a izolovať recipientné bunky.

Amplifikovateľné gény kódujúce selektovateľné markery (napríklad ada, GS, dhfr a multifunkčný gén CAD) majú prídavnú vlastnosť spočívajúcu v umožnení selekcie buniek obsahujúcich amplifikovateľné kópie selektovateľného markera vloženého do genómu. Túto realizáciu zaisťuje mechanizmus pre podstatné zvýšenie kópií susedného alebo pripojeného génu, ktorého amplifikácia je žiadúca. Je tiež možné použiť množstvo mutovaných verzií týchto sekvencií vykazujúcich zlepšené selekčné vlastnosti a iných amplifikovateľných sekvencií.

Poradie zložiek v konštrukte DNA sa môže meniť. Ak je konštruktom kružnicový plazmid, môže byť poradie prvkov vo výslednej štruktúre takéto: targetingová sekvencia - plazmidová DNA (skladajúca sa zo sekvencií použitých pre selekciu a/alebo replikáciu targetingového plazmidu v mikrobiálnom alebo inom vhodnom hostiteľovi) - selektovateľný marker (markery) - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu. Plazmid obsahujúci targetingovú sekvenciu a exogénne prvky DNA sa prednostne štiepi reštrikčným enzýmom, ktorý raz alebo viackrát rozštiepi targetingovú sekvenciu za vzniku lineárnej lebo prerušovanej molekuly pred zavedením do recipientnej bunky, takže voľné konce DNA zvyšujú početnosť požadovanej homológnej rekombinácie charakterizovanej v tomto popise. Voľné konce DNA je okrem toho možné spracovať exonukleázou za vzniku vyčnievajúcich 5' alebo 3' previsnutých jednoreťazcových koncov

DNA s cieľom zvýšenia početnosti požadovanej homológnej rekombinácie. V tejto realizácii má homológna rekombinácia medzi targetingovou sekvenciou a bunkovým cieľom (target) za následok vznik dvoch kópií targetingových sekvencií lemujúcich prvky obsiahnuté v zavedenom plazmide.

Ak je konštrukt lineárny, môže byť poradie napríklad takéto: prvá targetingová sekvencia - selektovateľný marker - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu - druhá targetingová sekvencia, alebo alternatívne prvá targetingová sekvencia - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu - DNA kódujúci selektovateľný marker - druhá targetingová sekvencia. Bunky, ktoré konštrukt stabilne integrujú, prežijú spracovanie selekčným činidlom; podmnožinou stabilných transfekovaných buniek budú homológne rekombinantné bunky. Homológne rekombinantné bunky je možné identifikovať pomocou rôznych techník, ako je PCR, hybridizácia Southern a fenotypový screening.

V inej realizácii môže byť poradie zložiek konštruktu takéto: prvá targetingová sekvencia - selektovateľný marker - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu - intrón - akceptorové miesto zostrihu - druhá targetingová sekvencia.

Alterantívne môže byť poradie zložiek v konštrukte DNA napríklad takéto: prvá targetingová sekvencia - selektovateľný marker 1 - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu - druhá targetingová sekvencia - selektovateľný marker 2 alebo alternatívne tiež prvá targetingová sekvencia - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu - selektovateľný marker 1 -druhá targetingová sekvencia - selektovateľný marker 2. V poslednej uvedenej realizácii vykazuje selektovateľný marker 2 vlastnosti vhodné pre negatívnu selekciu. Génový produkt selektovateľného markera 2 je teda možné podrobiť selekcii rastom na vhodnom upravenom médiu obsahujúcom činidlo (obvykle liečivo alebo jeho metabolitový analóg), ktoré zabíja bunky exprimujúce selektovateľný marker 2. Rekombinácia medzi targetingovými sekvenciami lemujúcimi selektovateľný marker 1 a homologickými

sekvenciami v genóme hostiteľskej bunky má za následok cielenú integráciu selektovateľného markera 1, pričom selektovateľný marker 2 integrovaný nie je. Takýmito rekombináciami vznikajú bunky, ktoré sú stabilne transfekované selektovateľným markerom 1, ale nie sú stabilne transfekované selektovateľným markerom 2. Selekciu buniek je možné v tomto prípade uskutočniť na základe rastu na médiu obsahujúcom selekčné činidlo, ktoré umožňuje pozitívnu selekciu na selektovateľný marker 1 a selekčné činidlo, ktoré umožňuje negatívnu selekciu na selektovateľný marker 2.

Konštrukt DNA môže tiež obsahovať pozitívne selektovateľný marker umožňujúci selekciu buniek obsahujúcich amplifikované kópie tohoto markera. Amplifikácie takého markera má za následok ko-amplifikáciu lemujúcich sekvencií DNA. V tejto realizácii obsahuje konštrukt jednotlivé zložky napríklad v tomto poradí: prvá targetingová sekvencia - amplifikovateľný pozitívne selektovateľný marker - druhý selektovateľný marker (prípadný) - regulačné sekvencie - exón - donorové miesto zostrihu - druhá targetingová sekvencia DNA.

V tejto realizácii môže byť aktivovaný gén ďalej amplifikovaný včlenením selektovateľného markerového génu, ktorý má tu vlastnosť, že bunky obsahujúce amplifikované kópie tohoto selektovateľného markerového génu môžu byť podrobené selekcii pomocou kultivácie týchto buniek za prítomnosti vhodného selekčného činidla. Aktivovaný endogénny gén bude amplifikovaný zároveň s amplifikáciou selektovateľného markerového génu. Bunky obsahujúce mnoho kópií aktivovaného endogénneho génu môžu produkovať vysokú hladinu požadovaného proteínu a sú užitočné pre produkciu proteínu in vitro a génovú terapiu.

V akejkoľvek realizácii nemusia selektovateľné a amplifikovateľné markerové gény ležať vo vzájomne tesnom susedstve.

Konštrukt DNA môže popripade obsahovať bakteriálny začiatok replikácie a bakteriálne markery rezistencie voči antibiotiku

alebo iné selektovateľné markery, ktoré umožňujú propagáciu plazmidu v baktériách alebo inom vhodnom klonovacom/hostiteľskom systéme vo veľkom rozsahu. Konštrukt DNA zahrnujúci DNA kódujúcu selektovateľný marker spolu s prídavnými sekvenciami, ako je promótor a spoje zostrihu, sa môže použiť na udelenie selektovateľného fenotypu transfekovaným bunkám (napríklad plazmid pcDNEO, ktorý je schematicky znázornený na obr. 4). Takýto konštrukt DNA môže byť kotransfekovaný do primárnych alebo sekundárnych buniek spolu s targetingovou sekvenciou DNA použitím spôsobov uvedených v tomto popise.

Transfekcia a homológna rekombinácia

Pri spôsobe podľa vynálezu sa konštrukt zavádza do bunky, ako primárnej, sekundárnej alebo imortalizovanej bunky, vo forme jedného konštruktu DNA alebo separátnych sekvencií DNA, ktoré sa zabudujú do chromozomálnej alebo jadrovej DNA transfekovanej bunky.

Targetingový konštrukt DNA, s obsahom targetingovej sekvencie, regulačnej sekvencie, exónu, donorového miesta zostrihu a selektovateľného markerového génu alebo génov sa môže zavádzať do buniek v podobe jediného konštruktu DNA alebo v podobe separátnych konštruktov. Celková dĺžka konštruktu DNA sa bude meniť v závislosti od počtu zložiek (napríklad targetingových sekvencií, regulačných sekvencií, exónov, selektovateľných markerových génov a iných prvkov) a ich dĺžky. Celková dĺžka konštruktu bude obvykle aspoň asi 200 nukleotidov. DNA môže byť ďalej zavádzaná v lineárnej, dvojreťazcovej (s alebo bez jednoreťazcových oblastí na jednom alebo obidvoch koncoch), jednoreťazcovej alebo kružnicovej podobe.

Ktorýkoľvek z typov konštruktov podľa vynálezu sa potom zavádza do bunky s cieľom dosiahnutia transfekcie. Transfekovaná bunka sa uchováva pri podmienkach umožňujúcich homológnu rekombináciu, ktoré sú známe v tomto obore (Capecchi M.R., Science 244: 1288 až 1292 (1989)). Ak sa homológne rekombinantná

bunka uchováva pri podmienkach dostačujúcich pre transkripciu DNA, regulačná oblasť zavádzaná targetingovým konštruktom, ako je to v prípade promótora, aktivuje transkripciu.

Konštrukty DNA je možné zavádzať do buniek pomocou rôznych fyzikálnych alebo chemických metód, ako je elektroporácia, mikroinjekcia, bombardovanie mikroprojektilmi, zrážanie fosforečnanom vápenatým a transfekcia sprostredkovaná lipozómami, polybrénom alebo DEAE-dextránom. Alternatívne je možné na zavádzanie DNA použiť infekčné vektory, ako sú retrovírusové vektory a vektory na báze Herpes, Adenovírus, Adenovírus-asociované vektory a vektory na báze vírusu príušnic a poliovírusu.

Targetingovú DNA je poprípade možné zavádzať do bunky v podobe dvoch alebo viacerých oddelených DNA fragmentov. V prípade, že sa použijú dva fragmenty, majú tieto dva fragmenty spoločnú sekvenčnú homológiu DNA (dochádza k prekrývaniu pri 3' konci jedného fragmentu a 5' konci druhého fragmentu, pričom jeden z týchto fragmentov nesie prvú targetingovú sekvenciu a druhý nesie druhú targetingovú sekvenciu). Pri zavádzaní do bunky môže u týchto dvoch fragmentov prebehnúť homológna rekombinácia za vzniku jediného fragmentu, v ktorom prvá a druhá targetingová sekvencia lemuje oblasť prekrývania medzi dvoma pôvodnými fragmentmi. Vzniknutý fragment má potom vhodnú podobu pre homológnu rekombináciu s cieľovými sekvenciami bunky. Môžu sa použiť viac ako dva fragmenty, ktoré sú zostrojené tak, aby u nich prebehla vzájomná homológna rekombinácia, ktorej konečným výsledkom je produkt vhodný pre homológnu rekombináciu s cieľovými sekvenciami bunky, ako je to popísané vyššie.

Homológne rekombinantné bunky

Targeting má za následok vloženie regulačnej sekvencie targetingového konštruktu, umiestenie endogénneho génu pod ich kontrolou (napríklad vložením buď promótora alebo enhancéra alebo obidvoch týchto prvkov pred (proti smeru expresie) endogénny gén

alebo regulačnú oblasť). Targeting môže mať poprípade súčasne za následok deléciu endogénneho regulačného prvku, ako je delécia tkanivového špecifického negatívneho regulačného prvku. Pri targetingu môže dôjsť k nahradeniu existujúceho prvku. Tkanivovo špecifický enhancér môže byť napríklad nahradený enhancérom, ktorý vykazuje širšiu alebo odlišnú špecificitu vzhľadom na typ bunky ako prvky, ktoré sa vyskytujú v prírode alebo ktorý vykazuje odlišný profil regulácie alebo indukcie v porovnaní s príslušnou netransfekovanou bunkou. Pri tejto realizácii dochádza k delécii prírodných sekvencií a pridaní nových sekvencií. Alternatívne sa pri targetingu endogénne regulačné prvky neodstraňujú ani nenahradzujú, ale sa rozbijú alebo zneschopnia, ako je to pri targetingu exogénnych sekvencií do endogénnych regulačných prvkov.

Po zavedení DNA do bunky sa bunka uchováva pri podmienkach, ktoré sú vhodné pre priebeh homológnej rekombinácie medzi genómovou DNA a časťou zavedenej DNA; tieto podmienky sú v tomto obore známe (Capecchi M.R., Science 244: 1288 až 1292 (1989)).

Homológna rekombinácia medzi genómovou DNA a zavedenou DNA má za následok vznik homológne rekombinantnej bunky, ako napríklad hubovej, rastlinnej alebo živočíšnej bunky, predovšetkým primárnej, sekundárnej alebo imortalizovanej ľudskej alebo inej cicavčej bunky, v ktorej sú sekvencie modifikujúce expresiu endogénneho génu operatívne pripojené k endogénnemu génu kódujúcemu produkt, za vzniku novej transkripčnej jednotky s expresným a/alebo kódujúcim potenciálom, ktorý sa odlišuje od potenciálu endogénneho génu.

Vynález sa predovšetkým týka homológne rekombinantnej bunky zahrnujúcej regulačné sekvencie a exón lemovaný donorovým miestom zostrihu, kde tieto prvky sú zavedené na dopredu určené miesto targetingom konštruktu DNA a sú operatívne pripojené k druhému exónu endogénneho génu. Ku ktorémukoľvek exónu endogénneho génu môže byť poprípade operatívne pripojených viac exogénnych exónov (kódujúcich alebo nekódujúcich) a intrónov. Výsledné homológne

rekombinantné bunky sa kultivujú pri podmienkach umožňujúcich prípadnú selekciu na amplifikáciu DNA kódujúcu amplifikovateľný marker a novú transkripčnú jednotku. Či už sa amplifikácia uskutočňuje alebo nie, bunky produkované pomocou tejto metódy je možné kultivovať pri podmienkach, ktoré sú v tomto obore známe a ktoré sú vhodné pre expresiu proteínu. Tak sa dá produkovať protein in vitro alebo je možné bunky použiť pre in vivo dodávku terapeutického proteínu (tj. pre génovú terapiu).

Pod označením "primárne bunky" sa v tomto popise rozumejú bunky prítomné v suspenzii buniek izolovaných z tkanivového zdroja stavovcov (pred tým, ako sa nanesú na médium, tj. ako sa pripoja k substrátu pre tkanivovú kultúru umiestenému v miske alebo v banke), bunky prítomné v explantáte získanom v tkaniva. Predpokladom je, že obidva vyššie uvedené typy buniek sa pripájajú k substrátu prvý raz. Tiež sa pod týmto označením rozumejú bunkové suspenzie získané z buniek nanesených na médium.

Pod označením "sekundárne bunky" alebo "bunkový kmeň" sa rozumejú bunky na všetkých nasledujúcich stupňoch kultivácie. Ak sa teda prvý raz primárna bunka pred tým nenanesená na substrát odstráni z kultivačného substrátu a opäť sa nanesie na substrát (pasážovanie), označuje sa názvom "sekundárna bunka", pričom tento názov sa používa aj pre všetky bunky v nasledujúcich pasážach. Sekundárne bunky sú bunkové kmene skladajúce sa zo sekundárnych buniek, ktoré boli raz alebo viackrát pasážované. Bunkový kmeň sa skladá zo sekundárnych buniek, ktoré 1) boli raz alebo viackrát pasážované, 2) vykazujú konečný počet stredných zdvojnásobení populácie v kultúre, 3) vykazujú vlastnosti kontaktne inhibovaného rastu závislého od zakotvenia (závislosť od zakotvenia sa nevzťahuje na bunky, ktoré sú propagované v suspenznej kultúre) a 4) nie sú imortalizované.

"Imortalizované bunky" sú bunkové línie (na rozdiel od bunkových kmeňov, keďže označenie "kmeň" je rezervované pre primárne a sekundárne bunky), ktorých kritickým znakom je, že vykazujú zjavne neobmedzenú životnosť v kultúre.

Bunky zvolené pre spôsob podľa vynálezu môžu patriť medzi nasledujúce štyri typy alebo kategórie: 1) bunky, ktoré v tom stave, v akom sa získajú, neprodukujú alebo neobsahujú proteín alebo produkt (ako proteín, ktorý nie je normálne exprimovaný bunkou alebo fuzionovaný proteín, ktorý sa normálne v prírode nevyskytuje), 2) bunky, ktoré produkujú alebo obsahujú proteín alebo produkt, ale v inom množstve, ako je požadované (ako napríklad v množstve nižšom, ako je fyziologicky normálna nižšia hladina v bunkách v tom stave, v akom sa získajú), 3) bunky, v tom stave, v akom sa získajú, ktoré produkujú proteín alebo produkt na fyziologicky normálnej úrovni, ale v ktorých má byť obsah proteínu alebo produktu alebo ich produkcia zvýšená a 4) bunky, v ktorých je žiadúce zmeniť profil regulácie alebo indukcie génu kódujúceho proteín.

Primárne, sekundárne a imortalizované bunky, ktoré majú byť transfekované spôsobom podľa vynálezu, je možné získať z rôznych tkanív a zahrnujú všetky typy buniek, ktoré sa dajú uchovávať v kultúre. Z primárnych a sekundárnych buniek, ktoré sa dajú transfekovať spôsobom podľa vynálezu, je možné napríklad uviesť fibroblasty, keratinocity, epitelové bunky (napríklad bunky epitelu mliečnej žľazy a bunky črevného epitelu), gliálne bunky, nervové bunky, tvarované krvné prvky (napríklad lymfocyty a bunky kostnej drene), svalové bunky a prekurzory týchto typov somatických buniek. Ak sa majú homológne rekombinantné bunky použiť pre génovú terapiu, prednostne sa primárne bunky získavajú od indivídua, ktorému sa majú transfekované primárne alebo sekundárne bunky podať. Primárne bunky je však možné získať aj od donora (odlišného od recipienta) rovnakého druhu.

Homológne rekombinantné imortalizované bunky je tiež možné produkovať spôsobom podľa vynálezu a používať pre produkciu proteínu alebo génovú terapiu. Ako neobmedzujúce príklady imortalizovaných ľudských bunkových línií, ktoré sú užitočné pre produkciu proteínu alebo génovú terapiu spôsobom podľa vynálezu, je možné uviesť bunky HT1080 (ATCC CCL 121), bunky HeLA (ATCC CCL

2, 2.1 a 2.2), bunky rakoviny prsníka MCF-7 (ATCC BTH 22), leukemické bunky K-562 (ATCC CCL 243), bunky karcinómu KB (ATCC CCL 17), bunky karcinómu vaječníkov 2780AD (Van der Blick, A.M. et al., Cancer Res., 48: 5927-5932 (1988)), Rajiho bunky (ATCC CCL 86), Jurkatove bunky (ATCC TIB 152), Namalwove bunky (ATCC CRL 1432), bunky HL-60 (ATCC CCL 240), Daudiho bunky (ATCC CCL 213), bunky RPMI 8226 (ATCC CCL 155), bunky U-937 (ATCC CRL 1593), Bowesove bunky melanómu (ATCC CRL 9607), bunky sublínie WI-38VA13 2R4 (ATCC CLL 75.1) a bunky MOLT-4 (ATCC CRL 1582), ako aj heterohybridomálne bunky produkované pri fúzii ľudských buniek a buniek iného druhu. Takisto je možné použiť kmene sekundárnych ľudských fibroblastov, ako WI-38 (ATCC CCL 75) a MRC-5 (ATCC CCL 171).

Pre in vitro produkciu proteínu alebo pre genómovú terapiu je možné ďalej použiť primárne, sekundárne alebo imortalizované ľudské bunky alebo primárne, sekundárne alebo imortalizované bunky iných druhov, ktoré vykazujú vlastnosti génovej amplifikácie in vitro.

Spôsob konverzie génu na kópiu cDNA

Tento vynález sa tiež týka spôsobu, pri ktorom sa homológna rekombinácia používa pre konverziu génu na kópiu cDNA (génovú kópiu, ktorá nemá intróny). Kópia cDNA sa môže preniesť do kvasinky alebo baktérie pre in vitro produkciu proteínov alebo sa môže vložiť do cicavčej bunky pre in vitro alebo in vivo produkciu proteínu. Ak sa má cDNA preniesť do mikrobiálnych buniek, zavádzajú sa dva konštrukty DNA obsahujúce targetingové sekvencie homológnou rekombináciou a to jeden konštrukt pred (proti smeru expresie) a druhý konštrukt za (v smere expresie) ľudským génom kódujúcim terapeutický proteín.

Tak napríklad sekvencie zavádzané pred (proti smeru expresie) gén zahrnujú sekvencie DNA, ktoré sú homológne k sekvenciám DNA v alebo pred DNA kódujúcu prvú aminokyselinu maturovaného upraveného terapeutického proteínu; retrovírusové

dlhodobé repetície (long time repeat - LTR; sekvencie kódujúce marker pre selekciu v mikrobiálnych bunkách; regulačný prvok, ktorý funguje v mikrobiálnych bunkách a DNA kódujúcu vedúci peptid, ktorý zaisťuje sekréciu z mikrobiálnych buniek s donorovým miestom zostrihu. Sekvencie zavádzané pred (proti smeru expresie) gén sa zavádzajú do blízkosti alebo pred genómovú DNA kódujúcu prvú aminokyselinu maturovaného upraveného terapeutického proteínu.

Sekvencie zavádzané za (v smere expresie) gén zahrnujú sekvencie DNA homológne k sekvenciám genómovej DNA v alebo za DNA kódujúcu poslednú aminokyselinu maturovaného upraveného proteínu; mikrobiálne sekvencie terminácie transkripcie; sekvencie schopné riadiť replikáciu DNA v mirkobiálnych bunkách a retrovírusovú LTR. Sekvencie zavádzané za gén sa zavádzajú do susedstva alebo za DNA kódujúcu stop kodón maturovaného upraveného terapeutického proteínu.

Po zavedení týchto dvoch konštruktov DNA do buniek sa výsledné bunky uchovávajú pri podmienkach vhodných pre homológnu rekombináciu medzi zavádzanou DNA a genómovou DNA za vzniku homológne rekombinantných buniek. Jeden alebo obidva konštrukty DNA môžu poprípade kódovať jeden alebo viac markerov pre pozitívnu alebo negatívnu selekciu buniek obsahujúcich daný konštrukt DNA. Selekčný stupeň je možné pripojiť k spôsobu potom, ako je jeden alebo obidva konštrukty DNA zavedený do buniek.

Alternatívne môžu byť ako sekvencie kódujúce marker pre selekciu v mikrobiálnych bunkách, tak aj sekvencie schopné riadiť replikáciu DNA v mikrobiálnych bunkách, prítomné buď v konštrukte zavádzanom targetingom pred (proti smeru expresie) alebo za (v smere expresie) ľudský gén kódujúci terapeutický proteín, alebo môže byť marker pre selekciu v mikrobiálnych bunkách prítomný v konštrukte zavádzanom targetingom za ľudský gén kódujúci terapeutický proteín a sekvencie schopné riadiť replikáciu DNA v mikrobiálnych bunkách môžu byť prítomné v targetingovom konštrukte zavádzanom pred tento gén.

Homológne rekombinantné bunky sa potom kultivujú pri podmienkach vhodných pre LTR riadenú transkripciu, úpravu a reverznú transkripciu RNA produktu génu kódujúceho terapeutický proteín. Produktom reverznej transkripcie je konštrukt DNA obsahujúci bezintrónovú kópiu DNA, ktorá kóduje terapeutický proteín, ktorý je operatívne pripojený k sekvenciám DNA obsahujúcim dva exogénne konštrukty DNA popísanej vyššie. Bezintrónový konštrukt DNA produkovaný týmto spôsobom sa potom zavedie do mikrobiálnej bunky. Potom sa mikrobiálna bunka kultivuje pri podmienkach vhodných pre expresiu a sekréciu terapeutického proteínu.

In vivo produkcia proteínu

Homológne rekobminantné bunky podľa vynálezu sú užitočné ako populácie homológne rekombinantných bunkových línií, populácie homológne rekombinantných primárnych alebo sekundárnych buniek, homológne rekombinantné klonálne bunkové kmene alebo línie, homológne rekombinantné heterogénne bunkové kmene alebo línie a zmesi buniek, v ktorých je prítomná aspoň jedna reprezentatívna bunka z jednej z štyroch vyššie uvedených kategórií homológne rekombinantných buniek.

Takéto bunky je možné použiť v dodávkovom systéme na liečenie jednotlivca s abnormálnym alebo nežiadúcim stavom, ktorý responduje na dodávku terapeutického produktu, ktorým je buď 1) terapeutický proteín (napríklad proteín, ktorý chýba, alebo ktorý je produkovaný v množstve nižšom ako zodpovedá fyziologickým potrebám jendotlivca, defektný alebo neúčinne alebo nevhodne utilizovaný v jednotlivcovi; proteín s novými funkciami, (ako s enzymatickými alebo transportnými funkciami) alebo 2) terapeutická nukleová kyselina (napríklad RNA inhibujúca expresiu génu alebo vykazujúca vlastnú enzymatickú aktivitu).

Pri tomto spôsobe, ktorým sa dodáva terapeutický proteín alebo nukleová kyselina, sa môžu indivíduu, u ktorého má byť

liečený abnormálny alebo nežiadúci stav, alebo u ktorého má byť takému stavu predchádzané, podávať homológne rekombinantné primárne bunky, klonálne bunkové kmene alebo heterogénne bunkové kmene v množstve postačujúcom a takou cestou, aby došlo k expresii proteínu alebo exogénnej DNA na fyziologicky relevantnej úrovni alebo aby bol protein alebo exogénna DNA urobený na fyziologicky relevantnej úrovni dostupným. Pod označením "fyziologicky relevantná úroveň" sa rozumie úroveň, ktorá sa buď blíži úrovni, na ktorej je produkt v tele normálne produkovaný alebo úroveň zaisťujúca zlepšenie abnormálnych alebo nežiadúcich stavov.

Pri jednej realizácii tohoto vynálezu, ktorá je vysvetlená v tomto popise, sa homológne rekombinantné imortalizované bunkové línie, ktoré majú byť podané, môžu uzatvoriť v jednom alebo viacerých polorozpustných bariérových zariadeniach. Priepustnosť zariadení je taká, že sa bunkám zabráni opustiť zariadenie po implantácii do živočícha, ale terapeutický produkt môže voľne odchádzať z bariérového zariadenia a vstupovať do priestoru obklopujúceho implantát alebo do systémovej cirkulácie. S cieľom dosiahnutia terapeutického úžitku je možné človeku napríklad dodávať hGH, hEPO, ľudský inzulinotropín, hGM-CSF, hG-CSF, ľudský alfa-interferón alebo ľudský FSHbeta.

Bariérové zariadenie je veľmi užitočné a umožňuje s cieľom liečenia choroby alebo zvieraťa alebo dosiahnutia poľnohospodárskeho úžitku (tj. produkcie mäsa a mlieka) implantovať homológne rekombinantné imortalizované bunky, homológne rekombinantné bunky z iného druhy (homológne rekombinantné xenogénne bunky) alebo bunky pochádzajúce z donora, ktorý s recipientom nie je histologicky kompatibilný (homogénne rekombinantné alogénne bunky). Bariérové zariadenie tiež umožňuje účelnú krátkodobú (tj. transientnú) terapiu tým, že sú buky ľahko dostupné a môžu sa odstrániť, keď je potrebné liečebný režim z dajakého dôvodu zastaviť.

Pre tento cieľ je možné používať množstvo syntetických,

polosyntetických alebo prírodných filtračných membrán. Ako neobmedzujúce príklady materiálov pre takéto membrány je možné uviesť celulózu, acetát celulózy, nitrocelulózu, polysulfón, polyvinyléndifluorid, polyvinylchlorid a polyméry derivátov vinylchloridu. Bariérové zariadenie umožňuje použiť pre génovú terapiu človeka primárne, sekundárne alebo imortalizované bunky pochádzajúce z iných druhov.

In vitro produkcia proteínu

Homológne rekombinantné bunky z človeka alebo iného druhu je podľa tohoto vynálezu možné použiť tiež pre in vitro produkciu proteínu. Bunky sa uchovávajú pri podmienkach známych v tomto obore, pri ktorých dochádza k expresii proteínu. Proteíny exprimované pomocou popísaných postupov je možné purifikovať z bunkového lyzátu alebo supernatantu a tak sa získa čistý požadovaný protein. Proteíny vyrábané pomocou tohoto postupu zahrnujú terapeutické proteíny, ktoré je možné dodávať človeku alebo inému zvieraťu konvenčnými farmaceutickými cestami, napríklad orálnym, intravenóznym, intramuskulárnym, intranazálnym alebo subkutánnym podávaním. Takéto proteíny zahrnujú hGH, hEPO, ľudský inzulinotropín, hGM-CSF, hG-CSF, ľudský alfa-interferón a ľudský FSHbeta.

Použitými bunkami môžu byť imortalizované, primárne alebo sekundárne bunky. Použitie buniek z iných dôvodov môže byť žiadúce v prípadoch, v ktorých sú bunky z iného zdroja ako človeka výhodné pre účely produkcie proteínu, alebo terapeuticky alebo obchodne užitočné. Tak napríklad sa účelne používajú bunky lososa pre produkciu lososieho kalcitonínu, bunky získané z ošípanej pre produkciu bravčového inzulínu a bunky hovädzieho dobytka pre produkciu hovädzieho rastového hormónu.

Výhody

Spôsoby, konštrukty DNA, bunky a výsledné proteíny podľa vynálezu sú všestranne využiteľné a majú množstvo výhod v

porovnaní so spôsobmi, ktoré sa v súčasnosti v tomto obore pre génový targeting používajú. Schopnosť aktivovať endogénny gén umiestením exogénnej regulačnej sekvencie v rôznej polohe v rozmedzí od bezprostredného susedstva vzhľadom na gén, ktorý je predmetom záujmu (priama fúzia k normálnej oblasti transkripcie génu) do 30 kbp alebo ešte ďalej pred (proti smeru expresie) prepísanou oblasťou endogénneho génu, alebo do intrónu endogénneho génu, je výhodná pre expresiu génu v bunke. Tak napríklad sa spôsob podľa vynálezu môže použiť na umiestenie regulačného prvku pred (proti smeru expresie) alebo za (v smere expresie) oblasťou, ktorá normálne umlčuje alebo negatívne reguluje gén. Umiestenie regulačného prvku pred alebo za takúto oblasť môže zvrátiť dominantné negatívne účinky, ktoré normálne inhibujú transkripciu. Okrem toho je možné oblasti DNA, ktoré normálne inhibujú transkripciu alebo ktoré majú inak škodlivý účinok na expresiu génu, vypustiť použitím targetingových konštruktov uvedených v tomto popise.

Okrem toho, keďže je známe, že funkcia promótora silne závisí od miestneho prostredia, môže sa podrobiť skúmaniu širokého rozmedzia polôh s cieľom nájdenia takého lokálneho prostredia, v ktorom je funkcia optimálna. Keďže však ATG štart kodóny sa často vyskytujú v cicavčej DNA (približne jeden výskyt na 48 bp), transkripcia sa neméže jednoducho začať v akejkoľvek polohe pred génom a produkovať transkript obsahujúci dlhú vedúcu sekvenciu predchádzajúcu správnemu ATG štart kodónu, keďže častý výskyt ATG kodónu v takejto sekvencii zabraňuje translácii správneho génového produktu a robí tak informáciu bezcennou.

Zavedenie exogénneho exónu, donorového miesta zostrihu a poprípade intrónu a akceptorového miesta zostrihu do targetingových konštruktov obsahujúcich regulačnú oblasť umožňuje teda optimalizovať expresiu génu tým, že sa identifikuje optimálne miesto pre funkciu regulačnej oblasti, bez toho, aby bolo nutné brať ohľad na obmedzenia vnútené potrebou vyhnúť sa nevhodným ATG štart kodónom v produkovanej mRNA. Tým sa dosiahne podstatne zvýšená flexibilita pri umiesťovaní konštruktu a je

možné aktivovať širší rozsah génov. Konštrukty DNA podľa vynálezu sú tiež užitočné napríklad pri spôsoboch produkcie fuzionovaných proteínov kódovaných rekombinantnými alebo exogénnymi sekvenciami a endogénnymi sekvenciami.

Targeting a amplifikácia génu, ktoré sú popísané vyššie, sú veľmi užitočné pri pozmieňaní expresie génov vytvárajúcich transkripčné jednotky, ktoré sú tak dostatočne veľké, že je problematické ich izolovať a exprimovať alebo pre orientácie na gény, u ktorých nie je celá oblasť kódujúca protein k dispozícii, alebo u ktorých táto oblasť nebola klonovaná. Konštrukty DNA popísané vyššie sú teda užitočné pre operatívne pripojenie regulačných prvkov k endogénnym génom spôsobom, ktorý presne definuje transkripčnú jednotku. Tým sa dosahuje pružnosť v relatívnom umiestení exogénnych regulačných prvkov a endogénnych génov, získa sa vysoko riadený systém na dosiahnutie a reguláciu expresie génov, ktoré sú predmetom terapeutického záujmu.

Vysvetlenie príkladov

Ako je uvedené v tomto popise, prihlasovateľ demonštroval, že DNA je možné zavádzať do buniek, ako primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných buniek stavovcov a že je možné ich integrovať do genómu transfekovaných buniek homológnou rekombináciou. Prihlasovateľ ďalej demonštroval, že exogénna DNA vykazuje požadovanú funkciu v homológne rekombinantných (HR) bunkách a že správne targetované bunky je možné identifikovať na báze detegovateľného fenotypu, ktorý je im udelený vhodne targetovanou DNA.

Prihlasovateľ popísal konštrukciu plazmidu užitočného pre targeting do špecifického miesta (miesta HPRT) v genóme človeka a selekciu založenú na fenotype rezistencie voči liečivu (pozri príklad 1a). Tento plazmid je označený šifrou pE3Neo. Jeho integrácia do genómu bunky v mieste HPRT poskytne bunky vykazujúce hprt$^-$, 6-TG rezistentný fenotyp, ktoré sú tiež rezistentné voči G418. Ako je uvedené v tomto popise,

prihlasovateľ demonštroval, že pE3Neo riadne funguje pri targetingu génu v získanej bunkovej línii ľudských ribroblastov (príklad 1b) tým, že ukázal, že DNA zavedená do získaných buniek je umiestená v exóne 3 génu HPRT.

Okrem toho prihlasovateľ demonštroval targeting génu v primárnych a sekundárnych fibroblastoch ľudskej kože použitím pE3Neo (príklad 1c). Ďalej je v tomto popise demonštrované, že modifikácia koncov DNA zvyšuje targeting DNA do genómovej DNA (príklady 1c a 1e). Prihlasovateľ tiež popísal spôsoby, pomocou ktorých je možné vložiť gén na dopredu zvolené miesto v genóme bunky, ako primárnej, sekundárnej alebo imortalizovanej bunky, metódou targetingu génu (príklad 1d).

Vynález sa okrem toho tiež týka spôsobu produkcie proteínu použitím transfekovaných buniek. Tento spôsob zahrnuje transfekciu buniek, ako sú primárne bunky, sekundárne bunky alebo imortalizované bunky, exogénnou DNA, ktorá kóduje terapeutický produkt, alebo DNA, ktorá je dostačujúca pre targeting na endogénny gén kódujúci terapeutický produkt. Tak napríklad v príkladoch 1g, 1h, 1j, 1k, 2, 3, 4 a 6 až 9 je popísaná produkcia proteínu targetovaním zvoleného endogénneho génu prvkami sekvencie DNA, ktoré modifikujú expresiu tohoto endogénneho génu.

Prihlasovateľ tiež popísal konštrukty DNA a spôsoby amplifikácie endogénneho bunkového génu, ktorý bol aktivovaný génovým targetingom (príklady 3, 6, 8 a 9).

Príklady 1f až 1h, 2, 4 a 6 ilustrujú realizáciu, v ktorej sa normálne regulačné sekvencie pred (proti smeru expresie) génom hEPO modifikujú s cieľom umožnenia expresie hEPO v kmeňoch primárnych alebo sekundárnych fibroblastov, ktoré neexprimujú EPO v detegovateľnom množstve, ak sú v netransfekovanom stave. Pri jednej realizácii ponecháva produkt targetovania normálny proteín EPO nedotknutý, ale pod kontrolou myšacieho metalotioneínového promótora.

Príklady 1i až 1j ukazujú použitie podobných targetingových konštruktov pre aktiváciu endogénneho génu rastového hormónu v primárnych alebo sekundárnych fibroblastoch človeka. Pri iných realizáciách, ktoré sú popísané pre aktiváciu expresie EPO v humánnych fibroblastoch, sú produkty targetingu chimerické transkripčné jednotky, v ktorých je prvý exón génu humánneho ratového hormónu umiestený pred (proti smeru expresie) EPO exóny 2 až 5. Produktom expresie, ktorá je kontrolovaná myšacím metalotioneínovým promótorom, zostrihu a translácie je proteín, v ktorom sú aminokyseliny 1 až 4 signálneho peptidu hEPO nahradené aminokyselinovými zvyškami 1 až 3 z hGH. Chimerická časť tohoto proteínu, signálny peptid, sa odstraňuje pred sekréciou z bunky.

V príklade 5 sú popísané targetingové konštrukty a spôsoby produkcie buniek, pri ktorých je gén (s intrónmi) prevedený na exprimovateľnú kópiu cDNA tohoto génu (bez intrónov) a získanie takýchto exprimovateľných molekúl cDNA v mikrobiálnych (napríklad kvasinkových alebo bakteriálnych) bunkách.

V príklade 6 je popísaná konštrukcia targetingového vektora označeného šifrou pREPO4 pre dvojitú selekciu a selekciu buniek, v ktorej je amplifikovaný gén dhfr. Plazmid pREPO4 bol použitý pre amplifikáciu loku hEPO v bunkách HT1080 (imortalizovaná bunková línia pochádzajúca z človeka) po aktivácii endogénneho génu hEPO homológnou rekombináciou. Ako je to popísané, stupňovitá selekcia v médiu obsahujúcom methotrexate má za následok 70-násobné zvýšenie produkcie hEPO v bunkách rezistentných voči 0,4 uM methotrexate.

Príklady 7 a 8 popisujú spôsoby vkladania regulačnej sekvencie pred normálny promótor EPO a spôsoby produkcie EPO použitím takého konštruktu. Okrem toho, príklad 8 popisuje amplifikáciu targetovaného génu EPO produkovaného spôsobom popísaným v príklade 7. Príklad 8 popisuje spôsoby targetingu génu humánneho alfa-interferónu, GM-CSF, g-CSF a FSHbeta s cieľom vytvorenia buniek užitočných pre produkciu proteínu.

Príklady uvádzajú spôsob aktivácie alebo aktivácie a amplifikácie endogénnych génov targetingom génu, ktorý nevyžaduje manipuláciu alebo iné použitie oblastí kódujúcich proteín cieľových génov. Použitím spôsobov, konštruktov DNA alebo plazmidov, ktoré sú tu popísané, alebo ich modifikácií, ktoré sú zrejmé odborníkom v tomto obore, je možné modifikovať expresiu génu v bunkách majúcich vlastnosti požadované pre in vitro produkciu proteínu (napríklad farmaceutického činidla) alebo spôsoby in vivo dodávky proteínu (napríklad génovou terapiou). Dve stratégie transkripčnej aktivácie génu hEPO sú ilustrované na obr. 5 a 6.

Použitím spôsobov a konštruktov DNA alebo plazmidov charakterizovaných v tomto popise alebo ich modifikácií, ktoré sú zrejmé odborníkom v tomto obore, je možné exogénnu DNA kódujúcu terapeutický produkt (napríklad proteín, ribozóm alebo antimediátorovú DNA) vložiť na dopredu určené miesto v genóme primárnych alebo sekundárnych buniek stavovca (napríklad cicavca, či už ide o človeka alebo iného živočícha).

Príklady realizácie vynálezu

P r í k l a d 1

Produkcia kmeňov transfekovaných buniek génovým targetingom

K targetingu génu dochádza, keď sa transfekčná DNA buď integruje do sekvencie chromozomálnej DNA alebo keď časť sekvencie chromozomálnej DNA nahradí prostredníctvom homológnej rekombinácie. K takému javu môže dochádzať počas akéhokoľvek daného transfekčného experimentu, ale obvykle je maskovaný obrovským nadbytkom iných javov či procesov, pri ktorých sa plazmidová DNA integruje nehomológnou alebo nelegitímnou rekombináciou.

a) Vytvorenie konštruktu užitočného pre selekciu na prebehnutý targeting génu v humánnych bunkách

Jeden prístup k selekcii uskutočneného targetingu spočíva v genetickej selekcii na stratu funkcie génu v dôsledku integrácie transfekčnej DNA. Humánny lokus HPRT kóduje enzým hypoxantín-fosforibozyl transferázu. Bunky hprt$^-$ je možné podrobiť selekcii prostredníctvom rastu v médiu obsahujúcom nukleozidový analóg 6-tioguanidín (6-TG): bunky s alelou divokého typu (HPRT$^+$) sú usmrtené pôsobením 6-TG, zatiaľ čo bunky s mutantnými alelami (hprt$^-$) môžu prežiť. Bunky s uskutočneným targetingom, ktorý zničil funkciu génu hprt, sú preto selektovateľné v 6-TG médiu.

Pre konštrukciu plazmidu pre targeting do liku HPRT sa 6,9kb HindIII fragment umiestený v polohách 11 960 až 18 869 v HPRT sekvencii (označenie v Genbank: HUMHPRTB; Edwards A. et al., Genomics 6: 593 až 608 (1990)) a zahrnujúci exóny 2 a 3 génu HPRT subklonuje do miesta HindIII pUC12. Výsledný klon sa rozštiepi v jedinečnom mieste XhoI v exóne 3 fragmentu génu HPRT a vloží sa 1,1kb fragment SalI-XhoI obsahujúci neo gén z pMC1Neo (Stratagene), pričom sa rozruší kódujúca sekvencia exónu 3. Zvolí sa jedna orientácia so smerom transkripcie neo opačným vzhľadom na transkripciu HPRT a táto orientácia sa označí šifrou pE3Neo. Nahradenie normálneho exónu 3 HPRT pomocou neo-rozrušenej verzie má za následok vznik hprt$^-$, 6-TG rezistentného fenotypu. Takéto bunky sú takisto rezistentné voči G418.

b) Targeting génu v ustálenej bunkovej línii humánnych firbroblastov

Na demonštráciu targetingu v líniách imortalizovaných buniek a na zistenie, že pE3Neo riadne funguje pri targetingu génu, sa uskutoční transfekcia bunkovej línie ľudského firbrosarkómu HT1080 (ATCC CCL 121) elektroporáciou pE3Neo.

Bunky HT1080 sa pred elektroporáciou uchovávajú v HAT (hypoxantín/aminopterín/xantín) doplnenom DMEM s 15 % teľacieho séra (Hyclone). Dva dni pred elektroporáciou sa bunky prevedú do

rovnakého média bez aminopterínu. Exponenciálne rastúce bunky sa trypsinizujú a zriedia v DMEM/15% teľacie sérum, odstredia a resuspendujú v PBS (fosfátom pufrovaný roztok chloridu sodného) na výslednú koncentráciu buniek 13,3 x 10^6 buniek/ml. pE3Neo sa štiepi HindIII, z hlavného reťazca pUC12 sa oddelí 8kb fragment HPRT-neo, tento fragment sa purifikuje extrakciou fenolom a zrážaním etanolom a resuspenduje na koncentráciu 600 ug/ml. 50 ul (30 ug) tohoto prípravu sa pridá do elektroporačnej kyvety (medzera medzi elektródami 4 mm; Bio-Rad Laboratories) spolu so 750 ul bunkovej suspenzie (10 000 000 buniek). Elektroporácia sa uskutočňuje pri 450 V, 250 uF pomocou zariadenia Bio-Rad Gene Pulser; Bio-Rad Laboratories. Obsah kyvety as ihneď pridá k DMEM s 15 % teľacieho séra a tak sa získa bunková suspenzia obsahujúca 1 milión buniek na 25 ml média. 25 ml spracovanej bunkovej suspenzie sa nanesie na platničky pre tkanivové kultúry s priemerom 150 mm. Inkubácia sa uskutočňuje pri 37 °C v atmosfére s obsahom 5 % oxidu uhličitého a po 24 hodinách sa priamo na platničky pridá roztok G418 do konečnej koncentrácie 800 ug/ml G418. Po 5 dňoch sa médium nahradí DMEM/15% teľacieho séra/800 ug/ml G418. 9 dní po elektroporácii sa médium nahradí DMEM/15% teľacieho séra/800 ug/ml G418 a 10 uM 6-tioguanínu. Kolónie rezistentné voči G418 a 6-TG sa zozbierajú použitím klonovacích valcov 14 až 16 dní po začiatku dvojitej selekcie.

Výsledky piatich reprezentatívnych experimentov s targetingom v bunkách HT1080 sú uvedené v tabuľke 1.

T a b u ľ k a 1

Transfekcia	Počet ošetrených buniek	Počet klonov $G418^r$ $6\text{-}TG^r$
1	1 x 10^7	32
2	1 x 10^7	28
3	1 x 10^7	24
4	1 x 10^7	32
5	1 x 10^7	66

V prípade transfekcie 5 ukázali kontrolné platničky určené

na stanovenie celkového výťažku kolónií G418^r, že zo začiatočného počtu 1 x 10^7 ošetrených buniek bolo možné vytvoriť 33 700 kolónií G418^r. Pomer prípadov s targetingom a bez targetingu je teda 66/33 700, tj. 1:510. Keď sa všetkých päť experimentov skombinuje, zistí sa, že k targetingovým príhodám dochádza s frekvenciou 3,6 x 10^{-6}, tj. u 0,00036 % ošetrených buniek.

Experimenty pri použití reštrikčného enzýmu a hybridizácie Southern s próbami pochádzajúcimi z génov neo a HPRT ukazujú, že gén neo je umiestený v loku HPRT v dopredu určenom mieste, tj. v exóne 3 HPRT.

c) Targeting génu v primárnych a sekundárnych fibroblastoch ľudskej kože

pE3Neo sa štiepi HindIII, z hlavného reťazca pUC12 sa oddelí 8kb fragment HPRT-neo a ten sa purifikuje extrakciou fenolom a zrážaním etanolom. DNA sa resuspenduje na koncentráciu 2 mg/ml. 3 milióny sekundárnych fibroblastov ľudskej predkožky v objeme 0,5 ml sa elektroporuje pri 250 V a 960 ,uF pri použití 100 ,uG HindIII pE3Neo (50 ,ul). Uskutočnia sa 3 separátne transfekcie, celkovo u 9 miliónov ošetrených buniek. Bunky sa spracujú a podrobia sa rezistencii voči G418. S cieľom selekcie pomocou G418 sa 500 000 buniek nanesie na 150mm kultivačnú misku. Po 10 dňoch od selekcie sa kultivačné médium nahradí živným médiom pre ľudské fibroblasty obsahujúcim 400 ,ug/ml G418 a 10,uM 6-TG. V selekcii pri použití kombinácie týchto dvoch liečiv sa pokračuje ďalších 10 dní. Misky sa prezrú pod mikroskopom, aby sa lokalizovali kolónie humánnych fibroblastov, ktoré sú rezistentné voči obidvom liečivám. Frakcie kolónií G418^r 6-TG je prítomná v počte 4 na 9 miliónov ošetrených buniek. Tieto kolónie tvoria 0,0001 % (tj. 1 na jeden milión) všetkých buniek schopných tvoriť kolónie. Kontrolné misky určené na stanovenie celkového výťažku kolónií G418^r ukazujú, že zo začiatočného počtu 9 x 10^6 ošetrených buniek bolo možné získať 2 850 kolónií G418^r. Pomer prípadov s targetingom a bez targetingu je teda 4/2 850, tj. 1:712.

Experimenty pri použití reštrikčného enzýmu a hybridizácie Southern s próbami pochádzajúcimi z génov neo a HPRT ukazujú, že gén neo je umiestený v loku HPRT v dopredu určenom mieste, tj. v exóne 3 HPRT. Tieto experimenty tiež ukazujú, že targeting prebehol v týchto štyroch klonálnych bunkových kmeňoch. Kolónie rezistentné voči obidvom liečivám sa tiež izolujú pomocou transfekcie primárnych buniek (1/3,0 x 10^7).

Výsledky niekoľkých experimentov s targetingom pri použití pE3Neo sú sumarizované v tabuľke 2. pE3Neo rozštiepený HindIII sa buď priamo transfekuje alebo dopredu spracuje exonukleázou III pre vytvorenie 5' jednoreťazcových previsov pred transfekciou (pozri príklad 1c). Skúšajú sa DNA prípravky s jednoreťazcovými oblasťami s dĺžkou 175 až 930 bp. Použitím samotného pE3Neo štiepeného HindIII sa analýzou pomocou reštrikčného enzýmu a hybridizácie Southern identifikuje 1/799 G418-rezistentných kolónií majúcich zamýšľanú inzerciu neo v mieste HPRT (celkovo sa izoluje 24 targetingových klonov). Targeting je maximálne stimulovaný (približne 10-násobná stimulácia), ak majú previsy dĺžku 175 bp. V tom prípade sa získa 1/80 $G418^r$ kolónií vykazujúcich reštrikčné fragmenty, ktoré slúžia na diagnostikovanie targetingu v HPRT (celkovo sa izoluje 9 targetovaných klonov).

Použitím podmienok a rekombinantých konštruktov DNA popísaných vyššie, je teda v normálnych humánnych fibroblastoch targeting dobre pozorovateľný, pričom celkovú početnosť targetingu (počet targetovaných klonov delený celkovým počtom klonov stabilne transfekovaných na G418-rezistenciu) je možné stimulovať transfekciou targetingovými konštruktmi obsahujúcimi jednoreťazcové previsnuté chvosty pri použití spôsobu popísaného v príklade 1e.

T a b u ľ k a 2

Targeting do loku HPRT v humánnych fibroblastoch

Spracovanie pE3Neo	Počet experimentov	Počet targ. kolónií na počet kolónií G418^r	Celkový počet targ. klonov
štiepenie HindIII	6	1/799	24
175bp previs	1	1/80	9
350bp previs	3	1/117	20
930bp previs	1	1/144	1

d) Vytvorenie konštruktu pre cielenú inzerciu génu, ktorý je predmetom terapeutického záujmu do humánneho genómu a jeho použitie pri targetingu génu

Pre targeting génu, ktorý je predmetom terapeutického záujmu, do špecifickej polohy genómu recipientných primárnych alebo sekundárnych buniek sa môže použiť variant pE3Neo, v ktorom je gén, ktorý je predmetom terapeutického záujmu, vložený do kódujúcej oblasti HPRT vedľa alebo v blízkosti génu neo. Takýto variant pE3Neo je možné skonštruovať pre targeting génu hGH do olku HPRT.

pXGH5 (schematicky znázornený na obr. 3) sa štiepi EcoRI a 4,1kb fragment obsahujúci gén hGH a pripojený myšací metalotioneínový (mMT) promótor sa izoluje. EcoRI previsy sa vyplnia Klonowovým fragmentom z E. coli DNA polymerázy. Oddelene sa pE3Neo rozštiepi XhoI, pričom k štiepeniu dôjde v spoji fragmentu neo a exónu 3 HPRT (3' spoj inzercie do exónu 3). XhoI previsnuté konce linearizovaného plazmidu sa vyplnia Klonowovým fragmentom z E. coli DNA polymerázy a výsledný fragment sa liguje k 4,1kb tupým koncom zakončenému fragmentu hGH-mMT. Bakteriálne kolónie získané použitím tejto ligačnej zmesi sa podrobia screeningu pomocou analýzy reštrikčným enzýmom na inzercii jedinej kópie fragmentu hGH-mMT a vyberie sa jedna orientácia génu hGH prepísaného v rovnakom smere ako gén neo. Táto

orientácia sa označí šípkou pE3Neo/hGH. pE3Neo/hGH sa štiepi HindIII, pričom dôjde k uvoľneniu 12,1kb fragmentu obsahujúceho sekvencie HPRT, neo a mMT-hGH. Rozštiepená DNA sa spracuje a transfekuje do primárnych alebo sekundárnych humánnych fibroblastov spôsobom popísaným v príklade 1c. Selekciou sa oddelia kolónie $G418^r$ TG^r a uskutoční sa analýza na cielenú inzerciu sekvencií mMT-hGH a neo do génu HPRT, ako je to popísané v príklade 1c. Jednotlivé kolónie sa skúšajú na expresiu hGH použitím obchodne dostupnej imunoeseje (Nichols Institute).

Sekundárne ľudské fibroblasty sa transfekujú pomocou pE3Neo/hGH a tioguanín-rezistentné kolónie sa analyzujú na stabilnú expresiu hGH a ďalej sa uskutočnia analýza reštrikčným enzýmom a hybridizáciou Southern. Z 13 TG^r analyzovaných kolónií sa identifikuje 8 kolónií, v ktorých došlo k vloženiu génu hGH do endogénneho loku HPRT. Všetkých 8 kmeňov stabilne exprimuje významné množstvo hGH s priemernou úrovňou expresie 22,7 ug/10^6 buniek/24 hodín. Alternatívne sa môže pre targeting EPO do humánneho loku HPRT použiť plazmid pE3NeoEPO (pozri obr. 4).

Použitie homológnej rekombinácie pre targeting génu, ktorý je predmetom terapeutického záujmu do špecifickej polohy genómovej DNA bunky, je možné rozšíriť a urobiť užitočnejším pre produkciu produktov určených na terapeutické účely (napríklad farmaceutických činidiel) alebo pre génovú terapiu vložením génu, prostredníctvom ktorého môžu byť bunky obsahujúce amplifikované kópie tohoto génu podrobené selekcii expozíciou vhodnému selekčnému režimu použitím liečiva. Tak napríklad pE3Neo/hGH (príklad 1d) je možné modifikovať vložením génu dhfr, ada alebo CAD do polohy bezprostredne vedľa génu hGH alebo neo v pE3Neo/hGH. Takýmto plazmidom sa transfekujú primárne, sekundárne alebo imortalizované bunky a identifikujú sa správne prípade targetingu. Tieto bunky sa ďalej spracujú zvyšujúcimi sa koncentráciami liečiv vhodných pre príslušnú selekciu buniek obsahujúcich amplifikované gén (pre dhfr je selekčným činidlom methotrexate, pre CAD je selekčným činidlom N-(fosfonoacetyl)-L--aspartát (PALA) a pre ada je selekčným činidlom adenínnukleozid

(napríklad alanozín)). Týmto spôsobom dôjde k integrácii génu, ktorý je predmetom terapeutického záujmu spolu s génom, na ktorý sa selektujú amplifikované kópie.

Génové inžinierstvo buniek pre produkciu génov pre terapeutické použitie je teda možné ľahko regulovať predbežnou voľbou miesta, v ktorom sa targetingový konštrukt integruje a v ktorom sú amplifikované kópie usídlené v amplifikovaných bunkách.

e Modifikácie koncov DNA s cieľom zvýšenia targetingu

Okolnosť, že 3' previsnuté konce sa zúčastňujú určitých homológnych rekombinantných dráh E. coli, bakteriofágu, S. cerevisiae a Xenopus laevis, je podporovaná niekoľkými typmi dôkazov. V oocytoch Xenopus laevis podľahli po mikroinjekcii molekuly s 3' previsnutými koncami s dĺžkou niekoľko sto bp rekombinácii s podobne upravenými molekulami oveľa rýchlejšie, ako molekuly s veľmi krátkymi previsnutými (4 bp) získanými štiepením reštrikčným enzýmom. Zdá sa, že v kvasinkách je tvorba 3' previsnutých koncov s dĺžkou niekoľko sto bp stupňom obmedzujúcim rýchlosť pri meiotickej rekombinácii. Nebol oznámený žiadny dôkaz, že sa 3' previsnuté konce zúčastňujú rekombinácie v humánnych bunkách a v žiadnom prípade sa nezistilo, že by modifikované DNA substráty akéhokoľvek druhu podporovali targeting (jednu formu homológnej rekombinácie) u akéhokoľvek druhu. Experiment popísaný v nasledujúcom príklade a v príklade 1c ukazuje, že 5' previsnuté konce sú účinné pri stimulácii targetingu v primárnych, sekundárnych a imortalizovaných ľudských fibroblastoch.

Nie sú k dispozícii žiadne správy týkajúce sa zvýšenia targetingu modifikáciou koncov transfekčných molekúl DNA. Tento príklad slúži na ilustráciu, že modifikácie koncov lineárnych molekúl DNA konverziou koncov týchto molekúl z dvojreťazcovej formy na jednoreťazcovú formu môže stimulovať targeting do genómu primárnych a sekundárnych ľudských fibroblastov.

1 100 mg plazmidu pE3Neo (príklad 1a) sa štiepi HindIII. Táto DNA sa môže použiť priamo po extrakcii fenolom a zrážaní etanolom alebo sa môže 8kb HindIII fragment, ktorý obsahuje len HPRT a neogén oddeliť od sekvencií vektora pUC12 elektroforézou na géle.

Štiepenie ExoIII DNA rozštiepenej HindIII má za následok rozsiahle exonukleolytické štiepenie na obidvoch koncoch začínajúce vždy na voľnom 3' konci a ponechávajúce 5' previsnuté konce. Rozsah exonukleolytickej akcie, a teda dĺžku výsledných 5' previsov, je možné regulovať menením doby štiepenia pomocou ExoIII. Štiepenie ExoIII použitím 100 ,ug pE3Neo štiepeného HindIII sa uskutočňuje pri podmienkach doporučených dodávateľom počas 30 sekúnd, 1 minútu, 1,5 minúty, 2 minúty, 2,5 minúty, 3 minúty, 3,5 minúty, 4 minúty, 4,5 minúty a 5 minút. S cieľom monitorovania rozsahu štiepenia sa v každom časovom okamihu na alikvótny diel štiepenej zmesi obsahujúcej 5 ,ug DNA spracovanej ExoIII pôsobí nukleázou z fazule mungo (Promega) pri podmienkach doporučených dodávateľom a získané vzorky sa frakcionizujú elektroforézou na géle. Meria sa rozdiel veľkosti molekúl pE3Neo štiepeného HindIII, ktorý nebol podrobený žiadnemu spracovaniu a rovnakých molekúl po spracovaní ExoIII a nukleázou z fazule mungo. Rozdiel veľkosti delený dvoma predstavuje priemernú dĺžku 5' previsu na každom konci molekuly. Pri použití časových intervalov uvedených vyššie a teploty štiepenia 30 °C by mali mať získané 5' previsy dĺžku v rozmedzí od 100 do 1 000 báz.

60 ,ug DNA (celý štiepený produkt pE3Neo získaný pomocou HindIII) spracovanej ExoIII z každého časového intervalu sa purifikuje a elektroporáciou zavedie do primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných fibroblastov človeka pri podmienkach uvedených v príklade 1c. Stupeň zvýšenia targetingu pri použití každého prípravku ošetreného ExoIII sa kvantifikuje zistením počtu kolónií G418^r 6-TG^R a porovnaním tohoto počtu s targetingom použitím pE3Neo štiepeného HindIII bez spracovania ExoIII.

Účinok 3' previsnutých koncov sa dá tiež kvantifikovať

použitím analogického systému. V tom prípade sa na pE3Neo štiepený HindIII pôsobí T7 gén 6 exonukleázou (United States Biochemicals) rôzne dlhý čas pri podmienkach doporučených dodávateľom. Stanovenie rozsahu štiepenia (priemernej dĺžky 3' previsu vztiahnuté na jeden koniec) a podmienky elektroporácie sú popísané v súvislosti s DNA ošetrenou ExoIII.

Stupeň zvýšenia targetingu pri použití každého prípravku spracovaného T7 gén 6 exonukleázou sa kvantifikuje zistením počtu kolónií G418^r 6-TG^r a porovnaním tohoto počtu s targetingom pri použití pE3Neo štiepeného HindIII bez spracovania T7 gén 6 nukleázou.

Sú možné aj iné spôsoby vytvorenia 5' a 3' previsnutého konca, napríklad denaturácia a teplotná hybridizácia dvoch lineárnych molekúl, ktoré sa vzájomne čiastočne prekrývajú. Pritom vznikne zmes molekúl, z ktorých každá obsahuje 3' previsy na obidvoch koncoch a 5' previsy na obidvoch koncoch, ako aj opäť teplotne hybridizované fragmenty, ktoré sú nerozlíšiteľné od východiskových lineárnych molekuly. Dĺžka previsov sa stanoví ako dĺžka DNA, ktorá nie je spoločná pre obidva fragmenty DNA.

f) Konštrukcia targetingových plazmidov na umiestenie génu ľudského erytropoetínu pod kontrolou myšacieho metalotioneínového promótora v primárnych, sekundárnych a imortalizovaných fibroblastoch človeka

Nasledujúci príklad slúži na ilustráciu jednej realizácie tohoto vynálezu, pri ktorej sa normálne pozitívne a negatívne regulačné sekvencie pred (proti smeru expresie) génom humánneho erytropoetínu (hEPO) modifikujú tak, aby umožnili expresiu humánneho erytropoetínu v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných fibroblastoch človeka, ktoré v tom stave, v akom sa získajú, neexprimujú významné množstvo hEPO.

Oblasť ležiaca výlučne pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou humánneho EPO je možné amplifikovať pomocou PCR. Na

tento cieľ sa po analýze publikovanej sekvencie humánneho EPO (označenie podľa Genbank: HUMERPA; Lin, F-K et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7580 až7594 (1985)) zostroja tri sady primérov. Tieto dvojice primérov môžu amplifikovať fragmenty s dĺžkou 609, 603 alebo 590 bp.

T a b u ľ k a 3

Primér	Súradnice HUMERPA	Sekvencie	Veľkosť fragmentu
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

Vyššie uvedené tri fragmenty sa v značnom rozsahu prekrývajú a sú pre ciele popísané vyššie zameniteľné. 609 bp fragment ležiaci v rozmedzí od -623 do -14 vzhľadom na miesto začiatku translácie (polohy nukleotidov 2 až 610 v HUMERPA) sa liguje na obidvoch koncoch použitím linkérov ClaI. Výsledný ClaI spojený fragment sa štiepi ClaI a vloží do miesta ClaI plazmidu pBluescriptIISK/+ (Stratagene) s takou orientáciou, že nukleotidová poloha 610 HUMERPA susedí s miestom SalI v plazmidovom polylinkéri. Tento plazmid, p5'EPO sa môže štiepiť oddelene v jedinečných miestach FspI alebo SfiI vo fragmente hEPO proti smeru expresie (nukleotidové polohy HUMERPA 150 až 405) a ligovať k myšaciemu metalotioneínovému promótoru. Obvykle sa tiež môžu u 1,8kb fragmentu EcoRI-BglII génu mMT-I (bez obsahu kódujúcich sekvencií mMT;Hamer D.H. a Walling M., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273 až 388 (1982); tento fragment je tiež možné izolovať pomocou známych spôsobov z myšacej genómovej DNA použitím PCR

primérov skonštruovaných na základe analýzy sekvencií mMT dostupných od Genbank; tj. MUSMTI, MUSMTIP, MUSMTIPRM) otupiť konce pomocou známych spôsobov a môže sa uskutočniť ligácia s p5'EPO štiepeným SfiI (ktorý má tiež tupé konce) alebo FspI. Zistí sa orientácia výsledných klonov a pre targeting primárnych a sekundárnych fibroblastov človeka sa použijú klony, v ktorých je miesto BglII z bývalého mMT v proximálnej polohe vzhľadom na miesto SalI plazmidového polylinkéra. Táto orientácia riadi transkripciu mMT smerom k nukleotidovej polohe 610 (HUMERPA) výsledného konštruktu. Výsledné plazmidy sa označia šiframi p5'EPO-mMTF a p5'EPO-mMTS pre inzercie mMT v miestach FspI a SfiI.

Prídavné sekvencie umiestené proti smeru expresie sú užitočné v prípadoch, v ktorých je žiadúce modifikovať, vypustiť a/alebo nahradiť negatívne regulačné prvky alebo enhancéry, ležiace proti smeru expresie ("pred") začiatočnou cieľovou sekvenciou. V prípade EPO sa môže vypustiť negatívny regulačný prvok inhibujúci expresiu EPO v extrahepatickom a extrarenálnom tkanive (Semenza G.L. et al., Mol. Cell. Biol. 10: 930 až 938 (1990)). Pripravia sa série delécií v 6kb fragmente. Vypustené oblasti sa môžu nahradiť enhancérom so širokou aktivitou voči hostiteľskej bunke (napríklad enhancérom z Cytomegalovírusu (CMV)).

Bola zvolená orientácia 609bp fragmentu 5'EPO vo vektore pBluescriptIISK/+, keďže sekvencia HUMERPA pri 5' konci predchádza miesto BamHI (distálne) HindIII (proximálne). 6kb fragment BamHI-HindIII, ktorý normálne leží pred (proti smeru expresie) 609bp fragmentom (Semenza G.L. et al., Mol. Cell. Biol. 10: 930 až 938 (1990)) sa môže izolovať z genómovej DNA pomocou známych spôsobov. Tak napríklad sa môže uskutočniť screenign umelej chromozomálnej knižnice bakteriofágu, kozmidu alebo kvasinky použitím 609bp PCR amplifikované fragmentu, ako próby. Požadovaný klon bude obsahovať 6kb fragment BamHI-HindIII a jeho totožnosť je možné potvrdiť známym spôsobom, porovnaním jeho reštrikčnej mapy s reštrikčnou mapou oblasti okolo génu hEPO.

Alternatívne sa môže skonštruovať reštrikčná mapa genómu človeka pred (proti smeru expresie) génom EPO a použitím 609bp fragmentu, ako próby, sa môžu identifikovať enzýmy vytvárajúce fragment pochádzajúci z miesta medzi súradnicami 2 a 609 HUMERPA, ktorý zasahuje za miesto BamHI umiestené ďalej vpredu proti smeru expresie.

Tento fragment sa môže izolovať elektroforézou na géle z príslušného štiepeného produktu humánnej genómovej DNA a ligovať do bakteriálneho alebo kvasinkového klonovacieho vektora. Správny klon bude hybridizovať k 609bp próbe 5'EPO a bude obsahovať 6kb fragment BamHI-HindIII. Izolovaný 6kb fragment v správnej orientácii do p5'EPO, p5'EPO-mMTF alebo p5'EPO-mMTS (tak, aby miesto HindIII susedilo s nukleotidovou polohou 2 HUMERPA). Prídavné sekvencie umiestené vpredu (proti smeru expresie) je možné izolovať pomocou známych metód použitím chromozomálnych krokových techník alebo izolácie kvasinkových umelých chromozómov hybridizujúcich k 609bp 5'EPO próbe.

Klonovacie stratégie popísané vyššie umožňujú modifikovať sekvencie umiestené pred EPO in vitro pre ďalšiu targetovanú transfekciu primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných humánnych fibroblastov. Tieto stratégie popisujú jednoduché inzercie promótora mMT, ako aj deléciu negatívnej regulačnej oblasti a deléciu negatívnej regulačnej oblasti s nahradením enhancérom so širokou aktivitou voči hostiteľskej bunke.

g) Aktivácia génu humánneho EPO a izolácia targetovaných, primárnych, sekundárnych a imortalizovaných humánnych fibroblastov screeningom

S cieľom targetovania s plazmidy rozštiepia reštrikčnými enzýmami, ktoré uvoľnia inzert z hlavného reťazca plazmidu. V prípade p5'EPO-mMTS sa pomocou HindIII a SalI štiepením uvoľní 2,4kb targetingový fragment, ktorý sa skladá z 1,8kb mMT promótora lemovaného na 5' strane 405 bp a 3' strane 204 bp DNA pre targeting tohoto konštruktu do regulačnej oblasti génu

humánneho EPO. Táto samotná DNA alebo samotný 2,4kb targetingový fragment sa purifikuje extrakciou fenolom a zrážaním etanolom a transfekuje sa do primárnych alebo sekundárnych fibroblastov človeka pri podmienkach uvedených v príklade 1c.

Transfekované bunky sa nanesú na 150mm platničky s živným médiom pre humánne fibroblasty. Po 48 hodinách sa bunky prenesú na 24-jamkové platničky pri hustote 10 000 buniek/cm^2 (približne 20 000/jamka; ak targeting prebieha s pomerom 1 prípad na 10^6 klonovateľných buniek (porovnaj príklad 1c), potom je potrebné na izoláciu jedinej kolónie preskúšať asi 50 jamiek). Bunky, v ktorých bola transfekčná DNA targetingom zavedená do homológnej oblasti pred génom humánneho EPO, exprimujú hEPO pod kontrolou mMT promótora. Po 10 dňoch sa úplné supernatanty z jamiek skúšajú na expresiu EPO použitím obchodne dostupného kitu pre imunoeseje (Amgen). Klony z jamiek vykazujúcich syntézu hEPO sa izolujú použitím známych metód. Obvykle sa postupuje tak, že sa analyzujú frakcie heterogénnych populácií buniek oddelených do jednotlivých jamiek alebo misiek, skúšajú sa frakcie týchto pozitívnych jamiek, pričom postup sa opakuje podľa potreby, až sa nakoniec izoluje targetovaná kolónia screeningom 96-jamkových mikrotitrových platničiek zaočkovaných pri koncentrácii 1 bunka/jamka.

Tiež sa môže analyzovať DNA z úplných lyzátov z platničiek použitím PCR pre amplifikáciu fragmentu. Pritom sa používa mMT špecifický primér v spojení s primérom ležiacim pred (proti smeru expresie) nukleotidovou polohou 1 (podľa HUMERPA). Táto dvojica primérov by mala amplifikovať fragment DNA s presne predpovedanou veľkosťou na základe sekvencie DNA. Pozitívne misky sa trypsinizujú a uskutoční sa nové vzorkovanie použitím postupne nižších koncentrácií a príprava DNA, ako aj PCR sa opakujú podľa potreby s cieľom izolácie targetovaných buniek.

Vyššie popísané režimy targetingu sa tiež môžu použiť na aktiváciu expresie hGH v imortalizovaných humánnych bunkách (napríklad bunky HT1080 (ATCC CCL 121), bunky HeLa a deriváty

buniek HeLa (ATCC CCL 2, 2.1 a 2.2), bunky rakoviny prsníka MCF-7 (A(TCC BTH 22), leukemické bunky K-562 (ATCC CCL 243), bunky karcinómu KB (ATCC CCL 17), bunky karcinómu vaječníkov 2780AD (Van Der Blick A.M. et al., Cancer Res., 48: 5927-5932 (1988)), Rajiho bunky (ATCC CCL 86), Jurkatove bunky (ATCC TIB 152), Namalwove bunky (ATCC CRL 1432), bunky HL-60 (ATCC CCL 240), Daudiho bunky (ATCC CCL 213), bunky RPMI 8226 (ATCC CCL 155), bunky U-937 (ATCC CRL 1593), Bowesove bunky melanómu (ATCC CRL 9607), bunky sublínie WI-38VA13 2R4 (AtTCC CLL 75.1) a bunky MOLT-4 (ATCC CRL 1582), ako aj rôzne heterohybridomálne bunky) pre účely produkcie hGH pre konvenčnú farmaceutickú dávku.

h) Aktivácia génu humánneho EPO a izolácia targetovaných primárnych, sekundárnych a imortalizovaných fibroblastov človeka použitím pozitívneho alebo kombinovaného, pozitívneho a negatívneho, selekčného systému

Stratégia pre konštrukciu p5'EPO-mMTF a p5'EPO-mMTS a ich derivátov s prídavným 6kb BamHI-HindIII fragmentom umiesteným vpredu (proti smeru expresie) môže byť nasledovaná prídavným stupňom vloženia génu neo do susedstva promótora mMT. Okrem toho je možné do susedstva so sekvenciami HUMERPA v polylinkéri pBluescriptIISK/+ zaviesť negatívny selekčný marker, napríklad gpt (z pMSG (Pharmacia) alebo iného vhodného zdroja). V prvom prípade sa izolujú kolónie G418^r a podrobia sa screeningu pomocou PCR amplifikácie alebo analýzy DNA pripravenej zo zmesi kolónií reštrikčným enzýmom a hybridizáciou Southern s cieľom identifikácie targetovaných kolónií. V poslednom uvedenom prípade sa kolónia G418^r umiestia do média obsahujúceho 6-tioxantín s cieľom selekcie na integráciu génu gpt (Besnard C. et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4139 až 4141 (1987)).

Okrem toho sa môže gén HSV-TK umiestiť na opačnú stranu inzertu ako gpt, čo umožňuje selekciu na neo a proti ako gpt, tak aj TK rastom buniek v živnom médiu pre humánne fibroblasty s obsahom 400 ,ug/ml G418, 100,uM 6-tioxantínu a 25 ,ug/ml gancyklovírusu. Dvojitá negatívna selekcia by mala poskytnúť

takmer absolútnu istotu pri výbere prípadov, kde targeting skutočne prebehol a konečné potvrdenie poskytuje analýza Southern blot.

Vyššie popísané režimy targetingu sa tiež môžu použiť pri aktivácii expresie hEPO v imortalizovaných humánnych bunkách (napríklad bunky HT1080 (ATCC CCL 121), bunky HeLa a deriváty buniek HeLa (ATCC CCL 2, 2.1 a 2.2), bunky rakoviny prsníka MCF-7 (A(TCC BTH 22), leukemické bunky K-562 (ATCC CCL 243), bunky karcinómu KB (ATCC CCL 17), bunky karcinómu vaječníkov 2780AD (Van Der Blick A.M. et al., Cancer Res., 48: 5927-5932 (1988)), Rajiho bunky (ATCC CCL 86), Jurkatove bunky (ATCC TIB 152), Namalwove bunky (ATCC CRL 1432), bunky HL-60 (ATCC CCL 240), Daudiho bunky (ATCC CCL 213), bunky RPMI 8226 (ATCC CCL 155), bunky U-937 (ATCC CRL 1593), Bowesove bunky melanómu (ATCC CRL 9607), bunky sublínie WI-38VA13 2R4 (AtTCC CLL 75.1) a bunky MOLT-4 (ATCC CRL 1582), ako aj rôzne heterohybridomálne bunky) pre účely produkcie hEPO pre konvenčnú farmaceutickú dávku.

i) Konštrukcia targetingových plazmidov pre umiestenie génu rastového hormónu človeka pod kontrolu myšacieho metalotioneínového promótora v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných ribroblastoch človeka

Tento príklad slúži na ilustráciu jednej realizácie vynálezu, v ktorej sa normálne regulačné sekvencie umiestené proti smeru expresie (pred) génom humánneho rastového faktora modifikujú s cieľom umožnenia expresie rastového faktora človeka v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných fibroblastoch človeka.

Použitím klonovaných fragmentov DNA pochádzajúcich z 5' konca N génu humánneho rastového hormónu sa zostroja podobné targetingové molekuly, aké boli popísané v príklade 1f pre targeting do regulačnej oblasti génu EPO. Približne 1,8kb fragment ležiaci v rozmedzí nukleotidových polôh 3787 až 5432 (polohy dvoch miest EcoNI, ktoré vytvárajú fragment s vhodnou

veľkosťou pre klonovanie alebo diagnostické štiepenie subklonov obsahujúcich tento fragment) HUMGHCSA (podľa označenia Genbank) sa amplifikuje použitím PCR primérov skonštruovaných na základe analýzy sekvencie HUMGHCSA v tejto oblasti. Táto oblasť je umiestená od stredu intrónu 1 génu N hGH do polohy vpredu (proti smeru expresie) približne 1,4 kb v smere k 5' od miesta štartu translácie. pUC12 sa rozštiepi EcoRI a BamHI, spracuje Klenowovým fragmentom pre vytvorenie tupých koncov a opäť sa uskutoční cyklizácia na kružnicovú formu v zriedenom stave, čo má za následok vznik plazmidov, ktoré stratili miesta EcoRI a BamHI. Výsledný plazmid sa označí šifrou pUC12XEB. Linkéry HindIII sa ligujú k amplifikovanému fragmentu hGH a výsledný fragment sa štiepi HindIII a liguje sa k pUC12XEB štiepenému HindIII. Výsledný plazmid, pUC12XEB-5'hGH sa štiepi EcoRI a BamHI s cieľom odstránenia 0,5 kb fragmentu ležiaceho bezprostredne pred miestom iniciácie transkripcie gGH. Štiepená DNA sa liguje k 1,8kb fragmentu EcoRI-BglII génu mMT-I (bez kódujúcich sekvencií mMT; Hamer D.H. a Walling M., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273 až 388 (1982); tento fragment je tiež možné izolovať pomocou známych spôsobov z myšacej genómovej DNA použitím PCR primérov skonštruovaných na základe sekvencií mMT dostupných od Genbank; tj. MUSMTI, MUSMTIP, MUSMTIPRM). Tento plazmid p5'hGH-mMT obsahuje promótor mMT lemovaný na obidvoch stranách sekvenciami hGH.

Klonovacie stratégie popísané vyššie umožňujú modifikovať in vitro sekvencie umiestené pred hGH (proti smeru expresie) pre nasledujúcu targetovanú transfekciu primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných humánnych fibroblastov. Pri popísanej stratégii sa používa jednoduchá inzercia MT promótora. Použiť je však možné aj iné stratégie, pri ktorých sa napríklad vložiť pred vloženú sekvenciu mMT enhancér so širokou špecificitou voči hostiteľským bunkám.

j) Aktivácia génu hGH a izolácia targetovaných primárnych, sekundárnych a imortalizovaných humánnych fibroblastov screeningom

S cieľom targetovania sa plazmidy rozštiepia reštrikčnými enzýmami, ktoré uvoľnia inzert z hlavného reťazca plazmidu. V prípade p5'hTH-mMT sa pomocou HindIII štiepením uvoľní 2,9kb targetingový fragment, ktorý je zložený z 1,8kb mMT promótora lemovaného na 5'strane a 3' strane DNA pre targeting tohoto konštruktu do regulačnej oblasti génu hGH. Táto DNA alebo samotný 2,9kb targetingový fragment sa purifikuje extrakciou fenolom a zrážaním etanolom a transfekuje do primárnych alebo sekundárnych fibroblastov človeka pri podmienkach uvedených v príklade 11.

Transfekované bunky sa nanesú na 150mm platničky s živným médiom pre humánne fibroblasty. Po 48 hodinách sa bunky prenesú na 24-jamkové platničky pri hustote 10 000 buniek/cm^2 (približne 20 000/jamka); ak targeting prebieha s pomerom 1 prípad na 10^6 klonovateľných buniek (porovnaj príklad 1c), potom je potrebné na to, aby sa izolovala jediná exprimujúca kolónia, preskúšať asi 50 jamiek). Bunky, v ktorých bola transfekčná DNA targetingom do homológnej oblasti pred génom hGH, exprimujú hGH pod kontrolou mMT promótora. Po 10 dňoch sa úplné supernatanty z jamiek skúšajú na expresiu hGH použitím obchodne dostupného kitu pre imunoeseje (Nichols). Klony z jamiek vykazujúcich syntézu hGH sa izolujú použitím známych metód. Obvykle sa postupuje tak, že sa analyzujú frakcie heterogénnych populácií buniek oddelených do jednotlivých jamiek alebo misiek, skúšajú sa frakcie týchto pozitívnych jamiek, pričom postup sa opakuje podľa potreby, až sa nakoniec izoluje targetovaná kolónia screeningom 96-jamkových mikrotitrových platničiek zaočkovaných pri koncentrácii 1 bunka/jamka.

Tiež sa môže analyzovať DNA z úplných lyzátov z platničiek použitím PCR pre amplifikáciu fragmentu. Pritom sa používa mMT špecifický primér v spojení s primérom ležiacim za (v smere expresie) nukleotidovou polohou 5432 (podľa HUMGHCSA). Táto dvojica by mala amplifikovať fragment DNA s presne predpovedanou veľkosťou na základe tejto sekvencie DNA. Pozitívne misky sa trypsinizujú a uskutoční sa nové vzorkovanie použitím postupne nižších koncentrácií a príprava DNA, ako aj stupne PCR sa opakujú

podľa potreby s cieľom izolácie targetovaných buniek.

Vyššie popísané režimy targetingu sa tiež môžu použiť na aktiváciu expresie hGH v imortalizovaných humánnych bunkách (napríklad bunky HT1080 (ATCC CCL 121), bunky HeLa a deriváty buniek HeLa (ATCC CCL 2, 2.1 a 2.2), bunky rakoviny prsníka MCF-7 (A(TCC BTH 22), leukemické bunky K-562 (ATCC CCL 243), bunky karcinómu KB (ATCC CCL 17), bunky karcinómu vaječníkov 2780AD (Van Der Blick A.M. et al., Cancer Res., 48: 5927-5932 (1988)), Rajiho bunky (ATCC CCL 86), Jurkatove bunky (ATCC TIB 152), Namalwove bunky (ATCC CRL 1432), bunky HL-60 (ATCC CCL 240), Daudiho bunky (ATCC CCL 213), bunky RPMI 8226 (ATCC CCL 155), bunky U-937 (ATCC CRL 1593), Bowesove bunky melanómu (ATCC CRL 9607), bunky sublínie WI-38VA13 2R4 (ATCC CLL 75.1) a bunky MOLT-4 (ATCC CRL 1582), ako aj rôzne heterohybridomálne bunky) pre účely produkcie hEPO pre konvenčnú frameceutickú dávku.

k) Aktivácia génu humánneho hGH a izolácia targetovaných primárnych, sekundárnych a imortalizovaných fibroblastov človeka použitím pozitívneho alebo kombinovaného, pozitívneho a negatívneho, selekčného režimu

Stratégia pre konštrukciu p5'hGH-mMT môže byť nasledovaná prídavným stupňom vloženia génu neo do susedstva promótora mMT. Okrem toho je možné do susedstva so sekvenciami HUMGHCSA v polylinkéri pUC12 zaviesť negatívny selekčný marker, napríklad gpt (z pMSG (Pharmacia) alebo iného vhodného zdroja). V prvom prípade sa izolujú kolónie G418^r a podrobia sa screeningu pomocou PCR amplifikácie alebo analýzy DNA pripravenej zo zmesi kolónií reštrikčným enzýmom a hybridizáciou Souther s cieľom identifikácie targetovaných kolónií. V poslednom uvedenom prípade sa kolónie G418^r umiestia do média obsahujúceho tioxantín s cieľom selekcie na integráciu génu gpt (Besnard C. et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4139 až 4141 (1987)). Okrem toho sa môže gén HSV-TK umiestiť na opačnú stranu inzertu ako gpt, čo umožňuje selekciu na neo a proti ako gpt, tak aj TK rastom buniek v živnom médiu pre humánne fibroblasty s obsahom 400 ug/ml G418, 100 uM

6-tioxantínu a 25 ,ug/ml gancyklovírusu. Dvojitá negatívna selekcia by mala poskytnúť takmer absolútnu istotu pri výbere prípadov, kde targeting skutočne prebehol a konečné potvrdenie poskytuje analýza Southern blot. Vyššie popísané režimy targetingu sa tiež môžu použiť pri aktivácii expresie hGH v imortalizovaných humánnych bunkách (napríklad bunky HT1080 (ATCC CCL 121), bunky HeLa a deriváty buniek HeLa (ATCC CCL 2, 2.1 a 2.2), bunky rakoviny prsníka MCF-7 (ATCC BTH 22), leukemické bunky K-562 (ATCC CCL 243), bunky karcinómu KB (ATCC CCL 17), bunky karcinómu vaječníkov 2780AD (Van Der Blick A.M. et al., Cancer Res., 48: 5927-5932 (1988)), Rajiho bunky (ATCC CCL 86), Jurkatove bunky (ATCC TIB 152), Namalwove bunky (ATCC CRL 1432), bunky HL-60 (ATCC CCL 240), Daudiho bunky (ATCC CCL 213), bunky RPMI 8226 (ATCC CCL 155), bunky U-937 (ATCC CRL 1593), Bowesove bunky melanómu (ATCC CRL 9607), bunky sublínie WI-38VA13 2R4 (AtTCC CLL 75.1) a bunky MOLT-4 (ATCC CRL 1582), ako aj rôzne heterohybridomálne bunky) pre účely produkcie hEPO pre konvenčnú farmaceutickú dávku.

Targetingové konštrukty pripravené podľa príkladov 1f a 1i a použité v príkladoch 1g, 1h, 1j a 1k môžu byť modifikované tak, aby obsahovali amplifikovateľný selektovateľný marker (napríklad ada, dhfr alebo CAD)m, čo je užitočné pre selekciu buniek, v ktorých je amplifikovaný aktivovaný endogénny gén a amplifikovateľný selekčný marker. Také bunky, ktoré exprimujú, alebo ktoré sú schopné exprimovať endogénny gén kódujúci terapeutický produkt, môžu slúžiť na produkciu proteínov (napríklad hGH alebo hEPO) alebo pre konvenčnú dodávku farmaceutického činidla, tj. pre génovú terapiu.

1) Transfekcia primárnych a sekundárnych fibroblastov exogénnou DNA a selektovateľným markerovým génom elektroporáciou

Exponenciálne rastúce fibroblasty alebo fibroblasty v skorej stacionárnej fáze sa trypsinizujú a spláchnu z povrchu plastu živným médiom. Odoberie sa alikvótna vzorka bunkovej suspenzie s cieľom spočítania buniek a ostatné bunky sa

odstredia. Odsaje sa supernatant a peleta sa resuspenduje v 5 ml elektroporačnom pufri (20mM HEPES s pH 7,3, 137mM chlorid sodný, 5mM chlorid draselný, 0,7mM hydrogenfosforečnan sodný a 6mM dextróza). Bunky sa opäť odstredia, supernatant sa odsaje a potom sa bunky resuspendujú v elektroporačnom pufri obsahujúcom 1 mg/ml acetylovaného albumínu z hovädzieho séra. Výsledná bunková suspenzia obsahuje približne 3 x 10^6 buniek/ml. Elektroporácia by sa mala uskutočňovať ihneď po resuspendovaní. Plazmidová DNA v podobe nadskrutkovice sa pridá do sterilnej kyvety (medzera medzi elektródami 4 mm; Bio-Rad Laboratories). Konečná koncentrácia DNA je približne aspoň 120 ,ug/ml. Potom sa do kyvety pridá 0,5 ml bunkovej suspenzie obsahujúcej asi 1,5 x 10^6 buniek a bunková suspenzia sa jemne premieša s roztokom DNA.

Elektroporácia sa uskutočňuje použitím zariadenia Genepulser (Bio-Rad), pričom kapacita je nastavená na 960 ,uF a napätie na 250 až 300 V. Úmerne so zvyšovaním napätia sa znižuje prežitie buniek, ale dramaticky sa zvyšuje percentný podiel preživších buniek so stabilne zavedenou DNA do genómu. Pri týchto podmienkach by mala doba pulzu trvať približne 14 až 20 ms.

Elektroporované bunky sa uchovávajú pri teplote miestnosti počas asi 5 minút a potom sa obsah kyvety jemne odstráni sterilnou prenosovou pipetou. Bunky sa priamo pridajú do 10 ml predhriateho živného média (médium popísané vyššie s obsahom 15 % teľacieho séra) v 10cm miske a inkubujú sa pri vyššie uvedených podmienkach. Nasledujúci deň sa médium odsaje a potom nasleduje ďalšia 16 až 24-hodinová inkubácia. Subkultúra buniek pre stanovenie účinnosti klonovania a pre selekciu na G418-rezistentné kolónie sa vytvorí nasledujúci deň. Bunky sa trypsinizujú, spočítajú a navzorkujú na médium. Obvykle sa fibroblasty aplikujú pri koncentrácii 10^3 buniek/10cm miska (v prípade stanovenia účinnosti klonovania) a pri koncentrácii 1 až 2 x 10^4 buniek/10cm miska (v prípade selekcie na rezistenciu voči G418).

Selekcia humánnych fibroblastov na rezistenciu voči G418 sa

uskutočňuje v médiu obsahujúcom 300 až 400 ,ug/ml G418 (geneticín disulfát), čo je soľ s približne 50% účinnosťou; Gibco) v živnom médiu pre fibroblasty (z 15 % teľacieho séra). Účinnosť klonovania sa stanoví za neprítomnosti G418. Navzorkované bunky sa inkubujú 12 až 14 dní a po tejto dobe sa kolónie fixujú formalínom, ofarbia kryštálovou fialovou a spočítajú (v miskách určených na stanovenie účinnosti klonovania) alebo sa izolujú použitím klonovacích valcov (v miskách s G418). Elektroporácia a selekcia králičích fibroblastov sa uskutočňuje v podstate rovnakým spôsobom ako v prípade humánnych fibroblastov, len s tým rozdielom, že sa použijú odlišné selekčné podmienky. Králičie fibroblasty sa podrobia selekcii na rezistenciu voči G418 v médiu s obsahom 1 g/ml G418.

Fibroblasty sa izolujú z čerstvo odrezanej predkožky človeka. Kultúry sa zaočkujú použitím 50 000 buniek/cm. Použije sa DMEM z 10 % teľacieho séra. Ak sú kultúry konfluentné, fibroblasty sa zozbierajú trypsinizáciou a elektroporáciou sa uskutoční transfekcia. Elektroporačné podmienky sa vyhodnotia transfekciou plazmidom pcDNEO (pozri obr. 5). Reprezentatívny elektroporačný experiment, pri ktorom sa používajú takmer optimálne podmienky (60 ,ug plazmidu pcDNEO pri elektroporačnom napätí 250 V a kapacitancii 960 ,uF), vedie k vzniku jednej G418 kolónie na 588 ošetrených buniek (0,17 % všetkých ošetrených buniek), tj. jednu G418 kolóniu na 71 klonovateľných buniek (1,4 %).

Ak sa uskutoční 9 oddelených elektroporačných experimentov pri takmer optimálnych podmienkach (60 ,ug plazmidu pcDNEO pri elektroporačnom napätí 300 V a kapacitancii 960 ,uF), získa sa priemerne 1 kolónia G418 na 1899 ošetrených buniek (0,05 %), pričom namerané rozmedzie je 1/882 až 1/7 500 ošetrených buniek. To zodpovedá v priemere 1 kolónii G418 na 38 klonovateľných buniek (2,6 %).

Nízkopasážové primárne humánne fibroblasty sa prevedú na bunky exprimujúce hGH kotransfekciu s plazmidmi pcDNEO a pXGH5.

Obvykle sa 60 ,ug ekvimolárnej zmesi obidvoch plazmidov transfekuje pri takmer optimálnych podmienkach (elektroporačné napätie 300 V a kapacitancia nastavená na 960 ,uF). Výsledky tohoto experimentu vedú k vzniku jednej kolónie G418 na 14 705 ošetrených buniek.

Dáta expresie hGH pre tieto a iné bunky izolované pri totožných transfekčných podmienkach sú sumarizované ďalej. Nakoniec je možné 98 % všetkých G418^r kolónií expandovať pre vytvorenie masových kultúr.

Počet analyzovaných klonov G418^r	154
Počet klonov exprimujúcich G418^r/hGH	65
Priemerná úroveň expresie hGH	2,3 ,ug hGH/10^6 buniek/24 h
Maximálna úroveň expresie hGH	23,0 ,ug hGH/10^6 buniek/24 h

Stabilné transfektanty boli tiež získané elektroporáciou primárnych alebo sekundárnych humánnych fibroblastov použitím pXGH301, konštruktu DNA, v ktorom sú prítomné gény neo a hGH v rovnakej plazmidovej molekule. Pomocou dvojstupňového postupu sa skonštruuje pXGH301. Z pBR322 (polohy pBR322 23 až 651) sa izoluje SalI-ClaI fragment a ten sa vloží do SalI-ClaI štiepeného pcDNEO, pričom sa zavedie miesto BamHI pred (proti smeru expresie) SV40 skoro promotujúcu oblasť pcDNEO. Tento plazmid pBNERO sa štiepi BamHI a izoluje sa 2,1kb fragment obsahujúci gén neo pod kontrolou SV40 skorého promótora. Tento fragment sa vloží do pXGH5 štiepeného BamHI. Plazmid s jednou inzerciou 2,1kb fragmentu BamHI sa izoluje, v ktorom neo a hGH sú prepísané v rovnakom vzájomnom smere. Tento plazmid sa označí šifrou pXGH301. Tak napríklad sa 1,5 x 10^6 buniek elektroporuje 60 ,ug pXGH301 pri napätí 300 V a kapacitancii 960 ,uF. Z transfekovaných sekundárnych fibroblastov sa izolujú kolónie rezistentné voči G418 pri početnosti 652 G418 rezistentných kolónií na 1,5 x 10 ošetrených buniek (1/2 299 ošetrených buniek). Približne 59 % týchto kolónií exprimuje hGH.

P r í k l a d 2

Konštrukcia targetingových plazmidov, ktoré poskytujú chimerické transkripčné jednotky, v ktorých sú fuzionované sekvencie humánneho rastového hormónu a erytropoetínu

Nasledujúci príklad slúži na ilustráciu dvoch ďalších realizácií tohoto vynálezu, pri ktorých sa normálna regulačné sekvencie pred (proti smeru expresie) génom humánneho erytropoetínu (hEPO) modifikujú tak, aby umožnili expresiu humánneho erytropoetínu v primárnych alebo sekundárnych kmeňoch fibroblastov, ktoré v netransfekovanom stave, v akom sa získajú, neexprimujú detegovateľné množstvo hEPO. V týchto realizáciách sú produkty targetingu chimerické transkripčné jednotky, v ktorých je prvý exón génu humánneho rastového hormónu umiestený pred exóny 2 až 5 hEPO. Produktom transkripcie, zostrihu a translácie je proteín, v ktorom sú aminokyseliny 1 až 4 signálneho peptidu hEPO nahradené aminokyselinovými zvyškami 1 až 3 z hGH. Dve uvádzané realizácie sa od seba odlišujú relatívnymi polohami tretích regulačných sekvencií, ktoré sú vložené a špecifickým profilom zostrihu, ku ktorému musí dôjsť, aby vznikol finálny upravený transkript.

Skonštruuje sa plazmid pXEPO-10 pre nahradenie exónu 1 hEPO exónom 1 hGH génovým targetingom na endogénny gén hEPO v humánnom chromozóme 7. Plazmid pXEPO-10 sa skonštruuje takto: najprv sa skonštruuje intermediárny plazmid pT163 vložením 6kb fragmentu HindIII-BamHI (pozri príklad 1f) ležiaceho pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou hEPO do pBluescriptIISK/+ (Stratagene, LaJolla, CA, USA) štiepeného HindIII-BamHI. Produkt tejto ligácie sa štiepi XhoI a HindIII a liguje k 1,1kb HidnIII-XhoI fragmentu z pMClneoPolyA (Thomas K.R. a Capecchi M.R., Cell 51: 503 až 512 (1987), ktorý je dostupný od firmy Stratagene, LaJolla, CA, USA) pre vytvorenie PT163. Oligonukleotidy 13.1 - 13.4 sa využijú pri reakciách PCR pre vytvorenie fuzionovaného fragmentu, v ktorom sú sekvencie myšacieho metalotioneínového 1 (mMT-I) promótora - hGH exónu 1

prídavne fuzionované k sekvenciám hEPO intrónu 1.

Najprv sa oligonukleotidy 13.1 a 13.3 použijú pre amplifikáciu približne 0,73kb fragmentu mMT-I promótor - hGH exón 1 z pXGH5 (obr. 5). Potom sa oligonukleotidy 13.2 a 13.4 použijú pre amplifikáciu približne 0,57kb fragmentu, ktorý je zložený prevažne z hEPO intrónu z humánnej genómovej DNA. Nakoniec sa tieto dva amplifikované fragmenty zmiešajú a ďalej amplifikujú s oligonukleotidmi 13.1 a 13.4 s cieľom vytvorenia finálneho fuzionovaného fragmentu (fuzionovaný fragment 3) lemovaného miestom SalI na 5' strane zoskupenia mMT-I a miestom XhoI na 3' strane sekvencie intrónu 1 hEPO. Fuzionovaný fragment 3 sa štiepi XhoI a SalI a liguje k pT163 štiepenému XhoI. Ligačná zmes sa transformuje do E. coli a klon, obsahujúci jeden inzert fuzionovaného fragmentu 3, v ktorom je miesto XhoI regenerované na 3' strane sekvenciou intrónu 1 hEPO, sa identifikuje a označí šifrou 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 AC**CTGTAGCC ATTGCCGCTA** GG
(SEQ ID NO 7)

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

Oblasť oligopeptidu 13.1, ktorá nie je vytlačená hrubo, je identifikovaná ako oblasť promótora mMT-I s prirodzeným miestom KpnI pri jej 5' konci. Tučné vytlačená oblasť označuje chvost s miestom SalI pre konverziu 5' hranice na miesto SalI. Hrubo vytlačená oblasť oligomérov 13.2 a 13.3 označuje sekvencie hGH,

zatiaľ čo oblasti, ktoré nie sú vytlačené hrubo, predstavujú sekvencie intrónu 1 z génu hEPO. Oblasť v oligomére 13.4, ktorá nie je vytlačená hrubo, je totožná s poslednými 25 bázami intrónu 1 hEPO. Hrubo vytlačená oblasť zahrnuje chvost s miestom XhoI pre konverziu 3' hranice amplifikovaného fragmentu na miesto XhoI.

Plazmid pXEPO-11 sa zostrojí s cieľom zavedenia promótora mMT-I a exónu 1 hGH proti smeru expresie štruktúrneho génu hEPO a promótorovej oblasti do endogénneho loku hEPO v humánnom chromozóme 7 génovým targetingom.

Plazmid pXEPO-11 sa skonštruuje takto: Oligonukleotidy 13.1 a 13.5 až 13.7 sa využijú pri reakciách PCR pre vytvorenie fuzionovaného fragmentu, v ktorom sú sekvencie myšacieho metalotioneínového 1 (mMT-I) promótora - hGH exónu 1 prídavne fuzionované k sekvenciám hEPO od -1 do 630 vzhľadom na kódovacie oblasti hEPO. Najprv sa oligonukleotidy 13.1 a 13.6 použijú pre amplifikáciu približne 0,75kb fragmentu mMT-I promótor - hGh exón 1 z pXGH5 (obr. 5).

Potom sa oligonukleotidy 13.5 a 13.7 použijú pre amplifikáciu približne 0,65kb fragmentu humánnej genómovej DNA, ktorý je zložený prevažne zo sekvencií hEPO od -1 do -620 vzhľadom na kódujúcu oblasť hEPO. Obidva oligonukleotidy 13.5 a 13.6 obsahujú 10bp likérovú sekvenciu umiestenú v oblasti hGH intrón 1 - hEPO promótor, ktorá zodpovedá donorovému miestu zostrihu intrónu 1 hEPO.

Nakoniec sa tieto dva amplifikované fragmenty zmiešajú a ďalej amplifikujú s oligonukleotidmi 13.1 a 13.7 s cieľom vytvorenia finálneho fuzionovaného fragmentu (fuzionovaný fragment 6) lemovaného miestom SalI na 5' strane zoskupenia mMT-I a miestom XhoI na 3' strane oblasti promótora hEPO. Fuzionovaný fragment 6 sa štiepi XhoI a SalI a liguje sa k pT163 štiepenému XhoI. Ligačná zmes s transformuje do E. coli a klon obsahujúci jeden inzert fuzionovaného fragmentu 6, v ktorom je miesto XhoI regenerované na 3' strane sekvenciou promótora hEPO

sa identifikuje a označí šifrou pXEPO-11.

13.5 5' **GACAGCTCAC CTAGCGGCAA TGGCTACAGG** *TGAGTACTC*
AAGCTTCTGG GCTTCCAGAC CCAG]SEQ ID NO 9)
HindIII

13.6 5' CTGGGTCTGG AAGCCCAGAA GCTT*GAGTAC TCAC***CTGTAG**
HindIII
CCATTGCCGC TAGGTGAGCT TGC (SEQ ID NO 10)

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

Oblasti oligopeptidu 13.5 a 13.6, ktoré sú vytlačené hrubo, označujú sekvencie hGH. Oblasti vytlačené kurzívou zodpovedajú prvým 10 bp intrónu 1 hEPO. Zvyšok oligopeptidov zodpovedá sekvenciám hEPO od -620 do -597 relatívne vzhľadom na kódujúcu oblasť hEPO. Oblasť vytlačená hrubo zahrnuje chvost s miestom XhoI pre konverziu 3' hranice amplifikovaného fragmentu na miesto XhoI.

Plazmid pXEPO-10 sa môže použiť pre génový targeting tak, že sa pomocou BamHI a XhoI vyštiepi 7,3kb fragment obsahujúci produkt mMT-I/hGH, ktorý je z obidvoch strán lemovaný sekvenciami hEPO. Tento fragment (targetingový fragment 1) neobsahuje žiadne kódujúce sekvencie hEPO, ale obsahuje len sekvencie ležiace medzi polohou -620 a približne -6620 proti smeru expresie do kódujúcej oblasti hEPO a sekvencie intrónu 1 hEPO na riadenie targetingu na lokus humánneho EPO.

Targetingový fragment 1 sa transfekuje do primárnych alebo sekundárnych fibroblastov z ľudskej kože použitím podobných podmienok, aké sú uvedené v príklade 1c. G418-rezistentné kolónie sa zozbierajú z jednotlivých jamiek 96-jamkových platničiek a podrobia sa screeningu na expresiu EOP testom ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Bunky, v ktorých sa transfekčná

DNA integruje náhodne do humánneho genómu, nemôžu produkovať EPO. Bunky, v ktorých transfekčná DNA podľahla homológnej rekombinácii s intrónom 1 endogénneho hEPO a sekvenciami hEPO umiestenými proti smeru expresie a ďalšími sekvenciami hEPO, obsahujú chimerický gén, v ktorom mMT-I promótor a neprepísané sekvencie a hGH 5' nepreložené sekvencie a hGH exón 1 nahradzujú normálny hEPO promótor a hEPO exón 1 (pozri obr. 1). Sekvencie, ktoré nepochádzajú z hEPO v targetingovom fragmente 1 sú pripojené k sekvenciám hEPO za (v smere expresie) intrónom 1 hEPO. Nahradenie normálnej regulačnej oblasti hEPO promótorom mMT-1 aktivuje gén EPO vo fibroblastoch, ktoré normálne hEPO neexprimujú. Nahradenie exónu 1 hEPO exónom 1 hGH má za následok vznik proteínu, v ktorom sú štyri prvé aminokyseliny signálneho peptidu hEPO nahradené aminokyselinami 1 až 3 z hGH, za vzniku funkčného chimerického signálneho peptidu, ktorý sa z maturovaného proteínu odstráni posttranslačným spracovaním a vylúči sa z exprimujúcich buniek.

Plazmid pXEPO-11 sa môže použiť pre génový targeting tak, že sa pomocou BamHI a XhoI vyštiepi 7,4kb fragment obsahujúci fuzionovaný produkt mMT-I/hGH, ktorý je z obidvoch strán lemovaný sekvenciami hEPO. Tento fragment (targetingový fragment 2) neobsahuje žiadne kódujúce sekvencie hEPO, ale obsahuje len sekvencie ležiace medzi polohou -1 a približne -6620 proti smeru expresie od kódujúcej oblasti hEPO na riadenie targetingu na lokus humánneho EPO.

Targetingový fragment 2 sa transfekuje do primárnych alebo sekundárnych fibroblastov z ľudskej kože pri použití podobných podmienok, aké sú uvedené v príklade 1g. G418-rezistentné kolónie sa zozbierajú z jednotlivých jamiek 96-jamkových platničiek a podrobia sa screeningu na expresiu EPO testom ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Bunky, v ktorých sa transfekčná DNA integruje náhodne do humánneho genómu, nemôžu produkovať EPO. Bunky, v ktorých transfekčná DNA podľahla homológnej rekombinácii s endogénnym promótorom hEPO a sekvenciami hEPO umiestenými proti smeru expresie, obsahujú chimerický gén, v ktorom mMT-I promótor

a neprepísané sekvencie a hGH 5' nepreložené sekvencie a hGH exón 1 a 10bp linkér skladajúci sa z prvých 10 báz hEPO intrónu 1 sú vložené do miesta HindIII ležiaceho v polohe -620 relatívne vzhľadom na kódujúcu oblasť hEPO (pozri obr. 2).

Umiestenie promótora mMT-I v smere proti smeru expresie od normálne tichého promótora hEPO bude riadiť syntézu nasledujúcej informácie v primárnych alebo sekundárnych fibroblastoch kože: (5' až 3') nepreloženej sekvencie metalotioneínu a hGH, hGH exón 1, 10 báz DNA identických s prvými 10 bp hEPO intrónu 1 a normálny hEPO promótor a hEPO exón 1 (-620 až +13 vzhľadom na kódujúcu oblasť hEPO). 10bp sekvencia linkéra z intrónu 1 hEPO pôsobí ako donorové miesto zostrihu pre fúziu hGH exónu 1 k nasledujúcemu (v smere expresie) akceptorovému miestu zostrihu, ktoré leží bezprostredne pred (proti smeru expresie) exónom 2 hEPO. Pri úprave výsledného transkriptu sa preto zostrihom odstráni exón 1 promótora hEPO a sekvencia intrónu 1. Nahradenie exónu 1 hEPO exónom 1 hGH má za následok vznik proteínu, v ktorom sú štyri prvé aminokyseliny signálneho peptidu hEPO nahradené aminokyselinami 1 až 3 z hGH, za vzniku funkčného chimerického signálneho peptidu, ktorý sa z maturovaného proteínu odstráni posttranslačným spracovaním a vylúči sa z exprimujúcich buniek.

Pomocou známych postupov je možné zostrojiť sériu konštruktov, ktoré sa podobajú pXEPO-10 a pXEPO-11. V týchto konštruktoch sa môžu relatívne polohy sekvencií promótora mMT-I a hGH, ako aj poloha, v ktorej sa sekvencie mMT-I/hGH vkladajú do predných (proti smeru expresie) sekvencií hEPO, meniť s cieľom vytvorenia alternatívnych chimerických transkripčných jednotiek, ktoré uľahčujú targeting génu, dosiahnutie účinnejšej expresie fuzionovaných transkriptov alebo iných požadovaných vlastností. Takéto konštrukty budú poskytovať podobné výsledky tak, že sa fuzionovaný gén hGH hEPO umiesti pod kontrolu exogénneho promótora targetingom génu na normálny lokus hEPO.

Tak napríklad 6kb fragment HidnIII-BamHI umiestený proti smeru expresie od génu hEPO (pozri príklad 1f) obsahuje množstvo

sekvencií rozpoznávaných reštrikčným enzýmom, ktoré sa dajú použiť ako miesto na vloženie génu neo a fuzionovaného fragmentu mMT-I promótor/hGH. Jedným z takýchto miesto je miesto BglII ležiace približne 1,3 kb pred (proti smeru expresie) miestom HindIII. Toto miesto je jedinečné v tejto oblasti a môže sa použiť na vloženie jedného alebo viacerých selektovateľných markerov a regulačnej oblasti pochádzajúcej z iného génu, ktorá bude slúžiť na aktiváciu expresie hEPO v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných humánnych bunkách.

Najprv sa skonštruuje intermediárny plazmid pT164 vložením 6kb fragmentu HindIII-BamHI (príklad 1f) ležiaceho pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou hEPO do pBluescriptIISK+ (Stratagene, LaJolla, Kalifornia, USA), štiepeného HindIII-BamHI. Plazmid pMClneoPolyA (Thomas K.R. a Capecchi M.R., Cell 51: 503 až 512 (1987), ktorý je dostupný od firmy Stratagene, LaJolla, CA, USA) sa štiepi BamHI a XhoI, konce sa otupia Klenowovým fragmentom z E. coli DNA polymerázy a výsledný 1,1kb fragment sa purifikuje. pT164 sa štiepi BglII a konce sa otupia Klenowovým fragmentom z E. coli DNA polymerázou. DVA vyššie uvedené fragmenty s tupými koncami sa spolu ligujú a vzniknutý produkt sa transformuje do kompetentných buniek E. coli. Klony obsahujúce jediný inzert 1,1kb fragmentu neo sa izolujú a analyzujú reštrikčným enzýmom pre identifikáciu klonov, v ktorých je miesto BglII regenerované fúziou tupých miest XhoI a BglII umiestené 1,3 kb od jedinečného miesta HindIII umiesteného v plazmide pT164. Výsledný plazmid pT165 sa teraz môže štiepiť v jedinečnom mieste BglII lemujúcom 5' stranu transkripčnej jednotky neo.

Oligonukleotidy 13.8 a 13.9 sa využijú pri reakciách PCR na vytvorenie fuzionovaného fragmentu, v ktorom sú sekvencie myšacieho metalotioneínového 1 (mMT-I) promótora - hGH exónu 1 prídavne fuzionované k 10bp fragmentu obsahujúcemu donorové miesto zostrihu. Zvolené donorové miesto zostrihu zodpovedá donorovému miestu zostrihu intrónu 1 prírodného hEPO, napriek tomu, že sa môže použiť väčší počet donorových miest zostrihu

alebo konvenčných donorových miest zostrihu. Oligonukleotidy (13.8 a 13.9) sa použijú na amplifikáciu približne 0,73kb fragmentu mMT-I promótor - hGH exón 1 z pXGH5 (obr. 5). Amplifikovaný fragment (fragment 7) sa štiepi BhlII a liguje do BhlII štiepeného pT165. Ligačná zmes sa transformuje do E. coli a identifikuje sa klon obsahujúci jeden inzert fragmentu 7, v ktorom miesto KpnI v promótore mMT-I susedí s 5' koncom génu neo a mMT-I promótor je orientovaný tak, že je transkripcia riadená smerom k jedinečnému miestu HindIII, ktorý sa označí šifrou pXEPO-12.

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

Oblasť oligonukleotidu 13.8, ktorá nie je vytlačená hrubo, sa identifikuje ako oblasť promótora mMT-I s prírodným miestom KpnI pri svojej 5' hranici. Oblasť vytlačená hrubo označuje chvost s miestom BglII pre konverziu 5' hranice na miesto BglII.

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

Oblasť oligonukleotidu 13.9, ktorá je vytlačená hrubo, označuje sekvencie hGH. Oblasť vytlačená kurzívou zodpovedá prvým 10 bp intrónu 1 hEPO. Podčiarknuté miesto BglII je pridané pre ciele konštrukcie plazmidu. Plazmid pXEPO-12 sa môže použiť pre génový targeting tak, že sa pomocou BamHI a HindIII vyštiepi 7,9kb fragment obsahujúci gén neo a fuzionovaný produkt mMT-I/hGH, ktorý je z obidvoch strán lemovaný sekvenciami hEPO. Tento fragment (targetingový fragment 3) neobsahuje žiadne kódujúce sekvencie hEPO, ale obsahuje len sekvencie ležiace približne medzi polohou -620 a približne -6620 proti smeru expresie od kódujúcej oblasti hEPO na riadenie targetingu na miesto umiestené pred (proti smeru expresie) od loku humánneho EPO.

Targetingový fragment 3 sa transfekuje do primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných fibroblastov z ľudskej kože pri použití podobných podmienok, aké sú uvedené v príklade 1b a 1c. G418-rezistentné kolónie sa zozbierajú z jednotlivých 96-jamkových platničiek a podrobia sa screeningu na expresiu EPO testom ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Bunky, v ktorých sa transfekčná DNA integruje náhodne do humánneho genómu, nemôžu produkovať hEPO. Bunky, v ktorých transfekčná DNA podľahla homológnej rekombinácii s endogénnym promótorom hEPO a sekvenciami hEPO umiestenými proti smeru expresie, obsahujú chimerický gén, v ktorom mMT-I promótor a neprepísané sekvencie, hGH 5′ nepreložené sekvencie a hGH exón 1 a 10pb linkér skladajúci sa z prvých 10 báz hEPO intrónu 1 sú vložené do miesta BglII ležiaceho približne v polohe -1920 relatívne vzhľadom na kódujúcu oblasť hEPO.

Promótor mMT-I umiestený pred (proti smeru expresie) normálne tichým promótorom hEPO bude riadiť syntézu, v primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných fibroblastoch kože (alebo iných humánnych bunkách), informácia, ktorá znie takto: (5′ až 3′) nepreložené sekvencie metalotioneínu a hGHm hGH exón 1, 10 báz DNA identických s prvými 10 bp hEPO intrónu 1 a predná (proti smeru expresie) oblasť hEPO a hEPO exónu 1 (približne v rozmedzí od -1920 do +13 vzhľadom na kódujúcu oblasť hEPO). 10bp sekvencia linkéra z intrónu 1 hEPO pôsobí ako donorové miesto zostrihu pre fúziu hGH exónu 1 k nasledujúcemu (v smere expresie) akceptorovému miestu zostrihu, ktoré leží bezprostredne pred (proti smeru expresie) exónom 2 hEPO. Pri úprave výsledného transkriptu sa preto zostrihom odstráni predná (proti smeru expresie) sekvencia hEPO, exón 1 promótora hEPO a sekvencia intrónu 1.

Ak sa použije pXEPO-10, pXEPO-11 a pXEPO-12, môže sa posttranskripčná úprava informácie zlepšiť použitím in vitro mutagenézy pre elimináciu akceptorového miesta zostrihu ležiaceho v predných (proti smeru expresie) sekvenciách hEPO medzi

promótorom mMT-I a hEPO exónom 1, čo má za následok zníženie úrovne produktívnych zostrihov, ktoré sú potrebné na vytvorenie požadovanej informácie. Nahradenie exónu 1 hEPO exónom 1 hGH má za následok vznik proteínu, v ktorom sú štyri prvé aminokyseliny signálneho peptidu hEPO nahradené aminokyselinami 1 až 3 z hGH, za vzniku funkčného chimerického signálneho peptidu, ktorý sa z maturovaného proteínu odstráni posttranslačným spracovaním a vylúči sa z exprimujúcich buniek.

P r í k l a d 3

Targetovaná modifikácia sekvencií proti smeru expresie a amplifikácia targetovaného génu

Ľudské bunky, v ktorých bol gén hEPO aktivovaný spôsobmi popísanými vyššie, môžu byť indukované pre amplifikáciu transkripčnej jednotky neo/mMT-I/EPO, ak targetovaný plazmid obsahuje markerový gén, ktorý môže dodať rezistenciu voči vysokej hladine cytotoxického činidla pomocou amplifikácie génu.

Selektovateľné markerové gény,ako je dihydrofolát reduktáza (dhfr, selekčné činidlo: methotrexate), multifunkčný gén CAD (kódujúci karbamylfosfát syntázu, aspertát transkarbamylázu a dihydro-orotázu; selekčné činidlo: N-(fosfonoacetyl)-L--aspartát (PALA)), glutamín syntetáza (selekčné činidlo: metionín, sulfoximín (MSX)) a adenozín deamináza (ada; selekčné činidlo: adenínnukleozid) boli dokumentované okrem iných génov ako gény amplifikovateľné v imortalizovaných humánnych bunkových líniách (Wright J.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1791 až 1795 (1990); Cockett M.I. et al., Bio/Technology 8: 662 až 667 (1990)).

Pri týchto štúdiách bolo zistené, že amplifikácia génu prebieha v množstve línií imortalizovaných ľudských buniek. Pri vhodných selekčných podmienkach vykazujú amplifikáciu okrem iného bunky karcinómu KB alebo bunky karcinómu vaječníkov 2780AD.

Plazmidy pXEPO-10 a pXPOE-11 môžu byť modifikované vložením normálneho alebo mutantného génu dhfr do jedinečného miesta HindIII tohoto plazmidu. Po transfekcii buniek HT1080 príslušnou DNA, selekcii na rezistenciu voči G418 (dodanú génom neo) a identifikácii buniek, v ktorých je gén hEPO aktivovaný génovým targetingom sekvencií neo, dhfr a mMT-I do správnej polohy pred (proti smeru expresie) génom hEPO, sa tieto bunky môžu podrobiť stupňovitej selekcii pomocou methotrexate (MTX), s cieľom selekcie na amplifikáciu dhfr a koamplifikáciu pripojených sekvencií neo, mMT-I a hEPO (Kaufman R.J., Technique 2: 221 až 236 (1990)). Používa sa stupňovitý selekčný režim, pri ktorom sa bunky najprv exponujú nízkej hladine MTX (0,01 až 0,08 uM) a potom sa postupne koncentrácia MTX zvyšuje až do 250 uM alebo vyššej. Pri selekcii na amplifikované transfekované bunkové línie budú účinné lineárne stupňovité prírastky 0,04 až 0,08 uM MTX a nasledujúce dvojnásobné zvýšenie koncentrácie MTX, napriek tomu, že je možné účinne použiť aj rôzne pomerne malé prírastky koncentrácie MTX.

Amplifikácia sa monituruje na základe zvyšovania počtu kópií génu dhfr a potvrdzuje sa meraním in vitro expresie hEPO. Použitím tejto stratégie sa môže pomocou targetovanej modifikácie sekvencií ležiacich úplne mimo kódujúcu oblasť hEPO dosiahnuť významná nadexpresia hEPO.

Konštrukty, ktoré sa podobajú konštruktom vyššie popísaným (príklady 1f, 1h, 1i, 1k, 2 a 7), pre aktiváciu expresie hGH v humánnych bunkách je tiež možné ďalej modifikovať génovým targetingom do nekódujúcich sekvencií a následnou amplifikáciou tak, aby obsahovali gén dhfr pre ciele získania buniek, ktoré vykazujú nadexpresiu génu hGH.

P r í k l a d 4

Targeting a aktivácia loku humánneho EPO v línii imortalizovaných ľudských fibroblastov

Zostrojí sa targetingový konštrukt pXEPO-13 na overenie hypotézy, že by bolo možné aktivovať endogénny gén hEPO v humánnych fibroblastoch.

Najprv sa skonštruuje plazmid pT22.1 obsahujúci 63 bp genómové sekvencie hEPO pred (proti smeru expresie) prvým kodónom génu hEPO fuzionovaný k myšaciemu metalotioneínovému-1 promótoru (mMT-I). Pre fúziu sekvencií mMT-I a hEPO sa použije PCR pri použití oligonukleotidov 22.1 až 22.4. Tieto priméry majú tieto vlastnosti: primér 22.1 je 21b oligonukleotid, ktorý je homológny voči segmentu promótora mMT-I začínajúcemu 28bp pred (proti smeru expresie) miestom KpnI mMT-I; priméry 22.2 a 22.3 sú 58-nukleotidové komplementárne priméry definujúce fúziu sekvencií hEPO a mMT-I tak, že fuzionovaný produkt obsahuje 28 bp sekvencie hEPO so začiatkom v 35 báze pred (proti smeru expresie) prvým kodónom génu hEPO a sekvencie mMT-I so začiatkom pri báze 29 oligonukleotidu 22.2 s obsahom prírodného miesta BhlII mMT-I a so zásahom 30 báz do sekvencie mMT-I; primér 22.4 he dlhý 21 nukleotidov je homológny voči sekvenciám hEPO začínajúcim 725 bp za (v smere expresie) od prvého kodónu génu hEPO.

Tieto parametre sa použijú pre amplifikáciu 1,4kb fragmentu DNA obsahujúceho fuzionované sekvencie mMT-I a hEPO (pozri vyššie). Výsledný fragment sa štiepi KpnI (PCR fragment obsahuje dve miesta KpnI; jedno prírodné miesto KpnI v oblasti promótora mMT-I a jedno prírodné miesto KpnI v sekvencii hEPO) a purifikuje sa. Plazmid pXEOP-1 sa tiež štiepi KpnI, pričom sa uvoľní 1,4kb fragment a 6,4kb fragment. 6,4kb fragment sa purifikuje a liguje k 1,4kb KpnI PCR fuzionovanému fragmentu. Výsledný konštrukt sa označí šifrou pT22.1.

Druhý medziprodukt, pT22.2, sa skonštruuje ligáciou približne 6kb fragmentu HindIII-BamHI ležiaceho pred (proti smeru expresie) štruktúrnym génom hEPO (pozri príklad 1f) k pBSIISK+ (Stratagene, LaJolla, CA, USA) štiepenému BamHI a HindIII.

Tretí medziprodukt, pT22.3, sa skonštruuje tak, že sa najprv

vyreže 1,1kb fragment XhoI/BamHI z pMCINEOpolyA (Stratagene, LaJolla, CA, USA) obsahujúceho gén neomycín fosfotransferázy. Konce tohoto fragmentu sa potom otupia Klenowovým fragmentom, DNA polymerázou I (New England Biolabs), Vzniknutý fragment sa liguje k miestu HindIII pBSIISK+ (ktorého konce boli podobne otupené DNA polymerázou I) za vzniku pT22.3.

Štvrtý medziprodukt, pT22.4, sa vyrobí purifikáciou 1,1kb fragmentu XhoI/HindIII obsahujúceho gén neo z pT22.3 a vzniknutý fragment sa liguje k pT22.2 štiepenému XhoI a HindIII. pT22.4 teda obsahuje gén neo, ktorý prilieha na strane HindIII BamHI-HindIII fragmentu hEPO umiesteného vpredu (proti smeru expresie).

Nakoniec sa vytvorí pXEPO-13 tak, že sa najprv vyreže 2,0kb fragment EcoRI/AccI z pT22.1. Miesto EcoRI tohoto fragmentu definuje 5' hranicu promótora mMT-I, zatiaľ čo miesto AccI tohoto fragmentu leží v exóne 5 hEPO. Fragment AccI/EcoRI obsahuje takmer úplnú expresnú jednotku hEPO, v ktorej chýba len časť exónu 5 a prírodné polyadenylačné miesto. Tento 2,0kb fragment EcoRI/AccI sa purifikuje, jeho konce sa otupia spracovaním Klenowovým fragmentom, DNA polymerázou I a liguje k pT22.4 s tupými koncami štiepenému XhoI.

Bunky HT1080 sa transfekujú pXEPO-13 štiepeným PvuI/BamHI. pXEPO-13 štiepený týmto spôsobom poskytne 3 fragmenty" 1kb vektorový fragment obsahujúci časť génu amp a 1,7kb fragment obsahujúci zvyšné sekvencie vektora a tak približne 9kb fragment obsahujúci sekvencie hEPO, neo a mMT-I. Tento približne 9kb fragment BamHI/PvuI obsahuje nasledujúce sekvencie v poradí od miesta BamHI: približne 5,2 kb prednej (proti smeru expresie) genómovej sekvencie hEPO, 1,1 kb transkripčnej jednotky neo, 0,7 kb promótora mMT-I a 2,0kb fragment obsahujúci kódujúce sekvencie hEPO zrezané do exónu 5.

45 ,ug pXEPO-13 štiepeného týmto spôsobom sa použije pre elektroporáciu 12 miliónov buniek (pri elektroporačných

podmienkach popísaných v príklade 1b). Táto elektroporácia sa opakuje celkovo 8 x, takže sa jej podrobí celkovo 96 miliónov buniek. Bunky sa zmiešajú s médiom na bunkovú hustotu 1 milión buniek/ml a 1ml alikvótnej vzorky sa umiesti do celkovo 96 150mm platničiek pre tkanivové kultúry (Falcon), z ktorých každá obsahuje minimálne 35 ml DMEM/15% teľacieho séra. Nasledujúci deň sa médium odsaje a nahradí čerstvým médiom obsahujúcim 0,8 ug/ml G418 (Gibco). Po 10 dňoch inkubácie sa z každej platničky odoberie vzorka média pre analýzu ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) pre stanovenie hEPO. Šesť z 96 platničiek obsahuje prinajmenšom 10 mU/ml hEPO. Jedna z týchto platničiek (číslo 18) sa vyberie pre purifikáciu kolónií exprimujúcich hEPO. Každá z 96 150mm platničiek obsahuje približne 600 G418 rezistentných kolónií (odhaduje sa, že celkový počet G418 rezistentných kolónií vo všetkých 96 platničkách je 57 600). Približne 600 kolónií na platničke č. 18 sa trypsinizuje a v koncentrácii 50 buniek/ml opäť navzorkuje na platničky s 364 jamkami (Sterilin). Po jednom týždni inkubácie sú pozorovateľné jednotlivé kolónie s početnosťou približne 10 kolónií na veľkú jamku tejto 364-jamkovej platničky (použité platničky obsahujú 16 malých jamiek v rámci každej z 24 veľkých jamiek). V tejto dobe sa uskutoční u každej jamky screening na expresiu hEPO. Dve z veľkých jamiek obsahujú médium s aspoň 20 mU/ml hEPO. Jamka č. A2 obsahuje 15 kolónií rozdelených medzi 16 malých jamiek. Obsah každej z týchto malých jamiek sa trypsinizuje a prenesie do 16 veľkých jamiek 96-jamkovej platničky. Po 7 dňoch inkubácie sa z média z každej z týchto jamiek odoberie vzorka pre analýzu ELISA na hEPO. Len jedna jamka, jamka č. 10, obsahuje hEPO. Tento bunkový kmeň sa označí šifrou HT165-18A2-10 a expanduje sa v kultúre pre kvantitatívnu analýzu hEPO, izoláciu RNA a izoláciu DNA. Pri kvantitatívnom meraní produkcie hEPO sa zistí hodnota 2 500 mU/10^6 buniek/24 hodín.

Ako próba pre RNA izolovanú z buniek HT165-18A2-10 sa použije 0,2kb DNA zasahujúca od miesta AccI v exóne 5 hEPO do miesta BglII v 3' nepreloženej oblasti. Targetingový konštrukt, pXEPO-13 zrezaný v mieste AccI exónu 5 neobsahuje tieto

AccI/BglII sekvencie a slúži preto ako diagnostikum pre targeting v loku hEPO. Len kmene buniek, ktoré podľahli rekombinácii homológnym spôsobom so sekvenciami prírodného hEPO sú schopné produkovať sekvencie hEPO mRNA homológne k sekvenciám AccI/BglII. Zistilo sa, že HT165/18A2-10 exprimuje mRNA s predvídanou veľkosťou, ktorá hybridizuje s 32P-značenou AccI/BglII hEPO próbou na blotoch Northern. Analýza reštrikčným enzýmom a analýza Souther blot potvrdzuje, že gén neo a promótor MT-I bol zameraný na jednu z dvoch aliel hEPO v bunkách HT165-18A2-10.

Tieto výsledky ukazujú, že je možné použiť homológnu rekombináciu pre targeting regulačnej oblasti na gén, ktorý je normálne tichý v humánnych fibroblastoch, pričom dôjde k funkčnej aktivácii tohoto génu.

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)

P r í k l a d 5

Produkcia benzintrónových génov

Targeting génu je tiež možné použiť pre produkciu upraveného génu, ktorý neobsahuje intróny, pre transfer do kvasiniek alebo baktérií s cieľom expresie génu a in vitro produkcie proteínu. Spôsobom popísaným vyššie sa napríklad môže produkovať hGH v kvasinkách.

Zostroja sa dva separátne targetingové konštrukty.

Targetingový konštrukt 1 (TC1) zahrnuje retrovírusovú sekvenciu LTR, napríklad LTR vírusu Moloneyovej murínnej leukémie (MoMLV), marker pre selekciu v humánnych bunkách (napríklad gén neo z Tn5), marker pre selekciu v kvasinkách (napríklad kvasinkový gén URA3), regulačnú oblasť schopnú riadiť expresiu génu v kvasinkách (napríklad promótor GAL4) a poprípade sekvenciu, ktorá po fúzii k génu hGH umožní sekréciu hGH z kvasinkových buniek (vedúcu sekvenciu). Vektor môže tiež zahrnovať sekvenciu DNA, ktorá umožňuje retrovírusové obalenie (packaging) v ľudských bunkách. Tento konštrukt je organizovaný tak, že vyššie uvedené sekvencie sú na obidvoch stranách lemované hGH genómovými sekvenciami, ktoré po homológnej rekombinácii so sekvenciami genómovej hGH génu N budú integrovať exogénne sekvencie v TC1 bezprostredne pred (proti smeru expresie) kodónom 1 hGH génu N, (čo zodpovedá aminokyseline v polohe 1 maturovaného upraveného proteínu). Poradie sekvencií DNA pri integrácii je takéto: predné sekvencie hGH a regulačné sekvencie, gén neo, LTR, gén URA3, promótor GAL4, kvasinková vedúca sekvencia, hGH sekvencie vrátane a za aminokyselinou 1 maturovaného proteínu.

Targetingový konštrukt 2 (TC2) zahrnuje sekvencie dostačujúce pre replikáciu plazmidu v kvasinke (napríklad dvojmikrónový kruh alebo sekvencie ARS), kvasinkové sekvencie terminácie transkripcie, vírusovú LTR a markerový gén pre selekciu v ľudských bunkách (napríklad materiálny gén gpt). Tento konštrukt je organizovaný tak, že vyššie uvedené sekvencie sú na obidvoch stranách lemované hGH genómovými sekvenciami, ktoré po homológnej rekombinácii so sekvenciami genómového hGH génu N budú integrovať exogénne sekvencie v TC2 bezprostredne za (v smere expresie) stop kodónom hGH génu N. Poradie sekvencií DNA pri integrácii je takéto: sekvencie exónu 5 hGH, kvasinkové sekvencie terminácie transkripcie, kvasinkové sekvencie replikácie plazmidu, LTR, gén gpt a hGH 3' nepreložené sekvencie.

Lineárne fragmenty pochádzajúce z TC1 a TC2 sa postupne targetujú na svoje zodpovedajúce polohy lemujúce gén hGH. Po superinfekcii týchto buniek pomocným retrovírusom poskytne LTR

riadená transkripcia v tejto oblasti RNA s LTR sekvenciami na obidvoch koncoch. Zostrih tejto RNA poskytne molekulu, v ktorej sú odstránené normálne hGH intróny. Reverzná transkripcia upraveného transkriptu bude mať za následok akumuláciu kópií dvojreťazcovej DNA upraveného hGH fuzionovaného génu. Z dvojnásobne targetovaných buniek infikovaných retrovírusom sa izoluje DNA, ktorá sa štiepi enzýmom odštiepujúcim transkripčnú jednotku pochádzajúcu z LTR. Štiepený materiál sa liguje pri podmienkach favorizujúcich cirkularizáciu, kružnicový produkt sa zavedie do kvasinkových buniek a bunky sa postupne vystavia selekcii na gén URA3. Len bunky, ktoré prevzali gén URA3 (pripojený k sekvenciám zavedeným TC1 a TC2 a hGH génu) môžu rásť. Tieto bunky obsahujú plazmid, ktorý exprimuje hGH protein po galaktózovej indukcii. hGH protein je z týchto buniek vylučovaný prostredníctvom fuzionovanej kvasinkovej vedúcej peptidovej sekvencie, ktorá sa odštiepi po sekrécii za vzniku maturovanej biologicky aktívnej molekuly hGH.

Expresia v bakteriálnych bunkách sa dosahuje jednoducho tým, že sa v TC1 a TC2 nahradí génom rezistencie voči ampicilínu z pBR322 kvasinkový gén URA3, promótorom tac (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 21 až 25 (1983)), kvasinkový promótor GAL4, bakteriálnou vedúcou sekvenciou kvasinková vedúca sekvencia, začiatkom replikácie z pBR322 dvojmikrónový kruh alebo sekvencia ARS a bakteriálnou termináciou transkripcie (napríklad terminátorom transkripcie trpA; Christie G.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 4180 až 4184 (1981) kvasinková sekvencia terminácie transkripcie.

Podobne sa dá hEPO exprimovať v kvasinkách a baktériách jednoducho tak, že sa hGH targetingové sekvencie nahradia hEPO targetingovými sekvenciami, pričom kvasnicová alebo bakteriálna vedúca sekvencia sa umiesti bezprostredne pred (proti smeru expresie) kodón 1 hEPO (čo zodpovedá aminokyselinovej polohe 1 v maturovanej upravenom proteíne).

P r í k l a d 6

Aktivácia a amplifikácia génu EPO v línii imortalizovaných ľudských buniek

Zavedenie expresnej jednotky dhfr do jedinečného miesta HindIII pXEPO-13 (pozri príklad 4) má za následok vznik nového targetingového vektora schopného dvojnásobnej selekcie a selekcie buniek, v nich je amplifikovaný gén dhfr. Jedinečné miesto HindIII v pXEPO-13 definuje spoj génu neo a genómovej sekvencie s prirodzeným výskytom pred (proti smeru expresie) génom ľudského EPO. Umiestenie génu dhfr do tohoto miesta poskytuje konštrukt s génmi neo a dhfr obklopenými sekvenciou DNA pochádzajúcou z loku prírodného hEPO. Podobne ako pXEPO-13 sú deriváty s vloženým génom dhfr užitočné pre targeting na lokus hEPO homologickou rekombináciou. Takýto konštrukt označený šifrou pREPO4 je znázornený na obr. 6. Tento plazmid zahrnuje exóny 1 až 4 a časť exónu 5 génu humánneho EPO, ako aj fragment HindIII-BamHI ležiaci pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou hEPO. pSVe, pTK a pmMT-I zodpovedajú promótorom zo skorej oblasti SV40, tymidín kinázovému (TK) génu z vírusu Herpes simplex (HSV) a génu myšacieho metalotioneínu-I.

Tento plazmid sa pripraví nasledujúcim spôsobom: pXEPO-13 štiepený HindIII sa prečistí a jeho konce sa otupia Klenowovým fragmentom DNA polymerázou I. S cieľom získania expresnej jednotky dhfr sa plazmidový konštrukt pF8CIS9080 (Eaton et al., Biochemistry 25: 8343 až 8347 (1986)) štiepi EcoRI a SalI. Z produktu štiepenia sa purifikuje 2kb fragment obsahujúci dhfr expresnú jednotku. Konce tohoto fragmentu sa otupia Klenowovým fragmentom, DNA polymerázou I. Tento fragment obsahujúci dhfr sa liguje k otupenému miestu HindIII pXEPO-13. Alikvótny diel ligačného produktu sa transformuje do E. coli a navzorkuje na ampicilínové selekčné platničky. Po inkubácii cez noc pri 37 sa lokalizujú jednotlivé bakteriálne kolónie a tieto kolónie sa zozbierajú a nechajú rásť. Z kultúr sa zhotovia miniplazmidové prípravky a výsledná DNA sa štiepi reštrikčnými enzýmami použitím kombinácie BglI + HindIII a ďalej tiež použitím SfiI s cieľom

stanovenia orientácie vložených dhfr fragmentov. Pokiaľ ide o plazmidovú DNA z jedného z týchto prípravkov, zistí sa 2kb inzercia dhfr fragmentu. Orientácie transkripcie dhfr expresnej jednotky v tomto plazmide je opačná vzhľadom na priľahlý gén neo. Tento konštrukt sa označí šifrou pREPO4.

Plazmid pREPO4 sa použije pre amplifikáciu loku hEPO v bunkách po aktivácii endogénneho génu hEPO homológnou rekombináciou. Aktivácia génu týmto konštruktom umožňuje uskutočniť selekciu na zvýšenú expresiu dhfr použitím liečiva methotrexate (MTX). K zvýšenej expresii dhfr dochádza v dôsledku zvýšenia počtu kópií amplifikácií DNA. Výsledný efekt je, že dochádza ku koamplifikácii aktivovaného génu hEPO spolu so sekvenciami dhfr. Koamplifikácia aktivovaného loku EPO by sa mala prejaviť zvýšenou expresiou EPO.

Targetingové experimenty sa uskutočňujú s bunkami HT1080 použitím pREPO4. Izoluje sa línia HTREPO-52 exprimujúca hEPO. Táto línia sa kvantitatívne analyzuje na produkciu EPO pomocou analýzy Southern a Northern Blot. Zistí sa, že tento kmeň je targetovaný jedinou kópiou sekvencií dhfr/neo/mMT-I. Hladina expresie po selekcii G418 (0,8 mg/ml) je približne 1 300 mU/10^6 buniek/deň. Keďže targetovaný lokus EPO obsahuje expresnú jednotku dhfr, je možné uskutočniť selekciu na zvýšenú expresiu dhfr použitím antifolátového liečiva, MTX. Tento kmeň sa potom podrobí stupňovitej selekcii v 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 a 0,4 uM MTX. Výsledky začiatočnej selekcie tohoto kmeňa sú uvedené v tabuľke 4 a na obr. 7.

T a b u ľ k a 4

Bunková línia	MTX (/uM)	mU/10⁶ buniek/24 h
52C20-5-0	0	1 368
52C20-5-0.01	0,01	1 744
52C20-5-0.02	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

Selekcia so zvýšenou hladinou MTX vedie k úspechu pri zvyšovaní expresie hEPO v línii HTREPO-52, pričom je pozorované 70% zvýšenie produkcie EPO v bunkovej línii rezistentnej voči 0,4/uM MTX. Potvrdenie amplifikácie loku hEPO sa uskutoční analýzou Souther Blot v bunkových líniách rezistentných voči MTX. Pritom sa odhalí približne 10-násobné zvýšenie počtu kópií aktivovaného loku hEPO k rodičovskej (neintegrovanej) HEPO alele.

P r í k l a d 7

Produkcia fuzionovaného génu hEPO vložením promótora CMV 1,8kb pred (proti smeru expresie) genómovú oblasť kódujúcu hEPO

Konštrukcia targetingového plazmidu pREPO15

Pri konštrukcii pREPO15 sa najprv fuzionuje promótor CMV k exónu 1 hGH pCR amplifikáciou. 1,6kb fragment sa amplifikuje z hGH expresného konštruktu pXGH300, ktorý obsahuje oblasť CMV promótora začínajúc nukleotidom 546 a končiac nukleotidom 2105 v sekvencii HS5MIEP (Genbank) fuzionovanú k sekvenciám hGH začínajúc nukleotidom 5225 a končiac nukleotidom 7322 v sekvencii HUMGHCSA (Genbank) použitím oligonukleotidov 20 a 35.

Oligonukleotid 20 (35 bp, SEQ. ID NO: 18) hybridizuje

k promótoru CMV v polohe -614 vzhľadom na miesto cap (v sekvencii HEHCMVP1, Genbank) a obsahuje miesto SalI pri 5' konci.

Oligonukleotid 35 (42 bp, SEQ ID NO: 19) je teplotne hybridizovaný k promótoru CMV v polohe +966 a priľahlému hGH exónu 1 a obsahuje prvých 10 bázových párov intrónu 1 hEPO (ktorý obsahuje časť donorového miesta zostrihu) a miesto HindIII u 5.

Výsledný fragment PCR sa štiepi HindIII a SalI a purifikuje sa na géle. Plazmid pT163 (príklad 2) sa štiepi XhoI a HindIII a približne 1,1kb fragment obsahujúci expresnú jednotku neo sa purifikuje na géle. 1,6kb fragment CMV promótor/hGH exón 1/donorové miesto zostrihu a 1,2kb fragment neo sa vzájomne ligujú a produkt ligácie sa vloží do miesta HindIIIpBSIISK+ (Stratagene Inc.). Výsledný intermediárny plazmid (označený šifrou pBNCHS) obsahuje expresnú jednotku neo v opačnej transkripčnej orientácii vzhľadom na orientáciu fragmentu CMV promótor/hGH exón 1/ donorové miesto zostrihu.

Druhý medziprodukt

pREPO5deltaHidnIII sa skonštruuje tak, že sa najprv štiepi pREPO5 enzýmom HindIII. Pôsobením tohoto reštrikčného enzýmu sa uvoľnia fragmenty s dĺžkou 1,9 kb a 8,7 kb. 8,7kb fragment obsahujúci EPO targetingové sekvencie sa purifikuje na géle a autoligáciou cirkularizuje. Výsledný kružnicový plazmid pREPO5deltaHindIII obsahujúci len nekódujúce sekvencie genómovej DNA, ktoré normálne ležia pred (proti smeru expresie) génom hEPO. Tieto sekvencie zahrnujú sekvenciu od polohy -5786 do polohy -1 vzhľadom na exón 1 EPO. Z pBNCHS sa pomocou HindIII vyštiepi 2,8kb fragment obsahujúci neo, promótor CMV, exón a 1 hGH a donorové miesto zostrihu a tento fragment sa purifikuje na géle. Konce fragmentu sa otupia Klenowovým fragmentom, DNA polymerázou I (New England Biolabs, Inc.) a liguje sa k pREOP5deltaHidnIII s otupenými koncami po štiepení BglII. BglII štiepi v polohe -1779 bp pred (proti smeru expresie) exónom 1 hEPO v pREPO5deltaHindIII.

Výsledný konštrukt pREPO15 (obr. 8) obsahuje predný (proti smeru expresie) EPO od polohy -5786 do polohy -1779 vzhľadom na kódujúce oblasti hEPO, expresnú jednotku neo, promótor CMV, exón 1 hGH, donorové miesto zostrihu a sekvencie od polohy -1778 do polohy -1bp pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou hEPO. Tieto rôzne prvky sú usporiadané vo vyššie uvedenom poradí od konca 5' do konca 3' relatívne vzhľadom na nukleotidovú sekvenciu prednej (proti smeru expresie) oblasti hEPO.

Pre transfekciu humánnych buniek sa pREPO15 štiepi NotI a PvuI s cieľom uvoľnenia 8,6 kb targetingového fragmentu. Tento targetingový fragment obsahuje prvú targetingovú sekvenciu (4,8 kb) a druhú targetingovú sekvenciu (1,8 kb), ktoré sú homologické voči DNA umiestenej pred (proti smeru expresie) génom hEPO.

Bunková kultúra, transfekcia a identifikácia targetovaných klonov exprimujúcich EPO

Všetky bunky sa uchovávajú pri 37 °C v atmosfére s 5 % oxidu uhličitého a 98% vlhkosťou na DMEM s obsahom 10 % teľacieho séra (DMEM/10, HyClone Laboratories).

Transfekcia sekundárnych fibroblastov z predkožky človeka sa uskutočňuje elektroporáciou 12 x 10^6 buniek v PBS (Gibco) použitím 100 µg DNA pri napätí 250 V a kapacitancii 960 µF. Ošetrenými bunkami sa zaočkujú 150mm platničky pri hustote 1 x 10^6 buniek/platnička. Nasledujúci deň sa médium vymení za DMEM/10 s obsahom 0,8 mg/ml g418 (Gibco). Selekcia prebieha počas 14 dní a potom sa odoberú vzorky média pre produkciu EPO. Všetky kolónie na platničkách vykazujúce významnú hladinu hEPO (nad 5 mU/ml) podľa stanovenia EPO testom ELISA (Genzyme Inc.) sa izolujú sterilným sklenením klonovacím valcom (Bellco) a prenesú do individuálnych jamiek 96-jamkovej platničky. Po inkubácii v dĺžke 1 až 2 dni sa pomocou skúšky ELISA zvolia jamky vhodné pre produkciu hEPO. Výsledné bunkové kmene produkujúce hEPO sa expandujú v kultúre a použijú sa na zmrazenie, izoláciu nukleovej

kyseliny a kvantifikáciou produkcie EPO.

Transfekcia buniek HT1080 (ATCC CCL 121) sa uskutočňuje elektroporáciou 12 x 10^6 buniek v PBS (Gibco) použitím 45 ,ug DNA pri napätí 450 V a kapacitancii 250 ,uF. Rast a identifikácia klonov sa uskutočňuje rovnakým spôsobom, ako v prípade sekundárnych fibroblastov ľudskej predkožky, pozri vyššie. Izolácia klonálnych bunkových línií produkujúcich hEPO sa uskutočňuje metódou obmedzujúceho riešenia. Pritom sa postupuje tak, že sa najprv naklonujú kolónie zozbierané z platničiek z prvej selekcie v podobe zmesi 10 až 15 kolónií na jamku 24-jamkovej platničky. Zmesi produkujúce hEPO sa navzorkujú pri bunkovej hustote menšej ako 1 kolónia na jamku do 96-jamkovej platničky. Jednotlivé klony sa expandujú pre ďalšiu analýzu spôsobom popísaným u fibroblastov ľudskej predkožky, pozri vyššie.

Charakterizácia klonov exprimujúcich EPO

pREPO15 neobsahuje žiadne kódujúce sekvencie hEPO. Pri targetingu fragmentu neo/CMV promótor/hGH exón 1/donor zostrihu pred (proti smeru expresie) exón 1 hEPO, k expresii hEPO dochádza iniciáciou transkripcie (od CVM promótora) za vzniku primárneho transkriptu zahrnujúceho sekvencie CMV, exón 1 hGH a donorové miesto zostrihu a 1,8 kb predných (proti smeru expresie) sekvencií hEPO a normálne hEPO exóny, intróny a 3' neprelożené sekvencie. Zostrih tohoto transkriptu prebieha od donorového miesta zostrihu priľahlého k exónu 1 hGH do nasledujúceho akceptorového miesta zostrihu v smere expresie, ktoré je umiestené vedľa exónu 2 EPO. Pritom vzniká nový intrón, ktorý sa skladá z genómovej sekvencie pred (proti smeru expresie) génom hEPO, normálneho promótora hEPO, exónu 1 hEPO a intrónu 1 hEPO. VB maturovanom transkripte exón 1 hGH nahradzuje exón 1 hEPO. Exón 1 hEPO kóduje len prvé štyri a 1/3 aminokyselín z 26 aminokyselín signálneho peptidu, ktorý sa odštiepi z prekurzorového proteínu pred sekréciou z bunky. Exón 1 hGH kóduje prvé tri a jednu tretinu aminokyselín signálneho peptidu

hGH, ktorý sa tiež odštiepi od prekurzorového proteínu pred sekréciou z bunky. Translácia informácie, pri ktorej exón 1 hGH nahradí exón 1 hEPO, má teda za následok vznik proteínu, v ktorom je signálny peptid chimérou sekvencie hGH a hEPO. Pri odštiepení signálneho peptidu počas normálneho posttranslačného štiepenia vznikne maturovaná molekula hEPO, ktorej primárna sekvencia je nerozlíšiteľná od normálneho produktu.

Transfekcia pREPO15 do humánnych fibroblastov má za následok expresiu EPO týmito bunkami. V tabuľke 5 sú ukázané výsledky experimentov s targetingom pri použití pREPO15 v humánnych fibroblastoch a bunkách HT1080. Zistená frekvencia targetingu v normálnych humánnych fibroblastoch je 1/64 G418^r kolónií a v bunkách HT1080 1/450 G418^r kolónií. Ďalej sa kvantifikuje úroveň produkcie hEPO obidvoch týchto bunkových kmeňov. Producent hEPO získaný transfekciou humánnych fibroblastov vykazuje sekréciu 7 679 mU/10^6 buniek/deň (tabuľka 5). Aktivovaný producent hEPO získaný transfekciou buniek HT1080 produkuje 12 582 mU/10^6 buniek/deň (tabuľka 5). Tieto výsledky ukazujú, že aktivácia loku EPO je účinná a vyvoláva produkciu hEPO na relatívne vysokej úrovni. Na potvrdenie prípadov targetingu prebehnutých v loku EOP sa použije analýza reštrikčným enzýmom a hybridizáciou Southern.

Uskutoční sa analýza Souther blot klonov humánnych firbroblastov a buniek HT1080, ktoré boli targetované pREPO15. Na obr. 9a je znázornená reštrikčná mapa rodičovského a targetovaného loku hEPO a na obr. 9b sú ukázané výsledky analýzy targetovaného klonu humánnych fibroblastov získané pomocou reštrikčného enzýmu a hybridizácie Southern. Štiepené produkty získané pomocou BglII/EcoRI obsahujú 5,9kb fragment a štiepené produkty získané pomocou BamHI obsahujú 6,6kb fragment, ako výsledok targetingu na lokus hEPO (pás T1). Obidva tieto fragmenty vzniknú vložením 2,7kb DNA obsahujúcej sekvencie génu neo a promótora CMV. Keďže je targetovaná len jedna z dvoch hEPO aliel, sú v týchto kmeňoch a v rodičovskej DNA pozorované fragmenty s dĺžkou 4,3 kb (BglII/EcoRI) a 10,6 kb (BamHI)

reflektujúce nezmenený lokus hEPO (pásy HF). Tieto výsledky potvrdzujú, že k homológnej rekombinácii došlo v loku hEPO za vzniku transkripčnej jednotky riadiacej produkciu humánneho erytropoetínu.

Oligonukleotid	Sekvencie
20	5′ TTTTCTCGAG TCGACGACAT TGATTATTGA CTAGT (SEQ ID NO: 18)
35	5′ TTTTAAGCTT GAGTACTCAC CTGTAGCCAT GGTGGATCCC GT (SEQ ID NO: 19)

T a b u ľ k a 5

Transfekcia pREPO15 a aktivácia expresie hEPO v humánnych bunkách

	Typ transfekovaných buniek	
	humánne fibroblasty	Bunky HT1080
Ošetrené bunky	$3,3 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$
[a]Kolónie G418^r	264	2 799
[b]Platničky s expresormi EPO	1	6
Expresory EPO na kolónie G418^r	1/264	1/450
Expresory hEPO/upravené bunky	$1/3,3 \times 10^7$	$1/5,2 \times 10^6$
[c]Expresia hEPO (mU/10^6 buniek/24 h)	7 679	12 582

[a] Počet kolónií G418^r sa odhadne spočítaním kolónií na dvoch platničkách, vypočítaním priemeru a extrapoláciou na celkový počet platničiek.

[b] Vzorky média z platničiek s kolóniami G418[r] sa podrobia skúške ELISA na EPO a platničky s hodnotou úrovne hEPO vyššou ako 5 mU/ml sa spočítajú. Ich súčet predstavuje počet prípadov aktivácie EPO.

[c] Produkcia hEPO sa kvantitatívne stanoví použitím kmeňa humánnych fibroblastov HF342-15 alebo bunkovej línie HT1080, HTREPO15-1-6-6.

P r í k l a d 8

Produkcia a amplifikácia fuzionovaného génu hEPO vložením promótora CMV 1,8 kb pred (proti smeru expresie) genómovú kódovaciu oblasť hEPO

Vložením dhfr expresnej jednotky do miesta ClaI umiesteného na 5' konci génu neo pREPO15 sa skonštruuje plazmid pREOP18 (obr. 10). S cieľom získania expresnej jednotky dhfr sa plazmidový konštrukt pF8CIS9080 (Eaton et al., Biochemistry 25: 8343 až 8347 (1986)) štiepi EcoRI a SalI. Z produktu štiepenia sa purifikuje 2kb fragment obsahujúci dhfr expresnú jednotku. Konce tohoto fragmentu sa otupia Klenowovým fragmentom, DNA polymerázou I. Potom sa k tomuto otupenému fragmentu liguje linkér ClaI (New England Biolabs). Produkt tejto ligácie sa potom štiepi ClaI a liguje k pREPO15 štiepenému ClaI. Alikvótny diel ligačného produktu sa transformuje do E. coli a navzorkuje na ampicilínové selekčné platničky. Bakteriálne kolónie sa analyzujú štiepením reštrikčným enzýmom s cieľom stanovenia orientácie vloženého dhfr fragmentu. Jeden plazmid s dhfr v opačnej transkripčnej orientácii ako má gén neo sa označí šifrou pREPO18(-). Druhý plazmid obsahujúci dhfr v rovnakej transkripčnej orientácii, akú má gén neo, sa označí šifrou pREPO18(+).

Bunková kultúra, transfekcia a identifikácia targetovaných klonov exprimujúcich EPO

Všetky bunky sa uchovávajú pri 37 °C v atmosfére s oxidu uhličitého a 98% vlhkosti na DMEM s obsahom 10 % teľacieho séra (DMEM/10, HyClone Laboratories). Transfekcia buniek TH1080 (ATCC CCL 121) sa uskutočňuje elektroporáciou 12 x 10^6 buniek v PNS (Gibco) použitím 45 ug DNA pri napätí 4 V a kapacitancii 250 uF. Ošetrenými bunkami sa zaočkujú 150mm platničky pri hustote 1 x 10^6 buniek/platnička. Nasledujúci deň sa médium vymení za DMEM/10 s obsahom 0,8 mg/ml g418 (Gibco). Selekcia prebieha počas 14 dní a potom sa odoberú vzorky média pre produkciu hEPO. Všetky kolónie na platničkách vykazujúce významnú hladinu hEPO (nad 5 mU/ml) podľa stanovenia EPO testom ELISA (Genzyme Inc.) sa trypsinizujú a bunky sa opäť prenesú na platničky pre izoláciu klonu. Izolácia klonálnych bunkových línií produkujúcich hEPO sa uskutočňuje pomocou metódy obmedzujúceho riedenia. Pritom sa potupuje tak, že sa najprv naklonujú kolónie v podobe zmesi 10 až 15 kolónií na jamku 24-jamkovej platničky. Zmesi produkujúce hEPO sa navzorkujú pri bunkovej hustote zodpovedajúcej menšej ako 1 kolónia na jamku do 96-jamkovej platničky. Jednotlivé klony sa expandujú v kultúre a použijú sa na zmrazenie, izoláciu nukleovej kyseliny a kvantifikáciou produkcie EPO.

Izolácia buniek obsahujúcich amplifikované sekvencie dhfr selekciou pri použití methotrexate

Targetované bunkové línie G418^r produkujúce hEPO sa po transfekcii pREPO18 nanesú na platničky pri röznej bunkovej hustote s cieľom selekcie pomocou methotrexate (MTX). Nové klony získané po selekcii pomocou jednej koncentrácie MTX sa skúšajú na produkciu hEPO a opäť sa prenesú na platničky obsahujúce médium s vyššou koncentráciou MTX (obvykle sa používa dvojnásobná koncentrácia). Tento postup sa opakuje tak dlho, dokiaľ sa nedosiahne požadovaná úroveň produkcie hEPO. V každom stupni rezistencie voči MTX sa izoluje DNA a RNA pre príslušné analýzy Southern a Norther blot.

Charakterizácia klonov exprimujúcich EPO

pREPO18 s dvoma rôznymi orientáciami dhfr sa transfekuje do buniek HT1080. Pred transfekciou sa pREPO18(+) a pREPO18(-) štiepi XbaI, pričom sa uvoľní 7,9kb targetingový fragment, ktorý v ďalej uvedenom poradí obsahuje 2,1kb oblasť genómovej DNA pred (proti smeru expresie) exónom 1 hEPO (od polohy -3889l do polohy -1779 relatívne vzhľadom na ATG štart kodón hEPO), 2kb oblasť obsahujúcu gén dhfr, 1,1kb oblasť obsahujúcu gén neo a 1,5kb oblasť obsahujúcu promótor CMV fuzionovaný k exónu 1 hGH, 10 bp intrónu 1 hEPO (obsahujúcich donorové miesto zostrihu) a potom 1,1kb oblasť genómovej DNA pred (proti smeru expresie) exónu 1hEPO (od polohy -1778 do polohy -678 relatívne vzhľadom na ATG štart kodón hEPO). Početnosť transfekcie a targetingu vypočítaná z dvoch experimentov je uvedená v tabuľke 6.

Pri týchto experimentoch sa izoluje päť primárnych klonov G418^r. Tieto klony sa expandujú v kultúre pre kvantitatívnu analýzu expresie hEPO (tabuľka 7). Keďže pREPO18 obsahuje gén dhfr, je možné uskutočniť selekciu na bunky obsahujúce amplifikované kópie targetingového konštruktu použitím MTX spôsobom popísaným v príklade 6. Analýzou pomocou reštrikčného enzýmu a hybridizáciou Southern sa potvrdí, že klony G418^r sú targetované na lokus hEPO. Tieto klony sa podrobia stupňovitej selekcii pomocou MTX, ako to bolo popísané vyššie.

T a b u ľ k a 6

Targeting pREPO18 v bunkách HT1080

	Konštrukt	
	pREPO18(-)	pREPO18(+)
Štiepenie DNA	XbaI	XbaI
Ošetrené bunky	36 x 10^6	36 x 10^6
Kolónie G418^r	16 980	19 290
Platničky s expresormi hEPO	39	41
Expresory hEPO na kolónie G418^r	1/435	1/470
Analyzované primárne klony	1	4

T a b u ľ k a 7

Produkcia hEPO v bunkových líniách HT1080 targetovaných pREPO18

Bunková línia	Konštrukt	hEPO (mU/10^6 buniek/24 h)
18B3-147	pREPO(+)	24 759
18B3-181	pREPO(+)	28 831
18B3-145	pREPO(+)	17 586
18B3-168	pREPO(+)	5 293
18A3-119	pREPO(-)	2 881

P r í k l a d 9

Aktivácia a amplifikácia endogénnych génov alfa-interferónu, GM-CSF, G-CSF a FSHbeta v imortalizovaných ľudských bunkách

Spôsobmi podľa vynálezu a použitím konštruktu DNA podľa vynálezu je možné aktivovať a amplifikovať širokú paletu endogénnych celulárnych génov. Ďalej je popísaná všeobecná stratégia aktivácie a amplifikácie génu humánneho alfa--interferónu (leukocytový interferón), GM-CSF (faktor stimulujúci kolónie - granulocyt/makrofág), G-CSF (faktor stimulujúci kolónie - granulocyt) a FSHbeta (Beta podjednotka hormónu stimulujúceho folikuly).

alfa-Interferón

Gén humánneho alfa-interferónu (sekvencia HUMIFNAA podľa Genbank) kóduje 188 aminokyselinový prekurzorový protein obsahujúci 23 aminokyselinový signálny peptid. Tento gén neobsahuje žiadne intróny. Na obr. 11 je schematicky ilustrovaná jedna stratégia aktivácie génu alfa-interferónu.

Zostrojí sa targetingový konštrukt zahrnujúci prvú

targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiesteným pred (proti smeru expresie) génom, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, donorové miesto zostrihu, intrón, akceptorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere expresie) prvou targetingovou sekvenciou. Druhá targetingová sekvencia by nemala zahrnovať ďalej dopredu ako k polohe -107 vzhľadom k normálnemu štart kodónu, aby bolo možné sa vyhnúť nežiadúcim ATG štart kodónom.

Pri tejto stratégii sú prvá a druhá targetingová sekvencia v normálnom cieľovom géne umiestené bezprostredne vedľa seba, ale nie je to nutné (pozri ďalej). Amplifikovateľné markerové gény a selektovateľné markerové gény, vhodné pre selekciu, sú uvedené v tomto popise. Amplifikovateľným markerovým génom môže byť rovnaký gén, ktorý je zároveň selektovateľným markerovým génom, ich polohy môžu byť obrátené a jeden z týchto génov, alebo obidva, môžu byť umiestené v intróne targetingového konštruktu. Selektovateľný markerový gén je fakultatívny a amplifikovateľný markerový gén je nutný len v tom prípade, ak sa má uskutočňovať amplifikácia. Zavedenie špecifického miesta CAP je fakultatívne. Do targetingového konštruktu sa poprípade k akceptorovému miestu zostrihu v smere ku koncu 3' a k druhej targetingovej sekvencii v smere ku koncu 5' môže zaviesť sekvencia exónu z iného génu.

Regulačná oblasť, miesto CAP, donorové miesto zostrihu, intrón a akceptorové miesto zostrihu môžu byť izolované ako úplná jednotka z génu ľudského elongačného faktora 1alfa (F-1alfa; sekvencia HUMEF1A podľa Genbank) alebo okamžitej skorej oblasti cytomegalovírusu (CMV; sekvencia HEHCMVP1 podľa Genbank), alebo sa môžu zložky usporiadane spojiť z jednotlivých zložiek izolovaných z rôznych génov.

Genómová DNA zodpovedajúca prednej (proti smeru expresie) oblasti génu alfa-interferónu pre použitie ako targetingová sekvencia a pre zostavenie targetingového konštruktu sa môže pripravovať pomocou techník rekombinácie DNA, ktoré sú odborníkom

v tomto obore známe. Ako je to uvedené v tomto popise, môže sa v targetingových konštruktoch použiť množstvo selektovateľných a amplifikovateľných markerov a aktivácia a amplifikácia sa môže uskutočňovať vo veľkom počte typu buniek. Transfekcia primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných ľudských buniek a izolácia homológne rekombinantných buniek exprimujúcich alfa-interferón sa môžu uskutočňovať spôsobmi popísanými v príklade 4 použitím skúšky ELISA pre ľudský alfa-interferón (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Alternatívne sa môžu homológne rekombinantné bunky identifikovať PCR screeningom, ako je to popísané v príklade 1 g a1j. Izolácia buniek obsahujúcich amplifikované kópie amplifikovateľného markerového génu a aktivovaného loku alfa-interferónu sa uskutočňuje spôsobom popísaným v príklade 6.

V homológne rekombinantných bunkách sa produkuje prekurzor mRNA, ktorý zahrnuje exogénny exón, donorové miesto zostrihu, intrón, akceptorové miesto zostrihu, druhú targetingovú sekvenciu, kódovaciu oblasť ľudského alfa-interferónu a 3' neprelożené sekvencie (obr. 11). Zostrih tejto informácie poskytne funkčnú mRNA, ktorú je možné preložiť s cieľom produkcie humánneho alfa-interferónu.

Veľkosť interferónu a teda poloha regulačnej oblasti relatívne vzhľadom na kódujúcu oblasť génu, sa môže meniť s cieľom optimalizácie funkcie regulačnej oblasti. Targetingový konštrukt môže obsahovať viac exónov. Okrem toho, v normálnom géne nemusí druhá targetingová sekvencia ležať bezprostredne vedľa alebo v blízkosti prvej targetingovej sekvencie, takže časti normálnej prednej oblasti génu sú pri homológnej rekombinácii vypustené.

GM-CSF

Gén ľudského GM-CSF (sekvencia HUMGMCSFG podľa Genbank) kóduje 144 aminokyselinový prekurzorový protein obsahujúci 17 aminokyselinový signálny peptid. Gén obsahuje 4 exóny a 3 intróny a 50 N terminálnych aminokyselín prekurzora je kódovaných v prvom

exóne. Na obr. 12 je schematicky ilustrovaná stratégia aktivácie génu GM-CSF.

Zostrojí sa targetingový konštrukt zahrnujúci prvú targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiestenýmpred (proti smeru expresie) génom, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, exón kódujúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je identická alebo funkčne ekvivalentná sekvencii prvých 50 aminokyselín GM-CSF, donorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere expresie) prvou targetingovou sekvenciou. Pri tejto stratégii produkujú homológne rekombinantné bunky prekurzor mRNA, ktorý zodpovedá exogénnemu exónu a donorovému miestu zostrihu, druhej targetingovej sekvencii, prípadným sekvenciám medzi druhou targetingovou sekvenciou a štart kodónom génu GM-CSF a exónom, intrónom a 3' nepreloženej oblasti génu GM-CSF (obr. 11). Zostrih tejto informácie má za následok fúziu exogénneho exónu k exónu 2 endogénneho génu GM-CSF, ktorý po preložení produkuje GM-CSF.

Pri tejto stratégii sú prvá a druhá targetingová sekvencia v normálnom cieľovom géne umiestené bezprostredne vedľa seba, ale nie je to nutné (pozri ďalej). Amplifikovateľné markerové gény a selektovateľné markerové gény vhodné pre selekciu sú uvedené v tomto popise. Amplifikovateľným markerovým génom môže byť rovnaký gén, ktorý je zároveň selektovateľným markerovým génom alebo ich polohy môžu byť obrátené. Selektovateľný markerový gén je fakultatívny a amplifikovateľný markerový gén je nutný len v tom prípade, ak sa má uskutočňovať amplifikácia. Selektovateľný marker a/alebo amplifikovateľný marker môže byť v targetingovom konštrukte umiestený medzi donorovým miestom zostrihu a druhou targetingovou sekvenciou. Zavedenie špecifického miesta CAP je fakultatívne.

Regulačná oblasť, miesto CAP a donorové miesto zostrihu môžu byť izolované ako úplná jednotka z génu ľudského elongačného faktora 1alfa (F-1alfa; sekvencia HUMEF1A podľa Genbank) alebo

okamžitej skorej oblasti cytomegalovírusu (CMV; sekvencia HEHCMVP1 podľa Genbank), alebo sa môžu zložky usporiadane spojiť z jednotlivých zložiek izolovaných z rôznych génov (ako promótor mMT-I a miesto CAP z génu hGH a exón 1 a donorové miesto zostrihu z génu hEPO).

Môžu sa použiť tiež iné prístupy. Tak napríklad prvá a druhá targetingová sekvencia môžu zodpovedať sekvenciám v prvom intróne génu GM-CSF. Alternatívne sa môže tiež použiť targetingový konštrukt, ktorý sa podobá konštruktu popísanému v súvislosti s alfa-interferónom; v tomto prípade sa targetingový konštrukt zostaví tak, aby obsahoval prvú targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiestneným pred (proti smeru expresie) génom GM-CSF, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, donorové miesto zostrihu, intrón, akceptorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere expresie) prvou targetingovou sekvenciou.

V každom prípade, v normálnom géne nemusí druhá targetingová sekvencia ležať bezprostredne vedľa alebo v blízkosti prvej targetingovej sekvencie, takže časti normálnej prednej oblasti sú pri homológnej rekombinácii vypustené. Targetingový konštrukt môže okrem toho obsahovať niekoľko nekódujúcich alebo kódujúcich exónov. Genómová DNA zodpovedajúca prednej (proti smeru expresie) alebo intrónovej oblasti génu humánneho GM-CSF pre použitie ako targetingová sekvencia a pre zostavenie targetingového konštruktu, sa môže pripravovať pomocou techník rekombinácie DNA, ktoré sú odborníkom v tomto obore známe. Ako je to uvedené v tomto popise, môže sa v targetingových konštruktoch použiť množstvo selektovateľných a amplifikovateľných markerov a aktivácia sa môže uskutočňovať vo veľkom počte typov buniek.

Transfekcia primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných ľudských buniek a izolácia homológne rekombinantných buniek exprimujúcich GM-CSF, sa môže uskutočňovať spôsobmi popísanými v príklade 4 použitím skúšky ELISA pre ľudský GM-CSF (R&D

Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Alternatívne sa môžu homológne rekombinantné bunky identifikovať PCR screeningom, ako je to popísané vyššie. Izolácia buniek obsahujúcich amplifikované kópie amplifikovateľného markerového génu a aktivovaného loku GM-CSF sa uskutočňuje spôsobom popísaným vyššie.

G-CSF

Gén ľudského G-CSF (sekvencia HUMGCSFF podľa Genbank) kóduje 204 až 207 aminokyselinový prekurzorový proteín obsahujúci 30 aminokyselinový signálny peptid. Gén obsahuje 5 exónov a 4 intróny. Prvý exón kóduje 13 aminokyselín signálneho peptidu. Na obr. 13 je schematicky ilustrovaná stratégia aktivácie génu G-CSF.

Zostrojí sa targetingový konštrukt zahrnujúci prvú targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiestenýmpred (proti smeru expresie) génom, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, exón kódujúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je identická alebo funkčne ekvivalentná sekvencii prvých 13 aminokyselín signálneho peptidu G-CSF, donorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere expresie) prvou targetingovou sekvenciou. Pri tejto stratégii produkujú homológne rekombinantné bunky prekurzor mRNA, ktorý zodpovedá exogénnemu exónu a donorovému miestu zostrihu, druhej targetingovej sekvencii, prípadným sekvenciám medzi druhou targetingovou sekvenciou a štart kodónom génu G-CSF a exónom, intrónom a 3' nepreloženej oblasti génu G-CSF (obr. 13). Zostrih tejto informácie má za následok fúziu exogénneho exónu k exónu 2 endogénneho génu G-CSF, ktorý po preložení produkuje G-CSF. Schopnosť funkčne nahradiť prvých 13 aminokyselín signálneho peptidu normálneho G-CSF aminokyselinami prítomnými v exogénnom exóne umožňuje uskutočňovať modifikáciu signálneho peptidu a teda aj sekrečných vlastností vyrobeného proteínu.

Pri tejto stratégii sú prvá a druhá targetingová sekvencia

v normálnom cieľovom géne umiestené bezprostredne vedľa seba, ale nie je to nutné. V normálnom géne druhá targetingová sekvencia nemusí ležať bezprostredne vedľa alebo v blízkosti prvej targetingovej sekvencie, takže časti normálnej prednej oblasti génu sú pri homológnej rekombinácii vypustené. Amplifikovateľným markerovým génom môže byť rovnaký gén, ktorý je zároveň selektovateľným markerovým génom alebo ich polohy môžu byť obrátené. Selektovateľný markerový gén je fakultatívny a amplifikovateľný markerový gén je nutný len v tom prípade, ak sa má uskutočňovať amplifikácia. Selektovateľný marker a/alebo amplifikovateľný marker môže byť v targetingovom konštrukte umiestený medzi donorovým miestom zostrihu a druhou targetingovou sekvenciou. Zavedenie špecifického miesta CAP je fakultatívne.

Regulačná oblasť, miesto CAP a donorové miesto zostrihu môžu byť izolované ako úplná jednotka z génu ľudského elongačného faktora 1alfa (F-1alfa; sekvencia HUMEF1A podľa Genbank) alebo okamžitej skorej oblasti cytomegalovírusu (CMV; sekvencia HEHCMVP1 podľa Genbank), alebo sa môžu zložky usporiadane spojiť z jednotlivých zložiek izolovaných z rôznych génov (ako promótor mMT-I a miesto CAP z génu hGH a exón 1 a donorové miesto zostrihu z génu EPO). Targetingový konštrukt môže obsahovať niekoľko kódujúcich alebo nekódujúcich exogénnych exónov, ak je v niektorom z exónov zahrnutý ATG štart kodón, ktorý je pri zostrihu v rámci s maturovaným proteínom.

Môžu sa použiť tiež iné prístupy. Tak napríklad prvá a druhá targetingová sekvencia môžu zodpovedať sekvenciám v prvom intróne génu G-CSF. Alternatívne sa môže tiež použiť targetingový konštrukt, ktorý sa podobá konštruktu popísanému v súvislosti s alfa-interferónom; v tomto prípade sa targetingový konštrukt zostaví tak, aby obsahoval prvú targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiestenym pred (proti smeru expresie) génom G-CSF, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, donorové miesto zostrihu, intrón, akceptorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere

expresie) prvou targetingovou sekvenciou.

Genómová DNA zodpovedajúca prednej (proti smeru expresie) alebo intrónovej oblasti génu humánneho G-CSF pre použitie ako targetingová sekvencia a pre zostavenie targetingového konštruktu, sa môže pripravovať pomocou techník rekombinácie DNA, ktoré sú odborníkom v tomto obore známe. Ako je to uvedené v tomto popise, môže sa v targetingových konštruktoch použiť množstvo selektovateľných a amplifikovateľných markerov a aktivácia sa môže uskutočňovať vo veľkom počte typov buniek. Transfekcia primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných ľudských buniek a izolácia homológne rekombinantných buniek exprimujúcich G-CSF, sa môže uskutočňovať spôsobmi popísanými v príklade 4 použitím skúšky ELISA pre ľudský G-CSF (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Alternatívne sa môžu homológne rekombinantné bunky identifikovať PCR screeningom, ako je to popísané vyššie. Izolácia buniek obsahujúcich amplifikované kópie amplifikovateľného markerového génu a aktivovaného loku alfa-interferónu sa uskutočňuje spôsobom popísaným vyššie.

FSHbeta

Gén ľudského FSHbeta (sekvencia HUMFSH1 podľa Genbank) kóduje 129 aminokyselinový prekurzorový protein obsahujúci 16 aminokyselinový signálny peptid. Gén obsahuje 3 exóny a 2 intróny, pričom prvý exón je nekódujúci. Aktivácia FSHbeta sa môže uskutočňovať pomocou mnohých rôznych stratégií. Na obr. 14 je schematicky ilustrovaná jedna z nich.

Zostrojí sa targetingový konštrukt zahrnujúci prvú targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiestenýmpred (proti smeru expresie) génom, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, exón, donorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere expresie) prvou targetingovou sekvenciou. Pri tejto stratégii produkujú homológne rekombinantné bunky prekurzor mRNA, ktorý zodpovedá exogénnemu

exónu a donorovému miestu zostrihu, druhej targetingovej sekvencii, prípadným sekvenciám medzi druhou targetingovou sekvenciou a štart kodónom génu FSHbeta a exónom, intrónom a 3' nepreloženej oblasti génu G-CSF (obr. 14). Zostrih tejto informácie má za následok fúziu exogénneho exónu k exónu 2 endogénneho génu FSHbeta, ktorý po preložení môže produkovať FSHbeta. Pri tejto stratégii sú prvá a druhá targetingová sekvencia v normálnom cieľovom géne umiestené bezprostredne vedľa seba, ale nie je to nutné (pozri ďalej).

Môžu sa použiť tiež iné prístupy. Tak napríklad prvá a druhá targetingová sekvencia môžu zodpovedať sekvenciám v prvom intróne génu FSHbeta. Alternatívne sa môže tiež použiť targetingový konštrukt, ktorý sa podobá konštruktu popísanému v súvislosti s alfa-interferónom; v tomto prípade sa targetingový konštrukt zostaví tak, aby obsahoval prvú targetingovú sekvenciu, ktorá je homológna voči sekvenciám umiesteným pred (proti smeru expresie) génom FSHbeta, amplifikovateľný markerový gén, selektovateľný markerový gén, regulačnú oblasť, miesto CAP, donorové miesto zostrihu, intrón, akceptorové miesto zostrihu a druhú targetingovú sekvenciu zodpovedajúcu sekvenciám za (v smere expresie) prvou targetingovou sekvenciou. Druhá targetingová sekvencia by nemala zasahovať ďalej dopredu ako k polohe -40 vzhľadom na normálne miesto štartu transkripcie FSHbeta, aby bolo možné sa vyhnúť nežiadúcim ATG štart kodónom.

V homológne rekombinantných bunkách sa produkuje prekurzor mRNA, ktorý zahrnuje exogénny exón, donorové miesto zostrihu, intrón, akceptorové miesto zostrihu, druhú targetingovú sekvenciu, kódovaciu oblasť ľudského FSHbeta a 3' nepreložené sekvencie. Zostrih tejto informácie poskytne funkčnú mRNA, ktorá sa dá preložiť s cieľom produkcie humánneho FSHbeta. Veľkosť intrónu a teda poloha regulačnej oblasti relatívne vzhľadom na kódujúcu oblasť génu, sa môže meniť s cieľom optimalizácie funkcie regulačnej oblasti.

Pri akejkoľvek aktivačnej stratégii v normálnom géne nemusí

druhá targetingová sekvencia ležať bezprostredne vedľa seba alebo v blízkosti prvej targetingovej sekvencie, takže časti normálnej prednej oblasti génu sú pri homológnej rekombinácii vypustené. Okrem toho, jedna targetingová sekvencia môže byť umiestená pred (proti smeru expresie) génom a druhá môže ležať v exóne alebo intróne génu FSHbeta.

Amplifikovateľným markerovým génom môže byť rovnaký gén, ktorý je zároveň selektovateľným markerovým génom alebo ich polohy môžu byť obrátené a jeden alebo obidva môžu byť umiestené v intróne targetingového konštruktu. Amplifikovateľné markerové gény a selektovateľné markerové gény vhodné pre selekciu sú uvedené v tomto popise. Selektovateľný markerový gén je fakultatívny a amplifikovateľný markerový gén je nutný len v tom prípade, ak sa má uskutočňovať amplifikácia. Zavedenie špecifického miesta CAP je fakultatívne. Do targetingového konštruktu sa poprípade k akceptorovému miestu zostrihu v smere ku koncu 3' a k druhej targetingovej sekvencii v smere ku koncu 5' môže zaviesť sekvencia exónu z iného génu. Regulačná oblasť, miesto CAP, exón, donorové miesto zostrihu, intrón a akceptorové miesto zostrihu môžu byť izolované ako úplná jednotka z génu ľudského elongačného faktora 1alfa (F-1alfa; sekvencia HUMEF1A podľa Genbank) alebo okamžitej skorej oblasti cytomegalovírusu (CMV; sekvencia HEHCMVP1 podľa Genbank), alebo sa môžu zložky usporiadane spojiť z jednotlivých zložiek izolovaných z rôznych génov. V každom prípade môže byť exogénny exón rovnaký alebo rôzny vzhľadom na prvý exón normálneho génu FSHbeta a v targetingovom konštrukte môže byť prítomných viac exónov.

Genómová DNA zodpovedajúca prednej (proti smeru expresie) oblasti génu humánneho FSHbeta pre použitie ako targetingová sekvencia a pre zostavenie targetingového konštruktu, sa môže pripravovať pomocou techník rekombinácie DNA, ktoré sú odborníkom v tomto obore známe. Ako je to uvedené v tomto popise, môže sa v targetingových konštruktoch použiť množstvo selektovateľných a amplifikovateľných markerov a aktivácia sa môže uskutočňovať vo veľkom počte typov buniek. Ak to je žiadúce, môže sa produkt

aktivovaného génu FSHbeta produkovať v type bunky, ktorý exprimuje humánnu glykoproteínovú alfa-podjednotku, ktorej produkt tvorí heterodimér s produktom génu FSHbeta. Môže ísť o bunkový kmeň alebo líniu vyskytujúcu sa v prírode.

Alternatívne sa gén alfa-podjednotky humánneho glykoproteínu (sekvencia HUMGLYCA1 podľa Genbank) môže koexprimovať s produktom génu FSHbeta. Takáto koexpresia sa môže uskutočňovať expresiou génu alebo cDNA alfa-podjednotky humánneho glykoproteínu pod kontrolou vhodného promótora, alebo aktiváciou génu afla-podjednotky humánneho glykoproteínu spôsobmi uvedenými v tomto popise.

Transfekcia primárnych, sekundárnych alebo imortalizovaných ľudských buniek a izolácia homológne rekombinantných buniek exprimujúcich FSHbeta sa môže uskutočňovať spôsobmi popísanými vyššie použitím skúšky ELISA pre ľudský FSHbeta (Accurate Chemicals and Scientific, Westburry, NY, USA). Alterantívne sa môžu homológne rekobminantné bunky identifikovať PCR screeningom, ako je to popísané vyššie. Izolácia buniek obsahujúcich amplifikované kópie amplifikovateľného markerového génu a aktivovaného loku alfa-interferónu sa uskutočňuje spôsobom popísaným vyššie.

Ekvivalenty

Odborníkom v tomto obore je na prvý pohľad alebo po realizácii rutinných experimentov zrejmé, že existuje množstvo ekvivalentov špecifických realizácií vynálezu uvedených v tomto popise. Takéto ekvivalenty samozrejme tiež patria do rozsahu pripojených nárokov.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Konštrukt DNA schopný pozmieňať expresiu targetovaného génu, keď je tento gén vložený do chromozomálnej DNA bunky, ktorý obsahuje

a) targetingovú sekvenciu a poprípade druhú targetingovú sekvenciu;

b) regulačnú sekvenciu;

c) exón a buď

d) nepárové donorové miesto zostrihu alebo

f) donorové miesto zostrihu, intrón a akceptorové miesto zostrihu.

2. Konštrukt podľa nároku 1, v ktorom exón ďalej obsahuje ktorýkoľvek z ďalej uvedených prvkov alebo ich kombináciu:

a) miesto CAP;

b) nukleotidovú sekvenciu ATG alebo

c) kódujúcu DNA v rámci s targetovaným génom, ktorá môže byť napríklad rovnaká alebo rôzna od kódujúcej DNA prvého exónu targetovaného génu.

3. Konštrukt podľa nároku 1 alebo 2, kde targetingová alebo targetingové sekvencie sú poprípade homológne k sekvencii v targetovanom géne alebo k sekvencii pred (proti smeru expresie) jeho kódujúcou oblasťou alebo endogénnou regulačnou sekvenciou.

4. Konštrukt podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, kde

targetovaný gén poprípade kóduje protein zvolený zo súboru zahrnujúceho terapeutický protein, hormón, cytokín, antigén, protilátku, enzým, zrážací faktor, transportný protein, receptor, regulačný protein, štruktúrny protein, transkripčný faktor, erytropoetín, kalcitonín, rastový hormón, napríklad ľudský rastový hormón, inzulín, inzulinotropín, rastové faktory podobné inzulínu, paratyroidný hormón, beta-interferón, gama-interferón, nervové rastové faktory, FSHbeta, TGF-beta, faktor nekrózy nádorov, glukagón, faktor-2 rastu kostí, faktor-7 rastu kostí, TSH-beta, interleukín 1, 2, 3, 6, 11 a 12, CSF-granulocyt (G-CSF), CSF-makrofág, CSF-granulocyt/makrofág (GM-CSF), imunoglobulíny, katalytické protilátky, protein kinázu C, glukocerebrozidázu, superoxid dismutázu, aktivátor tkanivového plazminogénu, urokinázu, antitrombín III, DNAázu, beta-galaktozidázu, tyrozín hydroxylázu, zrážací faktor krvi V, VII, VIII, IX, X a XIII, apolipoprotein E a A-I, globíny, receptor nízkohustotného lipoproteínu, receptor IL-2, antagonistov IL-2, antitrypsín, modifikátory imunitnej odpovede a rozpustný CD4.

5. Konštrukt podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 4, kde regulačná sekvencia poprípade obsahuje ktorýkoľvek z ďalej uvedených prvkov alebo ich kombináciu: promótor, enhancér,oblasť pripojenia lešenia (scaffold attachment) alebo miesto viažúce transkripčný faktor, napríklad promótor alebo prídavnú regulačnú sekvenciu (napríklad enhancér), pričom regulačnou sekvenciou je napríklad regulačná sekvencia z myšacieho metalotioneínového-1 génu; génu SV-40; génu cytomegalovírusu; génu kolagénu; génu aktínu; génu imunoglobulínu; génu HMG-CoA reduktázy alebo génu EF-1alfa.

6. Konštrukt podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 5, ktorý poprípade ďalej obsahuje jeden alebo viac selektovateľných markérov a/alebo amplifikovateľných markerových génov.

7. Spôsob prípravy homológne rekombinantnej bunky, v ktorej je expresia targetovaného génu, napríklad targetovaného génu

podľa nároku 4, pozmenená, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupeň:

a) transfekcie bunky konštruktom DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6 a

b) uchovávanie transfekovanej bunky pri podmienkach vhodných pre homológnu rekombináciu a poprípade

c) uchovávanie homológne rekombinantnej bunky zo stupňa b) pri podmienkach vhodných pre produkciu proteínu, napríklad proteínu definovaného v nároku 4, pričom bunkou je poprípade

i) eukaryotická, napríklad hubová, rastlinná alebo živočíšna bunka, napríklad bunka pochádzajúca zo stavovca, napríklad človeka

ii) primárna alebo sekundárna cicavčia, napríklad ľudská bunka,

iii) imortalizovaná cicavčia, napríklad ľudská bunka, alebo

iv) bunka zvolená zo súboru zahrnujúceho tieto bunky: bunky Bowesovho melanómu, Daudiho, HeLa, HL-60, HT1080, Jurkatova, karcinómu KB, leukémie K562, rakoviny prsníka MCF-7, Molt-4, Namalwova, Rajiho, RPMI8226, U-837, WI-38WA13 podlínie 2R4 a karcinómu vaječníkov 2780AD, ako aj ich deriváty.

alebo homológne rekombinantná bunka, proteín, napríklad proteín definovaný v nároku 4, alebo fuzionovaný proteín obsahujúci aminokyseliny kódované endogénnym génom (ktorým je poprípade gén erytropoetínu, ktorý napríklad obsahuje aminokyseliny 1 až 3 humánneho rastového hormónu a aminokyseliny 6 až 165 humánneho erytropoetínu), ktoré sú pripravené týmto spôsobom.

8. Homológne rekombinantná bunka obsahujúca exogénnu

regulačnú sekvenciu, exogénny exón a donorové miesta zostrihu operatívne pripojené k druhému exónu targetovaného génu (ktorého prvý exón je napríklad vypustený), pričom exogénna regulačná oblasť, exogénny exón a donorové miesto sú poprípade umiestené pred (proti smeru expresie) kódujúcou oblasťou alebo endogénnou regulačnou sekvenciou (ktorá je napríklad vypustená) endogénneho génu, pričom napríklad

a) exogénny exón a/alebo targetovaný gén a/alebo regulačná oblasť je definovaná v nároku 2, 4 alebo 5; a /alebo

b) bunka je definovaná v nároku 7; a/alebo

c) bunka je schopná exprimovať targetovaný gén.

9. Bunka podľa nároku 8, ktorá je schopná exprimovať fuzionovaný proteín obsahujúci aminokyseliny kódované exogénnym exónom a endogénnym génom, pričom endogénnym génom je napríklad erytropoetín a fuzionovaný proteín napríklad obsahuje aminokyseliny 1 až 3 ľudského rastového hormónu a aminokyseliny 6 až 165 ľudského erytropoetínu.

10. Spôsob pozmieňania expresie génu v bunke, napríklad pre produkciu proteínu, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupeň

a) transfekcie bunky konštruktom DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6 pre produkciu transfekovanej bunky;

b) uchovávanie transfekovanej bunky pri podmienkach vhodných pre homológnu rekombináciu, az vzniku homológne rekombinantnej bunky a

c) uchovávanie homológne rekombinantnej bunky pri podmienkach vhodných pre expresiu génu, ktorý je napríklad vhodný pre produkciu proteínu;

pričom bunkou je poprípade bunka definovaná v nároku 7, alebo protein (napríklad protein definovaný v nároku 4) alebo fuzionovaný protein obsahujúci aminokyseliny kódované endogénnym génom (poprípade s obsahom aminokyselín 1 až 3 rastového hormónu človeka a aminokyselín 6 až 165 ľudského erytropoetínu) pripraviteľný pomocou tohoto spôsobu.

11. DNA plazmid pREPO18.

12. Homológne rekombinantná bunka obsahujúca

a) regulačnú sekvenciu, exón, donorové miesto zostrihu, intrón a akceptorové miesto zostrihu zavedené homológnou rekombináciou pred (teda proti smeru expresie) kódujúcu oblasť targetovaného génu, pričom targetovaným génom je napríklad gén alfa-interferónu alebo gén erytropoetínu alebo

b) gén dhfr, gén neo, promótor CMV, exón 1 hGH a nepárové donorové miesto zostrihu targetované do polohy pred (proti smeru expresie) regulačnú oblasť endogénneho erytropoetínu, pričom bunka je poprípade pripraviteľná integráciou DNA z PREPO18.

13. Spôsob prípravy homológne rekombinantnej bunky, pri ktorom sa pozmieňa expresia targetovaného génu (napríklad génu alfa-interferónu alebo erytropoetínu), v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupeň:

a) transfekcie bunky konštruktom DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, ktorý obsahuje

i) targetingovú sekvenciu,
ii) regulačnú sekvenciu,
iii) exón,
iv) donorové miesto zostrihu,
v) intrón a
vi) akceptorové miesto zostrihu,

pričom targetingová sekvencia riadi integráciu prvkov ii) až vi) proti smeru expresie tak, že sú operatívne pripojené k prvému exónu targetovaného génu a

b) uchovávanie transfekovanej bunky pri podmienkach vhodných pre homológnu rekombináciu a poprípade

c) uchovávanie homológne rekombinantnej bunky zo stupňa b) pri podmienkach vhodných pre produkciu proteínu,

alebo homológne rekombinantná bunka alebo protein, ktoré sú týmto spôsobom pripravené.

14. Spôsob pozmieňania expresie génu (napríklad génu-alfa-interferónu alebo erytropoetínu) v bunke (napríklad pre výrobu proteínu), v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahrnuje stupeň

a) transfekcie bunky konštruktom DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6, ktorý obsahuje

i) targetingovú sekvenciu,
ii) regulačnú sekvenciu,
iii) exón,
iv) donorové miesto zostrihu,
v) intrón a
vi) akceptorové miesto zostrihu,

pričom targetingová sekvencia riadi integráciu prvkov ii) až vi) proti smeru expresie tak, že sú operatívne pripojené k prvému exónu targetovaného génu a

b) uchovávanie transfekovanej bunky pri podmienkach vhodných pre homológnu rekombináciu, za vzniku homológne rekombinantnej bunky a

c) uchovávanie homológne rekombinantnej bunky pri podmienkach vhodných pre expresiu génu (ktorý je napríklad vhodný pre produkciu proteínu),

alebo protein, ktoré je týmto spôsobom pripravený.

15. Spôsob targetingu génu erytropoetínu v cicavčej, napríklad ľudskej bunke, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa bunka transfekuje konštruktom obsahujúcim sekvenciu DNA, ktorá je homológna k sekvencii, ktorá je umiestená

a) vnútri génu erytropoetínu, alebo

b) pred (proti smeru expresie) sekvenciou ATG génu erytropoetínu napríklad sekvencia umiestená medzi asi 5 kb a 30 kb pred (proti smeru expresie) sekvenciou ATG génu erytropoetínu),

alebo sekvencie DNA umiestené medzi asi 5 kb a 30 kb pred (proti smeru expresie) sekvenciou ATG génu erytropoetínu, použiteľné pri spôsobe podľa nároku 15b.