



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315375**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 07 K 19/00, 14/035,
C 12 N 15/62, 15/63

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19965623	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1995.06.29, PCT/US95/08179
(22) Inng. dag	1996.12.30	(85) Videreføringsdag	1996.12.30
(24) Løpedag	1995.06.29	(30) Prioritet	1994.07.01, US, 270637
(41) Alm. tilgj.	1997.02.28		1994.07.15, US, 275876
(45) Meddelt dato	2003.08.25		1995.02.03, US, 383754
(83) Mikroorganisme deponert:	ZMBH nr. DSM 9279		1995.06.07, US, 486814

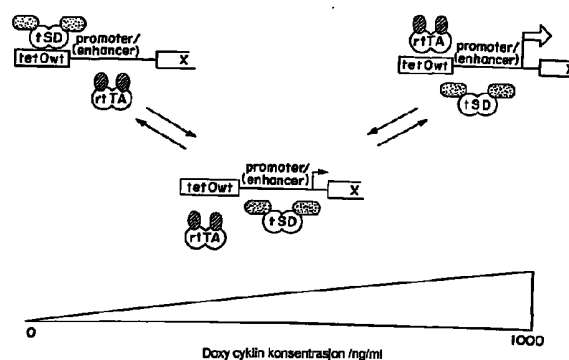
(71) Patenthaver	BASF AG, Carl-Bosch-Strasse 38, D-67056 Ludwigshafen, DE
(72) Oppfinner	Knoll AG, Knollstrasse 16-20, D-67061 Ludwigshafen, DE
	Hermann Bujard, D-69120 Heidelberg, DE
(74) Fullmektig	Manfred Gossen, El Cerrito, CA 94530, US
	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Fusjonsprotein som aktiverer eller hemmer transkripsjon, nukleinsyre som koder for dette, samt rekombinant vektor, vertscelle, fremgangsmåte for å stimulere, hemme eller modulere transkripsjon og testsett**

(56) **Anførte publikasjoner** M. Gossen et al., Trends in Biochemical Sciences, vol. 18, no 12 1993, s. 471-475
M. Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 89, 1992, s. 5547-5551
I. G. Cowell, Trends in Biochemical Sciences, vol. 19, no. 1, 1994, s. 38-42
B. Hecht et al., J. Bacteriol., vol. 175, no 4, 1993, s. 1206-1210

(57) **Sammendrag**

Nukleinsyremolekyler og proteiner nyttige for regulering av ekspresjonen av gener i eukaryote celler og organismer er beskrevet. Videre fremskaffes det et transkripsjonell aktivator fusjonsprotein som binder til tetoperator-sekvenser og stimulerer transkripsjon av et tetoperator-koblet gen i nærvær, men ikke i fravær, av tetracyklin (eller en analog derav). Videre tilveiebringes det transkripsjonell inhibitor fusjonsproteiner som inhiberer transkripsjon av et tetoperator-koblet gen på en regulert måte. I en utførelse, binder inhibitor fusjonsproteinet til tetoperatorsekvenser i fravær, men ikke i nærvær, av tetracyklin (eller analog). I en annen utførelse binder inhibitor-fusjonsproteinet til tetoperator-sekvensen i nærvær men ikke i fravær, av tetracyklin (eller analog). De transkripsjonelle aktivator- og inhibitor-fusjonsproteinene som beskrives kan benyttes i kombinasjon for å regulere ekspresjon av en eller flere tetoperator-koblede gener. Nye tetoperator-inneholdende transkripsjonelle enheter som tillater koordinert eller uavhengig tetracyklin-regulert ekspresjon av to eller flere gener av de transkripsjonelle modulatorer er også beskrevet. Testsett inkluderende komponentene av det regulerende systemet er også beskrevet.



Foreliggende oppfinnelse angår fusjonsprotein som aktiverer eller hemmer transkripsjon, nukleinsyre som koder for dette, samt rekombinant vektor, vertscelle, fremgangsmåte for å stimulere, hemme eller modulere transkripsjon og testsett.

5 Funksjonell analyse av cellulære proteiner blir svært forenklet ved hjelp av endringer i ekspresjonsnivået av det relevante gen for etterfølgende analyse av den resulterende fenotype. For en slik tilnærming er et induserbart ekspresjonssystem kontrollert av en ytre stimulus ønskelig. Ideelt ville et slikt system ikke bare mediere en på/av status for genekspresjon, men ville også tillate begrenset
10 ekspresjon av et gen på et definert nivå.

Forsøk på å kontrollere genaktivitet har blitt gjort ved bruk av ulike induserbare eukaryote promotere, slik som de som er følsomme overfor tungmetall-ioner (Mayo et al., (1982) Cell, 29:99-108; Brinster et al., (1982) Nature 296:39-42; Searle et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489), varmesjokk (Nouer et al., (1991)
15 i Heat Shock Response, ed. Nouer, L. CRC, Boca Raton, Florida, pp. 167-220) eller hormoner (Lee et al., (1981) Nature, 294:228-232; Hynes et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2038-2042; Klock et al., (1987) Nature 329:734-736; Israel & Kaufman (1989) Nucl. Acids Res. 17:2589-2604). Imidlertid har disse systemer generelt hatt ett eller begge av de følgende problemer: (1) inducere (for
20 eksempel tungmetall-ioner, varmesjokk eller steroidhormoner) fremkaller pleiotrope effekter, som kan komplisere analysene, og (2) mange promoter-systemer viser et høyt nivå av basalaktivitet i den ikke-induserte tilstand, noe som hindrer at det regulerte gen kan slås av og resulterer i moderate induksjonsfaktorer.

25 En tilnærming for å omgå disse begrensninger er å introdusere regulatoriske elementer fra evolusjonært fjerne arter slik som *E. coli*, inn i høyere eukaryote celler med den forventning at effektorer som modulerer slike regulatoriske systemer vil være ufølsomme overfor eukaryotisk cellefysiologi og, som en konsekvens, ikke vil fremkalle pleiotrope effekter i eukaryote celler. For
30 eksempel fungerer Lac repressoren (*lacR*)/operator/inducersystemet til *E. coli* i eukaryote celler og har blitt benyttet for å regulere genekspresjon via tre ulike tilnærminger: (1) man forhindrer transkripsjonsinitiering ved korrekt plassert lac operatorer på promoterseter (Hu & Davidson (1987) Cell 48:555-566; Brown et al., (1987) Cell 49:603-612; Figge et al., (1988) Cell 52:713-722; Fuerst et al., (1989)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2549-2553; Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5400-5405); (2) blokade av transkriberende RNA polymerase II under forlengelse ved et LacR/operator-kompleks (Deuschle et al., (1990) Science 248:480-483); og (3) aktivering av en promoter som er følsom overfor en fusjon mellom LacR og aktiveringsdomenet av herpes simplex-virus (HSV) virion protein 16 (VP16) (Labow et al., (1990) Mol. Cell. Biol. 10:3343-3356; Baim et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5072-5076).

I en utgave av Lac-systemet er ekspresjon av lac operator-tilknyttede sekvenser konstitutivt aktivert av et LacR-VP16 fusjonsprotein og blir slått av ved nærvær av isopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid (IPTG) (Labow et al., (1990) sitert ovenfor). I en annen versjon av systemet er en lacR-VP16 variant benyttet som binder til lac operatorer i nærvær av IPTG, som kan bli forsterket ved å øke cellenes temperatur (Baim et al., (1991), sitert over). Brukbarheten av disse lac-systemene i eukaryote celler er begrenset, delvis fordi IPTG virker langsomt og lite effektivt i eukaryote celler og må bli brukt i konsentrasjoner som kan ha cellegiftige effekter. Som alternativ kan temperaturendring dersom dette benyttes for å indukere genekspresjon, føre til pleiotrope effekter i cellene. Det er således et behov for et mere effektivt induserbart regulatorisk system som fremviser et raskt og høyt nivå av genekspresjon-induksjon og der det induserende agens blir tolerert av eukaryote celler uten celledødsitet eller pleiotrope effekter.

Komponenter av tetracyklin (Tc) motstandssystemet hos *E. coli* har også blitt funnet å funksjonere i eukaryote celler og har blitt benyttet for å regulere genekspresjon. For eksempel har Tet repressoren (TetR), som binder til tet-operatorsekvenser i fravær av tetracyklin og undertrykker gentranskripsjon, blitt uttrykket i planteceller i tilstrekkelig høye konsentrasjoner slik at transkripsjon fra en promoter som inneholdt tet-operatorsekvenser ble undertrykket (Gatz, C. et al., (1992) Plant J. 2:397-404). Imidlertid er meget høye intracellulære konsentrasjoner av TetR nødvendige for å holde genekspresjonen nedregulert i celler, noe som kan være vanskelig å oppnå i mange situasjoner, og dette kan føre til "lekkasje" i systemet.

I andre studier har TetR blitt fusjonert til aktiveringsdomenet hos VP16 for å skape en tetracyklin-kontrollert transkripsjonell aktivator (tTA) (Gossen M. & Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551). tTA fusjonsproteinet blir regulert av tetracyklin på samme måte som TetR, det vil si at tTA binder til tet-

operatorsekvenser i fravær av tetracyklin, men ikke ved tilstedeværelse av tetracyklin. Således blir i dette system genekspressjon forhindret ved kontinuerlig tilstedeværelse av Tc, og Tc blir fjernet for å indusere transkripsjon.

Hecht et al. beskriver også Tet repressormutanter som benytter et
5 seleksjonssystem for å identifisere ikke-induserbare Tet repressormutanter (Hecht et al. (1993) J. Bacteriol., Vol 175 (4), s. 1206-1210. Alle identifiserte mutanter fra denne studien binder til tet-operatoren både i nærvær og fravær av tetracyklin. For en generell oversikt over prokaryote reguleringslementer, inkludert lacR-systemet og deres potensielle anvendelse i eukaryot genekspressjon, se Gossen et
10 al. (1993) Trends in Biochemical Sciences, Vol. 18 (12), s. 471-475.

Oppfinnelsen relaterer til et induserbart regulatorisk system som benytter komponenter av Tet repressor/operator/inducer-systemet hos prokaryoter for å stimulere genekspressjon i eukaryote celler. I systemet blir transkripsjon av en tet-operator knyttet eller koblet nukleotidsekvens forhindret ved fravær av tetracyklin,
15 men kan raskt og potent bli indusert ved nærvær av tetracyklin (eller tetracyklin-analoger).

Ifølge et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse omfattes en isolert nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, kjennetegnet ved at fusjonsproteinet omfatter et første polypeptid som er en
20 mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær, men ikke i fravær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et annet polypeptid omfattende et transkripsjonsaktiveringsdomene som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler.

Transkripsjon blir indusert av et fusjonsprotein som består av minst to
25 polypeptider, et første polypeptid som binder til tet-operator-sekvensene under nærvær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog og et annet polypeptid som direkte eller indirekte aktiverer transkripsjon i eukaryote celler. Det første polypeptidet av fusjonsproteinet er en mutert Tet repressor som blir regulert av Tc på en motsatt måte sammenlignet med villtype repressoren, det vil si polypeptidet
30 binder til tet-operatorsekvensene i nærvær av istedenfor i fravær av Tc. Således blir i fravær av det induserende agens (Tc eller en Tc-analog) transkripsjon av et tet-operator-tilknyttet nukleotidsekvens ikke indusert. I nærvær av det induserende agens blir transkripsjon av den tet-operator-knyttede nukleotidsekvensen stimulert av transaktivator fusjonsproteinet fra oppfinnelsen.

Det induserbare regulatoriske system i oppfinnelsen har de fordelaktige egenskaper at induksjon av genekspresjon er rask, effektiv og potent (for eksempel typisk effekt er mellom 1000 og 2000 ganger, opp til en 20.000 gangers økning i ekspresjon har blitt observert) og det induserende agens behøver ikke å
 5 være kontinuerlig tilstede. Videre forårsaker det induserende agens ikke pleiotrope effekter eller celleskade i eukaryote celler. Oppfinnelsens induserbare regulatoriske system kan bli benyttet for å regulere genekspresjon i celler enten *in vitro* eller *in vivo*, og kan være spesielt hensiktsmessig for applikasjon i genterapi og for ekspresjon av genprodukter i transgene og homologt rekombinante
 10 organismer (for eksempel dyr og planter).

De induserbare regulatoriske system involverer minst to komponenter: en tetracyklin-induserbar transkripsjonell aktivator og en transkripsjonenshet som mål som skal bli regulert. Derav følger at et aspekt av oppfinnelsen relaterer til en Tc-induserbar transkripsjonell aktivator ("transaktivator") fusjonsprotein, og nukleinsyre (for eksempel DNA) som koder for fusjonsproteinet.
 15

Fusjonsproteinet ifølge foreliggende oppfinnelse som aktiverer transkripsjon er kjennetegnet ved at det omfatter et første polypeptid som er en mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær, men ikke i fravær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et annet polypeptid
 20 omfattende et transkripsjons aktiveringsdomene som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler.

Et foretrukket fusjonsprotein omfatter en Tn10-kodet Tet repressor som er mutert på minst én aminosyreposisjon utvalgt fra aminosyreposisjonene 71, 95, 101 og/eller 102, som er operativt knyttet til herpes simplex-virus virion protein 16 (VP16) aktiveringsdomene (nukleotid- og aminosyresekvensene av slikt et
 25 fusjonsprotein er vist i SEKV ID NR:1 og 2, henholdsvis). I en utførelse inkluderer aktiveringsdomenet hos fusjonsproteinet omtrent 127 C-terminale aminosyrer fra VP16 (for eksempel fusjonsproteinet vist i SEKV ID NR:2). I en annen utførelse inkluderer aktiveringsdomenet minst en kopi av omtrent 11 C-terminale aminosyrer
 30 fra VP16 (for eksempel aminosyresekvensen som er vist i SEKV ID NR:4). Andre muterte Tet repressorer og transkripsjonelle aktiveringsdomener som har de nødvendige funksjonelle aktiviteter er innen oppfinnelsens område. I tillegg kan transaktivator fusjonsproteinet inkludere et tredje polypeptid som fremmer transport av fusjonsproteinet til en cellekjerne. For eksempel kan et nukleært

lokaliseringssignal (for eksempel med en aminosyre-sekvens vist SEKV ID NR:5) bli inkorporert inn i fusjonsproteinet. Oppfinnelsen gir videre rekombinante vektorer og vertsceller som omfatter nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen. Oppfinnelsen gir videre transgene og homologe rekombinante organismer som omfatter nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen.

En transaktivator fra oppfinnelsen blir benyttet for å regulere transkripsjon av en mål-transkripsjonsenhet som består av en nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt knyttet til en minimal promotersekvens og minst én tet-operatorsekvens. Nukleotidsekvensen som skal transkriberes kan kode for et protein av interesse eller et aktivt RNA-molekyl (for eksempel antisens RNA-molekyl eller ribozym) og kan være en eksogen eller endogen nukleotidsekvens. En første nukleinsyre som koder for en transaktivator fra oppfinnelsen og en annen nukleinsyre som omfatter en mål-transkripsjonsenhet for transaktivatoren kan bli inkorporert i en nukleinsyresammensetning. Nukleinsyresammensetningen kan bli introdusert inn i vertsceller eller organismer (for eksempel transgene og homologt rekombinante dyr og planter) for å tillate transkripsjon av tetracyklin-induserbar ekspresjon av mål-nukleotidsekvensen.

I tillegg til å gi et regulatorisk system for ekspresjon av en enkel nukleotidsekvens som skal bli transkribert, inneholder oppfinnelsen også nye transkripsjonsenheter som mål som tillater samtidig og uavhengig regulering av transkripsjon av to eller flere nukleotidsekvenser. I en utførelse oppnås en koordinert regulering av transkripsjon av to nukleotidsekvenser ved å bruke en transkripsjonsenhet der først en nukleotidsekvens som skal bli transkribert er operativt knyttet til 5'-enden av en tet-operatorsekvens (eller sekvenser) og en annen nukleotidsekvens skal bli transkribert som er operativt knyttet til 3'-enden av den samme tet-operatorsekvens (sekvenser) slik at den første og andre nukleotidsekvens blir transkribert på en divergerende måte. Passende bidireksjonelle promotorer for slike bidireksjonelle transkripsjonsenheter vises i SEKV ID NR:6 og 7. Slike transkripsjonsenheter er spesielt hensiktsmessige for å produsere støkiometriske mengder av to subenheter i et heterodimert protein (for eksempel antistoffkjeder) i den samme celle eller for samtidig å uttrykke et gen av interesse og et gen som koder for en påvisbar markør i den samme celle, noe som tillater seleksjon av celler som uttrykker genet av interesse.

I en annen utførelse blir uavhengig regulering av to nukleotidsekvenser oppnådd ved bruk av en transkripsjonsenhet der en initial nukleotidsekvens som skal transkriberes, blir operativt knyttet til en tet-operator av en første klasse type, og en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes er operativt knyttet til en tet-
5 operator av en annen, ulik klasse type. To ulike transkripsjonelt aktivator fusjonsproteiner blir så brukt for å regulere transkripsjon av de to nukleotidsekvenser: et fusjonsprotein binder til den første klasse av tet-operatorsekvenser i nærvær av Tc, mens det andre fusjonsproteinet binder til den andre klasse av tet-operatorsekvenser i fravær av Tc (eller som alternativ, det første fusjonsprotein binder til
10 den første klasse av tet-operatorsekvenser i fravær av Tc og det andre fusjonsprotein binder til den andre klasse av tet-operatorsekvenser i nærvær av Tc). Denne transkripsjonsenhet er spesielt hensiktsmessig når man vil uavhengig regulere ekspresjon av et terapeutisk gen og et selvmordsgen hos en vert. For eksempel er ekspresjon av det terapeutiske gen stimulert i nærvær av tetracyklin
15 og, når behandlingen er avsluttet blir ekspresjon av selvmordsgenet stimulert ved at tetracyklin fjernes.

Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til fremgangsmåter for å stimulere transkripsjon av en nukleotidsekvens som operativt er knyttet til minst en tet-operatorsekvens i vertscellen, kjennetegnet ved at den omfatter å kontakte verts-
20 cellen *in vitro* med tetracyklin eller en tetracyklin-analog.

I en vertscelle blir transkripsjon stimulert ved at cellen får kontakt med Tc eller en Tc-analog. Ulike Tc-analoger samt endringer av konsentrasjon av det induserende agens kan bli benyttet for å modulere induksjonsnivået på gen-
ekspresjonen. Foretrukne Tc-analoger for å fremkalle et høyt nivå av gen-
25 ekspresjon inkluderer anhydro-tetracyklin og doksycylin. Oppfinnelsen gir videre en fremgangsmåte for å produsere og isolere proteiner av interesse under bruk av det regulatoriske system fra oppfinnelsen.

Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører isolert nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som hemmer transkripsjon i eukaryote celler, kjennetegnet ved at
30 fusjonsproteinet omfatter et første polypeptid som er en Tet repressor eller en mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens operativt koblet til et heterologt annet polypeptid omfattende et transkripsjons inhiberings-"silencer"-domene som hemmer transkripsjon i eukaryote celler. Det relaterer til tetracyklin-regulert transkripsjonelle inhibitorer som er hensiktsmessige for å hemme

ekspresjon, på en nøy kontrollert måte, av et gen som er knyttet til én eller flere tet-operatorsekvenser. Transkripsjonshemmingen fra oppfinnelsen omfatter et fusjonsprotein som hemmer transkripsjon i eukaryote celler, kjennetegnet ved at det omfatter et første polypeptid som er en Tet repressor eller en mutert Tet

5 repressor som binder til en tet-operatorsekvens, operativt koblet til et heterologt annet polypeptid omfattende et transkripsjons inhiberings-"silencer"-domene som hemmer transkripsjon i eukaryote celler. Det heterologe andre polypeptidet kommer fra et annet protein enn det første polypeptidet. Siden fusjonsproteinene fra oppfinnelsen inkluderer et eukaryotisk transkripsjonelt blokkerende domene,

10 forventes de å være mer effektive i å hemme transkripsjon i eukaryote celler enn en Tet repressor alene vil være.

I en utførelse av oppfinnelsen binder det første polypeptid fra det hemmende fusjonsprotein til tet-operatorsekvenser i fravær men ikke ved tilstedeværelse av tetracyklin (Tc) eller en analog av dette (for eksempel det første

15 polypeptid er fortrinnsvis en Tet repressor slik som Tn10-avledet Tet repressor med en amino-syresekvens som vist i SEKV ID NR:17). I fravær av tetracyklin (eller Tc-analog) binder dette fusjonsprotein til tet-operatorsekvenser som operativt er knyttet til et gen av interesse, noe som derved hemmer transkripsjon av genet av interesse. I en annen utførelse binder det første polypeptid til tet-

20 operatorsekvenser ved nærvær men ikke i fravær av tetracyklin (for eksempel det første polypeptid er fortrinnsvis en mutert Tet repressor, slik som en Tn10-avledet Tet repressor med en aminosyre-substitusjon på posisjon 71, 95, 101 og/eller 102). Fortrinnsvis har det første polypeptid en aminosyresekvens som vist i SEKV ID NR:19. Ved nærvær av tetracyklin (eller Tc-analog) binder dette fusjons-

25 proteinet til tet-operatorsekvenser som operativt er knyttet til et gen av interesse, noe som derved hemmer transkripsjon av genet av interesse.

Det andre polypeptidet kan være et transkripsjonelt "silencer" domene fra et protein slik som v-erbA onkogenproduktet, Drosophila Krueppel proteinet, retinsyre-reseptor alfa, thyroidhormon-reseptor alfa, gjær Ssn6/Tup1 protein-

30 komplekset, Drosophila protein "even-skipped", SIR1, NeP1, Drosophila dorsal proteinet, TSF3, SFI, Drosophila "hunchback" proteinet, Drosophila "knirps" proteinet, WT1, Oct-2.1, Drosophila "engrailed" proteinet, E4BP4 eller ZF5. Foretrukne "silencer" domener inkluderer aminosyrerestene 403-466 fra Krueppel

(vist i SEKV ID NR:21) og aminosyrerester 364-635 av v-erbA (vist i SEKV ID NR:23).

Oppfinnelsens fusjonsproteiner kan videre omfatte ytterligere polypeptider, slik som et polypeptid som fremmer transport av fusjonsproteinet inn i en
 5 cellekjerne (for eksempel en nukleær transport aminosyresekvens).

Denne oppfinnelse frembringer videre isolerte nukleinsyremolekyler som koder for oppfinnelsens transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner og rekombinante ekspresjonsvektorer som inneholder disse nukleinsyremolekyler i en form som er tilpasset ekspresjon av det kodede transkripsjonsinhibitor
 10 fusjonsproteinet i vertscelle. Oppfinnelsen frembringer videre vertsceller inn i hvilken en rekombinant ekspresjonsvektor fra oppfinnelsen har blitt introdusert. Således er et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein uttrykt i disse vertsceller. Vertscellen kan foretrukket videre omfatte en nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens.

15 I en ytterligere utførelse av foreliggende oppfinnelse kjennetegnes vertscellen ved at den omfatter:

en første nukleinsyre som koder for et første fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, det første fusjonsproteinet omfattende et første polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens operativt koblet til et annet polypeptid som
 20 aktiverer transkripsjon i eukaryote celler;

en annen nukleinsyre som koder for et annet fusjonsprotein som hemmer transkripsjon, det andre fusjonsprotein omfattende et tredje polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens operativt koblet til et fjerde polypeptid som hemmer transkripsjon i eukaryote celler; og

25 et tredje nukleinsyremolekyl som omfatter en nukleotidsekvens som skal bli transkribert operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens.

For å regulere transkripsjon av det tet-operator-knyttede gen av interesse i disse vertsceller, blir konsentrasjonen av Tc (eller en analog av dette) som er i kontakt med vertscellen endret.

30 Ifølge et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse, omfattes en fremgangsmåte for å modulere transkripsjon av nukleotidsekvensen som er operativt koblet til minst en tet-operatorsekvens i vertscellen ifølge krav 32, kjennetegnet ved at den omfatter modulering av konsentrasjon av tetracyklin eller en tetracyklin-analog som er i kontakt *in vitro* med vertscellen. For eksempel blir, når

transkripsjonsinhibitorfusjonsproteinet binder til tet-operatorekvenser i fravær av Tc, konsentrasjonen av Tc i kontakt med cellene senket for derved å hemme transkripsjon av det tet-operator-knyttede gen av interesse (for eksempel dersom celler først blir dyrket i nærvær av Tc, så kan Tc bli fjernet fra kulturmediet for å

5 hemme transkripsjon av genet av interesse). Som alternativ blir når transkripsjonsinhibitorfusjonsproteinet binder til tet-operator-sekvenser i tilstedeværelse av Tc, konsentrasjonen av Tc i kontakt med cellene øket for derved å hemme transkripsjon av det tet-operator-knyttede gen av interesse (for eksempel dersom celler først dyrkes i fravær av Tc, kan Tc bli tilsatt til kulturmediet for å hemme

10 transkripsjon av genet av interesse).

Oppfinnelsens transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner er hensiktsmessige for å hemme genekspressjon i en rekke ulike situasjoner som beskrevet videre her. I en spesielt foretrukket utførelse blir transkripsjon av et tet-operator (tetO)-tilknyttet gen av interesse, regulert ved hjelp av en kombinasjon av

15 tetracyklin-regulert transkripsjonell inhibitor og aktivator fusjonsproteiner i den samme vertscelle for å tillate en presis kontroll av ekspresjonsnivået av genet av interesse. For eksempel er et aktivator fusjonsprotein som binder til tetO kun i tilstedeværelse av Tc og et inhibitor fusjonsprotein som binder til tetO kun i fravær av Tc uttrykket i en vertscelle som inneholder et tetO-koblet gen av interesse. I

20 fravær av Tc er basalnivået av gentranskripsjon av genet av interesse hemmet av inhibitor fusjonsproteinet. Når cellen kommer i kontakt med Tc (eller analog) blir transkripsjon av genet av interesse, stimulert ved hjelp av aktivator fusjonsproteinet. Aktivator og inhibitor fusjonsproteinene fra oppfinnelsen kan også bli benyttet i kombinasjon for å regulere ekspresjon av multiple tetO-koblede gener av

25 interesse.

En rekombinant vektor ifølge foreliggende oppfinnelse for koordinert, bidireksjonell transkripsjon av en første og en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes, er kjennetegnet ved at vektoren omfatter en nukleotidsekvens som omfatter i en 5' til 3' retning:

- 30 et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, som er operativt koblet til
- minst én tet-operatorekvens, som er operativt koblet til
- et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes,

der transkripsjon av den første og andre nukleotidsekvens som er introdusert i vektoren foregår i motsatte retninger i relasjon til minst én tet-operatorsekvens.

I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse, omfattes en rekombinant vektor for uavhengig regulering av transkripsjon av en første og en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes, kjennetegnet ved at vektoren som omfatter en nukleotidsekvens omfatter:

et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en første klasse type; og

et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en annen klasse type.

Nye reagens-sett for å regulere ekspresjon av et gen av interesse er også innen oppfinnelsens område. I en utførelse vil oppfinnelsens testsett som omfatter et bæremiddel som har tett innelukket i seg minst to oppbevaringsmidler, være kjennetegnet ved at det omfatter:

en første beholder som inneholder en første nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, der fusjonsproteinet omfatter et første polypeptid som er en Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et annet polypeptid omfattende et transkripsjons aktivator-domene som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler; og

en annen beholder som inneholder en annen nukleinsyre som omfatter et kloningssete for introduksjon av en nukleotidsekvens som skal bli transkribert operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens.

Som alternativ eller i tillegg, kan reagens-settene inkludere et nukleinsyre-molekyl som koder for et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen. Mål-transkripsjon enheter hvori multiple gener av interesse kan bli klonet, for eksempel for koordinert eller uavhengig regulering, kan også bli inkludert i oppfinnelsens reaksjonsblandinger. Videre kan minst ett tetracyklin eller en tetracyklin-analog bli inkludert i disse reaksjonssett.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 er et søylediagram som viser stimulering av luciferaseaktivitet i HR5-C11 celler fremkalt av tetracyklin og ulike tetracyklin-analoger (1 ug/mL f.c.). Celler ble dyrket i fravær (-) eller tilstedeværelse av de angitte tetracykliner i 3 dager før luciferaseaktivitet ble bestemt. Hver åpen og skravert søyle representerer luciferaseaktiviteten i en enkel kulturskål.

Figur 2 er en graf som viser den relative luciferaseaktivitet i HR5-C11 celler etter inkubasjon med ulike konsentrasjoner av doksycyklin. Resultatene av tre uavhengige eksperimenter blir vist.

Figur 3 er en graf som viser induksjonskinetikken av luciferaseaktivitet i HR5-C11 celler fremkalt av doksycyklin. HR5-C11 kulturer ble utsatt for 1 µg/mL doksycyklin og luciferaseaktivitet ble målt etter ulike tidsintervaller, (•) kulturer som inneholdt doksycyklin, (O) kulturer dyrket under fravær av antibiotika.

Figur 4 viser aminosyresekvensene av ulike klasser av Tet repressorer, og illustrerer homologien mellom aminosyresekvensene av ulike klasser av Tet repressorer sammenlignet med klasse B Tet repressorer (f.eks. Tn10-avledede). Aminosyreposisjoner i andre klasser av Tet repressorer som er identiske med klasse B er merket med en strek.

Figur 5 viser nukleotidsekvensene hos tet-operatorer fra ulike klasser: klasse A (SEKV ID NR:11), klasse B (SEKV ID NR:12), klasse C (SEKV ID NR:13), klasse D (SEKV ID NR:14) og klasse E (SEKV ID NR:15).

Figur 6 er et skjematisk diagram av et bidireksjonelt promoter-konstrukt for koordinert regulering av to gener av interesse operativt koblet til de samme tet-operatorer for regulering av en tetracyklin-regulert transkripsjonell aktivator.

Figur 7A (SEKV ID NR:6) viser nukleotidsekvensen hos en bidireksjonell promoter-region som kan brukes til koordinert regulering av to gener av interesse av en tetracyklin-regulert transkripsjonell aktivator.

Figur 7B (SEKV ID NR:7) viser nukleotidsekvensen av en bidireksjonell promoter-region for koordinert regulering av to gener av interesse, ved en tetracyklin-regulert transkripsjonell aktivator.

Figur 8 viser to grafer 8A og 8B, som demonstrerer koordinert ekspresjon av luciferase og β-galaktosidase-aktivitet ved en tetracyklin-regulert transkripsjonell aktivator.

Figurene 9A-B er skjematiske diagrammer som viser selv-regulerende promotere for ekspresjon av tetracyklin-regulerte transkripsjonelle aktivatorer (tTA). A illustrerer celleregulering av ekspresjon av et villtype Tet repressor-inneholdende transaktivator fusjonsprotein som binder til tet-operatorer i fravær av Tc. B viser selv-regulering av ekspresjon av et mutert Tet repressor-inneholdende transaktivator fusjonsprotein som binder til tet-operatorer i nærvær av Tc.

Figur 10 er et skematisk diagram som viser den negative og positive regulering av et tet-operator (tetOwt)-koblet gen av interesse ved et tetracyklin-regulert transkripsjonelt inhibitorprotein (tSD) og et tetracyklin-induserbart transkripsjonelt aktivator fusjonsprotein (rtTA), henholdsvis i nærvær av økende konsentrasjon av tetracyklin-analogen doksycyklin.

Figur 11 er et skematisk diagram av konstruksjonen av TetR-blokker domene fusjonskonstrukter ved innen ramme fusjon av nukleinsyre som koder enten et Krueppel eller v-erbA blokker domene til 3'-enden av nukleinsyre som koder for en Tet repressor (tetR gen).

Figur 12 er en grafisk fremstilling av ekspresjon av luciferaseaktivitet i mus som er transgene for luciferase reporter-genet alene (skraverde søyler på høyre side) eller dobbelt transgene dyr som bærer luciferase reporter-genet og et tTA^R transgen, enten i fravær av doksycyklin (mørke søyler i midten) eller i nærvær av doksycyklin (lette søyler til venstre).

Denne oppfinnelse relaterer til nukleinsyremolekyler og proteiner som kan bli benyttet for å regulere ekspresjon av gener i eukaryote celler eller dyr på en nøy kontrollert måte. Regulering av gen-ekspresjon ved hjelp av oppfinnelsens system involverer minst to komponenter: et gen som er operativt koblet til en regulatorisk sekvens og et protein som enten i tilstedeværelse eller fravær av et induserbart agens binder til den regulatoriske sekvens og enten aktiverer eller hemmer transkripsjon av genet. Oppfinnelsens system benytter komponenter av Tet repressor/operator/inducer-systemet hos prokaryoter for å stimulere gen-ekspresjon i eukaryote celler.

Ulike aspekter av oppfinnelsen relaterer til fusjonsproteiner som har evnen til enten å aktivere eller hemme gentranskripsjon når de er bundet til tet-operatoren (tetO) sekvenser, men som binder til tet-operatorsekvensene bare i tilstedeværelse eller alternativt i fravær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog.

Således er i en vertscelle transkripsjon av et gen operativt koblet til en tet-operatorsekvens (sekvenser) stimulert eller hemmet av et fusjonsprotein fra oppfinnelsen ved å endre konsentrasjon av tetracyklin (eller analog) som er i kontakt med vertscellen (f.eks. tilføre eller å fjerne tetracyklin fra dyrkningsmediet, eller tilførsel eller opphør av tilførsel av tetracyklin til en vertsorganisme, osv.).

Oppfinnelsen relaterer videre til transkripsjonsenheter som er mål for regulering av fusjonsproteinet fra oppfinnelsen. I tillegg til at oppfinnelsen tillater regulering av et enkelt tet-operator-koblet gen av interesse, frembringer også oppfinnelsen nye transkripsjonsenheter som inneholder to eller flere gener som skal transkriberes, som kan bli regulert på enten en koordinert eller uavhengig måte ved hjelp av et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen. Metoder for å stimulere eller hemme transkripsjon av et gen ved hjelp av tetracyklin (eller tetracyklin-analog), og reagensblandinger som inneholder komponentene av det regulatoriske system som beskrives her, omfattes også av oppfinnelsen.

I de følgende avsnitt blir nukleinsyrene og proteinene som omfatter komponentene av oppfinnelsens induserbare regulatoriske system, samt deres relasjoner til hverandre, diskutert i større detalj. Avsnittene er som følger:

I. Tetracyklin-induserbare transkripsjonelle aktivatorer

- A. Transaktivator fusjonsproteinets første polypeptid
- B. Transaktivator fusjonsproteinets andre polypeptid
- C. Transaktivator fusjonsproteinets tredje polypeptid

II. Ekspresjon av et transaktivator fusjonsprotein

- A. Ekspresjonsvektorer
- B. Vertsceller
- C. Introduksjon av nukleinsyre inn i vertsceller

III. Mål-transkripsjonsenheter regulert av en tetracyklin-induserbar transaktivator

- A. Regulering av ekspresjon av tet-operator-koblede nukleotidsekvenser
- B. Koordinert regulering av to nukleotidsekvenser
- C. Uavhengig regulering av multiple nukleotidsekvenser
- D. Kombinert koordinert og uavhengig regulering av multiple nukleotid-

sekvenser

IV. Tetracyklin-regulerte transkripsjonelle inhibitorer

- A. Det første polypeptid fra det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein
- 5 B. Det andre polypeptid fra det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein
- C. Et tredje polypeptid fra det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein
- D. Ekspresjon av det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein

V. Oppfinnelsens ferdig-lagede reagensblandinger (kits)

10

VI. Regulering av genekspresjon ved tetracykliner eller tetracyklin-analoger

- A. Stimulering av genekspresjon ved transaktivator fusjonsproteiner
- B. Inhibisjon av genekspresjon ved transkripsjonelle inhibitor fusjons-
- 15 C. Kombinert positiv og negativ regulering av genekspresjon

VII. Oppfinnelsens applikasjoner

- A. Genterapi
- B. Produksjon av proteiner *in vitro*
- 20 C. Produksjon av proteiner *in vivo*
- D. Dyremodeller av humane sykdommer
- E. Produksjon av stabile cellelinjer med hensikt på kloning
- F. Transgene organismer
- G. Homologe rekombinante organismer

25

I. Tetracyklin-induserbare transkripsjonelle aktivatorer

- I oppfinnelsens induserbare regulatoriske system blir transkripsjon av et gen aktivert av et transkripsjonelt aktivatorprotein, også beskrevet her enkelt som en transaktivator. Oppfinnelsens transaktivator er et fusjonsprotein. Et av
- 30 oppfinnelsens aspekter relaterer således til fusjonsproteiner og nukleinsyrer (f.eks. DNA) som koder for fusjonsproteiner. Begrepet "fusjonsprotein" ønskes å beskrive minst to polypeptider, i et typisk tilfelle fra ulike kilder, som er operasjonelt koblet. Hva angår polypeptidene, ønskes begrepet "operasjonelt koblet" å mene at de to polypeptider er forbundet på et måte slik at hvert polypeptid kan utøve sin

ønskede funksjon. I et typisk tilfelle er de to polypeptider kovalentlig bundet gjennom peptidbindinger. Fusjonsproteinet er fortrinnsvis produsert ved hjelp av standard rekombinante DNA teknikker. For eksempel er et DNA-molekyl som koder for det første polypeptid, bundet til et annet DNA-molekyl som koder for det andre polypeptid, og det resulterende hybride DNA-molekyl blir uttrykket i en vertscelle for å produsere fusjonsproteinet. DNA-molekylene er bundet til hverandre i en 5' til 3' orientering slik at den translasjonelle ramme med henblikk på de kodede polypeptider etter sammenbinding ikke er endret (dvs. DNA-molekylene er bundet til hverandre i rammen).

A. Transaktivator fusjonsproteinet første polypeptid

Transaktivator fusjonsproteinet i oppfinnelsen er delvis sammensatt av et første polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær av tetracyklin (Tc), eller til en tetracyklin-analog. Fusjonsproteinet første polypeptid er fortrinnsvis en mutert Tet repressor. Begrepet "mutert Tet repressor" ønskes å inkludere polypeptider som har en aminosyresekvens som er lignende den i en villtype Tet repressor, men som har minst en aminosyre-forskjell fra villtype Tet repressoren. Begrepet "villtype Tet repressor" ønskes å skulle beskrive et protein som forekommer i naturen som undertrykker transkripsjon fra tet-operatorsekvenser i prokaryote celler i fravær av Tc. Aminosyre-forskjellen (forskjellene) mellom en mutert Tet repressor og en villtype Tet repressor kan bestå av substitusjon av én eller flere aminosyrer, fjernelse av én eller flere aminosyrer eller et tillegg av én eller flere aminosyrer. Den muterte Tet repressor i oppfinnelsen har de følgende funksjonelle egenskaper: 1) polypeptidet kan binde til en tet-operatorsekvens, dvs. det bevarer DNA bindingsspesifisiteten til en villtype Tet repressor, og 2) det er regulert på en motsatt måte av tetracyklin enn en villtype Tet repressor er, dvs. den muterte Tet repressor binder til en tet-operatorsekvens bare ved tilstedeværelse av Tc (eller en Tc-analog) i stedet for i fravær av Tc.

I en foretrukket utførelse blir en mutert Tet repressor som har de funksjonelle egenskaper som er beskrevet over, produsert ved substitusjon av aminosyrerester i sekvensen til en villtype Tet repressor. For eksempel, slik som beskrevet i Eksempel 1, har en Tn10-derivert Tet repressor med aminosyre-substitusjoner på aminosyre-posisjonene 71, 95, 101 og 102, de ønskede

funksjonelle egenskaper og kan således blir brukt som det første polypeptid i oppfinnelsens transaktivator fusjonsprotein. Aminosyresekvensen til denne muterte Tet repressor er vist SEKV ID NR:2 (posisjoner 1-207). I en utførelse av den muterte Tet repressor er posisjon 71 mutert fra glutaminsyre til lysin, posisjon 5 95 er mutert fra asparaginsyre til asparagin, posisjon 101 er mutert fra leucin til serin og posisjon 102 er mutert fra glycin til asparaginsyre, selv om oppfinnelsen ikke er begrenset til disse spesielle mutasjoner. Mutasjon av færre enn alle fire av disse aminosyreposisjonene kan være tilstrekkelig for å oppnå en Tet repressor med de ønskede funksjonelle egenskaper. Ifølge dette er en Tet repressor 10 fortrinnsvis mutert på minst én av disse posisjoner. Andre aminosyre-substitusjoner, fjernelser eller tillegg på disse eller andre aminosyre-posisjoner som bevarer de ønskede funksjonelle egenskaper til den muterte Tet repressor er innen oppfinnelsens område. Krystallstrukturen til et Tet repressor-tetracyklin-kompleks, som beskrevet i Hinrichs, W. et al., (1994) Science 264:418-420, kan bli 15 brukt for rasjonell produksjon av muterte Tet repressorer. Ifølge denne struktur er aminosyreposisjon 71 lokalisert utenfor tetracyklin-bindingslommen, noe som antyder at mutasjon av denne posisjon ikke nødvendigvis er nødvendig for å fremkalle de ønskede funksjonelle egenskaper til en mutert Tet repressor fra oppfinnelsen. I motsetning til dette er aminosyreposisjonene 95, 101 og 102 20 lokalisert innenfor det konserverte tetracyklin-bindingsområde. Således kan tetracyklin-bindingsområdet til en Tet repressor være målet for mutasjoner med henblikk på å skape en mutert Tet repressor fra oppfinnelsen.

Ytterligere muterte Tet repressorer som kan inkorporeres inn i et fusjonsprotein fra oppfinnelsen kan produseres ifølge oppfinnelsens metoder. Et antall 25 ulike klasser av Tet repressorer har blitt beskrevet, for eksempel A, B, C, D og E (der den Tn10-kodede repressor er en klasse B repressor). Aminosyresekvensene hos de ulike klasser av Tet repressorer deler en høy grad av homologi (dvs. 40-60% over proteinenes lengde), noe som også inkluderer regionen som inneholder de over beskrevne mutasjoner. Aminosyresekvensene til ulike klasser av Tet 30 repressorer blir vist og sammenlignet i Figur 4, og er også beskrevet i Tovar, K. et al., (1988) Mol. Gen. Genet. 215:76-80. Ifølge dette kan mutasjoner likeverdige til de som er beskrevet over for Tet repressoren avledet fra Tn10 bli produsert i andre klasser av Tet repressorer for å bli inkludert i et av oppfinnelsens fusjonsproteiner. For eksempel kan aminosyre på posisjon 95, som er en asparaginsyre i

alle fem repressorklassene, være mutert til asparagin i enhver klasse av repressor. På samme måte kan posisjon 102, som er glycin i alle fem repressorklassene, bli mutert til asparaginsyre i enhver repressorklasse. Ytterligere passende og likeverdige mutasjoner vil være klare til de som er kompetente i faget og kan bli skapt og testet for funksjonelle egenskaper ved hjelp av prosedyrer som blir beskrevet her. Nukleotid- og aminosyresekvenser i Tet repressorene fra klassene A, C, D og E blir vist i Waters, S.H., et al., (1983) Nucl. Acids Res. 11:6089-6105, Unger, B. et al., (1984) Gene 31:103-108, Unger, B. et al., (1984) Nucl. Acids Res. 12:7693-7703 og Tovar, K. et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 215:76-80, henholdsvis. Disse villtype-sekvenser kan være mutert ifølge oppfinnelsens informasjoner, til bruk i det induserbare regulatoriske system som blir beskrevet her.

Som alternativ til de over beskrevne mutasjoner kan ytterligere passende muterte Tet repressorer (dvs. som har de ønskede funksjonelle egenskaper beskrevet over) blir produsert ved hjelp av mutagenese av en villtype Tet repressor og seleksjon, som beskrevet i Eksempel 1. Nukleotid- og aminosyresekvensene til villtype klasse B Tet repressorer er vist i Hillen, W. and Schollmeier, K. (1983), Nucl. Acids Res. 11:525-539 og Postle, K. et al., (1984) Nucl. Acids Res. 12:4849-4863. Nukleotid- og aminosyresekvensene til villtype klasse A, C, D og E type repressorer er sitert over. En mutert Tet repressor kan bli produsert og utvalgt, for eksempel som følger: en nukleinsyre (f.eks. DNA) som koder for en villtype Tet repressor blir utsatt for tilfeldig mutagenese og de resulterende muterte nukleinsyrer blir inkorporert inn i en ekspresjonsvektor og introdusert inn i en vertscelle for å bli undersøkt. En utvelgende test blir benyttet som tillater seleksjon av en Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens kun i nærvær av tetracyklin. For eksempel kan et bibliotek av muterte nukleinsyrer i en ekspresjonsvektor bli introdusert inn i en *E. coli* type der tet-operatorsekvensene kontrollerer ekspresjon av et gen som koder for en Lac repressor, og der Lac repressoren kontrollerer ekspresjon av et gen som koder for en passende markør (f.eks. medikamentresistens). Binding av en Tet repressor til tet-operatorsekvensene i bakteriene vil hemme ekspresjon av Lac repressoren, og derved indusere ekspresjon av det utvalgte markørgenet. Celler som uttrykker markør-genet blir utvalgt basert på den utvalgte fenotype (dvs. medikament-resistens). I tilfelle av villtype Tet repressorer vil ekspresjon av det utvalgte markørgenet forekomme i

fravær av Tc. En nukleinsyre som koder for en mutert Tet repressor blir utvalgt ved hjelp av dette system, basert på evnen til nukleinsyren til å indusere ekspresjon av det utvalgte markørgen i bakteriene kun i nærvær av Tc.

Et første polypeptid fra transaktivator fusjonsproteinet (f.eks. den muterte Tet repressor) har egenskapen å binde spesifikt til en tet-operatorsekvens. Hver klasse av Tet repressor har en tilsvarende tet-operatorsekvens som mål. Således er begrepet "tet-operatorsekvens" ønsket å inkludere alle klasser av tet-operatorsekvenser, dvs. klasse A, B, C, D og E. Nukleotidsekvenser fra disse fire klasser av tet-operatorer blir vist i Figur 5 og SEKV ID NR:11-15, og er beskrevet i Waters, S.H. et al., (1983) sitert over, Hillen, W. and Schollenmeier, K. (1983) sitert over, Stüber, D. and Bujard, H. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:167-171, Unger, B. et al. (1984) sitert over og Tovar, K. et al. (1988) sitert over. I en foretrukket utførelse er den muterte Tet repressor en Tn10-kodet repressor (dvs. klasse B) og tet-operator-sekvensen er en klasse B tet-operatorsekvens. Alternativt kan en mutert klasse A Tet repressor bli benyttet med en klasse A tet-operatorsekvens, og så videre for de andre klasser av Tet repressorer/operatorer.

En annen tilnærming for å produsere en mutert Tet repressor som binder til en klasse A tet-operator er å videre mutere den allerede muterte Tn10-deriverte Tet repressor som beskrives her (en klasse B repressor) slik at den ikke lenger binder effektivt til en klasse B type operator, men i stedet for binder effektivt til en klasse A type operator. Det har blitt funnet at nukleotidposisjon 6 i klasse A eller B type operatorer er det kritiske nukleotid for gjenkjennelse av operatoren av dens komplementære repressor (posisjon 6 er et G/C-par i klasse B operatorer og et A/T-par i klasse A operatorer) (se Wissman et al., (1988) J. Mol. Biol. 202:397-406). Det har også blitt funnet at aminosyreposisjon i klasse A eller klasse B Tet repressor er den kritiske aminosyre med hensyn på evnen til å gjenkjenne posisjon 6 på operatoren (aminosyreposisjon 40 er et treonin i klasse B repressorer, men er et alanin i klasse A repressorer). Det har videre blitt funnet at substitusjon av treonin 40 i en klasse B repressor med alanin endrer dets bindingsspesifisitet slik at repressoren nå kan binde en klasse A operator (på samme måte endre substitusjon av alanin 40 i en klasse A repressor med treonin bindingsspesifisiteten slik at repressoren nå kan binde en klasse B operator) (se Altschmied et al., (1988) EMBO J. 7:4011-4017). Ifølge dette kan man endre bindingsspesifisiteten hos den muterte Tn10-deriverte Tet repressor som blir

beskrevet her ved å i tillegg endre aminosyrerest 40 fra treonin til alanin ved standard molekylærbiologiske teknikker (f.eks. seterettet mutagenese).

En mutert Tet repressor med spesifikke mutasjoner (f.eks. i posisjoner 71, 95, 101 og/eller 102 som beskrevet over) kan bli produsert ved å introdusere
5 nukleotid-ændringer i en nukleinsyre som koder for en villtype repressor ved standard molekylærbiologiske teknikker, f. eks. seterettet mutagenese eller PCR-mediert mutagenese, under bruk av oligonukleotid "primers" som inkorporerer nukleotid-mutasjonene. Som alternativ, når en mutert Tet repressor blir identifisert ved utvelging fra et bibliotek, kan den muterte nukleinsyre bli hentet frem fra
10 biblioteks-vektoren. For å produsere et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen blir så en nukleinsyre som koder for en mutert Tet repressor, deretter bundet i leserammen til en annen nukleinsyre som koder for et transkripsjonelt aktiveringsdomene, og fusjonskonstruktet blir inkorporert inn i en rekombinant ekspresjonsvektor. Transaktivator fusjonsproteinet kan bli uttrykket ved å
15 introdusere den rekombinante ekspresjonsvektor inn i en vertscelle eller et dyr.

B. Det andre polypeptid i transaktivator fusjonsproteinet

Det første polypeptid i transaktivator fusjonsproteinet er operasjonelt koblet til et annet polypeptid som direkte eller indirekte aktiverer transkripsjon i eukaryote
20 celler. For å knytte operasjonelt det første og andre polypeptid sammen, blir vanligvis nukleotidsekvenser som koder for det første og andre polypeptid knyttet til hverandre innen leserammen slik at man produserer et kimært gen som koder for et fusjonsprotein, selv om det første og andre polypeptid kan bli operasjonelt koblet ved andre metoder som bevarer funksjonen til hvert polypeptid (f.eks.
25 kjemisk krysskoblet). I en foretrukket utførelse har det andre polypeptid i transaktivatoren selv transkripsjonell aktiveringsaktivitet (dvs. det andre polypeptid kan direkte aktivere transkripsjon). I en annen utførelse aktiverer det andre polypeptid transkripsjon ved en indirekte mekanisme, gjennom å rekruttere et transkripsjonelt aktiveringsprotein for å interagere med fusjonsproteinet. Ifølge
30 dette er begrepet "et polypeptid som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler" som brukt her, ønsket å inkludere polypeptider som enten direkte eller indirekte aktiverer transkripsjon.

Polypeptider som kan funksjonere slik at de aktiverer transkripsjon i eukaryote celler er vel kjent i fagområdet. Spesifikt har transkripsjonelle

aktiveringsdomener hos mange DNA-bindende proteiner blitt beskrevet og har blitt vist å bevare deres aktiveringsfunksjon når domenet blir overført til et heterologt protein. Et foretrukket polypeptid som kan brukes i oppfinnelsens fusjonsprotein, er herpes simplex-virus virion proteinet 16 (her henvist til som VP16, hvis

5 aminosyresekvens er offentliggjort i Triezenberg, S.J. et al. (1988) Genes Dev. 2:718-729). I en utførelse benyttes ca. 127 av de C-terminale aminosyrene til VP16. For eksempel kan et polypeptid som har en aminosyresekvens som er vist i SEKV ID NR:2 (posisjoner 208-335) bli benyttet som det andre polypeptid i fusjonsproteinet. I en annen utførelse blir minst én kopi av ca. 11 aminosyrer fra

10 den C-terminale region i VP16, som bevarer transkripsjonell aktiveringsevne, benyttet som det andre polypeptid. Fortrinnsvis brukes en dimer av denne region (dvs. ca. 22 aminosyrer). Passende C-terminale peptiddeler av VP16 er beskrevet i Seipel, K. et al., (EMBO J. (1992) 13:4961-4968). For eksempel kan en dimer av et peptid som har en aminosyresekvens som er vist i SEKV ID NR:4 (kodet for av

15 en nukleotidsekvens som er vist i SEKV ID NR:3) bli benyttet som det andre polypeptid i fusjonsproteinet.

Andre polypeptider med transkripsjonell aktiveringsevne i eukaryote celler kan bli benyttet i oppfinnelsens fusjonsprotein. Transkripsjonelle aktiveringsdomener som finnes i ulike proteiner har blitt gruppert i kategorier som er basert

20 på lignende strukturelle egenskaper. Transkripsjonelle aktiveringsdomene-typer inkluderer sure transkripsjons aktiveringsdomener, prolinrike transkripsjons aktiveringsdomener, serin/treoninrike transkripsjons aktiveringsdomener og glutaminrike transkripsjons aktiveringsdomener. Eksempler på sure transkripsjons aktiveringsdomener inkluderer regionene i VP16 allerede beskrevet og

25 aminosyrerester 753-881 i GAL4. Eksempler på prolinrike aktiveringsdomener inkluderer aminosyrerester 399-499 i CTF/NF1 og aminosyrerester 31-76 i AP2. Eksempler på serin/treoninrike transkripsjons aktiveringsdomener inkluderer aminosyrerester 1-427 i ITF1 og aminosyrerester 2-451 i ITF2. Eksempler på glutaminrike aktiveringsdomener inkluderer aminosyrerester 175-269 i Oct1 og

30 aminosyrerester 132-243 i Sp1. Aminosyresekvensene i hver av de over beskrevne regioner, og av andre hensiktsmessige transkripsjonelle aktiveringsdomener er vist i Seipel, K. et al., (EMBO J. (1992) 13:4961-4968).

I tillegg til tidligere beskrevne transkripsjonelle aktiveringsdomener er nye transkripsjonelle aktiveringsdomener som kan bli identifisert med standard

teknikker, innen oppfinnelsens område. Et polypeptids transkripsjonelle aktiveringsevne kan bli estimert ved å koble polypeptidet til et annet polypeptid som har DNA-bindingsevne og deretter å bestemme mengden av transkripsjon av en målsekvens som blir stimulert av fusjonsproteinet. For eksempel vil en

5 standardtest som benyttes i faget, bruke et fusjonsprotein av et mulig transkripsjonelt aktiveringsdomene og et GAL4 DNA-bindingsdomene (f.eks. aminosyrerester 1-93). Dette fusjonsprotein brukes så for å stimulere ekspresjon av et reporter-gen som er knyttet til GAL4-bindingsseter (se f.eks. Seipel, K. et al. (1992) EMBO J. 11:4961-4968 og referanser som siteres der).

10 I en annen utførelse vil det andre polypeptid i fusjonsproteinet indirekte aktivere transkripsjon ved å rekruttere en transkripsjonell aktivator slik at den siste interagerer med fusjonsproteinet. For eksempel kan en mutert tetR fra oppfinnelsen bli fusjonert til et polypeptid-domene (f.eks. et dimeriseringsdomene) som har evne til å mediere en protein-protein-interaksjon med et transkripsjonelt

15 aktivatorprotein, som for eksempel en endogen aktivator som er tilstede i en vertscelle. Det har blitt vist at funksjonelle assosiasjoner mellom DNA-bindingsdomener og transaktiveringsdomener ikke behøver å være kovalente (se f.eks. Fields and Song (1989) Nature 340:245-247; Chien et al (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582; Gyuris et al., (1993) Cell 75:791-803; og Zervos, A.S. (1993) Cell 72:223-232). Således behøver fusjonsproteinets andre polypeptid ikke

20 direkte aktivere transkripsjon, men heller danne en stabil interaksjon med et endogent polypeptid som har et kompatibelt protein-protein-interaksjonsdomene og transaktivasjonsdomene. Eksempler på passende interaksjon- (eller dimerisering) domener inkluderer leucin glidelåser (Landschulz et al. (1989) Science 243:1681-1688), helix-sløyfe-helix-domener (Murre, C. et al. (1989) Cell 58:537-544) og zinkfingerdomener (Frankel, A.D. et al. (1988) Science 240:70-73). Interaksjon mellom et dimeriseringsdomene som er tilstede i fusjonsproteinet med en endogen nukleær faktor resulterer i rekruttering av transaktivasjonsdomenet til den nukleære faktor til fusjonsproteinet og derved til en tet-operatorsekvens som

30 har fusjonsproteinet bundet.

C. Et tredje polypeptid i transaktivator fusjonsproteinet

I tillegg til en mutert Tet repressor og et transkripsjonelt aktiveringsdomene kan et fusjonsprotein fra oppfinnelsen inneholde et operasjonelt koblet tredje

polypeptid som fremmer transport av fusjonsproteinet til en cellekjerne. Aminosyresekvenser som når de inkluderes i et protein fremmer transport av proteinet til cellekjernen, er kjent i faget og kalles nukleære lokalisasjonssignaler (NLS).

Nukleære lokalisasjonssignaler er vanligvis sammensatt av en av rekke basiske aminosyrer. Når disse knyttes til et heterologt protein (f.eks. et fusjonsprotein fra oppfinnelsen) fremmer nukleære lokalisasjonssignaler transport av proteinene til en cellekjerne. Det nukleære lokalisasjonssignal blir knyttet til et heterologt protein slik at det blir eksponert på proteinets overflate og slik at det ikke interfererer med proteinets funksjon. Fortrinnsvis blir NLS knyttet til én ende av proteinet, for eksempel N-terminalen. Aminosyresekvensen til et ikke-begrensende eksempel av et NLS som kan bli inkludert i et fusjonsprotein fra oppfinnelsen blir vist i SEKV ID NR:5. Fortrinnsvis blir en nukleinsyre som koder for det nukleære lokalisasjonssignal spleiset ved hjelp av standard rekombinante DNA teknikker i leserammen til nukleinsyren som koder for fusjonsproteinet (f.eks. ved 5'-enden).

Plasmidet pUHD17-1 (beskrevet i større detalj i Eksempel 1), som omfatter en transaktivator fra oppfinnelsen med nukleotidsekvensen som er vist i SEKV ID NR:1, har blitt deponert på 8. juli, 1994 under betingelsene til Budapest-avtalen ved Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Tyskland, og blitt gitt nummer DSM 9279.

II. Ekspresjon av et transaktivator fusjonsprotein

A. Ekspresjonsvektorer

En nukleinsyre fra oppfinnelsen som koder for et transaktivator fusjonsprotein, som beskrevet over, kan bli inkorporert i en rekombinant ekspresjonsvektor i en form som passer for ekspresjon av fusjonsproteinet i en vertscelle. Begrepet "i en form som passer for ekspresjon av fusjonsproteinet i en vertscelle" ønskes å bety at den rekombinante ekspresjonsvektor inkluderer én eller flere regulatoriske sekvenser som er operasjonelt koblet til nukleinsyren som koder for fusjonsproteinet på en måte som tillater transkripsjon av nukleinsyren til mRNA og translasjon av dette mRNA til fusjonsproteinet. Begrepet "regulatorisk sekvens" er kjent i faget og ønskes å inkludere promotere, forsterkere og andre ekspresjonskontrollelementer (f.eks. polyadenyleringssignaler). Slike regulatoriske sekvenser er kjent til de som er trenet i faget og er beskrevet i Goeddel, Gene Expression

Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Det må forstås at ekspresjonsvektorens plan kan avhenge av slike faktorer som valg av vertscelle som skal transfekteres og/eller mengde av fusjonsprotein som skal uttrykkes.

5 Ved bruk i pattedyrceller vil ofte en rekombinant ekspresjonsvektors kontrollfunksjoner frembringes ved hjelp av virus genetisk materiale. For eksempel er vanlige benyttede promotorer avledet fra polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus og Simian virus 40. Bruk av virus regulatoriske elementer for å dirigere ekspresjon av fusjonsproteinet kan tillate høyt nivå av konstitutiv
10 ekspresjon av fusjonsproteinet i en rekke ulike vertsceller. I en foretrukket rekombinant ekspresjonsvektor blir sekvensene som koder for fusjonsproteinet, omgitt oppstrøms (dvs., 5') av den humane cytomegalovirus IE promoter, og nedstrøms (dvs., 3') av et SV40 poly(A)-signal. For eksempel kan en ekspresjonsvektor som er lik den som er beskrevet i Eksempel 1 bli benyttet. Den
15 humane cytomegalovirus IE promotoren er beskrevet i Boshart et al. (1985) Cell 41:521-530. Andre allesteds nærværende uttrykkende promotorer som kan bli benyttet inkluderer HSV-Tk promotoren (beskrevet i McKnight et al. (1984) Cell 37:253-262) og β -actin promotere (f.eks. den humane β -actin promoter som beskrevet av Ng et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:2720-2732).

20 Som alternativ kan de regulatoriske sekvenser i den rekombinante ekspresjonsvektor dirigere ekspresjon av fusjonsproteinet hovedsakelig i en spesiell celletype, dvs. vevsspesifikke regulatoriske elementer kan bli benyttet. Ikke-begrensede eksempler på vevsspesifikke promotorer som kan bli benyttet inkluderer albuminpromoter (leverspesifikk, Pinkert et al. (1987) Genes Dev.
25 1:268-277), lymfoid-spesifikke promotorer (Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), spesielt promotorer av T-celle-reseptorer (Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) og immunoglobuliner (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748), neuron-spesifikke promotere (f.eks. neurofilament promotoren, Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl.
30 Acad. Sci. USA 86:5473-5477), pankreas-spesifikke promotorer (Edlund et al. (1985) Science 230:912-916) og brystkjertel-spesifikke promotorer (f.eks. melke-myse promotor, U.S. Patent nr. 4,873,316 og European Application Publication No. 264,166). Utviklingsregulerte promotorer omfattes også, for eksempel hox-

promotorer fra mus (Kessl and Gruss (1990) Science 249:374-379) og α -fetoprotein promotoren (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Som alternativ kan en selvregulerende konstruksjon som koder for et transaktivator fusjonsprotein bli produsert. For å oppnå dette blir nukleinsyre som koder for fusjonsproteinet operativt koblet til en minimal promotersekvens og minst én tet-operatorsekvens. For eksempel kan nukleinsyren vist i SEKV ID NR:1 bli koblet til en promoter som har en nukleotidsekvens vist i SEKV ID NR:8, 9 eller 10 (nukleinsyrene i SEKV ID NR:8 og 9 omfatter en minimal CMV promoter og ti tet-operatorer, nukleinsyrene i SEKV ID NR:10 omfatter en TK promoter og ti tet-operatorer). Et skjematisk diagram som viser slik en selvregulerende konstruksjon vises i Figur 9B. Når denne nukleinsyre blir introdusert inn i en celle (f.eks. i en rekombinant ekspresjonsvektor) vil trolig et lavt nivå av basal transkripsjon av transaktivator-genet forekomme på grunn av "lekkasje". I nærvær av Tc (eller en analog) vil denne lave mengde av transaktivator fusjonsproteinet binde til tet-operatorsekvens (sekvensene) oppstrøms for nukleotidsekvensen som koder for transaktivatoren og stimulere ytterligere transkripsjon av nukleotidsekvensen som koder for transaktivatoren, noe som derved fører til videre produksjon av transaktivator fusjonsproteinet i cellen. Det vil forstås av de som er trenet i faget at slik selvregulerende promoter også kan bli brukt sammen med andre tetracyklin-regulerte transaktivatorer, slik som villtype Tet repressor fusjonsproteinet (tTA) som er beskrevet i Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, som binder til tet-operatorene i fravær av Tc (som illustrert i Figur 9A). Når brukt sammen med denne transaktivator, blir selv-regulert transkripsjon av nukleotidsekvensen som koder for denne transaktivator stimulert i fravær av Tc.

Plasmidet pUHD15-3, som omfatter nukleotidsekvenser som koder for tTA beskrevet i Gossen og Bujard (1992), sitert over, operativt koblet til en selv-regulerende promoter, har blitt deponert på 8. juli, 1994, ifølge reglene av Budapest-avtalen i Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Tyskland og gitt deponeringsnummer DSMZ 9280.

I en utførelse er den rekombinante ekspresjonsvektor fra oppfinnelsen et plasmid, slik som det som er beskrevet i Eksempel 1. Som alternativ kan en av oppfinnelsens rekombinante ekspresjonsvektorer være et virus eller en del av et virus, noe som tillater ekspresjon av en nukleinsyre som er introdusert inn i virusets nukleinsyre. For eksempel kan replikasjonsdefektive retrovirus, adeno-

virus og adeno-assosierte virus, bli benyttet. Protokoller for å produsere rekombinante retrovirus og for å infisere celler *in vitro* eller *in vivo* med slike virus kan finnes i Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), seksjoner 9.10-9.14 samt andre standard laboratoriemanualer. Eksempler på passende retrovirus inkluderer pLJ, pZIP, pWE og pEM, som er vel kjent for de som er trent i faget. Eksempler på passende innpakkingsvirus linjer inkluderer ψ Crip, ψ Cre, ψ 2 og ψ Am. Genomet til et adenovirus kan bli manipulert slik at det koder og uttrykker et transaktivator fusjonsprotein, men er inaktivert i relasjon til dets evne til å replikere i en normal lytisk virus livscyklus. Se for eksempel Berkner et al. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434, og Rosenfeld et al. (1992) Cell 68:143-155. Passende adenovirus-vektorer som er derivert fra adenovirus type Ad type 5 dl1324 eller andre varianter av adenovirus (f.eks. Ad2, Ad3, Ad7, etc.) er vel kjent til de som er trent i faget. Som alternativ kan en adeno-assosiert virusvektor slik som den beskrevet i Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260, bli benyttet for å uttrykke et transaktivator fusjonsprotein.

B. Vertsceller

Et fusjonsprotein fra oppfinnelsen blir uttrykt i en eukaryotisk celle ved å introdusere nukleinsyre som koder for fusjonsproteinet i en vertscelle, der nukleinsyren er i en form som er passende for ekspresjon av fusjonsproteinet i vertscellen. For eksempel blir en rekombinant ekspresjonsvektor fra oppfinnelsen som koder for fusjonsproteinet introdusert i en vertscelle. Som alternativ kan nukleinsyre som koder for fusjonsproteinet som er operativt koblet til regulatoriske sekvenser (f.eks. promotersekvenser) men uten ytterligere vektorsekvenser, bli introdusert i en vertscelle. Som brukt her ønskes begrepet "vertscelle" å inkludere enhver eukaryotisk celle eller cellelinje så lenge som cellen eller cellelinjen ikke er inkompatibelt med proteinet som skal uttrykkes, seleksjonssystemet som velges eller dyrkningssystemet som blir benyttet. Ikke-begrensede eksempler på pattedyr cellelinjer som kan bli brukt inkluderer CHO dhfr⁻ celler (Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220), 293 celler (Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36:pp. 59) eller myeloma-celler som SP2 eller NSO (Galfre and Milstein (1981) Meth. Enzymol. 73(B):3-46).

I tillegg til cellelinjer er oppfinnelsen appliserbar til normale celler slik som celler som skal modifiseres med henblikk på gen-terapiformål eller embryonale celler som er modifisert for å skape et transgent eller homologt rekombinant dyr. Eksempler på celletyper av spesiell interesse for gen-terapiformål inkluderer

5 hematopoietiske stamceller, myoblaster, hepatocytter, lymfocytter, neuronale celler og hudepitel og luftveisepitel. I tillegg kan for transgene eller homologt rekombinante dyr, embryonale stamceller og befruktete eggceller bli modifisert så de inneholder nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein. Videre kan planteceller bli modifisert for å skape transgene planter.

10 Oppfinnelsen kan brukes til en rekke formål og omfatter eukaryote celler utenom pattedyrceller, inkluderende insekt (f.eks. *Sp. frugiperda*), gjærceller (f.eks. *S. cerevisiae*), *S. pombe*, *P. pastoris*, *K. lactis*, *H. polymorpha*, som generelt beskrevet av Fleer, R. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3(5):486-496)), soppceller og planteceller. Eksempler på vektorer som kan brukes til

15 ekspresjon i gjær *S. cerevisiae* inkluderer pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123) og pYES2 (InVitrogen Corporation, San Diego, CA). Fusjonsproteinet kan bli uttrykt i insektceller ved bruk av baculovirus ekspresjonsvektorer (f.eks. som beskrevet i O'Reilly et al. (1992) Baculovirus

20 Expression Vectors: A Laboratory Manual, Stockton Press). Baculovirusvektorer som er tilgjengelig for ekspresjon av proteiner dyrket i insektceller (f.eks. SF9 celler) inkluderer pAc-serien (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) og pVL-serien (Lucklow, V.A. and Summers, M.D., (1989) Virology 170:31-39).

25 C. Introduksjon av nukleinsyre i en vertscelle

Nukleinsyre som koder for fusjonsproteinet kan bli introdusert i en vertscelle ved hjelp av standard teknikker for å transfektere eukaryote celler. Begrepet "transfekte" eller "transfeksjon" ønskes å omfatte alle vanlige teknikker for å introdusere nukleinsyre i vertsceller, noe som inkluderer kalsiumfosfat-

30 kopresipitering, DEAE-dekstran-mediert transfeksjon, lipofeksjon, elektroporering og mikroinjeksjon. Passende metoder for å transfekte vertsceller kan finnes i Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.utg. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) og andre laboratorie-lærebøker.

Antall vertsceller transformert med nukleinsyre fra oppfinnelsen vil avhenge i hvert fall delvis, av typen rekombinant ekspresjonsvektor som benyttes og typen av transfeksjonsteknikk som benyttes. Nukleinsyre kan introduseres i en vertscelle forbigående eller, mer vanlig, når langstidsregulering av genekspresjon ønskes blir

5 nukleinsyren integrert stabilt i vetscellens genom eller forblir som et stabilt episom i vertscellen. Plasmidvektorer introdusert i pattedyrceller blir vanligvis integrert i vertscellens DNA forholdsvis sjelden. For å identifisere disse integrerte vektorer blir et gen som inneholder en selekterbar markør (f.eks. medikamentresistens) vanligvis introdusert i vertscellen sammen med nukleinsyren av interesse.

10 Foretrukne utvalgte markører inkluderer de som gir resistens mot visse typer medikamenter, slik som G418 og hygromycin. Selekterbare markører kan enten introduseres på en separat plasmid eller på den samme plasmid som nukleinsyren av interesse. Vertsceller som er transfektert med en av oppfinnelsens nukleinsyrer (f.eks. en rekombinant ekspresjonsvektor) og gen for en selekterbar markør, kan

15 identifiseres ved at man selekterer for celler ved hjelp av den selekterbare markør. For eksempel dersom den selekterbare markør koder for et gen som gir resistens mot neomycin kan vertsceller som har tatt opp nukleinsyre blir utvalgt ved hjelp av G418. Celler som har inkorporert det selekterbare markørgen vil overleve, mens de andre cellene dør.

20 En vertscelle transfektert med en nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein fra oppfinnelsen kan videre bli transfektert med én eller flere nukleinsyrer som fungerer som mål for fusjonsproteinet. Målnukleinsyren omfatter en nukleotidsekvens som skal transkriberes som er operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens (beskrevet i større detalj i Seksjon III, nedenfor).

25 Nukleinsyre som koder for oppfinnelsens fusjonsprotein kan bli introdusert i eukaryote celler som vokser i kultur *in vitro* ved hjelp av konvensjonelle transfeksjonsteknikker (f.eks. kalsiumfosfat-presipitering, DEAE-dekstran-transfeksjon, elektroporering, etc.). Nukleinsyre kan også bli overført til celler *in vivo*, for eksempel ved applikasjon av en overføringsmekanisme som er passende

30 for å introdusere nukleinsyre i celler *in vivo*, slik som retrovirus-vektorer (se f.eks. Ferry, N. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381), og Kay, M.A. et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647), adenovirusvektorer (se f.eks. Rosenfeld, M.A. (1992) Cell 68:143-155; og Herz, J. and Gerard, R.D. (1993) Proc. Natl.- Acad. Sci. USA 90:2812-2816), reseptor-mediert DNA-opptak (se

f.eks. Wu, G. og Wu, C.H. (1988) J. Biol. Chem. 263:14621; Wilson et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:963-967 og US-patent No. 5,166,320), direkte injeksjon av DNA (se f.eks. Acsadi et al. (1991) Nature 332:815-818, og Wolff et al. (1990) Science 247:1465-1468) eller partikkel-bombardering (se f.eks. Cheng, L. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4455-4459, og Zelenin, A.V. et al. (1993) FEBS Letters 315:29-32). For gen-terapiformål kan således celler bli modifisert *in vitro* og tilført et individ, eller som alternativ, celler kan direkte modifiseres *in vivo*.

III. Mål-transkripsjon-enheter regulert av en tetracyklin-induserbar

transaktivator

Et fusjonsprotein fra oppfinnelsen blir benyttet for å regulere transkripsjon av en mål-nukleotidsekvens. Denne mål-nukleotidsekvens blir operativt koblet til en regulatorisk sekvens som binder fusjonsproteinet. Mere spesifikt regulerer fusjonsproteinet ekspresjon av en nukleotidsekvens operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens. Således relaterer et annet aspekt av oppfinnelsen til mål-nukleinsyrer (dvs. DNA-molekyler) som omfatter en nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens. Slike nukleinsyrer blir også referert til her som tet-regulerte transkripsjonsenheter (eller ganske enkelt transkripsjonsenheter).

Innen en transkripsjonsenhet inkluderer vanligvis "nukleotidsekvensen skal transkriberes" en minimal promotersekvens som ikke selv er transkribert, men som fungerer (i det minste delvis) for å plassere transkripsjonsmaskineriet for transkripsjon. Den minimale promotersekvens er koblet til den transkriberte sekvens i en 5' til 3' retning ved hjelp av fosfodiester-bindinger (dvs. promoteren er lokalisert oppstrøms fra den transkriberte sekvens) for å danne en kontinuerlig nukleotidsekvens. Således er som benyttet her begrepene "nukleotidsekvens som skal transkriberes" eller "mål-nukleotidsekvens" ønsket å inkludere både nukleotidsekvensen som er transkribert til mRNA og en operativt koblet oppstrøms minimal promotersekvens. Begrepet "minimal promoter" ønskes å beskrive en partiell promotersekvens som definerer startsetet for transkripsjon for den koblede sekvens som skal transkriberes, men som i seg selv ikke har evne til å påbegynne transkripsjon effektivt, hvis i det hele tatt. Således er aktiviteten av en slik minimal promoter avhengig av binding av en transkripsjonell aktivator (slik som det tetracyklin-induserbare fusjonsprotein i oppfinnelsen) til en operativt koblet

regulatorisk sekvens (slik som én eller flere tet-operatorsekvenser). I en utførelse er den minimale promoter fra det humane cytomegalovirus (som beskrevet i Boshart et al., (1985) Cell 41:521-530). Fortrinnsvis er nukleotidposisjonene mellom ca. +75 til -53 og +75 til -31 benyttet. Andre passende minimale promotere er kjent i faget eller kan bli identifisert ved hjelp av standardteknikker. For eksempel kan en funksjonell promoter som aktiverer transkripsjon av et kontinuerlig koblet reportergen (f.eks. kloramfenikol-acetyltransferase, β -galaktosidase eller luciferase) bli progressivt forkortet til den ikke lenger aktiverer ekspresjon av reportergen alene, men behøver tilstedeværelse av en eller flere ytterligere regulatoriske sekvenser.

Innen en transkripsjonsenhet er mål-nukleotidsekvensen (inkluderende den transkriberte nukleotidsekvens og dens oppstrøms minimale promotersekvens) operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens. I en typisk konfigurasjon er tet-operatorsekvens, eller sekvensene, operativt koblet oppstrøms (dvs. 5') fra den minimale promotersekvens gjennom en fosfodiester-binding i en passende avstand for å tillate transkripsjon av mål-nukleotidsekvensen etter binding av et regulatorisk protein (f.eks. transaktivator fusjonsproteinet) til tet-operatorsekvensen. Det betyr at transkripsjonsenheten omfattes av, i en 5' til 3' retning: tet-operatorsekvens, eller sekvenser, - en minimal promoter - en transkribert nukleotidsekvens. Det vil forstås av de som er trenet i faget at det er en viss fleksibilitet i den distanse som kan tillates mellom tet-operatorsekvens, eller sekvenser, og den minimale promoter, selv om det vanligvis vil være slik at tet-operatorsekvensene vil være lokalisert innen ca. 200-400 basepar oppstrøms fra den minimale promoter.

Nukleotidsekvensene fra eksempel på tet-regulerte promotorer, som inneholder tet-operatorsekvenser koblet til en minimal promoter, som kan brukes i oppfinnelsen blir vist i SEKV ID NR:8-10. Nukleotidsekvensene til SEKV ID NR:8 og 9 omfatter en cytomegalovirus minimal promoter koblet til ti tet-operatorsekvenser, de to nukleotidsekvenser adskiller seg i distansen mellom operatorene og det første transkriberte nukleotid. Nukleotidsekvensen i SEKV ID NR:10 omfatter en herpes simplex-virus minimal tk promoter koblet til ti tet-operatorsekvenser. Promoteren i SEKV ID NR:8 korresponderer til P_{hCMV}^*-1 , beskrevet i Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-

5551. Promoteren i SEKV ID NR:9 korresponderer til P_{hCMV}^*-2 , også beskrevet i Gossen, M. og Bujard, H., sitert over.

Alternativt siden man i faget har observert at regulatoriske elementer kan funksjonere nedstrøms fra sekvenser som skal transkriberes, er det sannsynlig at
5 tet-operatorsekvens, eller sekvenser, kan bli operativt koblet nedstrøms (dvs. 3') fra den transkriberte nukleotidsekvens. I denne konfigurasjon omfattes transkripsjonsenheten således av i en 5' til 3' retning: en minimal promoter - en transkribert nukleotidsekvens - tet-operatorsekvens, eller sekvenser. Det vil igjen bli forstått at det trolig vil være en viss fleksibilitet i den tillatte distanse nedstrøms
10 hvor tet-operatorsekvens, eller sekvenser, kan bli koblet.

Begrepet "tet-operatorsekvens" er ønsket å omfatte alle klasser av tet-operatorer (f.eks. A, B, C, D og E). En nukleotidsekvens som skal transkriberes kan være operativt koblet til en enkel tet-operatorsekvens, eller for økede regulatoriske muligheter, kan den bli operativt koblet til multiple tet-operator-
15 sekvenser (f.eks. to, tre, fire, fem, seks, syv, åtte, ni, ti eller flere operatorsekvenser). I en foretrukket utførelse blir sekvensen som skal transkriberes operativt koblet til syv tet-operatorsekvenser.

En tet-regulert transkripsjonsenhet kan videre bli inkorporert i en rekombinant vektor (f.eks. et plasmid eller en virusvektor) ved hjelp av standard
20 rekombinante DNA-teknikker. Transkripsjonsenheten eller den rekombinante vektor der den er inneholdt, kan bli introdusert i en vertscelle ved standard transfeksjonsteknikker slik som de beskrevet over. Det vil bli forstått at etter introduksjon av transkripsjonsenheten i en populasjon av vertsceller kan det bli nødvendig å velge ut en vertscelle-klon som viser en lav basal ekspresjon av tet-
25 operator-koblet nukleotidsekvens (dvs. seleksjon for en vertscelle der transkripsjonsenheten har integrert på et sete som gir lav basal ekspresjon av den tet-operator-koblede nukleotidsekvens). Videre kan en tet-regulert transkripsjonsenhet bli introdusert ved hjelp av prosedyrer som er beskrevet over, inn i genomet til et ikke-humant dyr under fosterstadiet eller inn i planteceller for å produsere
30 transgene eller homologt rekombinante organismer som bærer transkripsjonsenheten i noen eller alle celler. Det vil igjen oppfattes at det kan bli nødvendig å selekttere en transgen eller homolog organisme der det er en lav basal ekspresjon av tet-operator-koblet nukleotidsekvens i celler av interesse.

I en utførelse koder målnukleotidsekvensen til den tet-regulerte transkripsjonsenhet et protein av interesse. Således vil etter induksjon av transkripsjon av nukleotidsekvensen ved hjelp av transaktivatoren fra oppfinnelsen og translasjon av det resulterende mRNA, proteinet av interesse bli produsert i en
5 vertscelle eller et dyr. Som alternativ kan nukleotidsekvensen som skal transkriberes kode for et aktivt RNA-molekyl, for eksempel et antisense RNA-molekyl eller et ribozym. Ekspresjon av aktive RNA-molekyler i en vertscelle eller et dyr, kan bli benyttet for å regulere funksjoner i verten (f.eks. hindre produksjon av et protein av interesse ved å hemme translasjon av mRNA som koder for
10 proteinet).

En transaktivator fra oppfinnelsen kan bli benyttet for å regulere transkripsjon av en eksogen nukleotidsekvens som er introdusert i vertscellen eller dyret. En "eksogen" nukleotidsekvens er en nukleotidsekvens som er introdusert i vertscellen og vanligvis er innført i vertens genom. Den eksogene nukleotid-
15 sekvens behøver ikke være tilstede andre steder i vertens genom (dvs. en fremmed nukleotidsekvens) eller kan være en tilleggskopi av en sekvens som er tilstede i vertens genom, men som er integrert på et annet sted i genomet. En eksogen nukleotidsekvens som skal transkriberes og en operativt koblet tet-operatorsekvens eller sekvenser, kan inneholdes innen et enkelt nukleinsyre-
20 molekyl som blir introdusert i vertscellen eller dyret.

Som alternativ kan en transaktivator fra oppfinnelsen bli benyttet for å regulere transkripsjon av en endogen nukleotidsekvens som har fått tilkoblet en tet-operatorsekvens, eller sekvenser. En "endogen" nukleotidsekvens er en nukleotid-sekvens som er tilstede innen vertens genom. Et endogent gen kan
25 være operativt koblet til en tet-operatorsekvens, eller sekvenser, ved homolog rekombinasjon mellom en tetO-inneholdende rekombinasjonsvektor og sekvenser fra det endogene gen. For eksempel kan en homolog rekombinasjonsvektor bli preparert som inkluderer minst én tet-operatorsekvens og en minimal promoter-sekvens omgitt ved dets 3' ende av sekvenser som representerer den kodende
30 region av det endogene gen, og omgitt ved dets 5' ende av sekvenser fra oppstrømsregionen av det endogene gen, ved å ekskludere den virkelige promoter-region av det endogene gen. De omgivende sekvenser er tilstrekkelig lange slik at vellykket homolog rekombinasjon av vektor DNA med det endogene gen, kan forekomme. Fortrinnsvis blir flere kilobaser med omgivende DNA

inkludert i den homologe rekombinasjonsvektor. Ved homolog rekombinasjon mellom vektor DNA og det endogene gen i en vertscelle blir en region av den endogene promoter byttet ut med vektor DNA som inneholder én eller flere av tet-operatorsekvenser operativt koblet til en minimal promoter. Således er ekspresjon av det endogene gen ikke lenger under kontroll av den endogene promoter, men snarere plassert under kontroll av tet-operatorsekvens, eller sekvenser, og den minimale promoter.

I en annen versjon kan tet-operatorsekvenser bli ført inn på et annet sted innen et endogent gen, fortrinnsvis innen en 5' eller 3' regulatorisk region, via homolog rekombinering for å skape et endogent gen hvis ekspresjon kan bli regulert av et tetracyklin-regulert fusjonsprotein som er beskrevet her. For eksempel kan én eller flere tetO-sekvenser bli innført i en promoter eller forsterker-region av et endogent gen slik at promoteren eller forsterker-funksjonen blir vedlikeholdt (dvs. tetO-sekvensene blir introdusert i et sete på promoter/forsterker-regionen som ikke er kritisk for promoter/forsterker-funksjonen). Regioner innen promotere eller forsterkere som kan bli endret uten tap av promoter/forsterker-funksjonen er kjent i faget å være tilstede i mange gener, eller kan bli bestemt ved hjelp av standard-teknikker for å analysere kritiske regulatoriske regioner. Et endogent gen som har tetO-sekvenser innført i en ikke-kritisk regulatorisk region, vil bevare evnen til å bli uttrykket i dets normale konstitutive og/eller vevsspesifikke mønster, men kan i tillegg bli nedregulert av et tetracyklin-kontrollert transkripsjonelt inhibitorprotein på en kontrollert måte. For eksempel kan konstitutiv ekspresjon av et slikt modifisert endogent gen bli hemmet av at man i nærvær av tetracyklin (eller analog) bruker et inhibitor fusjonsprotein som binder til tetO-sekvenser i nærvær av tetracyklin (eller analog) (som videre beskrevet i detalj i Seksjon IV og Seksjon VI, del B, se under).

A. Regulering av ekspresjon av tet-operator-koblet nukleotidsekvenser

Ekspresjon av tet-operator-koblet nukleotidsekvenser er regulert av et trans-aktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen. Fusjonsproteinet og målnukleinsyren er således begge tilstede i en vertscelle eller organisme. Tilstedeværelsen av både transaktivator fusjonsproteinet og måltranskripsjonsenheten i den samme vertscelle eller organisme kan oppnås på én av flere måter. For eksempel kan en vertscelle bli transfektert med en nukleinsyre fra ekspresjonssystemet (dvs. som

koder for transaktivator fusjonsproteinet), stabile transfekterte celler kan bli utvalgt og deretter kan de transfekterte celler bli retransfektet (også referert til som "supertransfektet") med nukleinsyre som korresponderer til den andre nukleinsyren fra ekspresjonssystemet (dvs. målnukleinsyren som skal bli transkribert). To
 5 ulike selekterbare markører kan bli benyttet for seleksjon, for eksempel opptak av den første nukleinsyre kan bli selektert med G418 og opptak av den andre nukleinsyre kan bli selektert med hygromycin. Som alternativ kan en enkel cellepopulasjon bli transfektet med nukleinsyre som korresponderer til begge komponenter fra systemet. Således gir oppfinnelsen en nukleinsyresammen-
 10 setning som omfatter:

- en første nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, fusjonsproteinet omfattende et første polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog
 15 operativt koblet til et annet polypeptid som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler, og
- en annen nukleinsyre som omfatter en nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens.

20 I én versjon er de to nukleinsyrer to separate molekyler (dvs. to ulike vektorer). I dette tilfelle er en vertscelle kotransfektet med de to nukleinsyremolekyler eller transfektet etter hverandre først med én nukleinsyre og deretter det andre nukleinsyremolekyl. I en annen utførelse er de to nukleinsyrer koblet
 25 (dvs. ko-lineære) i det samme molekyl (dvs. en enkel vektor). I dette tilfelle blir en vertscelle transfektet med det enkelte nukleinsyremolekyl.

Vertscellen kan være en celle som er dyrket *in vitro* eller en celle som er tilstede *in vivo* (dvs. en celle som er utvalgt for genterapi). Vertscellen kan videre være en befruktet eggcelle, embryonal stamcelle eller enhver annen embryonal
 30 celle som brukes i produksjon av ikke-humane transgene eller homologt rekombinante dyr. Transgene eller homologt rekombinante dyr som omfatter begge nukleinsyrekomponenter fra ekspresjonssystemet, kan produseres ved å introdusere begge nukleinsyrer inn i samme celler på et embryonalt stadium, eller mer fordelaktig, et dyr som bærer en nukleinsyrekomponent fra systemet i dets

genom blir parret med et dyr som bærer den andre nukleinsyrekomponenten av systemet i dets genom. Avkom som har arvet begge nukleinsyrekomponenter kan deretter bli identifisert med standardteknikker.

5 B. Koordinert regulering av ekspresjon av to nukleotidsekvenser

I tillegg til å frembringe et system for regulert ekspresjon av en enkelt transkribert nukleotidsekvens gir oppfinnelsen videre mulighet for koordinert regulering av ekspresjon av to nukleotidsekvenser som er operativt koblet til den samme tet-operatorsekvens, eller sekvenser. Således relaterer et annet aspekt av oppfinnelsen til en ny tet-regulert transkripsjonsenhet for koordinert regulering av to gener. I denne transkripsjonsenhet regulerer den samme tet-operatorsekvens, eller sekvenser, ekspresjonen av to operativt koblede nukleotidsekvenser som er transkribert i motsatte retninger fra den felles tet-operatorsekvens, eller sekvenser. Således er en nukleotidsekvens operativt koblet til én side av tet-operator-

15 sekvensen (f.eks. 5' enden på topptråden av DNA) og den andre nukleotidsekvens er operativt koblet til den andre siden av tet-operatorsekvensen (f.eks. 3' enden på topptråden til DNA). I tillegg må det bli forstått at hver nukleotidsekvens som skal transkriberes inkluderer en operativt koblet minimal promotersekvens som er lokalisert mellom nukleotidsekvensen som skal transkriberes og tet-operator-

20 sekvensen, eller sekvensene.

Et representativt eksempel av en slik transkripsjonsenhet er skjematisk fremstillet i Figur 6. I denne er vektorene, de to nukleotidsekvensene operativt koblet til den samme tet-operatorsekvens, eller sekvenser, og blir transkribert i motsatte retninger relativ til tet-operatorsekvensen, eller sekvensene (dvs.

25 sekvensene blir transkribert på en divergent måte etter aktivering av et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen). Ved "transkribert i motsatte retninger relativt til tet-operator-sekvensen, eller sekvensene" menes at den første nukleotidsekvens blir transkribert 5' til 3' fra én DNA-kjede (f.eks. bunnkjeden) og den andre nukleotidsekvens blir transkribert 5' til 3' fra den andre DNA-kjede

30 (f.eks. toppkjeden), noe som resulterer i bidireksjonell transkripsjon vekk fra tet-operatorsekvensen, eller sekvensene.

Således fremskaffer oppfinnelsen en rekombinant vektor for koordinert regulert, og bidireksjonell transkripsjon av to nukleotidsekvenser. I en versjon

omfatter vektoren en nukleotidsekvens koblet ved hjelp av fosfodiester-bindinger og omfattende i en 5' til 3' retning:

- en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til
- 5 - minst én tet-operatorsekvens, operativt koblet til
- en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes,

der transkripsjon av de første og andre nukleotidsekvenser foregår i motsatte retninger fra minimalt én tet-operatorsekvens, eller sekvenser (dvs. de første og andre nukleotidsekvenser blir transkribert på en divergent måte).

I en annen versjon inkluderer vektoren ikke den første og andre nukleotidsekvens som skal transkriberes, men inneholder i stedet for kloningsseter som tillater introduksjon inn i vektoren av nukleotidsekvenser av interesse. Således omfatter i denne versjon vektoren en nukleotidsekvens som omfatter i en 5' til 3' retning:

- et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til
- minst én tet-operatorsekvens, operativt koblet til
- 20 - et sekundært kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes,

der transkripsjon av en første og annen nukleotidsekvens introdusert inn i vektoren foregår i motsatte retninger fra den minst én tet-operatorsekvens, eller sekvenser. Det vil forstås av de som er trenet i faget at denne type av "kloningsvektor" kan være i en form som også inkluderer minimale promotersekvenser slik at en første nukleotidsekvens introdusert inn i det første kloningssete blir operativt koblet til en første minimal promoter og en annen nukleotidsekvens som blir introdusert inn i det andre kloningssete blir operativt koblet til en annen minimal promoter. Som alternativ kan "kloningsvektoren" være i en form som ikke inkluderer minimal promotersekvenser og i stedet for nukleotidsekvenser blir introdusert som inkluderer koblede minimale promotersekvenser inn i kloningsseter på vektoren.

Begrepet "kloningssete" ønskes forstått å omfatte minst ett restriksjonsendonukleasesete. Vanligvis er multiple ulike restriksjonsendonukleaseseter (f.eks. en polylinker) inneholdt i nukleinsyren.

I videre en annen utførelse kan vektoren for koordinert, bidireksjonell
5 transkripsjon av to nukleotidsekvenser inneholde et første nukleotid som skal transkriberes, slik som det som koder for en påvisbar markør (f.eks. luciferase eller β -galaktosidase), og et kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens av interesse.

Nukleotidsekvensene fra to ulike passende bidireksjonelle promoterregioner
10 for bruk i en vektor for koordinert regulering av to nukleotidsekvenser som skal transkriberes, som beskrevet her, blir vist i figurene 7A og 7B (SEKV ID NR: 6 og 7, henholdsvis). I konstruksjonen i Figur 7A er begge minimale promoters som er tilstede i konstruksjonen utledet fra en CMV-promoter. I konstruksjonen i Figur 7B er én minimal promoter tilstede i konstruksjonen utledet fra en CMV-promoter mens den andre minimale promoter er utledet fra en TK-promoter. Et plasmid
15 pUHDG1316-8, som omfatter en bidireksjonell promoter fra oppfinnelsen, har blitt deponert på 8. juli, 1994 under regelverket til Budapestavtalen i Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) i Braunschweig, Tyskland og gitt deponeringsnummer DSMZ 9281.

20 Transkripsjonsenheten fra oppfinnelsen for bruk i bidireksjonell transkripsjon av to nukleotidsekvenser operativt koblet til den samme tet-operator-sekvens, eller sekvenser, er hensiktsmessig for koordinering av ekspresjon av to nukleotid-sekvenser av interesse. Fortrinnsvis er minst én av nukleotidsekvensene som skal transkriberes en eukaryotisk nukleotidsekvens. I en applikasjon blir
25 vektoren brukt for å produsere støkiometriske mengder av to subenheter av et heterodimert molekyl i den samme celle. For eksempel kan vektoren bli benyttet for å produsere tunge og lette antistoffkjeder i den samme celle eller å produsere vekstfaktor-reseptor-sub-enheter i den samme celle. I en annen applikasjon blir vektoren benyttet for å uttrykke to genprodukter som koopererer i å etablere en
30 spesiell cellulær fenotype. I enda en annen applikasjon blir vektoren brukt for å koekspresere en indikator-funksjon og et gen av interesse, der indikatoren blir benyttet for å følge ekspresjon av genet av interesse. Således kan en av de to koordinert uttrykte sekvenser kode for et gen av interesse og den andre kan kode for en påvisbar markør, slik som en overflatemarkør eller enzym (f.eks. β -

galaktosidase eller luciferase) som benyttes for seleksjon av celler som uttrykker genet av interesse.

Transkripsjon av de to koordinerte regulerte nukleotidsekvenser kan bli induisert av tetracyklin (eller en analog) ved bruk av den Tc-induserbare

5 transkripsjonelle aktivator fra oppfinnelsen for å regulere ekspresjon av de to nukleotidsekvenser. Således er i dette system ekspresjon av begge nukleotidsekvenser slått av i fravær av Tc (eller analog), mens ekspresjon er slått på ved tilstedeværelse av Tc (eller analog). Alternativt kan vektoren for koordinert

10 regulering av to nukleotidsekvenser bli brukt sammen med andre tetracyklin-regulerte transkripsjonsfaktorer som er kjent i faget. For eksempel kan et trans-aktivator fusjonsprotein av en villtype Tet repressor fusjonert til et transkripsjonelt aktiveringsdomene som aktiverer genekspresjon i fravær av Tc (eller analog), slik som tTA beskrevet i Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:5547-5551, også bli benyttet sammen med denne måltranskripsjonsenhet for

15 koordinert regulering.

C. Uavhengig regulering av ekspresjon av multiple nukleotidsekvenser

Oppfinnelsen tillater videre uavhengig og motsatt regulering av to eller flere nukleotidsekvenser som skal transkriberes. Således relaterer et annet av

20 oppfinnelsens aspekter til en ny tet-regulert transkripsjonsenhet for uavhengig regulering av to eller flere gener. For å uavhengig regulere ekspresjon av to nukleotidsekvenser som skal transkriberes, blir én nukleotidsekvens operativt koblet til en tet-operatorsekvens, eller sekvenser, av en klasse type og den andre nukleotidsekvens blir operativt koblet til en tet-operatorsekvens, eller sekvenser,

25 av en annen klasse type. Således gir oppfinnelsen minst én rekombinant vektor for uavhengig regulering av transkripsjon av to nukleotidsekvenser. I en utførelse omfatter vektoren eller vektorene:

- en første nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst

30 én tet-operatorsekvens av en første klasse type, og

- en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en annen klasse type.

(Det må forstås at hver nukleotidsekvens som skal transkriberes også inkluderer en operativt koblet, oppstrøms minimal promotersekvens). De to uavhengig regulerte transkripsjonsenheter kan være inkludert på en enkel vektor, eller alternativt på to separate vektorer. Den rekombinante vektor, eller vektorer, som inneholder nukleotidsekvensene som skal transkriberes, kan bli introdusert i en vertscelle eller dyr som beskrevet tidligere.

I en annen utførelse inneholder vektoren, eller vektorene, ikke den første og andre nukleotidsekvens som skal transkriberes, men inneholder i stedet for kloningsseter som tillater introduksjon inn i vektoren av nukleotidsekvenser av interesse. Således omfatter i denne versjon vektoren, eller vektorene:

- et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en første klasse type, og
- et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en annen klasse type.

Denne kloningsvektor, eller vektorer, kan være i en form som allerede inkluderer første og andre minimale promotere operativt koblet henholdsvis til det første og andre kloningssete. Alternativt kan nukleotidsekvenser som skal transkriberes som inkluderer en operativt koblet minimal promoter, bli introdusert inn i kloningsvektoren.

I ennå en utførelse kan vektoren for uavhengig regulering av to nukleotidsekvenser inneholde et første nukleotid som skal transkriberes, for eksempel slik som koder for en detekterbar markør eller et selvmordsgen, operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en første klasse type og et kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens av interesse, slik at den er operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en annen klasse type.

Det vil forstås av de som er trenet i faget at ulike kombinasjoner av klasser av tet-operatorsekvenser kan bli brukt for uavhengig regulering av to nukleotidsekvenser. For eksempel kan den første tet-operatorsekvens, eller sekvenser, være av klasse A type og den andre kan være av klasse B type, eller den første tet-operatorsekvens kan være av klasse B type og den andre kan være av klasse

C type, etc. Fortrinnsvis er en av de to tet-operatorene benyttet en klasse B type operator.

Uavhengig transkripsjon av de første og andre nukleotidsekvenser blir regulert i en vettscelle ved at man videre introduserer inn i vertscellen én eller flere
 5 nukleinsyrer som koder for to ulike transaktivator fusjonsproteiner, som binder uavhengig til tet-operatorsekvenser av ulike klasse typer. Det første fusjonsprotein omfatter et polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær av tetracyklin eller analog, operativt koblet til et polypeptid som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler (f.eks. et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen, slik som
 10 et mutert Tn10-avledet Tet repressor koblet til en VP16 aktiveringsregion). Det andre fusjonsprotein omfatter et polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens i fravær av tetracyklin, eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et polypeptid som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler (f.eks. en villtype Tn10-avledet Tet repressor koblet til en VP16 aktiveringsregion slik som den tTA beskrevet i
 15 Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551). I en annen utførelse binder det første fusjonsprotein til tet-operatorsekvensen av den første klasse type som brukes i transkripsjonsenheten og det andre fusjonsprotein binder til tet-operatorsekvensen av den andre klasse type som brukes i transkripsjonsenheten. Alternativt i en annen utførelse binder det første
 20 fusjonsprotein til den andre klasse av tet-operator og det andre fusjonsprotein binder til den første klasse av tet-operator.

For eksempel kan den første nukleotidsekvens som skal transkriberes være koblet til en klasse A tet-operator og det første fusjonsprotein kan binde til klasse A operatører, mens den andre nukleotidsekvens som skal transkriberes,
 25 kan være koblet til en klasse B tet-operator og det andre fusjonsprotein kan binde til klasse B operatører. Således vil i denne versjon transkripsjon av den første nukleotidsekvens bli aktivert i nærvær av Tc (eller analog) mens transkripsjon av den andre nukleotid-sekvens blir aktivert i fravær av Tc (eller analog). Alternativt i en annen versjon binder det første fusjonsprotein til klasse B operatører og det
 30 andre fusjonsprotein binder til klasse A operatører. I dette tilfelle blir transkripsjon av den andre nukleotid-sekvens aktivert i nærvær av Tc (eller analog) mens transkripsjon av den første nukleotidsekvens blir aktivert i fravær av Tc (eller analog). Passende transaktivator-proteiner som kan brukes i dette system kan bli utviklet som beskrevet over i Seksjon I og i Gossen and Bujard (1992) sitert over.

For å hemme heterodimerise-ring mellom de to ulike typer av Tet repressor fusjonsproteiner tilstede i den samme celle, kan det være nødvendig å mutere dimeriseringsregionen av én eller begge av transaktivator fusjonsproteinene. Mutasjoner kan bli målrettet til C-terminale regionen til TetR som man vet er involvert i dimerisering. Dimeriseringsregionen har blitt beskrevet i detalj basert på krystallstrukturen til TetR (se Hinrichs, W. et al. (1994) Science 264:418-420).

Dette system tillater uavhengig og motsatt regulering av ekspresjonen av to gener ved Tc og analoger. Bruk av ulike Tc-analoger som induserende agens kan videre tillate høy, lav eller gjennomsnittlige nivåer av ekspresjon av de ulike sekvenser (mere detaljert diskutert i Seksjon V, under). Den nye transkripsjons-enheten fra oppfinnelsen som tillater uavhengig regulering av ekspresjon av to gener og er beskrevet over, kan benyttes i situasjoner der to genprodukter skal uttrykkes i den samme celle, men der det er ønskelig å uttrykke et genprodukt mens ekspresjon av det andre genprodukt er slått av, eller vice versa. For eksempel er dette system spesielt hensiktsmessig for å uttrykke i den samme vertscelle enten et terapeutisk gen eller et selvmordsgen (dvs. et gen koder for et produkt som kan bli benyttet for å ødelegge cellen, slik som ricin, eller herpes simplex-virus thymidinkinase). I mange genterapi-situasjoner er det ønskelig å ha evne til å uttrykke et gen for terapeutiske formål i en vertscelle, men også å ha evnen til å ødelegge vertscellen når terapi er fullført. Dette kan oppnås ved å benytte det ovenfor beskrevne system ved å koble det terapeutiske gen til en klasse av tet-operator og selvmordsgenet til en annen klasse av tet-operator. Således kan ekspresjon av det terapeutiske gen i en verts-celle bli stimulert av Tc (der nå ekspresjon av selvmordsgenet er fraværende). Deretter blir med en gang behandlingen er fullført, Tc fjernet, dette slår av ekspresjon av det terapeutiske gen og slår på ekspresjon av selvmordsgenet i cellen.

D. Kombinert koordinert og uavhengig regulering av multiple nukleotidsekvenser

Det er videre mulig å regulere ekspresjon av fire nukleotidsekvenser ved å kombinere systemet beskrevet i Seksjon IIIB med systemet beskrevet i Seksjon IIIC, slik at to sekvenspar blir koordinert regulert mens ett par blir regulert uavhengig fra det andre par. Således kan to mål-transkripsjonsenheter bli produsert som omfatter:

- en første nukleinsyre som omfatter i en 5' til 3' retning: en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, en tet-operatorsekvens, eller sekvenser, av en første klasse type, og en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes
- en annen nukleinsyre som omfatter i en 5' til 3' retning: en tredje nukleotidsekvens som skal transkriberes, en tet-operatorsekvens, eller sekvenser, av en annen klasse type, og en fjerde nukleotidsekvens som skal transkriberes.

Transkripsjon av de første og andre nukleotidsekvensene i den første nukleinsyren foregår i divergerende retninger fra den første klasse av tet-operatorsekvens, eller sekvenser. På samme måte foregår transkripsjon av det tredje og fjerde nukleotidsekvensene i den andre nukleinsyren i divergerende retninger fra den andre klasse av tet-operatorsekvens, eller sekvenser. Således blir ekspresjon av de første og andre nukleotidsekvenser koordinert regulert, og ekspresjon av de tredje og fjerde nukleotidsekvenser blir også koordinert regulert. Imidlertid blir ekspresjon av de første og andre sekvenser uavhengig (og i motsatt retning) regulert sammen-lignet med de tredje og fjerde sekvenser gjennom bruk av to ulike transaktivator fusjonsproteiner, som beskrevet over, en som aktiverer transkripsjon i nærvær av Tc (eller analog) og den andre som aktiverer transkripsjon i fravær av Tc (eller analog). En transaktivator blir produsert så den binder til tet-operatorer av den første klasse type og den andre blir produsert slik at den binder til tet-operatorer av den andre klasse type. I andre versjoner kan disse transkripsjonsenheter i stedet for allerede å inneholde første, andre, tredje og/eller fjerde nukleotidsekvenser som skal transkriberes, kan disse transkripsjonsenheter inneholde kloningsseter som tillater introduksjon av første, andre, tredje og/eller fjerde nukleotidsekvenser som skal transkriberes.

IV. Tetracyklin-regulerte transkripsjonelle inhibitorer

Et annet aspekt av oppfinnelsen relaterer til transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner. Inhibitor fusjonsproteinene i oppfinnelsen er konstruert på samme måte som transaktivator fusjonsproteinene i oppfinnelsen (se Seksjon I, over) men i steden for å inneholde et polypeptid-domene som stimulerer

transkripsjon i eukaryote celler, inneholder inhibitor fusjonsproteinene et polypeptid-domene som hemmer transkripsjon i eukaryote celler. Inhibitor fusjonsproteinene blir benyttet for å nedregulere ekspresjon av gener som er operabelt koblet til tetO-sekvenser. For eksempel kan når et tetO-koblet gen blir

5 introdusert i en vertscelle eller et dyr, nivået av basal, konstitutiv ekspresjon av genet variere, avhengig av type av celle eller vev der genet er introdusert og på integrasjonsstedet for genet. Alternativt kan konstitutiv ekspresjon av endogene gener der tetO-sekvenser har blitt introdusert, variere avhengig av styrken på ytterligere endogene regulatoriske sekvenser i nærheten. Inhibitor fusjons-

10 proteinene beskrevet her gir sammensetninger som kan bli benyttet for å hemme ekspresjonen av slike tetO-koblede gener på en kontrollert måte.

I en utførelse omfatter inhibitor fusjonsproteinene fra oppfinnelsen et første polypeptid som binder til tet-operatorsekvenser i fravær men ikke i nærvær av tetracyklin (Tc) eller en tetracyklin-analog operativt koblet til et heterologt annet

15 polypeptid som hemmer transkripsjon i eukaryote celler. I en annen utførelse omfatter inhibitor fusjonsproteinet et første polypeptid som binder til tet-operatorsekvenser i nærvær men ikke i fravær av tetracyklin operativt koblet til et heterologt annet polypeptid som hemmer transkripsjon i eukaryote celler. Begrepet "heterologt" skal bety at det andre polypeptid er avledet fra et protein som er ulikt

20 det første polypeptid. På samme måte som transaktivator fusjonsproteinene kan transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner bli fremstillet ved hjelp av standard rekombinante DNA teknikker som beskrevet her.

A. Det første polypeptid i transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteinet

25 Det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen består delvis av et første polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens enten (i) i fravær men ikke i nærvær av tetracyklin (Tc), eller en analog, eller som alternativ (ii) i nærvær men ikke i fravær av Tc, eller en analog. Fortrinnsvis er i den første versjon det første polypeptid en villtype Tet repressor (som binder til tet-operatorsekvenser i

30 fravær men ikke i nærvær av Tc). En villtype Tet repressor fra enhver klasse (f.eks. A, B, C, D eller E) kan bli benyttet som det første polypeptid. Fortrinnsvis er villtype Tet repressoren en Tn10-avledet Tet repressor. Nukleotid- og aminosyresekvensene av en villtype Tn10-avledet Tet repressor blir vist i SEKV ID NR:16 og i SEKV ID NR:17, henholdsvis.

Som alternativ er i den siste versjonen det første polypeptid en mutert Tet repressor som beskrevet i Seksjon I, del A over (som binder til tet-operatorsekvenser i nærvær men ikke i fravær av Tc). En mutert Tet repressor fra enhver klasse (f.eks. A, B, C, D eller E) kan bli benyttet som det første polypeptid.

5 Fortrinnsvis er den muterte Tet repressor en Tn10-avledet Tet repressor med én eller flere aminosyre-substitusjoner i posisjonene 71, 95, 101 og/eller 102. Nukleotid- og aminosyre-sekvensene for slik en mutert Tn10-avledet Tet repressor blir vist i SEKV ID NR:18 og i SEKV ID NR:19, henholdsvis.

10 **B. Det andre polypeptid av det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein**

Det første polypeptid av det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein er operativt koblet til et annet polypeptid som direkte eller indirekte hemmer transkripsjon i eukaryote celler. Som beskrevet i Seksjon I over, for operativt å koble det første og andre polypeptid i et fusjonsprotein blir vanligvis

15 nukleotidsekvenser som koder det første og det andre polypeptid ligert til hverandre innen leserammen for å skape et kimært gen som koder for fusjonsproteinet. Imidlertid kan det første og andre polypeptid bli operativt koblet med andre teknikker som preserverer funksjonen til hvert polypeptid (f.eks. kjemisk kryssbundet). Selv om fusjonsproteinet vanligvis beskrives her med det

20 første polypeptid plassert på den aminoterminalen ende på fusjonsproteinet, og det andre polypeptid på den C-terminalen ende av fusjonsproteinet, vil det bli forstått av de som er trenet i faget at den motsatte orientering (dvs. det andre polypeptid ved den aminoterimnale ende og det første polypeptid ved den karboksyterminalen ende) også innbefattes av oppfinnelsen.

25 Proteiner og polypeptid-domener innen proteiner som kan funksjonere for å hemme transkripsjon i eukaryote celler har blitt beskrevet i faget (for oversikter se f.eks. Renkawitz, R. (1990) Trends in Genetics 6:192-197; og Herschbach, B.M and Johnson, A.D. (1993) Annu. Rev. Cell. Biol. 9:479-509). Slik transkripsjonelle inhibitor-domener har blitt beskrevet i faget som "silencing domains" eller

30 "repressor domener". Selv om den nøyaktige mekanisme ansvarlig for at mange av disse polypeptid-domener hemmer transkripsjon ikke er kjent (og oppfinnelsen ønskes ikke begrenset av mekanisme) er det mange ulike måter hvormed repressor-domener kan hemme transkripsjon, inkluderende: 1) kompetitiv hemming av binding av enten aktivatorproteiner eller det generelle

transkripsjonelle maskineriet, 2) hindring av aktivitet av en DNA-bundet aktivator, og 3) negativ interferens med sammensetningen av et funksjonelt preinitieringskompleks av det generelle transkripsjonsmaskineri. Således kan et repressordomene ha en direkte inhibitorisk effekt på det transkripsjonelle maskineri eller kan hemme transkripsjon indirekte ved å hemme aktiviteten av aktivatorproteiner. Således er begrepet "et polypeptid som hemmer transkripsjon i eukaryote celler" som brukt her, forutsatt å inkludere polypeptider som virker enten direkte eller indirekte for å hemme transkripsjon. Som benyttet her er "inhibisjon" av transkripsjon forutsatt å bety en forminskning i nivået eller mengde av transkripsjon av et målgen sammenlignet med nivået eller mengde av transkripsjon før regulering fremkalt av det transkripsjonelle inhibitorprotein. Transkripsjonell inhibisjon kan være delvis eller komplett. Ordene "silencer", "repressor" og "inhibitor" blir benyttet om hverandre her for å beskrive et regulatorisk protein, eller domener i proteinet, som kan hemme transkripsjon.

Et transkripsjonelt "repressor" eller "silencer" domene som beskrevet her, er et polypeptid-domene som bevarer dets transkripsjonelle repressorfunksjon når domenet er overført til et heterologt protein. Proteiner som har blitt vist å ha repressordomener som kan funksjonere når de blir overført til et heterologt protein, inkluderer v-erbA onkogenproduktet (Baniahmad A. et al., (1992) EMBO J. 11:1015-1023), tyreideahormonreseptoren (Baniahmad, se over), retinsyre-reseptoren (Baniahmad, se over), og bananfluens Krueppel (Kr) proteinet (Licht, J.D. et al. (1990) Nature 346:76-79; Sauer, F. and Jäckle, H. (1991) Nature 353:563-566; Licht, J.D. et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14:4057-4066). Ikke-begrensende eksempler på andre proteiner som har transkripsjonell repressor-aktivitet i eukaryote celler inkluderer bananfluens homeodomene protein "even-skipped" (eve), Ssn6/Tup1 proteinkomplekset fra *S. cerevisiae* (se Herschbach and Johnson, se over), SIR1 proteinet fra gjær (se Chien, et al. (1993) Cell 75:531-541), NeP1 (se Kohne, et al. (1993) J. Mol. Biol. 232:747-755), bananfluens "dorsale" protein (se Kirov, et al., (1994) Mol. Cell. Biol. 14:713-722; Jiang, et al. (1993) EMBO J. 12:3201-3209, TSF3 (se Chen et al., (1993) Mol. Cell. Biol. 13:831-840), SF1 (se Targa, et al., (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 188:416-423) bananfluens "hunchback" protein (se Zhang, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7511-7515) bananfluens "knirps" protein (se Gerwin et al., (1994) Mol. Cell. Biol. 14:7899-7908), WT1 protein (Wilm's tumors

genprodukt) (se Anant, et al. (1994) *Oncogene* 9:3113-3126; Madden, et al. (1993) *Oncogene* 8:1713-1720), Oct-2.1 (se Lillycrop, et al., (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:7633-7642) bananfluens "engrailed" protein (se Badiani, et al., (1994) *Genes Dev.* 8:770-782; Han og Manley, (1993) *EMBO J.* 12:2723-2733), E4BP4 (se
 5 Cowell og Hurst (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:59-65) og ZF5 (se Numoto, et al (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:3767-3775).

I en foretrukket utførelse er det andre polypeptid i det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen et transkripsjonelt repressor-domene fra bananfluens Krueppel-protein. En C-terminal region med repressoraktivitet kan bli
 10 benyttet, slik som aminosyrer 403-466 fra det originale protein (se Sauer, F. og Jäckle, H., se over). Denne region blir beskrevet som C64KR. Nukleotid- og aminosyresekvensene til C64KR blir vist i SEKV ID NR:20 og i SEKV ID NR:21, henholdsvis. Konstruksjon av en ekspresjonsvektor som koder for et TetR-C64KR fusjonsprotein blir beskrevet i Eksempel 4. Som alternativ kan en alaninrik amino-
 15 terminal region av Kr som også har repressoraktivitet, bli benyttet som det andre polypeptid i fusjonsproteinet. For eksempel kan aminosyrer 26-102 i Kr (se Licht, J.D. et al (1990) se over) bli benyttet som det andre polypeptid. Som alternativ kan kortere eller lengre polypeptidfragmenter som omfatter hver enkelt av repressor-
 domenene i Kr som fremdeles bevarer full eller delvis inhibitoraktivitet, også bli
 20 planlagt benyttet (f.eks. aminosyre 62 til 92 i det aminoterminal repressor-
 domenet, se Licht et al. (1994) se over).

I en annen foretrukket utførelse er det andre polypeptid av det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen et transkripsjonelt repressor-domene fra v-erbA onkogenproduktet. Repressor-domenet til v-erbA har
 25 blitt kartlagt til omtrent aminosyrerester 362-632 i det opprinnelige v-erbA onkogenproduktet (se Baniahmad, et al. se over). Således blir et fragment som omfatter denne region benyttet som det andre polypeptid i repressor-domenet. I en utførelse blir aminosyrerestene 364-635 fra det opprinnelige v-erbA proteinet benyttet. Nukleotid- og aminosyresekvensene fra denne region av v-erbA blir vist i
 30 SEKV ID NR:22 og SEKV ID NR:23, henholdsvis. Konstruksjon av en ekspresjonsvektor som koder for et TetR-v-erbA fusjonsprotein blir beskrevet i Eksempel 5. Alternativt blir kortere eller lengre polypeptidfragmenter som omfatter v-erbA repressor-regionen som fremdeles fremviser full eller delvis inhibitoraktivitet også vurdert benyttet. For eksempel aminosyrerester 346-639, 362-639, 346-632, 346-

616 og 362-616 fra v-erbA bli benyttet. I tillegg blir polypeptidfragmenter som omfatter disse regioner som har interne deleasjoner men fremdeles bevarer full eller delvis inhibitoraktivitet, omfattet av oppfinnelsen, slik som aminosyrerester 362-468/508-639 fra v-erbA. Videre kan to eller flere kopier av repressor-domenet bli inkludert i fusjonsproteinet, slik som to kopier av aminosyrerester 362-616 fra v-erbA. Passende repressor polypeptid-domener fra v-erbA er videre beskrevet i Baniahmad, A. et al. (se over).

I andre utførelser blir andre repressor-domener benyttet. Ikke-begrensede eksempler på polypeptid-domener som kan bli benyttet inkluderer:

aminosyrerester 120-410 fra thyroide-hormonreseptor alfa ($THR\alpha$), aminosyrerester 143-403 fra retinsyre-reseptor alfa ($RAR\alpha$), aminosyrerester 186-232 av knirps, den N-terminale region av WT1 (se Anant, se over), den N-terminale region av Oct-2.1 (se Lillycrop, se over), et 65 aminosyredomene av E4BP4 (se Cowell og Hurst, se over) og det N-terminale zinkfinger-domene fra ZF5 (se Numoto, se over). Videre blir også kortere og lengre polypeptidfragmenter som omfatter disse regioner som fremdeles bevarer full eller delvis inhibitorisk aktivitet vurdert benyttet.

I tillegg til tidligere beskrevne transkripsjonelle inhibitor-domener er nye transkripsjonelle inhibitor-domener som kan bli identifisert med standardteknikker innen oppfinnelsens område. Et polypeptids transkripsjonelle inhibitorevne kan bli estimert ved: 1) å konstruere en ekspresjonsvektor som koder for represjons-polypeptid som skal testes koblet til et annet polypeptid med DNA bindingsaktivitet (dvs. konstruere et DNA bindingsdomene-represjonsdomene fusjonsprotein), 2) kotransfekte denne ekspresjonsvektor i vertsceller sammen med en reporter-gen konstruksjon som vanligvis er konstitutiv uttrykt i vertscellen og også inneholder bindingssteder for DNA-bindingsdomenet, og 3) bestemme mengde transkripsjon av reporter-gen-konstruksjonen som blir hemmet ved ekspresjon av fusjons-proteinet i vertscellen. For eksempel er en standard analyse som brukes i faget bygget på bruk av et fusjonsprotein av et GAL4 DNA-bindingsdomene (f.eks. aminosyrerester 1-147) og et repressor-domene som skal testes. Dette fusjonsprotein blir så benyttet for å hemme ekspresjon av en reporter-gen-konstruksjon som inneholder positive regulatoriske sekvenser (som normalt stimulerer konstitutiv transkripsjon) og GAL4 bindingssteder (se f.eks. Baniahmad, se over).

C. Et tredje polypeptid i det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein

I tillegg til en Tet repressor og et transkripsjonelt repressor-domene kan et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen inneholde et operativt koblet tredje polypeptid som fremmer transport av fusjonsproteinet til en cellekjerne. Som beskrevet for transaktivator fusjonsproteinene (se Seksjon I, del C, over) kan et nukleært lokaliseringssignal bli inkorporert inn i det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein.

D. Ekspresjon av det transkripsjonelle inhibitor fusjonsprotein

Et nukleinsyremolekyl som koder for et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen kan bli inkorporert i en rekombinant ekspresjonsvektor og introdusert i en vertscelle for å uttrykke fusjonsproteinet i vertscellen som beskrevet i Seksjon II, del A, B og C, beskrevet over. Fortrinnsvis bærer en vertscelle som uttrykker et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen også et tet-operator-koblet gen av interesse (dvs. mål-nukleotidsekvens om skal transkriberes).

Transgene organismer som uttrykker et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein i organismens celler, kan bli produsert som beskrevet i del F. Videre kan homologe rekombinante organismer som uttrykker et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein i organismens celler, bli fremstillet som beskrevet i del G.

Oppfinnelsen frembringer rekombinante ekspresjonsvektorer som er passende for homolog rekombinasjon. I en utførelse omfatter en slik ekspresjonsvektor et nukleinsyremolekyl som koder for et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen som er omgitt på dets 5' og 3' ender av ytterligere nukleinsyrer fra et eukaryot gen, der den ytterligere nukleinsyre er av tilstrekkelig lengde slik at vellykket homolog rekombinasjon med det eukaryote gen kan finne sted. Vektorer og metoder for å produsere homologe rekombinante organismer som uttrykker komponentene i det regulatoriske system fra oppfinnelsen, og bruk av dette, er beskrevet i videre detaljer i US patentsøknad nr. 98/260,452. Fortrinnsvis bærer en transgen eller homolog rekombinant organisme som uttrykker et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen i organismens celler, også et tet-operator-koblet gen av interesse (dvs. mål-nukleotidsekvens som skal transkriberes) i organismens celler.

V. Oppfinnelsens testsett

Et annet aspekt ved oppfinnelsen relaterer til ferdigpakkede analysepakker som inkluderer komponentene av det induserbare regulatoriske system fra oppfinnelsen. Et slikt testsett kan bli benyttet for å regulere ekspresjon av et gen av interesse (dvs. en nukleotidsekvens av interesse som skal transkriberes) som kan bli klonet inn i en mål-transkripsjonsenhet. Dette testsett kan inkludere nukleinsyre som koder for et transkripsjonelt aktivator fusjonsprotein eller et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein, eller begge. Som alternativ kan eukaryote celler som har nukleinsyre som koder for transaktivator og/eller inhibitor fusjonsprotein stabilt inkorporert, slik at transaktivatoren og/eller inhibitor fusjonsproteinet blir uttrykt i den eukaryote celle bli levert sammen i dette testsett.

I en utførelse inkluderer denne pakke en bærermetode som har godt innpakket minst to oppbevaringsmåter, en første oppbevaringsmåte som inneholder en første nukleinsyre (f.eks. DNA) som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen (f.eks. en rekombinant ekspresjonsvektor som koder for et første polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær av tetracyklin operativt koblet til et annet polypeptid som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler), og en annen oppbevaringsmetode som inneholder en annen målnukleinsyre (f.eks. DNA) for transaktivatoren, hvori en nukleotidsekvens av interesse kan bli klonet. Den andre nukleinsyre omfatter vanligvis et kloningssete for introduksjon av en nukleotid-sekvens som skal transkriberes (eventuelt inkluderende en operativt koblet minimal promotersekvens) og minst én operativt koblet tet-operatorsekvens. Ordet "kloningssete" ønskes å omfatte minst ett restriksjonsendonukleasesete. I typiske tilfeller blir multiple ulike restriksjons-endonukleaseseter (f.eks. en polylinker) inneholdt i nukleinsyren.

For å regulere ekspresjon av en nukleotidsekvens av interesse ved hjelp av komponentene av utstyrspakken, blir nukleotidsekvensen klonet inn i kloningssetet på målvektoren i utstyrspakken ved konvensjonelle rekombinate DNA-teknikker, og deretter blir den første og andre nukleinsyre introdusert i en vertscelle eller et dyr. Transaktivator fusjonsproteinet uttrykt i vertscellen eller dyret regulerer deretter transkripsjon av nukleotidsekvensen av interesse i nærvær av det induserende agens (Tc eller en analog av dette).

Alternativt i en annen utførelse inkluderer utstyrspakken en eukaryot celle som er stabilt transfektert med en nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen, slik at transaktivatoren blir uttrykt i cellen. Heller enn å inneholde nukleinsyre alene kan det første oppbevaringsmiddel beskrevet
 5 over, således inneholde en eukaryot cellelinje der den første nukleinsyre som koder for transaktivatoren har blitt stabilt introdusert (f.eks. ved stabil transfeksjon med en konvensjonell metode slik som kalsiumfosfat -presipitering eller elektroporering, osv.). I denne utførelse blir en nukleotidsekvens av interesse klonet inn i kloningssettet på målvektoren i utstyrspakken og målvektoren blir så
 10 introdusert inn i den eukaryote celle som uttrykker transaktivator fusjonsproteinet.

Som alternativ eller i tillegg kan en rekombinant vektor fra oppfinnelsen for koordinert regulering av ekspresjon av to nukleotidsekvenser også bli inkorporert i en utstyrspakke fra oppfinnelsen. Vektoren kan inkluderes i utstyrspakken i en form som tillater introduksjon inn i en vektor av to nukleotidsekvenser av interesse.
 15 Således vil i en annen versjon en utstyrspakke fra oppfinnelsen inkludere 1) en første nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen (eller en eukaryot celle der nukleinsyren har blitt stabilt introdusert) og 2) en annen nukleinsyre som omfatter en nukleotidsekvens som omfatter i en 5' til 3' retning: et første kloningssete for introduksjon av en først nukleotidsekvens av interesse
 20 operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens operativt koblet til et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens av interesse, der transkripsjon av de første og andre nukleotidsekvenser foregår i motsatte retninger fra den i det minste ene tet-operatorsekvens. Eventuelt kan vektoren inkludere operativt koblede minimale promotersekvenser. I en annen utførelse kan vektoren
 25 være i en form som allerede inneholder en nukleotidsekvens som skal transkriberes (f.eks. kodende for en registrerbar markør slik som luciferase, β -galaktosidase eller CAT) og et kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens av interesse som skal bli transkribert.

Oppfinnelsens transkripsjonsenheter og transaktivatorer for uavhengig
 30 regulering av et ekspresjon av to nukleotidsekvenser som skal transkriberes, kan også bli inkorporert i en utstyrspakke fra oppfinnelsen. Mål-transkripsjonsenheterne kan være i en form som tillater at nukleotidsekvenser av interesse som skal bli transkribert blir introdusert inn i transkripsjonsenheterne. Således inkluderer i en annen utførelse en utstyrspakke fra oppfinnelsen 1) en første nukleinsyre som

koder for en transaktivator som binder til en tet-operator av en første klasse type i nærvær av Tc eller en analog av dette, 2) en annen nukleinsyre som omfatter et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til minst én tet-operator av en første klasse type, 3) en tredje nukleinsyre som koder for en transaktivator som binder til en tet-operator av en annen klasse type i fravær av Tc eller en analog av dette, og 4) en fjerde nukleinsyre som omfatter et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operator av en annen klasse type. (Om ønsket er minimale promotersekvenser inkludert i den andre og fjerde nukleinsyre). I en annen utførelse er en nukleotidsekvens som skal transkriberes (f.eks. kodende for et selvmordsgen) allerede inneholdt i enten den andre eller fjerde nukleinsyre. I enda en annen utførelse kan nukleinsyrene som koder for transaktivatorene (f.eks. den første og tredje nukleinsyre beskrevet over) bli stabilt introdusert i en eukaryotisk cellelinje som følger utstyrspakken.

I nok en utførelse inkluderer en utstyrspakke fra oppfinnelsen en første oppbevaringsmåte som inneholder en første nukleinsyre som koder for et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen (f.eks. fusjonsproteinet hemmer transkripsjon i eukaryote celler enten bare i tilstedeværelse av Tc eller bare i fravær av Tc) og en annen oppbevaringsmåte som inneholder en annen nukleinsyre som omfatter et kloningssete for introduksjon av en nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens. Utstyrspakken kan videre inkludere en tredje nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein som binder til tetO-sekvenser enten bare i tilstedeværelse av Tc eller bare i fravær av Tc. Alternativt kan den første og/eller tredje nukleinsyre (dvs. som koder for inhibitor eller transaktivator fusjonsproteiner) bli stabilt inkorporert i en eukaryotisk vertscelle som følger utstyrspakken.

I en videre versjon kan en utstyrspakke fra oppfinnelsen inkludere minst ett tetracyklin eller en tetracyklinanalog. For eksempel kan utstyrspakken inkludere en oppbevaringsmåte som inneholder tetracyklin, anhydro-tetracyklin, doksycyklin, epioksy-tetracyklin eller andre tetracyklinanaloger beskrevet her.

VI. Regulering av genekspresjon ved tetracykliner eller analoger derav

A. Stimulering av genekspresjon ved transaktivator fusjonsproteiner

I en vertscelle som bærer nukleinsyre som koder for et transaktivator
 5 fusjonsprotein fra oppfinnelsen og en nukleotidsekvens som er operativt koblet til
 tet-operatorsekvensen (dvs. gen av interesse som skal bli transkribert),
 forekommer ikke høyt nivå av transkripsjon av nukleotidsekvensen som er
 operativt koblet til tet-operatorsekvens, eller sekvenser, i fravær av det
 induserende agens, tetracyklin eller analoger derav. Nivå av basal transkripsjon av
 10 nukleotidsekvensen kan variere avhengig av vertscellen og lokalisasjon der
 sekvensen er integrert, men er generelt ganske lav eller til og med umulig å
 detektere i fravær av Tc. For å indusere transkripsjon i en vertscelle får vertscellen
 kontakt med tetracyklin eller en tetracyklin-analog. Det beskrives metoder for å
 stimulere transkripsjon av en nukleotidsekvens som er operativt koblet til en tet-
 15 operatorsekvens i en vertscelle eller dyr som uttrykker et transaktivator
 fusjonsprotein fra oppfinnelsen. Metodene involverer å kontakte cellen med
 tetracyklin eller en tetracyklin-analog eller å tilføre tetracyklin eller en tetracyklin-
 analog til et individ som inneholder cellen.

Begrepet "tetracyklin-analog" ønskes å inkludere forbindelser som er
 20 strukturelt relatert til tetracyklin og som binder til Tet repressoren med en K_a på
 minst ca. 10^6 M^{-1} . Fortrinnsvis binder tetracyklin-analogen med en affinitet på
 omtrent 10^9 M^{-1} eller større. Eksempler på slike tetracyklin-analoger inkluderer,
 men er ikke begrenset til, anhydrotetracyklin, doksycyklin, klorotetracyklin,
 oksytetracyklin og andre beskrevet av Hlavka og Boothe, "The Tetracyclines," in
 25 Handbook of Experimental Pharmacology 78, (R.K. Blackwood et al. (eds.),
 Springer-Verlag, Berlin-New York, 1985; L.A. Mitscher, "The Chemistry of the
 Tetracycline Antibiotics", Medicinal Research 9, Dekker, New York, 1978; Noyee
 Development Corporation, "Tetracycline Manufacturing Processes" Chemical
 Process Reviews, Park Ridge, NJ, 2 volumes, 1969; R.C. Evans, "The Technology
 30 of the Tetracyclines", Biochemical References Series 1, Quadrangle Press, New
 York, 1968; og H.F. Dowling, "Tetracycline", Antibiotic Monographs, no. 3, Medical
 Encyclopedia, New York, 1955. Foretrukne Tc-analoger med henblikk på høyt nivå
 stimulering av transkripsjon er anhydrotetracyklin og doksycyklin. En Tc-analog
 kan bli valgt som har redusert antibiotisk aktivitet sammenlignet med Tc.

Eksempler på slike Tc-analoger er anhydrotetracyklin, epioksy-tetracyklin og cyanotetracyklin.

For å indusere genekspressjon i en celle *in vitro* får cellen kontakt med Tc- eller Tc-analog ved å dyrke cellen i et medium som inneholder forbindelsen. Når celler blir dyrket *in vitro* i nærvær av Tc, eller Tc-analog, er et foretrukket konsentrasjonsområde for det induserende agens mellom ca. 10 og ca. 1000 mg/mL. Tc eller en Tc-analog, kan bli tilsatt direkte til media der celler allerede blir dyrket eller, mer fordel-aktig for å oppnå høye nivåer av geninduksjon, blir celler høstet fra Tc-frie media og dyrket i ferske media som inneholder Tc, eller en analog derav.

For å indusere genekspressjon *in vivo* får celler inne i et subjekt kontakt med Tc, eller en Tc-analog ved tilførsel av forbindelsen til subjektet. Begrepet "subjekt" ønskes å inkludere menneske og andre ikke-humane pattedyr omfattende aper, kuer, geiter, sauer, hunder, katter, kaniner, rotter, mus og transgene og homologe rekombinante varianter av disse. Videre ønskes begrepet "subjekt" å inkludere planter, slik som transgene planter. Når det induserende agens blir tilført et humant eller dyre-subjekt blir dosen justert slik at man fortrinnsvis oppnår en serumkonsentrasjon mellom ca. 0,05 og 1,0 µg/mL. Tc- eller en Tc-analog, kan bli tilført til et subjekt på enhver måte som effektivt oppnår en *in vivo* konsentrasjon som er tilstrekkelig for geninduksjon. Eksempler på passende tilførselsmåter inkluderer oral tilførsel (f.eks. oppløse det induserende agens i drikkevannet), langsomt frigjørende tabletter og implantasjon av en diffusjonspumpe. For å tilføre Tc eller en Tc-analog, til en transgen plante kan det induserende agens bli oppløst i vann som tilføres planten.

Muligheten for å bruke ulike Tc-analoger som induserende agens i dette system tillater å modulere nivå av ekspresjon av en tet-operator-koblet nukleotid-sekvens. Som vist i Eksempel 2 har anhydrotetracyklin og doksy-cyklin blitt funnet å være sterke induserende agens. Økning i transkripsjon av målsekvensen er vanligvis så høy som 1000 til 2000 ganger, og induksjonsfaktorer så høy som 20.000 ganger kan oppnås. Tetracyklin, klorotetracyklin og oksytetracyklin har blitt funnet å være svakere induserende agens, dvs. økning i transkripsjon av en målsekvens er i området ca. 10 ganger. Således kan en passende tetracyklin-analog bli valgt som et induserende agens basert på det ønskede nivå av induksjon av genekspressjon. Det er også mulig å endre nivå av genekspressjon i en

vertscelle eller dyr over tid ved å endre Tc-analogen som benyttes som det induserende agens. For eksempel kan det være situasjoner hvor det er ønskelig å ha en kraftig økning av genekspresjon initialt og deretter ha et vedvarende lavt nivå av genekspresjon. Således kan en analog som stimulerer et høyt nivå av transkripsjon bli benyttet initialt som induserende agens og deretter kan det induserende agens bli byttet over til en analog som stimulerer et lavere nivå av transkripsjon. Videre kan det være mulig når man regulerer ekspresjonen av multiple nukleotidsekvenser (f.eks. når en sekvens blir regulert av en klasse av tet-operatorsekvens, eller sekvenser, og den andre blir regulert av en annen klasse av tet-operatorsekvens, eller sekvenser, som beskrevet over i Seksjon III, del C, over) og uavhengig variere nivået av ekspresjon av hver sekvens avhengig av hvilket transaktivator fusjonsprotein som blir benyttet for å regulere transkripsjon og hvilken Tc-analog, eller analoger, som blir benyttet som det induserende agens. Ulike transaktivator fusjonsproteiner kan forventes å vise ulike nivåer av respons til Tc-analogen. Nivå av induksjon av genekspresjon av en spesiell kombinasjon av transaktivator fusjonsprotein og induserende agens (Tc eller Tc-analog) kan bli bestemt ved teknikker som er beskrevet her (f.eks. se Eksempel 2). I tillegg kan nivået av genekspresjon bli modulert ved å variere konsentrasjonen av det induserende agens. Således frembringer ekspresjonssystemet fra oppfinnelsen en mekanisme ikke bare for å slå genekspresjon på eller av, men også for å finjustere nivået av genekspresjon på intermediære nivåer avhengig av type og konsentrasjon av induserende agens som blir benyttet.

B. Hemming av genekspresjon ved transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner

Oppfinnelsen frembringer også metoder for å hemme genekspresjon, ved hjelp av de transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteinene fra oppfinnelsen. Disse metoder kan bli benyttet for å nedregulere basal, konstitutiv eller vevsspesifikk transkripsjon av et tetO-koblet gen av interesse. For eksempel vil et gen av interesse som er operativt koblet til tetO-sekvenser og ytterligere positive regulatoriske elementer (f.eks. konstitutive eller vevsspesifikke forsterker-sekvenser) bli transkribert i vertsceller på et nivå som primært er bestemt av styrken av de positive regulatoriske elementer i vertscellen. Videre kan et gen av interesse som er operativt koblet til tetO-sekvenser og bare en minimal

promotersekvens, vise ulike grader av basalnivå-transkripsjon avhengig av vertscellen eller vev og/eller lokalisasjon av integrasjon av sekvensen. I en vertscelle som inneholder slik en målsekvens og som uttrykker et inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen, kan transkripsjon av målsekvensen bli nedregulert på en kontrollert måte ved å endre konsentrasjonen av Tc (eller analog) som er i kontakt med vertscellen. For eksempel når inhibitor fusjonsproteinet binder til tetO i fravær av Tc, blir konsentrasjonen av Tc som er i kontakt med vertscellen redusert for å hemme ekspresjon av målgenet. Fortrinnsvis blir en vertscelle dyrket i fravær av Tc for å holde målgenets ekspresjon hemmet. På samme måte blir Tc ikke tilført en vertsorganisme for å holde målgenets ekspresjon hemmet. Alternativt blir når inhibitor fusjonsproteinet binder til tetO i nærvær av Tc, konsentrasjonen av Tc som er i kontakt med vertscellen øket for å hemme ekspresjon av målgenet. For eksempel blir Tc tilsatt kulturmediet til en vertscelle eller Tc blir tilført en vertsorganisme for å hemme målgenets ekspresjon.

Inhibitor fusjonsproteinene som er beskrevet her kan hemme et tetO-koblet gen av interesse der tetO-sekvensene er plassert på 5' siden av en minimal promotersekvens (f.eks. tetracyklinregulert transkripsjonsenheter som beskrevet i Seksjon III, over). Videre kan inhibitor fusjonsproteinet bli benyttet for å hemme ekspresjon av et gen av interesse der tetO-koblede sekvenser er lokalisert på 3' siden av promotersekvensen, men på 5' siden av transkripsjonsstartsete. Videre kan inhibitor fusjonsproteinet bli benyttet for å hemme ekspresjon av et gen av interesse der tetO-koblede sekvenser er lokalisert på 3' siden av transkripsjonsstartsetet.

Ulike Tc-analoger som beskrevet i Seksjon VI, del A, over, med henblikk på transaktivator fusjonsproteinene kan på samme måte bli benyttet for å regulere aktiviteten av inhibitor fusjonsproteinene. Videre er metodene som benyttes til *in vitro* kultur med Tc (eller analog) og *in vivo* tilførsel av Tc (eller analog) beskrevet i seksjon VI, del A, like appliserbare til de transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner.

C. Kombinert positiv og negativ regulering av genekspresjon

I tillegg til å regulere genekspresjon ved hjelp av enten en transkripsjonell aktivator eller et inhibitor fusjonsprotein alene, kan de to typer av fusjonsproteiner bli benyttet i kombinasjon for å tillate både positiv og negativ regulering av

ekspresjon av ett eller flere målgener i en vertscelle. Således kan et transkripsjonelt inhibitor-protein som binder til tetO, enten (i) i fravær men ikke i tilstedeværelse av Tc, eller (ii) i nærvær av men ikke i fravær av Tc, bli benyttet i kombinasjon med et trans-aktivator protein som binder til tetO enten (i) i fravær
5 men ikke i nærvær av Tc, eller (ii) i nærvær men ikke i fravær av Tc.

Transaktivator-proteiner som binder til tetO i fravær men ikke i nærvær av Tc (f.eks. villtype TetR-aktivator fusjonsproteiner) er beskrevet i mer detalj i USSN 08/076,726, USSN 08/076,327 og USSN 08/260,452. Transaktivator fusjonsproteiner som binder til tetO i nærvær men ikke i fravær av Tc (f.eks.
10 muterte TetR-aktivator fusjonsproteiner) blir beskrevet her (se Seksjon I over) og i USSN 08/270,637 og USSN 08/275,876. Transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner er beskrevet her i Seksjon IV.

Som beskrevet over i Seksjon III, del C, når mer enn ett TetR fusjonsprotein blir uttrykt i en vertscelle eller organisme, kan ytterligere skritt bli tatt for å hemme
15 heterodimerisering mellom de ulike TetR fusjonsproteiner. For eksempel kan en transaktivator som består av TetR fra én klasse bli benyttet i kombinasjon med en transkripsjonell inhibitor som består av TetR av en annen ulik klasse som ikke heterodimeriserer med den første klasse av TetR. Som alternativ kan aminosyre-
rester i TetR som er involvert i dimerisering, bli mutert for å hemme heterodimeri-
20 sering. Imidlertid, selv om noen heterodimerisering mellom transaktivator og inhibitor fusjonsproteiner forekommer i en vertscelle, skulle tilstrekkelige mengder av homodimerer bli produsert til at effektiv positiv og negativ regulering skulle bli mulig som beskrevet her.

Det vil forstås av de som er trenet i faget at ulike kombinasjoner av aktivator
25 og inhibitor proteiner kan bli benyttet for å regulere et enkelt tetO-koblet gen av interesse på både en negativ og en positiv måte eller til å regulere multiple tetO-koblede gener av interesse på en koordinert måte eller på en uavhengig måte, ved å benytte de informasjoner som er beskrevet her. De nøyaktige regulatoriske komponenter som vil benyttes vil avhenge av genene som skal bli regulert og den
30 type regulering man ønsker. Flere eksempler av hvordan trans-aktivator og inhibitor fusjonsproteiner kan bli benyttet i kombinasjon er beskrevet videre nedenfor.

I en foretrukket versjon som er illustrert skjematisk i Figur 10, blir ekspresjon av et tetO-koblet målgen av interesse i en vertscelle regulert på både

en negativ og positiv måte ved kombinasjon av et inhibitor fusjonsprotein som binder til tetO i fravær, men ikke i nærvær av tetracyklin eller analog av dette (henvist til som et "tetracycline controlled silencing domain" eller tSD) og et aktivator fusjonsprotein som binder til tetO i nærvær men ikke i fravær av tetracyklin eller en analog av dette (henvist som et "reverse tetracycline controlled transactivator" eller rtTA). I tillegg til tetO-sekvenser er målgenet koblet til en promoter og kan inneholde andre positive regulatoriske elementer (f.eks. forsterkersekvenser) som bidrar til basalnivå, konstitutiv transkripsjon av genet i vertscellen. Binding av tSD til tetO-sekvensene i fravær av tetracyklin eller analog (f.eks. doksycyklin) hemmer den basale konstitutive transkripsjon av genet av interesse, og holder således genet av interesse i en undertrykket tilstand til genekspresjon blir ønsket. Når genekspresjon blir ønsket blir konsentrasjonen av tetracyklin eller analog (f.eks. doksycyklin) som er i kontakt med vertscellen øket. Idet medikamentet blir tilsatt mister tSD evnen til å binde til tetO-sekvenser mens det tidligere ikke-bundne rtTA oppnår evnen til å binde til tetO-sekvenser. Den resulterende binding av rtTA til tetO-sekvenser som er koblet til genet av interesse, stimulerer således transkripsjon av dette gen. Nivå av ekspresjon kan bli kontrollert ved hjelp av konsentrasjon av tetracyklin eller analog, type av Tc-analog som benyttes, varigheten av induksjon, etc. som beskrevet tidligere her.

det vil forstås at den motsatte kombinasjon av fusjonsproteiner (dvs. inhibitor binder i nærvær men ikke i fravær av medikamentet og aktivatoren binder i fravær men ikke i nærvær av medikamentet) også kan bli benyttet. I dette tilfelle blir ekspresjon av genet av interesse undertrykket ved å kontakte vertscellen med medikamentet (f.eks. dyrking med Tc eller analog) og genekspresjon blir aktivert ved at man fjerner medikamentet.

I en annen utførelse blir aktivator- og inhibitorfusjonsproteinene som beskrevet i det tidligere avsnitt, benyttet i kombinasjon for å koordinert regulere på både en positiv og en negativ måte to gener av interesse, idet man benytter den bidireksjonelle tetO-koblede transkripsjonsenhet som er beskrevet i Seksjon III, del B over. I dette tilfelle blir Gen 1 og Gen 2 koblet til den eller de samme tetO-sekvens eller sekvenser, men i motsatte retninger. Inhibitorfusjonsproteinet blir benyttet for å undertrykke basalnivå av transkripsjon av både Gen 1 og Gen 2 på en koordinert måte, mens transaktivator fusjonsproteinet blir benyttet for å stimulere ekspresjon av Gen 1 og Gen 2 på en koordinert måte.

I videre ennå en utførelse blir aktivator- og inhibitorfusjonsproteinene benyttet for uavhengig å regulere to eller flere gener av interesse, idet man bruker tetO-koblede transkripsjonsenheter som beskrevet i Seksjon III, del C over. For eksempel i en utførelse blir et transaktivator fusjonsprotein som binder til en klasse av tetO-sekvenser (f.eks. klasse A) i nærvær men ikke i fravær av Tc eller analog benyttet, i kombinasjon med et inhibitorfusjonsprotein som binder til en annen, ulik klasse av tetO-sekvenser (f.eks. klasse B) også i nærvær men ikke i fravær av Tc eller analog. I en vertscelle som inneholder Gen 1 koblet til klasse A tetO-sekvenser og Gen 2 koblet til klasse B tetO-sekvenser, vil begge gener bli uttrykt på basalnivåer i fravær av medikamentet, mens ekspresjon av Gen 1 vil bli stimulert idet medikamentet tilsettes og ekspresjon av Gen 2 vil bli undertrykket ved tilsetning av medikamentet.

Alternativt i en annen utførelse binder transaktivatoren til en klasse av tetO-sekvenser (f.eks. klasse A) i nærvær men ikke i fravær av Tc eller analog og inhibitor fusjonsproteinet binder til en annen, ulik klasse av tetO-sekvenser (f.eks. klasse B) i fravær men ikke i nærvær av Tc eller analog. I vertscellen som beskrevet i avsnittet over, vil Gen 1 bli uttrykt på basalnivåer i fravær av medikamentet og vil bli stimulert ved tilsetning av medikamentet, mens Gen 2 vil bli undertrykket i fravær av medikamentet men vil ha basalnivåekspresjon idet medikamentet blir tilsatt. Ulike andre mulige kombinasjoner vil være klar for den kompetente fagmann. Transaktivator og inhibitor fusjonsproteiner som binder til ulike klasser av tetO-sekvenser kan bli fremstillet som beskrevet i Seksjon I, del A. Mål-transkripsjonsenheter som omfatter tetO-sekvenser av ulike klasser kan bli fremstillet som beskrevet i Seksjon III, del C.

VII. Oppfinnelsens applikasjoner

Oppfinnelsen kan benyttes til en lang rekke av ulike situasjoner der det er ønskelig å ha evnen til å slå genekspressjon på eller av, eller å regulere nivå av genekspressjon, på en rask, effektiv og kontrollert måte uten at det fremkalles pleiotrope effekter eller celledødsitet. Således har oppfinnelsens system vide bruksmuligheter for å studere cellulær utvikling og differensiering i eukaryote celler, planter og dyr. For eksempel kan ekspresjon av onkogener bli regulert på en kontrollert måte i celler for å studere deres funksjon. I tillegg kan systemet bli benyttet for å regulere ekspresjon av setespesifikke rekombinaser, slik som CRE

eller FLP, for derved å tillate irreversibel modifikasjon av genotypen hos en transgen organisme under kontrollerte betingelser ved et spesielt utviklingsnivå. For eksempel kunne medikamentresistens-markører innført i genomet av transgene planter som tillater seleksjon av en spesiell transgen plante, bli
 5 irreversibelt fjernet via en Tc-regulert setespesifikk rekombinase. Andre applikasjoner av oppfinnelsens regulatoriske system inkluderer:

A. Genterapi

Oppfinnelsen kan være spesielt hensiktsmessig for genterapi-formål, med
 10 hensyn på behandling av enten genetiske eller ervervede sykdommer. Genterapi involverer som generell tilnærming at nukleinsyre introduseres inn i celler slik at ett eller flere genprodukter som kodes for av det introduserte genetiske materiale blir produsert i cellene for å gjenskape eller forsterke en funksjonell aktivitet. Oversiktsarbeider om genterapi-tilnærminger finnes i Anderson, W.F. (1992)
 15 Science 256:808-813; Miller, A.D. (1992) Nature 357:455-460; Friedmann, T. 1989) Science 244:1275-1281 og Cournoyer, D. et al., (1990) Curr. Opin. Biotech. 1:196-208. Imidlertid har nåtidens genterapivektorer vanligvis konstitutive regulatoriske elementer som responderer på endogene transkripsjonsfaktorer. Disse vektor-systemer tillater ikke en modulering av nivå av genekspresjon i et
 20 subjekt. I mot-setning til dette tillater det induserbare regulatoriske system fra oppfinnelsen denne mulighet.

For å bruke oppfinnelsens system for genterapiformål, blir i en utførelse celler fra et subjekt som har behov for genterapi, modifisert så de inneholder 1) nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen i en
 25 form som er passende for ekspresjon av transaktivatoren i vertscellene og 2) et gen av interesse (f.eks. for terapeutiske formål) som er operativt koblet til en tet-operatorsekvens, eller sekvenser. Subjektets celler kan bli modifisert *ex vivo* og deretter introdusert i subjektet eller cellene kan bli direkte modifisert *in vivo* (metoder for modifikasjon av cellene er beskrevet over i Seksjon II). Ekspresjon av
 30 genet av interesse i subjektets celler blir så stimulert ved tilførsel av Tc eller en Tc-analog til pasienten. Gen-ekspresjonsnivået kan bli variert avhengig av hvilken spesiell Tc-analog som benyttes som det induserende agens. Nivået av genekspresjon kan også bli modulert ved å justere dosen av tetracyklin, eller

analog, som blir tilført til pasienten for derved å justere konsentrasjonen som oppnås i sirkulerende kroppsvæsker og vevene av interesse.

Videre i en annen utførelse blir et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein benyttet for videre å kontrollere nivået av ekspresjon av genet av interesse. For eksempel kan subjektets celler bli modifisert så de også inneholder en nukleinsyre som koder for et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein som binder til tetO i fravær av Tc. Nukleinsyren er i en form som passer for ekspresjon av inhibitor fusjonsproteinet i vertscellene. Således vil før tilførsel av Tc (eller analog) til subjektet basalnivå av transkripsjon av genet av interesse bli holdt helt taust av inhibitor fusjonsproteinet. Ved tilførsel av Tc vil binding av inhibitor fusjonsproteinet til tetO bli hemmet, mens binding av transaktivator fusjonsproteinet vil bli indusert, noe som stimulerer transkripsjon av genet av interesse. Slik kombinert positiv og negativ regulering av genekspresjon idet man bruker både et transaktivator fusjonsprotein og et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein fra oppfinnelsen, blir illustrert skjematisk i Figur 10.

Konvensjonelle deteksjonsmetoder som er kjent i faget, slik som enzymkoblet immunosorbent assay, kan bli benyttet for å følge ekspresjonen av det regulerte protein av interesse i vertscellene og konsentrasjonen av Tc eller, Tc-analog, kan bli variert til det ønskede nivå av ekspresjon av proteinet av interesse blir oppnådd. Således kan ekspresjon av et protein av interesse bli justert basert på de medisinske behov hos et individ, noe som kan variere gjennom individets levetid. For å stoppe ekspresjon av genet av interesse i subjektets celler, kan tilførsel av det induserende agens bli stoppet. Således tilbyr det regulatoriske system fra oppfinnelsen den fordel fremfor konstitutivt regulatoriske systemer at det tillater modulering av nivået av gen-ekspresjon avhengig av kravene og behovene i den terapeutiske situasjon.

Gener av spesiell interesse som skal uttrykkes i et subjekts celler for behandling av genetisk eller ervervet sykdom, eller sykdommer, inkluderer de som koder for adenosin deaminase, Faktor VIII, Faktor IX, dystrophin, β -globin, LDL-reseptor, CFTR, insulin, erythropoietin, anti-angiogenese faktorer, veksthormon, glukocerebrosidase, β -glukuronidase, α 1-antitrypsin, fenylalanin-hydroksylase, tyrosin-hydroksylase, ornitin-transkarbamylase, arginosuccinat-syntetase, UDP-glukuronosyl-transferase, apoA1, TNF, løselig TNF-reseptor, interleukiner (f.eks.

II-2), interferoner (f.eks. α -, eller γ -IFN) og andre cytokiner og vekstfaktorer. Celler typer som kan bli modifisert for genterapiformål inkluderer hematopoietiske stamceller, myoblaster, hepatocytter, lymfocytter, hudepitelium og luftveiseepitelium. For videre beskrivelse av celletyper, gener og metoder for genterapi, se Wilson, J.M.

- 5 et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano, D. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Wolff, J.A. et al., (1990) Science 247:1465-1468; Chowdhury, J.R. et al., (1991) Science 254:1802-1805; Ferry, N. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Wilson J.M. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:963-967; Quantin, B. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
10 89:2581-2584; Dai, Y, et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:10892-10895; van Beusechem, V.W. et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Rosenfeld, M.A. et al. (1992) Cell 68:143-155; Kay, M.A. et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Cristiano, R.J. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126; Hwu, P. et al. (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; og Hertz, J. og
15 Gerard, R.D. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816.

Applikasjon av genterapi av spesiell interesse i kreftbehandling inkluderer overekspressjon av et cytokinen (f.eks. TNF- α) i tumorinfiltrerende lymfocytter eller et topisk ekspressjon av cytokiner i tumorceller for å indusere en anti-tumor immunrespons på tumorstedet), ekspressjon av et enzym i tumorceller som kan
20 omdanne et ikke-toksisk agens til et toksisk agens, ekspressjon av tumorspesifikke antigener for å indusere en antitumor immunrespons, ekspressjon av tumor-undertrykkende gener (f.eks. p53 eller Rb) i tumorceller, ekspressjon av et multi-medikament-resistensgen (f.eks. MDR1 og/eller MRP) i benmargceller for å beskytte dem mot kjemoterapi-toksisitet.

- 25 Applikasjon av genterapi av spesiell interesse i behandling av virus-sykdommer inkluderer ekspressjon av transdominante negative virus-transaktiveringsproteiner, slik som transdominant negativ tat og rev mutanter for HIV eller transdominante ICp4 mutanter for HSV (se f.eks. Balboni, P.G. et al., (1993) J. Med. Virol. 41:289-295; Liem, S.E. et al. (1993) Hum. Gene Ther. 4:625-
30 634; Malim, M.H. et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1197-1201; Daly, T.J. et al., (1993) Biochemistry 32:8945-8954; og Smith, C.A. et al (1992) Virology 191:581-588), ekspressjon av transdominante negative omgivende proteiner, slik som env mutanter for HIV (se f.eks. Steffy, K.R. et al. (1993) J. Virol. 67:1854-1859), intracellulær ekspressjon av antistoffer eller fragmenter av disse, rettet mot virale

produkter ("intern immunisering", se f.eks. Marasco, W.A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893) og ekspresjon av løselige virusreseptorer slik som løselig CD4. I tillegg kan oppfinnelsens system bli benyttet for å uttrykke under visse forhold, et selvmordsgen i celler, noe som ville tillate eliminering av cellene etter at de har utført en ønsket funksjon. For eksempel kan celler som benyttes for vaksinasjon bli eliminert i et subjekt etter en immunrespons har blitt fremkalt ved at ekspresjon av et selvmordsgen kan induseres i cellene ved tilførsel av Tc eller en Tc-analog til subjektet.

Det Tc-kontrollerte regulatoriske system fra oppfinnelsen har en rekke fordeler som passer spesielt godt til applikasjon av genterapi. For eksempel gir systemet en "på"/"av" genekspresjonsbryter som tillater regulert dosering av et genprodukt i et subjekt. Det er flere situasjoner der det kan være ønskelig å ha evne til å fremskaffe et genprodukt i spesifiserte mengder og/eller ved ulike tidspunkter på en regulert måte heller enn at man bare uttrykker genproduktet konstitutivt på et visst nivå. For eksempel kan et gen av interesse bli koblet på ved faste tidsintervaller (f.eks. hver dag, annenhver dag, hver uke, etc.) for å gi det mest effektive nivå av et genprodukt av interesse på de mest effektive tidspunkter. Nivået av genproduktet som er produsert i et subjekt, kan bli fulgt ved standardmetoder (f.eks. direkte analyse ved å bruke et immunologisk assay slik som ELISA eller RIA eller indirekte ved å følge en laboratoriefunksjon som er avhengig av funksjonen av genproduktet av interesse, f.eks. blodsukkernivå og lignende). Denne evne til å slå på ekspresjon av et gen ved spesifikke tidsintervaller i et subjekt mens man også tillater at genet blir slått av ved andre tidspunkter unnviker behovet for vedvarende tilførsel av et genprodukt av interesse ved avbrutte intervaller. Denne tilnærming unngår behovet for gjentatte injeksjoner av et genprodukt som kan være smertefull og/eller kan fremkalle bivirkninger og sannsynligvis ville kreve kontinuerlige besøk til en lege. I motsetning vil oppfinnelsens system unngå disse ulemper. Videre tillater evnen til å slå på ekspresjon av et gen ved spesifikke tidsintervaller i et subjekt en fokusert behandling av sykdommer som har aktivitetsøkninger (f.eks. mange autoimmunsykdommer) bare på tidspunkter når behandling er nødvendig under en akutt fase når smerte og symptomer er tydelige. I de perioder når slike sykdommer er i remisjon, kan ekspresjonssystemet bli holdt i en avslått tilstand.

Genterapi-applikasjoner som spesielt kan nyte godt av denne evne til å modulere genekspresjon ved de spesifikke tidsintervaller inkluderer de følgende, ikke-begrensede eksempler:

Reumatoid artritt - gener som koder for genprodukter som hemmer produksjon av inflammatoriske cytokiner (f.eks. TNF, IL-1 og IL-12) kan bli uttrykt i subjektet. Eksempler på slike inhibitorer inkluderer løselige former av en reseptor for cytokinet. I tillegg eller som alternativ kan cytokinene i IL-10 og/eller IL-4 (som stimulerer en beskyttende Th2-type respons) bli uttrykt. Videre kan en glukokortikomimetisk reseptor (GCMR) bli uttrykt.

Hypopituitarisme - genet for humant veksthormon kan bli uttrykt i slike subjekter selektivt i tidlig barnealder når genekspresjon er nødvendig til normal størrelse er oppnådd, ved dette tidspunkt kan genekspresjonen bli nedregulert.

Sårtilheling/vevsregenerering - faktorer (f.eks. vekstfaktorer, angiogene faktorer, etc.) som er nødvendige for tilhelingsprosessen, kan uttrykkes selektivt når de er nødvendige og så bli nedregulert.

Anti-kreftbehandlinger - Ekspresjon av genprodukter som er hensiktsmessige i anti-kreftbehandling kan bli begrenset til en terapeutisk fase til retardasjon av svulstveksten er oppnådd, hvorefter ekspresjon av genproduktet kan bli ned-regulert. Mulige systemiske anti-kreftbehandlinger inkluderer bruk av tumor-infiltrerende lymfocytter som uttrykker immunostimulatoriske molekyler (f.eks. IL-2, IL-12 og lignende), angiogenese-inhibitorer (PF4, IL-12, etc.), Her-regulin, Leukoregulin (se PCT Publication No. WO 85/04662) og vekstfaktorer for benmarg støtteterapi, slik som G-CSF, GM-CSF og M-CSF. Med henblikk på den siste benyttelse tillater bruk av oppfinnelsens regulatoriske system å uttrykke faktorer for benmarg støtteterapi en forenklet terapeutisk omkobling, ved regulære intervaller, fra kjemoterapi til benmarg støtteterapi (på samme måte kan slik en tilnærming også bli benyttet ved AIDS-behandling, for eksempel forenklet omkobling fra antiviral behandling til benmarg støttebehandling). Videre er kontrollert lokal målrettet anti-kreftbehandling mulige også. For eksempel uttrykking av et selvmordsgen ved hjelp av en av oppfinnelsens regulatorer der regulatoren selv er kontrollert av for eksempel en tumorspesifikk promotor eller bestrålingsindusert promotor.

I en annen utførelse benyttes oppfinnelsens regulatoriske system for å uttrykke angiogenesis-inhibitor (eller inhibitorer) fra innen en tumor via et transgen

som er regulert av oppfinnelsens system. Ekspresjon av angiogeneseinhibitorer på denne måte kan være mere effektivt enn ved systemisk tilførsel av inhibatoren og ville unngå enhver ødeleggende bivirkning som kunne følge systemisk tilførsel. Spesifikt kunne begrensning av angiogenese-inhibitor ekspresjon til å kun foregå
 5 innen tumorer være spesielt hensiktsmessige ved behandling av kreft hos barn som fremdeles er i ferd med å benytte angiogenese koblet til normal cellevekst.

I en annen utførelse kan regulert høyt-nivå ekspresjon av cytokiner representere en metode for å fokusere pasientens egen immunrespons på tumor-cellene. Tumorceller kan bli overført til å uttrykke kjemoattraktanter og vekst-
 10 fremmede cytokiner som er viktige i å øke et individs naturlige immunrespons. Siden de høyeste konsentrasjoner av cytokiner vil være i nærheten av tumoren er sannsynligheten for å fremkalle en immunologisk respons til tumorantigener også øket. Et potensielt problem med denne type terapi er at de tumorceller som produserer cytokinene vil også bli mål for immunresponsen og derfor vil
 15 cytokinenes kilde bli eliminert før alle tumorceller er sikkert utryddet. For å motvirke dette kan ekspresjon av virusproteiner som man vet maskerer infiserte celler fra immun-systemet, bli plassert under regulering, sammen med cytokingenet eller gener, i de samme celler. Et slikt protein er E19 proteinet fra adenovirus (se. f.eks. Cox, Science 247:715). Dette protein hindrer transport av
 20 klasse I HLA antigener til overflaten av cellen og forhindrer derved gjenkjennelse og oppløsning av cellen av vertens cytotoksiske T-celler. Således kunne regulert ekspresjon av E19 i tumor-celler beskytte cytokinproduserende celler fra cytotoksiske T-celler under påbegynnelsen av en immunrespons som er fremkalt av cytokinekspresjon. Etter en tidsperiode tilstrekkelig til å fjerne alle tumorcellene
 25 unntatt de som uttrykker E19, kan E19-ekspresjon bli slått av, noe som fører til at disse cellene deretter blir utsatt for den fremkalte antitumor-immunrespons.

Godartet prostatahypertrofi - På samme måte som over kan et selvmords-gen bli regulert ved hjelp av en av oppfinnelsens regulatorer, der regulatoren selv blir kontrollert av for eksempel en prostata-spesifikk promoter.

30 Evnen til å uttrykke et selvmordsgen (f.eks. et apoptosegen, TK-gen, etc.) på en kontrollert måte ved hjelp av det regulatoriske system fra oppfinnelsen, øker den generelle tillegg og hensiktsmessighet av systemet, for eksempel kan ved slutten av en ønsket terapi ekspresjon av et selvmordsgen bli slått på for å eliminere celler som har genterapivektoren, slik som celler i et bioinert implantat,

celler som har disseminert og spredd seg forbi og utenfor den ønskede originale plassering, etc. Videre kan dersom et transplantat transformeres til en svulst eller har sideeffekter, cellene raskt bli eliminert ved induksjon av selvmordsgenet. Bruk av flere enn én Tc-kontrollert på/av bryter i en celle tillater komplett uavhengig
 5 regulering av et selvmordsgen sammenlignet med regulering av et gen av terapeutisk interesse (som beskrevet i detalj her).

Oppfinnelsens regulatoriske system tillater videre evnen å etablere et terapeutisk relevant ekspresjonsnivå for et genprodukt av interesse i et subjekt, dette i motsetning til uregulert konstitutiv ekspresjon som ikke tillater noen
 10 fleksibilitet i nivået av genproduktekspresjon som kan oppnås. Et fysiologisk relevant nivå av genproduktekspresjon kan bli etablert basert på spesifikke medisinske behov hos subjektet, for eksempel basert på laboratorieanalyser som følger relevante gen-produktnivåer (ved bruk av metoder som er beskrevet over). I tillegg til de kliniske eksempler hvor genprodukter som allerede er diskutert over
 15 med gen til dosering av genprodukt er andre terapeutiske relevante genprodukter som kan bli uttrykt på ønsket nivå følgende: Faktor XIII og IX hos blødere (f.eks. kan ekspresjon bli hevet under perioder hvor skaderisiko øker, for eksempel under utøvelse av sport), insulin eller amylin hos diabetikere (ved behov, avhengig av sykdomstilstanden hos subjektet, diett, etc.), erythropoietin for å behandle
 20 erythrocytopeni (ved behov, for eksempel ved endestadiet av nyresvikt), lavtetthets-lipoproteinreseptor (LDLr) eller meget lavtetthets-lipoproteinreseptor (VLDLr) for arteriosklerose eller genterapi i lever (f.eks. ved bruk av *ex vivo* implantater). Applikasjoner for behandling av sentralnervesystemsykdommer omfattes også. For eksempel kan ved Alzheimers sykdom finjustert ekspresjon av cholinacetyl-
 25 transferase (ChAT) for å gjenopprette acetylcholin-nivåer, nevrotrope faktorer (f.eks. NGF, BDNF og lignende) og/eller komplementinhibitorer (f.eks. sCR1, sMCP, sDAF, sCD59, etc.) bli oppnådd. Slike genprodukter kan fremskaffes for eksempel av transplanterte celler som uttrykker genproduktene på en regulert måte ved hjelp av bruk av oppfinnelsens system. Videre kan Parkinsons sykdom
 30 bli behandlet med finregulert ekspresjon av tyrosin-hydroksylase (TH) for å øke nivåene av L-dopa og dopamin.

I tillegg til de proteinrelaterte genproduktene som er beskrevet over, kan genprodukter som er funksjonelle RNA-molekyler (slik som antisense RNA og ribozymmer) bli uttrykt på en kontrollert måte hos et individ for terapeutiske formål.

For eksempel kan et ribozym bli oppbygget som kan diskriminere mellom en mutert form av et gen og et villtype gen. Således kan et "korrekt" gen (f.eks. et villtype p53 gen) bli introdusert i en celle samtidig med introduksjon av et regulert ribozym som er spesifikt for den muterte form av dette gen (f.eks. et mutert
 5 endogent p53 gen) for å fjerne det defekte mRNA som uttrykkes fra det endogene gen. Denne tilnærming er spesielt fordelaktig i situasjoner der et genprodukt fra det defekte gen ville interferere med effekten til det eksogene villtype gen.

Ekspresjon av et genprodukt i et individ ved bruk av det regulatoriske system fra oppfinnelsen blir modulert ved bruk av tetracyklin eller analog av dette.

10 Slike medikamenter kan tilføres via enhver tilførselsvei som er passende for å tilføre medikamentet til området der effekt ønskes (f.eks. tilførsel til celler som inneholder et gen hvis ekspresjon skal bli regulert). Avhengig av de spesielle celletyper som er involvert, kan de foretrukne tilførselsveier inkludere oral tilførsel, intravenøs tilførsel og lokal tilførsel (f.eks. ved å bruke en "transdermal patch" for å
 15 rekke cellene til et lokalisert transplantat under huden, slik som keratinocytter, mens man unngår enhver mulig bivirkning fra systemisk behandling).

I visse genterapi-situasjoner kan det være nødvendig eller ønsket å ta skritt for å unngå eller hemme uønsket immunreaksjoner i et individ som får behandling. For å unngå en reaksjon mot cellene som uttrykker det terapeutiske genprodukt,
 20 blir vanligvis et individs egne celler benyttet, dersom mulig, for å uttrykke det terapeutiske genprodukt, enten ved *in vivo* modifikasjon av individets celler eller ved å fremskaffe celler fra individet, modifisere dem *ex vivo* og så føre dem tilbake til individet. I situasjoner der allogene eller xenogene celler blir benyttet for å uttrykke et genprodukt av interesse, kan oppfinnelsens regulatoriske system i
 25 tillegg til å regulere terapeutisk gen, også bli benyttet for å regulere ett eller flere gener som er involvert i immun-gjenkjennelsen av cellene slik at man kan hemme en immun-reaksjon mot de fremmede celler. For eksempel kan celleoverflate-molekyler som er involvert i gjenkjennelse av en fremmed celle av T-lymfocytene, bli nedregulert på overflaten av en fremmed celle som benyttes for avlevering av
 30 et terapeutisk genprodukt, for eksempel ved regulert ekspresjon i den fremmede celle av et ribozym som kløver det mRNA som koder for celleoverflatemolekylet. Spesielt foretrukne celleoverflatemolekyler som kan bli nedregulert på denne måte for å hemme en uønsket immunrespons, inkluderer klasse I og/eller klasse II hovedhistokompatibilitetskompleks (MHC) molekyler, kostimulerende molekyler

(f.eks. B7-1 og/eller B7-2), CD40, og ulike "adhesjons" molekyler, slik som ICAM-1 eller ICAM-2. Ved å bruke tilnærminger som er beskrevet her for å fremkalle uavhengig men koordinert regulering av multiple gener i den samme celle, kan nedregulering av ekspresjon av et celleoverflatemolekyl, eller molekyler, i en
5 vertscelle bli koordinert med oppregulering av ekspresjon av et terapeutisk gen. Således kan etter at terapien er komplett og ekspresjon av det terapeutiske gen er stoppet, ekspresjonen av det endogene celleoverflatemolekyl bli ført tilbake til normal.

Videre som beskrevet over i relasjon til anti-kreftbehandlinger kan et virus-
10 protein (f.eks. adenovirus E19 protein) som nedregulerer ekspresjon av MHC anti-gener, bli regulert i vertsceller ved bruk av oppfinnelsens system som en måte hvorved man kan unngå uønskede immunologiske reaksjoner.

I tillegg til å unngå eller hemme en immunrespons mot en fremmed celle som leverer et terapeutisk genprodukt, kan det også være nødvendig i visse
15 situasjoner å unngå eller hemme en immunrespons mot visse komponenter av det regulatoriske system fra oppfinnelsen (f.eks. regulator fusjonsproteinene som er beskrevet her) som blir uttrykt i et subjekt, siden disse fusjonsproteiner inneholder ikke-pattedyr polypeptider som kan stimulere en uønsket immunreaksjon. I denne henseende kan regulator fusjonsproteiner bli planlagt og/eller utvalgt for med
20 henblikk på en minsket evne til å stimulere en immunrespons hos en vert. For eksempel kan et transkripsjons aktivator-domene til bruk i regulator fusjonsproteinet bli utvalgt som har minimal immunogenisitet. I denne henseende er det mulig at et villtype transkripsjons aktiveringsdomene fra herpes simplex-virusproteinet VP16 ikke nødvendigvis er et foretrukket transkripsjons aktiverings-
25 domene til bruk *in vivo*, siden dette protein kan fremkalle en immunrespons hos pattedyr. Alternative transkripsjons aktiveringsdomener kan bli benyttet, som beskrevet her, basert på deres reduserte immunogenisitet hos et individ. For eksempel kan et transkripsjons aktiveringsdomene av et protein fra den samme dyreart som verten bli foretrukket (f.eks. et transkripsjons aktiveringsdomene fra et
30 humant protein til bruk som et regulatorisk fusjonsprotein hos mennesker). Alternativt kan et regulatorisk fusjonsprotein fra oppfinnelsen bli modifisert for å redusere dets immunogenisitet hos individer, f.eks. ved å identifisere og modifisere én eller flere dominante T-celle-epitoper innen et polypeptid fra fusjonsproteinet (f.eks. enten Tet repressor-delen eller den transkripsjonelle

modulator del, slik som et VP16 polypeptid). Slike T-celleepitoper kan bli indentifisert ved standardmetoder og endret ved mutagenese, igjen ved bruk av standardmetoder. En modifisert form av et regulator fusjonsprotein kan deretter bli utvalgt som bevarer dets originale transkripsjonelle regulatoriske evne, men som
 5 likevel viser redusert immunogenisitet hos et subjekt når det sammenlignes med et ikke-modifisert fusjonsprotein.

I tillegg til de foregående opplysninger kan alle konvensjonelle metoder for generelt eller spesifikt å nedregulere immunresponser hos individer bli kombinert med bruk av oppfinnelsens regulatoriske system i situasjoner der inhibisjon av
 10 immunresponser er ønsket. Generelle immuno-suppressive agens slik som syklosporin A og/eller FK506 kan bli tilført individet. Som alternativ kan immunmodulatoriske agens som tillater mere spesifikk immunsuppresjon bli benyttet. Slike agens kan inkludere hemmere av kostimulatoriske molekyler (f.eks. et CTLA4Ig fusjonsprotein, løselig CD4, anti-CD4 antistoff, anti-B7-1 og/eller anti-
 15 B7-2 antistoff eller anti-gp39 antistoff).

Til slutt i visse situasjoner kan en leveringsmåte for celler som uttrykker et terapeutisk gen bli valgt som minimaliserer eksponering av transplanterte celler mot immunsystemet. For eksempel kan celler bli implantert i en bioinert kapsel eller i biokompatible membraner med porer som tillater diffusjon av proteiner
 20 (f.eks. et terapeutisk genprodukt av interesse) ut av implantatet og diffusjon av næringsstoff og oksygen inn i implantatet, men som hemmer adgang av immun-celler, og derved unngår eksponering av de transplanterte celler til immunsystemet (slik som har blitt benyttet ved transplantasjon av celler fra Langerhanske øyer).

25 **B. Produksjon av proteiner *in vitro***

Storskalaproduksjon av et protein av interesse kan oppnås ved å bruke celler dyrket *in vitro* som har blitt modifisert slik at de inneholder 1) en nukleinsyre som koder for et transaktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen i en form som er passende for ekspresjon av transaktivatoren i cellene, og 2) et gen som koder for
 30 et protein av interesse operativt koblet til en tet-operatorsekvens, eller sekvenser. For eksempel kan pattedyrceller, gjærceller eller soppceller bli modifisert slik at de inneholder disse nukleinsyrekomponentene som beskrevet her. De modifiserte pattedyr-, gjær- eller soppceller kan deretter dyrkes ved standard dyrknings-teknikker i nærvær av Tc eller en analog av dette, for å indusere ekspresjon av

genet og produsere proteinet av interesse. Således gir oppfinnelsen en produksjonsprosess for å isolere et protein av interesse. I prosessen blir en vertscelle (f.eks. en gjærscelle eller en sopp) som har fått introdusert både en nukleinsyre som koder for transkriptivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen og en
5 nukleinsyre som koder for et protein av interesse operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens, dyrket i produksjonsskala i et kulturmedium i nærvær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog for å stimulere transkripsjon av nukleotidsekvensen som koder for proteinet av interesse (dvs. nukleotidsekvensen som er operativt koblet til tet-operatorsekvens, eller sekvenser) og proteinet av
10 interesse blir isolert fra de høstede vertsceller eller fra kulturmediet. Standard protein rensningsteknikker kan benyttes for å isolere proteinet av interesse fra mediet eller fra de høstede celler.

C. Produksjon av proteiner *in vivo*

15 Oppfinnelsen gir også metoder for storskala produksjon av et protein av interesse i dyr, som i transgene husdyr. Fremskritt i transgen teknologi har gjort det mulig å produsere transgene husdyr, slik som kuer, geiter, griser og sauer (oversiktsartikkel av Wall R.J. et al. (1992) J. Cell. Biochem. 49:113-120; og Clark, A.J. et al. (1987) Trends in Biotechnology 5:20-24). Således kan transgene husdyr
20 som bærer i deres genom komponentene av det induserbare regulatoriske system fra oppfinnelsen bli konstruert, der et gen som koder for et protein av interesse blir operativt koblet til minst tet-operatorsekvens. Genekspresjon og således proteinproduksjon blir indusert ved tilførsel av Tc (eller analog av dette) til det transgene dyr. Proteinproduksjon kan bli rettet til et spesielt vev ved å koble nukleinsyren
25 som koder for transaktivator fusjonsprotein til et passende vevsspesifikt regulatorisk element, eller elementer, som begrenser ekspresjon av transaktivatoren til visse celler. For eksempel kan et brystkjertel spesifikt regulatorisk element, slik som melkemyse promotor (U.S. Patent No. 4,873,316 og European Application Publication No. 264,166) bli koblet til transaktivator
30 transgenet for å begrense ekspresjon av transaktivatoren til melkekjertelvev. Således vil i nærvær av Tc (eller analog) proteinet av interesse bli produsert i melkekjertelvevet hos det transgene dyr. Proteinet kan bli konstruert for å bli skilt ut i melken hos det transgene dyr og, om ønsket, kan proteinet så bli isolert fra melken.

D. Dyremodeller av humane sykdommer

De transkripsjonelle aktivator og inhibitor proteinene fra oppfinnelsen kan bli benyttet alene eller i kombinasjon for å stimulere eller hemme ekspresjon av

5 spesifikke gener hos dyr for å etterligne patofysiologien av humane sykdommer og derved produsere dyremodeller av humane sykdommer. For eksempel kan i et vertsdyr et gen av interesse som man tror er involvert i en sykdom, bli plassert under den transkripsjonelle kontroll av én eller flere tet-operatorsekvenser (f.eks. ved homolog rekombinasjon som beskrevet her). Et slikt dyr kan så parres til et

10 annet dyr som har ett eller flere transgener for et transaktivator fusjonsprotein og/eller et inhibitor fusjonsprotein for å produsere avkom som bærer både et tetracyklin-regulert fusjonsprotein-gen og en tet-regulert målsekvens. Ekspresjon av genet av interesse hos dette avkom kan bli modulert ved bruk av tetracyklin (eller analog). For eksempel kan ekspresjon av genet av interesse bli nedregulert

15 ved bruk av et transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein for å undersøke sammenhengen mellom genekspresjon og sykdommen. Slik en tilnærming kan være mere fordelaktig enn gen "knock out" ved hjelp av homolog rekombinasjon for å produsere dyremodeller av ulike sykdommer, siden det tet-regulerte system beskrevet her tillater kontroll av både ekspresjonsnivået av genet av interesse og

20 tidspunktet når genekspresjonen blir ned- eller oppregulert.

E. Produksjon av stabile cellerlinjer for genkloning og andre brukerområder

Det transkripsjonelle inhibitorsystem som beskrives her kan bli benyttet for

25 å holde genekspresjonen slått av (dvs. uttrykket) og derved tillate produksjon av stabile cellerlinjer som under andre betingelser ikke ville bli produsert. For eksempel kan stabile cellerlinjer som bærer gener som er cytotoxiske for cellen være vanskelig eller umulig å produsere på grunn av tendens til lavnivå spontan ekspresjon av de toksiske gener. Ved å hemme genekspresjon av slike toksiske

30 gener ved bruk av de transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner fra oppfinnelsen kan stabile cellerlinjer som bærer toksiske gener bli skapt. Slike stabile cellerlinjer kan deretter bli benyttet for å klonе slike toksiske gener (f.eks. indusering av ekspresjon av de toksiske gener under kontrollerte betingelser ved hjelp av Tc eller analog). Vanlige metoder for ekspresjonskloning av gener som kan

appliseres til det transkripsjonelle inhibitorsystem fra oppfinnelsen er vel kjent i faget (se f. eks. Edwards, C.P. og Aruffo, A (1993) Curr. Opin. Biotech. 4:558-563). Videre kan det transkripsjonelle inhibitorsystem bli benyttet for å hemme basalekspresjon av gener i andre celler for å skape stabile cellelinjer slik som i embryonale stamceller (ES). Residual ekspresjon av visse gener som er introdusert inn i ES-celler kan resultere i en manglende evne til å isolere stabile transfekterte kloner. Inhibisjon av transkripsjon av slike gener ved bruk av det transkripsjonelle inhibitorsystem beskrevet her, kan være hensiktsmessig for å overvinne dette problem.

10

F. Transgene organismer

Nukleinsyre som koder et transaktivator fusjonsprotein kan bli overført til en befruktet eggcelle fra et ikke-humant dyr for å skape et transgent dyr som uttrykker fusjonsproteinet fra oppfinnelsen i én eller flere celletyper. Et transgent dyr er et dyr som har celler som inneholder et transgen, der transgenet ble introdusert i dyret eller en forgjenger av dyret på et stadium før fødsel, dvs. embryonalt stadium. Et transgen er et DNA som er integrert i genomet til en celle, hvorfra et transgent dyr utvikles og som forblir i det modne dyrs genom, og derved dirigerer ekspresjon av et genprodukt som er kodet i én eller flere celletyper eller vev hos det transgene dyr. Det ikke-humane dyr kan være en mus. Andre transgene dyr kan være en geit, sau, gris, ku eller andre landbruksdyr. Slike transgene dyr er hensiktsmessige med henblikk på produksjon av proteiner i stor skala (såkalt "gene pharming").

Et transgent dyr kan skapes ved for eksempel å introdusere en nukleinsyre som koder for fusjonsproteinet (vanligvis koblet til passende regulatoriske elementer slik som konstitutive eller vevsspesifikke forsterkere) inn i den maskuline pronukleus i en befruktet eggcelle, for eksempel ved mikroinjeksjon, hvorefter eggcellen blir tillatt å utvikles i et pseudogavid hunnfosterdyr. Intronsekvenser og polyadenyleringssignaler kan også bli inkludert i transgene for å øke effektiviteten av transgenets ekspresjon. Metoder for å produsere transgene dyr, spesielt dyr som mus, har blitt konvensjonelle i faget og er beskrevet, for eksempel i US-patent nr. 4,736,866 og 4,870,009 og i Hogan, B. et al. (1986) A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory. Et transgent grunnlegger-dyr kan benyttes for å avle ytterligere dyr som bærer

transgenet. Transgene dyr som bærer et transgen som koder for fusjonsproteinet fra oppfinnelsen kan videre bli avlet til andre transgene dyr som bærer andre transgen, for eksempel til et transgent dyr som inneholder et gen som er operativt koblet til en tet-operatorsekvens (diskutert i større detalj i Seksjon III, under).

5 Det vil forstås at i tillegg til transgene dyr kan det regulatoriske system som er beskrevet her, bli applisert til andre transgene organismer, slik som transgene planter. Transgene planter kan bli fremskaffet ved konvensjonelle teknikker som er kjent i faget.

10 **G. Homologe rekombinante organismer**

Det beskrives også en homologt rekombinant ikke-human organisme som uttrykker fusjonsproteinet fra oppfinnelsen. Begrepet "homologt rekombinant organisme" som brukt her ønskes å beskrive en organisme, for eksempel dyr eller planter, som inneholder et gen som har blitt modifisert ved homolog

15 rekombinasjon mellom genet og et DNA-molekyl introdusert i en celle hos dyret, for eksempel en fostercelle fra dyret. Det ikke-humane dyr kan være en mus. Et dyr kan skapes der nukleinsyre som koder for fusjonsproteinet har blitt introdusert inn i et spesifikt sete på genomet, dvs. nukleinsyren har homologt rekombinert med et endogent gen.

20 For å skape et slikt homologt rekombinant dyr blir en vektor preparert som inneholder DNA som koder for fusjonsproteinet, omgitt på dets 5' og 3' ender av ytterligere nukleinsyre fra et eukaryot gen der den homologe rekombinasjonen skal forekomme. Den ekstra nukleinsyre som omgir det som koder for fusjonsproteinet er tilstrekkelig lang til at vellykket homolog rekombinasjon med det

25 eukaryote gen kan forekomme. Vanligvis er flere kilobaser av omgivende DNA (både ved 5' og 3' endene) inkludert i vektoren (se f.eks. Thomas, K.R. og Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 for en beskrivelse av homologe rekombinasjonsvektorer). Vektoren blir introdusert i en embryonal stamcellelinje (f.eks. ved elektroporering) og celler der det introduserte DNA har homologt

30 rekombinert med det endogene DNA blir utvalgt (se f.eks. Li, E. et al., (1992) Cell 69:915). De utvalgte celler blir så injisert i en blastocyst fra et dyr (f.eks. en mus) for å danne aggregerings-kimærer (f.eks. Bradley, A. i Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). Et kimær-embryo kan så bli implantert i et passende

pseudogavid hunnfosterdyr og embryo bli brakt frem til termin. Avkom som har det homologt rekombinerte DNA i deres kjønnsceller, kan bli benyttet for å avle dyr der alle cellene inneholder det homologt rekombinerte DNA. Disse "kjønnscele transmisjon" dyrene kan deretter parres med dyr som er bærere av et gen som er operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens (mer detaljert diskutert i Seksjon III, under).

I tillegg til den homologe rekombinasjonsmetode som er beskrevet ovenfor, er det kjent enzymassisterte setespesifikke integrasjonssystemer som blir applisert til komponentene i oppfinnelsens regulatoriske system for å integrere et DNA-molekyl på en på forhånd bestemt plass i et annet mål-DNA-molekyl. Eksempler på slike enzymassisterte integrasjonssystemer inkluderer Cre rekombinase-lox målsystem (f.eks. som beskrevet i Baubonies, W og Sauer, B. (1993) Nucl. Acids. Res. 21:2025-2029; og Fukushige, S. og Sauer, B. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7905-7909) og FLP rekombinase-FRT målsystemet (f.eks. som beskrevet i Dang, D.T. og Perrimon, N. (1992) Dev. Genet. 13:367-375; og Fiering, S. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8469-8473).

Fordeler

Det induserbare regulatoriske system fra oppfinnelsen som benytter et transaktivator fusjonsprotein, tar for seg og løser mange av de begrensninger av andre induserbare regulatoriske systemer som er kjent i faget. For eksempel er meget høye intracellulære konsentrasjoner av det transkripsjonelle aktivator fusjonsprotein fra oppfinnelsen ikke nødvendig for effektiv regulering av gen-ekspresjon. I tillegg, siden genekspresjon blir indusert ved å tilsette i stedet for å fjerne, det induserende agens, blir induksjonskinetikken i oppfinnelsens system ikke begrenset av hastigheten av fjernelse av det induserende agens, og er derfor normalt vesentlig raskere. Videre er det induserende agens bare tilstede mens gentranskripsjonen blir indusert, noe som unngår behovet for en kontinuerlig tilstedeværelse av et agens for å holde genekspresjonen slått av.

Bruk av de transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner fra oppfinnelsen for å hemme transkripsjon i eukaryote celler gir også fordeler sammenlignet med bruk av prokaryote repressorer alene (f.eks. TetR, lacR) for å hemme transkripsjon i eukaryote celler. Siden inhibitor fusjonsproteinene fra oppfinnelsen inneholder et

eukaryotisk transkripsjonelt repressor-domene burde disse fusjonsproteiner være mere effektive i å undertrykke transkripsjon i eukaryote celler, og de kan derfor muligens ha behov for lavere intracellulære konsentrasjoner for å fremkalle effektiv represjon med mindre sjanse av "leakiness". I tillegg kan ved innførsel av tetO-sekvenser inn i den regulatoriske region av et endogent gen i transkripsjonelle inhibitor fusjonsproteiner fra oppfinnelsen bli benyttet for å nedregulere konstitutiv og/eller vevsspesifikk ekspresjon av endogene gener.

Videre i motsetning til ulike versjoner av lac-systemet (f.eks. Labow et al., (1990) Mol. Cell. Biol. 10:3343-3356; Baim et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5072-5076), som blir begrenset av de negative egenskaper til det induserende agens (IPTG) og/eller av behovet for å øke temperaturen som er nødvendig for å indusere genekspresjon (som kan fremkalle pleiotrope effekter), har det induserende agens benyttet i oppfinnelsens system (Tc eller en analog av dette) mange fordelaktige egenskaper: 1) Tc og analoger av dette viser høy affinitet for TetR og lav toksisitet for eukaryote celler, og kan således bli benyttet for gen-induksjon i konsentrasjoner som ikke affiserer cellevekst eller morfologi, 2) Tc-analoger som bevarer TetR-binding men som har redusert antibiotisk aktivitet eksisterer og disse kan benyttes som induserende agens, noe som unngår mulige bivirkninger fra de antibiotiske egenskaper hos Tc, 3) de farmakokinetiske egenskaper hos Tc og Tc-analoger tillater raskt og effektivt cellulært opptak og penetrasjon av fysiologiske barrierer, slik som livmorkaken eller blod-hjernebarrieren, og 4) Tc-analoger med ulike induksjonsevner tillater modulering av genekspresjonsnivået.

Således fremskaffer oppfinnelsen et induserbart regulatorisk system som tillater rask aktivering av gentranskripsjon uten cellulær toksisitet og et bredt område av induksjonsindekser. Økning av genekspresjon etter induksjon er vanligvis mellom 1000 og 2000 ganger og kan være så høy som 20.000 ganger. Alternativt kan lavere nivåer av geninduksjon, f.eks. 10 ganger, oppnås avhengig av hvilket induserende agens som benyttes. Dette system kan bli benyttet i en lang rekke ulike applikasjoner. Disse applikasjoner inkluderer genterapi, storskalaproduksjon av proteiner i dyrkede celler eller i transgene husdyr, og i studiet av genfunksjon, f.eks. i forhold til cellulær utvikling og differensiering. Videre tillater de nye transkripsjonseenheter fra oppfinnelsen koordinert eller

uavhengig regulering av ekspresjon av multiple gener ved bruk av de regulatoriske komponenter fra oppfinnelsen.

Denne oppfinnelse blir videre illustrert ved de følgende eksempler. Alt innhold av referanser, patenter og publiserte patentsøknader som siteres i denne søknad blir herved inkorporert som referanser.

EKSEMPEL 1: Seleksjon av en mutert Tet repressor og konstruksjon av en tetracyklin-induserbar transkripsjonell aktivator

En "revers" Tet repressor, som binder til dets mål-DNA i nærvær i stedet for i fravær av tetracyklin ble degenerert ved kjemisk mutagenese og seleksjon, essensielt som beskrevet i Hecht, B. et al. (1993) J. Bacteriology 175:1206-1210, Enkelt-trådet DNA (kodende og ikke-kodende tråder) som kodet for villtypen Tn10-derivert Tet repressoren ble utsatt for kjemisk mutagenese med natriumnitritt. Enkelt-trådet DNA (40 µg i 40 µL i Tris-EDTA buffer) ble blandet med 10 µL av 2,5 M natriumacetat (pH 4,3) og 50 µL av natriumnitrat, mellom 0,25 M og 2 M, og inkubert i 45 til 60 minutter ved romtemperatur. Etter mutagenese ble den komplementære tråd syntetisert ved bruk av revers transkriptase eller ved amplifikasjon ved bruk av polymerase kjedereaksjon med Taq DNA polymerase. Siden mutageneseprosedyren fører til multiple mutasjoner i DNA ble tre fragmenter av genet, hver på ca. 200 basepar, individuelt subklonet inn i et villtype Tet repressor-gen i en rekombinant ekspresjonsvektor for å byttes ut med den korresponderende del av villtype-genet. Dette skapte en samling av muterte tet repressor-gener der hvert gen hadde for det meste enkeltmutasjoner i det 200 basepar stor muterte fragmentet av genet.

Samlingen av muterte Tet ble undersøkt i et genetisk analysesystem som velger positivt for en funksjonell interaksjon mellom en Tet repressor og dets relevante operator ved bruk av *E. coli* type WH207(λWH25) (konstruksjon av denne type er beskrevet i detalj hos Wissmann, A. et al. (1991) Genetics 128:225-232). I denne *E. coli* type dirigerer tet-operatorer ekspresjonen av divergerende arrangert β-galaktosid (*lacZ*) og Lac repressor (*lacI*) gener og lac regulatoriske regionen dirigerer ekspresjon av et galaktokinase (*galk*) gen. Binding av tet repressorer til tet-operatorer slår transkripsjon av *lacI*- og *lacZ*-genene av. Fravær av Lac repressor tillater ekspresjon av *galk*-genet, noe som gjør *E. coli* bakterien i

stand til å bruke galaktose som den eneste karbonkilde, noe som fungerer som en markør. lacZ⁻ fenotypen fungerer som en annen markør. Således har bakterier som inneholder Tet repressorer som binder til tet-operatorer en Gal⁺, lacZ⁻ fenotype. Bakterier som inneholder villtype Tet repressorer har en Gal⁺, lacZ⁻ fenotype i fravær av tetracyklin. En mutert "revers" tet repressor (rTetR) ble utvalgt basert på en Gal⁺, lacZ⁻ fenotype i nærvær av tetracyklin.

Nukleotid- og aminosyresekvensen til rTetR mutanten vises i SEKV ID NR:1 (nukleotidposisjoner 1-621) og 2 (aminosyreposisjoner 1-207), henholdsvis.

Sekvensanalyse av rTetR mutanten viste de følgende aminosyre- og nukleotidendringer:

aminosyre (posisjon)		affisert kodon	
villtype	mutant	villtype	mutant
glu(71)	lys	GAA	AAA
asp(95)	asn	GAT	AAT
leu(101)	ser	TTA	TCA
gly(102)	asp	GGT	GAT

To ytterligere mutasjoner førte ikke til endring av aminosyre:

aminosyre (posisjon)		affisert kodon	
villtype	mutant	villtype	mutant
leu(41)	leu	TTG	CTG
arg(80)	arg	CGT	CGC

For å overføre rTetR mutanten til en transkripsjonell aktivator ble et XbaI/Eco47III fragment på 399 basepar som kodet for aminosyrene 3 til 135 av rTetR (dvs. inneholdende den muterte region) byttet ut med det tilsvarende restriksjonsfragment fra ekspresjonsvektoren pUHD15-1 for å produsere pUHD17-1. I pUHD15-1 er nukleotidsekvenser som koder for villtype TetR koblet i leserammen til nukleotidsekvenser som koder for de C-terminale 130 aminosyrer fra herpes simplex-virus VP16. Disse transaktivatorsekvenser er omgitt oppstrøms av en CMV promoter/enhancer og nedstrøms av et SV40 poly(A)-sete (konstruksjonen av pUHD15-1 er beskrevet i større detalj i USSN 08/076,726 og

Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551).

Således er i pUHD17-1 nukleotidsekvenser som koder for den reverse TetR mutant koblet i leseramme til VP16 sekvenser for å skape en revers Tc-kontrollert transaktivator (referert til her som tTA^R). Den tilsvarende utbytting av den muterte region av rTetR for villtype regionen av TetR ble utført med plasmid pUHD152-1, som er den samme som pUHD15-1 med det unntak at den i tillegg inneholder nukleotidsekvenser som koder for et nukleært lokalisasjonssignal som er koblet i leseramme til 5' enden av nukleotidsekvensene som koder for Tet repressoren. Aminosyresekvensen av det nukleære lokalisasjonssignal er MPKRPRP (SEKV ID NR:5), som er koblet til serinet ved aminosyreposisjon 2 i TetR. Den resulterende ekspresjonsvektor koder for den reverse Tc-kontrollerte transaktivator inkluderende et nukleært lokalisasjonssignal (referert til her som ntTA^R) og ble benevnt pUHD172-1.

EKSEMPEL 2: Tetracyklin-indusert stimulering av transkripsjon ved tTA^R

Transient transfeksjon

pUHD17-1 og pUHD172-1 ekspresjonsvektorene ble forbigående transfektert ved en standard kalsiumfosfatmetode inn i HeLa celler sammen med et reporter-plasmid, pUHC13-3, der heptamere tet-operatorer er fusjonert inn oppstrøms fra en minimal hCMV-promoter og et luciferase reporter-gen (reporter-plasmiden er beskrevet i detalj i USSN 08/076,726 og Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551). Etter inkubasjon av de transfekterte celler ved 37°C i 20 timer i nærvær eller fravær av tetracyklin (eller en analog), ble luciferase-aktivitet analysert som følger: celler som var dyrket til ca. 80% kontinuitet i 35 mm skåler i Eagle's minimalt essensielle medium ble vasket med 2 mL av fosfatbuffret saltvann før de ble oppløst i 25 mM Tris fosfat, pH 7,8/2 mM dithiothreitol/2 mM diaminocykloheksantetraeddiksyre/10% glycerol/1% Triton x 100 i 10 minutter ved romtemperatur. Lysatet ble skrapet av cellekulturskålene og sentrifugert i 10 sekunder i en Eppendorf sentrifuge. 10 µL alikvoter av super-natanten ble blandet med 250 µL av 25 mM glycylglycin/15 mM MgSO₄/5 mM ATP og analysert for luciferaseaktivitet i et Lumat LB9501 (Berthold, Wildbad, Tyskland) ved bruk av integral analysemåte (10 sekunder). D-luciferin

(L6882, Sigma) ble benyttet ved en konsentrasjon på 0,5 mM. Bakgrunnssignalet som ble målt i ekstrakter av HeLa celler som ikke inneholdt et luciferase-gen var ikke mulig å skille fra instrument-bakgrunnen (80-120 relative lysenheter (rlu)/10 sekunder). Proteininnhold i lysatet ble bestemt etter Bradford (Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254). Celler som var transfektert med plasmider som kodet enten for tTA^R eller ntTA^R viste en øket mengde av luciferaseaktivitet i nærvær av tetracykliner. Denne effekt var gjennomgående mere uttalt når anhydrotetracyklin (ATc) ble benyttet i stedet for vanlig tetracyklin.

10 Stabil transfeksjon

Etter denne analyse av kortvarig transfeksjon ble ekspresjonsvektorer preparert for å brukes til stabil transfeksjon av celler. En pSV2neo-avledet neomycin potstandskassett (beskrevet i Southern, P.J. og Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341) ble integrert inn i transaktivator ekspresjonsvektorene pUHD17-1 og pUHD172-1, noe som resulterte i pUHD17-1neo og pUHD172-1neo, henholdsvis. pUHD172-1neo, som koder for ntTA^R ble stabilt integrert i HeLa celler ved hjelp av standardteknikker. Ti G418-motstandsdyktige cellekloner ble analysert med henblikk på deres fenotype ved transient supertransfeksjon med pUHC13-3 som har luciferase-genet under kontroll av en minimal CVM-promoter og tet-operatorer. Tre kloner, kalt HR4, HR5 og HR10, viste en sterk økning av luciferaseaktivitet i nærvær av ATc. Fra disse kloner ble HR5 utvalgt for videre eksperimenter.

For å produsere stabile transfektanter for både ntTA^R og et tet-operatorer-koblet luciferase reporter-gen ble HR5-celler kotransfektet med pUH13-3 og pHMR272, som koder for hygromycin resistens (se Bernhard, H-U. et al. (1985) Exp. Cell Res. 158:237-243) og hygromycin motstandsdyktige kloner ble utvalgt. I et analogt eksperiment ble HR5 celler kotransfektet med pUH13-7 og pHMR272. pUH13-7 inneholder en minimal promotersekvens som omfavner posisjonene +19 til -37 av HSVtk promoteren ved siden av de heptamere tetO-sekvenser i stedet for en minimal CMV promoter. Fra 21 hygromycin resistente kloner viste ti induserbar luciferaseaktivitet når Tc eller doksycyklin (Dc) ble tilført kulturmediet. Kloner som inneholdt luciferase reporter-genet koblet til en minimal CMV promoter blir beskrevet her som HR5-C, mens de som inneholdt luciferase reporter-genet koblet til en minimal tk promoter blir beskrevet som HR5-T.

Seks av HR5 klonene stabilt transfektert med en ntTA^R-avhengig reporter-enhet og tidligere vist å være responsive til tetracykliner, ble dyrket i parallell i fravær og nærvær av 1 µg/mL doksycyklin. Omtrent tre ganger 10⁴ celler ble platet ut i hver 35 mm skål (4 skåler for hver klon). Etter vekst i 60 timer, ble cellene

5 høstet og luciferaseaktivitet av ekstraktene (i relative lysenheter) (rlu)/µg ekstrahert protein) ble bestemt. Som vist i Tabell 1 viser de absolutte ekspresjonsnivåene til seks kloner at aktivering av luciferase-genekspresjon oppnås over tre størrelses-ordner hos flere av de doble stabile cellelinjer som inneholder det ntTA^R regulatoriske system.

10 Det er av betydning at til og med høyere induksjonsfaktorer (f.eks. så høy som en 20.000 ganger økning i ekspresjon) kunne bli oppnådd dersom man i stedet å for bare å tilsette det induserende agens til kulturmediet vasket cellene før induksjon og deretter sådde dem ut i ferskt kulturmedium som inneholdt det induserende agens.

15 **TABELL 1. Doksycyklin-avhengig luciferaseaktivitet av dobbel stabil luc+/HR5 cellekloner**

Luciferaseaktivitet, rlu/µg protein				
20	Klone	-Doksycyklin	+Doksycyklin	Induksjonsfaktor
	HR5-C6	65	54,911	845
		62	69,525	1120
	HR5-C11	100	165,671	1660
25		142	179,651	1270
	HR5-C14	43	44,493	1030
		43	56,274	1310
30	HR5-T2	56	16,696	298
		40	16,416	410
	HR5-T15	6,8	1838	270

	6,5	1688	260
HR5-T19	4,8	1135	236
	5,4	1285	237

5

Induksjon av luciferaseaktivitet ved ulike tetracykliner

Evnen til tetracyklin og ulike tetracyklin-analoger til å indusere luciferaseekspressjon i HR5-C11 celler ble studert. HR5-C11 celler sådd ut i en tetthet på ca. 3×10^4 celler/35 mm skål (~80% kontinuitet). Etter at cellene var fullt attasjert skålene ble de følgende tetracykliner tilsatt til kulturene på en konsentrasjon av 1 µg/mL: tetracyklin-HCl (Tc), oksytetracyklin-HCl (OTc), klorotetracyklin (CTc), anhydrotetracyklin-HCl (ATc) og doksycyklin-HCl (Doxy). Disse forbindelsene er kommersielt tilgjengelig fra Sigma Chemical Co., St. Louis, MO og ble holdt i vandig løsning på en konsentrasjon av 1 µg/mL. Celler som var dyrket i fravær av antibiotika (-) fungerte som kontroller. Etter tre dager ble cellene høstet og luciferaseaktivitet og proteininnholdet av ekstraktene ble bestemt. Resultatene vises i søylediagrammet på Figur 1. Hver søyle i figuren (lukket og skravert) representerer den relative luciferaseaktivitet (normalisert med henblikk på proteinmengde i ekstrakt) fra en enkel dyrkningsskål. Gjennomsnittet av luciferaseaktivitetene frembragt fra de to platene som ble dyrket med tetracyklin, ble definert som 1. Tc, CTc og OTc viste en moderat stimulering av luciferaseaktivitet. I motsetning til dette stimulerte Atc og Doxy luciferaseaktivitet omtrent 1000 og 1500 ganger, henholdsvis.

25

Dose-respons av luciferaseaktivitet over for doksycyklin i HR5-C11 celler

Det ovenfor beskrevne eksperiment undersøkte induksjonsevnen hos ulike tetracykliner og viste at doksycyklin var den kraftigste effektor av tetracyklinene som ble undersøkt. Doksycyklin ble derfor utvalgt for kvantitativt å analysere dose-responsen. HR5-C11 celler ble inkubert med ulike konsentrasjoner av doksycyklin og luciferaseaktivitet ble målt. Resultatene fra tre uavhengige eksperimenter blir vist i Figur 2. Ved mindre enn 10 ng/mL i kulturmediet er doksycyklin uten effekt i å indusere luciferaseaktivitet. Når konsentrasjonen blir øket over 10 ng/mL ble

30

imidlertid en nesten lineær økning i ekspresjonen av luciferase observert. Maksimal aktivering ble oppnådd ved 1 µg/mL. Ved konsentrasjoner over 3 µg/mL viste doksycyklin en lett veksthemmende effekt på HeLa celler, som bestemt i et MTT-analysesystem.

5

Kinetikk av induksjon av ntTA^R systemet

For å undersøke kinetikken av doksycyklin-indusert ntTA^R-mediert induksjon av genekspresjon ble tidskurven av luciferaseaktivitetsinduksjonen i HR5-C11 celler fulgt etter tilsetning av doksycyklin til mediet (sluttkonsentrasjon 10 1 µg/mL). Celler ble dyrket i nærvær av doksycyklin og etter ulike tidsintervaller ble cellene høstet og luciferaseaktivitet bestemt som beskrevet over. Som vist i Figur 3 ble en 100 gangers induksjon av luciferaseaktivitet observert etter 5,5 timer inkubering med Doxy. Fullt induserte nivåer ble oppnådd på mindre enn 24 timers inkubering med Doxy. Således indikerer disse resultater at induksjon av 15 genekspresjon forekommer raskt etter eksponering av cellene til det induserende agens.

EKSEMPEL 3: Koordinert regulering av ekspresjon av to nukleotid-sekvenser av en Tc-kontrollert transkripsjonell aktivator

20

En rekombinant ekspresjonsvektor for koordinert, bidireksjonell transkripsjon av to nukleotidsekvenser ble konstruert som omfattet i en 5' til 3' retning: et luciferase-gen, en første minimal promoter, syv tet-operatorsekvenser, en annen minimal promoter og et LacZ gen. Konstruksjonen er illustrert i Figur 6. I 25 denne konstruksjonen er luciferase og LacZ genene orientert slik at de blir transkribert i motsatt retning relativt til tet-operatorsekvensene, dvs. luciferase-genet blir transkribert i en 5' til 3' retning fra bunntården av DNA, mens LacZ genet blir transkribert i en 5' til 3' retning fra topptråden av DNA. Luciferase-genet er etterfulgt av et SV40 polyadenyleringssignal, mens LacZ genet blir etterfulgt av et 30 β-globin polyadenyleringssignal.

Konstruksjonen ble transfektert inn i HeLa cellelinjen HtTA-1 celler, som uttrykker et villtype Tet repressor-VP16 fusjonsprotein (referert til som tTA og beskrevet i Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-

5551). tTA fusjonsproteinet binder til tet-operatorsekvensene i fravær av Tc (eller analog) men ikke i nærvær av Tc (eller analog). Konstruksjonen ble kotransfektet inn i HtTA-1 celler med et plasmid som gir hygromycin-resistens, og stabilt transfektete kloner ble utvalgt basert på deres hygromycin-resistente fenotype.

- 5 Utvalgte hygromycin-resistente (Hygr^r) kloner ble studert med henblikk på luciferase- og β -galaktosidaseaktivitet. Kloner som var positive for alle tre markører (Hygr^r, luc⁺, β -gal⁺) ble deretter studert for tetracyklin-avhengig koregulering av ekspresjon av luciferase og β -galaktosidaseaktivitet ved at klonene ble dyrket i økende mengder tetracyklin og ved at luciferase og β -galaktosidaseaktivitet ble målt. Resultatene fra et slikt eksperiment som benyttet klone Ht1316-8/50 blir vist i Figur 8. I fravær av tetracyklin (hvorved tTA kan binde til tet-operatorer og aktivere genekspresjon) ble både luciferase og β -galaktosidaseaktivitet påvist. I nærvær av økende mengde av tetracyklin ble luciferase og β -galaktosidaseaktivitet koordinert og likeverdig ned-regulert. Disse resultater demonstrerer at ekspresjon av to gener kan bli koordinert regulert av en tetracyklin-kontrollert transaktivator ved operativ kobling av de to gener til den samme tet-operatorsekvens, eller de samme sekvenser.

20 **EKSEMPEL 4: Konstruksjon av et tetracyklin-regulert transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein som omfatter TetR og et Krueppel silencer domene**

For å konstruere en ekspresjonsvektor som koder for en tetracyklin-regulert transkripsjonell inhibitor fra oppfinnelsen (også referert til som et tetracyklin-kontrollert silencer domene, eller tSD), et nukleinsyrefragment som koder for et transkripsjonelt silencer domene blir ligert i en ekspresjonsvektor som inneholder nukleotidsekvensene som koder for en viltype eller modifisert (dvs. mutert) TetR slik at de silencer domene-kodende sekvenser blir ligert i leseramme med TetR-kodende sekvenser. Plasmidet pUHD141sma-1 inneholder nukleotidsekvenser som koder for en viltype Tn10-avledet Tet repressor (nukleotid- og aminosyresekvensene av denne er vist i SEKV ID NR:16 og 17, henholdsvis). I pUHD141sma-1 er den TetR-kodende sekvens koblet på dets 5' ende til en CMV-promoter og på dets umiddelbare 3' ende til en nukleotidsekvens som skaper en polylinker der ytterligere nukleinsyrefragmenter kan bli introdusert. Nukleotid-

sekvensen over denne polylinkerregion er: TCC CCG GGT AAC TAA GTA AGG ATC C (SEKV ID NR:24) (der TCC CCG GGT ACC koder for aminosyrerester 205-208 i TetR, nemlig Ser-Gly-Ser-Asn). Denne polylinkerregionen inkluderer restriksjonsendonukleaseseter for PspAI (CCC GGG) og BamHI (GGA TCC).

- 5 Nedstrøms fra polylinkerregionen inneholder plasmidet et SV40-avledet polyadenyleringssignal. pUHD141sma-1 vektoren er illustrert skjematisk i Figur 11.

For konstruere en ekspresjonsvektor som koder for et fusjonsprotein mellom TetR og et transkripsjonelt silencer domene fra bananfluens Krueppel (Kr) proteinet blir et nukleinsyrefragment som koder for et silencer domene fra Kr
 10 forsterket ved polymerase-kjedereaksjon (PCR), under bruk av Kr cDNA som en templat. Oligonukleotid primere blir produsert som forsterker et nukleinsyre-fragment som koder for C-terminale 64 aminosyrer i Kr (benevnt C64KR). Denne region korresponderer til aminosyreposisjonene 403-466 i det native protein. Nukleotid- og aminosyresekvensene til C64KR blir vist i SEKV ID NR:20 og SEKV
 15 ID NR:21, respektive. PCR primere blir laget for å inkludere restriksjonsendonukleaseseter slik at det resulterende forsterkede fragment inneholder restriksjonsendonukleaseseter i dets 5' og 3' ender. Restriksjonsendonukleaseseter blir valgt som inneholdes inne i polylinkeren i pUHD141sma-1, som tillater retningsdefinert ligering innen lese-rammen av det amplifiserte fragment inn i
 20 polylinkersetet. For eksempel blir PCR primere produsert som inkorporerer et PspAI sete (CCC GGG) i 5' enden av fragmentet som koder for C64KR og et BamHI sete på 3' enden av fragmentet. Etter en standard PCR-reaksjon blir det amplifiserte fragment og pUHD141-sma1 fordøyet med PspAI og BamHI. Det forsterkede fragment blir så ligert på en retningsdefinert måte inn i polylinkersetet
 25 på pUHD141-sma1 med standard ligeringsbetingelser for å produsere ekspresjonsvektoren pUHD141kr-1. Standardteknikker blir benyttet for å isolere det ønskede plasmid og bekrefte dets konstruksjon. Konstruksjon av pUHD141kr-1 blir illustrert skjematisk i Figur 11.

Den resulterende ekspresjonsvektor pUHD141kr-1 inneholder nukleotid-
 30 sekvenser som koder for et fusjonsprotein som omfatter aminosyrene 1-207 fra villtype TetR koblet i leseramme til aminosyrer 403-466 av Kr (C64KR). Nukleotid- og aminosyresekvensene som går over sammenføyningen av fusjonsproteinet er som følger: AGT GGG TCC CCG GGT GAC ATG GAA (SEKV ID NR:25) og Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Pro-Gly-Asp-Met-Glu (SEKV ID NR:26). Ser-Gly-Ser tilsvarer

aminosyrer 205-207 av TetR, Pro-Gly blir kodet for av polylinkeren og Asp-Met-Glu korresponderer tilk aminosyrene 403-405 i C64KR.

På samme måte kan en ekspresjonsvektor som koder for et fusjonsprotein fra en mutert TetR (som binder til tetO kun i nærvær av Tc) og C64KR bli konstruert som beskrevet over med bruk av nukleotidsekvenser som koder for en mutant tetR (nukleotid og aminosyresekvensene av dette er vist i SEKV ID NR:18 og 19, respektive) i stedet for villtype TetR-sekvensene i pUHD141-sma1.

En ekspresjonsvektor som koder for et tetR-Kr fusjonsprotein (f.eks. pUHD141kr-1) blir forbigående eller stabilt transfektert i vertsceller som beskrevet i Eksempel 2 for å uttrykke TetR-Kr fusjonsproteinet i vertscellen. En reporter-genkonstruksjon som inneholder én eller flere tetO-sekvenser, en minimal promoter og et reporter-gen slik som luciferase, blir også transfektert inn i cellene som beskrevet i Eksempel 2. (Reporter-genkonstruksjoner blir beskrevet i mer detalj i USSN 08/076,726 og Gossen, M. og Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551). Luciferaseaktivitet i nærvær eller fravær av økende mengder av Tc eller en analog, f.eks. doksycyklin, blir målt som beskrevet i Eksempel 2. For villtype TetR-Kr fusjonsproteinet beskrevet over, blir den transkripsjonelle hemmingsaktivitet av fusjonsproteinet bestemt ved å sammenligne mengde av luciferaseaktivitet i nærvær av doksycyklin (ingen represjon) med mengde av luciferaseaktivitet i fravær av doksycyklin (represjon). Den transkripsjonelle hemmingaktivitet av fusjonsproteinet kan også bli testet med bruk av reporter-genkonstruksjoner som viser høyere basalnivå av ekspresjon (dvs. høyere nivå av ekspresjon i nærvær av doksycyklin) ved å bruke en reporter-genkonstruksjon som inneholder ytterligere positive regulatoriske elementer (f.eks. enhancer-sekvenser).

EKSEMPEL 5: Konstruksjon av et tetracyklin-regulert transkripsjonelt inhibitor fusjonsprotein som omfatter TetR og et v-erbA repressor domene

For å konstruere en ekspresjonsvektor som koder for et fusjonsprotein mellom TetR og et transkripsjonelt repressor domene fra v-erbA onkogenproduktet blir et nukleinsyrefragment som koder for et repressor domene fra v-erbA ligert i lese-rammen inn i pUHD141sma-1 som beskrevet i Eksempel 4. Et nukleinsyrefragment som koder for et v-erbA repressor domene som er passende

for ligering i pUHD141sma-1 blir amplifisert ved polymerase kjedereaksjon (PCR) med bruk av v-erbA cDNA som en templat. Oligonukleotid primers blir utviklet som forsterker et nukleinsyrefragment som koder for aminosyrene 364-635 av det native v-erbA protein. Nukleotid- og aminosyresekvensene av denne regionen av v-erbA vises i SEKV ID NR:22 og SEKV ID NR:23, respektive. Som beskrevet i Eksempel 4 blir PCR primere laget slik at det amplifiserte v-erbA fragment inneholder restriksjonsendonukleaseseter nær dets 5' og 3' ender, for eksempel PspAI ved 5' enden og BamHI ved 3' enden. Etter en standard PCR-reaksjon blir det amplifiserte fragment og pUHD141-sma1 fordøyet med PspAI og BamHI. Det amplifiserte fragment blir så ligert retningsspesifikt inn i polylinkersetet på pUHD141-sma1 under bruk av standard ligeringsbetingelser for å produsere ekspresjonsvektoren pUHD141kr-1. Standardteknikker kan bli benyttet for å isolere det ønskede plasmid og bekrefte dets konstruksjon. Konstruksjon av pUHD141erb-1 blir illustrert skjematisk i Figur 11.

Den resulterende pUHD141erb-1 ekspresjonsvektoren inneholder nukleotidsekvenser som koder for et fusjonsprotein som omfatter en villtype TetR koblet i leseramme til aminosyre 364-635 av v-erbA. Nukleotid- og aminosyresekvensene over sammenkoblingen av fusjonsproteinet er som følger: AGT GGG TCC CCG GGT CTG GAC GAC (SEKV ID NR:27) og Ser-Gly-Ser-Pro-Gly-Leu-Asp-Asp (SEKV ID NR:28). Ser-Gly-Ser tilsvarer aminosyrene 205-207 i TetR, Pro-Gly er kodet for av polylinkeren, og Leu-Asp-Asp tilsvarer aminosyrene 364-366 i v-erbA repressor domenet.

Som beskrevet i Eksempel 4 kan en ekspresjonsvektor som koder for et fusjonsprotein med en mutert TetR (som binder til tetO kun i nærvær av Tc) og et v-erbA repressor domene bli konstruert som beskrevet over ved å bruke nukleotidsekvenser som koder for et mutant TetR protein (nukleotid- og aminosyresekvensen av denne vises i SEKV ID NR:18 og 19, respektive) i stedet for villtype TetR sekvensene som finnes i pUHD141-sma1.

Ekspresjon av TetR-v-erbA fusjonsproteinet i vertsceller og analyse av fusjonsproteinets transkripsjonelle inhiberende aktivitet er som beskrevet i Eksempel 4 for TetR-Kr fusjonsproteinet.

EKSEMPEL 6: Regulering av genekspresjon i transgene dyr ved tTA^R.

For å undersøke evnen som tTA^R har i å regulere genekspresjon *in vivo* ble transgene muselinjer konstruert som inneholdt heterologe kromosom-insersjoner av enten et tTA^R ekspresjonskonstrukt eller et reporter-gen som var operabelt koblet til tet-operatorer. Enkle transgene dyrestammer som inneholdt enten en tTA^R ekspresjonskonstrukt eller det tetO-koblede reporter-gen ble deretter kryssavlet og dobbelt transgent avkom ble identifisert. De doble transgene dyr ble deretter karakterisert med henblikk på evnen til tTA^R å regulere ekspresjon av reporter-genet på en tetracyklin-avhengig måte. Dette eksempel demonstrerer at tTA^R effektivt stimulerer ekspresjon av et gen som er operabelt koblet til tet-operatorer i vev hos dyr *in vivo* som respons på tilførsel av tetracyklin (eller analog) til dyrene, mens ekspresjon av det tetO-koblede gen forblir på bakgrunnsnivåer i fravær av tetracyklin eller en analog. Disse resultater demonstrerer at det tetracyklin-kontrollerte transkripsjonelle regulatoriske system som er beskrevet her funksjonerer effektivt i dyr i tillegg til cellelinjer *in vitro*.

Generering av mus som er transgene for en P_hCMV-tTA^R ekspresjonsenhet

Mus som uttrykker tTA protein ble fremskaffet ved pronukleær injeksjon inn i besvangrede eggceller av et 2,7 kb XhoI-Pfml fragment som var kuttet ut fra plasmid pUHG17-1. Dette DNA fragment inneholdt tTA^R genet (vist i SEKV ID NR:1) under transkripsjonell kontroll av den humane CMV IE promoteren (posisjon +75 til -675) sammen med et kanin β-globin polyadenyleringssete, inkluderende et intron. Den humane CMV IE promoteren er en konstitutiv promoter som tillater ekspresjon av det muterte tetR-VP16 fusjonsproteinet i alle celler der kromosom integrering av DNA sekvensen som koder for tTA^R har forekommet. DNA ble injisert inn i befruktede eggceller i en konsentrasjon av ca. 5 ng per μL ved hjelp av standardteknikker. Transgene mus ble dannet fra de injiserte befruktede eggceller ifølge standard prosedyrer. Transgene grunnlegger-mus ble analysert ved bruk av polymerase kjedereaksjon (PCR) og Southern hybridisering for å påvise tilstedeværelsen av tTA^R transgene i det kromosomale DNA fra musene. To transgene muselinjer, CR3 og CR4 ble identifisert og kryssavlet med en annen transgen muselinje som bar et luciferase reporter-gen under kontroll av tetO-sekvensene (beskrevet videre under).

Generering av mus som er transgene for P_hCMV*-1 luciferase reporterenhet

Mus som bærer et P_hCMV*-1 luc reporter genekspressionsenhet ble generert ved pronukleær injeksjon i befruktete eggceller av et 3,1 kb XhoI-EaeI fragment kuttet ut fra plasmiden pUHC13-3. Dette DNA-fragmentet inneholder

5 luciferasegenet under transkripsjonell kontroll av den tetracyklin-responsive P_hCMV*-1 promoteren (SEKV ID NR:8), sammen med et SV40 t₁ tidlig polyadenyleringsete, inkluderende et intron. DNA ble injisert inn i eggceller i en konsentrasjon av ca. 5 ng per µL, og transgene mus ble generert ifølge standard prosedyrer. Transgene grunnleggermus ble analysert ved hjelp av Southern

10 hybridisering for å påvise tilstedeværelsen av P_hCMV*-1 luc transgene i det kromosomale DNA fra musene. En muselinje som var transgen for tetO-koblet luciferase reporter-genet, L7, ble kryssavlet med de tTA^R transgene linjer CR3 og CR4 (beskrevet videre under).

Generering av mus transgene for P_hCMV*-1 luc og P_hCMVtTA^R

Etter at å konstruert enkelt transgene mus som uttrykker tTA^R eller som bærer P_hCMV*-1 luc, ble dobbelt transgene mus som bar både tTA ekspresjonsvektoren og luciferase rapportørenhetene fremskaffet gjennom å kryssavle heterozygote mus transgene for den ene av de to transgener. Dobbelt transgene

20 dyr ble identifisert med standard analysemetoder (f.eks. PCR og/eller Southern hybridisering) for å påvise tilstedeværelse av både tTA^R transgene og P_hCMV*-1 luc transgene i det kromosomale DNA fra musene.

Induksjon og analyse av luciferaseaktivitet i vevsprøver fra mus

25 Oral tilførsel av tetracyklin eller dets derivat doksyklyn ble gitt i form av tilsetning til drikkevannet i en konsentrasjon på 200 µg per mL med 5% sukrose tilsatt for å overdøve den bitre smak av antibiotikamedikamentene. For diegivende mus var konsentrasjonen 2 mg per mL med 10% sukrose for å sikre et tilstrekkelig opptak via melken til de unge musene.

30 For å analysere luciferaseaktivitet ble mus avlivet ved nakkedislokasjon og vevsprøver ble homogenisert i 2 mL reagensrør som inneholdt 500 µL lysisbuffer (25 mM Tris-fosfat, pH 7,8/2 mM DTT/2 mM EDTA/10% glycerol/1% Triton X100) med bruk av en Ultra-Turrax. Homogenatet ble frosset i flytende nitrogen og

sentrifugert etter opptining i 5 minutter ved 15.000 g. 2-20 µL av supernatanten ble blandet med 250 µL luciferase-analysebuffer (25 mM glycyglycin, pH 7,5/15 mM MgSO₄/5 mM ATP) og luciferaseaktivitet ble målt i 10 sekunder etter injeksjon av 100 µL av en 125 µM luciferinløsning med bruk av Berthold Lumat LB 9501.

- 5 Proteinkonsentrasjonen i homogenatet ble bestemt med Bradford-metoden og luciferaseaktivitet ble kalkulert som relative lysenheter (rlu) per µg totalt protein.

Resultater

- Mus fra to linjer som bar P_hCMV-tTA^R transgene (CR3 og CR4) ble parret med mus fra linje L7, transgene for P_hCMV*-1 luc. L7 linjen viser en meget lav, men påvisbar bakgrunn av luciferaseaktivitet i ulike organer som sannsynligvis er forårsaket av posisjonsvirkninger på integrasjonssetet. Bakgrunns-luciferaseaktiviteten i ulike vev i L7 enkelt transgene mus er illustrert grafisk i Figur 12, representert av de "checked" søyler på høyre side for hvert vev som ble undersøkt (hver søyle representerer resultatene fra ett dyr). Luciferaseaktiviteten i ulike vev av C3/L7 dobbelt transgene mus i fravær av tetracyklin-analogen doksycyklin (dvs. ikke-induserte betingelser) blir illustrert grafisk i Figur 12, og er representert av de mørke søyler i midten av hvert vev som ble undersøkt. Luciferaseaktiviteten i ulike vev fra de C3/L7 dobbelt transgene mus i nærvær av doksycyklin (dvs. induserte betingelser) er illustrert grafisk i Figur 12, og er representert av de lyse søyler på venstre side for hvert vev som ble studert.

- Luciferaseaktivitet var påvisbar i de syv vev fra de doble transgene mus som ble undersøkt: pankreas, nyre, mavesekk, muskel, brissel, hjerte og tunge. Vevs-mønsteret av aktivert luciferasenivåer (dvs. i nærvær av doksycyklin) i de doble transgene mus var lignende ekspresjonsmønsteret hos hCMV IE promoteren som er rapportert i litteraturen. Dette er i overensstemmelse med ekspresjon av luciferase reporter-genet som er regulert av tTA^R (som blir uttrykt hos musene under kontroll av hCMV IE promoteren). Nivået av reporter-geninduksjonen varierte mellom de ulike vev som ble studert. Reguleringsfaktorer opp til 100.000 ganger (dvs. 5 størrelses-ordner) ble oppnådd for eksempel i pankreas.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

5 (i) SØKERE:

(A) NAVN: Hermann Bujard
(B) GATE: Remler Str. 9
(C) BY: D-69120 Heidelberg
(E) LAND: Germany

10 (A) NAVN: Manfred Gossen
(B) GATE: 978 Arlington Boulevard #B
(C) BY: El Cerrito
(D) STAT: California
(E) LAND: USA
15 (F) POSTKODE (ZIP): 94530

(ii) OPPFINNELSENS TITTEL: Tetracycline-Regulated
Transcriptional
Modulators

20

(iii) ANTALL SEKVENSER: 28

(iv) KORRESPONDENCE ADRESSE:

(A) ADRESSAT: LAHIVE & COCKFIELD
25 (B) GATE: 60 State GATE, suite 510
(C) BY: Boston
(D) STAT: Massachusetts
(E) LAND: USA
(F) ZIP: 02109-1875

30

(v) COMPUTER-LESBAR FORM:

(A) MEDIUMTYPE: diskett
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATIVSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
35 (D) SOFTWARE: ASCII Text

35

(vii) TIDLIGERE SØKNADS DATA:

(A) SØKNADSNUMMBER: To be assigned
(B) INNLEVERINGSDATO: 07-JUN-1995
40 (C) KLASSIFIKASJON:

40

(vii) TIDLIGERE SØKNADS DATA

(A) SØKNADSNUMMBER: US 08/383,754
(B) INNLEVERINGSDATO: 03-FEB-1995
45 (C) KLASSIFIKASJON:

45

(vii) TIDLIGERE SØKNADS DATA

(A) SØKNADSNUMMBER: US 08/275,876
(B) INNLEVERINGSDATO: 15-JULY-94
50 (C) KLASSIFIKASJON:

50

(vii) TIDLIGERE SØKNADS DATA

(A) SØKNADSNUMMBER: US 08/270,637

(B) INNLEVERINGSDATO: 01-JULY-94

(C) KLASSIFIKASJON:

5

(viii) FULLMEKTIG/AGENT INFORMASJON:

(A) NAVN: DeConti, Giulio A. Jr.

(B) REGISTRERINGSNUMMER: 31,503

(C) REFERANSE/SAK NUMMER: BBI-009C2PC

10

(ix) TELEKOMMUNIKASJON INFORMASJON:

(A) TELEFON: (617)227-7400

(B) TELEFAX: (617)227-5941

15

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:1:

(i) SEKVENNS KARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 1008 basepar

20

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: dobbel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

25

(ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: exon

(B) LOKASJON: 1..1008

30

(ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: mRNA

(B) LOKASJON: 1..1008

(ix) TREKK:

35

(A) NAVN/NØKKEL: misc. binding

(B) LOKASJON: 1..207

(ix) TREKK:

40

(A) NAVN/NØKKEL: misc. binding

(B) LOKASJON: 208..335

(ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: CDS

(B) LOKASJON: 1..1005

45

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:1:

ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA GTG ATT AAC AGC GCA TTA GAG

CTG 48

Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu

50

Leu

1

5

10

15

CTT AAT GAG GTC GGA ATC GAA GGT TTA ACA ACC CGT AAA CTC GCC
 CAG 96
 Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 5 Gln
 20 25 30
 AAG CTA GGT GTA GAG CAG CCT ACA CTG TAT TGG CAT GTA AAA AAT
 AAG 144
 10 Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 Lys
 35 40 45
 CGG GCT TTG CTC GAC GCC TTA GCC ATT GAG ATG TTA GAT AGG CAC
 15 CAT 192
 Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 His
 50 55 60
 20
 ACT CAC TTT TGC CCT TTA AAA GGG GAA AGC TGG CAA GAT TTT TTA
 CGC 240
 Thr His Phe Cys Pro Leu Lys Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 Arg
 25 65 70 75
 80
 AAT AAG GCT AAA AGT TTT AGA TGT GCT TTA CTA AGT CAT CGC AAT
 GGA 288
 30 Asn Lys Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asn
 Gly
 85 90 95
 GCA AAA GTA CAT TCA GAT ACA CGG CCT ACA GAA AAA CAG TAT GAA
 35 ACT 336
 Ala Lys Val His Ser Asp Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 Thr
 100 105 110
 40 CTC GAA AAT CAA TTA GCC TTT TTA TGC CAA CAA GGT TTT TCA CTA
 GAG 384
 Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
 Glu
 115 120 125
 45 AAT GCA TTA TAT GCA CTC AGC GCT GTG GGG CAT TTT ACT TTA GGT
 TGC 432
 Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
 Cys
 50 130 135 140

GTA TTG GAA GAT CAA GAG CAT CAA GTC GCT AAA GAA GAA AGG GAA
 ACA 480
 Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
 Thr
 5 145 150 155
 160

CCT ACT ACT GAT AGT ATG CCG CCA TTA TTA CGA CAA GCT ATC GAA
 TTA 528
 10 Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
 Leu
 165 170 175

TTT GAT CAC CAA GGT GCA GAG CCA GCC TTC TTA TTC GGC CTT GAA
 15 TTG 576
 Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
 Leu
 180 185 190

20 ATC ATA TGC GGA TTA GAA AAA CAA CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC
 GCG 624
 Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
 Ala
 195 200 205

25 TAC AGC CGC GCG CGT ACG AAA AAC AAT TAC GGG TCT ACC ATC GAG
 GGC 672
 Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile Glu
 Gly
 30 210 215 220

CTG CTC GAT CTC CCG GAC GAC GAC GCC CCC GAA GAG GCG GGG CTG
 GCG 720
 35 Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly Leu
 Ala
 225 230 235
 240

GCT CCG CGC CTG TCC TTT CTC CCC GCG GGA CAC ACG CGC AGA CTG
 40 TCG 768
 Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg Leu
 Ser
 245 250 255

45 ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC TTA
 GAC 816
 Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu
 Asp
 260 265 270

50

GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT TTC
 GAT 864
 Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 Asp
 5 275 280 285

CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGT CCG GGA TTT ACC
 CCC 912
 Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr
 Pro
 290 295 300

CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC GAG
 TTT 960
 His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu
 Phe
 305 310 315
 20 320

GAG CAG ATG TTT ACC GAT CCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT GGG
 TAG 1008
 Glu Gln Met Phe Thr Asp Pro Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
 25 325 330 335

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:2:
 (i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 335 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: linear
 (ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:2:
 Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
 Leu
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 Gln
 20 25 30

Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 Lys
 35 40 45

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 His
 50 55 60

	Thr	His	Phe	Cys	Pro	Leu	Lys	Gly	Glu	Ser	Trp	Gln	Asp	Phe	Leu
	Arg														
	65					70					75				
	80														
5	Asn	Lys	Ala	Lys	Ser	Phe	Arg	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	His	Arg	Asn
	Gly														
						85				90					95
10	Ala	Lys	Val	His	Ser	Asp	Thr	Arg	Pro	Thr	Glu	Lys	Gln	Tyr	Glu
	Thr														
						100				105					110
	Leu	Glu	Asn	Gln	Leu	Ala	Phe	Leu	Cys	Gln	Gln	Gly	Phe	Ser	Leu
15	Glu														
						115				120					125
	Asn	Ala	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	His	Phe	Thr	Leu	Gly
	Cys														
20		130					135						140		
	Val	Leu	Glu	Asp	Gln	Glu	His	Gln	Val	Ala	Lys	Glu	Glu	Arg	Glu
	Thr														
	145					150						155			
25	160														
	Pro	Thr	Thr	Asp	Ser	Met	Pro	Pro	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Glu
	Leu														
						165				170					175
30	Phe	Asp	His	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Ala	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	Glu
	Leu														
						180				185					190
35	Ile	Ile	Cys	Gly	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu	Lys	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser
	Ala														
						195				200					205
	Tyr	Ser	Arg	Ala	Arg	Thr	Lys	Asn	Asn	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ile	Glu
40	Gly														
						210				215					220
	Leu	Leu	Asp	Leu	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala	Pro	Glu	Glu	Ala	Gly	Leu
	Ala														
45	225						230					235			
	240														
	Ala	Pro	Arg	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Ala	Gly	His	Thr	Arg	Arg	Leu
	Ser														
50						245				250					255

Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu
 Asp
 260 265 270
 5 Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe
 Asp
 275 280 285
 10 Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr
 Pro
 290 295 300
 His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu
 Phe
 15 305 310 315
 320
 Glu Gln Met Phe Thr Asp Pro Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
 325 330 335
 20

INFORMASJON OM SEKV ID NO:3:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 33 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHET: dobbel
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:3:

GAC GCG CTA GAC GAT TTC GAT CTG GAC ATG TTG 33
 Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 35 1 5 10

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:4:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 11 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:4:

Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu
 50 1 5 10

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:5:

- (i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:
- 5 (A) LENGDE: 7 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTTYPE: peptid
- 10 (v) FRAGMENT-TYPE: indre
- (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:5:
- 15 Met Pro Lys Arg Pro Arg Pro
1 5

20 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:6:

- (i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:
- (A) LENGDE: 569 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
25 (C) BESKAFFENHET: dobbel
(D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA
- 30 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:6:
- GAATTCGGGG CCGCGGAGGC TGGATCGGTC CCGGTGTCTT CTATGGAGGT
CAAAACAGCG 60
- 35 TGGATGGCGT CTCCAGGCGA TCTGACGGTT CACTAAACGA GCTCTGCTTA
TATAGGTCGA 120
- GTTTACCACT CCCTATCAGT GATAGAGAAA AGTGAAAGTC GAGTTTACCA
CTCCCTATCA 180
- 40 GTGATAGAGA AAAGTGAAAAG TCGAGTTTAC CACTCCCTAT CAGTGATAGA
GAAAAGTGAA 240
- AGTCGAGTTT ACCACTCCCT ACCAGTGATA GAGAAAAGTG AAAGTCGAGT
45 TTACCACTCC 300
- CTATCAGTGA TAGAGAAAAG TGAAAGTCGA GTTTACCACT CCCTATCAGT
GATAGAGAAA 360
- 50 AGTGAAAGTC GAGTTTACCA CTCCCTATCA GTGATAGAGA AAAGTGAAAAG
TCGAGCTCGG 420

TACCCGGGTC GAGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGCCTATAT AAGCAGAGCT
CGTTTAGTGA 480

5 ACCGTCAGAT CGCCTGGAGA CGCCATCCAC GCTGTTTTGA CCTCCATAGA
AGACACCGGG 540

ACCGATCCAG CCTCCGCGGC CCCGAATTC
569

10

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:7:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 520 basepar

15 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: dobbel

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:7:

20

AGATCTGCAG GGTGCTCGG TGTTCGAGGC CACACGCGTC ACCTTAATAT
GCGAAGTGGA 60

25 CCGGATCTCG AGTTTACCAC TCCCTATCAG TGATAGAGAA AAGTGAAAGT
CGAGTTTACC 120

ACTCCCTATC AGTGATAGAG AAAAGTGAAA GTCGAGTTTA CCACTCCCTA
TCAGTGATAG 180

30 AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC TATCAGTGAT AGAGAAAAGT
GAAAGTCGAG 240

TTTACCACTC CCTATCAGTG ATAGAGAAAA GTGAAAGTCG AGTTTACCAC
TCCCTATCAG 300

35

TGATAGAGAA AAGTGAAAGT CGAGTTTACC ACTCCCTATC AGTGATAGAG
AAAAGTGAAA 360

40 GTCGAGCTCG GTACCCGGGT CGAGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGCCTATA
TAAGCAGAGC 420

TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA CGCTGTTTTG
ACCTCCATAG 480

45 AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCGG CCCCGAATTC
520

50

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:8:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 450 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomic)

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

- (A) ORGANISME: Human cytomegalovirus
- (B) STAMME: K12, Towne

(ix) TREKK:

- (A) NAVN/NØKKEL: mRNA
- (B) LOKASJON: 382..450

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:8:

GAATTCCTCG AGTTTACCAC TCCCTATCAG TGATAGAGAA AAGTGAAAGT
CGAGTTTACC 60

ACTCCCTATC AGTGATAGAG AAAAGTGAAA GTCGAGTTTA CCACTCCCTA
TCAGTGATAG 120

AGAAAAGTGA AAGTCGAGTT TACCACTCCC TATCAGTGAT AGAGAAAAGT
GAAAGTCGAG 180

TTTACCACTC CCTATCAGTG ATAGAGAAAA GTGAAAGTCG AGTTTACCAC
TCCCTATCAG 240

TGATAGAGAA AAGTGAAAGT CGAGTTTACC ACTCCCTATC AGTGATAGAG
AAAAGTGAAA 300

GTCGAGCTCG GTACCCGGGT CGAGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGCCTATA
TAAGCAGAGC 360

TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA CGCTGTTTTG
ACCTCCATAG 420

AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCGG
450

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:9:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 450 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: DNA (genomic)

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

- (A) ORGANISME: Human cytomegalovirus
- (B) STAMME: Towne

(ix) TREKK:

- (A) NAVN/NØKKEL: mRNA

(B) LOKASJON: 382..450

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:9:

5 GAATTCCTCG ACCCGGGTAC CGAGCTCGAC TTTCAC TTTT CTCTATCACT
 GATAGGGAGT 60

GGTAAACTCG ACTTTCACTT TTCTCTATCA CTGATAGGGA GTGGTAAACT
 CGACTTTCAC 120

10 TTTTCTCTAT CACTGATAGG GAGTGGTAAA CTCGACTTTC ACTTTTCTCT
 ATCACTGATA 180

GGGAGTGGTA AACTCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA TAGGGAGTGG
 TAAACTCGAC 240

15 TTTCAC TTTT CTCTATCACT GATAGGGAGT GGTAAACTCG ACTTTCACTT
 TTCTCTATCA 300

CTGATAGGGA GTGGTAAACT CGAGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGCCTATA
 20 TAAGCAGAGC 360

TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA CGCTGTTTTG
 ACCTCCATAG 420

25 AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCGG
 450

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:10:

30 (i) SEKVENSBESKRIVELSE:

- (A) LENGDE: 398 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær

35 (ii) MOLEKYLTYP: DNA (genomic)

(vi) OPPRINNELIG KILDE:

- (A) ORGANISME: Herpes Simplex Virus
- (B) STAMME: KOS

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:10:

40 GAGCTCGACT TTCACTTTTC TCTATCACTG ATAGGGAGTG GTAAACTCGA
 CTTTCACTTT 60

TCTCTATCAC TGATAGGGAG TGGTAAACTC GACTTTCACT TTCTCTATC
 45 ACTGATAGGG 120

AGTGGTAAAC TCGACTTTCA CTTTCTCTA TCACTGATAG GGAGTGGTAA
 ACTCGACTTT 180

50 CACTTTTCTC TATCACTGAT AGGGAGTGGT AACTCGACT TTCACTTTTC
 TCTATCACTG 240

ATAGGGAGTG GTAAACTCGA CTTTCACTTT TCTCTATCAC TGATAGGGAG
TGGTAAACTC 300

5 GAGATCCGGC GAATTCGAAC ACGCAGATGC AGTCGGGGCG GCGCGGTCCG
AGGTCCACTT 360

CGCATATTAA GGTGACGCGT GTGGCCTCGA ACACCGAG
398

10

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:11:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 38 basepar
- 15 (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

20 (xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:11:

ACTTTATCAC TGATAACAA ACTTATCAGT GATAAAGA
38

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:12:

25 (i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 38 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær
- 30 (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:12:

ACTCTATCAT TGATAGAGTT CCCTATCAGT GATAGAGA
38

35

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:13:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 38 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- 40 (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:13:

45 AGCTTATCAT CGATAAGCTA GTTTATCACA GTTAAATT
38

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:14:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 38 basepar
- 50 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: dobbel
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYPE: DNA

5 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:14:
 ACTCTATCAT TGATAGGGAA CTCTATCAAT GATAGGGA
 38

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:15:
 10 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 38 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHET: dobbel
 (D) TOPOLOGI: lineær
 15 (ii) MOLEKYLTYPE: DNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:15:
 AATCTATCAC TGATAGAGTA CCCTATCATC GATAGAGA
 38
 20

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:16:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
 25 (A) LENGDE: 621 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHET: dobbel
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTYPE: cDNA
 30 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:16:

ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA GTG ATT AAC AGC GCA TTA GAG
 CTG 48
 Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
 35 Leu
 1 5 10 15

CTT AAT GAG GTC GGA ATC GAA GGT TTA ACA ACC CGT AAA CTC GCC
 CAG 96
 40 Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 Gln
 20 25 30

AAG CTA GGT GTA GAG CAG CCT ACA TTG TAT TGG CAT GTA AAA AAT
 45 AAG 144
 Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 Lys
 35 40 45

50 CGG GCT TTG CTC GAC GCC TTA GCC ATT GAG ATG TTA GAT AGG CAC
 CAT 192

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 His
 50 55 60

5 ACT CAC TTT TGC CCT TTA GAA GGG GAA AGC TGG CAA GAT TTT TTA
 CGT 240
 Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 Arg
 65 70 75

10 80

AAT AAG GCT AAA AGT TTT AGA TGT GCT TTA CTA AGT CAT CGC GAT
 GGA 288
 Asn Lys Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp
 15 Gly
 85 90 95

GCA AAA GTA CAT TTA GGT ACA CGG CCT ACA GAA AAA CAG TAT GAA
 ACT 336
 20 Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 Thr
 100 105 110

CTC GAA AAT CAA TTA GCC TTT TTA TGC CAA CAA GGT TTT TCA CTA
 25 GAG 384
 Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
 Glu
 115 120 125

30 AAT GCA TTA TAT GCA CTC AGC GCT GTG GGG CAT TTT ACT TTA GGT
 TGC 432
 Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
 Cys
 130 135 140

35

GTA TTG GAA GAT CAA GAG CAT CAA GTC GCT AAA GAA GAA AGG GAA
 ACA 480
 Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
 Thr
 40 145 150 155
 160

CCT ACT ACT GAT AGT ATG CCG CCA TTA TTA CGA CAA GCT ATC GAA
 TTA 528
 45 Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
 Leu
 165 170 175

TTT GAT CAC CAA GGT GCA GAG CCA GCC TTC TTA TTC GGC CTT GAA
 50 TTG 576

Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
 Leu
 180 185 190

5 ATC ATA TGC GGA TTA GAA AAA CAA CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC
 621
 Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
 195 200 205

10

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:17:
 (i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 207 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:17:

20 Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
 Leu
 1 5 10 15

25 Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 Gln
 20 25 30

Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 30 Lys
 35 40 45

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 His
 35 50 55 60

Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 Arg
 65 70 75

40 80

Asn Lys Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp
 Gly
 85 90 95

45 Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 Thr
 100 105 110

Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
 Glu
 115 120 125

5 Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
 Cys
 130 135 140

10 Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
 Thr
 145 150 155
 160

15 Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
 Leu
 165 170 175

20 Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
 Leu
 180 185 190

Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
 195 200 205

25 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:18:
 (i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 621 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 30 (C) BESKAFFENHET: dobbel
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:18:
 35 ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA GTG ATT AAC AGC GCA TTA GAG
 CTG 48
 Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
 Leu
 1 5 10 15

40 CTT AAT GAG GTC GGA ATC GAA GGT TTA ACA ACC CGT AAA CTC GCC
 CAG 96
 Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 Gln
 45 20 25 30

AAG CTA GGT GTA GAG CAG CCT ACA CTG TAT TGG CAT GTA AAA AAT
 AAG 144
 Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 50 Lys
 35 40 45

CGG GCT TTG CTC GAC GCC TTA GCC ATT GAG ATG TTA GAT AGG CAC
 CAT 192
 5 Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 His
 50 55 60
 ACT CAC TTT TGC CCT TTA AAA GGG GAA AGC TGG CAA GAT TTT TTA
 10 CGC 240
 Thr His Phe Cys Pro Leu Lys Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 Arg
 65 70 75
 80
 15 AAT AAG GCT AAA AGT TTT AGA TGT GCT TTA CTA AGT CAT CGC AAT
 GGA 288
 Asn Lys Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asn
 Gly
 20 85 90 95
 GCA AAA GTA CAT TCA GAT ACA CGG CCT ACA GAA AAA CAG TAT GAA
 ACT 336
 Ala Lys Val His Ser Asp Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 25 Thr
 100 105 110
 CTC GAA AAT CAA TTA GCC TTT TTA TGC CAA CAA GGT TTT TCA CTA
 GAG 384
 30 Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
 Glu
 115 120 125
 AAT GCA TTA TAT GCA CTC AGC GCT GTG GGG CAT TTT ACT TTA GGT
 35 TGC 432
 Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
 Cys
 130 135 140
 40 GTA TTG GAA GAT CAA GAG CAT CAA GTC GCT AAA GAA GAA AGG GAA
 ACA 480
 Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
 Thr
 145 150 155
 45 160
 CCT ACT ACT GAT AGT ATG CCG CCA TTA TTA CGA CAA GCT ATC GAA
 TTA 528
 Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
 50 Leu
 165 170 175

TTT GAT CAC CAA GGT GCA GAG CCA GCC TTC TTA TTC GGC CTT GAA
 TTG 576
 Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
 5 Leu 180 185 190

ATC ATA TGC GGA TTA GAA AAA CAA CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC
 10 621
 Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
 195 200 205

- 15 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:19:
 (i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 207 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær
 20 (ii) MOLEKYLTYP: protein
 (xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:19:

Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
 Leu
 25 1 5 10 15

Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 Gln
 20 25 30

30 Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 Lys
 35 40 45

35 Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 His
 50 55 60

Thr His Phe Cys Pro Leu Lys Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 40 Arg
 65 70 75
 80

45 Asn Lys Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asn
 Gly
 85 90 95

Ala Lys Val His Ser Asp Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 50 Thr
 100 105 110

```

Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
Glu
      115              120              125
5  Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
Cys
      130              135              140
10 Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
Thr
145              150              155
160
15 Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
Leu
      165              170              175
20 Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
Leu
      180              185              190
Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
195              200              205
25

```

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:20:

```

30  (i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:
      (A) LENGDE: 192 basepar
      (B) TYPE: nukleinsyre
      (C) BESKAFFENHET: dobbel
      (D) TOPOLOGI: lineær

```

```

35  (ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

```

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:20:

```

40  GAC ATG GAA AAA GCG ACA CCG GAG ACG ATG GTC CAT TGG ATT TGT
CTG      48
Asp Met Glu Lys Ala Thr Pro Glu Thr Met Val His Trp Ile Cys
Leu
      1              5              10              15
45  AAG ATG GAG CCA GCT CTG TGG ATG GCC ATT ACA GCA ACA TCG CAC
GGC      96
Lys Met Glu Pro Ala Leu Trp Met Ala Ile Thr Ala Thr Ser His
Gly
50              20              25              30

```

GCA AGG CAC AGG ACA TTC GTC GGG TTT TCC GGC TGC CTC CAC CGC
 AAA 144
 Ala Arg His Arg Thr Phe Val Gly Phe Ser Gly Cys Leu His Arg
 Lys

5 35 40 45

TCC CTC ACG TAC CCA GTG ATA TGC CTG AGC AAA CCG AGC CAG AGG
 ATT 192
 Ser Leu Thr Tyr Pro Val Ile Cys Leu Ser Lys Pro Ser Gln Arg
 Ile

10 50 55 60

15 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:21:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 64 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20 (ii) MOLEKYLTTYPE: protein

25 (xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:21:

Asp Met Glu Lys Ala Thr Pro Glu Thr Met Val His Trp Ile Cys
 Leu

1 5 10 15

30 Lys Met Glu Pro Ala Leu Trp Met Ala Ile Thr Ala Thr Ser His
 Gly

20 25 30

35 Ala Arg His Arg Thr Phe Val Gly Phe Ser Gly Cys Leu His Arg
 Lys

35 40 45

Ser Leu Thr Tyr Pro Val Ile Cys Leu Ser Lys Pro Ser Gln Arg
 Ile

40 50 55 60

45 (2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:22:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 816 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: dobbel

(D) TOPOLOGI: lineær

50 (ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:22:

```

CTG GAC GAC TCG AAG CGC GTA GCC AAG CGG AAG CTG ATC GAG GAG
5 AAC 48
Leu Asp Asp Ser Lys Arg Val Ala Lys Arg Lys Leu Ile Glu Glu
Asn
1 5 10 15

10 CGG GAG CGG CGA CGC AAG GAG GAG ATG ATC AAA TCC CTG CAG CAC
CGG 96
Arg Glu Arg Arg Arg Lys Glu Glu Met Ile Lys Ser Leu Gln His
Arg
20 25 30

15 CCC AGC CCC AGC GCA GAG GAG TGG GAG CTG ATC CAC GTG GTG ACC
GAG 144
Pro Ser Pro Ser Ala Glu Glu Trp Glu Leu Ile His Val Val Thr
Glu
20 35 40 45

GCG CAC CGC AGC ACC AAC GCG CAG GGC AGC CAC TGG AAG CAG AGG
AGG 192
Ala His Arg Ser Thr Asn Ala Gln Gly Ser His Trp Lys Gln Arg
25 Arg
50 55 60

AAA TTC CTG CTC GAA GAT ATC GGT CAG TCG CCC ATG GCC TCC ATG
CTT 240
30 Lys Phe Leu Leu Glu Asp Ile Gly Gln Ser Pro Met Ala Ser Met
Leu
65 70 75
80

35 GAC GGG GAC AAA GTG GAC CTG GAG GCG TTC AGC GAG TTT ACA AAA
ATC 288
Asp Gly Asp Lys Val Asp Leu Glu Ala Phe Ser Glu Phe Thr Lys
Ile
85 90 95

40 ATC ACG CCG GCC ATC ACC CGC GTG GTC GAC TTT GCC AAA AAC CTG
CCC 336
Ile Thr Pro Ala Ile Thr Arg Val Val Asp Phe Ala Lys Asn Leu
Pro
45 100 105 110

ATG TTC TCG GAG CTG CCG TGC GAG GAT CAG ATC ATC CTG CTG AAG
GGC 384
50 Met Phe Ser Glu Leu Pro Cys Glu Asp Gln Ile Ile Leu Leu Lys
Gly
115 120 125

```

```

TGC TGC ATG GAG ATC ATG TCG CTG CGC GCC GCC GTG CGC TAC GAC
CCC      432
Cys Cys Met Glu Ile Met Ser Leu Arg Ala Ala Val Arg Tyr Asp
5  Pro
      130              135              140

GAG AGC GAA ACG CTG ACG CTG AGC GGG GAA ATG GCC GTC AAA CGC
GAG      480
10 Glu Ser Glu Thr Leu Thr Leu Ser Gly Glu Met Ala Val Lys Arg
    Glu
    145              150              155
    160

CAG TTG AAG AAC GGA GGG CTG GGG GTC GTG TCT GAT GCC ATC TTC
GAC      528
15 Gln Leu Lys Asn Gly Gly Leu Gly Val Val Ser Asp Ala Ile Phe
    Asp
              165              170              175
20

CTC GGC AAG TCG CTG TCT GCC TTC AAC CTG GAC GAC ACC GAG GTG
GCC      576
    Leu Gly Lys Ser Leu Ser Ala Phe Asn Leu Asp Asp Thr Glu Val
    Ala
25              180              185              190

CTG CTG CAG GCC GTG CTG CTC ATG TCC TCA GAC CGG ACG GGG CTG
ATC      624
30 Leu Leu Gln Ala Val Leu Leu Met Ser Ser Asp Arg Thr Gly Leu
    Ile
      195              200              205

TGC GTG GAT AAG ATA GAG AAG TGC CAG GAG TCG TAC CTG CTG GCG
TTC      672
35 Cys Val Asp Lys Ile Glu Lys Cys Gln Glu Ser Tyr Leu Leu Ala
    Phe
      210              215              220

GAG CAC TAC ATC AAC TAC CGC AAA CAC AAC ATT CCC CAC TTC TGG
TCC      720
40 Glu His Tyr Ile Asn Tyr Arg Lys His Asn Ile Pro His Phe Trp
    Ser
    225              230              235
    240

AAG CTG CTG ATG AAG GTG GCG GAC CTG CGC ATG ATC GGC GCC TAC
CAC      768
45 Lys Leu Leu Met Lys Val Ala Asp Leu Arg Met Ile Gly Ala Tyr
    His
50              245              250              255

```

GCC AGC CGC TTC CTG CAC ATG AAG GTG GAG TGC CCC ACC GAG CTC
 TCC 816
 Ala Ser Arg Phe Leu His Met Lys Val Glu Cys Pro Thr Glu Leu
 Ser

5 260 265 270

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:23:

10 (i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 272 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPPE: protein

15

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:23:

Leu Asp Asp Ser Lys Arg Val Ala Lys Arg Lys Leu Ile Glu Glu
 Asn

20 1 5 10 15

Arg Glu Arg Arg Arg Lys Glu Glu Met Ile Lys Ser Leu Gln His
 Arg

25 20 25 30

Pro Ser Pro Ser Ala Glu Glu Trp Glu Leu Ile His Val Val Thr
 Glu

35 40 45

30 Ala His Arg Ser Thr Asn Ala Gln Gly Ser His Trp Lys Gln Arg
 Arg

50 55 60

Lys Phe Leu Leu Glu Asp Ile Gly Gln Ser Pro Met Ala Ser Met
 Leu

35 65 70 75
 80

Asp Gly Asp Lys Val Asp Leu Glu Ala Phe Ser Glu Phe Thr Lys
 Ile

40 85 90 95

Ile Thr Pro Ala Ile Thr Arg Val Val Asp Phe Ala Lys Asn Leu
 Pro

45 100 105 110

Met Phe Ser Glu Leu Pro Cys Glu Asp Gln Ile Ile Leu Leu Lys
 Gly

50 115 120 125

Cys Cys Met Glu Ile Met Ser Leu Arg Ala Ala Val Arg Tyr Asp
 Pro
 130 135 140

5 Glu Ser Glu Thr Leu Thr Leu Ser Gly Glu Met Ala Val Lys Arg
 Glu
 145 150 155
 160

10 Gln Leu Lys Asn Gly Gly Leu Gly Val Val Ser Asp Ala Ile Phe
 Asp
 165 170 175

15 Leu Gly Lys Ser Leu Ser Ala Phe Asn Leu Asp Asp Thr Glu Val
 Ala
 180 185 190

20 Leu Leu Gln Ala Val Leu Leu Met Ser Ser Asp Arg Thr Gly Leu
 Ile
 195 200 205

Cys Val Asp Lys Ile Glu Lys Cys Gln Glu Ser Tyr Leu Leu Ala
 Phe
 210 215 220

25 Glu His Tyr Ile Asn Tyr Arg Lys His Asn Ile Pro His Phe Trp
 Ser
 225 230 235
 240

30 Lys Leu Leu Met Lys Val Ala Asp Leu Arg Met Ile Gly Ala Tyr
 His
 245 250 255

35 Ala Ser Arg Phe Leu His Met Lys Val Glu Cys Pro Thr Glu Leu
 Ser
 260 265 270

40

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:24:

(i) SEKVENS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 25 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 45 (C) BESKAFFENHET: dobbel
 (D) TOPOLOGI: lineær
 (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:24:

50 TCCCCGGGTA ACTAAGTAAG GATCC
 25

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:25:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 24 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:25:

AGTGGGTCCC CGGGTGACAT GGAA

24

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:26:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 8 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: polypeptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:26:

Ser Gly Ser Pro Gly Asp Met Glu

1

5

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:27:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 24 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) BESKAFFENHET: dobbel
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA

(xi) SEKVENNS-BESKRIVELSE: SEKV ID NO:27:

AGTGGGTCCC CGGGTCTGGA CGAC

24

(2) INFORMASJON OM SEKV ID NO:28:

(i) SEKVENNS-KARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 8 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: polypeptid

(v) FRAGMENT-TYPE: indre

5 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NO:28:

Ser Gly Ser Pro Gly Leu Asp Asp
1 5

PATENTKRAV

1. Isolert nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at fusjonsproteinet omfatter et første polypeptid som er en mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær, men ikke i fravær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et annet polypeptid omfattende et transkripsjonsaktiveringsdomene som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler.
- 10 2. Nukleinsyre ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den muterte Tet repressor er en mutert Tn10-avledet Tet repressor med en aminosyresubstitusjon i minst én aminosyreposisjon utvalgt fra gruppen bestående av posisjon 71, posisjon 95, posisjon 101 og posisjon 102.
- 15 3. Nukleinsyre ifølge krav 2, der den muterte Tn10-avlede Tet repressor omfatter aminosyresekvensen som korresponderer til posisjonene 1 til 207 av SEKV ID NR:2.
- 20 4. Nukleinsyre ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det andre polypeptid omfatter et transkripsjons aktiveringsdomene av herpes simplex virion protein 16.
5. Nukleinsyre ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at transkripsjons
25 aktiveringsdomenet omfatter en C-terminal aminosyreregion av herpes simplex-virus virion protein 16 omfattende en aminosyresekvens som korresponderer til posisjonene 208 til 335 av SEKV ID NR:2.
6. Nukleinsyre ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d transkripsjons
30 aktiveringsdomenet omfatter minst én kopi av en C-terminal region av herpes simplex-virus virion protein 16 omfattende en aminosyresekvens vist i SEKV ID NR:4.

7. Nukleinsyre ifølge krav 1, karakterisert ved at det andre polypeptid omfatter et transkripsjons aktiveringsdomene utvalgt fra gruppen som omfatter: et surt transkripsjons aktiveringsdomene, et prolin-rikt transkripsjons aktiveringsdomene, et serin/threonin-rikt transkripsjons aktiveringsdomene og et glutamin-rikt transkripsjons aktiveringsdomene.
8. Fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, karakterisert ved at det omfatter et første polypeptid som er en mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær, men ikke i fravær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et annet polypeptid omfattende et transkripsjons aktiveringsdomene som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler.
9. Rekombinant vektor, karakterisert ved at den omfatter nukleinsyremolekylet ifølge krav 1, i en form som er passende for ekspresjon av fusjonsproteinet i en vertscelle.
10. Rekombinant vektor ifølge krav 9, karakterisert ved at ekspresjon av fusjonsproteinet er regulert av minst ett vevsspesifikt regulatorisk element.
11. Rekombinant vektor ifølge krav 9, karakterisert ved at ekspresjon av fusjonsproteinet blir regulert av minst én tet-operatorsekvens.
12. Vertscelle, karakterisert ved at den omfatter den rekombinante vektor ifølge krav 9.
13. Vertscelle ifølge krav 12, karakterisert ved at den videre omfatter en nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst én tet-operator-sekvens.
14. Fremgangsmåte for å stimulere transkripsjon av nukleotidsekvensen operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens i vertscellen ifølge krav 13, karakterisert ved at den omfatter å kontakte vertscellen *in vitro* med tetracyklin eller en tetracyklin-analog.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfatter å isolere et protein som er kodet for av nukleotidsekvensen som er operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens fra vertscellen eller fra et kulturmedium der vertscellene blir dyrket.
- 5
16. Isolert nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som hemmer transkripsjon i eukaryote celler, k a r a k t e r i s e r t v e d at fusjonsproteinet omfatter et første polypeptid som er en Tet repressor eller en mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens operativt koblet til et heterologt annet
- 10 polypeptid omfattende et transkripsjons inhiberings-"silencer"-domene som hemmer transkripsjon i eukaryote celler.
17. Nukleinsyre ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at det første polypeptid binder til en tet-operatorsekvens i fravær men ikke i nærvær av
- 15 tetracyklin eller en tetracyklin-analog.
18. Nukleinsyre ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at det første polypeptid omfatter en aminosyresekvens som er vist i SEKV ID NR:17.
- 20 19. Nukleinsyre ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at det første polypeptid binder til en tet-operatorsekvens i nærvær, men ikke i fravær, av tetracyklin eller en tetracyklin-analog.
20. Nukleinsyre ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at den muterte Tet
- 25 repressoren har en aminosyresubstitusjon på minst én aminosyreposisjon som tilsvarer en aminosyreposisjon utvalgt fra gruppen som består av posisjon 71, posisjon 95, posisjon 101 og posisjon 102 av en villtype Tn10-avledet Tet repressor aminosyresekvens.
- 30 21. Nukleinsyre ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at den muterte Tet repressoren omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV ID NR:19.
22. Nukleinsyre ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at det andre polypeptid omfatter et transkripsjons "silencer"-domene av et v-erbA onkogenprodukt.

23. Nukleinsyre ifølge krav 22, karakterisert ved at det andre polypeptid omfatter en aminosyresekvens vist SEKV ID NR:23.

24. Nukleinsyre ifølge krav 16, karakterisert ved at det andre polypeptid omfatter et transkripsjons repressor-domene av et Drosophila Krueppel protein.

25. Nukleinsyre ifølge krav 24, karakterisert ved at det andre polypeptid omfatter en aminosyresekvens vist i SEKV ID NR:21.

10

26. Nukleinsyre ifølge krav 16, karakterisert ved at det andre polypeptid omfatter et transkripsjons "silencer"-domene av et protein utvalgt fra gruppen bestående av retinsyre-reseptor alfa, thyroidhormon-reseptor alfa, gjær Ssn6/Tup1 proteinkomplekset, Drosophila proteinet "even-skipped", SIR1, NeP1, Drosophila dorsal proteinet, TSF3, SFI, Drosophila "hunchback" proteinet, Drosophila "knirps" proteinet, WT1, Oct-2.1, Drosophila "engrailed" proteinet, E4BP4 og ZF5.

15

27. Fusjonsprotein som hemmer transkripsjon i eukaryote celler, karakterisert ved at det omfatter et første polypeptid som er en Tet repressor eller en mutert Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens, operativt koblet til et heterologt annet polypeptid omfattende et transkripsjons inhiberings-"silencer"-domene som hemmer transkripsjon i eukaryote celler.

20

28. Fusjonsproteinet ifølge krav 27, karakterisert ved at det første polypeptid binder til en tet-operatorsekvens i fravær, men ikke i nærvær, av tetracyklin eller en tetracyklin-analog.

25

29. Fusjonsproteinet ifølge krav 27, karakterisert ved at det første polypeptid binder til en tet-operatorsekvens i nærvær, men ikke i fravær, av tetracyklin eller en tetracyklin-analog.

30

30. Rekombinant vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter nukleinsyremolekylet ifølge krav 16 i en form som er passende for ekspresjon av fusjonsproteinet i en vertscelle.

5 31. Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter den rekombinante vektor ifølge krav 30.

32. Vertscelle ifølge krav 31, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfattende en nukleotidsekvens som skal transkriberes operativt koblet til minst
10 én tet-operatorsekvens.

33. Fremgangsmåte for å modulere transkripsjon av nukleotidsekvensen som er operativt koblet til minst en tet-operatorsekvens i vertscellen ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter modulering av konsentrasjon av
15 tetracyklin eller en tetracyklin-analog som er i kontakt *in vitro* med vertscellen.

34. Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:
en første nukleinsyre som koder for et første fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, det første fusjonsproteinet omfattende et første polypeptid som
20 binder til en tet-operatorsekvens operativt koblet til et annet polypeptid som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler;
en annen nukleinsyre som koder for et annet fusjonsprotein som hemmer transkripsjon, det andre fusjonsprotein omfattende et tredje polypeptid som binder til en tet-operatorsekvens operativt koblet til et fjerde polypeptid som hemmer
25 transkripsjon i eukaryote celler; og
et tredje nukleinsyremolekyl som omfatter en nukleotidsekvens som skal bli transkribert operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens.

35. Rekombinant vektor for koordinert, bidireksjonell transkripsjon av en første
30 og en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes, k a r a k t e r i s e r t v e d at vektoren omfatter en nukleotidsekvens som omfatter i en 5' til 3' retning:
et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, som er operativt koblet til
minst én tet-operatorsekvens, som er operativt koblet til

et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes,

der transkripsjon av den første og andre nukleotidsekvens som er introdusert i vektoren foregår i motsatte retninger i relasjon til minst én tet-operatorsekvens.

36. Rekombinant vektor ifølge krav 35, karakterisert ved at den første og andre nukleotidsekvens som skal transkriberes har blitt introdusert inn i det første og andre kloningssete, respektive.

37. Rekombinant vektor for uavhengig regulering av transkripsjon av en første og en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes, karakterisert ved at vektoren som omfatter en nukleotidsekvens omfatter:

et første kloningssete for introduksjon av en første nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en første klasse type; og

et annet kloningssete for introduksjon av en annen nukleotidsekvens som skal transkriberes, operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens av en annen klasse type.

38. Vektor ifølge krav 37, karakterisert ved at den første og andre nukleotidsekvens som skal transkriberes har blitt introdusert i det første og andre kloningssete, respektive.

39. Testsett som omfatter et bærermiddel som har tett innelukket i seg minst to oppbevaringsmidler, karakterisert ved at det omfatter:

en første beholder som inneholder en første nukleinsyre som koder for et fusjonsprotein som aktiverer transkripsjon, der fusjonsproteinet omfatter et første polypeptid som er en Tet repressor som binder til en tet-operatorsekvens i nærvær av tetracyklin eller en tetracyklin-analog, operativt koblet til et annet polypeptid omfattende et transkripsjons aktivatoromene som aktiverer transkripsjon i eukaryote celler; og

en annen beholder som inneholder en annen nukleinsyre som omfatter et kloningssete for introduksjon av en nukleotidsekvens som skal bli transkribert operativt koblet til minst én tet-operatorsekvens.

FIG. 1

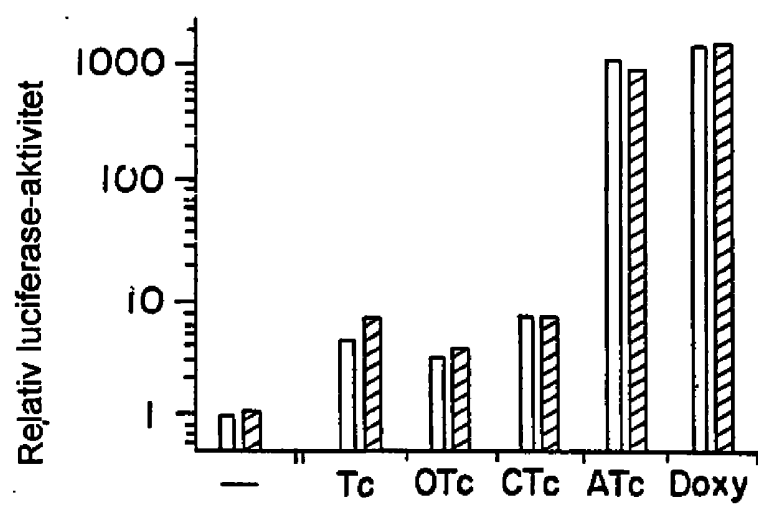


FIG.2

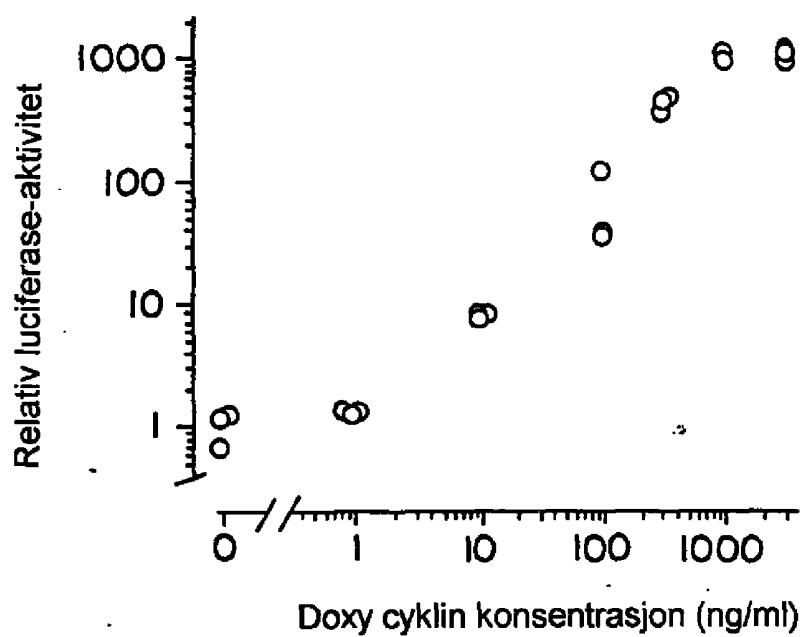


FIG.3

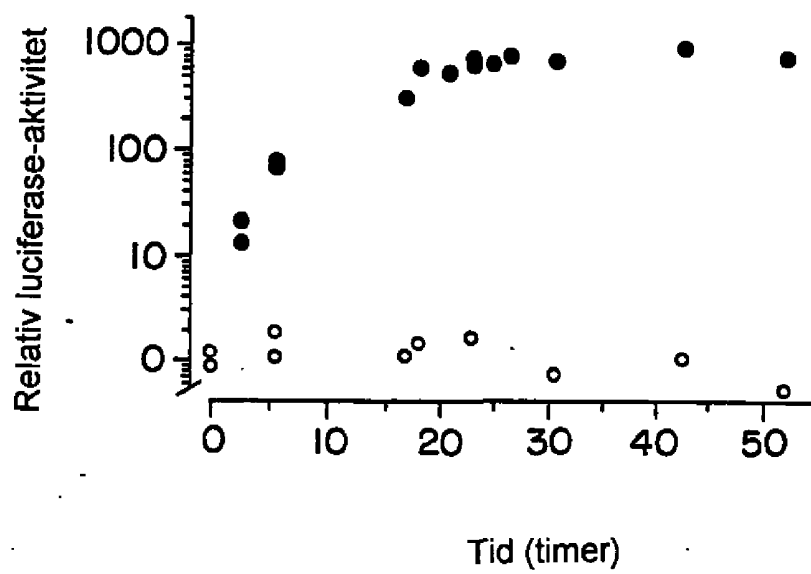
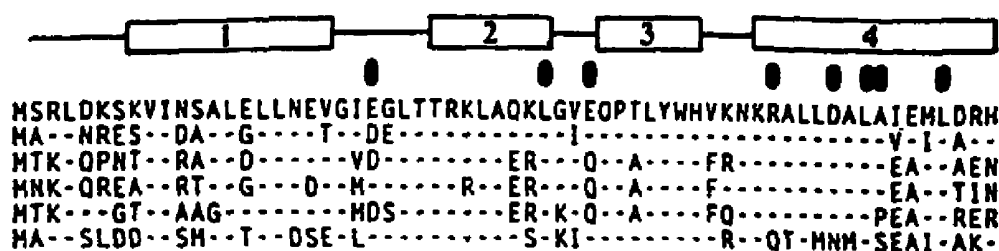
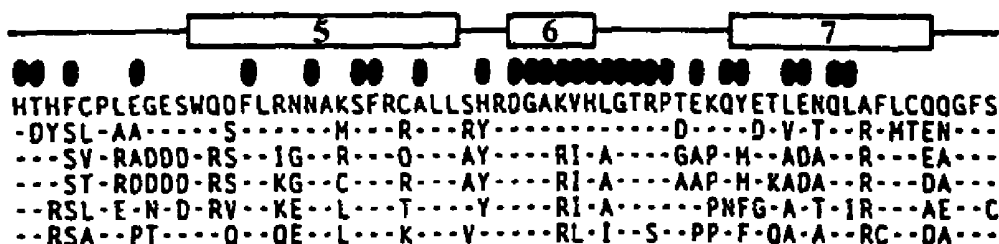


FIG. 4A

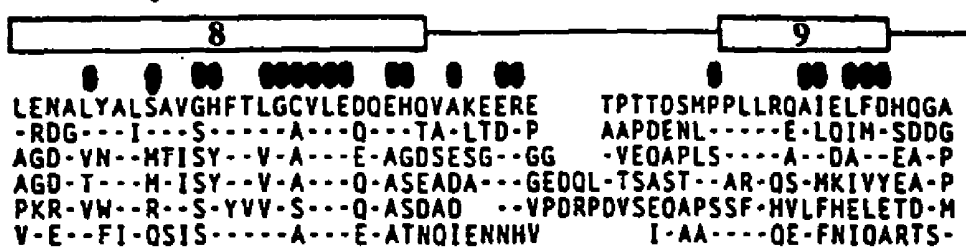
H T H



63 B
 D
 A
 C
 G
 E



126 B
 D
 A
 C
 G
 E



182 B
 182 D
 183 A
 186 C
 184 G
 179 E



207 B
 218 D
 216 A
 219 C
 210 G
 211 E

-Q---H---SL-R-F-V--TALLQIVGGDKLIIPFC
 DA--EQ--AV-VD--A--RRLVVRNVEGPRKGDD
 DA--ER--A---G---MRLTTNDIEVLKNVDE
 DA--N---DSL-A-F-RLRAAVLATD
 -M--H---KSL-F-FSA--DEKKHTPIEDGNK

FIG. 5

A1	AC T T T A T C A C T G A T A A A C A T G A A A T A G T G A C T A T T T G T	A A C T T A T C A G T G A T A A A G A T T G A A T A G T C A C T A T T T C T	A2
B1	A C T C T A T C A T T G A T A G A G T T G A G A T A G T A A C T A T C T C A	T C C C T A T C A G T G A T A G A A G G A T A G T C A C T A T C T C T	B2
C1	A G C T T A T C A T C G A T A A G C T T C G A A T A G T A G C T A T T C G A	A G T T T A T C A C A G T T A A A T T C A A A T A G T G T C A A T T T A A	C2
D1	A C T C T A T C A T T G A T A G G G A T G A G A T A G T A A C T A T C C C T	A C T C T A T C A T T G A T A G G G A T G A G A T A G T T A C T A T C C C T	D2
E1	A A T C T A T C A C T G A T A G A G T T T A G A T A G T G A C T A T C T C A	A C C C T A T C A T C G A T A G A G A T G G G A T A G T A G C T A T C T C T	E2

FIG. 6

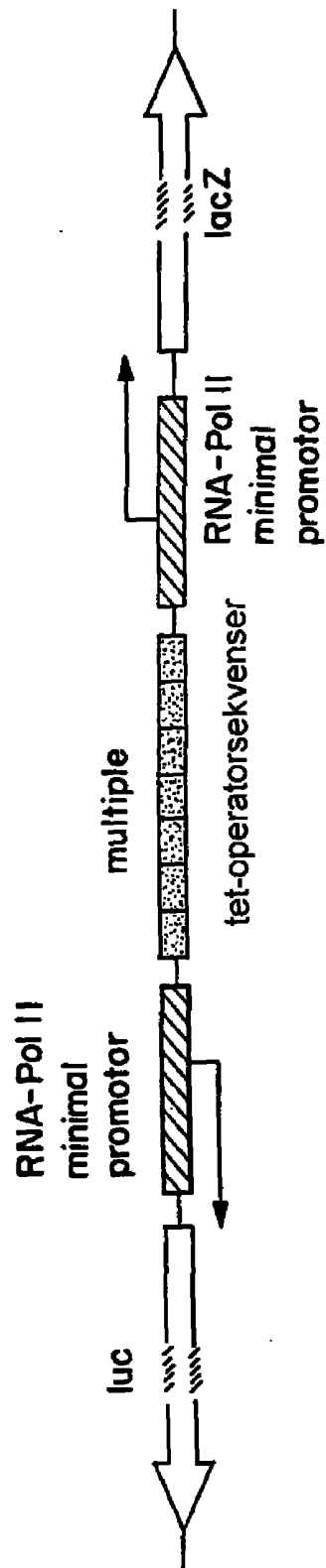


FIG. 7A

5' GAATTCGGGG
EcoRI +75

CCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGA

+1
←
C

TGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACCTAAACGAGCTCTGCTT.ATATAGG
P_{hCMV*-3}
-31

tet O

TC (GAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTC)₇GAGC

P_{hCMV*-4}

TCGGTACCCGGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAG
-53

CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA
+1 →

CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCCGAATTC 3'
+75 EcoRI

FIG. 7B



FIG. 8A

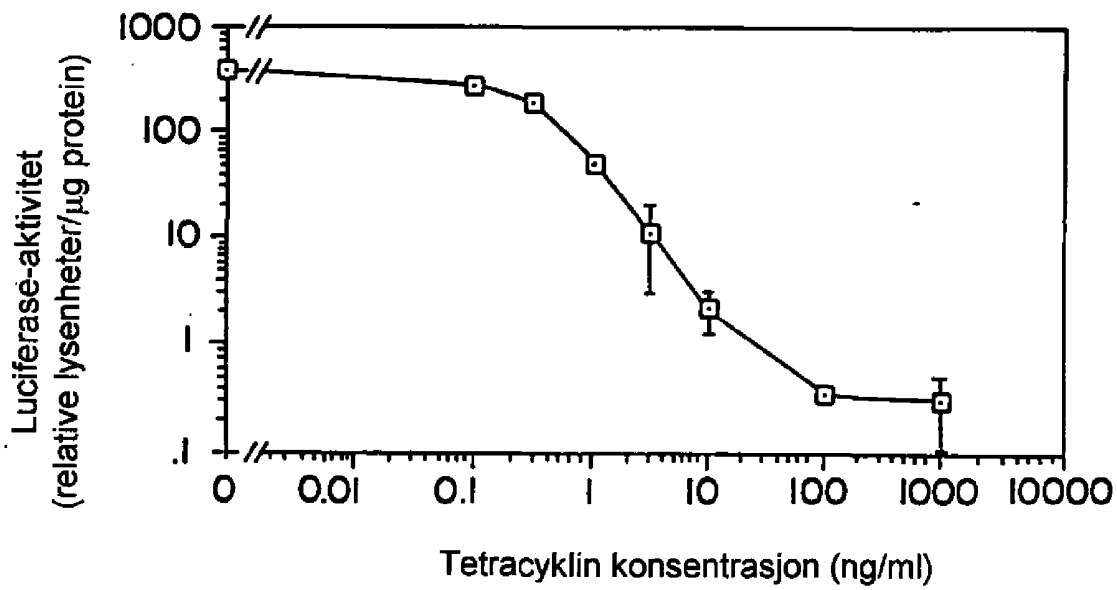


FIG. 8B

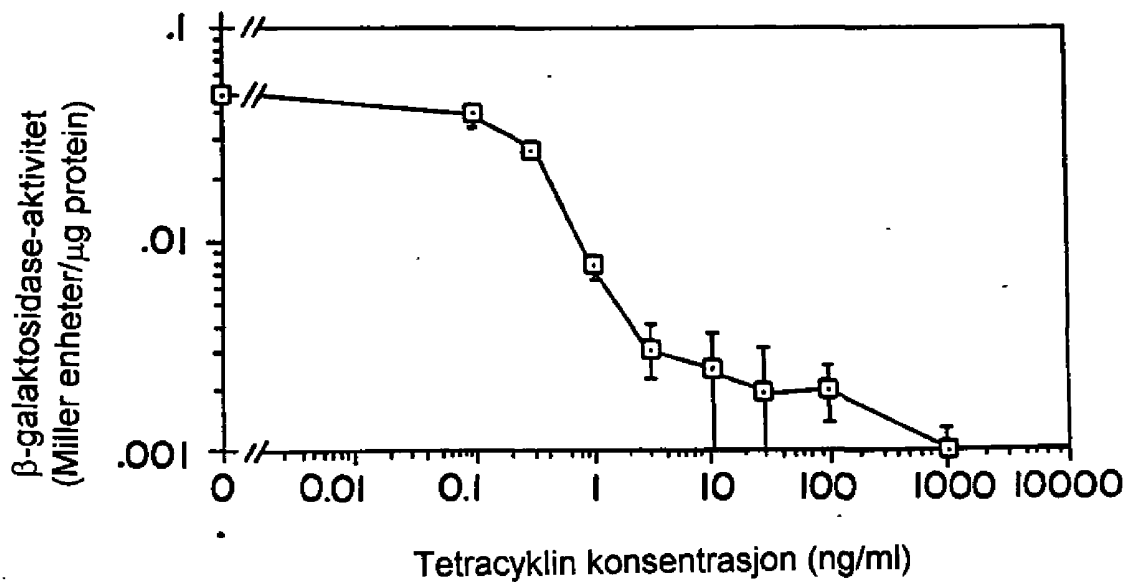


FIG. 9A

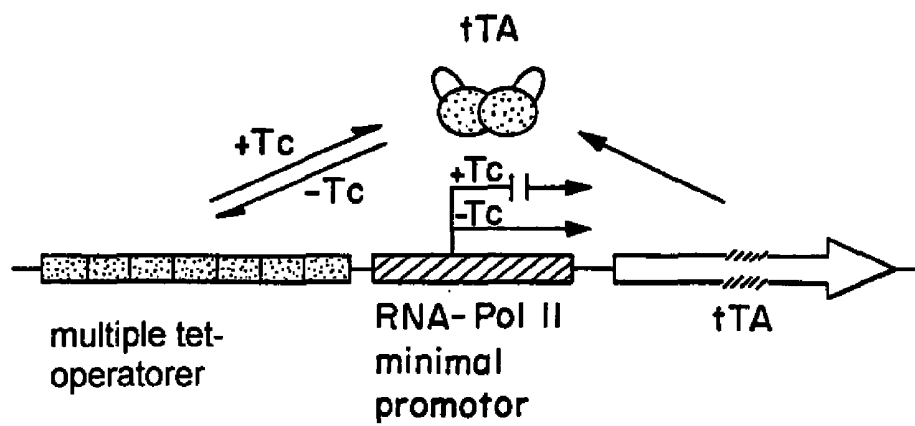


FIG. 9B

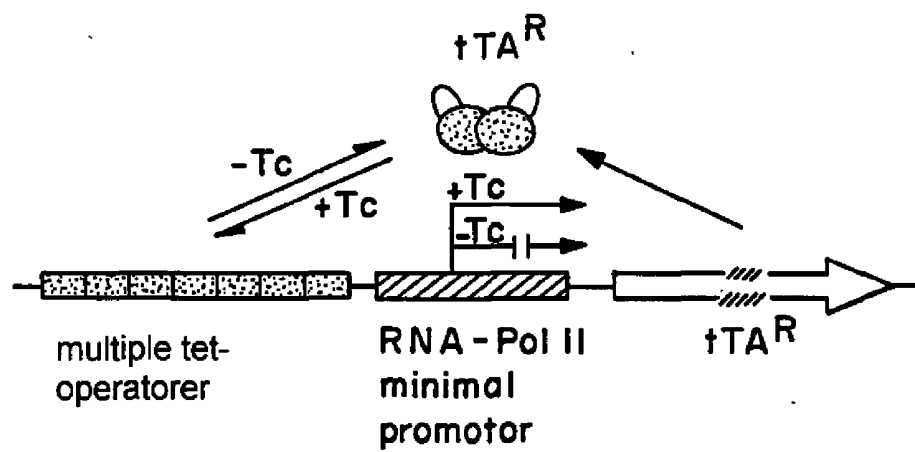


FIG.10

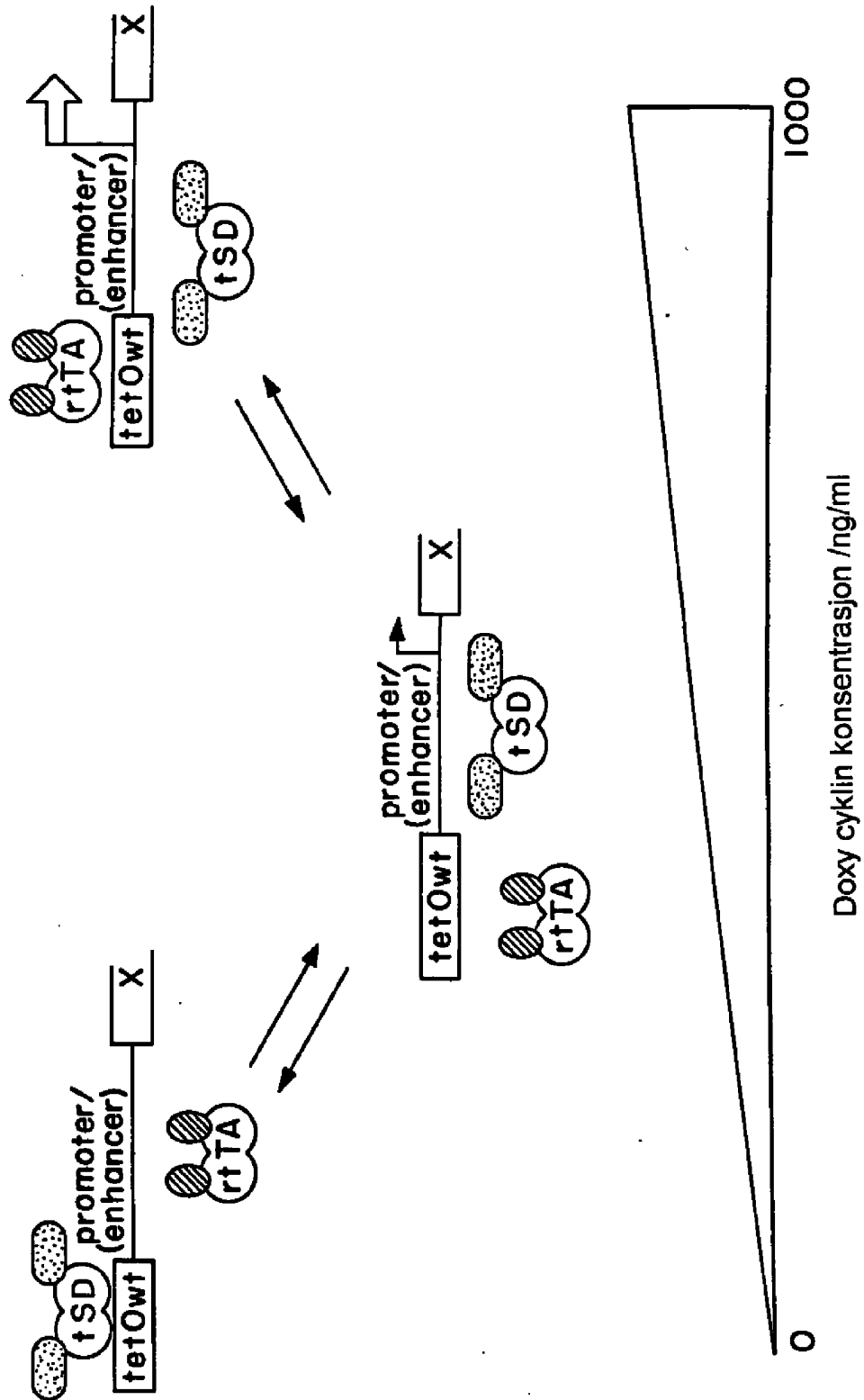


FIG. II

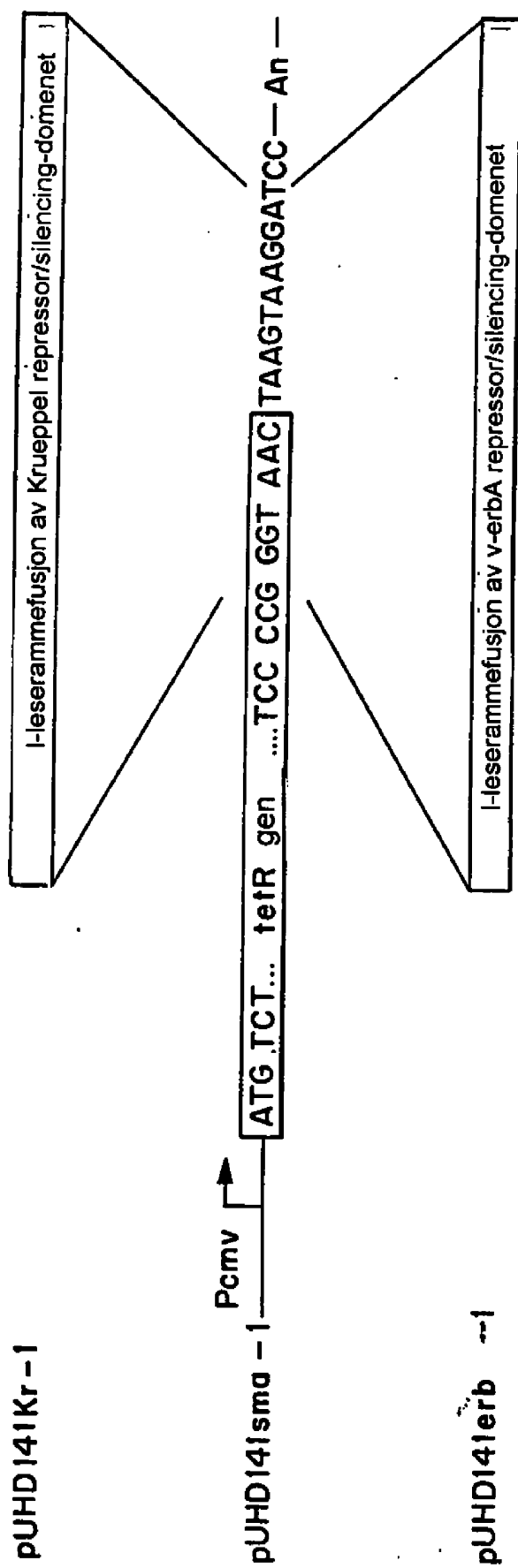


FIG.12

