

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

612-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27. 08. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.09.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/522684**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**
(Věstník č. 7/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/14123**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/09439**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/85
C 12 N 15/90

(71) Přihlášovatel:

GENVEC, INC., Rockville, MD, US;

(72) Původce:

McVey Duncan L., Derwood, MD, US;

Kovesdi Imre, Rockville, MD, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsoby a vektory pro místně specifickou
rekombinaci**

(57) Anotace:

Způsoby místně specifické rekombinace v buňce a vektory, které se mohou v takových metodách použít. Způsoby a vektory se mohou podle vynálezu použít za účelem získání trvalé exprese genu v buňce a modulace exprese genu. Při jednom preferovaném způsobu podle vynálezu dochází ke kontaktu buňky s vektorem, který obsahuje počátek replikace funkční v savčích buňkách, jenž se nachází mezi prvním a druhým rekombinantním místem v paralelním uspořádání. Při jiné preferované metodě dochází ke kontaktu buňky s vektorem, který obsahuje první a druhé rekombinantní místo v antiparalelních orientacích tak, že vektor vstupuje do buňky. Při obou metodách se buňce dále poskytuje místně specifická rekombináza, která umožňuje rekombinanci mezi prvním a druhým rekombinantním místem vektoru.

CZ 612-98 A3

Způsoby a vektory vhodné pro místně specifickou rekombinaci

Oblast techniky

Vynález popisuje způsoby a vektory vhodné pro místně specifickou rekombinaci v buňkách. Tyto metody a vektory se mohou použít za účelem dosažení perzistentní exprese genu v buňce a pro modulaci exprese genu.

Dosavadní stav techniky

Během několika posledních let vznikla řada nových přístupů ke genové terapii a řada nemocí se jeví potenciálně léčitelná použitím tzv. terapeutických genů." Obecně lze říct, že terapeutický gen je v daném stádiu nemoci nebo syndromu gen, který koriguje nebo kompenzuje zásadní deficit proteinu nebo v jiném případě je to gen, který je schopný potlačit určitý gen nebo neutralizovat negativní účinky jím kódovaného produktu. Terapeutický gen může být navíc gen, který zprostředkuje odumření buněk například při genové terapii rakoviny. Terapeutický úspěch při použití genové terapie závisí na vhodné expresi terapeutického genu a potenciálně na jeho stálosti v hostiteli. Zatímco exprese se může účinně řídit použitím různých dobře známých strategií klónování, perzistenci (to je dlouhodobá exprese genu v hostitelské buňce) lze těžko vylepšit.

Jako obecný přístup pro prodloužení exprese genu se používá pro transfer terapeutického genu vektor, který zaručuje stabilitu genu v hostiteli. Tato stabilita se posiluje použitím vektoru, který se integruje do genomu hostitele, což umožňuje současnou integraci terapeutického genu, který je nesen vektorem. Na základě těchto slov retrovirus, který se integruje do hostitelského genomu jako součást jeho životního cyklu, se může použít k uvedenému účelu. Avšak použití retroviru se neobejde bez problémů.

Například stabilní integrace retrovirového vektoru je omezena na cílové buňky, které aktivně syntetizují DNA; velikost fragmentu, který může nést vektor, je limitována malou velikostí vektoru; vektor nevykazuje tropismus pro tkáň; zmíněné vektory se rychle deaktivují systematicky dávanými protilátkami. Pro tyto a jiná omezení, která doprovázejí použití retrovirů, se dává přednost použití adenovirů (Ad), jež slouží jako další vektory pro genovou terapii (Rosenfeld et al., Science, 252, 431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell, 68, 143-155 (1992)).

Adenoviry nemají obal, tvoří pravidelné dvacetistěny, jejich průměr dosahuje 65-80 nanometrů, tvoří vnější kapsid a vnitřní jádro (Ginsberg (ed.), The Adenoviruses, Plenum Press, NY (1984)). Jádro adenoviru obsahuje lineární, dvouřetězcovou molekulu DNA. Intenzivně se studovaly dva lidské sérotypy, jmenovitě Ad2 a Ad5. S této studie vznikla řada dostupných informací o adenovirech. Tyto informace stejně jako řada použitelných vlastností adenovirů (mezi jinými skutečnost, že replikačně deficientní rekombinantní viry jsou snadno připravitelné a je možné je produkovat ve velkém množství za použití komplementujících buněčných linií; adenoviry jsou schopny infikovat skoro většinu buněčných typů, mezi něž patří diferenciované nebo neproliferující se buňky; s infekcí adenoviry se nespojuje vznik rakoviny) umožňuje, aby adenoviry se staly účinnými vektory pro zavádění genů *in vivo* a *in vitro* (Rosenfeld et al., (1991) citace uvedena shora); Rosenfeld et al., (1992) citace uvedena shora); Engelhardt et al., Hum. Gene Ther., 4, 79-769 (1993); Crystal et al., Nat. Genet., 8, 42-51 (1994); Lemarchand et al., Circ. Res., 72, 1132-1138 (1993); Guzman et al., Circ. Res., 73, 1202-1207 (1993); Bajocchi et al., Nat. Genet., 3, 229-234 (1993); Mastrangeli et al., J.Clin. Invest, 91, 225-234 (1993)).

Navzdory těmto výhodám adenovirových vektorů, adenoviry nejsou vhodným nástrojem pro přenos genů, protože jejich použitím se nedosáhlo uspokojivé dlouho trvající exprese aplikovaného terapeutického genu. První generaci adenovirových vektorů chybí podstatná oblast E1 (Rosenfeld et al., (1991) citace uvedena shora); . Boucher et al., Hum. Gene Ther., 5, 615-39 (1994)). Produkt *trans* genu z těchto virových vektorů se v modelu hlodavců detekuje po dobu přibližně dvou týdnů, pak jeho hladina poklesne na úroveň pozadí. V modelu imunosupresivních myší délka období detekovatelné exprese genu po infekci je podstatně delší stejně jako síla exprese (Yang et al., J. Virol., 69, 2004-15, (1995); Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 10, 4407-11 (1994)). Tyto data naznačují, že imunní studie je odpovědná za relativně nízké použití první generace adenovirových vektorů. Avšak neschopnost adenovirů setrvat v buňce, kde jsou integrovány do genomu hostitele naznačuje, že buňky, které exprimují terapeutický gen nesený vektorem, ztrácí tento vektor.

Řada vědců, kteří pracují s adenoviry, zvolily jiný způsob stabilizace rekombinantních vektorů, přičemž se získá dlouhodobá exprese genu. Jedním takovým způsobem, který zvyšuje účinnost dalších systémů, je udržení integrity transferovaného genu v hostiteli tvorbou episomu. Episom je extrachromozomální genový element, který se replikuje nezávisle ne genomu hostitelské buňky. Jako způsob vytvořit episomy z různých dvouřetězcových templátů DNA slouží vědcům za vzor Epstein-Barrové virus (EBV), který je schopen tvořit episomy během své latentní fáze.

EBV je lidský lyfotropický herpes virus, který způsobuje mononukleózu a spojuje se s nejméně dvěma druhy lidské rakoviny (Reisman et al., Molec. Cell. Biol., 5, 1822-1832 (1985)). EBV obsahuje dva počátky replikace, *oriLyt* a

oriP. Během latentní fáze EBV existuje jako molekula uzavřené cirkulární dvouřetězcové DNA, která používá pro replikaci *oriP* a jejíž počet kopií se drží v rozsahu 10 až 200 na buňku (Yong et al., *Gene*, 62, 171-185 (1988)). Plazmidy, které mají *oriP*, se také udržují v buňce a také exprimují jaderný antigen EBNA-1 (Yates et al., *Nature*, 313, 812-815, (1985); Jalanko et al., *Biochemica et Biophysica Acta*, 949, 206-212 (1988); Kioussis et al., *EMBO J.*, 6, 355-361 (1987); Jalanko et al., *Arch. Virol.*, 103, 157-166 (1988); Sugden et al., *J. Virol.*, 63, 2644-2649 (1989)). Za přítomnosti EBNA-1, *oriP* umožňuje replikaci plazmidu v různých buňkách savců, které EBV není schopen infikovat v kultuře (Reismann et al., citace uvedena shora; Yates et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 3806-3810 (1984)). Počátek replikace *oriP* obsahuje dva cis-působící elementy, jejichž aktivita je nutná (Middleton et al., *Advances in Virus Research*, 40, 19-55 (1991)). Elementy se separují ve velikosti 1 000 párů bazí (bp) a oba obsahují vícenásobné degenerované kopie segmentu o velikosti 30 bp. První element nazývaný rodinou repetit nebo FR obsahuje 20 tandemových repetit o velikosti 30 bp. Druhý element obsahuje segment o velikosti 114 bp, který zahrnuje dyádový symetrický element o velikosti 65 bp nebo DS.

Studie mutageneze ukazují, že dvě oblasti *oriP* působí proti sobě nezávisle na orientaci a na vzdálenosti (Middleton et al., citace uvedena shora). Delece intervenující oblasti mezerníku nebo připojení více než 1 000 bp k této oblasti neovlivní funkci *oriP*. Element FR je znám, že působí jako zesilovač, ale jeho úloha při replikaci není stále jasná. Avšak 20 tandemových repetit obsahujících FR může být nahrazeno vícenásobnými kopiemi DS. Pouhých 8 z 20 tandemových repetit nalezených v zesilovači FR je dostatečných v krátkodobém testu pro aktivitu zesilovače a replikaci plazmidu.

EBNA-1 se váže na repeticce o velikosti 30 bp, které jsou přítomny v obou elementech oriP. Protein EBNA-1 je nutný pro iniciaci replikace DNA blízko DS, který se objevuje jednou za cyklus během S fáze buněčného cyklu EBV (Middleton et al., citace uvedena shora). Pro replikaci plazmidu je repetitivní sekvence glycin-alanin, která obsahuje přibližně 1/3 proteinu a malou oblast C-konce proteinu, postradatelná (Yates et al. (1985), citace uvedena shora; Lupton et al., Mol. Cell. Biol., 5, 2533-2542 (1985)). Avšak tato sekvence brání imunnímu systému detekovat EBNA-1 a jeví se nezbytná pro stabilitu EBV a EBV-odvozených vektorů (Levitskaya et al., Nature, 375, 685-688 (1995)).

Stabilita episomů, která se získá použitím EBV, je potencionálně limitující pro dlouhodobou stabilitu a expresi terapeutického genu, pokud existuje nejméně nějaká možnost chyby při dělení nově syntetizovaných episomů mezi dceřinými buňkami a vzhledem k pronikavému negativnímu selekčnímu tlaku s ohledem na extrachromozomální genové elementy. Integrace episomu do neškodlivého lokusu v genomu, to je bezpečného pro transferovaný gen, odstraní potencionální chybějící stabilitu. Na základě těchto skutečností adeno-asociované viry (AAV) vykazují jedinečnou schopnost se integrovat s vysokou frekvencí do lidského chromozómu 19q13.3-qter (Kotin et al., Human Gene Therapy., 5, 793-801 (1994)). Uvedená schopnost AAV integrovat se do definovaného a příznivého místa genomu eliminuje risk inzerční mutageneze, která je způsobená nechtěnou aktivací nebo inaktivací genu, která doprovází náhodnou inzerci DNA (Schelling et al., Gene Therapy, 165-169 (1994)).

AAV je lidský parvovirus, který se pomnožuje buď jako integrovaný provirus nebo lytickou infekcí (Muzyczka, Current Topics in Microbiol. And Immunol., 158, 97-129 (1992)) a který se může použít jako vektor pro eukaryontní buňky

(americké patenty 4,797,368 a 5,173,414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4, 2072-2081 (1984); GenBank Database Accession Number J01901 nebo AA2C). Lytická fáze AAV infekce vyžaduje expresi produktů časných genů adenovirů Ela, Elb, E2a, E4 a VA RNA (Kotin et al., citace uvedena shora). K latentním infekcím dochází infekcí AAV za nepřítomnosti pomocného viru. Za těchto okolností AAV se účinně integruje do buněčného genomu a udržuje se v tomto stádiu pokud není nahrazen adenovirem.

Pro lokusem řízenou integraci cizího genu do lidského genomu se vyžadují pouze dva komponenty AAV: proteiny Rep a obrácené koncové repetice AAV (ITR). Každý ze čtyř proteinů Rep se kóduje stejným genem a vznikají alternativním sestřihem nascentní mRNA (Kyöstiö et al., J. Virol., 68, 2947-2957 (1994)). Dva větší proteiny Rep, Rep 78 a Rep 68, se váží na ITR AAV a působí jako na ATP nezávislá sekvenčně specifická endonukleáza s helikázovou aktivitou, přičemž během replikace DNA AAV rozmotává oblast ITR (Hölsher et al., J. Virol., 68, 7169-7177 (1994)). Menší proteiny Rep, Rep 52 a Rep 40, se jeví podstatnými pro akumulaci jednořetězcových progenových genomů, které se používají při balení virů.

ITR AAV se nacházejí na každém konci genomu. V případě, že virové ITR jsou jednořetězcové, tvoří vlásenkové struktury T-tvaru (Snyder et al., J. Virol., 67, 6096-6104 (1993)). Signály počátku replikace, balení, integrace a sestřihu se také nacházejí v oblasti virových ITR. Navázání proteinů Rep na ITR AAV odpovídá úloze této oblasti při replikaci, která je nezávislá na ITR, a při integraci řízené lokusem. Jestliže proteiny Rep nejsou přítomny, k replikaci nedochází a integrace do genomu je náhodná (Kotin et al., citace uvedena shora). ITR mohou fungovat buď v jejich přirozené formě nebo jsou-li klónovány do plazmidu jako dvouřetězcová DNA. Při vhodné aplikaci proteinů Rep (to je poskytnutí proteinů Rep

pomocí kódujících sekvencí umístěných *in trans*) se mohou cizí sekvence začleněné mezi ITR vystříhnout z plazmidu, replikovat se a integrovat se do genomu hostitelské buňky.

Implementace EBV strategie, za účelem vytvořit episom, nebo AAV strategie, za účelem stabilizovat episom nebo sekvence nesené episomem pomocí inkorporace do genomu hostitelské buňky, vyžaduje v každém systému přísně regulovat relevantní regulační protein (například EBNA-1 u EBV a proteiny Rep u AAV). Jeden z přístupů, který je vhodný pro dosažení přísné regulace exprese genu, je řízení exprese genu nebo genové sekvence pomocí místně řízenou rekombinací. Existují dva dobře prostudované systémy, které umožňují místně specifickou rekombinaci a mohou se použít pro různé aplikace. Jsou to fágový systém P1 Cro/Lox a kvasinkový systém Flp/Frt.

Proteiny Cre a Flp patří do rodiny λ integráz, což jsou rekombinázy DNA (Kilby et al., TIG, 9, 413-421 (1993); Landy, Current Opinion in Genetics and Development, 3, 699-707 (1993); Argos et al., EMBO J., 5, 433-440 (1986)). Rekombinázy Cre a Flp vykazují nápadné podobnosti, co se týče typů reakcí, kterých se účastní, a ve struktuře jejich cílových míst a mechanismů rekombinace (Jayaram, TIBS, 19, 78-82 (1994); Lee et al., J. Biolog. Chem., 270, 4042-4052 (1995); Whang et al., Molec. Cell. Biolog., 14, 7492-7498 (1994); Abremski et al., J. Mol. Biol., 192, 17-26 (1986); Adams et al., J. Mol. Biol., 226, 661-673 (1992)). Například rekombinace je nezávislá na replikaci a na exogenních zdrojích energie, jako je ATP, a funguje u nadšroubovicového i lineárního templátu DNA.

Rekombinázy Cre a Flp se uplatňují při vyvolání rekombinace mezi dvěma jejich cílovými místy, Lox a Frt. Obě cílová místa tvoří obrácené palindromy oddělené asymetrickou sekvencí (Mack et al., Nucleic Acid Research, 20, 4451-4455

(1992); Hoess et al., *Nucleic Acid Research*, 14, 2287-2300 (1986); Kilby et al., citace uvedena shora). Asymetrie se zaměřuje na rekombinaci. Jmenovitě rekombinace mezi cílovými místy uspořádanými paralelně (to je tzv. "přímé repetice") na stejné molekule lineární DNA vede k vystřižení intervenující sekvence DNA jako kruhové molekuly (Kilby et al., citace uvedena shora). Rekombinace mezi přímými repeticemi na molekule kruhové DNA vystřihne intervenující DNA a vzniknou dvě kruhové molekuly. Rekombinace mezi antiparalelními místy (to je místy, které mají obrácenou orientaci nebo se také nazývají "obrácené repetice") na lineární nebo kruhové molekule DNA vede k inverzi vnitřní sekvence. Dokonce působení rekombinázy může vést k reciproční záměně oblastí distálních k cílovému místu, v případě, že cíl je přítomen na oddělených lineárních molekulách, intramolekulární rekombinace se upřednostňuje před intermolekulární.

Oba rekombinantní systémy Cre/Box a Flp/Frt se používají z různých důvodů. Například místně specifická integrace do rostlinného, hmyzího, bakteriálního, kvasinkového a savčího chromozómu (Sauer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 5166-5170 (1988); Fukushige et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 7905-7907 (1992); Baubonis et al., *Nucleic Acids Research*, 21, 2025-2029 (1993); Hasan et al., *Gene*, 150, 51-56 (1994); Golic et al., *Cell*, 59, 499-509 (1989); Sauer, *Mol. Cell. Biolog.*, 7, 2087-2096 (1987); Sauer et al., *Methods: Companion to Methods in Enzymol.*, 4, 143-149 (1992); Sauer et al., *The New Biologist*, 2, 441-449 (1990); Sauer et al., *Nucleic Acids Res.*, 17, 147-167 (1989); Quin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 1706-1710 (1994); Orban et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 6861-6865 (1992)). Za použití těchto systému se sestavily eukaryontní virové vektory a získaly se začleněné DNA (Sauer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 9108-9112 (1987); Gage et al., *J. Virol.*, 66, 5509-5515 (1992);

Holt et al., *Gene*, 133, 95-97 (1993); Peakman et al., *Nucleic Acids Res.*, 20, 495-500 (1992)). Proběhly specifické delece chromozomálních sekvencí a znovuospořádání. Je možné vystřížení cizorodé DNA z λ vektorů ve formě plazmidu (Barinaga et al., *Science*, 265, 27-28 (1994); Rossant et al., *Nature Medicine*, 1, 592-594 (1995); Sauer, *Methods in Enzymol.*, 225, 890-900 (1993); Sauer et al., *Gene*, 70, 331-341 (1988); Brunelli et al., *Yeast*, 9, 1309-1318 (1993); InVitrogen (San Diego, CA) 1995 Catalog, 35; Clontech (Palo Alto, CA) 1995/1996 Catalog, 187-188). Schémata klónování se vytvořila tak, že rekombinace buď rekonstituuje nebo deaktivuje funkční transkripční jednotku pomocí delece nebo inverze sekvencí mezi místy rekombinace (Odell et al., *Plant Physiol.*, 106, 447-458 (1994); Gu et al., *Cell*, 73, 1155-1164 (1993); Lakso et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 6232-6236 (1992); Fiering et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8469-8473 (1993); O'Gorman et al., *Science*, 251, 1351-55 (1991); Jung et al., *Science*, 259, 984-987 (1993)). Podobně se vyvinula pozitivní a negativní strategie selekce a testování rekombinantů (Sauer et al., *J. Mol. Biol.*, 223, 911-928 (1992)). Geny kódující rekombinázy Cre nebo Flp jsou poskytnuty *in trans* za řízení buď konstitutivního, indukovatelného nebo vývojově řízeným promotorem nebo se zavede izolovaná rekombináza (Baubonis et al., citace uvedena shora; Dang et al., *Develop. Genet.*, 13, 367-375 (1992); Chou et al., *Genetics*, 131, 643-653 (1992); Morris et al., *Nucleic Acids Res.*, 19, 5895-5900 (1991)). Použití rekombinantních systémů nebo jejich komponentů v transgenních myších, v rostlinách a ve hmyzu vykazují mimo jiné, že hostitelé exprimují geny rekombináz bez zjevných škodlivých účinků, což potvrzuje, že proteiny jsou obecně dobře tolerovány (Orbin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 6861-6865 (1992)).

Nedávno se začaly používat replikačně deficitní adenovirové vektory obsahující gen Cre fága P1 za účelem studia intracelulární rekombinace zprostředkované Cre (Anton et al., J. Virol., 69, 4600-4606 (1995)). V těchto experimentech se adenovirový vektor exprimující Cre vnesl do buněk spolu s dalším adenovirovým vektorem, ve kterém se kódující sekvence reportního genu oddělila od libovolného promotoru vzájemně spolu nesouvisející intergenovou sekvencí lemovanou paralelními místy Lox. Rekombinace zprostředkovaná Cre vede k vystřížení intergenové sekvence a zpuštění dříve tichého reportního genu. Tento přístup umožňuje pouze pozitivní modulaci exprese genu a nikoli stabilní expresi genu, protože rekombinací aktivovaný gen se bude exprimovat pouze tak dlouho, dokud replikačně deficitní adenovirový vektor zůstane v buňce hostitele. Existuje možnost obrácené rekombinantní reakce, která současně vypíná reportní gen a ukládá horní limit získané úrovně exprese, způsobené pokračující produkcí Cre v hostitelské buňce (Anton et al., citace uvedena shora, strana 4605).

Existuje potřeba expresivního systému, ve kterém se může plně realizovat potenciál adenoviru a jiných vektorů vhodných pro genovou terapii. Vynález popisuje takové expresivní systémy. Vynález zvláště popisuje metody místně specifické rekombinace v buňce, vektory, které se mohou v těchto metodách použít a které umožní prodloužit expresi genu stejně jako modulovat expresi genu a které umožní obejít některé v textu zmíněné problémy podstatné v předchozích expresivních systémech.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje metody místně specifické rekombinace v buňce, stejně jako vektory, které se mohou v těchto metodách použít. Způsoby a vektory podle vynálezu se mohou použít pro

získání trvalé exprese genu v buňce a pro modulaci genové exprese.

Jedna preferovaná metoda podle vynálezu zahrnuje kroky: (a) umožnění kontaktu buňky s vektorem, který obsahuje počátek replikace funkční v savčích buňkách a nachází se mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které jsou lokalizovány paralelně, tak, že dojde k internalizaci vektoru do buňky, a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která provede rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem vektoru.

Jiná preferovaná metoda podle vynálezu z části zahrnuje kroky: (a) umožnění kontaktu buňky s vektorem obsahujícím první a druhé rekombinantní místo v antiparalelní orientaci tak, že vektor se internalizuje do buňky a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která provede rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem vektoru.

Vynález popisuje metody dosažení trvalé exprese genu v hostitelské buňce a vektory, které se mohou v takových metodách použít. Metody a vektory se mohou také použít při modulaci exprese genů. Metody a vektory podle vynálezu se využívají na základě nových přístupů (1) unikátní schopnosti EBV a AAV (to je schopnost EBV tvořit episomy a schopnost AAV vstupovat do lidského genomu), (2) aktivity rekombináz rekombinantních systémů takových, jako jsou Cre/Lox a Flp/Ftr rekombinantní systémy a (3) různé požadované vlastnosti adenovirů a jiných podobných virových a plazmidových vektorů.

Definice

V tabulce č. 1 jsou uvedeny zde používané zkratky a označení, které se používají při popise metod a vektorů.

Tabulka č. 1: zkratky a označení

AAV	adeno-asociovaný virus
Ad	adenovirus
bp	páry bazí
cDNA	komplementární DNA
CMV	cytomegalovirus
Cre	místně specifická rekombináza fága P1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DS	dyádový symetrický element obsahující jeden element oriP
EBV	Epstein-Barrové virus
EBNA-1	protein, který váže oriP a moduluje replikaci EBV a episomů vytvořených EBV
FCS	první kódující sekvence
Flp	cílové místo rozeznávané kvasinkovým proteinem Frt
FR	EBV rodina repetice obsahující jeden element oriP
FRS	první rekombinantní místo
Frt	kvasinková místně specifická rekombináza
HSV	herpes simplex virus typ I a II
ITR	AAV obrácené koncové repetice, které obsahují sekvence, které fungují jako počátek replikace
kb	páry kilobazí
Lox	cílové místo rozeznávané proteinem Cre fága P1
oriLyt	EBV počátek replikace zahrnutý do replikace v lytické fázi
oriP	EBV počátek replikace zahrnutý do replikace v latentní fázi
P	promotor
PCR	polymerázová řetězová reakce

PG	cizorodý gen
Rep	proteiny, které váží ITR, které působí při replikaci a integrují se do genomu AAV a vektorů získaných z AAV
RNA	ribonukleová kyselina
RS	rekombinantní místo
RSV	virus Rousova sarkomu
SA	akceptorové místo spojení
SCS	druhá kódující sekvence
SD	donorové místo spojení
SRS	druhé rekombinantní místo
SV40	opičí virus 40

"Vektor" je molekula (například virus nebo plazmid), která slouží k přenosu kódující informace do hostitelské buňky. "Počátek replikace" je sekvence na vektoru nebo na chromozomu hostitelské buňky, která umožňuje replikaci extragenomových elementů (například viry nebo plazmidy) nezávisle na genomu hostitelské buňky.

"Gen" je libovolná sekvence nukleové kyseliny kódující protein nebo nascentní molekulu RNA. "Cizorodý gen" je typický gen, který není typicky přítomný ve vektoru a je do něho subklónován podle vynálezu. Jeho zavedení do hostitelské buňky je doprovázeno zřejmou změnou v intracelulárním prostředí (například růstem množství deoxyribonukleové kyseliny (DNA), ribonukleové kyseliny (RNA), peptidu nebo proteinu nebo změnou rychlostí jejich produkce nebo degradace). "Produkt genu" je buď ještě nepřeložená molekula RNA přepsaná z daného genu nebo kódující sekvence (například mRNA nebo antisense RNA) nebo polypeptidový řetězec (to je protein nebo peptid) přeložený z molekuly mRNA přepsané z daného genu nebo kódující sekvence. Zatímco gen obsahuje kódující sekvence a libovolné nekódující sekvence "kódující

sekvence" nazahrnuje žádné nekódující sekvence (například regulační) DNA. Gen nebo kódující sekvence je "rekombinantní," jestliže sekvence bází podél celé délky molekuly se změnila ze sekvence, ve které se gen nebo kódující sekvence typicky v přírodě nachází nebo jestliže se sekvence bází v přírodě typicky nenachází. Podle vynálezu gen nebo kódující sekvence se může zcela nebo částečně připravit synteticky, může obsahovat sekvence genomové nebo komplementární DNA (cDNA) a může se vyskytovat ve formě buď DNA nebo cDNA.

Nekódující sekvence nebo regulační sekvence zahrnují promotorové sekvence. "Promotor" je sekvence DNA, která řídí navázání RNA polymerázy, čímž vyvolává syntézu RNA. "Zesilovače" jsou cis-působící elementy DNA, které stimulují nebo inhibují transkripci přilehlých genů. Zesilovač, který inhibuje transkripci, se také nazývá "silencer". Zesilovače se odlišují od míst vázajících DNA pro sekvenčně specifické proteiny vázající DNA, které se nachází pouze v promotoru (které se také nazývají "elementy promotoru") a ve kterých zesilovače mohou fungovat v obou orientacích a na vzdálenost až několika párů kilobází, dokonce s místa nacházejícího se po směru transkribované oblasti.

Podle vynálezu "rekombinantní místa" tvoří obrácené palindromy oddělené asymetrickou sekvencí, ve které dochází k místně specifické rekombinantní reakci. Vynález popisuje preferované provedení, kde se přednostně používají rekombinantní místa (například první a/nebo druhé rekombinantní místo). Avšak může se použít více nebo méně rekombinantních míst (například 1 nebo více míst jako například 3, 4, 5 nebo 6 rekombinantních míst). Mohou se použít různé typy rekombinantních míst, například kombinace míst Lox a dvě místa Flp. "Rekombináza" je protein, který umožňuje rekombinaci mezi určitými rekombinantními místy.

Podle vynálezu je kódující sekvence "operativně spojena" s promotorem v případě, kdy promotor je schopen řídit transkripci této kódující sekvence. Promotor "sousedí" s rekombinančním místem (to je s prvním nebo druhým rekombinantním místem) v případě, že promotor je schopen uplatnit své působení na transkripci prostřednictvím oblasti rekombinantního místa a tím i na sekvence spojené s rekombinantním místem. Kódující sekvence (to je kódující sekvence nebo druhá kódující sekvence) "sousedí" s rekombinantním místem (to je první nebo druhé rekombinantní místo) v případě, že kódující sekvence je v takové vzdálenosti od rekombinantního místa, že toto místo může být transkripčně řízeno promotorem spojeným s rekombinantním místem, které uplatňuje svůj účinek prostřednictvím oblasti rekombinantních míst a na kódující sekvenci. Aby k tomuto mohlo dojít kódující sekvence se vyskytuje přednostně ve vzdálenosti okolo 1000 párů bazí od rekombinantního místa a dokonce více se upřednostňuje vzdálenost okolo 500 párů bazí. Avšak v případě, že promotor je oddělen od kódující sekvence a řídí ji opačně orientovanou intervenující kódující sekvencí, upřednostňuje se vzdálenost mezi promotorem a kódující sekvencí okolo 5000 párů bazí nebo méně, dokonce více se upřednostňuje vzdálenost okolo 2000 párů bazí a méně. "Multigenní message" je jednéduchá mRNA, z které se překládá více než jeden peptid nebo protein.

Metody vhodné pro místně řízenou rekombinaci

Vynález popisuje způsoby provedení místně specifické rekombinace v buňce. Obě rekombinační metody zahrnují kontakt buňky s vektorem, který obsahuje první a druhé rekombinantní místo, tak, že vektor se internalizuje do buňky a pak poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním

místem vektoru. První způsob místně specifické rekombinace zahrnuje použití vektoru (to je "paralelní rekombinanční vektor"), který obsahuje první a druhé rekombinantní místa v paralelní orientaci, zatímco druhý způsob místně specifické rekombinace zahrnuje použití vektoru (to je "antiparalelní rekombinanční vektor"), který obsahuje první a druhé rekombinantní místa v antiparalelní (nebo v opačné) orientaci.

Způsob paralelní rekombinace je schopný provést místně specifickou rekombinaci buňce tak, že rekombinace generuje episom obsahující počátek replikace, který je funkční v savčích buňkách, který se může replikovat samostatně, nezávisle na genomu hostitele, a může se podílet na stabilním uchování vektorů nesoucích jeden nebo více cizorodých genů v hostitelských buňkách. Způsob paralelní rekombinace je použitelný pro stabilizaci vektorů, které se neintegrují do genomu hostitelské buňky (například vektory Ad nebo HSV), tím že jim poskytnou schopnost replikovat se způsobem "podobným lysogennímu". Tato metoda se použije za účelem dosažení stabilní exprese genu stabilizací vektorů, které nesou jeden nebo více cizorodých genů.

Způsob paralelní rekombinace se může také použít pro místně specifickou rekombinaci v buňce, kde rekombinace generuje tzv. "miniplazmid," který nezahrnuje počátek replikace schopný fungovat v savčích buňkách a který není schopný se replikovat nezávisle na hostitelském genomu. Druhý produkt rekombinace generovaný paralelní rekombinací (to je produkt jiný než episom nebo miniplazmid, který sám obsahuje buď lineární nebo uzavřenou kruhovou strukturu, což závisí na skutečnosti, zda původní substrát pro rekombinanční reakci má lineární nebo uzavřenou kruhovou strukturu) může být také funkční v buňce. Takový miniplazmid může zlepšit krátkodobé zavedení proteinů do buněk (například proteinu Rep).

V jiném případě je také možné, že vektor použitelný pro místně specifickou rekombinaci zahrnuje před rekombinací více než jeden počátek replikace. Vektory, které obsahují více než jeden počátek replikace, jsou dobře známy v oboru.

Obě paralelní a antiparalelní rekombinantní metody se mohou použít pro pozitivní i negativní regulaci transkripce kódující sekvence nebo současně pro pozitivní regulaci transkripce jedné a negativní regulaci transkripce jiné kódující sekvence prostřednictvím rekombinace. Způsob antiparalelní rekombinace se liší od způsobu paralelní rekombinace tím, že nedochází k tvorbě episomu nebo miniplazmidu.

Rekombinantní metody podle vynálezu probíhají v buňce, preferuje se eukaryontní buňka. Eukaryontní buňka je buňka, která má opravdové jádro obklopené jadernou membránou. Výhodné je, aby eukaryontní buňka pocházela z vícebuněčného druhu (například protiklad buňky jednobuněčných kvasinek). Preferuje se savčí buňka (optimální je lidská buňka). Tyto způsoby se mohou účinně provést na řadě různých buněčných typů, jako jsou ptačí a rybí buňky a lidské buňky dále mezi než patří, ale nejsou omezeny na buňky hlodavců, opice, šimpanze, kočky, psa, kopytnatců (jako jsou vepř nebo přežvýkavci) a lidské buňky. Přenos vektoru do určitého typu buňky je limitován například chybějícími receptory pro určitý virus, jako je adenovirus. Účinnost přenosu se může zvýšit použitím následující metodou: vnést lidský adenovirus do krevních buněk nebo do jiného typu buněk. V případě lidských buněk virus například tvoří DNA-polylysinový komplex obsahující ligand (například transferin) (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6099-6103 (1992)) nebo se mohou použít podobné metody, které jsou odborníkům dobře známé.

V případě popsaných nových metod se může využít libovolný vhodný vektor. Může jít o libovolný vektor,

lineární nebo kruhový, který je vhodný pro zavedení nukleových kyselin do eukaryontních buněk a je schopný fungovat jako vektor, což znamená, aby během některé fáze jeho existence převážně tvořil dvouřetězcovou DNA. Upřednostňuje se, aby výsledný vektor byl kompatibilní s hostitelskou buňkou, to znamená, aby byl schopen přepisovat sekvenční nukleové kyseliny subklónované do vektoru a jestliže je to potřeba, aby dokázal přeložit nascentní mRNA.

Optimální vektor je virového původu a může obsahovat a může obsahovat jednu nebo více heterologních nebo rekombinantních sekvencí, například kódující sekvenci, cizorodý gen, promotor nebo podobně. Upřednostňuje se vektor, který obsahuje minimální sekvenční nutnou pro balení a zavedení do buňky.. Požaduje se, aby vektor byl obsažen ve viru, který má buď obal nebo ne. Například se preferuje vektor, kterým je virus tvořící obal z rodiny *Hepadnaviridae*, *Parvoviridae*, *Papovaviridae* nebo *Adenoviridae*. Preferovaným virem bez obalu podle vynálezu je virus z rodiny *Hepadnaviridae*, zvláště pak *Hepadnavirus*. Z rodiny *Parvoviridae* se preferuje rod *Parvovirus* (například parvoviry savců a ptáků) nebo *Dependovirus* (například adeno-asociované viry (AAV)). Virus z rodiny *Papovaviridae* je s výhodou z podrodiny *Papillomavirinae* (například papilomaviry zahrnující, ale ne omezeny na lidské papilomaviry (HPV) 1-48 a hovčezí papilomaviry (BPV)) nebo z podrodiny *Polyomavirinae* (například polyomaviry zahrnující, ale ne omezeny na JC, SV40, BK viry a vyšší polyomaviry). Virus z rodiny *Adenoviridae* je s výhodou z rodu *Mastadenovirus* (například savčí adenoviry) nebo *Aviadenovirus* (například ptačí adenoviry). Vhodným vektorem může být i virus tvořící obal z rodiny *Herpesviridae* nebo může jít o Sindbis virus. Preferovaným virem, který tvoří obal, podle vynálezu virus rodiny *Herpesviridae*, zvláště podrodiny *Alphaherpesvirinae*

(například viry podobné viru herpes simplex), rodu *Simplexvirus* (například viry podobné viru herpes simplex), rodu *Varicellavirus* (například varicela a viry podobné viru pseudovztekliny), podrodiny *Bataherpesvirinae* (například cytomegalovirus), rodu *Cytomegalovirus* (například lidský cytomegalovirus), podrodiny *Gammaherpesvirinae* (například s lymfocyty asociované viry) nebo rodu *Lymphocryptovirus* (například EB podobné viry). Zvláště se preferuje, aby virový komponent vektoru se vybral ze skupiny obsahující Ad, herpes simplex virus typ I a II (HSV), EBV, virus vakcínie, papilomavirus (například lidský (HPV) nebo hovězí (BVP)), JC, opičí virus 40 (SV40), polyomavirus (například lidský nebo myší), virus hepatitidy B a cytomegalovirus (CMV). Používá se metoda paralelní rekombinace, při které se tvoří episom, vektor je odvozen z viru, který netvoří proviry jako část svého replikačního cyklu.

Zvláště preferovaným vektorem je podle vynálezu adenovirový vektor (to je virový vektor rodiny *Adenoviridae*, optimální je z rodu *Mastadenovirus*). Adenovirový vektor je adenovirus libovolného sérotypu. Použitá kultura adenoviru se může vytvořit z adenovirového sérotypu od 1 až do 47, současně dostupný u instituce American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) nebo z jiného sérotypu adenoviru dostupného z jiného zdroje. Adenovirus může být podskupiny A (například sérotypy 12, 18, 31) nebo podskupiny B (sérotypy 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35), podskupiny C (například sérotypy 1, 2, 5, 6), podskupiny D (například sérotypy 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36 až 39, 42 až 47), podskupiny E (sérotyp 4), podskupiny F (sérotyp 40, 41) nebo libovolný jiný sérotyp adenoviru. Preferuje se však adenovirus sérotypu Ad2 nebo Ad5.

Adenovirus, který se používá pro přenos nukleové kyseliny může být adenovirus divokého typu (to je replikačně

kompetentní). V jiném případě adenovirus může obsahovat genetický materiál nejméně s jednou modifikací, který ho mění na virus replikačně deficientní. Modifikace genomu adenoviru může zahrnovat, ale není omezena na adici segmentu DNA, uspořádání segmentu DNA, delecí segmentu DNA, nahrazení segmentu DNA nebo zavedení léze DNA. Velikost segmentu DNA se může pohybovat mezi jedním nukleotidem až 36 páry kilobází (kb) (což je přibližně velikost adenovirového genomu) nebo v jiném případě se může velikost segmentu rovnat maximálnímu množství, které se může zabalit do virionu adenoviru (což je okolo 38kb). Preferované modifikace v adenovirovém genomu jsou modifikace v oblastech E1, E2, E3 nebo E4.

Vektory podle vynálezu mohou dále obsahovat cizorodý gen. Cizorodý gen může být ve vektoru v libovolné orientaci. Může se použít libovolný vhodný cizorodý gen, jako reportní gen nebo terapeutický gen a to tak dlouho, dokud je cizorodý gen schopný být exprimován v buňce, ve které je internalizovaný vektor. Gen může obsahovat reportní gen nebo sekvenci nukleové kyseliny, která kóduje protein detekovatelný v buňce. Gen také může obsahovat terapeutický gen, který ovlivňuje hladinu RNA a proteinu. Protein se může použít při léčbě dědičných nemocí, jako je například regulátor cDNA transmembránové konduktance u cystické fibrózy, který se používá pro léčbu cystické fibrózy. Protein kódovaný terapeutickým genem může uplatnit svůj terapeutický účinek tím, že dojde k odumření buňky. Expres genu jako taková může vést k usmrcení buňky, jako například tomu je u genu toxinu A difterie. Expres genu může způsobit selektivní citlivost buňky k jistým lékům, například exprese genu HSV tymidinové kinázy způsobuje citlivost buněk na antivirové látky, které zahrnují acyklovir, gancyclovir a FIAU (1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-5-jodouracil). Tento uvedený přístup, při kterém dochází k odumírání buněk, (který

se může použít například při léčbě rakoviny) může dále být podpořen použitím ve vektoru tzv. "runaway replication origin", jak se popisuje dále. Avšak použití takového "runaway" replikačního systému není omezeno na usmrcení buněk, ale může se použít například za okolností, kde je nutná krátkodobá silná exprese (například při zavedení velkého množství proteinu rekombinantním způsobem).

Terapeutický gen může působit na hladinu RNA například kódováním antisense message nebo ribozómu, proteinu, který ovlivňuje sestřih nebo zpracování 3'-konce (například polyadenylace), nebo může kódovat protein, který působí na sílu exprese jiného genu v buňce (to je v případě, že se uvažuje, že exprese genu zahrnuje všechny kroky iniciace transkripce až po produkci upraveného proteinu), dále zprostředkováním změny rychlosti akumulace mRNA, změny transportu mRNA a/nebo změnou posttranskripční refulace. Takový cizorodý gen může kódovat libovolný jiný protein, například EBNA-1 a může se vyskytovat samostatně nebo spolu s dalším cizorodým genem(y) umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem.

Transformovaný cizorodý gen může obsahovat DNA, jejíž velikost může odpovídat jedné repetiční jednotce (to je nukleotid pro DNA) až velikosti, při které je snadné ji izolovat nebo syntetizovat nebo přenést do hostitele za použití metody podle vynálezu, je možné ji zabalit, pokud je obsažena ve virových vektorech nebo dosahuje horního limitu velikosti plazmidových vektorů. Cizorodý gen může tvořit nebo kódovat kódující nebo nekódující sekvence, sense nebo antisense sekvence zahrnující ribozómy, nebo druhy katalytické RNA (Hampel et al., Nucleic Acids Research, 18, 299-304 (1990); Cech et al., Annual Rev. Biochem., 55, 599-629 (1986)), stejně jako rekombinačně vytvořené sekvence nebo sekvence, které se normálně *in vivo* nevyskytují.

Podobně, vektory používané v paralelních a antiparalelních metodách mohou zahrnovat jiné geny a kódující sekvence. Například kódující sekvence nebo druhá kódující sekvence podle vynálezu může obsahovat kódující sekvenci Cre nebo Flp, kódující sekvenci EBNA-1 nebo libovolnou jinou kódující sekvenci dále popsanou.

Zvláště paralelní a antiparalelní rekombinantní metody podle vynálezu se mohou použít pro zavedení proteinů Rep do buněk, buď jako kódující sekvence nebo jako cizorodý gen. V literatuře se uvádí různé mutované proteiny Rep a odchylky na sekvenci kódující Rep (McCarty et al., J. Virol., 66, 4050-7 (1992); Kyöstiö et al., citace uvedena shora), které se mohou použít. Metody umožňují průběh proteinem Rep zprostředkované rekombinace sekvencí lemovaných jedním nebo více ITR adeno-asociovaného viru (nebo sekvence obsahující tyto ITR, které jsou známy v oboru) do lidského chromosomu 19 nebo do sekvencí, které jsou popsány v literatuře (Linden et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 7966-7972 (1996)). Tyto metody se dají také použít při proteinem Rep zprostředkované rekombinaci sekvencí lemovaných ITR adeno-asociovaného viru do jiné genomové oblasti, pokud proteiny Rep preferenčně řídí rekombinaci do chromosomu 19, ale mohou také řídit rekombinaci do jiných míst.

Pak takové přístupy se využívají pro vytvoření multigenního message z kódující sekvence a kódující sekvence intervenující mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí. Například kódující sekvence EBNA-1 (nebo některá jiná kódující sekvence) může být druhým otevřeným čtecím rámcem (ORF) ve dvougenní (nebo multigenní) kazetě, která se aktivuje rekombinací. Virový promotor pro EBV, který řídí expresi EBNA-1 poskytuje pouze okolo 0,1% aktivity při srovnání s použitím promotoru CMV. V digenní kazetě, však exprese druhého genu tvoří 0,1% prvního genu a 10-ti násobek

pozadí. V tomto případě EBNA-1 se bude indukovat rekombinací. To je nutné zvláště v případech, ve kterých exprese EBNA-1 během propagace virových vektorů může potencionálně působit v oriP, a tak destabilizuje virus. V jiném případě, kdy se oriP replikuje pouze jednou za cyklus buňky, je možné za některých okolností vytvořit virus, ve kterém EBNA-1 není regulována, ale místo toho je řízena slabým konstitutivním promotorem.

Ve spojení s paralelními a antiparalelními rekombinantními metodami a vektory se může využít libovolná vhodná kombinace rekombinantních míst a rekombináz. První a druhé rekombinanční místo přednostně obsahuje Lox místa a rekombináza obsahuje Cre nebo první a druhé rekombinantní místo obsahuje Frt místa a rekombináza zahrnuje Flp. V jiném případě rekombináza může být jiný druh rekombináz rodiny λ integráz (nebo libovolných jiných vhodných rekombináz) a rekombinanční místo může být odpovídající sekvence, ve které rekombináza působí. Rekombináza se může do buněk zavést libovolným vhodným způsobem, například umístěním sekvencí kódující rekombinázu do zaváděcího vektoru (například jako kódující sekvence nebo cizorodý gen), společná aplikace druhého vektoru, který kóduje gen rekombinázy nebo přidáním exogenní rekombinázy.

Preferuje se, že kódující sekvence Cre tvoří kódující sekvenci rekombinázy Cre bakteriofága P1 nebo různé mutace této sekvence, jak se popisuje v literatuře (Wierzbicki et al., J. Mol. Biol., 195, 785-794 (1987); Abremski et al., J. Mol. Biol., 202, 59-66 (1988); Abremski et al., J. Mol. Biol., 184, 211-20 (1988); Abremski et al., Protein Engineering, 5, 87-91 (1992), Hoess et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 6840-6844 (1987); Sternberg et al., J. Mol. Biol., 187, 197-212 (1986)) nebo protein Cre dodávaný do buněk se produkuje jednou z těchto sekvencí rekombinantním způsobem. Mohou se použít další mutace této kódující sekvence, která

bude ještě izolována, pokud variace proteinů vzniklých z takových mutací jsou schopny umožnit průběh rekombinace v místě Lox. Dále se může, za účelem zvýšení koncentrace proteinu Cre v jádru, k sekvenci kódující Cre přidat signál umístění do jádra. Je však možné zavést do buňky vektor kódující komplementární Cre nebo jiné mutantní rekombinázo-
v^o proteiny, které poskytují rekombinázo-
v^o aktivitu pomocí intragenní nebo intergenní komplementace. Test pro zjištění funkce Cre v místech Lox probíhá podle popisu v publikaci autorů Abremski et al. (Abremski et al., J. Biolog. Chem., 259, 1509-1514 (1984) a Sauer et al. (Sauer et al. (1990), citace uvedena shora)).

Jestliže se hovoří o rekombinaci řízené Cre/Lox, pak se s výhodou používá místo loxP jako Lox místo nebo se začleňují různé mutace této sekvence tak, jak se popisuje v literatuře (Mack et al., citace uvedena shora; Hoess et al., (1986) citace uvedena shora; Hoess et al., Biochemistry, 81, 1026-29 (1984); Hoess et al., Gene, 40, 325-329 (1985); Abremski et al., J. Biol. Chem., 261, 391-396 (1986)). Mohou se použít podobné mutované sekvence loxP, které se musí ještě izolovat, pokud takové sekvence jsou schopny sloužit jako rekombinantní místa pro Cre.

První nebo paralelní rekombinantní metodě a druhé nebo antiparalelní rekombinantní metodě se dá lépe porozumět na základě zde uvedených obrázků, zvláště pak obrázků č. 1A až 1C až obrázků 5A až 5G, které zobrazují různé názorné provedení paralelních a antiparalelních rekombinantních vektorů použitelných v uvedených metodách podle vynálezu.

a. Paralelní rekombinantní metoda

Paralelní rekombinantní metoda podle vynálezu umožňuje vznik buď miniplazmidu nebo episomu z extrachromozomálního genového elementu. Zatímco miniplazmid se nereplikuje v buňce (a tak se nepoužívá v případě, kdy se vyžaduje krátkodobé

zavedení nebo integrace sekvence) episom je schopný se v buňce replikovat mimo genom. Episom se získal v případě, že počátek replikace je přítomen v oblasti substrátu rekombinace, který má kruhovou strukturu jako výsledek rekombinace (jak zobrazují obrázky 1A až 1C); miniplazmid se získal v případě, že takový počátek replikace neexistuje. Paralelní způsob rekombinace pak má zvláštní využití v případě virových vektorů, které nejsou v buňkách stabilní, jako následek jejich neschopnosti se integrovat jako provirus do genomu hostitele nebo v případě virů, jako jsou HSV, jejichž genom je během latentní fáze v klidu. Tento způsob se může použít za účelem získání trvalé exprese genu, které se dosáhne stabilizací vektorů nesoucích cizorodý gen v hostitelských buňkách, které nejsou typicky stabilní nebo jsou v klidu při latentní fázi a také se může použít pro modulaci exprese genů, které jsou nesený těmito vektory. Obecně existují tři předpoklady pro zavedení episomů podle této metody: (1) počátek replikace, (2) způsob vystřižení episomu ze zaváděcího vektoru a (3) metoda zajištění segregace dceřinné molekuly v každé buňce při mitóze.

Paralelní metoda rekombinace umožňující místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce obsahuje (a) kontakt buňky s vektorem, který obsahuje počátek replikace funkční ve savčích buňkách nacházející se mezi prvním a druhým rekombinantním místem umístěným paralelně, tak, že dochází k internalizaci vektoru do buňky a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem vektoru.

Preferovaný vektor znázorněný na obrázku č. 1, buď lineární virus (to jsou virové sekvence označené tečkovaným rámečkem) nebo kruhová molekula (to jsou sekvence plazmidu nebo viru označené tečkovanou čarou), se může použít ve

spojení s paralelní rekombinační metodou. Vzhledem k úvahám o zavedení episomu uvedeným dříve v textu se při paralelní rekombinační metodě a také při preferované antiparalelní rekombinační metodě může použít počátek replikace, který je funkční v savčích buňkách (například počátek izolovaný ze savčích buněk nebo virový počátek replikace jako jsou, ale nejsou jimi omezeny, počátek replikace z Ad, HSV, EBV, papilomaviru, viru vakcinie nebo polyomaviru). Vynález dále popisuje sadu vektorů, které poskytují buď jednoduchý integrovaný templát, nízký nebo ztřední počet episomů nebo miniplazmidů v jedné buňce nebo až tisíce episomů na jednu buňku, přičemž každý z nich může obsahovat různé kódující sekvence, promotory a/nebo cizorodé geny.

Vyžaduje se, aby vektory používané ve spojení s uvedenými metodami měly počátek replikace, který zahrnuje sekvenci latentního replikonu EBV, *oriP* nebo variace této sekvence, které se popisují v literatuře (Middleton et al., citace uvedena shora; Reisman et al., citace uvedena shora). Tato sekvence může dále obsahovat odchylky na *oriP* sekvenci, což umožňuje, že takové mutované sekvence jsou schopny se replikovat samostatně na extragenní DNA (Middleton et al., citace uvedena shora; Reisman et al., citace uvedena shora). Avšak v paralelních a antiparalelních rekombinačních metodách počátek replikace může být libovolný počátek replikace schopný fungovat v libovolné buňce. Mezi tyto buňky patří neeukaryotní buňky nebo buňky jednobuněčných eukaryont (například prokaryont a kvasinek) (M. Depamphilis, Ed., DNA Replication in Eukaryotic Cells (Cold Spring Harbor Press, NY, 1996)).

Je nutné zmínit, že *oriP* má různé biologické funkce, které vykazují řada počátků replikace DNA, které se charakterizovaly z virů. Jmenovitě *oriP* umožňuje řízení replikace plazmidové DNA tak, že ty buňky co přežijí nejsou

poškozeny. Jiné počátky replikace nazývané "runaway" počátky replikace dovolují exponenciální rychlost replikace DNA během buněčného cyklu a mohou vést k odumření buňky v závislosti na druhu dalšího vektoru, který je přítomen na vektoru. Takové "runaway" počátky replikace zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, počátky replikace SV40, BK, polyomavirů, Ad a HSV-1. Tyto "runaway" počátky replikace mohou také přednostně použít v metodách a ve vektorech podle vynálezu a mohou se také aplikovat za jiným účelem než je usmrcení buněk. Samozřejmě může být nutné poskytnutí dalších kofaktorů buňce, aby počátky replikace správně fungovaly.

Zvláště při použití "runaway" počátků replikace polyomaviru (Muller, Mol. Cell. Biol., 8, 5000-5015 (1988) a GenBank Database Accession number J02288 nebo PLY 2CG) se pro iniciaci replikace virové DNA vyžaduje velký virový T antigen. Tento protein působí tím, že se váže na oblast počátku replikace, rozmotává DNA v této oblasti a umožňuje působení dalších buněčných enzymů (jako je DNA polymeráza). Při použití takového počátku replikace z polyomaviru je nutné nejméně buňce poskytnout virový T antigen buď jako kódující sekvenci (například první, druhou nebo jinou kódující sekvenci) nebo cizorodý gen (*in cis* nebo *in trans*). V některých případech vedle virového T antigenu mohou být také nutný další permissivní faktory například pro optimalizaci virové replikace. Používaný polyomavirový počátek replikace je počátek myšího polyomaviru. Avšak také se preferují lidské počátky replikace nebo z jiných polyomavirů. Sekvence kódující tyto počátky replikace stejně jako jejich variace jsou známy v oboru (Muller, citace uvedena shora).

Podobně, se může použít počátek replikace, který dává vzniku vícenásobnému počtu episomů v jedné buňce. Například ve vektoru podle vynálezu se může použít papilomavirový počátek replikace (popsaný v GenBank Database Accession

Number PAPABPV1, s kompletním genomem BPV1 se popisuje v GenBank Database Accession Number X02346, časná kódující sekvence BPV4 se popisuje v GenBank Database Accession Number D00146). Genomy papilomavirů se v transformovaných buňkách udržují jako plazmidy s vyšším počtem kopií. Když se použije takový papilomavirový počátek replikace, je nutné buňce poskytnout virový protein E1 (například jako kódující sekvenci nebo cizorodý gen umístěný *in cis* nebo *in trans* nebo je nutné ho dodat exogenně). V některých případech je nutné buňce poskytnout zdroj virového proteinu E2 pro optimalizaci replikace. Papilomavirový počátek replikace, proteiny E1 a E2 jsou známy v oboru a mohou se použít tyto sekvence nebo jejich variace (Pirsoo et al., EMBO J., 15, 1-11 (1996), Grossel et al., Virology, 217, 301-310 (1996)). Z papilomavirových počátků replikace se zvláště preferují bovinní. V jiném případě se z papilomavirů preferují lidské, ale může se použít i jiný zdroj viru.

Zatímco tyto a jiné počátky replikace, které způsobují, že kruhový element se může na genomu hostitelské buňky autonomně replikovat, se mohou použít místo *oriP*. Když se použije *oriP* je nutné buňce dodat EBNA-1. Jako i v jiných případech buněčných replikačních proteinů, tak protein EBNA-1 se může dodat exogenně nebo jako kódující sekvence *in cis* nebo *in trans* uspořádání vzhledem k *oriP*, stejným způsobem jako se popisuje zavedení rekombináz do buňky.

Dokonce plazmidy, které mají *oriP* v nepřítomnosti proteinu EBNA-1, mohou být stabilní v buňkách, které jsou infikované EBV (Lupton et al., citace uvedena shora; Teshigawara et al., Nuc. Acids. Res., 20, 2607 (1992)), sekvence kódující EBNA-1 dohromady s *oriP* tvoří minimální komponenty pro stabilní zachování kruhového plazmidu odvozeného od EBV v kultivovaných buňkách, které nejsou infikovány EBV. Avšak, jak je zde dále uvedeno, způsob

paralelní rekombinace se může použít pro zavedení proteinů Rep (ale i jiných proteinů) do buňky, kde se nevyužívá počátek replikace.

Vystřížení episomu nebo miniplazmidu z paralelního rekombinačního plazmidu a jeho následná recirkulizace se uskuteční pomocí rekombinačního systému, který zahrnuje ve vektoru první a druhé rekombinační místo (FRS a SRS na obrázku č. 1A) a místně specifickou rekombinázu, která působí v prvním a druhém rekombinantním místě a umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem vektoru. Přítomnost dvou rekombinantních míst, které jsou umístěny paralelně na jednoduché molekule DNA vede k vystřížení intervenujících sekvencí vhodnou rekombinázou tak, že tvoří uzavřenou kruhovou molekulu. K dělení episomu mezi dceřinné buňky se může uskutečnit aplikací EBNA-1, který pravděpodobně funguje navázáním na genom hostitelské buňky a *oriP* (nebo jiný počátek replikace) a v podstatě protlačí episom do nascentí buňky nebo protein, který má stejnou funkci.

Pokud se do buňky aplikuje rekombináza kódováním *oriP* nebo jiného počátku replikace, který je funkční v savcích buňkách mezi dvěma paralelními rekombinantními místy ve vektoru, se vytvoří episom. Za účelem vytvoření buněk, do kterých se vnesl paralelní rekombinační vektor s takovou místně specifickou rekombinázou, se paralelní rekombinační vektor (jako se ukazuje na obrázku č. 1A) rekombinoval mezi prvním a druhým rekombinančním místem tak, aby tvořil episom (jak je ukázán na obrázku č. 1C). Mini-plazmid může podobně vznikat tam, kde neexistuje počátek replikace mezi paralelními rekombinačními místy. Když se virový vektor používá jako nástroj pro zavedení episomu nebo miniplazmidu, druhý produkt rekombinace (jak se ukazuje na obrázku č. 1B) je zkrácený virus a v případě, že se použije plazmid vzniká podobně zkrácený plazmid nebo miniplazmid.

S výhodou vektor dále obsahuje kódující sekvenci rekombinázy, zvláště kódující sekvenci Cre. Vektor také může přednostně obsahovat jednu nebo více přidaných sekvencí, jako je první, druhá a/nebo třetí kódující sekvence a/nebo přídatná kódující sekvence, která zahrnuje promotor, jako je cizorodý gen. Pak v případě paralelní rekombinantní metody vektor s výhodou obsahuje cizorodý gen. V optimálním případě tento cizorodý gen se nachází mezi prvním a druhým rekombinantním místem, jak se znázorňuje v paralelním rekombinantním vektoru na obrázku č. 1A, výsledkem je episom, který nese cizorodý gen (PG) jak dokládá obrázek č. 1C.

Podobně vektor dále obsahuje kódující sekvenci. Takovou kódující sekvencí může být libovolná vhodná kódující sekvence, v optimálním případě vhodná kódující sekvence proteinů EBNA-1 nebo Rep nebo její různé mutace, které jsou známy a jsou popsány v literatuře (Yates et al., (1985; Lupton et al.; citace uvedeny shora; Middleton et al., J.Virol., 66, 1795-1798 (1992); Levitskaya et al., citace uvedena shora). V případě, že se používají jiné počátky replikace než *oriP*, vznikají jiné replikační virové proteiny ve formě kódující sekvence (například velký T antigen, E1 nebo E1 a E2). Je nutné, aby kódující sekvence se nacházela mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které obsahuje počátek replikace. Výsledkem je episom, jenž nese kódující sekvenci.

Podle uvedených skutečností paralelní způsob rekombinace umožňuje pozitivně nebo negativně regulovat jednu kódující sekvenci nebo současně pozitivně regulovat jednu a negativně regulovat druhou kódující sekvenci pomocí rekombinace. Například, jak je zobrazeno na obrázku č. 1A, první kódující sekvence (FCS) se nachází mezi prvním a druhým rekombinantním místem (FRS a SRS) a je orientována tak, že se přepisuje ve směru od prvního (FRS) do druhého rekombinantního místa (SRS).

Na stejné molekule se může promotor (P) nacházet mezi (FCS a SRS tak, že P je schopný přepsat kódující sekvenci po směru transkripce SRS. V takovém případě se FCS nepřepíše na nascentní mRNA dříve než proběhne rekombinace. Avšak po rekombinaci se FCS přepíše jako následek rekombinace, kdy FCS řídí P.

Paralelní způsob rekombinace také umožňuje negativní regulaci transkripce jedné kódující sekvence a současně pozitivní regulaci jiné kódující sekvence pomocí rekombinace. Jestliže druhá kódující sekvence (SCS) se nachází bezprostředně po směru transkripce od promotoru a je operabilně s promotorem spojena tak, že promotor je schopný před rekombinací řídit expresi SCS, pak se SCS bude přepisovat. Po rekombinaci se P, který před tím řídil transkripci SCS, umístí proti směru transkripce FCS a pak se přepíše FCS, zatímco SCS se nepřepíše. Je však nezbytné, aby promotor řídil před rekombinací expresi libovolné sekvence umístěné po směru transkripce. Podobně je nezbytné, aby promotor po rekombinaci řídil expresi jiné kódující sekvence. Tento způsob také umožňuje nezávislou negativní regulaci jedné kódující sekvence, například inkorporací SCS do vektoru, znázorněného na obrázku č. 1A, v nepřítomnosti FCS.

Zde se popisuje jedno provedení způsobu paralelní rekombinace, která umožňuje pozitivní regulaci kódující sekvence: (a) kódující sekvence se nachází v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje způsobem, že se přepisuje ve směru od prvního ke druhému rekombinantnímu místu, které pokračuje skrz kódující sekvenci, (b) kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem a (c) promotor se nachází v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje počátek replikace a sousedí se zmíněným druhým

rekombinantním místem tak, že promotor je orientován způsobem, že řídí přepis ve směru od prvního do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz promotor. V optimálním případě mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí neexistují kódující sekvence, promotory nebo místa terminace transkripce.

Vektor, který se používá pro pozitivní regulaci exprese jedné kódující sekvence, dále s výhodou obsahuje druhou kódující sekvenci umístěnou v jiné oblasti než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem. Tato oblast zahrnuje zmíněný počátek replikace a sousedí s druhým rekombinantním místem a je operabilně spojena s promotorem. Tento způsob umožňuje současně pozitivní a negativní regulaci oddělených kódujících sekvencí. V optimálním případě mezi promotorem a druhou kódující sekvencí neexistují kódující sekvence, promotory nebo místa terminace transkribce.

V jiném provedení způsob paralelní rekombinace se může použít pro nezávislou regulaci kódující sekvence, přičemž nelze pozitivně regulovat jinou sekvenci. V této metodě se (a) promotor nachází v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že promotor je orientován způsobem, že řídí přepis ve směru od prvního do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz promotor (b) Kódující sekvence se nachází v jiné oblasti než je ta, která se vyskytuje mezi prvním a druhým rekombinantním místem. Tato oblast obsahuje počátek replikace a sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem tak, že kódující sekvence je operabilně spojena s promotorem.

Tyto další metody se mohou také s výhodou použít, když vektor pro zavedení episomu navíc nese cizorodý gen. Avšak za účelem optimalizace produkce proteinu kódovaného kódující sekvencí rekombinací se mohou zahrnout do vektoru, který se

používá při způsobu paralelní rekombinace, donorová a akceptorová místa spojení.

Podle vynálezu libovolný promotor (například promotor, který se následkem rekombinace spojuje s kódující sekvencí, stejně jako promotor přítomný jako součást cizorodého genu) ať už se izoluje z přírody nebo je připraven rekombinací DNA nebo synteticky, se může použít k transkripci genu, pokud promotor je schopný řídit transkripci v eukaryontní (požaduje se v savčí) buňce.

Sekvence DNA vhodné pro expresi v eukaryontních buňkách (to jsou "eukaryontní promotory") se odlišují od sekvencí, které jsou vhodné pro expresi v prokaryontních buňkách. V prokaryontních systémech nelze rozeznat nebo nejsou funkční eukaryontní promotory a doprovodné genové signály a naopak v eukaryontních buňkách nelze rozeznat nebo nefungují prokaryontní ptomotory.

Porovnáním sekvencí promotorů, které jsou funkční v eukaryontech, se objevily elementy s konzervativní sekvencí. Pro eukaryontní promotory, které se přepisují RNA polymerázou II, je typický "signál TATA," který je umístěn v přibližné poloze -25, která se jeví být podstatná pro umístění počátku transkripce. TATA signál řídí RNA polymerázu, aby začala přepisovat přibližně 30bp po směru transkripce v savčích systémech. TATA signál často funguje ve spojení s nejméně dvěma dalšími sekvencemi umístěnými okolo 40bp a 110bp proti směru transkripce od startovacího místa transkripce. Je typické, že tzv, "CCAAT signál" slouží jako jedna ze dvou upstream sekvencí. Tou druhou je segment bohatý na GC (například "GC signál" obsažený například v sekvenci GGGCGG nebo v sekvencích GCCACACCC a ATGCAAAT). Homologie CCAAT může ležet na různých řetězcích DNA. Upstream promotorový element může také být specializovaným signálem takovým, jako jsou ty,

které se popisují v oboru a které charakterizují jisté uspořádání genů.

Aby došlo k iniciaci transkripce, je TATA signál a sekvence proti směru transkripce rozeznán regulačními proteiny, které se vážou na tato místa a aktivují transkripci tím, že umožňují RNA polymeráze II vázat segment DNA a správně iniciovat transkripci. Změny bazí v TATA signálu a v sekvencích proti směru transkripce mohou podstatně snížit rychlost transkripce (Myers et al., Science, 229, 242-7 (1985); McKnight et al., Science, 217, 316-324 (1982)). Poloha a orientace těchto elementů, které jsou relativní jeden k druhému a k počátečnímu místu, je dostatečná pro transkripci některých, ale ne všech, kódujících sekvencí. Například některé promotory dobře fungují i za nepřítomnosti libovolného TATA signálu. Podobně se může lišit i požadavek těchto a jiných sekvencí, aby RNA polymeráza I a II nebo jiná RNA polymeráza rozeznala promotory.

Oblasti promotoru se liší v délce a v sekvenci a mohou dále sousedit s jedním nebo více místy, kde se váže sekvenci specifické DNA vázající proteiny a/nebo zesilovač nebo tlumič. V tomto vynálezu se preferentně používá jako promotor pro regulaci genu nebo kódující sekvence promotor CMV nebo promotor P5 (například "první kódující sekvence" nebo "druhá kódující sekvence" popisované dále). Takové promotory stejně jako jejich mutace jsou známy a popisují se v literatuře (Hennighausen et al., EMBO J., 5, 1367-1371 (1986); Lehner et al., J. Clin. Microbiol., 29, 2494-2502 (1991); Lang et al., Nucleic Acids Res., 20, 3287-95 (1992); Srivastava et al., J. Virol., 45, 555-564 (1983); Green et al., J. Virol., 36, 79-92 (1980); Kiöstiö et al., citace uvedena shora). Jiné promotory se však mohou také použít. Jsou to například Ad2 nebo Ad5 hlavní pozdní promotor a tripartitní vedoucí sekvence, dlouhá koncová repetice viru Rousova sarkomu (RSV)

a jiné konstitutivní promotory, jak se popisují v literatuře. Například se může použít promotor herpesové thymidinové kinázy (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 144-145 (1981)), regulační sekvence genu metallothioninu (Brinster et al., Nature, 296, 39-42 (1982)), promotorové elementy kvasinek nebo jiných hub, jako je promotor Gal 4, promotor alkoholové dehydrogenázy, promotor fosfoglycerolové kinázy a promotor alkalické fosfatázy. Podobně se mohou použít promotory izolované z genomu savčích buněk nebo z virů, které rostou v těchto buňkách (například Ad, SV40, CMV a podobně).

Mimo použití konstitutivního promotoru se upřednostňuje pozitivní a/nebo negativní regulace odezvy promotoru na vhodný signál. Například se může použít indukovatelný promotor, jako je promotor IL-8, který reaguje na TNF nebo jiný citokin. Jiné příklady vhodné indukovatelné promotorové systémy zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, metallothiononový indukovatelný promotorový systém, bakteriální expresivní systém lac a systém T7 polymerázy. Dále se mohou použít promotory, které jsou selektivně aktivovány v různých stádiích vývoje (například geny globinů se přepisují rozdílně v embryu a v dospělém jedinci). Zvláště se může použít promotor, který se může regulovat exogenními faktory, jako jsou tetracyklin nebo syntetický hormon, jako je RU-486. Tyto promotory (a doprovodné regulační faktory, které se buňkám poskytují stejným způsobem) se popisují v odborné literatuře (Delort et al., Human Gene Therapy, 7, 809-820 (1996); Clontech, CLONTECHniques, "Tee-Off™ and Tet-On™ Gene Expression Systems and Cell Lines", Volume XI, No. 3, 2-5 (July 1996)).

Jiná otázka je použití tkáňově specifického promotoru (to je promotor, který se preferenčně aktivuje v dané tkáni a výsledkem je exprese produktu genu v tkáni, kde je promotor aktivován), například na hepatocyty specifický promotor

albuminu nebo α_1 -antitrypsin (Frain et al., Mol. Cell. Biol. 10: 991-999 (1990); Ciliberto et al., Cell 41: 531-540 (1985); Pinkert et al., Genes and Devel., 1, 268-276 (1987); Kelsey et al., Genes and Devel., 1, 161-171 (1987)), řídící oblast genu elastázy I, která je aktivní v pankreatických acinárních buňkách (Swift et al., Cell, 38, 639-646 (1984); MacDonald, Hepatology, 7, 425-515 (1987)), řídící oblast genu inzulinu, která je aktivní v pankreatických beta buňkách (Hanahan, Nature, 315, 115-122 (1985)), řídící oblast viru nádoru prsní žlázy u myší, která je aktivní testikulárních, prsních, lymfoidních a žirných buňkách (Leder et al., Cell, 45, 485-495 (1986)), řídící oblast genu základního proteinu myelinu, která je aktivní v oligodendrocytech v mozku (Readhead et al., Cell, 48, 703-712 (1987)) a řídící oblast genu uvolňujícího gonadotropní hormon, která je aktivní v hypothalamu (Mason et al., Science, 234, 1372-1378 (1986)). Do vektoru se může použít nádorově specifický promotor, jako je karcinoembryonický antigen u karcinomu tlustého střeva (Schrewe et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2738-2748 (1990)). Podle vynálezu se může mutagenezí změnit libovolný promotor, pokud má požadovanou vazebnou schopnost a sílu.

Nyní je známo, že indukovatelná aktivita se může získat fúzí domény receptoru hormonu, která váže ligand C-konce, s kódující sekvencí určitého proteinu (Kellendock et al., Nucleic Acids Res., 24, 1404-1411 (1996); Metzger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 6991-6995 (1995)). Tento přístup je výhodný, když se použije při tvorbě fúze rekombináz, což umožňuje, aby rekombinace možnost byla indukována a byla řízena exogení látkou, která váže steroidní receptor. Avšak způsob s výhodou používá libovolnou kódující sekvenci (například první a druhou kódující sekvenci) podle vynálezu a/nebo libovolný cizorodý gen. Zvláště způsob se přednostně používá s použitím domény vázající ligand (například doména

vázající hormon)hormonového receptoru, který je schopný vázat exogenní, ale ne přirozeně se vyskytující, steroid. Například se může použít doména vázající ligand mutantního hormonového progesteronového receptoru (hPR891), která odpovídá za nízkou hladinu syntetického steroidu, jako je RU-486, ale ne za endogenní steroid (Kellendock et al., citace uvedena shora). V jiném případě domény vázající ligand z receptorů estrogenu, glikokortikoidu a androgenu se mohou fúzovat s rekombináázou nebo s jinými kódujícími sekvencemi. Aby aktivita rekombinázy nebo jiného proteinu kódovaného kódující sekvencí podle vynálezu byla závislá na ligandu, buď vytvořením translačních fúzí, které vedou ke vzniku chimerického proteinu, nebo pomocí transkripčních fúzí, které umožňují řízení genu exogenní látkou, se používají podobné přístupy popsané v odborné literatuře. Avšak specifické proteiny, jako je rapamycin, umožňují navázání proteinů, která se normálně ignorují, což je ještě další úroveň řízení systémů (Balter et al., Science, 273, 183 (1996); Choi et al., Science, 273, 239-242 (1996)).

V některých případech počátky, které se používají při autonomní replikaci vektorů mohou také zahrnovat sekvence, které fungují jako promotory (například způsobují úzké propojení replikace a transkripce DNA). Počátek replikace polyomaviru obsahuje konstitutivní promotor, který se může použít například při řízení exprese cizorodého genu. Podobně počátek replikace hovězího papilomaviru obsahuje promotor, který se indukoval papilomavirovým proteinem E2. Tento počátek se může potencionálně použít ve smyslu genu, který je ve vektoru podle vynálezu. Podobně počátek replikace EBV obsahuje repetice, které působí jako zesilovač v přítomnosti proteinu EBNA-1. Tyto repetice se mohou použít například pro pozitivní regulaci exprese genu při rekombinací zprostředkovanou pozitivní regulaci proteinu EBNA-1.

Odborníkovi je jasné, že různé genetické signály a zpracování řídí množství nukleových kyselin a proteinů/peptidů v buňce. Jsou to například transkripce, translace mRNA a posttranskripční úpravy. Transkripce DNA na RNA vyžaduje funkční promotor. Úroveň transkripce se reguluje účinností se, kterou RNA polymeráza může rozeznat, iniciovat a ukončit transkripci na základě specifických signálů. Tyto kroky stejně jako elongace nascentní mRNA a jiné stupně jsou všechny ovlivňovány řadou jiných komponentů, které jsou také přítomny v buňce, například jinými proteiny, které mohou být transkripčního procesu, koncentrací ribonukleotidů přítomných v buňce a podobně.

Expresce proteinu je také závislá na hladině transkripce RNA, která se reguluje signály DNA a množstvím templátu DNA. Podobně translace mRNA vyžaduje nejméně iniciační kodon (přednostně AUG iniciační kodon), který se obvykle nachází mezi 10 až 100 nukleotidem 5'-konce message. Ukázalo se, že sekvence, které lemují AUG iniciační kodon, ovlivňují jeho rozeznávání eukaryontními rybozomy tím, že se přizpůsobí perfektní kozakově sekvenci, což vede k optimální translaci (Kozak, J. Molec. Biol., 196, 947-950 (1987)). Úspěšná exprese sekvence cizí nukleové kyseliny v buňce může vyžadovat post-translační modifikaci výsledného proteinu/peptidu. Produkce rekombinantního proteinu nebo peptidu může být ovlivněna účinností, se kterou se DNA přepisuje na mRNA, účinností, se kterou se mRNA překládá na protein a schopností buňky provést post-translační modifikace. Toto jsou všechny faktory, které odborník zná, a je schopen manipulací za použití standardních metod za účelem dosažení požadovaného konečného výsledku.

Za účelem optimalizace produkce proteinu rekombinací se s výhodou použije vektor pro pozitivní a negativní regulaci oddělených kódujících sekvencí, který dále obsahuje: (a) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi prvním

rekombinantním místem a kódující sekvencí v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace, (b) donorové místo spojení, které se nachází mezi promotorem a druhým rekombinantním místem v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace, a (c) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi druhým rekombinantním místem a druhou kódující sekvencí v oblasti jiné než je ta, která zahrnuje oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, jež zahrnuje počátek replikace.

Odborník také ví, že imunitní odezva na jisté imunogenní proteiny může vést ke snížení množství proteinu *in vivo*. Protein Cre je příklad takového proteinu, proti kterému se může vzniknout imunitní odezva. Protein EBV EBNA-1 účinně uniká detekci imunním systémem. Vynález také popisuje způsob poskytnutí Cre nebo jiných podobných imunogenních proteinů, které se používají v kontextu vynálezu a které jsou rozpoznatelné imunním systémem. Jde o způsob, kterým se umístí kopie repetice glycin-alanin proteinu EBNA-1 (nebo jeho konzervativních variací) do C- nebo N-konce proteinu. Takové zavedení proběhne na úrovni DNA v kódující sekvenci (například první nebo druhá kódující sekvence nebo cizorodý gen). Repetice glycin-alanin jsou známy v oboru (Yates et al., citace uvedena shora; Lupton et al., citace uvedena shora; Levitskaya et al., citace uvedena shora). Toto proběhne zavedením sekvence nukleové kyseliny repetice glycin-alanin (nebo jejich variant) buď do 5'- nebo do 3'- konce kódující sekvence. Tento přístup se dá použít dohromady s doménou vázající ligand. Jak ukazuje obrázek č. 2A-2F, repetice glycin-alanin (Gly Ala) se mohou použít v různých místech vis-a-vis kódující sekvence (CS) a domény vázající ligand (HBD), v případě je-li přítomna.

Způsob paralelní rekombinace se může použít pro dočasnou regulaci genu a kódujících sekvencí. Například první kódující

sekvence může být kódující sekvence proteinů Rep a EBNA-1. Také druhá kódující sekvence může obsahovat kódující sekvenci pro Cre nebo Flp. První nebo druhá (nebo jiná) kódující sekvence může obsahovat buď kódující sekvence proteinu EBNA-1, Rep, Flp, Cre, velký T antigen, El nebo E2.

Za účelem dosažení dočasné exprese kódující sekvence rekombinázy se může také použít regulace způsobená rekombinací. Kódující sekvence rekombinázy se může nacházet v poloze SCS, jak ukazuje obrázek č. 1A. Po následujícím vystřížení episomu rekombináza se nebude v hostitelské buňce dále produkovat. Tento přístup je výhodný v tom, že po vytvoření episomu se neobjeví aktivita rekombinázy. To redukuje možnost reintegrace episomu nebo multimerizace způsobené intermolekulární rekombinací.

Kódující sekvence proteinu EBNA-1 se nachází v poloze FCS, což znázorňuje obrázek č. 1A. To umožňuje regulaci exprese kódující sekvence proteinu EBNA-1, která je výhodná, protože replikace *oriP in cis* během produkce viru zprostředkované proteinem EBNA-1 (to je v případě, když se virus použije jako vektor pro zavedení episomu) může vést v některých případech k nežádoucí nestabilitě genomu a ke snížení výtěžku. Jestliže kódující sekvence proteinu EBNA-1 je jako FCS, pak její exprese se vyskytne pouze po vystřížení episomu.

Produkce proteinu EBNA-1 nebo libovolného proteinu kódovaného kódující sekvencí, jejíž transkripce je řízena promotorem P (to je FCS nebo SCS), se může maximalizovat umístěním SRS dovnitř intronu. To vylučuje možnost iniciace libovolných náhodných kodonů přítomných v SRS a podobně vylučuje tvorbu libovolných fúzních proteinů. Tento způsob se může uskutečnit jak ukazuje obrázek č. 1A umístěním akceptorových míst spojení (SA) mezi FRS a FCS a mezi SRS a SCS a také umístěním donorových míst spojení (SD) mezi P a

SRS. Produkce proteinu kódovaná FCS, SCS nebo TG se může podobně maximalizovat umístěním polyadenylačních míst bezprostředně po směru transkripce kódujících oblastí těchto sekvencí.

Přístup, který se používá pro řízení exprese proteinu EBNA-1, se může podobně použít ve smyslu řízení transkripce a následné translace proteinů Rep z AAV. Dočasná exprese a síla exprese genu Rep je přísně regulována, aby nedošlo ke dvěma potenciálním problémům. Podobně jako u proteinu EBNA-1, přítomnost proteinů Rep v hostitelské buňce během produkce viru může způsobit nestabilitu viru a snížit výtěžky, když se virus použije jako vektor pro zavedení episomu. Nadměrná exprese genu Rep je cytotoxická k buňkám a může vyvolat imunní odezvu. Tyto potenciální problémy se mohou obejít klónováním sekvence kódující protein Rep do polohy FCS, což je znázorněno na obrázku č. 1A. Klónování zajistí, že nedojde expresi genu proteinu Rep během produkce viru. Po infekci a zavedení rekombinázy do buněk obsahující vektor kódující protein Rep (například buď tak, že sekvence klódující rekombinázu je na stejném vektoru, pravděpodobně jako SCS nebo na vektoru, s kterým jsou společně aplikovány) se objeví replikace, přičemž se P dostane do polohy proti směru transkripce sekvence kódující protein Rep a sekvence kódující protein Rep se řídí promotorem P. Promotor P5, který je přirozeným promotorem pro gen proteinu Rep, se může použít jako P, protože tento promotor může řídit vhodnou sílu exprese genu Rep, aby umožnil proteinem Rep zprostředkovanou genomovou integraci bez cytotoxických účinků nebo vyvolání imunitní odezvy.

Sekvence lemované jednou nebo více ITR AAV jsou s výhodou integrovány do lidského chromozomu 19 v případě, že jsou přítomny proteiny Rep. V jednom provedení podle vynálezu kódující sekvence je kódující sekvence proteinu Rep. Vektor

dále s výhodou obsahuje jeden nebo více (například první nebo druhou) ITR adeno-asociovaného viru. Způsob podle vynálezu může použít řadu umístění ITR AAV pokud jsou lokace nezávislé. Preferuje se, aby jedna nebo více ITR AAV se nacházely v oblasti mezi prvním a druhým rekombinačním místem, která zahrnuje počátek replikace. Jedna nebo více ITR se však také mohou nacházet v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje počátek replikace. Umístění jedné nebo více ITR AAV tak, že bezprostředně lemuje cizorodý gen umožní integraci tohoto genu do jiného genetického místa. Je také možné umístit jednu nebo více ITR AAV tak, že proteiny Rep jsou inaktivovány. Například jedna nebo více ITR AAV se může umístit mezi FCS kódující Rep a downstream polyadenylační místo. V tomto případě proteinem Rep zprostředkovaná rekombinace episomálních sekvencí do jiného genetického místa by mohla oddělit kódující sekvenci od polyadenylačního místa a tak zrušit aktivitu Rep, protože transkripty se v eukaryontních buňkách rychle degradovaly, přinejmenším se polyadenylovaly. Podobně se mohou jiné geny regulovat, aktivovat nebo inaktivovat za použití způsobu paralelní rekombinace podle vynálezu.

V jiném případě se proteiny Rep mohou do buňky zavést kódované na miniplazmidu, který vznikl způsobem paralelní rekombinace. Tento přístup zahrnuje vytvoření miniplazmidu, na kterém je obsažena sekvence kódující protein Rep nebo jiný protein. Tento miniplazmid se dá vytvořit použitím vektoru, který obsahuje zmíněnou sekvenci, umístěnou mezi dvěma přímo opakovanými rekombinantními místy, kde neexistuje počátek replikace, který se podobně nachází mezi rekombinantními místy.

Způsob, který buňce poskytuje proteiny Rep zahrnuje: (a) kontakt buněk s vektorem, který obsahuje sekvenci kódující

protein Rep nacházející se mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které jsou umístěny paralelně, tak, že vektor se do buňky internalizuje; (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která vykonává rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinačním místem vektoru. V optimálním případě sekvence kódující Rep je operabilně spojena s promotorem uvnitř vektoru nebo je následkem rekombinace operabilně spojena s promotorem ve vektoru.

Tato metoda se s výhodou provádí v případech: (a) sekvence kódující protein Rep sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje způsobem, že se přepisuje ve směru od prvního ke druhému rekombinantnímu místu, které pokračuje skrz kódující sekvenci, (b) kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem a (c) promotor se nachází v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje kódující sekvenci a sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem tak, že promotor je orientován způsobem, že řídí přepis ve směru od prvního do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz kódující sekvenci.

Vektor, který se s výhodou také používá pro zavedení proteinů Rep, dále obsahuje první a druhou ITR adeno-asociovaného viru. V optimálním případě jedna nebo více ITR se nacházejí v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, který zahrnuje kódující sekvenci. V jiném případě jedna nebo více ITR se nachází v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace.

Některé z těchto provedení způsobu paralelní rekombinace jsou zobrazeny na obrázcích č. 3A až 3X. Zvláště obrázek č. 3A znázorňuje způsob podle vynálezu, kde se do buňky zavede vektor obsahující paralelní rekombinanční místa (FRS a SRS) a počátek replikace umístěný mezi těmito místy. Rekombináza se

s výhodou také zavádí do buňky buď *in cis* nebo *in trans*. Vektor (buď lineární nebo kruhový), který se v této metodě používá, s výhodou obsahuje kódující sekvenci (CS), která se nachází na libovolném místě vektoru (obrázek č. 3B), v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje *ori* (obrázek č. 3C) nebo v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem (obrázek č. 3D). Vektor dále s výhodou může obsahovat jednu nebo více ITR umístěných libovolně na vektoru (obrázek č. 3E) a/nebo může obsahovat jeden nebo více cizorodých genů (PG; obrázek č. 3F).

Když se promotor nachází v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje počátek replikace, může se pro negativní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 3G), pro pozitivní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 3H) nebo pro současnou pozitivní regulaci první kódující sekvence (CS) a negativní regulaci druhé kódující sekvence (SCS; obrázek č. 3I) použít způsob paralelní rekombinace. Za účelem optimalizovat produkci proteinu (obrázek č. 3J) se může do vektoru inkorporovat jedno nebo více donorových (SD) a/nebo akceptorových (SA).

Regulace genové exprese, která se provádí rekombinací, se může podobně uskutečnit použitím vektoru, který má promotor umístěný v oblasti jiné než je oblast obsahující *ori* mezi prvním a druhým rekombinantním místem. Takový vektor se může použít při pozitivní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 3K) nebo při současné pozitivní regulaci první kódující sekvence a negativní regulaci druhé kódující sekvence (obrázek č. 3L), přičemž tyto regulace probíhají rekombinací. Způsob paralelní rekombinace se také může použít společně s druhým promotorem (SP) za účelem současně pozitivní regulace první kódující sekvence rekombinací (obrázek č. 3M).

Třetí kódující sekvence se může vnést do vektoru mezi první promotor a první rekombinantní místo (obrázek č. 3N). Zvláště, když třetí kódující sekvence se orientuje stejným směrem jako první promotor (obrázek č. 3N), digenní message se může vytvořit rekombinací (například když interní vstupní místo ribozomu je vhodně umístěné ve vektoru). Jestliže je třetí kódující sekvence orientována opačným směrem jak první promotor (obrázek č. 3N), pak třetí kódující sekvence se negativně reguluje rekombinací, zatímco první kódující sekvence se reguluje pozitivně (například v optimálním případě, když donorová a akceptorová místa spojení jsou vhodně umístěná na vektoru).

Zvláště způsob paralelní rekombinace je vhodný způsob zavádějící protein Rep do buněk, například gen proteinu Rep může být zpočátku utlumený a je pozitivně regulován rekombinací (obrázek č. 30). Zde, jako i v jiných provedeních vektor může dále nést jednu nebo více ITR, které jsou umístěny na libovolném místě vektoru (obrázek č. 30), v oblasti mezi rekombinantními místy, která nese *ori* (obrázek č. 3P) nebo mimo zmíněnou oblast obsahující *ori* (obrázek č. 3Q).

Způsob paralelní rekombinace také může probíhat za použití vektoru, který neobsahuje počátek replikace mezi prvním a druhým rekombinantním místem (obrázek č. 3R). Tato metoda se dá použít za účelem zavedení proteinu Rep do buňky buď jako cizorodý gen nebo kódující sekvence, která je přítomna na minikruhu vytvořeném rekombinací (obrázek č. 3S). Takový vektor dále může obsahovat jinou kódující sekvenci, která se pozitivně reguluje rekombinací (obrázek č. 3T). Jako při použití vektoru obsahující *ori*, tak za účelem pozitivní regulace kódující sekvence (obrázek č. 3U), současné pozitivní regulace první kódující sekvence a negativní regulace druhé kódující sekvence (obrázek č. 3V) a pozitivní

regulace první i druhé kódující sekvence (obrázek č. 3W) rekombinací, je možné použít vektor, který nemá počátek replikace. Toto provedení se může také aplikovat s použitím třetí kódující sekvence (obrázek č. 3X). Podle vynálezu libovolná kódující sekvence (to je první, druhá nebo třetí) a/nebo cizorodý gen může kódovat ekvence kódující EBNA-1, Rep, Flp, Cre, velký T antigen, E1 a E2. Další variace metody jsou odborníkovi zřejmé.

b) způsob antiparalelní rekombinace

Způsob antiparalelní rekombinace je podobný způsobu paralelní rekombinace v tom, že probíhá na základě místně specifické rekombinace provedené vhodným rekombinačním systémem, jako je s výhodou systém Cre/Lox fága P1, kvasinkový Flp/Frt systém nebo jiné vhodné rekombinantní systémy. Na rozdíl od způsobu paralelní rekombinace však antiparalelní rekombinace zahrnuje vektor s prvním a druhým rekombinantním místem, které se nachází v antiparalelní orientaci na stejné molekule DNA. Toto odlišné umístění rekombinantních míst vede k inverzi intervenující sekvence při aplikaci rekombinázy místo vystřížení episomu. Způsob antiparalelní rekombinace se může použít k modulaci exprese genu například pro pozitivní nebo negativní regulaci jedné kódující sekvence nebo pro současnou pozitivní regulaci jedné a negativní regulaci jiné kódující sekvence pomocí rekombinace.

Způsob antiparalelní rekombinace umožňující místně specifickou rekombinaci v buňce zahrnuje: (a) kontakt buňky s vektorem tak, že vektor vstupuje do buňky, přičemž vektor obsahuje (i) promotor umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a lemuující druhé rekombinantní místo tak, že promotor se orientuje na řízení transkripce ve směru od prvního

rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes promotor a (ii) kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které zahrnuje promotor a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence je orientována způsobem, že se přepisuje opačným směrem ze směru prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes promotor, kde kódující sekvence je operabilně spojena s libovolným promotorem; a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem ve vektoru. Upřednostňuje se, aby se mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí nevyskytovala žádná kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce.

Tento způsob s výhodou zahrnuje druhou kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje promotor a sousedí s druhým rekombinantním místem a která je operabilně spojena s promotorem. V optimálním případě se zde nevyskytují žádné kódující sekvence, promotory nebo transkripční terminační místa umístěná mezipromotorem a druhou kódující sekvencí.

Avšak způsob antiparalelní rekombinace se také může použít pro negativní regulaci jedné kódující sekvence, aniž dochází k regulaci jiné kódující sekvence. Tato metoda zahrnuje: (a) kontakt buňky s vektorem tak, že vektor vstupuje do buňky, přičemž vektor obsahuje (i) promotor umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a lemující druhé rekombinantní místo tak, že promotor se orientuje na řízení transkripce ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa pokračující přes promotor a (ii) kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi

prvním a druhým rekombinantním místem, které zahrnuje promotor a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence je operabilně spojena s libovolným promotorem; a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem ve vektoru. Upřednostňuje se, aby se mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí nevyskytovala žádná kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce.

Tento způsob dále s výhodou zahrnuje druhou kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje promotor a sousedí s druhým rekombinantním místem a která je operabilně spojena s promotorem. V optimálním případě se zde nevyskytují žádné kódující sekvence, promotory nebo transkripční terminační místa umístěná mezi promotorem a druhou kódující sekvencí.

Způsob antiparalelní rekombinace se může také použít při negativní regulaci jedné kódující sekvence, přičemž nedochází k pozitivní regulaci jiné kódující sekvence. Tato metoda zahrnuje: (a) kontakt buňky s vektorem tak, že vektor vstupuje do buňky, přičemž vektor obsahuje (i) promotor umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a lemující druhé rekombinantní místo tak, že promotor se orientuje na řízení transkripce ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa pokračující přes promotor a (ii) kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které zahrnuje promotor a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence je operabilně spojena s libovolným promotorem; a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým

rekombinantním místem ve vektoru. V optimálním případě mezi promotorem a kódující sekvencí se nevyskytuje žádná kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce intervenující následující rekombinací.

Libovolné vektory používané pro pozitivní a/nebo negativní regulaci kódující sekvence mohou s výhodou dále obsahovat cizorodý gen a/nebo kódující sekvenci genů buď Rep, EBNA-1, Cre nebo Flp. Stejně jako u způsobu paralelní rekombinace libovolná kódující sekvence (například první, druhá nebo jiná kódující sekvence) a/nebo cizorodý gen může obsahovat kódující sekvence EBNA-1, Rep, Flp, Cre, velký T antigen, E1 nebo E2.

Pro optimalizaci produkce proteinu následující po rekombinaci se může použít vektor pro současnou pozitivní a negativní regulaci oddělených kódujících sekvencí, který zahrnuje (a) akceptorové místo spojení umístěné mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí v oblasti jiné než je oblast, která zahrnuje oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje promotor, a (b) donorové místo spojení umístěné mezi promotorem a druhým rekombinantním místem v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje promotor, a (c) akceptorové místo umístěné mezi druhým rekombinantním místem a druhou kódující sekvencí v oblasti jiné než je oblast zahrnující oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje promotor.

Obrázek č. 4 zobrazuje preferovaný vektor pro použití ve spojení se způsobem antiparalelní rekombinace. Jak ukazuje obrázek č. 4 antiparalelní rekombinační vektor obsahuje první kódující sekvenci (FCS) sousedící s prvním rekombinantním místem (FRS) tak, že FCS se orientuje způsobem, že se přepisuje v opačném směru od prvního rekombinantního místa (FRS) do druhého rekombinantního místa (SRS). FCS se

nepřepisuje , protože není operabilně spojen s libovolným upstream promotorem. Druhá kódující sekvence (SCS) sousedí s druhým rekombinantním místem (SRS) a je orientována způsobem, že se přepisuje ve směru od prvního rekombinantního místa (FRS) do druhého rekombinantního místa (SRS).

Není třeba, aby SCS byla nezbytně přítomna, například v případech kde exprese jedné kódující sekvence je pozitivně regulovaná, ale jiná kódující sekvence není rekombinací regulována negativně. Avšak, když je přítomna SCS, přepisuje se přinejmenším v počátku, protože je operabilně spojena s promotorem (P) umístěným mezi prvním a druhým rekombinantním místem (FRS a SRS). Podobně není nutné, aby byla přítomna FCS, například v případě, kde exprese kódující sekvence se pozitivně reguluje, ale jiná kódující sekvence není pozitivně regulována rekombinací. Avšak když existuje FCS, přepisuje se následující rekombinací, která umístí promotor proti směru transkripce FCS.

Před aplikací rekombinázy do buňky obsahující vektor se SCS narozdíl od FCS přepisuje. Následuje aplikace rekombinázy, rekombinace umístí promotor proti směru transkripce FCS a FCS se přepisuje, zatímce SCS ne. Upřednostňuje se, aby mezi FCS a FRS ani mezi SCS a SRS nebyly kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce.

Za účelem maximalizace genové exprese a produkce proteinu se mezi FCS a FRS a mezi SCS a SRS mohou umístit akceptorová místa spojení. Donorová místa spojení (SD) se mohou umístit mezi P a SRS. Podobně polyadenylační místa se mohou vnést do následující kódujících sekvencí FCS a SCS.

Při takovém způsobu rekombinace může SCS kódovat sekvenci kódující rekombinázu a FCS může kódovat sekvenci kódující protein Rep nebo EBNA-1. Antiparalelní rekombinantní vektor zobrazený na obrázku č. 4 a jeho variace se mohou

podobně použít pro jiné geny například pro geny, které vyžadují správnou dočasnou expresi, jako jsou vývojově regulované geny nebo pro geny, jejichž exprese se musí přísně řídit, jako jsou ty kódující toxické nebo škodlivé proteiny.

V souladu se způsobem antiparalelní rekombinace je také možné pozitivně a/nebo negativně regulovat kódující sekvenci (jako je například kódující sekvence proteinu Rep, EBNA-1 nebo rekombináza) umístěním kódující sekvence mezi rekombinantní místa a umístění jednoho nebo více promotorů vně rekombinantní místa. Jedno provedení způsobu, které umožňuje pozitivní regulaci, obsahuje: (a) kontakt buňky s vektorem tak, že vektor vstupuje do buňky, přičemž vektor obsahuje (i) kódující sekvenci umístěnou mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a lemující druhé rekombinantní místo tak, že kódující sekvence se orientuje aby se přepsala v opačném směru ze směru prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes promotor a kde kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem, a (ii) promotor umístěný v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které zahrnuje kódující sekvenci a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že promotor je orientována, aby řídil transkripci ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes kódující sekvenci; (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem ve vektoru.

Aby mohlo dojít k současně k pozitivní a negativní regulaci oddělených kódujících sekvencí vektor dále obsahuje druhou kódující sekvenci umístěnou v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje kódující

sekvenci a sousedí s prvním rekombinantním místem a která je operabilně spojena s promotorem.

V jiném provedení způsob pro negativní regulaci jedné kódující sekvence zahrnuje: (a) kontakt vektoru s buňkou tak, že vektor vstupuje do buňky, přičemž vektor obsahuje (i) kódující sekvenci umístěnou mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a sousedící s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje, aby se přepsala ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, která obsahuje kódující sekvenci, a (ii) promotor sousedící s prvním rekombinantním místem a umístěný v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které zahrnuje kódující sekvenci tak, že promotor je orientován, aby řídil transkripci ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes kódující sekvenci a kde kódující sekvence je operabilně spojena s libovolným promotorem; a (b) poskytnutí buňky s místně specifickou rekombináázou, která umožňuje rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem ve vektoru.

Tyto vektory mohou dále s výhodou obsahovat jeden nebo více cizorodých genů. V optimálním případě mezi promotorem a rekombinantním místem nebo mezi kódující sekvencí nebo druhou kódující sekvencí a rekombinantním místem nejsou žádné kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce. Dále místa spojení (to je akceptorová a donorová místa spojení) a polyadenylační místa se mohou inkorporovat do vektorů používaných v těchto metodách za účelem maximalizovat expresi genu a produkci kódovaného proteinu.

Některá z těchto provedení způsobu antiparalelní rekombinace jsou zobrazeny na obrázcích 5A až 5G. Zvláště obrázky zahrnují způsob podle vynálezu, kde vektor obsahující antiparalelní rekombinantní místa (FRS a SRS) se zavádí do

buňky. Do buňky se také přednostně zavádí rekombináza buď *in cis* nebo *in trans*. Vektor (buď lineární nebo kruhový) používaný v tomto způsobu také přednostně obsahuje kódující sekvenci (CS). Když je promotor umístěný v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, pro pozitivní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 5A), negativní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 5B) nebo současnou pozitivní regulaci první kódující sekvence (CS) a negativní regulaci druhé kódující sekvence (SCS; obrázek č. 5C) rekombinací se může použít způsob antiparalelní rekombinace. Za účelem optimalizace produkce proteinu (obrázek č. 5D) se může do vektoru inkorporovat jedno nebo více donorových (SD) a/nebo akceptorových (SA) míst spojení.

Regulace genové exprese uskutečněné rekombinací se může proběhnout použitím vektoru, který má promotor umístěný v oblasti jiné než je oblast obsahující *ori* mezi prvním a druhým rekombinantním místem (když se například použije lineární substrát). Takový vektor se může použít pro pozitivní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 5E), negativní regulaci kódující sekvence (obrázek č. 5F) nebo pro současnou pozitivní regulaci první kódující sekvence a negativní regulaci druhé kódující sekvence (obrázek č. 5G) rekombinací. Podle vynálezu libovolné kódující sekvence (to je první nebo libovolná jiná kódující sekvence) a/nebo cizorodý gen přítomný ve vektoru může kódovat kódující sekvenci EBNA-1, Rep, Flp, Cre, velkého T antigenu, E1 nebo E2. Další variace této metody jsou odborníkovi zřejmé.

Nové vektory

Existuje řada různých vektorů, které se mohou použít v souladu s vynálezem. Vynález také popisuje jisté nové vektory, které jsou zvláště použitelné ve způsobech paralelní a antiparalelní rekombinace podle vynálezu.

Tento vektor obsahuje první a druhé rekombinantní místo, umístěné v paralelní nebo antiparalelní orientaci. První a druhé rekombinantní místo může být libovolné vhodné rekombinantní místo takové, že po internalizaci do buňky a kontaktu s vhodnou rekombinázou dojde k rekombinaci mezi prvním a druhým rekombinantním místem vektoru.

Rekombinantní místa, rekombináza, kódující sekvence, oblasti mezi rekombinantními místy, promotory, cizorodé geny a podobně, které se nacházejí na všech vektorech v souladu s vynálezem, přičemž takové elementy se popisují dříve v textu, tvoří součást kazet buď nezávisle nebo jsou v nich tyto elementy spojeny. V souladu s vynálezem "kazeta" je jednoduše určitá základní sekvence, která má funkce, jež umožňují subklónování a získání sekvencí nukleových kyselin (například jedno nebo více restričních míst) nebo expresi (například polyadenylační místa nebo místa spojení) určitých sekvencí nukleové kyseliny.

Určení a/nebo výběr vektoru se může uskutečnit použitím různých přístupů, které jsou odborníkovi známy. Například vektory obsahující určité geny a kódující sekvence se mohou identifikovat hybridizací, přítomností tzv. markerů a expresí určitých začleněných sekvencí. U prvního přístupu přítomnost cizí sekvence inzerované do vektoru se může detekovat hybridizací (například DNA-DNA hybridizací) použitím sond obsahující sekvence, které jsou homologní se začleněnými sekvencemi nukleové kyseliny. U druhého přístupu rekombinantní vektor/hostitelský systém může být identifikován a vybrán na základě přítomnosti nebo absence funkcí genu markeru, jako je rezistence na antibiotika, aktivita thymidinové kinázy a podobně, což se děje na základě inzerce určitých genů, které kódují tyto funkce do vektoru. U třetího přístupu se vektory mohou identifikovat testováním přítomnosti cizího genového produktu, který exprimuje

začleněná sekvence nukleové kyseliny. Takové testy mohou být založeny na fyzikálních, imunologických nebo funkčních vlastnostech produktu genu.

Tyto vektory, které jsou zvláště použitelné v metodách paralelní a antiparalelní rekombinace jsou dále popsány níže.

a. paralelní rekombinantní vektor

V jednom provedení vynálezu paralelní rekombinantní vektor obsahuje: (a) první a druhé rekombinantní místo umístěné paralelně, (b) počátek replikace umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem, (c) kódující sekvenci v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které obsahuje počátek replikace a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje, aby se přepsala ve směru od prvního do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz kódující sekvenci, kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem, a (d) promotor umístěný v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje počátek replikace a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že promotor je orientován, aby řídil transkripci ve směru z prvního do druhého rekombinantního místa, které prochází skrz promotor. Upřednostňuje se, aby se mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí nevyskytovala žádná kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce.

Dále vektor s výhodou obsahuje druhou kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje počátek replikace a sousedí s druhým rekombinantním místem a která je operabilně spojena s promotorem. V optimálním případě mezi promotorem a kódující sekvencí se nevyskytuje žádná kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce. Vektor může dále

obsahovat přidané kódující sekvence, například třetí kódující sekvenci, jak se popisuje dříve.

Pro optimalizaci exprese genu a produkce proteinu vektor s výhodou dále obsahuje: (a) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace, (b) donorové místo spojení, které se nachází mezi promotorem a druhým rekombinantním místem v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace, a (c) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi druhým rekombinantním místem a druhou kódující sekvencí v oblasti jiné než je ta, která zahrnuje oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, jež zahrnuje počátek replikace. Takový vektor poskytuje způsob modulace exprese genu tím, že poskytuje episom, ve kterém je první kódující sekvence pozitivně regulována a druhá kódující sekvence je negativně regulována rekombinací, při které se tvoří episom.

V jiném provedení vynálezu paralelní rekombinantní vektor obsahuje: (a) první a druhé rekombinantní místo umístěné paralelně, (b) počátek replikace umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem, (c) promotor umístěný v oblasti mezi prvníma a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje počátek replikace a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že promotor se orientuje, aby řídil transkripci ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz promotor a (d) kódující sekvenci umístěnou v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které obsahuje počátek replikace a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že kódující sekvence je operabilně spojena s promotorem.

Rekombinantní místa v paralelním rekombinantním vektoru mohou být libovolná vhodná rekombinantní místa, jak se

popisuje shora v textu, s ohledem na uvedený způsob. Rekombinantní místa v paralelním rekombinantním vektoru jsou s výhodou místa Lox, ve kterých je dále obsažena sekvence kódující Cre buď proti směru transkripce prvního místa Lox nebo po směru transkripce druhého místa Lox, nebo místa Frt, ve kterých vektor obsahuje sekvenci kódující Flp buď proti směru transkripce prvního místa Frt nebo po směru transkripce druhého místa Frt.

Počátek replikace je popsán shora v textu a s výhodou obsahuje sekvenci ori z EBV, počátek replikace polyomaviru nebo papilomaviru nebo libovolný jiný počátek replikace. Když se použijí tyto (stejně jako jiné) počátky replikace, buňce by se měly dále poskytnout proteiny, které umožňují nebo usnadňují replikaci v buňce. Tyto proteiny, které se v určitém smyslu považují za "buněčné replikační proteiny," se přednostně vybírají za skupiny obsahující proteiny EBNA-1, velký T antigen, E1 a E2.

Kódující sekvencí může být libovolná kódující sekvence. Je výhodné, aby první kódující sekvence byla sekvence kódující protein EBNA-1 nebo Rep, jak se popisuje s ohledem na uvedené způsoby. Avšak první kódující sekvence (a druhá kódující sekvence nebo libovolná jiná kódující sekvence) také může přednostně obsahovat sekvenci kódující Flp, Cre, velký T antigen, E1 a/nebo E2. Takový vektor poskytuje způsob modulace exprese genu tím, že poskytuje episom, ve kterém je kódující sekvence regulována rekombinací, při které se tvoří episom.

Vektor dále přednostně obsahuje cizorodý gen, který se s výhodou nachází mezi kódující sekvencí a promotorem. Může se použít libovolný vhodný cizorodý gen takový, jako je reportní gen nebo terapeutický gen. Vynález popisuje vektory, o kterých se píše shora v textu a které jsou zobrazeny na doprovodných obrázcích.

b. antiparalelní rekombinantí vektor

Antiparalelní rekombinantí vektor obsahuje: (a) promotor umístěný mezi prvním a druhým rekombinantím místem v antiparalelních orientacích a sousedící s druhým rekombinantím místem tak, že promotor je orientován, aby řídil transkripci ve směru z prvního do druhého rekombinantního místa, které prochází skrz promotor, a (b) kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které obsahuje promotor a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje, aby se přepsala v opačném směru ze směru prvního do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz promotor, kde kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem.

Vektor dále obsahuje druhou kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které obsahuje promotor a sousedí s druhým rekombinantním místem a která je operabilně spojena s libovolným promotorem. V optimálním případě mezi promotorem a druhou kódující sekvencí se nevyskytují žádné kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce.

V jiném provedení vynálezu vektor obsahuje: (a) promotor umístěný mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že promotor je orientován, aby řídil transkripci ve směru z prvního do druhého rekombinantního místa, které prochází skrz promotor, a (b) kódující sekvenci umístěnou v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které obsahuje promotor a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje, aby se přepsala v opačném směru ze směru prvního do druhého rekombinantního místa, které pokračuje skrz promotor, kde

kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem.

Za účelem optimalizace genové exprese a produkce proteinu antiparalelní rekombinantní vektor dále obsahuje: (a) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi prvním rekombinantním místem a kódující sekvencí v oblasti jiné než je oblast, která zahrnuje oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje promotor, (b) donorové místo spojení, které se nachází mezi promotorem a druhým rekombinantním místem v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje promotor, a (c) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi druhým rekombinantním místem a druhou kódující sekvencí v oblasti jiné než je ta, která zahrnuje oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, jež zahrnuje promotor.

Vynález dále popisuje antiparalelní rekombinantní vektor, který obsahuje: (a) kódující sekvenci umístěnou mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a sousedící s druhým rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje, aby se přepsala v opačném směru ze směru prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes kódující sekvenci a kde kódující sekvence není operabilně spojena s libovolným promotorem, a (b) promotor umístěný v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, které zahrnuje kódující sekvenci a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že promotor je orientován, aby řídil transkripci ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes kódující sekvenci;

Preferuje se vektor, který dále obsahuje druhou kódující sekvenci umístěnou v oblasti mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje kódující sekvenci a

sousedí s prvním rekombinantním místem a je operabilně spojena s promotorem. Vektor také přednostně obsahuje jinou kódující sekvenci (například třetí kódující sekvenci a/nebo jinou kódující sekvenci).

V jiném provedení vynálezu vektor obsahuje: (a) kódující sekvenci umístěnou mezi prvním a druhým rekombinantním místem v antiparalelních orientacích a sousedí s druhým rekombinantním místem tak, že kódující sekvence se orientuje, aby se přepsala ve směru z prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes kódující sekvenci, a (b) promotor sousedí s prvním rekombinantním místem a je umístěn v oblasti jiné než je oblast mezi prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje kódující sekvenci tak, že promotor se orientuje, aby řídil transkripci ve směru od prvního rekombinantního místa do druhého rekombinantního místa, které pokračuje přes kódující sekvenci a kde kódující sekvence je operabilně spojena s promotorem. Přednostně tyto vektory mohou dále obsahovat cizorodý gen. V optimálním případě mezi promotorem a rekombinantním místem nebo mezi kódující sekvencí nebo druhou kódující sekvencí a rekombinantním místem neexistují kódující sekvence, promotory nebo terminační místa transkripce. Dále do vektorů, které se používají v těchto metodách za účelem maximalizovat expresi genu a produkci kódovaného proteinu se mohou inkorporovat místa spojení (to je akceptorová místa spojení a donorová místa spojení) a polyadenylační místa.

Takový vektor podle vynálezu umožňuje modulaci exprese genu, aniž se tvoří episom následkem rekombinace. Dále vynález poskytuje vektory, které jsou popsány dříve v textu a zobrazeny na doprovodných obrázcích.

Jiné obecné úvahy

V metodách podle vynálezu, co se týče různých aspektů podle vynálezu na buňky, vektory jsou vneseny do hostitelské buňky, kterou je s výhodou eukaryontní hostitelská buňka. Eukaryontní hostitelská buňka se může vyskytovat *in vitro* nebo *in vivo*. Termín "kontakt" buněk s vektorem podle vynálezu může znamenat libovolný způsob, kterým se vektor zavede do buňky. Přednostně se virové vektory zavádějí infekcí za použití přirozené schopnosti viru vstoupit do buněk (například schopnost adenoviru vstoupit do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou). Avšak plazmidové a virové vektory se mohou zavést libovolnými jinými vhodnými způsoby, například transfekcí, transformací zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým, mikroinjekcí, elektroporací, osmotickým šokem a podobně. Podobně v preferovaném provedení podle vynálezu se zamýšlí transfer vektorů *in vivo*. Způsob podle vynálezu také zamýšlí transfer vektoru *in vivo* způsobem zde uvedeným nebo libovolnou standardní metodou.

Termín "poskytnutí buňky s místně specifickou rekombinázou" podle vynálezu znamená poskytnutí rekombinázy kódované vektorem nebo rekombinázy ve formě proteinu. Zavedení vektoru se může provést libovolným způsobem vhodným pro zavedení proteinu do buňky, například mikroinjekcí adenovirem zprostředkovaným pohlcením v případě zavedení *in vitro*, injekcí nebo fúzí nebo dalšími způsoby, jak se zde popisují pro případ zavedení *in vivo*, stejně jako jiné standardní způsoby zavedení, které jsou známy v oboru.

V případech zavedení *in vivo* se mohou stát cílem pro zavedení vektoru nebo proteinu libovolné orgány nebo tkáně nebo komponentní buňky. Orgány/tkáně/buňky s výhodou pocházejí z cirkulačního systému (to je srdce, krevní žíly nebo krev), z respiračního systému (nos, faryng, laryng, trachea, průdušky, průdušinky, plíce), z gastrointestinálního

systému (ústa, faryng, jícen, žaludek, střevo, slinné žlázy, pankreas, játra, žlučník), z močového systému (ledviny, močovody, močový měchýř, močová trubice), z nervového systému (mozek a páteř, speciální smyslové orgány, jako jsou oči) a z kožního systému (kůže). Dokonce více se preferují buňky vybrané ze skupiny, která obsahuje srdce, krevní žíly, plíce, játra, žlučník, močový měchýř a oční buňky.

V jiných provedeních vynálezu, kdy se v uvedených metodách používá jeden nebo více vektorů nebo v případě, že se rekombináza, jako je Cre nebo Frt, aplikuje zevně ve formě proteinu, se může kontakt buněk s různými komponenty podle vynálezu uskutečnit v libovolném pořadí nebo současně. Upřednostňuje se, aby ke kontaktu došlo současně. V preferovaném provedení vynálezu komponentní vektory podle vynálezu se mohou smíchat dohromady a může se provést před kontaktem s buňkou preinkubace. Pokud se aplikuje více vektorů upřednostňuje se, aby se první vektor aplikoval na buňku méně než přibližně 6 týdnů po nebo méně než 6 týdnů před aplikací dalšího vektoru. Dokonce se upřednostňuje, aby se první vektor aplikoval na buňku méně než přibližně 2 týdny po nebo méně než 2 týdny před aplikací dalšího vektoru. Pokud jsou vektory aplikovány společně s rekombinázou, jako je Cre nebo Frt, upřednostňuje se, aby se protein do buňky aplikoval méně než přibližně 12 hodin po nebo méně než přibližně 12 hodin před okamžikem, kdy buňka přichází do kontaktu z vektorem. Dokonce více se preferuje, aby se do buňky protein aplikoval méně než přibližně 12 hodin po nebo méně než přibližně 12 hodin před okamžikem, kdy buňka přichází do kontaktu z vektorem.

Kompozice podle vynálezu (to je kompozice, která obsahuje vektory a/nebo rekombinázy podle vynálezu) se mohou připravit do farmaceutických kompozic s vhodnými farmaceuticky přijatelnými nosiči nebo ředidly a je-li to

vhodné, připravují se v pevné, semi-pevné, kapalné nebo plynné formě, jako jsou tablety, kapsule, prášek, granule, masti, roztoky, čípky, injekce, inhaláty a aerosoly, které se aplikují obvyklou cestou. Způsoby, které jsou známy v oboru, se využívají pro prevenci uvolnění a absorpce kompozice až do okamžiku, kdy dosáhnou cílového orgánu, tkáně nebo buňky nebo se může využít časovaného uvolnění kompozice. Měla by se použít farmaceuticky přijatelná forma, která neovlivňuje kompozici podle vynálezu. Kompozice může být ve farmaceutické dávkové formě sama nebo ve vhodném spojení, stejně jako v kombinaci s jinými farmaceuticky aktivními látkami.

Farmaceutické kompozice podle vynálezu se mohou zavádět mnoha cestami a do různých míst zvířecího těla, aby se dosáhlo určitého efektu. Lokální nebo systémové zavedení se může uskutečnit podáním, které zahrnuje aplikaci nebo nakapání formulace do tělních dutin, inhalaci nebo vstříknutí aerosolu nebo parenterální zavedení, které zahrnuje intramuskulární, intravenózní, peritoneální, podkožní, intradermální, stejně jako povrchovou aplikaci.

Kompozice podle vynálezu může tvořit formu jednotkové dávky, například čajová lžička, tableta, roztok nebo čípek. Každá jednotková dávka obsahuje předem definované množství kompozice samotné nebo ve vhodné kombinaci s jinými aktivními činidly. Termín "forma jednotkové dávky" je fyzicky diskrétní jednotka vhodná jako jednotková dávka pro lidi a zvířata. Každá jednotka obsahuje předem určené množství kompozice podle vynálezu samotné nebo v kombinaci s jinými aktivními činidly vypočítané v množství dostatečném pro dosažení žádaného účinku ve spojení s farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem. Specifikace pro nové formy jednotkové dávky podle vynálezu závisí na určitém účinku, kterého má být dosaženo, a na určité farmakodynamice spojené s farmaceutickou kompozicí v určitém hostiteli.

Vynález dále popisuje způsob získání stabilní exprese genu v hostiteli nebo modulaci exprese genu v hostiteli, který zahrnuje aplikaci kompozice podle vynálezu za použití libovolné dříve zmiňované nebo alternativní cesty podání známé v oboru a vhodné pro určitou aplikaci. "Účinné množství" kompozice je takové množství, aby se v hostiteli dosáhlo žádaného účinku, který se může zaznamenávat za použití několika koncových bodů, které jsou známy v oboru. Například jeden požadovaný účinek může obsahovat účinný transfer nukleové kyseliny do hostitelské buňky. Takový transfer se může monitorovat prostřednictvím terapeutického účinku (například tišením některého symptomu spojeného s onemocněním nebo syntomu, který je léčen) nebo dalším důkazem transferovaného genu nebo kódující sekvencí nebo jeho exprese v hostiteli (například použití polymerázové řetězové reakce, northernovy a Southernovy hybridizace nebo transkripčních testů za účelem detekce nukleové kyseliny v hostitelských buňkách nebo použitím testu imunoblotem, detekce pomocí protilátek nebo specifikovanými testy pro detekci proteinu nebo polypeptidu kódovaného transferovanou nukleovou kyselinou nebo spočívající v hladině nebo funkci způsobené takovým transferem). Jeden takový specifickovaný test je popsán v příkladech, který zahrnuje expresi genu β -glukuronidázy.

Vynález zahrnuje všechny tyto popsané metody a dále metody vhodné pro specifickou aplikaci, které jsou známy v oboru. Avšak účinné množství kompozice se může dále odhadovat vhodným testem pro rekombinanční reakci.

Pro dosažení účinného transferu vektorů podle vynálezu se preferuje kontakt okolo 1 až 5 000 kopií vektoru s jednou buňkou, což je založeno na přibližném počtu buněk, které se infikují daným způsobem aplikace. Preferuje se, aby do každé buňky vstoupilo okolo 1 až 300 fága tvořících jednotek. Avšak

toto je pouze obecná hodnota bez důvodu vylučuje použití vyššího nebo nižšího množství komponent, jak se může zaručit při určité aplikaci, buď *in vitro* nebo *in vivo*. Například aktuální dávka a rozpis může se lišit v závislosti, zda kompozice se aplikuje v kombinaci s jinými farmaceutickými kompozicemi nebo v závislosti na individuálních rozdílech ve farmakokinetice, dispozici léků a metabolismu. Podobně množství může kolísat při aplikacích *in vitro* v závislosti na určitém používaném typu buňky nebo na způsobu, kterým se vektor přenáší. Odborník může jednoduše udělat nezbytné odhady podle nutností určitých situací.

Přehled obrázků na výkrese

Obrázky č. 1A až 1C jsou schémata zobrazující vektor s paralelními rekombinantními místy použitelnými v souladu s vynálezem před zavedením do hostitelské buňky (obr. č. 1A) a zkrácený virus nebo kruhovou strukturu (obr. č. 1B) a episom (obr. č. 1C), které vznikly intracelulární rekombinací, ke které dojde po zavedení vektoru do hostitelské buňky podle vynálezu. Pro zavedení episomu do hostitelské buňky se může použít buď uzavřený kruhový vektor (to je lemující plazmid nebo virové sekvence, které jsou označeny tečkovanou čarou) nebo lineární vektor (to je lemující virové sekvence označené tečkovanými rámečky). Oblast, která je mezi FRS a SCS a současně je zahrnuje může být v obou orientacích vzhledem k sekvencím lemujícího vektoru. Šipky ukazují směr transkripce. Vysvětlení zkratk: RS, rekombinantní místo; FRS, první rekombinanční místo; SRS, druhé rekombinanční místo; SA, akceptorové místo spojení; SD, donorové místo spojení; FCS, první kódující sekvence; SCS, druhá kódující sekvence; P, promotor; PG, cizorodý gen; ori, počátek replikace.

Obrázky 2A až 2F jsou schémata zobrazující potenciální umístění repetice glycin-alanin (Gly Ala) relativní ke

kódující sekvenci (CS) a doméně vázající hormon (HBD). Repetice glycin-alanin se mohou podobně použít bez účasti libovolné domény vázající hormon.

Obrázky 3A až 3X jsou schémata zobrazující další aplikace paralelních rekombinantních metod podle vynálezu. Šipky označují směr transkripce. Přerušovaná čára označuje, že vektor může být buď lineární nebo kruhový. Otevřené výseče označují, že specifikovaná sekvence může být přítomna kdekoliv na vektoru. Otevřené rámce v definované oblasti vektoru označují část vektoru, ve kterém se může vyskytovat specifikovaná sekvence. Vysvětlení zkratk: RS, rekombinantní místo; FRS, první rekombinanční místo; SRS, druhé rekombinanční místo; SA, akceptorové místo spojení; SD, donorové místo spojení; FCS, první kódující sekvence; SCS, druhá kódující sekvence; TCS, třetí kódující sekvence; P, promotor; SP, druhý promotor; PG, cizorodý gen; N, počátek replikace; ITR, obrácená konečná repetice; Rep, sekvence kódující protein Rep.

Obrázek č. 4 je schéma zobrazující vektor s antiparalelními rekombinantními místy, který je použitelný v souladu s vynálezem, zvláště při regulaci exprese genu místně řízenou rekombinací bez epizomální excize. Může se použít buď uzavřený kruhový vektor (to je lemující plazmid nebo virové sekvence označené přerušovanou čarou) nebo lineární vektor (to je lemující virové sekvence označené čárkovanými rámečky). Oblast, která leží mezi a zároveň zahrnuje FCS a SCS, může být v obouh orientacích s ohledem na lemující vektorové sekvence. Šipky označují směr transkripce. Vysvětlení zkratk: FRS, první rekombinanční místo; SRS, druhé rekombinanční místo; SA, akceptorové místo spojení; SD, donorové místo spojení; FCS, první kódující sekvence; SCS, druhá kódující sekvence; P, promotor.

Obrázky č. 5A až 5G jsou schémata znázorňující další aplikace antiparalelních rekombinantních metod podle vynálezu. Šipky ukazují směr transkripce. Tečkování označuje, že vektor může být buď lineární nebo kruhový. Vysvětlení zkratk: RS, rekombinanční místo; FRS, první rekombinanční místo; SRS, druhé rekombinanční místo; SA, akceptorové místo spojení; SD, donorové místo spojení; FCS, první kódující sekvence; SCS, druhá kódující sekvence; P, promotor.

Obrázek č. 6 je restriční mapa zobrazující plazmid pEOBspLx-Puro-CMV_{Lx}.

Obrázek č. 7 je restriční mapa zobrazující plazmid pEOBspLx-Puro-CMV_{Lx}-βglu.

Obrázek č. 8 je restriční mapa zobrazující plazmid pAdCMV Cre.

Obrázek č. 9 je restriční mapa zobrazující plazmid pAdCMVCreRSVOrf6.

Obrázek č. 10 je restriční mapa zobrazující plazmid pKSEBNAOriP(NR).

Obrázek č. 11 je restriční mapa zobrazující plazmid pKSEBNA(NS).

Obrázek č. 12 je restriční mapa zobrazující plazmid pAdCLxPyTagOri.

Obrázek č. 13 je restriční mapa zobrazující plazmid pAdEPrRlr.

Obrázek č. 14 je restriční mapa zobrazující linearizovaný plazmid pCGE1E2ori. Plazmid typicky existuje v uzavřené kruhové formě.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Tento příklad popisuje způsoby a vektory místně specifické rekombinace v buňce, které se mohou použít pro

tvorbu episomu, jak se uvádí na obrázcích 1A až 1C. Tento příklad zvláště ukazuje způsob zavedení episomu a pozitivní regulaci transkripce genu rekombinací.

Standardní molekulové a genové techniky, jako jsou tvoření kmenů a plazmidů, gelová elektroforéza, DNA manipulace zahrnující izolaci plazmidu, klónování a sekvenování DNA, Southernův přenos a podobně, se provedly tak, jak je známo v oboru a jak se popisuje ve standardním laboratorním manuálu (například Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1992); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, (1987)). Restrikční enzymy a jiné enzymy pro molekulové manipulace se získaly z obecně dostupných zdrojů (například Boehringer Mannheim, Inc., Indianapolis; New England Biolabs, Beverly, Massachusetts; Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Maryland; atd.) a použily se podle doporučení výrobce. Buňky transformované linie ledvinových buněk lidského embrya 293 (American Type Culture Collection CRL 1573) se kultivovaly a udržovaly za použití standardních kultivačních činidel, medií a technik (Erzerum et al., *Nucleic Acids Research*, 21, 1607-1612 (1993)). Jestliže je to vhodné, tak se pro selekci transfektovaných buněk použil puromycin.

Za účelem testování a potvrzení způsobu podle vynálezu, jak se zobrazuje na obrázcích č. 1A až 1C. Tyto plazmidy zahrnují pEOBspLx-Puro-CMV_Lx, který obsahuje jako FCS sekvenci kódující EBNA-1 a který je zobrazen na obrázku č. 6. Plazmid pEOBspLx-Puro-CMV_Lx-βglu je zobrazen na obrázku č. 7 a zahrnuje jako FCS sekvenci kódující β-glukuronidázu. Oba plazmidy pEOBspLx-Puro-CMV_Lx a pEOBspLx-Puro-CMV_Lx-βglu zahrnují rekombinantní místa Lox (paralelně), promotor CMV jako promotor pro pozitivní regulaci exprese genu. Promotor CMV se používá, protože je schopen řídit relativně silnou

expresi konstitutivního genu ve většině buněk tkáňových kultur (Boshart et al., Cell, 41, 521-530 (1985)). Podobně oba plazmidy pEOBspLx-Puro-CMV_Lx a pEOBspLx-Puro-CMV_Lx-βglu obsahují sekvenci kódující puromycin, kterou řídí promotor RSV. Plazmid pAdCMV Cre exprimující Cre, který obsahuje sekvenci kódující Cre fága P1 řízenou promotorem CMV a polyadenylační signál SV40, je zobrazen na obrázku č. 8.

Plazmid pEOBspLx-Puro-CMV_Lx se vytvořil z vektoru firmy Invitrogen pREP 4 (Invitrogen, San Diego, California). Plazmid pREP 4 se štěpil restrikázami HpaI a BsmI a oligonukleotid obsahující restrikční místa MluI, PvuII a KpnI se zavedl do vektoru po té, co se modifikovalo specifické místo MluI. Kazeta obsahující gen puromycinu, který je řízen promotorem RSV, a polyadenylační signál hovězího růstového hormonu (BGH) se klonovala do MluI/PvuII fragmentu DNA ve vektoru. Promotor CMV obsahující signál spojení, po němž následuje polylinkr a polyadenylační sekvence SV40 se zavedl do PvuII/KpnI míst vektoru. Místo Lox se zavedlo do intronu expresivní kazety CMV. Sekvence proti směru transkripce sekvence kódující EBNA-1 se modifikovaly přidáním syntetického akceptorového místa spojení a místa Lox. Akceptorové místo spojení je proximální k EBNA-1 v plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV_Lx.

Plazmid pEOBspLx-Puro-CMV_Lx-βglu se získal z plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV_Lx nahrazením sekvence kódující EBNA-1 sekvencí kódující β-glukuronidázu a polyadenylačním signálem SV40. Výsledná delece sekvence kódující EBNA-1 spojuje oblast od iniciačního kodonu do místa BsgI proteinu EBNA-1.

Plazmid pAdCMV Cre obsahuje expresivní kazetu zahrnující promotor CMV, sekvenci kódující Cre a polyadenylační místo SV40 lemované sekvencemi Ad5 1-355 a 3333-5788. Samozřejmě přesné limity sekvencí používaných pro rekombinaci se mohou lišit (například od přibližně 1 do přibližně 100 bp) v

závislosti na určitém žádaném produktu rekombinace. Plazmid pAdCMV Cre se může rekombinovat s Ad za vzniku E1-deficientního viru (například Rosenfeld et al., (1991), citace uvedena shora; Rosenfeld et al. (1992), citace uvedena shora).

Za účelem testovat schopnost selekce buněk obsahujících plazmid pEOBspLx-Puro-CMV β glu, selekce je založena na rezistenci na puromycin, kterou propůjčuje kazeta RSV/puromycin, proběhla transfekce zprostředkovaná CaPO_4 plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV β glu do buněk 293 exprimujících protein EBNA-1 (293-EBNA; InVitrogen, San Diego, CA). Po transfekci se buňky udržovaly v přítomnosti puromycinu v koncentraci okolo 0,5 mg/ml. Populace buněk, která přežila je rezistentní na puromycin, což způsobila exprese puromycinu z kazety RSV/puromycin.

Transfekce plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV β glu do buněk 293 zprostředkovaná CaPO_4 s nebo bez pAdCMV Cre proběhla (Graham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)) za účelem určit, zda rekombináza Cre produkovaná genem Cre poskytovaná buňkám 293 *in trans* mohla způsobit rekombinaci mezi místy Lox, které se nacházejí v plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV β glu, tak vznikají episom a sekvence kódující β -glukuronidázu v episomu se řídí promotorem CMV. Po 48 hodinách se buňky zpracovaly a testovala se aktivita β -glukuronidázy za použití běžně dostupného kitu podle doporučení výrobce (Tropic Inc., Bedford, MA). Získané výsledky se uvádí v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2:

Plazmid(y)	β -glukuronidázové jednotky
bez plazmidu	850
pEOBspLx-Puro-CMV β glu	$6,9 \times 10^3$

pEOBspLx-Puro-CMV β Lx- β glu + pAdCMV Cre1,6x10⁵

Jak se uvádí v tabulce č. 2, hladiny β -glukuronidáz jsou nejvyšší v těch buňkách, které obsahují oba plazmidy pEOBspLx-Puro-CMV β Lx- β glu a pAdCMV Cre. Jestliže oba plazmidy v buňkách 293 nejsou, hladiny β -glukuronidáz jsou těžko detekovatelné, ačkoli se pozoruje nízká základní hladina aktivity. U buněk, které obsahují plazmid pEOBspLx-Puro-CMV β Lx- β glu a ne pAdCMV Cre, se pozorovala vyšší hladina β -glukuronidázy.

Následně se zjistilo, že rekombinantní místa v plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV β Lx- β glu jsou orientovány antiparalelně místo paralelně. Tato značná pozorovaná β -glukuronidázová aktivita je způsobena přítomností kryptického promotoru umístěného rekombinací proti směru transkripce reportního genu. Avšak tyto výsledky potvrzují, že způsob podle vynálezu se může použít pro získání antiparalelního rekombinantního vektoru.

Příklad 2:

Tento příklad popisuje vektory pro místně specifickou rekombinaci v buňkách, ve kterých se tyto vektory používají za účelem vzniku episomu, jak se uvádí na obrázcích 1A až 1C. Tento příklad zvláště popisuje lineární Ad vektory.

Způsob podle vynálezu se podobně může použít za účelem vzniku virových vektorů pro zavádění episomu, zvláště Ad vektorů, které vnikají modifikací vektoru. Přístup se popisuje v předchozím příkladu. Jmenovitě funkčnost oriP nebo podobného počátku replikace, který je schopen fungovat v savčích buňkách, se může v takovém virovém vektoru potvrdit transfekcí plazmidu pEOBspLx-Puro-CMV β Lx- β glu do buněčné linie, která konstitutivně exprimuje protein EBNA-1 (jak se popisuje v publikaci Reisman et al., citace uvedena shora).

Vyberou se buňky rezistentní na puromycin a pomnoží se. Analýza Southernovým přenosem se použije pro potvrzení stability plazmidu jako episomu. Podobně se může potvrdit i funkčnost proteinu EBNA-1.

Za účelem vzniku Ad vektorů se mohou podobným způsobem jako u plazmidu pAdCMV Cre přenést do pendlujícího vektoru oba plazmidy založené na EBNA-1 a β -glukuronidáze. Pendlující vektor obsahuje vložený fragment, který je lemován restričními místy BclI a BamHI, obklopenými na levé straně 355bp a na druhé straně zbytky 3333 až 5788 z Ad5. Vložený fragment se nahradil restričním fragmentem BglII/BamHI, který nese obě místa Lox z plazmidu pAdER-Puro, z kterého vznikl plazmid pEOBspLx-Puro-CMVLx. Podobně se vložený fragment může nahradit restričním fragmentem BglII až BamHI, který nese místa Lox z plazmidu pEOBspLx-Puro-CMVLx- β glu. Tyto plazmidy se mohou použít pro vznik vektoru založených na Ad5 homologní rekombinaci, jak se popisuje dříve v textu (Rosenfeld et al., (1991), citace uvedena shora; Rosenfeld et al., (1991), citace uvedena shora).

Příklad 3:

Tento příklad popisuje další vektory, které se mohou použít pro uskutečnění místně specifické rekombinace v buňce. Zvláště tento příklad popisuje reprezentativní příklad vektoru, který se může použít pro poskytnutí rekombinázy Cre.

Za účelem usnadnění konstrukce vektoru a zvláště vektoru zobrazeného na obrázcích 1A až 1C se gen Cre subklónoval do odděleného Ad. Jako zdroj sekvence kódující rekombinázu Cre se použil P1 získaný z ATCC, který se klónoval do pCR-ScriptTM (Stratagene, La Jolla, CA) za použití PCR vznikl lépe přístupný zdroj genu. Gen Cre se pak přenesl do pendlujícího vektoru, ve kterém se umístil tak, že ho řídí promotor CMV a po něm následuje polyadenylační signál, čímž

vznikl vektor pADCMVCreRSVOrf6 znázorněný na obrázku č. 9. Pendlující vektor se použil pro vznik Ad vektoru AdCMVCre6 (za použití dříve popsaného způsobu), ve kterém gen Cre nahradil oblast E1 adenovirového genomu.

Produkce AdCMVCre6 se potvrdila PCR a použitím funkčního testu, jak se popisuje v příkladu 1. Analýza rekombinace Southernovým přenosem řízené plazmidem AdCMVCre6 se potvrdila použitím testovacího plazmidu v buněčné linii 835 založené na buňkách 293, stejně jako v buněčné linii A549 lidského plicního karcinomu. Podobně funkce promotoru, donorového a akceptorového místa spojení se použila v různých takových konstrukcích a potvrdily se předchozí příklady. Zvláště β -glukuronidáza se umístila do polohy první kódující sekvence na obrázku č. 1, aby vznikl plazmid pEOBglugl. Kontransfekce plazmidu pEOBglugl s plazmidem exprimujícím Cre vedl ve více než 3-log indukci β -glukuronidázy.

Tyto výsledky potvrzují funkčnost rekombinázy Cre ve uvedeném vektoru a dále potvrzuje funkčnost základních komponentů vektoru používaných k následné vektorové konstrukce.

Příklad 4:

Tento příklad popisuje další vektory, které je možné použít pro provedení místně specifické rekombinace v buňce. Tento příklad zvláště popisuje vektory, které obsahují počátek replikace polyomaviru a které se mohou použít například pro "runaway" replikaci.

Vektory obsahující počátek replikace polyomaviru se konstruovaly za použití standardních klónovacích technik, jak popisuje předchozí příklad. Funkčnost komponentů EBV a polyomavirových systémů obsažených v různých vektorech a nutných pro replikaci (zvláště počátek replikace) se potvrdila použitím testu DpnI. Základ tohoto testu je, že

plazmidy produkované v *E.coli* jsou metylovány a jsou citlivé na štěpení restrikázou DpnI. Jestliže se tento plazmid replikuje v savčích buňkách, je buď hemimetylován nebo není vůbec metylován, což dokazuje jeho odolnost vůči štěpení restrikázou DpnI.

Aby se potvrdila funkčnost komponentu EBV, testovaly se izogenní konstrukce pKSEBNAoriP(NR) (zobrazeném na obrázku č. 10) a pKSEBNA(NS) (zobrazeném na obrázku č. 11). Tyto plazmidy obsahují EBNA-1 řízeným jeho vlastním virovým promotorem, buď v přítomnosti (to je plazmid pKSEBNAoriP(NR)) nebo v nepřítomnosti (to je plazmid pKSEBNA(NS)) oriP umístěném na 5'-konci genu. Počátek oriP v plazmidu pKSEBNAoriP(NR) má delecí od NcoI do EcoRV (to je koordináty EBV 8033 až 8995), které vedou k 962bp velké delecí. Plazmidy se transfektovaly do buněk odvozených z linie 293 a po pěti dnech se shromáždily. Buněčný pelet se extrahoval Hirtovou extrakcí (Hirt, J. Mol. Biol., 26, 365-369 (1967)) a testel se DpnI testem. Zjistilo se, že se replikují pouze plazmidy obsahující oriP.

Podobně se ~~ta~~nsfektoval do buněk NIH 3T3 plazmid pAdCLxPyTagOri (zobrazený na obrázku č. 12). Tento plazmid obsahuje sekvenci kódující velký T antigen polyomaviru řízenou promotorem CMV a obsahuje počátek replikace polyomaviru na 3'-konci polyadenylačního signálu, který lemuje sekvenci kódující T antigen. Zjistilo se, že podobný plazmid obsahující zmíněné elementy mimo T antigenu se replikuje v případě, že se buňce poskytne T antigen. Tyto výsledky potvrzují, že komponenty polyomaviru přítomné v tomto vektoru, stejně jako komponenty EBV přítomné v plazmidu pKSEBNAoriP (NR) jsou schopny vnést na plazmid schopnost autonomní replikace, které se účastní.

Za účelem potvrzení funkčnosti komponent polyomaviru se kazeta přítomná v plazmidu pAdCLxPyTagOri přenesla do E1

delece Ad pendlujícího vektoru pADEPrRLr zobrazeném na obrázku č. 13. Tento plazmid zahrnuje, jak ukazuje obrázek č. 1A, první kódující sekvenci (FCS) obsahující sekvenci kódující T antigen a operátor, kterým je počátek replikace polyomaviru. Promotor (P) v tomto plazmidu je promotor RSV a druhá kódující sekvence (SCS) obsahuje luciferázový reportní gen. Potvrdila se aktivita luciferázové transkripční jednotky. Transfekce tohoto plazmidu s kazetou exprimující Cre vedla k místně specifické rekombinaci pendlujícího vektoru. Tyto výsledky potvrzují funkčnost různých komponentů vektorů.

Výsledky ukazují, že se mohou konstruovat i jiné vektory vhodné pro použití v případě místně specifické rekombinace v buňce a mohou se použít podle vynálezu. Zvláště výsledky potvrzují, že je možná konstrukce vektorů, které obsahují počátek replikace polyomaviru a mohou se použít při "runaway" replikaci.

Příklad 5:

Tento příklad popisuje další vektory, které je možné použít pro provedení místně specifické rekombinace v buňce. Tento příklad zvláště popisuje vektory, které obsahují počátek replikace boviního papilomaviru. Je možné získat vysoké číslo kopií v různých hostitelích.

Podobný postup, který se popisuje v předchozích příkladech se použil pro konstrukci vektorů, které obsahují počátek replikace boviního papilomaviru. Zkonstruoval se zvláště vektor pCGE1E2ori zobrazený na obrázku č. 14. Tento vektor obsahuje digenní expresivní kazetu s geny E1 a E2 boviního papilomaviru řízenou promotorem CMV. Bezprostředně na 3'-konci expresivní kazety vektor obsahuje počátek replikace boviního papilomaviru sahajícího od nukleotidu 7351 až 57 genomu boviního papilomaviru. Jiná konstrukce nese

14.04.98

76

počátek replikace boviního papilomaviru, je stabilní za přítomnosti E1 a E2, které podporují kompetenci replikace vektoru pCGE1E2ori.

Změněné nároky

P A T E N T Ů V Ě N Á R O K Y

1. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e
obsahuje:

- (i) první a druhé rekombinantní místo v paralelní orientaci a
- (ii) jednu nebo více adeno-asociovaných virových ITR.

2. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e
obsahuje:

- (i) první a druhé rekombinantní místo v paralelní orientaci,
- (ii) počátek replikace, který se nachází mezi zmíněným prvním a druhým rekombinantním místem, a/nebo jeden nebo více adeno-asociovaných virových ITR,
- (iii) jeden nebo více promotorů, a
- (iv) jednu nebo více kódujících sekvencí, kde každý z uvedeného jednoho nebo více promotorů a každá z uvedené jedné nebo více kódujících sekvencí sousedí s prvním nebo druhým rekombinantním místem tak, že jedno nebo obě z uvedeného prvního a druhého rekombinantního místa sousedí s jedním nebo více promotory a/nebo s jednou nebo více kódujících sekvencí, a

kde na základě rekombinace probíhá pozitivní regulace jedné nebo více kódující sekvence(í) a/nebo negativní regulace jedné nebo více jiné kódující sekvence(í).

3. Vektor podle nároku 1 nebo vektor podle nároku 2,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahují:

(i) promotor, který (a) se nachází v oblasti mezi zmíněným prvním a druhým rekombinantním místem, která v případě, že vektor obsahuje počátek replikace, zahrnuje zmíněný počátek replikace, (b) sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem a (c) orientuje se tak, že řídí transkripci ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedený promotor a

(ii) kódující sekvenci, která se nachází v oblasti mezi zmíněným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje uvedený promotor, sousedí s uvedeným prvním rekombinantním místem, je orientována tak, aby se přepisovala ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz zmíněný promotor a není operabilně spojena se zmíněným promotorem.

4. Vektor podle nároku 1 nebo vektor podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahují:

(i) promotor, který (a) se nachází v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která v případě, že vektor obsahuje počátek replikace, zahrnuje uvedený počátek replikace, (b) sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem a (c) je orientován tak, že řídí transkripci ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do zmíněného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedený promotor a

(ii) kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje zmíněný promotor, sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem a je operabilně spojena se zmíněným promotorem.

5. Vektor podle nároku 1 nebo vektor podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahují:

(i) promotor, který (a) se nachází v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která v případě, že vektor obsahuje počátek replikace, zahrnuje uvedený počátek replikace, (b) sousedí s prvním rekombinantním místem a (c) se orientuje tak, aby řídil transkripci ve směru od zmíněného prvního rekombinantního místa do zmíněného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedený promotor a

(ii) kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi zmíněným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje zmíněný promotor, sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem, je orientována tak, aby se přepisovala ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do zmíněného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedený promotor a není operabilně spojena se zmíněným promotorem.

6. Vektor podle nároku 1 nebo vektor podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahují:

(i) promotor, který (a) se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která v případě, že vektor obsahuje počátek replikace, zahrnuje uvedený počátek replikace, (b) sousedí s prvním rekombinantním místem a (c) se orientuje tak, aby řídil transkripci ve směru od zmíněného prvního rekombinantního místa do zmíněného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedený promotor a

(ii) kódující sekvenci, která se nachází v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje zmíněný promotor, sousedí se zmíněným prvním

rekombinantním místem a je operabilně spojena se zmíněným promotorem.

7. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje první a druhé rekombinantní místo v paralelní orientaci, mezi nimiž se nachází (i) první kódující sekvence, která sousedí se zmíněným prvním rekombinantním místem tak, že zmíněná první kódující sekvence je orientována, aby se přepisovala ve směru z uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedenou první kódující sekvenci, a která není operabilně spojena s promotorem a (ii) promotor, který sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem tak, že uvedený promotor je orientován, aby řídil transkripci ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz uvedený promotor.

8. Vektor podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje druhou kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedenou první kódující sekvenci, a která sousedí se zmíněným druhým rekombinantním místem tak, že zmíněná druhá kódující sekvence je operabilně spojena se zmíněným promotorem.

9. Vektor podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený vektor dále obsahuje:

(i) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi zmíněným prvním rekombinantním místem a zmíněnou první kódující sekvencí tak, že akceptorové místo spojení je v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedenou první kódující sekvenci,

(ii) donorové místo spojení, které se nachází mezi zmíněným promotorem a uvedeným druhým rekombinantním místem tak, že uvedené donorové místo spojení je v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedenou první kódující sekvenci a

(iii) akceptorové místo spojení, které se nachází mezi uvedeným druhým rekombinantním místem a druhou kódující sekvencí tak, že uvedené akceptorové místo spojení je v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem zahrnující uvedenou první kódující sekvenci.

10. Vektor podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje:

(i) druhou kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje uvedenou první kódující sekvenci a uvedený promotor, sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že uvedená druhá kódující sekvence je orientována, aby se přepisovala v opačném směru ze směru uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz zmíněnou první kódující sekvenci a není operabilně spojena s promotorem a

(ii) druhý promotor, který se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje uvedenou první kódující sekvenci a uvedený promotor, a sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem tak, že uvedený druhý promotor je orientován tak, aby řídil transkripci v opačném směru ze směru uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného rekombinantního místa probíhajícího skrz zmíněnou první kódující sekvenci.

11. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje:

(i) první a druhé rekombinantní místo v paralelní orientaci, mezi nimiž se nachází první kódující sekvence, která sousedí s uvedeným prvním rekombinantním místem a je orientována tak, že se přepisuje ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz zmíněnou první kódující sekvenci.

(ii) promotor, který se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje uvedenou první kódující sekvenci, a sousedí s prvním rekombinantním místem tak, že promotor je operabilně spojen s uvedenou první kódující sekvencí a

(iii) druhou kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která zahrnuje uvedenou první kódující sekvenci, sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem a je orientována tak, aby se přepisovala ve směru od uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa probíhajícího skrz zmíněnou první kódující sekvenci.

12. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje první a druhé rekombinantní místo v antiparalelní orientaci a jednu nebo více adeno-asociovaných virových ITR.

13. Vektor podle nároku 12, který dále obsahuje jeden nebo více promotorů a jednu nebo více kódujících sekvencí, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e každý z jednoho nebo více uvedených promotorů a každá z jedné nebo více uvedených kódujících sekvencí sousedí s prvním nebo druhým rekombinantním místem tak, že jedno nebo obě uvedená první a

druhá rekombinantní místa sousedí s jedním nebo více promotory a/nebo s jednou nebo více kódujícími sekvencemi a na základě rekombinace dochází k pozitivní regulaci jedné nebo více kódující sekvence(í) a/nebo k negativní regulaci jedné nebo více jiné kódující sekvence(í).

14. Vektor podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje:

(i) promotor, který se nachází v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, sousedí s druhým rekombinantním místem a je orientován tak, že řídí transkripci ve směru od uvedeného rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedený promotor a

(ii) buď kódující sekvenci "a," která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedený promotor, sousedí s uvedeným prvním rekombinantním místem, je orientována tak, že se přepisuje v opačném směru ze směru uvedeného prvního rekombinantního místa do zmíněného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedený promotor a není operabilně spojena s promotorem nebo kódující sekvenci "b," která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedený promotor, sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem a je operabilně spojena s uvedeným promotorem.

15. Vektor podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje:

(i) promotor, který se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, sousedí s uvedeným prvním rekombinantním místem a je orientován tak, aby řídil transkripci ve směru od uvedeného

promotoru do uvedeného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedené první rekombinantní místo a

(ii) buď kódující sekvenci "a," která se nachází v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, sousedí s uvedeným prvním rekombinantním místem a je operabilně spojena s uvedeným promotorem nebo kódující sekvenci "b," která se nachází v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem a je orientována tak, aby se přepisovala v opačném směru ze směru uvedeného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedenou kódující sekvenci a není operabilně spojena s uvedeným promotorem.

16. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje:

(i) první a druhé rekombinantní místo v antiparalelní orientaci, mezi nimiž se nachází promotor, který sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem a orientuje se tak, že řídí transkripci ve směru ze zmíněného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedený promotor,

(ii) první kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, jenž obsahuje uvedený počátek replikace, sousedí s uvedeným prvním rekombinantním místem a není operabilně spojena s promotorem a

(iii) druhou kódující sekvenci, která se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem, která obsahuje uvedený počátek replikace, sousedí s druhým rekombinantním místem a je operabilně spojena s uvedeným promotorem.

17. Vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje:

(i) první a druhé rekombinantní místo v antiparalelní orientaci, mezi nimiž se nachází první kódující sekvence, která sousedí s uvedeným druhým rekombinantním místem a orientuje se tak, že se přepisuje v opačném směru ze směru zmíněného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedenou první kódující sekvenci, a druhou kódující sekvenci sousedící se zmíněným prvním rekombinantním místem a orientovanou tak, že se přepisuje ve směru zmíněného prvního rekombinantního místa do uvedeného druhého rekombinantního místa procházejícího skrz uvedenou druhou kódující sekvenci a

(ii) promotor, který se nachází v jiné oblasti, než je oblast mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedený počátek replikace, sousedí se zmíněným prvním rekombinantním místem a je operabilně spojen s uvedenou druhou kódující sekvencí.

18. Vektor podle libovolného z nároků 7 až 11, 16 a 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje jednu nebo více adeno-asociovaných virových ITR.

19. Vektor podle libovolného z nároků 7 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje počátek replikace umístěný v oblasti mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem obsahující uvedenou první kódující sekvenci.

20. Vektor podle libovolného z nároků 1 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje cizorodý gen.

21. Vektor podle libovolného z nároků 2 až 11 a 13 až 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená kódující sekvence, první kódující sekvence, druhá kódující sekvence nebo cizorodý gen obsahuje sekvenci kódující doménu vázající ligand receptoru hormonu, který je schopný vázat exogenní, ale ne přirozeně se vyskytující hormon.

22. Vektor podle libovolného z nároků 2 až 11 a 13 až 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená kódující sekvence, první kódující sekvence, druhá kódující sekvence nebo cizorodý gen obsahuje jednu nebo více sekvencí, které kódují repetici glycin-alanin.

23. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem, který obsahuje (i) první a druhé rekombinantní místo v paralelní orientaci a (ii) počátek replikace, který se nachází mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem a je funkční v savčí buňce a /nebo jednu nebo více adeno-asociovaných virových ITR, přičemž se uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru.

24. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) ke kontaktu zmíněné buňky s vektorem podle nároku 2 dochází tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a

jestliže vektor obsahuje počátek replikace, tento počátek replikace je funkční v savčí buňce a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru.

25. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 3 nebo 5 dochází tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a jestliže vektor obsahuje počátek replikace, tento počátek replikace je funkční v savčí buňce a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru, přičemž na základě rekombinace uvedená kódující sekvence je operabilně spojena s uvedeným promotorem.

26. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 4 nebo 6 dochází tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a jestliže vektor obsahuje počátek replikace, tento počátek replikace je funkční v savčí buňce a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru, přičemž na základě rekombinace uvedená kódující sekvence není operabilně spojena s uvedeným promotorem.

27. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 7 a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru, přičemž na základě rekombinace uvedená první kódující sekvence je operabilně spojena s uvedeným promotorem.

28. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 8 a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru, přičemž na základě rekombinace uvedená druhá kódující sekvence není operabilně spojena s uvedeným promotorem.

29. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 9 a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru.

30. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 10 a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru, přičemž na základě rekombinace uvedená první kódující sekvence je operabilně spojena s uvedeným prvním promotorem a uvedená druhá kódující sekvence je operabilně spojena s uvedeným druhým promotorem.

31. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 11 a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru,

přičemž na základě rekombinace uvedená první kódující sekvence není operabilně spojena s uvedeným promotorem a uvedená druhá kódující sekvence je operabilně spojena s uvedeným promotorem.

32. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinaci v buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 12 nebo 13 tak, že vektor vstupuje do uvedené buňky a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru.

33. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinací v buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 14 tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru,

příčemž na základě rekombinace buď uvedená kódující sekvence "a" je operabilně spojena s uvedeným promotorem nebo uvedená kódující sekvence "b" není operabilně spojena s uvedeným promotorem.

34. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinací v buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 15 tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru,

příčemž na základě rekombinace buď uvedená kódující sekvence "a" není operabilně spojena s uvedeným promotorem nebo uvedená kódující sekvence "b" je operabilně spojena s uvedeným promotorem.

35. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinací v buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle nároku 16 nebo 17 tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru,

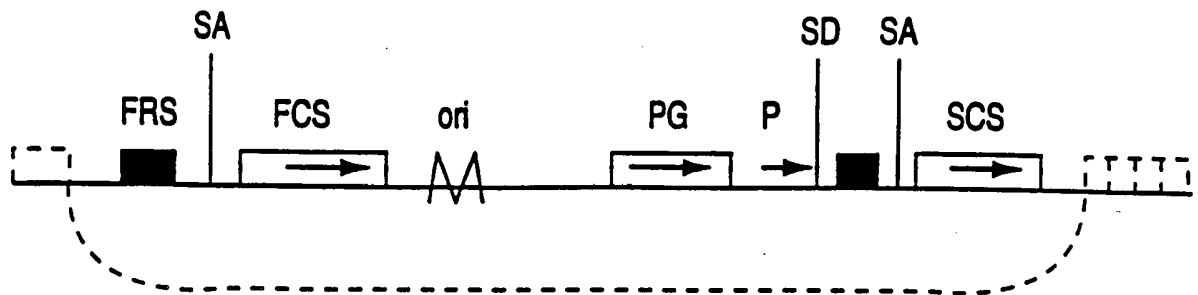
přičemž na základě rekombinace ta kódující sekvence, která byla operabilně spojena s uvedeným promotorem s ním operabilně spojena není, a ta kódující sekvence, která nebyla operabilně spojena s uvedeným promotorem s ním operabilně spojena je.

36. Způsob, který umožňuje provést místně specifickou rekombinací v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

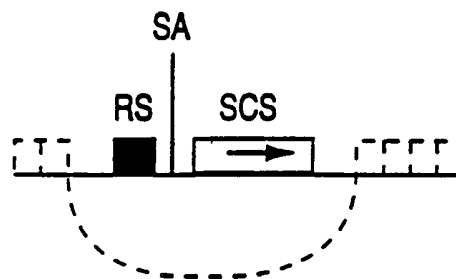
(a) dochází ke kontaktu uvedené buňky s vektorem podle libovolného z nároků 18 až 22 tak, že uvedený vektor vstupuje do uvedené buňky a jestliže vektor obsahuje počátek replikace, pak tento počátek replikace je funkční v savčí buňce a

(b) poskytuje uvedenou buňku s místně specifickou rekombinázou, která umožňuje rekombinaci mezi uvedeným prvním a druhým rekombinantním místem uvedeného vektoru.

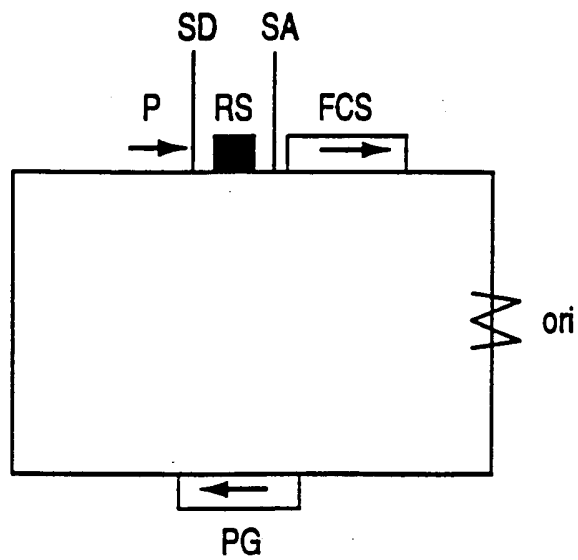
1 / 15



obr. č. 1A



obr. č. 1B



obr. č. 1C

14.04.98

2 / 15

obr. č. 2A

CS	HBD	Gly Ala
----	-----	---------

obr. č. 2B

CS	Gly Ala	HBD
----	---------	-----

obr. č. 2C

Gly Ala	CS	HBD
---------	----	-----

obr. č. 2D

HBD	CS	Gly Ala
-----	----	---------

obr. č. 2E

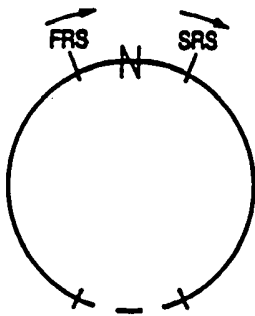
Gly Ala	HBD	CS
---------	-----	----

obr. č. 2F

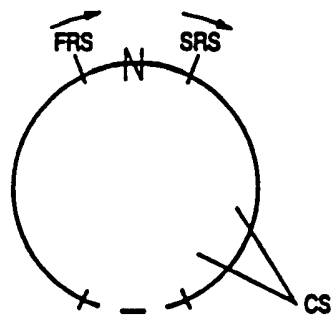
HBD	Gly Ala	CS
-----	---------	----

14.04.98

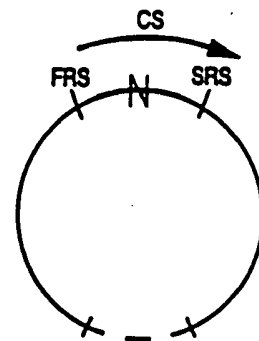
3 / 15



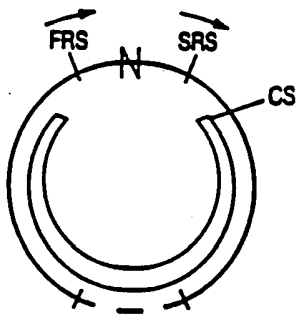
obr.č.3A



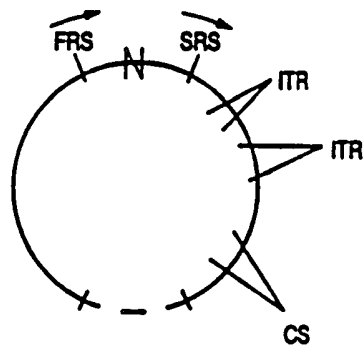
obr.č.3B



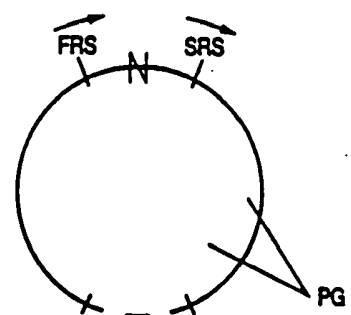
obr.č.3C



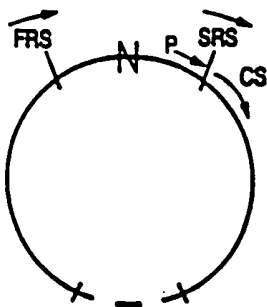
obr.č.3D



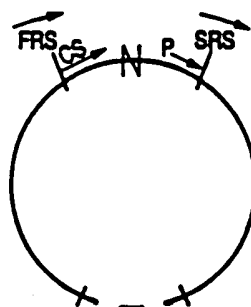
obr.č.3E



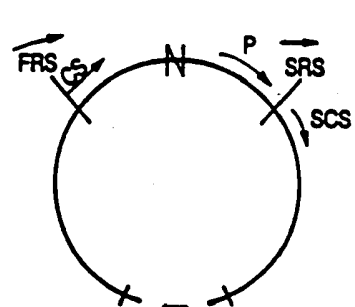
obr.č.3F



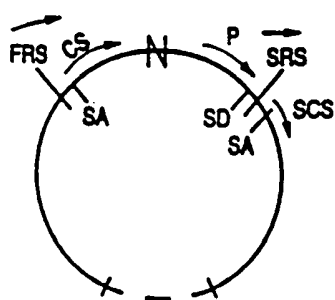
obr.č.3G



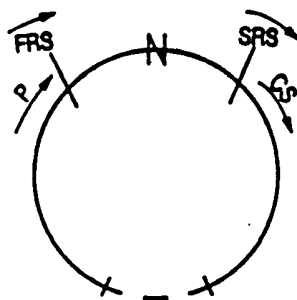
obr.č.3H



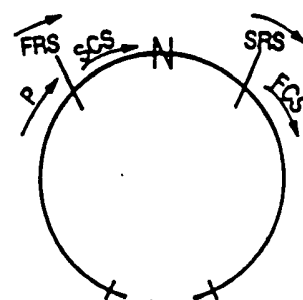
obr.č.3I



obr.č.3J

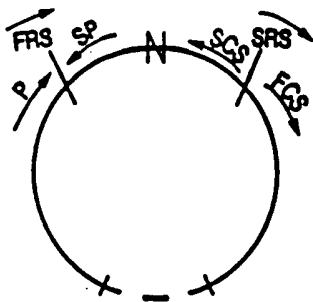


obr.č.3K

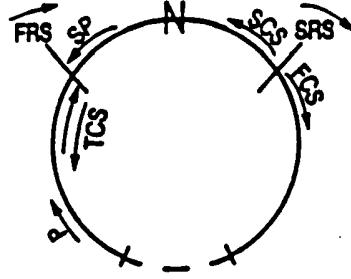


obr.č.3L

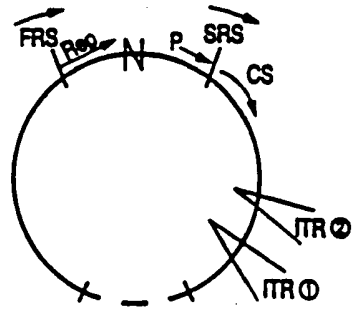
4 / 15



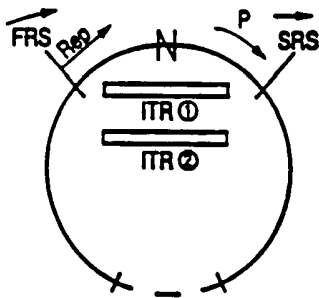
obr. č. 3M



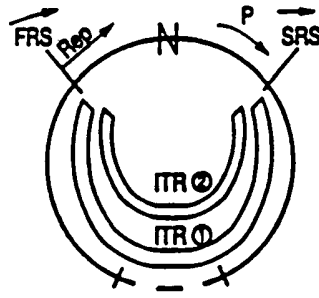
obr. č. 3N



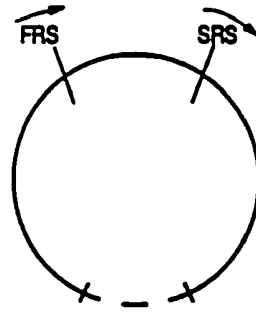
obr. č. 3O



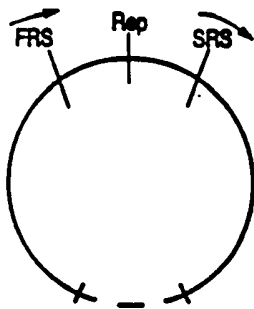
obr. č. 3P



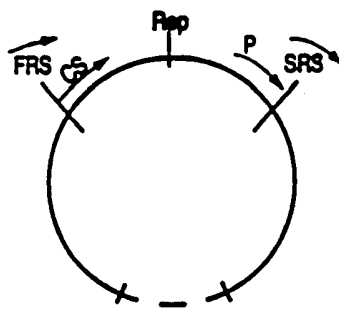
obr. č. 3Q



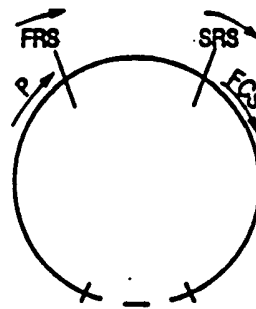
obr. č. 3R



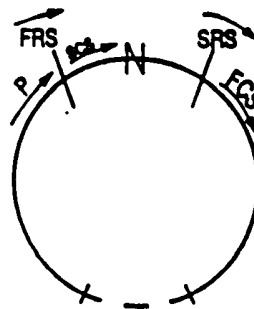
obr. č. 3S



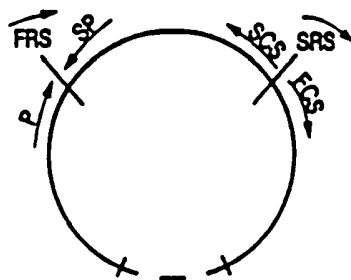
obr. č. 3T



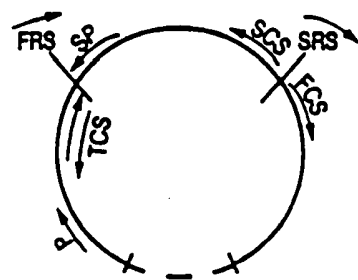
obr. č. 3U



obr. č. 3V



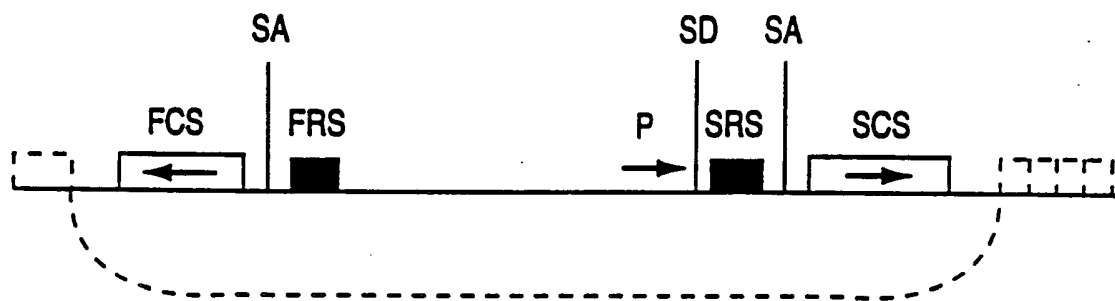
obr. č. 3W



obr. č. 3X

14-04-98

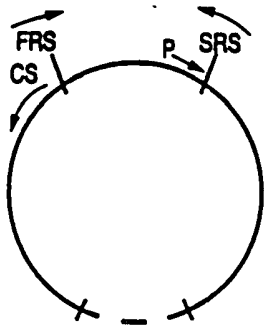
5 / 15



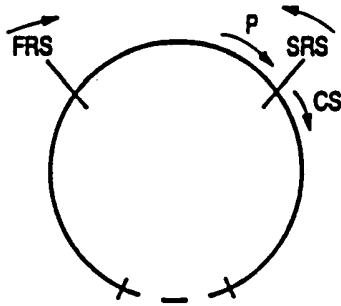
обл. 8.4

14-04-98

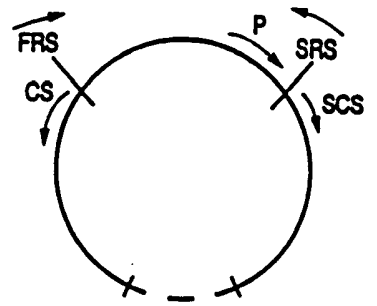
6/15



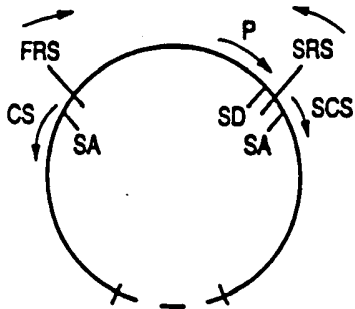
obr. 4.5A



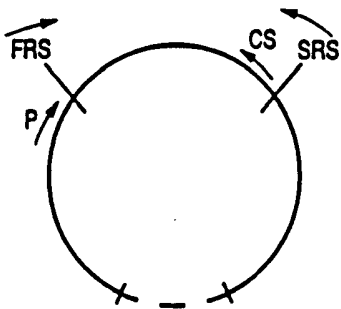
obr. 5.5B



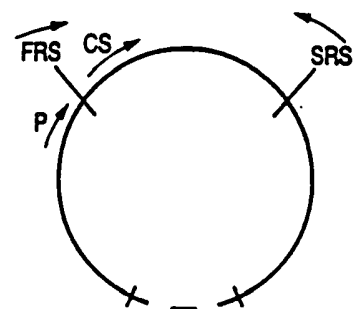
obr. 6.5C



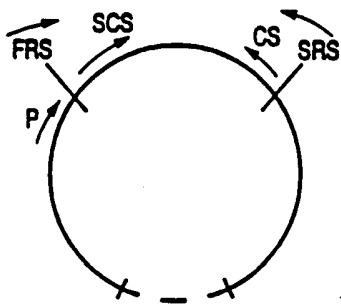
obr. 7.5D



obr. 8.5E

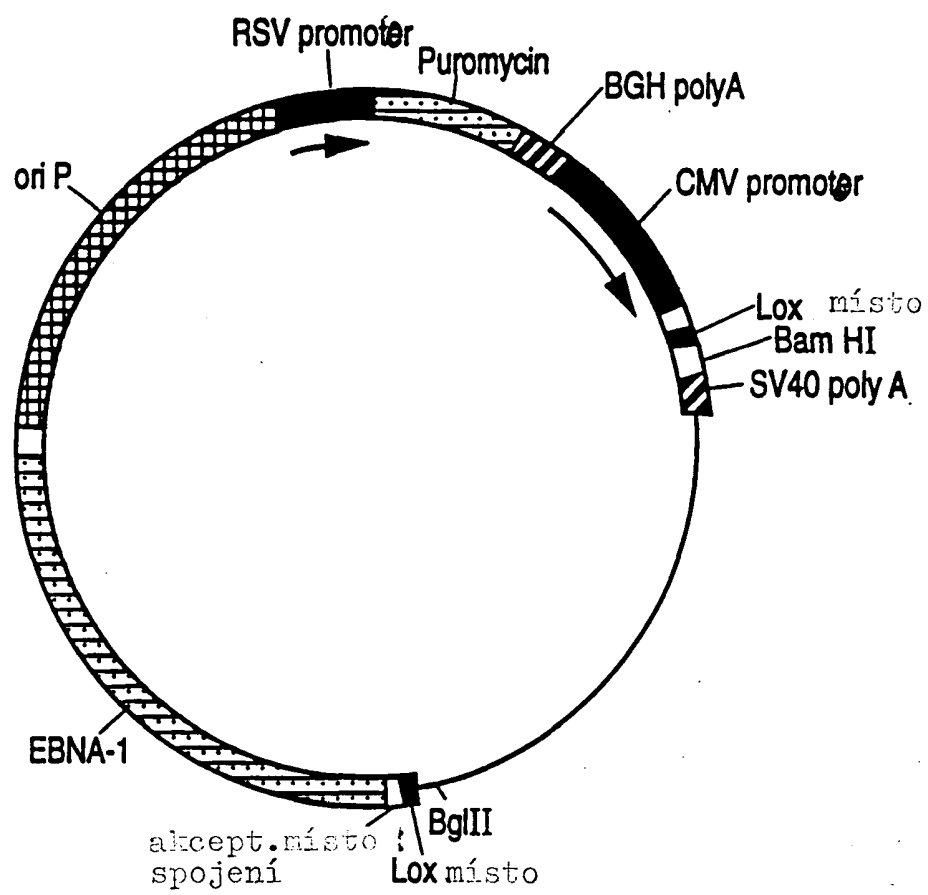


obr. 9.5F



obr. 10.5G

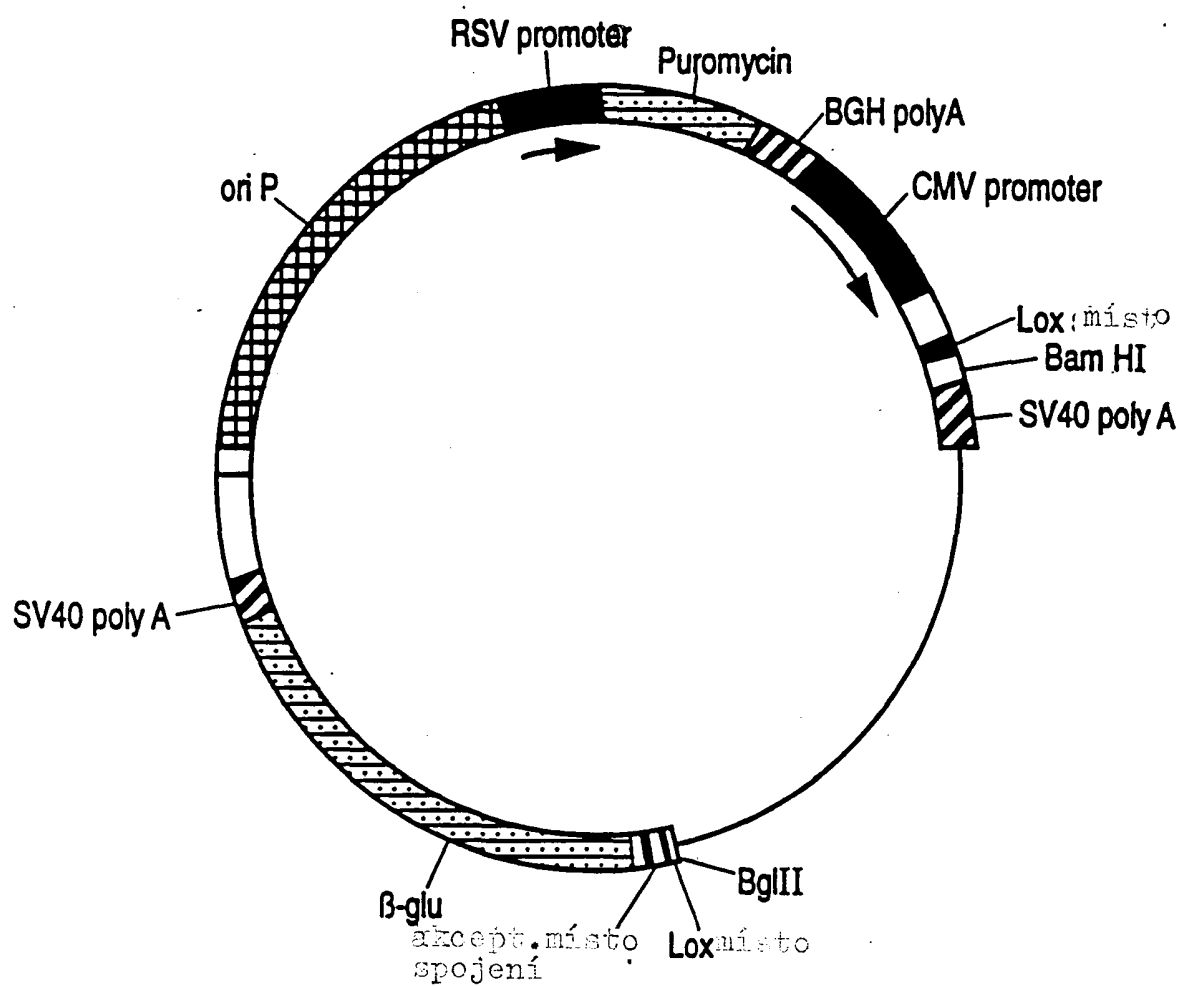
7 / 15



obr. 2.6

14.04.98

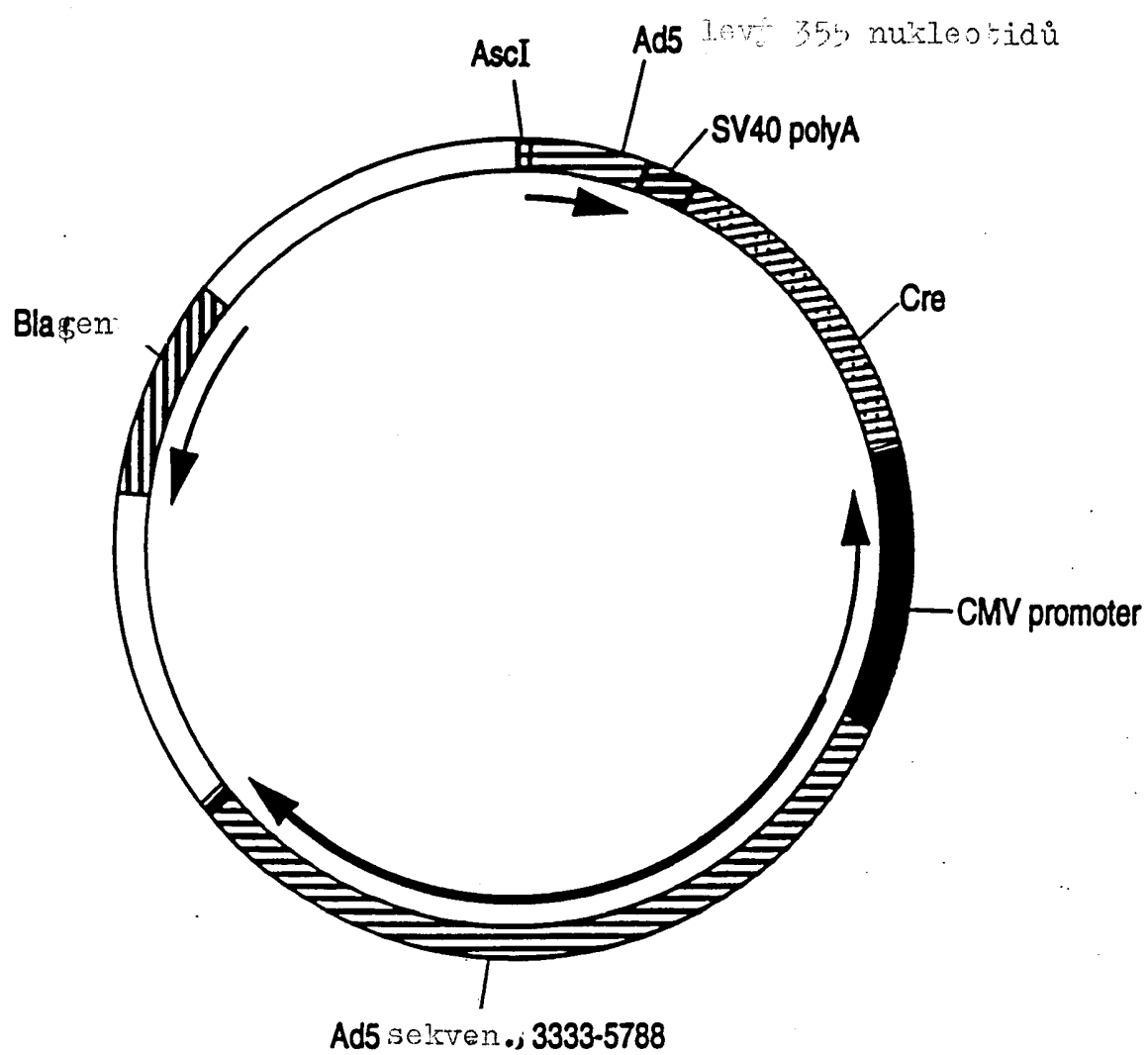
8 / 15



obr. 8.7

14.04.98

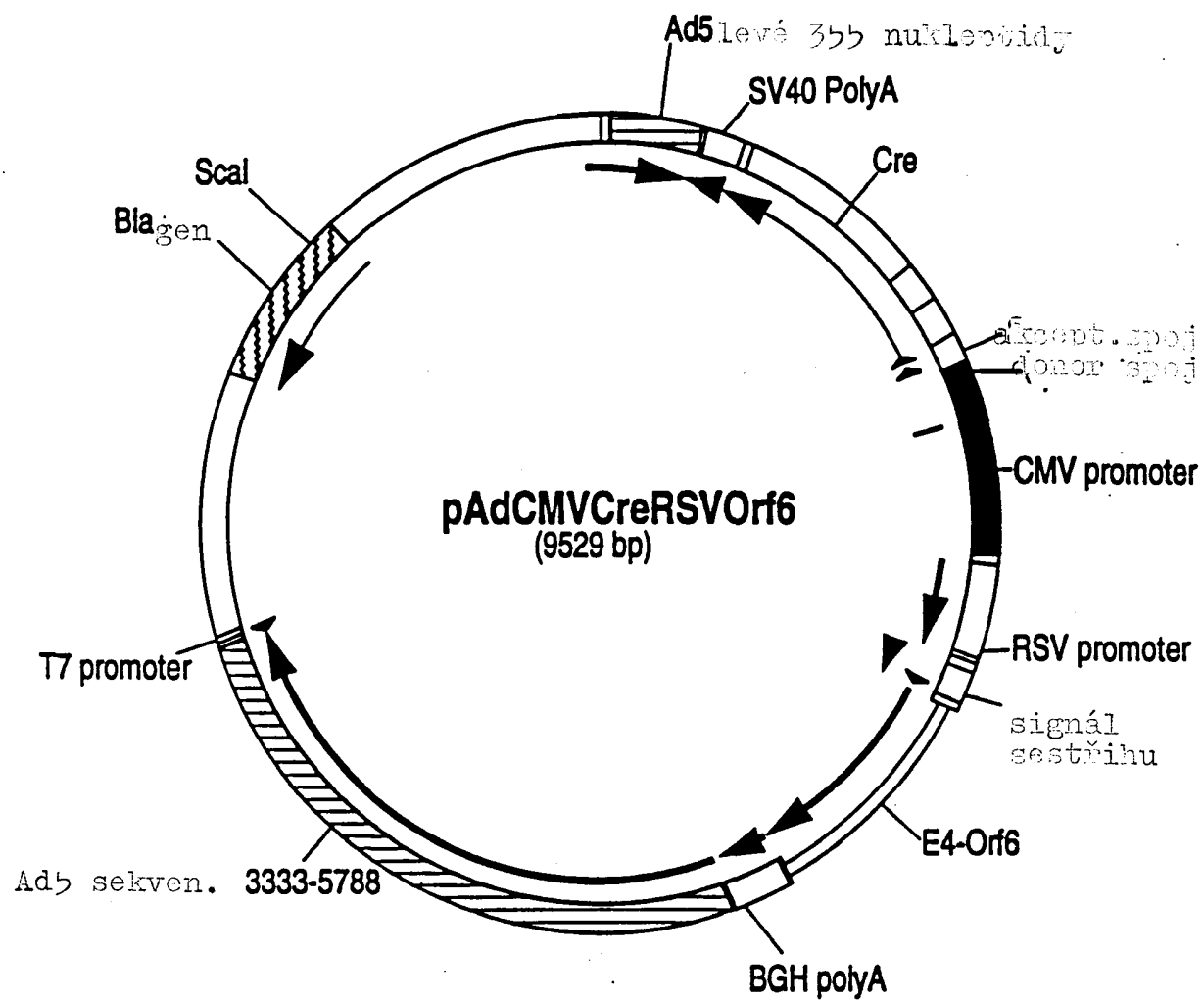
9 / 15



obr. 8.8

14.04.98

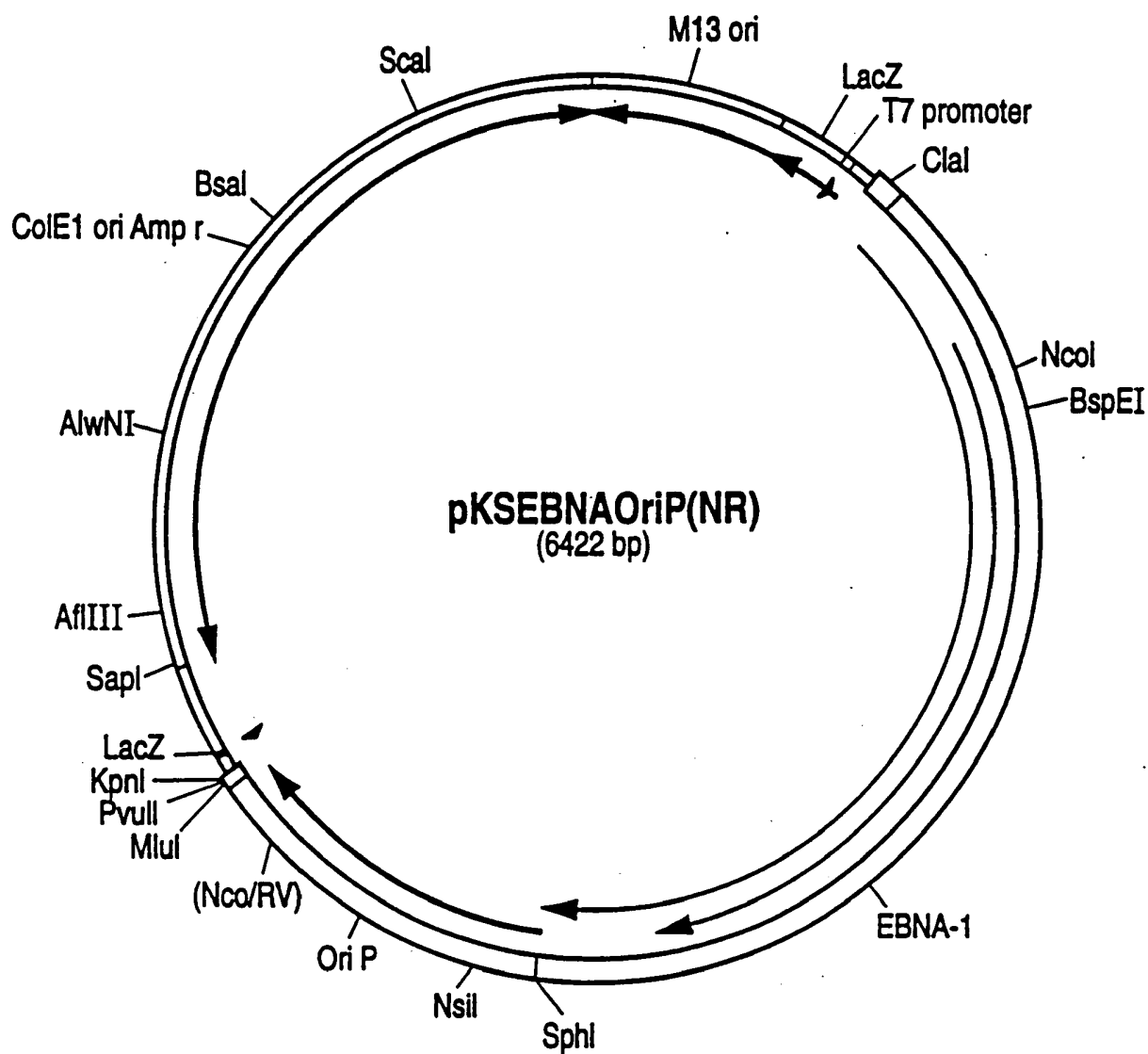
10 / 15



obr. 8.9

14-04-98

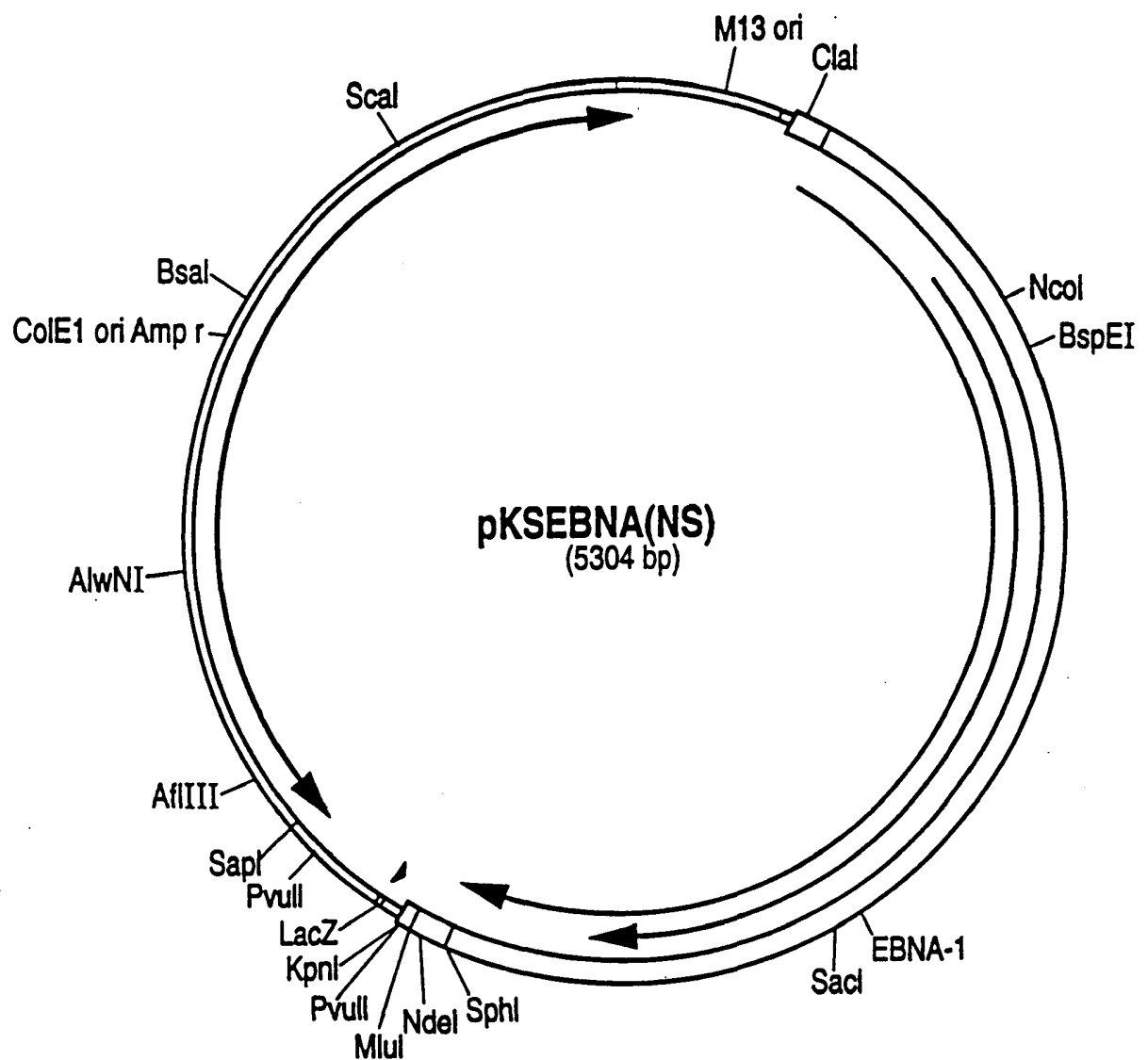
11 / 15



obr.č.10

14.04.98

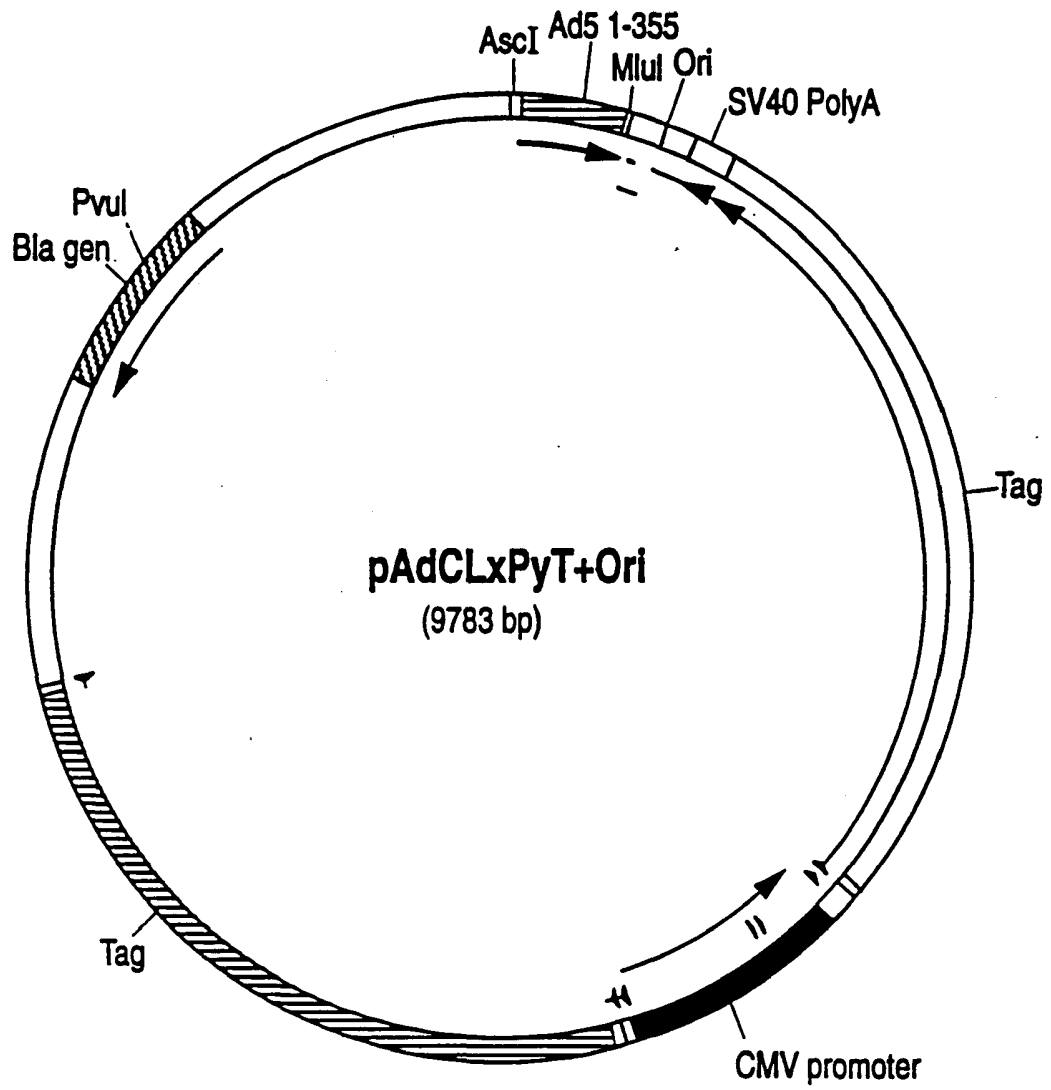
12 / 15



obr. č. 41

14.04.98

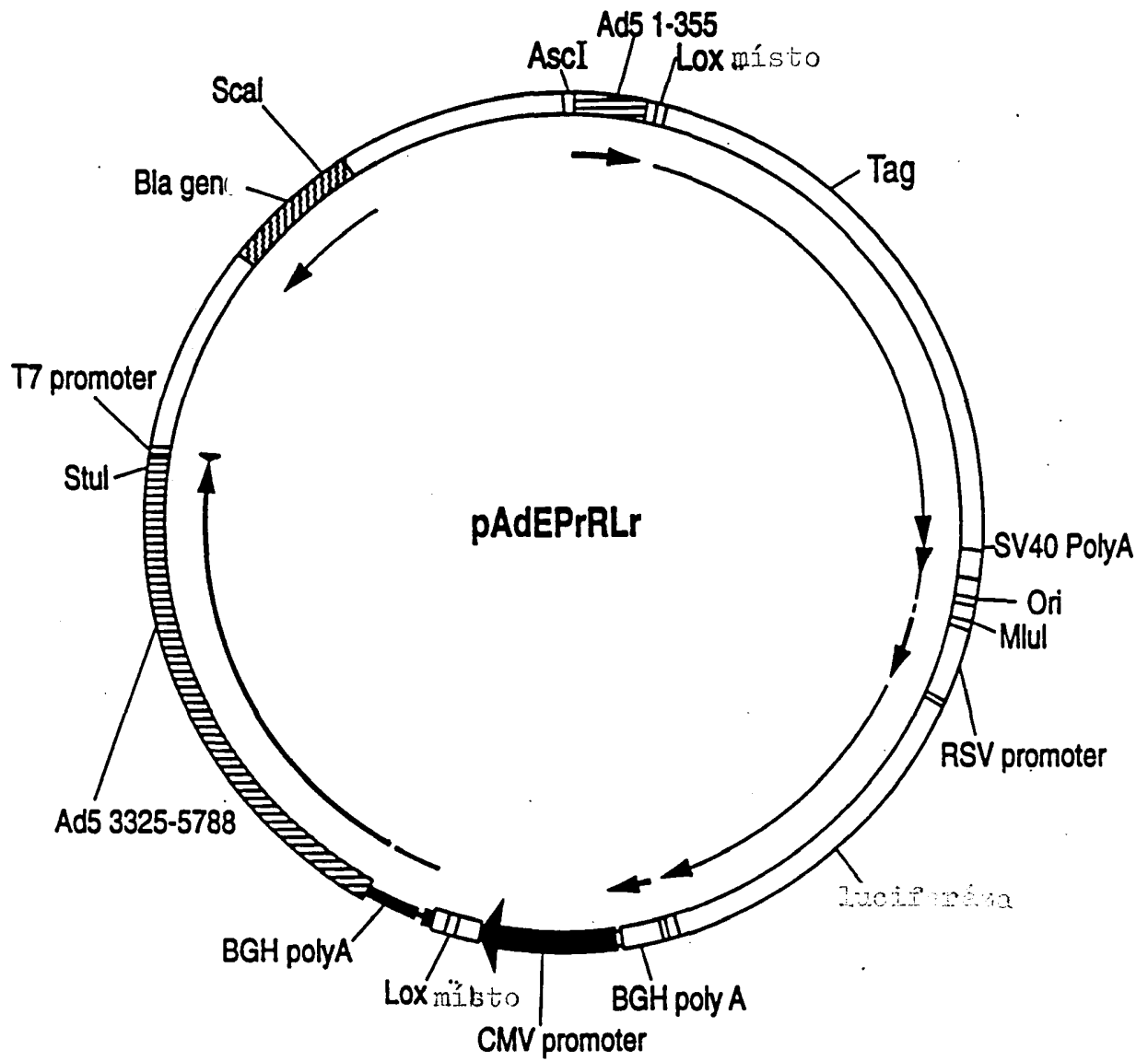
13 / 15



obr. č. 12

14-04-98

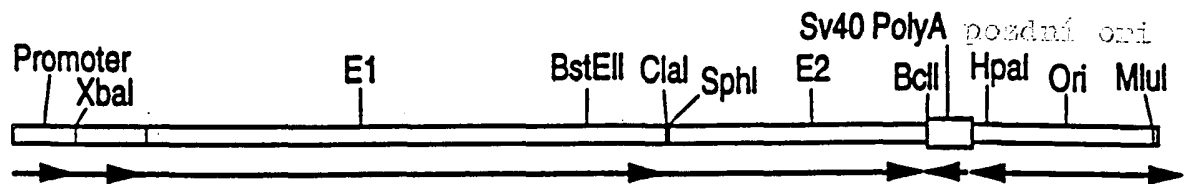
14 / 15



obr. 3.13

14.04.98

15 / 15



pCGE1E2ori
(4017 bp)

06.03.94