

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

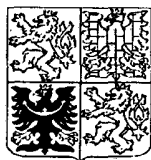
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3080-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29. 03. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **31.03.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9503841**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 01. 98**
(Věstník č. 1/98)

(86) PCT číslo: **PCT/FR96/00477**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/30512**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 12 N	15/62
C 12 N	15/63
C 12 N	15/85
C 12 N	15/86
C 07 K	14/82
A 61 K	31/70

(71) Přihlášovatel:

RHONE-POULENC RORER S.A., Antony, FR;

(72) Původce:

Bracco Laurent, Paris, FR;

Schweighoffer Fabien, Vincennes, FR;

Tocque Bruno, Courbevoie, FR;

(74) Zástupce:

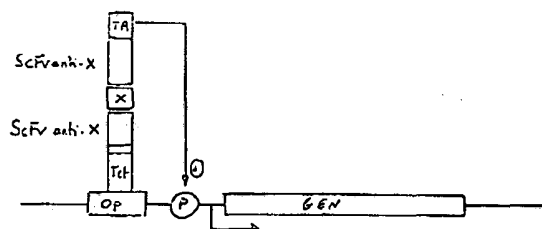
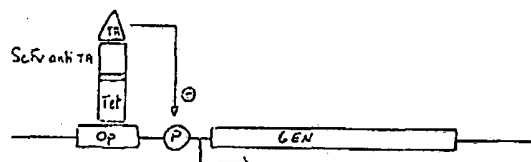
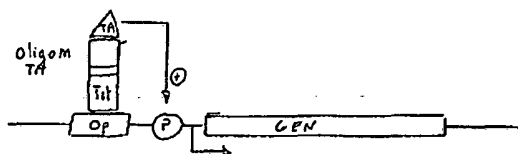
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Systém podmínění exprese

(57) Anotace:

Vynález se týká nového systému podmíněné exprese genů. Systém podle vynálezu je zejména založen na realizaci exprese bispecifických chimerických molekul obsahujících oblast schopnou selektivně vázat definovanou sekvencí DNA a detekční oblast schopnou specificky vázat transaktivátor nebo transrepresor nebo transaktivátorový nebo transrepresorový komplex.



CZ 3080-97 A3

System podmíněné exprese

Oblast techniky

Vynález se týká nového systému pro podmíněnou expresi genů. Vynález se rovněž týká použití tohoto systému v genové nebo buněčné terapii pro dosažení velmi selektivní exprese zainteresovaného genu.

Dosavadní stav techniky

Genová a buněčná terapie spočívá v korekci nedostatečnosti nebo anomálie (mutace, aberantní exprese a podobně) nebo v zajištění exprese terapeutického zainteresovaného proteinu zavedením genetické informace do léčeného orgánu nebo do léčené buňky. Tato genetická informace může být zavedena buď ex vivo do buňky izolované z orgánu, přičemž tato buňka, která byla takto modifikována, se potom zavede zpět do organismu (buněčná terapie), nebo přímo in vivo do příslušné tkáně (genová terapie).

Pro provedení přenosu genů existují různé techniky, ze kterých lze zejména uvést různé techniky transfekce, při kterých nachází uplatnění přírodní nebo syntetické, chemické nebo biochemické vektory, jakými jsou například komplexy DNA a DEAE-dextranu (Pagano a kol., J.Virol. 1 (1967)891), DNA a jadrových proteinů (Kaneda a kol., Science 243(1989) 375), DNA a lipidů (Felgner a kol., PNAS 84 (1987)7413), použití liposomů (Fraleley a kol., J.Biol.Chem.255(1980)10431), jakož i kationtových lipidů a podobně. Jiná transfekční technika spočívá v použití virů jakožto vektorů pro přenos genů. V tomto ohledu byly testovány různé viry za účelem stanovení jejich schopnosti infikovat určité buněčné populace. Zejména se jedná o retroviry (RSV, HMS, MMS a podobně), vir HSV, adeno-přisružené viry a adenoviry.

Jednou z hlavních obtíží, které se vyskytují při rozvoji genové a buněčné terapie, je však selektivita léčení. V závislosti na dané aplikaci a na přenášeném genu je velmi

důležité mít možnost zacílit některé tkáně nebo pouze některé části organismu a to za účelem zaostření terapeutického účinku pouze na tyto tkáně nebo části organismu o omezení rozptylu tohoto účinku a sekundárních nežádoucích účinků.

Takové zacílení terapeutického účinku může být provedeno za použití vektorů, které vykazují potřebnou danou buněčnou specifičnost, tj. vektorů, které jsou selektivně specifické pouze pro zainteresované buňky.

Jiný přístup k řešení uvedeného problému spočívá v použití specifických expresních signálů některých buněčných typů. V tomto ohledu byly v literatuře popsány tak zvané specifické promotory, jakými jsou například promotory genů kódujících pyruvát-kinázu, villin, GFAP, promotor intestinální vazby mastných kyselin, promotor aktinu alfa buněk hladkého svalu nebo promotor genů apo-AI, apo-AII, lidský albumin a podobně. Tyto promotory však mají některé nedostatky a zejména vykazují určitý transkripční šum, který může být nepříjemný při expresi toxických genů. Použití těchto promotorů je tedy omezeno pouze na některé buňky a nemohou být tedy použity pro jakoukoliv aplikaci.

Podstata vynálezu

Vynález nyní popisuje nový systém podmíněné exprese genů, který je obzvláště selektivní a účinný. Výhodným znakem tohoto systému podle vynálezu je jeho schopnost exprimovat gen nikoliv v závislosti na buněčném typu, nýbrž v závislosti na přítomnosti specifického buněčného prvku nebo specifické fyziologické situace. Tento systém se ve skutečnosti týká chimerických bispecifických molekul obsahujících oblast, která je schopna selektivně vázat definovanou sekvenci DNA, a detekční oblast, která je schopna specificky vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex.

První znak vynálezu spočívá ve vytvoření a expresi

chimerických bispecifických molekul obsahujících oblast, která je schopna selektivně vázat definovanou sekvenci DNA, a oblast, která je schopna specificky vázat transaktivátor nebo transrepresor nebo transaktivační nebo transrepresorový komplex.

Další znak vynálezu spočívá v sekvenci nukleové kyseliny kódující výše definovanou chimerickou molekulu, jakož i v každém expresním vektoru, který obsahuje uvedenou nukleovou sekvenci.

Další znak vynálezu spočívá v systému podmíněné exprese genů, zahrnujícím i) výše definovanou chimerickou molekulu a ii) expresní kazetu obsahující regulační sekvenci, minimální promotor (jehož aktivita závisí na přítomnosti transaktivátoru) a uvedený gen.

Další znak vynálezu spočívá rovněž v expresním vektoru zahrnujícím

- nukleovou sekvenci kódující výše definovanou chimerickou molekulu a
- uvedenou expresní kazetu.

Systém podmíněné exprese podle vynálezu je obzvláště vhodný pro použití v genové nebo buněčné terapii k dosažení velmi selektivní exprese zainteresovaných genů.

Jedna ze složek systému podle vynálezu je tedy tvořena chimerickými bispecifickými molekulami obsahujícími oblast, která je schopna selektivně vázat definovanou sekvenci DNA, a oblast, která je schopna selektivně vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex. Bispecifičnost molekul podle vynálezu spočívá jednak v jejich schopnosti vázat definovanou sekvenci DNA (která je obvykle označována jako regulační nebo operační sekvence) a jednak v jejich schopnosti specificky tvořit transaktivační nebo transrepresní proteinovou oblast, která umožňuje indukovat nebo potlačit expresi genů.

Vynález spočívá ve vytvoření chimerických bispecifických molekul umožňujících získání každého transkripčního faktoru, jehož aktivace nebo inaktivace vede k fyziopatologické situaci. Chimerické bispecifické molekuly podle vynálezu takto umožňují selektivní získání specifických transkripčních transaktivátorů fyziopatologického stavu, fixování těchto transkripčních faktorů k promotorům prostřednictvím vazby těchto molekul k definovaným sekvencím DNA lokalizovaným u těchto promotorů (regulační nebo operační sekvence) a takto i dosažení podmíněné exprese genů (obr.1).

Vynález se rovněž týká chimerických bispecifických molekul umožňujících vytvoření nikoliv molekuly nesoucí transaktivační oblast, avšak transkripčního transaktivačního komplexu, tj. komplexu vytvořeného mezi cílovou molekulou přítomnou v buňce a molekulou nesoucí transaktivační oblast (obr.2). V tomto případě, je transaktivační komplex výhodně vytvořen pomocí druhé chimerické bispecifické molekuly obsahující transaktivační oblast a oblast selektivní vazby k uvedené buněčné molekule. Fixování této druhé molekuly umožňuje vytvoření transkripčního transaktivačního binárního komplexu, přičemž tento komplex je takto tvořen detekčním systémem podle vynálezu. Fixování tohoto ternárního komplexu v blízkosti promotorů takto umožňuje regulovanou expresi genů. Tento typ konstrukce výhodně umožňuje rozšířit oblast použití systému podle vynálezu na detekci libovolné intracelulární molekuly zbavené transaktivační oblasti a to až se již jedná o endogenní molekulu nebo například o molekulu infekčního původu.

Systém podle vynálezu takto díky velmi selektivnímu detekčnímu systému ("senzor") umožňuje aktivovat výlučně expresi zainteresovaných genů v přítomnosti cílových proteinů. Může se jednat o stranskripční faktory vyskytujících se v rámci fyziologických nebo fyziopatologických situací nebo o libovolnou endogenní molekulu nebo například o molekulu infekčního původu.

V rámci vynálezu výraz transaktivátor označuje každý transaktivační faktor transkripce nebo každý protein zahrnující transkripční transaktivační oblast. Výraz transaktivační komplex označuje komplex vytvořený mezi molekulou přítomnou v buňce a bispecifickou molekulou podle vynálezu obsahující transaktivační oblast a oblast specifické vazby k uvedené molekule.

Expresní systém podle vynálezu může být použit pro získání libovolného transaktivačního proteinu nebo proteinu nesoucího transaktivační oblast a zejména libovolného proteinu virálního, parazitního nebo mykobakteriálního původu, jakož i buněčného původu, majícího transkripční transaktivační účinnost.

Z transkripčních faktorů virálního původu lze uvést zejména protein Tat viru HIV, proteiny E6/E7 viru papilomu nebo také protein EBNA viru Epsteinova a Barrova. Tyto proteiny mají transkripční transaktivační oblast a jsou přítomny výlučně v buňkách infikovaných těmito viry, tj. za specifických fyziopatologických podmínek. System podmíněné exprese podle vynálezu výhodně umožňuje detekci takové fyziologické situace (výskyt uvedených specifických transaktivátorů virální infekce) a indukci selektivní exprese daného genu nebo daných genů.

Z buněčných proteinů lze výhodně uvést mutovaný nebo divoký protein p53. Tento protein p53 je tvořen 393 aminokyselinami. Ve své divoké formě je tento protein supresorem nádorů schopným negativně regulovat růst a dělení buněk. Tato účinnost je spojena s přítomností transkripční transaktivační oblasti ve struktuře proteinu p53, lokalizované v N-terminální oblasti proteinu (asi zbytky 1 až 100). V některých situacích je divoký protein p53 rovněž schopen indukovat apoptózu (Yonish-Rouach a kol., Nature, 352, 345-347, 1991). Tyto vlastnosti se projevují ve stresových situacích, kdy je ohrožena integrita buněčné DNA a protein p53 je takto pokládán za "strážce genomu". Přítomnost mutovaných proteinů p53

v asi 40 % lidských nádorů všech typů posiluje tuto hypotézu a podtrhuje pravděpodobně klíčovou úlohu, kterou hrají mutace tohoto genu při rozvoji nádorů (o tom viz: Montemarh, *Oncogene*, 7, 1673-1680, 1992; Oren, *FASEB J.*, 6, 3169-3176, 1992; Zambetti a Levine, *FASEB J.*, 7, 855-865, 1993). V rámci vynálezu je možné selektivně rekrutovat transaktivační oblast proteinu p53 a takto indukovat regulovanou expresi genu nebo genů výlučně v buňkách obsahujících tento protein. Podle vynálezu je obzvláště zajímavé specificky rekrutovat mutované formy proteinu p53, které se, jak již bylo uvedeno výše, vyskytují ve fyziopatologických situacích buněčné proliferace (rakovinového typu). Takovéto zacílení může být výhodně provedeno pomocí oblasti specifické vazby k mutovaným formám proteinu p53. Nicméně existuje zde specifičnost spojená s akumulací mutovaných forem, které mají poločas života výrazně delší oproti divoké formě.

System podle vynálezu může být rovněž použit pro indukovaní selektivní exprese genu nebo genů detekcí každé cílové molekuly přítomné v buňce. Detekovaným proteinem je výhodně protein vyskytující se v buňce při abnormálních situacích (infekce, hyperproliferace, a podobně). Může se zejména jednat o virální proteiny, jakými jsou například strukturní nebo funkční proteiny viru a zejména viru HIV, hepatitidy, herpes, a podobně. Může se rovněž jednat o specifické proteiny buněčného hyperproliferačního stavu, jakými jsou zejména proteiny myc, fos, jun, cykliny a podobně.

Jedna z vlastností chimerických molekul podle vynálezu spočívá tedy v jejich schopnosti vázat se na specifické oblasti DNA (regulační nebo operační oblasti). Tato vazba umožňuje přivést transaktivační oblast do blízkosti promotoru a tímto způsobem aktivovat expresi genu vloženého pod kontrolu uvedeného promotoru.

Oblast schopná selektivně vázat definovanou sekvenci DNA přítomná v molekulách podle vynálezu je v podstatě protei-

nového původu. Výhodněji je tato oblast odvozena od prokaryotického nebo eukaryotického proteinu schopného interakce se sekvencemi DNA. Četné genetické a strukturální studie dnes již umožňují přesně definovat v proteinech vstupujících v interakci se sekvencemi dvouvláknové DNA oblasti, které jsou zodpovědné za tyto interakce.

Z prokaryotických proteinů vstupujících do interakce se sekvencemi dvouvláknové DNA lze uvést zejména bakteriální represory a výhodněji tetracyklinový represor odvozený z E.Coli a represor Cro odvozený od bakteriofágu Lambda.

Uvedený tetracyklinový represor (tetR) od E.Coli je proteinem s asi 210 aminokyselinami. V E.coli tento tetracyklinový supresor tetR negativně reguluje transkripci genů mediujících rezistenci k tomuto antibiotiku v operonu tet. V nepřítomnosti tetracyklinu se represor tetR fixuje k DNA v úrovni specifické sekvence (která je označována jako operační sekvence nebo Tetop) a potlačuje transkripci rezistenčního genu. Naopak v přítomnosti tetracyklinu se represor tetR již nefixuje k operátoru tetop umožňující tak konstituční transkripci uvedeného genu (Hillen.W a Wissmann A. (1989) v Protein-Nucleic Acid Interaction. Topics in Molecular and Structural Biology, ed., Saenger W. a Heinemann U. (Macmillan, Londýn), sv.10, str. 143-162). Sekvence tetracyklinového supresoru tetR již byla publikována (je uvedena zejména v patentovém dokumentu WO94/04682). Sekvence dvouvláknové DNA, která je specifická pro vazbu tetracyklinového supresoru tetR k DNA (Tetop) je tvořena následujícím motivem:

TCTCTATCACTGATAGGGA (SEQ ID n^o1).

Tento motif může být opakován několikrát za účelem zvýšení afinity a účinnosti systému. Regulační sekvence může takto obsahovat a 10 uvedených motivů, přičemž výhodně obsahuje dva motivy (Tetop2) nebo sedm motivů (Tetop7)(viz obr.3).

Protein Cro byl definován původně jako regulátor expre-

se represoru CI (Eisen H. a kol.(1970)PNAS 66, str.855). Klonování geni *cro* umožnilo identifikaci proteinu s 66 aminokyselinami (SEQ ID n^o21; Roberts T. a kol.(1977), Nature 270, str.274). *Cro* vykonává svou fyziologickou úlohu tím, že se přednostně fixuje na operátor OR₃ odvozený od bakteriofágu Lambda.

Sekvence dvouvláknové DNA specifická pro vazbu *Cro* k DNA (oblast označovaná jako OR3) je tvořena následujícími bázemi:

TATCACCGCAAGGGATA (SEQ ID n^o2).

Tato oblast může být opakována několikrát za účelem dosažení zvýšené afinity a účinnosti systému (viz obr.4).

Z eukaryotických proteinů vstupujících v interakci se sekvencemi dvouvláknové DNA se pro konstrukci molekul podle vynálezu výhodně používají proteiny nebo oblasti odvozené od proteinů STAT, p53 nebo NFκB (Inoue a kol., PNAS 89(1992) 4333). Pokud jde o protein p53, je jeho vazebná oblast k DNA lokalizována v centrální oblasti proteinu, přesněji v oblasti mezi aminokyselinami 102 až 292 (Pavletich a kol., Genes and Dev.7(1993)2556).

Jak již bylo uvedeno výše, je oblast schopná selektivně vázat definovanou sekvenci DNA přítomná v molekulách podle vynálezu výhodně odvozena od prokaryotického nebo eukaryotického proteinu schopného vstoupit v interakci s oblastí dvouvláknové DNA. Oblast použitá pro konstrukci molekul podle vynálezu může být tvořena celým proteinem nebo jeho částí obsahující oblast interakce s DNA. Tato oblast byla indentifikována v případě různých proteinů a zejména v případě TetR (viz například Berens a kol., J.Biol.Chem.267(1992)1945). Tato oblast může být rovněž tvořena derivátem tohoto proteinu nebo jeho fragmentem, který si zachoval schopnost vazby k DNA. Takovými deriváty jsou zejména proteiny s modifikací

jedné nebo několika aminokyselin, například za účelem umožnění jejich fuze s ostatními oblastmi molekul podle vynálezu, které mohou být připraveny klasickými technikami molekulární biologie. Tak například takové deriváty proteinů TetR a Cro byly již popsány v literatuře, přičemž tyto deriváty mají lokálně přesné mutace nebo/a delece (Hecht a kol., J. Bact. 175(1993), str. 1206; Altschmied a kol., EMBO J 7 (1988) 4011; Baumister a kol., Proteins 14 (1992) 168; Hansen a kol., J. Biol. Chem. 262(1987) 14030). Schopnost těchto derivátů vázat se k definované sekvenci DNA může být potom testována inkubací připraveného derivátu s regulační sekvencí a detekcí vytvořených komplexů. Kromě toho uvedenými deriváty mohou být rovněž proteiny mající zlepšenou schopnost vazby k DNA (specifičnost, afinita a podobně).

Podle výhodné formy provedení je oblast schopná selektivně vázat definovanou sekvenci DNA přítomná v molekulách podle vynálezu odvozena od prokaryotického proteinu. Tento typ konstrukce je obzvláště výhodný vzhledem k tomu, že tyto proteiny nelidského původu rozpoznávají dvouvláknové DNA s alespoň 14 nukleotidy. Pravděpodobnost nalezení stejné sekvence v lidském genomu je téměř nulová a získaný expresní systém je takto ještě selektivnější.

V rámci jiné výhodné formy provedení je oblast schopná selektivně vázat definovanou sekvenci DNA přítomná v molekulách podle vynálezu odvozena od proteinů tetR nebo Cro. Je obzvláště výhodné použít proteiny tetR nebo Cro (SEQ ID n^o 21) v kompletním stavu.

Oblast schopná specificky vázat transkripční transaktivátor nebo transkripční transaktivační komplex přítomná v molekulách podle vynálezu může být oblastí různého typu. Zejména se může jednat o oligomerizační oblast v případě, kdy transaktivátor nebo transaktivační komplex, který má být zacílen, takovou oblast rovněž obsahuje. Může se rovněž jednat o každou syntetickou nebo přírodní oblast, o které je známo,

že vstupuje v interakci s uvedeným transaktivátorem nebo transaktivačním komplexem. Může se také jednat o protilátku nebo o fragment nebo derivát protilátky řízené proti uvedenému transaktivátoru nebo transaktivačnímu komplexu.

Z oligomeračních oblastí použitelných v rámci vynálezu lze zejména jmenovat leucinové zipy, například oblasti SH2 nebo oblasti SH3. Leucinové zipy jsou alfa-amfipatickými helixy, které obsahují 4 nebo 5 leucinů každých 7 aminokyselin. Tato periodičnost umožňuje lokalizaci leucinů téměř ve stejné poloze na helixu alfa. Dimerace je podmíněna hydrofobními interakcemi mezi bočními řetězci leucinů dvou přilehlých zipových oblastí (Vogt a kol., *Trend In Bioch.Science* 14(1989). O oblastech SH2 je známo, že vstupují v interakci s fosforylovanými specifickými peptidovými oblastmi v tyrosinu. Oblasti SH3 mohou být použity pro vytvoření oligomeru s každým transaktivátorem nebo transaktivačním komplexem, který obsahuje odpovídající peptid bohatý na prolin (Pawson a kol., *Current Biology* 3 (1993)434). Rovněž mohou být použity oblasti proteinů, o kterých je známo, že indukují oligomerační, jakými jsou zejména C-terminální oblast proteinu p53. Použití této oblasti umožňuje rekrutovat selektivním způsobem proteiny p53 přítomné v buňce. V rámci vynálezu se výhodně používá oblast p53 obsažená mezi aminokyselinami 320-393 (SEQ ID n^o3). 302-360 nebo 302-390.

Ze syntetických nebo přírodních oblastí, o kterých je známo, že vstupují v interakci s molekulou obsahující cílový transaktivační prvek, lze například uvést oblast proteinu MDM2 vstupující v interakci s proteinem p53. Tento typ konstrukce takto umožňuje rekrutovat jako transaktivátor divoký nebo mutovaný protein p53.

Výhodnou oblastí specifické vazby k transkripčnímu transaktivátoru podle vynálezu je protilátka nebo fragment nebo derivát protilátky. Fragmenty nebo deriváty protilátky jsou například fragmenty Fab nebo F(ab)'₂, oblasti VH

nebo VL protilátky s jednoduchým řetězcem (ScFv) obsahující oblast VH spojenou s oblastí VL ramenem. Tento typ oblasti je obzvláště výhodný vzhledem k tomu, že může být řízen proti celé molekule.

Protilátky tvořené molekulami skupiny imunoglobulinů jsou tvořené různými řetězci (2 těžké (H) a 2 lehké (L)), přičemž tyto řetězce jsou zase tvořeny různými oblastmi (variabilní oblast (V), připojovací oblast (J) a podobně). Oblast vazby k transaktivátoru nebo k transaktivačnímu komplexu přítomná v molekulách podle vynálezu je výhodně tvořena fragmentem nebo derivátem protilátky obsahujícím alespoň vazebné místo zodpovědné za vazbu k antigenu. Tento fragment může být buď variabilní oblastí lehkého řetězce (V_L) nebo těžkého řetězce (V_H), případně ve formě fragmentu Fab nebo $F(ab')_2$ nebo výhodně ve formě protilátky s jednoduchým řetězcem (jednořetězcová protilátka) (ScFv). Jednořetězcové protilátky použité pro konstrukci molekul podle vynálezu jsou tvořené peptidem odpovídajícím vazebnému místu variabilní oblasti lehkého řetězce protilátky a připojeným peptidovým ramenem k peptidu odpovídajícímu vazebnému místu variabilní oblasti těžkého řetězce protilátky. Konstrukce sekvencí nukleových kyselin kódujících takové modifikované protilátky podle vynálezu byla například popsána v patentovém dokumentu US 4,946,778 nebo v patentových přihláškách WO94/02610 a WO94/29446. Tato konstrukce je ilustrována v dále zařazených příkladech.

Výhodná konstrukce podle vynálezu zahrnuje oblast vazby k proteinu p53. Výhodně se jedná o derivát protilátky řízený proti proteinu p53. Výhodnou formou této oblasti je jednořetězcová protilátka řízená proti p53. Jako ilustrační příklad je možné uvést použití ScFv se sekvencí SEQ ID n^o4, jehož konstrukce je popsána v příkladech provedení.

Oblast vazby k DNA a oblast vazby k transaktivátoru jsou vzájemně spojené prostřednictvím ramene. Toto rameno je obecně tvořeno peptidem zajišťujícím celému komplexu dosta-

tečnou flexibilitu, nezbytnou k tomu, aby ově uvedené oblasti molekul podle vynálezu mohly být funkční autonomním způsobem. Tento peptid je obecně tvořen nezatíženými aminokyselinami, které neinterferují s aktivitou molekul podle vynálezu a kterými jsou například glycin, serin, tryptofan, lysin nebo prolin. Toto rameno obsahuje obecně 5 až 30 aminokyselin, výhodně 5 až 20 aminokyselin. Příklady peptidových ramen použitelných pro konstrukci molekul podle vynálezu jsou například:

-GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID n^o5),
-PKPSTPPGSS (SEQ ID n^o6), jehož kódující sekvence je
CCCAAGCCCAGTACCCCCCAGGTTCTTCA (SEQ ID n^o6).

Výhodnými příklady molekul podle vynálezu jsou zejména následující molekuly:

a) ScFv-tag-Hinge-TET nebo Cro (obr.5A).

Tento typ molekuly zahrnuje:

- oblast vazby k transaktivátoru tvořenou jednořetězcovou protilátkou,
- peptidovou sekvencí tag poznatelnou monoklonální protilátkou umožňující imunologickou detekci molekuly. Touto sekvencí může být například epitop VSV sekvence MNRLGK (SEQ ID n^o7), jejíž kódující sekvencí je ATGAACCGGCTGGGCAAG (SEQ ID n^o7), nebo epitop myc se sekvencí EQKLISEEDLN (SEQ ID n^o8), jehož kódující sekvencí je GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT (SEQ ID n^o8) a který je rozpoznatelný protilátkou 9E10.
- peptidové rameno se sekvencí SEQ ID n^o6 (Hinge) a
- oblast vazby k DNA tvořenou proteinem TET nebo Cro.

ScFv je výhodně řízen proti proteinu p53.

b) ScFv-Hinge-TET nebo Cro (obr.5B)

Tento typ molekuly obsahuje stejné prvky jako molekula

a) s výjimkou spočívající v tom, že je zde nepřítomna sekven-

ce tag.

c) ScFv-TET nebo Cro (obr.5V)

Tento zjednodušený typ molekuly obsahuje pouze oblast vazby k transaktivátoru tvořenou jednořetězcovou protilátkou a oblast vazby k DNA tvořenou proteinem TET nebo Cro. Tato molekula neobsahuje ani rameno ani sekvenci tag. V této konstrukci je oblast vazby k transaktivátoru lokalizována v N-terminální části molekuly a oblast vazby k DNA se nachází v C-terminální části molekuly.

d) TET nebo Cro-ScFv (obr.5D)

Tento typ molekuly je podobný výše uvedenému typu c). Jediný rozdíl spočívá v podstatě v uspořádání oblastí: oblast vazby k transaktivátoru je nyní lokalizována v C-terminální části molekuly a oblast vazby DNA se nachází v N-terminální oblasti molekuly.

e) TET nebo Cro-Hinge-ScFv (obr.5E)

Tento typ molekuly obsahuje stejné prvky jako výše uvedený typ b) molekuly. Rozdíl spočívá v podstatě v uspořádání oblastí: oblast vazby k transaktivátoru je nyní lokalizována v C-terminální části molekuly, zatímco oblast vazby k DNA se v tomto případě nachází v N-terminální části molekuly.

f) Oligom-tag-Hinge-TET nebo Cro (obr.5A)

Tento typ molekuly je podobný výše uvedenému typu a) a výjimkou spočívající v tom, že oblast vazby k transaktivátoru je nahrazena oblastí oligomerace s proteinem p53 se sekvencí SEQ ID n^o3. Tato molekula umožňuje rekrutovat mutované proteiny p53 vyskytující se v nádorových buňkách.

g) Oligom-Hinge-TET nebo Cro (obr.5B)

Tento typ molekuly je podobný výše uvedenému typu b) s výjimkou spočívající v tom, že oblast vazby k transaktivátoru je v tomto případě nahrazena oblastí oligomerace s proteinem p53 se sekvencí SEQ ID n^o3.

h)Oligom-TET nebo Cro (obr.5C)

Tento typ molekuly je podobný výše uvedenému typu c) s výjimkou spočívající v tom, že oblast vazby k transaktivátoru je v tomto případě nahrazena oblastí oligomerace s proteinem p53 se sekvencí SEQ ID n^o3.

i)TET nebo Cro-Oligom (obr.5D)

Tento typ molekuly je podobný výše uvedenému typu d) s výjimkou spočívající v tom, že oblast vazby k transaktivátoru je zde nahrazena oblastí oligomerace s proteinem p53 se sekvencí SEQ ID n^o3.

j)TET nebo Cro-Hinge-Oligom (obr.5E)

Tento typ molekuly je podobný výše uvedenému typu e) s výjimkou spočívající v tom, že oblast vazby k transaktivátoru je zde nahrazena oblastí oligomerace s proteinem p53 se sekvencí SEQ ID n^o3.

Jinak může být v každé z těchto molekul peptidové rameno snadno nahrazeno sekvencí (G4S)₃ (SEQ ID n^o5).

Dalším předmětem vynálezu je sekvence nukleové kyseliny kódující výše definovanou chimerickou molekulu. Výhodně se jedná o sekvenci DNA, zejména DNAC. Může se rovněž jednat o RNA. Tyto sekvence podle vynálezu se obecně konstruují sestavením v klonovacím vektoru sekvencí kódujících různé oblasti technikami molekulární biologie. Uvedené sekvence nukleových kyselin podle vynálezu mohou být případně modifikovány chemickou, enzymatickou nebo genetickou cestou za účelem generování stabilizovaných oblastí nebo/a multifunkčních

oblastí nebo/a oblastí s redukovanou délkou nebo/a za účelem příznivého ovlivnění jejich lokalizace v tom či onom intracelulárním úseku. Sekvence nukleových kyselin podle vynálezu mohou takto obsahovat sekvence kódující peptidy jádrové lokalizace (NLS). Zejména je možné provést fúzi sekvencí podle vynálezu se sekvencí kódující NLS viru SV40, který má následující peptidovou sekvenci:

PKKKRKV (SEQ ID n^o9) (Kalderon a kol., Cell 39(1984)499).

Nukleové sekvence podle vynálezu tvoří výhodně část expresního vektoru, který může mít plasmidový nebo virální charakter.

Dalším předmětem vynálezu je fúzní protein obsahující transkripční transaktivátorovou oblast a oblast specifické vazby k dané molekule, kteréžto oblasti jsou případně spojené peptidovým ramenem, jakož i libovolnou sekvencí nukleové kyseliny kódující takovou fúzi. Transaktivační oblast může pocházet z libovolného transkripčního transaktivačního proteinu, jakým je například p53, VP16, EBNA, E6/E7, Tat a podobně.

Dalším předmětem vynálezu je systém podmíněné exprese genů zahrnující:

- výše definovanou chimerickou molekulu a
- expresní kazetu obsahující regulační sekvenci, minimální transkripční promotor a uvedený gen.

Uvedená expresní kazeta obsahuje prvky nezbytné k aktivaci exprese genu transaktivátorem nebo transaktivačním komplexem rekrutovaným bispecifickou molekulou. Regulační sekvence je takto vazebnou sekvencí zodpovědnou za vazbu k DNA exprimované chimerické molekuly. V případě, že oblast vazby k DNA chimerické molekuly je reprezentována celkem nebo částí tetracyklinového supresoru TetR, potom regulační sekvence obsahuje sekvenci SEQ ID n^o1 nebo její derivát, opakovanou případně několikrát. Výhodně se jedná o sekvenci op2 (obsahující

7 motivů Tetop, které se opakují tak, jak je to popsáno například Weinmannem a kol. v *The Plant Journal* 5(1994)559). Stejně tak, když je oblast vazby k DNA chimerické molekuly reprezentována celkem nebo částí Cro, obsahuje regulační sekvence sekvenci SEQ ID n^o2 nebo její derivát, které jsou případně několikrát opakovány. Výhodně se jedná o sekvenci OR3. Deriváty sekvencí SEQ ID n^o1 a n^o2 mohou být tvořeny každou sekvencí získanou modifikací genetického charakteru (mutace, delece, adice, repetice a podobně), která zachovává schopnost derivátu specificky vázat protein. Takové deriváty byly popsány v literatuře (Baumeister a kol. (již citován výše), Tovar a kol., *Mol.Gen.Genet.* 215(1988)76, WO94/04672).

Pokud jde o minimální transkripční promotor, jedná se o promotor, jehož aktivita závisí na přítomnosti transaktivátoru. Vzhledem k tomu je promotor v nepřítomnosti chimerické molekuly neaktivní a nedochází k expresi genu nebo dochází pouze k velmi omezené expresi tohoto genu. Naopak v přítomnosti chimerické molekuly umožňuje rekrutovaný transaktivátor nebo transaktivační komplex indukovat aktivitu minimálního promotoru a tudíž i expresi zainteresovaného genu.

Uvedený minimální promotor je obecně tvořen boxem TATA nebo INR. Tyto prvky jsou ve skutečnosti minimálně potřebnými prvky pro expresi genu v přítomnosti transaktivátoru. Tento minimální promotor může být připraven z každého promotoru genetickou modifikací. Jako příklad výhodného promotorového kandidáta lze uvést promotor genu thymidin-kinázy. Zajímavých výsledků bylo dosaženo s minimálním promotorem odvozeným od promotoru TK tvořeného nukleotidy -37 až +19. Uvedený minimální promotor může být rovněž odvozen od lidského CMV. Zejména může být tvořen fragmenty obsaženými mezi nukleotidy -53 až +75 nebo -31 až +75 viru CMV. Nicméně může být použit každý konvenční promotor, jakým je například promotor genů kódujících enzymy chloramfenikolacetyl-transferázu, beta-galaktosidázu nebo také luciferázu.

Expresní kazeta je výhodně tvořena následujícími prvky:

- regulační sekvence: sekvence zahrnující sekvenci SEQ ID n^o1 nebo n^o2 nebo její derivát, které jsou případně několikrát opakovány,
- minimální promotor: promotor odvozený od promotoru genu thymidin-kinázy (TK),
- zainteresovaná kódující sekvence.

Ještě výhodněji je minimální promotor tvořen oblastí -37 až +19 promotoru genu thymidin-kinázy.

Výhodně je expresní kazeta zvolena z množiny zahrnující strukturní kazety Tetop2.TK-Gen, Tetop7.TK-Gen a OR3.TK-Gen.

Dalším znakem vynálezu je expresní vektor obsahující sekvenci nukleových kyselin kódující chimerickou molekulu a výše definovanou expresní kazetu. Do vektorů podle vynálezu mohou být sekvence nukleových kyselin kódující chimerickou molekulu a expresní kazeta vloženy ve stejné orientaci nebo v opačných orientacích. Jinak uvedený vektor může mít plasmidovou nebo virální povahu.

Z virálních vektorů lze uvést výhodněji adenoviry, retroviry, herpesviry nebo také adeno-přidružené viry. Viry podle vynálezu jsou defektními viry, t.zn. viry, které nejsou schopné replikovat se autonomním způsobem v cílové buňce.

Obečně je tedy genom defektních virů použitých v rámci vynálezu zbaven alespoň sekvencí nezbytných pro replikaci uvedeného viru v infikované buňce. Tyto oblasti mohou být buď eliminovány (zcela nebo částečně), nebo učiněny nefunkčními, nebo nahrazeny jinými sekvencemi a zejména sekvencemi podle vynálezu. Výhodně si defektní vir nicméně zachovává ty sekvence svého genomu, které jsou nezbytné pro inkapsidaci virových částic.

Pokud jde o adenoviry, byly již charakterizovány různě

né sérotypy, jejichž struktura a vlastnosti se poněkud liší. Z těchto sérotypů je výhodné použít v rámci vynálezu lidské adenoviry typu 2 nebo 5 (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenoviry zvířecího původu (viz přihláška WO94/26914). Z adenovirů zvířecího původu použitelných v rámci vynálezu lze uvést adenoviry psího, bovinního, murinního (příklad: Mav1, Beard a kol., Virology 75(1990)81), ovčího, prasečího, ptačího nebo také opičího (příklad: SAV) původu. Výhodně je adenovirem zvířecího původu psí adenovir, zejména adenovir CAV2 /kmen manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800), například/. Výhodně se v rámci vynálezu použijí adenoviry lidského nebo psího původu anebo smíšeného původu.

Výhodně genom rekombinantních adenovirů podle vynálezu obsahuje alespoň sekvence ITR a inkapsidační oblast adenoviru a sekvenci nukleových kyselin kódující chimerickou molekulu, jakož i výše definovanou expresní kazetu. Výhodně je v genomu je adenovirů podle vynálezu nefunkční alespoň oblast E1. Uvažovaný virální gen může být učiněn nefunkčním libovolnou o sobě známou technikou a zejména celkovou supresí, substitucí (například sekvencemi podle vynálezu), částečnou delecí nebo adicí jedné nebo několika bází v uvažovaném genu nebo v uvažovaných genech. Takových modifikací může být dosaženo in vitro (na izolované DNA) nebo in situ, například za použití technik genového inženýrství nebo také působením mutagenních činidel. Rovněž ostatní oblasti mohou být modifikované a zejména oblast E3 (WO95/02697), oblast E2 (WO9428938), oblast E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) a oblast L5 (WO95/02697).

V rámci výhodné formy provedení obsahuje adenovir podle vynálezu delecí v oblastech E1 a E4. V rámci jiné výhodné formy provedení tento adenovir obsahuje delecí v oblasti E1, v jejíž úrovni jsou vloženy oblast E4 a sekvence podle vynálezu (viz FR 9413355).

Defektní rekombinantní adenoviry podle vynálezu mohou

být připraveny libovolnou o sobě známou technikou (Levrero a kol., Gene 101(1991)195, EP185573, Graham, EMBO J. 3(1984) 2917). Tyto adenoviry mohou být zejména připraveny homologní rekombinací mezi adenovirem a plasmidem nesoucím mimo jiné sekvenční DNA podle vynálezu (sekvenční kódující chimerickou molekulu + expresní kazetu). Uvedená homologní rekombinace se provádí po ko-tranfekci uvedených adenovirů a plasmidu do příslušné buněčné řady. Použitelná buněčná řada musí výhodně 1) být transformovatelná uvedenými prvky a 2) musí obsahovat sekvenční schopné komplementovat část genomu defektního adenoviru, výhodně v integrované formě za účelem zamezení rekombinačních rizik. Jakožto příklad takové buněčné řady lze uvést lidskou embryonální renální řadu 293 (Graham a kol., J.Gen.Virol.36 (1977)59), která obsahuje zejména ve formě integrovaném ve svém genomu levou část genomu adenoviru Ad5 (12 %) nebo řady schopné komplementovat funkce E1 a E4, které byly zejména popsány v přihláškách WO94/26914 a WO95/02697.

Následně se multiplikované a izolované adenoviry purifikují klasickými technikami molekulární biologie, které jsou ilustrovány v dále zařazených příkladech provedení.

Pokud jde o adeno-přidružené viry (AAV), jedná se o viry s DNA mající relativně redukovanou velikost a integrující se do genomu buněk, které infikují, stabilním a místně specifickým způsobem. Tyto viry jsou schopné infikovat široké spektrum buněk, aniž by indukovali jakýkoliv účinek ovlivňující růst, morfologii nebo dělení buněk. Jinak se nezdá, že by tyto viry byly implikovány do lidských patologií. Genom adeno-přidružených virů již byl konován, sekvencován a charakterizován. Zahrnuje asi 4700 bází a obsahuje na každém konci oblast obrácené repetice (ITR) s asi 145 bázemi, sloužící jako počátek replikace viru. Zbytek genomu je rozdělen do dvou hlavních oblastí nesoucích inkapsidační funkce: levá část genomu, která obsahuje gen rep implikovaný při virální replikaci a expresi virálních genů, a pravá část genomu, která

obsahuje gen cap kódující proteiny kapsidy viru.

Použití vektorů adeno-přidružených virů (AAV) pro přenos genů in vitro a in vivo již byl popsán v literatuře (viz zejména WO91/18088, WO93/09239, US 4,797,368, US 5,139,941, EP 488 528). V těchto přihláškách jsou popsány různé konstrukce odvozené od adeno-přidružených virů AAV, ve kterých jsou geny rep nebo/a cap eliminovány delecemi a nahrazeny zainteresovaným genem, jakož i jejich použití pro přenos in vitro (na buňkách v buněčné kultuře) nebo in vivo (přímo do organismu) zainteresovaného genu. Defektní rekombinantní adeno-přidružené viry AAV mohou být připraveny ko-transfekcí do buněčné řady infikované pomocným virem lidského původu (například adenovirem) plasmidu obsahujícího nukleové sekvence podle vynálezu (sekvence kódující chimerickou molekulu + expresní kazetu) lemované dvěma oblastmi obrácené repetice (ITR) odvozenými od adeno-přidružených virů a plasmidu nesoucího inkapsidační geny (geny rep a cap) odvozené z adeno-přidružených virů AAV. Produkované rekombinantní AAV se potom purifikují klasickými technikami.

Pokud jde o herpesviry a retroviry, byla konstrukce rekombinantních vektorů v široké míře popsána v literatuře. O tom viz zejména: Breakfield a kol., New Biologist 3 (1991) 203, EP 453242, EP178220, Bernstein a kol. Genet.Eng.7(1985) 235, McCormick, BioTechnology 3 (1985)689 a podobně.

Retroviry jsou integrativními viry, které selektivně infikují buňky ve stádiu jejich dělení. Tyto viry takto tvoří žádané vektory při rakovinových aplikacích. Genom retrovirů v podstatě obsahuje dvě sekvence LTR, inkapsidační sekvenci a tři kódující oblasti (gag, pol a env). V rekombinantních vektorech odvozených od retrovirů jsou geny gag, pol a env obecně eliminovány delecí a to zcela nebo částečně a nahrazeny zainteresovanou heterologní sekvencí nukleové kyseliny. Tyto vektory mohou být získány z různých typů retrovirů, jakými jsou zejména MoMuLV (vir murinní Maloneyovy leukemie,

také označován jako MoMLV), MSV (vir murinního Maloneyova sarkomu), HaSV (vir Harveyova sarkomu), SNV (vir slezinné nekrózy), RSV (vir Rousova sarkomu) nebo také Friendův vir.

Za účelem konstrukce rekombinantních retrovirů podle vynálezu se obecně sestrojí plasmid obsahující zejména sekvence LTR, inkapsidační sekvenci a sekvence podle vynálezu (sekvence kódující chimerickou molekulu + expresní kazetu, který se potom použije pro transfekování tak zvané inkapsidační buněčné řady, schopné přinést do polohy trans retrovirální funkce, které jsou v plasmidu deficitní. Obecně jsou inkapsidační řady tedy schopné exprimovat geny gag, pol a env. Takové inkapsidační řady byly popsány v rámci dosavadního stavu techniky a jsou jimi zejména řady PA317 (US 4,861,-719), PsiCRIP (WO90/02806) a GP+envAm-12 (WO89/07150). Jinak mohou rekombinantní retroviry zahrnovat modifikace v úrovni sekvencí LTR provedené za účelem potlačení transkripční aktivity, jakož i rozložené inkapsidační sekvence zahrnující část genu gag (Bender a kol., J.Virol.61(1987)1639). Produkované rekombinantní retroviry se potom purifikují klasickými technikami.

Příklad konstrukce defektního rekombinantního viru podle vynálezu (retrovir) je popsán na obr.8. Z tohoto obrázku je zřejmá druhá výhoda konstrukcí podle vynálezu, která spočívá v absenci exprese zainteresovaného genu v inkapsidačních řadách. Vzhledem k tomu, že v těchto řadách není přítomen transaktivátor nebo transaktivační komplex rekrutovaný systémem podle vynálezu, je promotor neaktivní a nedochází tak k expresi genu v produkční buňce (obr.8A). K tomu dochází pouze v případě, kdy vir účinně infikoval cílovou buňku, tj. buňku, ve které je přítomen transaktivátor nebo transaktivační komplex rekrutovaný systémem podle vynálezu, a kdy dochází k účinné expresi genu (obr.8B). To je obzvláště výhodné pro konstrukci viru obsahujícího geny, jejichž exprese by byla pro buňky toxická (geny Grb3-3, IL-2, difterický toxin a podobně).

V rámci realizace vynálezu je obzvláště výhodné použít defektní rekombinantní adenovir nebo retrovir. Tyto vektory mají ve skutečnosti vlastnosti, které jsou mimořádně zajímavé pro přenos genů do nádorových buněk.

V rámci vynálezu mohou být rovněž použity různé typy nevirálních vektorů. Systém podmíněné exprese podle vynálezu může být ve skutečnosti zabudován do nevirálního činidla schopného podporovat přenos a expresi nukleových kyselin do eukaryotických buněk. Chemické nebo biochemické vektory představují zajímavou alternativu přírodních virů a to zejména vzhledem ke snadné manipulaci, ke zvýšené bezpečnosti a vzhledem k tomu, že zde neexistuje teoretická mez týkající se velikosti DNA, která má být transfekována.

Tyto syntetické vektory mají dvě základní funkce, a sice zhutňovat transfekovanou nukleovou kyselinu a podporovat její buněčnou fixaci, jakož i její průchod skrze plasmovou membránu, a případně skrze obě jádrové membrány. Aby se čelilo polyaniontovému charakteru nukleových kyselin, mají nevirální vektory ve všech případech polykationtové náboje.

Z vyvinutých syntetických vektorů jsou nejvýhodnější kationtové polymery typu polylysinu, $(LKLK)_n$, $(LKKL)_n$, polyethylenimin a DEAE-dextran nebo také kationtové a lipofektantní lipidy. Tyto vektory mají schopnost zhutnit DNA a podporovat její sdružení s buněčnou membránou. Z těchto posledně uvedených lze uvést lipopolyaminy (lipofektamin, transfektam a podobně) a různé kationtové nebo neutrální lipidy (DOTMA, DOGS, DOPE a podobně). V nedávné době byl vyvinut systém cílené transfekce, mediované receptorem, který využívá princip kondenzace DNA díky kationtovému polymeru řídící fixování komplexu k membráně v důsledku chemické kopulace mezi kationtovým polymerem a ligandem membránového receptoru přítomného na povrchu buněčného typu, který má být roubován. Bylo již popsáno zacílení receptoru transferinu, insulinu nebo receptoru asialoglykoproteinů hepatocytů.

Předmětem vynálezu je také jakákoliv farmaceutická kompozice, která obsahuje výše uvedený vektor. Tyto kompozice mohou být formulovány s ohledem na topické, perorální, parenterální, intranasální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární a podobné podání. Výhodně kompozice podle vynálezu obsahuje farmaceuticky přijatelné nosiče pro injikovatelné formulace. Může se zejména jednat o roztoky solí (dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý nebo chlorid hořečnatý, a podobně, nebo směsi takových solí) ve sterilní a izotonickém stavu nebo o suché kompozice, zejména lyofilizované kompozice, které po přidání sterilizované vody nebo fyziologického roztoku umožňují rekonstituci injikovatelných tekutin. Pokud jde o retroviry, může být výhodné přímo použít inkapsidační buňky nebo buňky infikované ex vivo a reimplantované in vivo, případně ve formě neoorgánu.

Dávky vektoru použité pro injekci mohou být uzpůsobeny v závislosti na různých parametrech a zejména v závislosti na použitém způsobu podání, na léčené patologii nebo také na požadované době léčení. Obecně jsou rekombinantní viry podle vynálezu jsou formulovány a podávány ve formě dávek pohybujících se mezi 10^4 a 10^{14} pfu/ml. V případě adeno-přidružených virů (AAV) a adenovirů mohou být rovněž použity dávky pohybující se mezi 10^6 a 10^{10} pfu/ml. Výraz pfu ("plaque forming unit") odpovídá infekční potenci suspenze virionů a je stanovena infekcí příslušné buněčné kultury a vyhodnocením (obvykle po 48 hodinách) počtu infikovaných buněčných plaků. Techniky stanovení titru pfu virálního roztoku jsou v široké míře dokumentovány v literatuře.

Expresní systém podle vynálezu a odpovídající vektory jsou obzvláště vhodné pro regulaci exprese zainteresovaných genů v rámci buněčných a genových terapií. Tyto vektory mohou být také použity pro regulaci exprese jakékoliv zainteresované kódující sekvence a zejména sekvence kódující terapeutický

produkt, kterým může být peptid, polypeptid, protein ribonukleová kyselina a podobně. Genem je sekvence DNA (DNAC, DNAG, syntetická, lidská, zvířecí, rostlinná a obdobná DNA) kódující proteinové produkt, jakými jsou například enzymy, krevní deriváty, hormony, lymfokiny: interleukiny, interferony, TNF a podobně (FR 9203120), růstové faktory, neurotransmitory nebo jejich prekurzory nebo syntézní enzymy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5 a podobně, apolipoproteiny: ApoAI, ApoAIV, ApoE a podobně (FR 93 05125), dystrofin nebo minidystrofin (FR 9111947), nádor-supresorové geny: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev a podobně (FR 93 04745), geny kódující faktory implikované v koagulaci: faktory VII, VIII, IX a podobně nebo také celek nebo část přírodního nebo umělého imunoglobulinu (Fab, ScFv a podobně), RNA-ligand (WO91/19813) a podobně.

Za interesovaným genem může být také antimediatotová sekvence, jejíž exprese v cílové buňce umožňuje regulovat expresi genů nebo transkripci buněčných RNAm. Takové sekvence mohou být například přepsány do cílové buňky jako komplementární RNA buněčných RNAm a mohou takto blokovat jejich translaci na protein technikou popsanou v patentovém dokumentu EP 140 308.

Vynález je obzvláště vhodný pro expresi sekvencí kódujících toxické faktory. Zejména se může jednat o buněčné jedy (difterický toxin, toxin pseudomonas, ricin A a podobně a o produkty indukující senzibilitu na vnější činidlo (sebevražedné geny: thymidin-kináza, cytosin-deamináza a podobně) nebo také o vražedné geny schopné indukovat buněčnou smrt (Grb3-3 (PCT/FR94/00542), ScFv anti-ras (WO94/29446) a podobně). Systém podle vynálezu ve skutečnosti umožňuje produkovat zejména virální vektory obsahující tyto sekvence a to bez rizika otravy produkční buňky a potom indukovat expresi těchto toxických molekul a to selektivně v cílových buňkách majících požadovaný transaktivátor nebo transaktivační komplex. Tento typ konstrukce je tedy obzvláště vhodný pro pro-

tinádorové terapeutické strategie, jejich cílem je například selektivně zničit napadené buňky. Tento systém je rovněž obzvláště zajímavý pro expresi cytokinů, interferonů, TNF, TGF, jejichž neregulovaná produkce by mohla mít výrazné vedlejší účinky.

Stručný popis obrázků

V následující části popisu bude vynález detailněji popsán pomocí příkladů jeho konkrétního provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně definován definicí patentových nároků.

Na přípojených výkresech:

obr.1 znázorňuje zobrazení systému podmíněné exprese podle vynálezu umožňující selektivní rekrutování transaktivátoru pomocí oligomerační oblasti (A) nebo ScFv (B),

obr.2 znázorňuje zobrazení systému podmíněné exprese podle vynálezu umožňující selektivní rekrutování transaktivačního komplexu,

obr.3 znázorňuje expresní kazetu podle vynálezu zahrnující regulační sekvenci Tetop7, minimální promotor (box TATA) a gen (CAT),

obr.4 znázorňuje zobrazení expresní kazety podle vynálezu zahrnující regulační sekvenci OR3, minimální promotor (box TATA) a gen (CAT),

obr.5 znázorňuje bispecifické chimerické molekuly podle vynálezu,

obr.6 znázorňuje sekvence DNA kódující bispecifické chimerické molekuly podle vynálezu,

obr.7 znázorňuje chimerické kontrolní konstrukce,

obr.8 znázorňuje strukturu a funkci virálního vektoru

ru (retrovir) podle vynálezu,

obr.9 znázorňuje studii interakce mezi hybridními molekulami podle vynálezu a regulační sekvencí,

obr.10 znázorňuje studii interakce mezi hybridními molekulami podle vynálezu a různými formami proteinu p53,

obr.11 znázorňuje prokázání aktivace kazety Tet-Luc v buňkách SAOS-2,

obr.12 znázorňuje prokázání aktivace kazety Tet-Luc v buňkách H358.

Obecné techniky molekulární biologie

Klasické metody molekulární biologie, mezi které patří zejména odstředění plasmidové DNA v systému chlorid cesný-ethidiumbromid, digesce restrikčními enzymy, elektroforéza na gelu, transformace v *E.coli*, precipitace nukleových kyselin a podobně, jsou popsány v literatuře (Maniatis a kol., 1989).

Enzymy byly poskytnuty firmou New-England Biolabs (Beverly, MA). Za účelem ligací jsou fragmenty DNA separovány podle jejich velikosti na 0,8 až 1,5% agarosovém gelu, purifikovány metodou GeneClean (BIO101, LaJolla CA) a inkubovány přes noc při teplotě 14 °C v pufru Tris-HCl, pH 7,4, 50mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, v přítomnosti DNA-ligázy fágu T4.

Amplifikace reakcí PCR (Polymerase Chain Reaction) byla rovněž provedena podle Maniatis-e a kol (1989) při dodržení následujících podmínek:

- koncentrace MgCl₂ upravena na 8mM,
- denaturační teplota 95 °C, hybridizační teplota 55 °C, alongační teplota 72 °C. Tento cyklus byl opakován 25 krát v zařízení PE9600 Thermalcycler (Perkin Elmer, Norwalk CO).

Oligonukleotidy se syntetizují za použití chemie fos-

foramiditů chráněných v poloze beta kyanoethylovou skupinou (Sinha a kol., 1984, Giles 1985) a automatického syntetizéru DNA Applied Biosystem model 394 (Applied Biosystem, Foster City CA) při dodržení doporučení výrobce.

Sekvenování bylo provedeno na dvoukládkových maticích metodou terminace řetězců za použití fluorescenčních značkovacích činidel. Zde byla použita sekvencovací souprava Taq Syc Primer Kit dostupná u firmy Applied Biosystem (Applied Biosystem, Foster City CA) při dodržení pokynů výrobce.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce expresní kazety zahrnující regulační sekvenci, minimální transkripční promotor a gen

1.1 Konstrukce plasmidu pTETop7/CAT

Plasmid pTETop7/CAT obsahuje následující prvky (obr.3):

- regulační sekvenci tvořenou sekvencí interakce s tetracyklinovým supresorem tetR sestávající ze sedmi opakovanými motivy Tetop (SEQ ID n^o1),
- minimální promotor odvozený od promotoru genu thymidin-kinázy (oblast -37 až + 19 nesoucí box TATA),
- sekvenci kódující chloramfenicolacetyl-transferázu (CAT) pod kontrolou uvedeného minimálního promotoru.

Tento plasmid byl konstruován klonováním fragmentu SmaI-BglII plasmidu pUHD10-7 (WO 94/29442) v plasmidu pKK232-8 (Pharmacia), který byl předběžně digerován restrikcí enzy-
mi SmaI a BamHI.

1.2. Konstrukce plasmidu pOR₃/CAT

Plasmid pOR3/CAT obsahuje následující prvky (obr.4):

- regulační sekvenci tvořenou sekvencí OR3 interakce s represorem Cro (SEQ ID n^o2),
- minimální promotor odvozený od promotoru genu thymidin-kinázy (oblast -37 až 19 nesoucí box TATA),
- sekvence kódující chloramfenikolacetyl-transferázu (CAT) pod kontrolou uvedeného minimálního promotoru.

Tento plasmid byl konstruován následujícím způsobem: sekvence OR3 interakce s represorem Cro byla syntetizována uměle. Za tím účelem byly syntetizovány dva následující oligonukleotidy:

Oligo 5533 (SEQ ID n^o22): 5'-GATCCTATCACCGCAAGGGATAA-3'

Oligo 5534 (SEQ ID n^o23): 3'-GATAGTGGCGTTCCTATTTCTGA-5'.

Oba tyto oligonukleotidy byly potom hybridizovány za účelem rekonstituování dvouvláknové sekvence OR3 lemované sekvencemi umožňujícími její klonování orientované následujícím způsobem:

CATCCTATCACCGCAAGGGATAA

GATAGTGGCGTTCCTATTTCTGA.

1.3. Konstrukce expresní kazety toxických genů

Expresní kazety toxických genů se získají z výše popsaných plasmidů (1.1. a 1.2.) nahrazením sekvence CAT sekvencí kódující toxický produkt, výhodně gen Grb3-3 (PCT/FR94/00542), gen thymidin-kinázy, gen kódující difterický toxin nebo pseudomonas, a podobně.

Příklad 2

Konstrukce specifických jednovláknových protilátek pro p53

Tato jednovláknová protilátka se konstruuje podle následujícího protokolu:

DNAc kódující oblasti VH a VL byly získány z hybridomu

pAb421 produkujícího protilátku anti-p53. Za tímto účelem byly totální RNA uvedeného hybridomu extrahovány a podrobeny inverzní transkripční reakci za použití nahodilých hexamerů ve funkci zárodečných subjektů. Použití tohoto typu zárodečného subjektu umožňuje vyvarovat se použití specifických zárodečných subjektů imunoglobulinů. Získané klony DNAC ma dostatečnou délkou pro klonování oblastí V. Nicméně v případě, že představují malou frakci z přítomných totálních DNAC, potom musí být provedena předběžná amplifikační reakce za účelem produkování množství DNA dostatečného pro klonování. Za tím účelem se DNAC kódující oblasti VH a VL aplikují odděleně. Použitými zárodečnými subjekty jsou oligonukleotidy hybridizující v úrovni opačných konců variabilních oblastí každého řetězce (H a L). Amplifikačním produktem užívajícím specifické zárodečné subjekty těžkých řetězců je fragment obsahující asi 340 párů bází. Amplifikační produkt používající specifické zárodečné subjekty lehkých řetězců je tvořen fragmentem obsahujícím asi 325 párů bází.

Po purifikaci se DNAC kódující oblasti VH a VL protilátky sestaví do jediného řetězce pomocí nukleotidového ramene (L). Toto nukleotidové rameno je konstruováno takovým způsobem, že jeden z konců se váže na konec 3' DNAC kódující oblast VH a druhý konec se váže na konec 5' DNAC kódující oblast VL. Sekvence ramene kóduje peptid SEQ ID n^o5. Sestavená sekvence s asi 700 páry bází obsahuje ve formě fragmentu NcoI-NotI, řetězec VH-L-VL, jehož sekvence je reprezentována sekvencí SEQ ID n^o4 (aminokyseliny 9 až 241). Tato sekvence rovněž zahrnuje na konci C sekvenci tag odvozenou od myc (zbytky 256 až 266).

Příklad 3

Konstrukce sekvencí nukleových kyselin kódujících bispecifické chimerické molekuly obsahující oblast vazby k transaktivátoru tvořenou jednovláknovou protilátkou (ScFv)

3.1. Konstrukce plasmidu obsahujícího sekvenci ScFv-myc-Hinge-TetR nebo Cro (obr.5A a obr.6)

Nejdříve byl fragment NcoI-NotI obsahující DNAC kódující ScFv anti-p53 klonován v plasmidu typu pUC19. Potom se za tento fragment vloží sekvence kódující epitop VSV (SEQ ID n^o7) nebo myc (SEQ ID n^o8).

Sekvence kódující proteiny TetR a Cro se potom získají následujícím způsobem:

- Sekvence kódující TetR byla získána amplifikací z matečného plasmidu nesoucího sekvenci tetR za použití následujících oligonukleotidů:

Oligo 5474 (SEQ ID n^o10):

```
GGCTCTAGACCCAAGCCCAGTACCCCCCAGGTTCTTCAACGCG  
TGGATCCATGTCCAGATTAGATAAAAGTAAAG
```

Oligo 5475 (SEQ ID n^o11):

```
CGTACGGAATTCGGGCCCTTACTCGAGGGACCCACTTTCACATTT  
AAGTTG
```

Tyto oligomery rovněž přinášejí sekvenci kódující peptidové rameno Hinge spojující obě funkční oblasti molekul.

Amplifikovaný fragment tedy obsahuje sekvenci kódující peptidové rameno a oblast vazby k DNA tetR. Tento fragment se klonuje do míst XbaI-EcoRI získaného plasmidu za účelem generování plasmidu obsahujícího sekvenci kódující molekulu ScFv-myc-Hinge-TetR (obr.6).

- Sekvence kódující Cro byla získána amplifikací na DNA-matrici bakteriofágu Lambda za použití následujících oligonukleotidů:

Oligo 5531 (SEQ ID n^o12):

GGCTCTAGACCCAAGCCCAGTACCCCCCAGGTTCTTCAACGCG
TGGATCCATGGAACAACGCATAACCCTGAAAG

Oligo 5532 (SEQ ID n^o13):

CGTACGGAATTCGGGCCCTTACTCGAGTGCTGTTGTTTTTTTGT
ACTCGG

Tyto oligonukleotidy přináší rovněž sekvenci kódující peptidové rameno Hinge spojující obě funkční oblasti molekuly.

Amplifikovaný fragment tedy obsahuje sekvenci kódující peptidové rameno a oblast vazby s DNA Cro. Tento fragment byl klonován do míst XbaI-EcoRI výše uvedeného získaného plasmidu za účelem generování plasmidu obsahujícího sekvenci kódující molekulu ScFv-myc-Hinge-Cro (obr.6).

3.2. Konstrukce plasmidu obsahujícího sekvenci ScFv-Hinge-TetR nebo Cro (obr.5B)

Tento příklad popisuje konstrukci plasmidů nesoucích sekvenci kódující bispecifickou chimerickou molekulu podle vynálezu zbavenou sekvence tag

Tyto plasmidy byly získány z plasmidů popsanych v 3.1. digescí enzymy NotI a XbaI. Tato digesce umožňuje vyštípnout fragment nesoucí oblast kódující tag myc.

3.3 Konstrukce plasmidu zahrnujícího sekvenci ScFv-TetR nebo Cro (obr.5C)

Tento příklad popisuje konstrukci plasmidů nesoucích sekvenci kódující bispecifickou chimerickou molekulu podle vynálezu nemající rameno a sekvenci tag.

Tyto plasmidy byly získány z plasmidů popsaných v 3.1. digescí enzymy NotI a BamHI. Tato digesce umožňuje vyštípnout fragment nesoucí oblast kódující tag myc a peptidové rameno Hinge.

Příklad 4

Konstrukce sekvencí nukleových kyselin kódujících bispecifické chimerické molekuly obsahující oblast vazby k transaktivátoru tvořenou oligomerační oblastí

4.1. Klonování oligomerační oblasti proteinu p53 (fragment 320-393)

DNAc kódující oligomerační oblast proteinu p53 (SEQ ID n^o3) byla získána amplifikací reakcí PCR na plasmidu nesoucím DNAc divokého lidského p53 za použití následujících oligonukleotidů:

Oligo 5535 (SEQ ID n^o14):

CAGGCCATGGCATGAAGAAACCACTGGATGGAGAA

(podtržená část představuje místo NcoI)

Oligo 5536 (SEQ ID n^o15):

CGTCGGATCCTCTAGATGCGGCCGCGTCTGAGTCAGGCCCTTC

(podtržená část: místo BamHI; dvakrát podtržená část: místo XbaI; tučně napsaná část: NotI).

4.2. Plasmidy p53 320/393-myc-Hinge-TetR nebo Cro (obr.5A) byly získány klonováním výše uvedeného amplifikovaného fragmentu ve formě fragmentu NcoI-NotI do míst odpovídajících

plasmidům popsaným v příkladu 3.1. v náhradu za oblast kódující ScFv.

4.3. Plasmidy p53 320/393-Hinge-TetR nebo Cro (obr.5B) byly získány klonováním amplifikovaného fragmentu z 4.1. ve formě fragmentu NcoI-XbaI do míst odpovídajících plasmidům popsaným v 3.1 v náhradu za oblast kódující ScFv a tag.

4.4. Plasmidy p53 320/393-TetR nebo Cro (obr.5C) byly získány klonováním fragmentu amplifikovaného v 4.1. ve formě fragmentu NcoI-BamHI do míst odpovídajících plasmidům popsaným v příkladu 3.1 v náhradu za oblast kódující ScFv, tah a Hinge.

4.5. Plasmidy tetR nebo Cro- p53 320/393 (obr.5D) nebo tetR nebo Cro-Hinge-p53 320/393 (obr.5E) byly získány klonováním fragmentů amplifikovaných reakcí PCR na plasmidu nesoucím DNAC divokého lidského p53 za použití oligo 5537/5539 nebo 5538/5539 digerovaných XhoI/EcoRI do plasmidů popsaných v 3.1, předběžně digerovaných enzymy XhoI/EcoRI.

Oligo 5537 (SEQ ID n^o16):

CAGGCTCGAGAAGAAACCACTGGATGGAGAA

Oligo 5538 (SEQ ID n^o17):

CAGGCTCGAGCCCAAGCCCAGTACCCCCCAGGTTCTTCAAAGA
AACCACTGGATGGAGAA

Oligo 5539 (SEQ ID n^o18):

GGTCGAATTCGGGCCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC

Příklad 5

Příklad 5

Konstrukce kontrolního plasmidu nesoucího sekvenci kódující chimerickou molekulu zahrnující oblast vazby k DNA (TetR nebo Cro) a transaktivátorovou oblast proteinu p53 (oblast 1-73)

Plasmidy p53 1/73-TetR nebo Cro s nebo bez tag (myc nebo VSV) a Hinge (obr.7A, 7B a 7C) byly získány klonováním fragmentů amplifikovaných reakcí PCR z plasmidu nesoucího DNAc divokého lidského p53 za použití oligo 5661/5662 a potom digerovaných enzymy NcoI/NotI, NcoI/XbaI, NcoI/BamHI do plasmidů popsaných v 3.1, předběžně digerovaných enzymy NcoI/NotI, NcoI/XbaI nebo NcoI/BamHI.

Oligo 5661 (SEQ ID n^o19):

CAGGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC

Oligo 5662 (SEQ ID n^o20):

CGTCGGATCCTCTAGATGCGGCCGCCACGGGGGGAGCAGCCTC
TGG

Příklad 6

Konstrukce expresních plasmidů různých hybridních molekul podle vynálezu

Plasmidy použité pro expresi hybridních molekul byly získány klonováním fragmentů obsahujících DNAc kódující tyto molekuly do míst NcoI/EcoRI eukaryotického expresního vektoru pcDNA3 (invitrogen). Takto byly provedeny různé následující konstrukce:

-ScFv 421: SEQ ID n^o4,

- TET19: hybridní protein obsahující řetězec ScFv421-VSV-Hinge-TetR popsaný na obr.6 podle příkladu 3.1,
- TET02: hybridní protein obsahující řetězec p53(320/393)-VSV-Hinge-TetR popsaný na obr.5A podle příkladu 4.3,
- TET03: hybridní protein obsahující řetězec p53(320/393)-Hinge-TetR popsaný na obr.5B podle příkladu 4.4,
- TET04: hybridní protein obsahující řetězec p53(320/393)-TetR popsaný na obr.5C podle příkladu 4.4,
- TET07: hybridní protein obsahující řetězec p53(1/73)-VSV-Hinge-TetR popsaný na obr.7A podle příkladu 5.

Příklad 7

Rozpoznání dvouvláknových sekvencí DNA hybridními molekulami podle vynálezu

7.1. Produkce hybridních molekul

Různé molekuly použité v tomto experimentu byly získané translací in vitro v lyzátu retikulocytů molekul popsanych v příkladu 6 za použití soupravy TNT Coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega) a podle experimentálního protokolu popsaného dodavatelem pro celkový reakční objem 50 mikrolitrů.

7.2. Konstrukce specifické dvouvláknové sekvence DNA

Specifická dvouvláknová sekvence DNA použitá v tomto experimentu je tvořena dvěma syntézními oligonukleotidy majícími následující sekvence:

Oligo 5997 (SEQ ID n^o24):

GATCCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGTGAGTGGTAAACTCA

Oligo 5998 (SEQ ID n^o25):

AGCTTGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCG

Oba tyto syntézní oligonukleotidy byly označeny fosforem 33 inkubací následující směsi po dobu 30 minut při teplotě 37 °C a za použití 10 pmolů každého z oligonukleotidů:

Tris-HCl pH 7,6	50	mM
MgCl ₂	10	mM
dithiothreitol	5	mM
Spermidin	100	μM
EDTA	100	μM
ATP-gama- ³³ P(Amersham)	50	μCi (1000-3000 Ci/mmol)
T4-kináza (Boehringerú	10	U.

Potom se oba takto označené oligonukleotidy hybridizují v přítomnosti 400 mM NaCl za účelem rekonstituce následující dvouvláknové sekvence TetO (SEQ ID n^o26):

GATCCGACTTTCACTTTTCTCTATCACTGATAGTGAGTGGTAAACTCA
CTAGGCTCAAAGTGAAAAGAGATAGTGACTATCACTCACCATTTGAGT

7.3. Rozpoznání dvouvláknové sekvence TetO různými hybridními molekulami podle vynálezu

Vazebná reakce k DNA se provádí v 50 μl reakční směsi (Tris-HCl pH 7,4 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 10 mM, beta-merkat-toethanol 6 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,5 mg/ml) přidáním sekvence TetO (10⁻¹⁰ M) připravené v příkladu 7.2, 10 μl translačního produktu připraveného podle příkladu 7.1 a 10⁻⁸ M chladného kompetičního oligonukleotidu AP2 (Promega) použitého pro eliminaci nespecifické vazby. Specifičnost interakce ověří posunutím rovnováhy přidáním 10 μM (Sigma) tetracyklinu k reakční směsi. Reakční směsi se potom inkubují po dobu 15 minut

při teplotě 20 °C, načež se k ní přidá 10 μ l 50% glycerolu a finální směsi se podrobí nativní elektroforéze na 5% polyakrylamidovém gelu, přičemž se migrace provádí při 200 V a 16 °C. Gel se potom vysuší a podrobí autoradiografii.

Výsledek tohoto experimentu provedeného s hybridními molekulami TET19, TET02 a TET07 je zobrazen na obr.9. Za těchto podmínek lze pozorovat vazbu těchto třech molekul ke specifické dvouvláknové DNA-sekvenci TetO vzhledem k migračnímu zpoždění takto vázaných molekul, přičemž specifická tato interakce je prokázána inhibicí uvedeného migračního zpoždění přidáním tetracyklinu.

Tento výsledek takto potvrzuje skutečnost, že hybridní molekuly podle vynálezu jsou schopné vázat se specifickým způsobem k nukleotidové sekvenci TetO.

Příklad 8

Specifická vazba hybridních molekul podle vynálezu k molekule mající transkripční transaktivační oblast

8.1. Produkce hybridních molekul podle vynálezu a molekul majících nebo nemajících transkripční transaktivační oblast

Pro účel tohoto experimentu byly hybridní molekuly podle vynálezu ScFv 421, TET19 a TET02 podle příkladu 6 produkovány translací *in vitro* za použití experimentálního protokolu podle příkladu 7.1 v přítomnosti 44 μ Ci ³⁵S-methioninu (Amersham)(1175 Ci/mmol), přičemž se získají radioaktivně značené hybridní molekuly.

DNAc molekul majících nebo nemajících transkripční transaktivační oblast byly klonovány ve vektoru pBlueBacIII (Invitrogen) v místě BamHI. Z těchto vektorů byly produkovány a purifikovány rekombinantní baculoviry podle instrukcí výrobce. Uvedené molekuly se produkují infekcí rekombinantním

baculovirem hmyzích buněk sf9 podle experimentálního protokolu výrobce. Připraví se proteinové extrakty s finální koncentrací proteinu 10 mg/ml podle protokolu popsaného K-Ory-m a kol. (K. Ory, EMBO J., 13, 3496-3504, 1994). Těmito molekulami jsou:

- p53(1/393): divoký protein p53,
- p53(1/320): divoký protein p53 omezený na aminokyselinovou sekvenci 1 až 320 a tedy zbavenou oligomerační oblasti a oblasti rozpoznatelné monoklonální protilátky pAb421.

8.2. Vazba hybridních molekul podle vynálezu k molekulám majícím nebo nemajícím transkripční transaktivační oblast

5 μ l každého z translačních produktů připravených podle příkladu 8.1 se inkubuje s 5 μ l extraktu baculoviru připraveného podle příkladu 8.1 a 2 μ g monoklonální protilátky D01 (Oncogene Sciences), která rozpoznává N-terminální část proteinu p53, po dobu 16 hodin při teplotě 4 $^{\circ}$ C ve 100 μ l modifikovaného pufru RIPA ((K.Ory, EMBO J., 13, 3496-3504, 1994). Imunoprecipitace se provede postupem popsaným K.Ory-m a kol. (K.Ory, EMBO J., 13, 3496-3504, 1994). Komplexy zadržené protilátkou se eluují 10 minutovou inkubací při teplotě 80 $^{\circ}$ C v přítomnosti 30 μ l migračního pufru (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) a podrobí elektroforéze na 10% polyakrylamidovém gelu v denaturačním prostředí při 200 V podle výše popsaného protokolu (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Gel se potom vysuší a vyvolá pomocí instantního zobrazovače (Packard instruments), který umožňuje kvantitativně stanovit množství hybridních molekul majících nebo nemajících transkripční transaktivační oblast. Výsledky tohoto pokusu jsou zobrazeny na obr.10.

Za těchto podmínek se jasně ukazuje, že hybridní molekula mající ScFv 421 (TET19) rozpoznává molekulu p53(1/393 stejně dobře jako samotný ScFv 421 a že hybridní molekula mající oblast 320/393 (TET02) vykazuje stejné vlastnosti,

avšak má výraznější schopnost retence proteinu p53(1/393). Kromě toho nepřítomnost signálu pozorovaného při inkubaci s molekulou p53(1/320) ukazuje, že tyto interakce jsou skutečně specifické a jsou mediované C-terminální částí proteinu p53 (aminokyseliny 320 až 393), jak bylo očekáváno.

Tyto výsledky tedy potvrzují skutečnost, že hybridní molekuly podle vynálezu jsou opravdu schopné rekrutovat transkripční transaktivační oblast nesenou molekulou, jejíž jsou specifickými partnery.

Příklad 9

Funkční rekrutování transkripční transaktivační oblasti hybridními molekulami podle vynálezu

Funkční rekrutování transkripční transaktivační oblasti hybridními molekulami podle vynálezu bylo vyhodnoceno v transaktivačním systému *in vivo* v buňkách SAOS-2 (lidský osteosarkom) s deficitem obou alel proteinu p53 v nádorové buněčné řadě s deficitem obou alel proteinu p53 (Maxwell a Roth, *Oncogene* 8, 3421, 1993) a v nádorové řadě HT29 s deficitem jedné z obou alel proteinu p53 a s jednou mutovanou alelou (mutace H273). Tento systém je založen na použití reportérového genu, který je stanovitelný enzymaticky a vložen pod kontrolu promotoru obsahujícího nukleotidové motivy specificky rozpoznatelné represorem Tet (operátor Tet).

~~V tomto testu se reportérový gen-LUC-(luciferáza)~~
vloží pod kontrolu operátoru Tet a je obsažen v plasmidu pUHC13-3 (Gossen M. a Bujard H., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89, 5547-5551, 1992).

9.1 Použité buněčné řady a kultivační podmínky

Buněčné řady použité v těchto experimentech, jakož i jejich genotyp připojený k proteinu p53 a použité kultivační podmínky pro jejich růst jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka

Buněčné řady

Řada	p53	Kultivační prostředí	č.ATCC
SAOS-2	-/-	Prostředí DMEM (Gibco BRL) obohacené 10 % fetálního telecího séra (Gibco BRL)	HTB 85
H358	-/-	Prostředí RPMI1640 (Gibco BRL) obohacené 10 % fetálního telecího séra (Gibco BRL)	
HT29	-/H237	Prostředí DMEM (Gibco BRL) obohacené 10 % fetálního telecího séra (Gibco BRL)	

9.2. Expresní plasmidy molekul majících transkripční trans-aktivační oblast

Molekulami s transkripční tranaktivátorovou oblastí ~~použitými při tomto experimentu jsou divoký protein p53 (Wt)~~ a mutanty G281 a H175 tohoto proteinu. DNAC kódující tyto tři proteiny byly vloženy do míst BamHI vektoru pCDNA3 (introgen).

9.3. Intracelulární exprese hybridních molekul podle vynálezu

Hybridní molekuly podle vynálezu se exprimují v buňkách buněčné kultury dočasnou transfekcí za použití následu-

jícího protokolu:

Buňky ($3,5 \cdot 10^5$) se zaočkují do šestijamkových titračních ploten obsahujících v jamce po 2 ml kultivačního prostředí a kultivují přes noc v inkubátoru při teplotě 37°C s atmosférou obsahující 5 % oxidu uhličitého. Transfekují se potom jednotlivé konstrukce za použití lipofekAMINu (Gibco BRL) ve funkci transfekčního činidla a to následujícím způsobem: 1,5 μg totálního plasmidu se inkubuje (z toho je 0,25 μg reportérového plasmidu) s 5 μl lipofekAMINu po dobu 30 minut se 2 ml kultivačního prostředí (transfekční směs). V průběhu této doby se buňky dvakrát promyjou PBS a potom inkubují po dobu 4 hodin při teplotě 37°C s tranfekční směsí, načež se tranfekční směs odsaje a nahradí 2 ml kultivačního prostředí obohaceného 10 % fetálního telecího séra inaktivovaného teplem a buňky se kultivují po dobu 48 hodin při teplotě 37°C .

9.4 Detekce aktivace transkripce

Aktivace transkripce spojená s funkčním rekrutováním transkripčního transaktivátoru se detekuje a kvantitativně vyhodnotí změřením aktivity luciferázy kódované genem LUC za použití soupravy Luciferase Assay System (Promega) podle protokolu dodaného výrobcem.

9.5. Funkční rekrutování transkripční transaktivační oblasti molekulami podle vynálezu

Tento experiment byl provede za použití molekul TET02, TET03 a TET07 podle příkladu 6. Při tomto experimentu slouží molekula TET07 jako pozitivní kontrolní subjekt vzhledem k tomu, že má svou vlastní transkripční transaktivátorovou oblast.

Získané výsledky v buňkách SAOS-2, které jsou uvedeny na obr.11, ukazují, že molekula TET07 je opravdu samotná schopna aktivovat transkripci genu LUC vloženého pod kontrolu oprátoru Tet a to na rozdíl od konstrukce TET02. To je v souladu se skutečností, že tato buněčná řada neobsahuje endogenní

protein p53, který takto tedy nemůže být rekrutován molekulou TET02. Naopak zavedení divokého proteinu p53 nebo jeho mutantu, které samy o sobě neprodukují signál, je schopné generovat transkripční aktivitu v přítomnosti molekul TET02. Takový výsledek nelze pozorovat u mutantu H175, který je v literatuře popsán jako mutant mající nefunkční transkripční transaktivační oblast.

Tento výsledek získaný u buněčné řady SAOS-2 s molekulou TET02 mohl být reprodukován u nádorové buněčné řady také neobsahující endogenní p53 (buňky H358) a mohl být rozšířen i na molekuly TET03 a TET04 (obr.12).

Za účelem potvrzení těchto výsledků v kontextu různých buněčných řad byly molekula TET02, jakož i pozitivní kontrolní subjekt TET07 exprimovány v buňkách HT29, které mají mutantní endogenní protein p53 (H273), zatímco negativní kontrolní subjekt tohoto experimentu spočívá v transfekci prázdného vektoru pcDNA3. Výsledek tohoto experimentu, uvedený v dále zařazené tabulce, ukazuje, že molekula TET02 je opravdu schopna rekrutovat transkripční transaktivační oblast endogenního proteinu p53.

Tabulka

Transkripční aktivace hybridních molekul podle vynálezu v buňkách HT29

pcDNA3	TET07	TET02
1	59	10

Soubor uvedených experimentů ukazuje, že hybridní molekuly podle vynálezu jsou opravdu schopné vázat jak sekven-

ce dvouvláknové DNA specifického charakteru, tak i proteiny mající transkripční transaktivační oblast a že tyto molekuly jsou schopné podmíněně indukovat expresi zainteresovaných genů.

Seznam sekvencí

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 1 :

Charakteristika sekvence:

délka: 19 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 1

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 1 :

TCTCTATCAC TGATAGGGA

19

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 2 :

Charakteristika sekvence:

délka: 17 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 1

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 2 :

TATCACCGCA AGGGATA

17

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 3 :

Charakteristika sekvence:

délka: 74 aminokyselin

typ: aminokyselina

počet vláken: 1

konfigurace: lineární

Typ molekuly: peptid

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sequence: SEQ ID n^o: 3 :

Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg
1 5 10 15
Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys
20 25 30
Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser
35 40 45
His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu
50 55 60
Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
65 70

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 4 :

Charakteristika sekvence:

délka: 768 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 1

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sequence: SEQ ID n^o: 4 :

TTACTCGCGG CCCAGCCGGC CATGGCCCAG GTGCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT 60
GTAAGGTCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGCACAGCTT CTGGCTTCAA_CATTAAAGAC 120
TACTATATGC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGATGGATT 180
GATCCTAAGA ATGGTGATAC TGAATATGCC CCGAAGTTC AGGGCAAGGC CACTATGACT 240
GCAGACACAT CCTCCAATAC AGCCTACCTG CAGCTCAGCA GCCTGGCATC TGAGGACACT 300
GCCGTGTATT ATTGTAATTT TTACGGGGAT GCTTTGGACT ATTGGGGCCA AGGGACCACG 360
GTCACCGTCT CCTCAGGTGG AGGCGGTTCA GGCGGAGGTG GCTCTGGCGG TGGCGGATCG 420
GATGTTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCACT TTGTCGGTTA CCATTGGACA ACCAGCCTCC 480
ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTG GATAGTGATG GAAAAACATA TTTGAATTGG 540
TTGTTACAGA GGCCAGGCCA GTCTCCAAAG CGCCTAATCT ATCTGGTGTC TAAACTGGAC 600

TCTGGAGTCC CTGACAGGTT CACTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTAC ACTTAAAATC 660
AACAGAGTGG AGGCTGAGGA TTTGGGAGTT TATTATTGCT GGCAAGGTAC ACATTCTCCG 720
CTTACGTTTCG GTGCTGGCAC CAAGCTGGAA ATTAAACGGG CGGCCGCA 768

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 5 :

Charakteristika sekvence:

délka: 15 aminokyselin

typ: aminokyselina

počet vláken: 1

konfigurace: lineární

Typ molekuly: peptid

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 5 :

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 6 :

Charakteristika sekvence:

délka: 30 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 6 :

CCC AAG CCC AGT ACC CCC CCA GGT TCT TCA
Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10

30

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 7 :

Charakteristika sekvence:

délka: 18 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární
Typ molekuly: DNAC
Hypotetická: ne
Antimediátorová: ne
Popis sekvence: SEQ ID n^o: 7 :

ATG AAC CGG CTG GGC AAG
Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5

13

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 8 :
Charakteristika sekvence:
délka: 33 párů bází
typ: nukleotid
počet vláken: 2
konfigurace: lineární
Typ molekuly: DNAC
Hypotetická: ne
Antimediátorová: ne
Popis sekvence: SEQ ID n^o: 8 :

GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10

33

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 9 :
Charakteristika sekvence:
délka: 7 aminokyselin
typ: aminokyselina
počet vláken: 1
konfigurace: lineární
Typ molekuly: peptid
Hypotetická: ne
Antimediátorová: ne
Popis sekvence: SEQ ID n^o: 9 :

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

Informace o sekvenci SEQ ID n^o:10 :

Charakteristika sekvence:

délka: 66 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 10:

```
GGCTCTAGAC CCAAGCCCAG TACCCCCCA GGTCTTCAA CGCGTGGATC CATGTCCAGA 60
TTAGATAAAA GTAAAG 66
```

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 11:

Charakteristika sekvence:

délka: 51 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 11:

```
CGTACGGAAT TCGGGCCCTT ACTCGAGGGA CCCACTTTCA CATTTAAGTT G 51
```

Informace o sekvenci SEQ ID n^o:12 :

Charakteristika sekvence:

délka: 66 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 12 :

GGCTCTAGAC CCAAGCCCAG TACCCCCCA GGTTCCTCAA CGCGTGGATC CATGGAACAA 60

CGCATAACCC TGAAAG 66

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 13:

Charakteristika sekvence:

délka: 51 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 13:

CGTACGGAAT TCGGGCCCTT ACTCGAGTGC TGTTGTTTTT TTGTTACTCG G

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 14:

Charakteristika sekvence:

délka: 35 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 14 :

CAGGCCATGG CATGAAGAAA CCACTGGATG GAGAA

Informace o sekvenci SEQ ID n^o:15 :

Charakteristika sekvence:

délka: 43 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 15:

CGTCGGATCC TCTAGATGCG GCCGCTCTG AGTCAGGCC TTC

43

Informace o sekvenci SEQ ID n^o:16 :

Charakteristika sekvence:

délka: 31 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 16:

CAGGCTCGAG AAGAAACCAC TGGATGGAGA A

31

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 17:

Charakteristika sekvence:

délka: 61 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 17:

CAGGCTCGAG CCCAAGCCCA GTACCCCCC AGGTTCTTCA AAGAAACCAC TGGATGGAGA

60

A

61

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 18:

Charakteristika sekvence:

délka: 37 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 18:

GGTCGAATTC GGGCCCTCAG TCTGAGTCAG GCCCTTC

37

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 19:

Charakteristika sekvence:

délka: 29 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 19:

CAGGCCATGG AGGAGCCGCA GTCAGATCC

29

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 20:

Charakteristika sekvence:

délka: 46 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 20:

CGTCGGATCC TCTAGATGCG GCCGCCACGG GGGGAGCAGC CTCTGG

46

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 21:

Charakteristika sekvence:

délka: 66 aminokyselin

typ: aminokyselina

počet vláken: 1

konfigurace: lineární

Typ molekuly: peptid

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 21:

Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln	
1				5					10					15		
Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	
			20					25					30			
Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	
		35					40					45				
Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	
	50					55					60					
Thr	Ala															
65																

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 22:

Charakteristika sekvence:

délka: 23 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAC

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 22:

GATCCTATCA CCGCAAGGGA TAA

23

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 23:

Charakteristika sekvence:

délka: 23 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2
konfigurace: lineární
Typ molekuly: DNAC
Hypotetická: ne
Antimediátorová: ne
Popis seqvence: SEQ ID n^o: 23:

GATAGTGGCG TTCCCTATTT CGA

23

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 24:
Charakteristika sekvence:
délka: 48 párů bází
typ: nukleotid
počet vláken: 2
konfigurace: lineární
Typ molekuly: DNAC
Hypotetická: ne
Antimediátorová: ne
Popis seqvence: SEQ ID n^o: 24:

GATCCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA TAGTGAGTGG TAAACTCA

48

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 25:
Charakteristika sekvence:
délka: 48 párů bází
typ: nukleotid
počet vláken: 2
konfigurace: lineární
Typ molekuly: DNAC
Hypotetická: ne
Antimediátorová: ne
Popis seqvence: SEQ ID n^o: 25:

AGCTTGAGTT TACCACTCCC TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCG

48

Informace o sekvenci SEQ ID n^o: 26:

Charakteristika sekvence:

délka: 96 párů bází

typ: nukleotid

počet vláken: 2

konfigurace: lineární

Typ molekuly: DNAc

Hypotetická: ne

Antimediátorová: ne

Popis sekvence: SEQ ID n^o: 26:

GATCCGACTT TCACTTTTCT CTATCACTGA TAGTGAGTGG TAAACTCACT AGGCTCAAAG 60

TGAAAAGAGA TAGTGACTAT CACTCACCAT TTGAGT 96

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Bispecifická chimerická molekula obsahující oblast schopnou selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci a detekční oblast schopnou specificky vázat transaktivátor nebo transrepresor nebo transaktivátorový nebo transrepresorový komplex, který je charakteristický pro fyziologický nebo fyziopatologický stav.

2. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je odvozena od proteinu schopného interakce s uvedenou DNA.

3. Molekula podle nároku 2, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je odvozena od eukaryotického proteinu.

4. Molekula podle nároku 3, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je odvozena od proteinů p53, STAT nebo NFkB.

5. Molekula podle nároku 2, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je odvozena od prokaryotického proteinu.

6. Molekula podle nároku 5, v y z n a č e n á t í m , že prokaryotickým proteinem je bakteriální represor.

7. Molekula podle nároku 6, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je odvozena od proteinu tetR.
8. Molekula podle nároku 6, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je odvozena od proteinu Cro.
9. Molekula podle některého z nároků 2 až 8, v y z n a - č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci obsahuje oblast interakce s DNA uvedeného proteinu.
10. Molekula podle některého z nároků 2 až 8, v y z n a - č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je tvořena úplným proteinem.
11. Molekula podle nároku 10, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je tvořena proteinem tetR.
12. Molekula podle nároku 10, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná selektivně vázat definovanou DNA-sekvenci je tvořena proteinem Cro.
13. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná specificky vázat transaktivátor nebo transrepreseor nebo tranaktivátorový nebo transrepreseorový komplex je oligomerační oblastí.

14. Molekula podle nároku 13, v y z n a č e n á t í m , oligomerační oblastí je leucinový zip, oblast SH3 nebo oblast SH2.

15. Molekula podle nároku 13, v y z n a č e n á t í m , že oligomerační oblast schopná specificky vázat transaktivátor je tvořena C-terminální částí proteinu p53.

16. Molekula podle nároku 15, v y z n a č e n á t í m , že oligomerační oblast je tvořena C-terminální částí proteinu p53 počínaje zbytkem 320 a konče zbytkem 393 (SEQ ID n^o3), nebo počínaje zbytkem 302 a konče zbytkem 360 anebo počínaje zbytkem 302 a konče zbytkem 390.

17. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná specificky vázat transaktivátor nebo transrepressor nebo transaktivátorový nebo transrepressorový komplex je syntetickou nebo přírodní oblastí, o které je známo, že vstupuje v interakci s uvedeným transaktivátorem nebo transrepressorem nebo transaktivátorovým nebo transrepressorovým komplexem.

18. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná specificky vázat transaktivátor nebo transrepressor nebo transaktivátorový nebo transrepressorový komplex je protilátkou nebo fragmentem nebo derivátem protilátky, které jsou řízeny proti uvedenému transaktivátoru nebo transrepressoru nebo transaktivátorovému nebo transrepressorovému komplexu.

19. Molekula podle nároku 18, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná specificky vázat transaktivátor nebo transaktivátorový komplex je tvořena fragmentem Fab nebo F(ab)'₂

protilátky nebo oblastí VH nebo VL protilátky.

20. Molekula podle nároku 18, v y z n a č e n á t í m , že oblast schopná specificky vázat transaktivátor nebo transaktivátorový komplex je tvořena jednovláknovou protilátkou (ScFv) obsahující oblast VH spojenou s oblastí VL ramenem.

21. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že oblast vazby k DNA a oblast vazby k transaktivátoru jsou vzájemně spojené prostřednictvím ramene.

22. Molekula podle nároku 21, v y z n a č e n á t í m , že rameno je tvořeno peptidem obsahujícím 5 až 30 aminokyselin, výhodně 5 až 20 aminokyselin.

23. Molekula podle nároku 22, v y z n a č e n á t í m , že rameno je zvoleno z množiny zahrnující peptidy se sekvencemi SEQ ID n^o5 a SEQ ID n^o6.

24. Molekula podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č e n á t í m , že oblast vazby k DNA je situována v N-terminální poloze, zatímco oblast vazby k transaktivátoru je situována v C-terminální poloze.

25. Molekula podle některého z nároků 1 až 23, v y z n a č e n á t í m , že oblast vazby k DNA je situována v C-terminální poloze, zatímco oblast vazby k transaktivátoru je situována v N-terminální poloze.

26. Bispecifická chimerická molekula mající strukturu ScFv-VSV/myc-Hinge-TET nebo Cro (obr.5A).

27. Bispecifická chimerická molekula mající strukturu ScFv-Hinge-TET nebo Cro (obr.5B).

28. Bispecifická chimerická molekula mající strukturu ScFv-TET nebo Cro (obr.5C).

29. Bispecifická chimerická molekula mající strukturu TET nebo Cro-ScFv (obr.5D).

30. Bispecifická chimerická molekula mající strukturu TET nebo Cro-Hinge-ScFv (obr.5E).

31. Bispecifická chimerická molekula mající strukturu Oligom-VSV/myc-Hinge-TET nebo Cro (obr.5A), Oligom-Hinge-TET nebo Cro (obr.5B) nebo Oligom-TET nebo Cro (obr.5C).

32. Sekvence nukleové kyseliny kódující chimerickou molekulu podle některého z nároků 1 až 31.

33. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 32, v y z n a -
č e n á t í m , že se jedná o sekvenci DNA.

34. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 32 nebo 33,
v y z n a č e n á t í m , že tvoří součást vektoru.

35. Systém podmíněné exprese genů zahrnující:
- chimerickou molekulu definovanou v nárocích 1 až 31 a
- expresní kazetu obsahující regulační sekvenci, minimální transkripční promotor a uvedený gen.

36. Systém podmíněné exprese podle nároku 35, v y z n a -
č e n ý t í m , že oblast vazby k DNA chimerické molekuly
je tvořena celkem nebo částí TetR a regulační sekvence obsa-
huje sekvenci SEQ ID n^o1 nebo derivát této sekvence, které
se případně několikrát opakují.
37. Systém podmíněné exprese podle nároku 35, v y z n a -
č e n ý t í m , že oblast vazby k DNA chimerické molekuly je
tvořena celkem nebo částí Cro a regulační sekvence obsahuje
sekvenci SEQ ID n^o2 nebo její derivát, které se případně ně-
kolikrát opakují.
38. Systém podmíněné exprese podle některého z nároků 35
až 37, v y z n a č e n ý t í m , že minimální promotor obsa-
huje box TATA nebo INR.
39. Systém podmíněné exprese podle nároku 38, v y z n a -
č e n ý t í m , že minimální promotor je odvozen od promo-
toru genu thymidin-kinázy.
40. Systém podmíněné exprese podle nároku 39, v y z n a -
č e n ý t í m , že minimální promotor je tvořen nukleotidy
-37 až +19 promotoru genu thymidin-kinázy.
-
41. Vektor obsahující:
- sekvenci nukleové kyseliny kódující chimerickou molekulu
podle některého z nároků 1 až 31 a
- expresní kazetu obsahující regulační sekvenci, minimální
transkripční promotor a zainteresovanou kódující sekvenci.
42. Vektor podle nároku 41, v y z n a č e n ý t í m ,

že minimální transkripční promotor je definován v nárocích 38 až 40.

43. Vektor podle nároku 41, v y z n a č e n ý t í m , že oblast vazby k DNA chimerické molekuly je tvořena celkem nebo částí TetR a regulační sekvence obsahuje sekvenci SEQ ID n^o1 nebo její derivát, které se případně několikrát opakují.

44. Vektor podle nároku 41, v y z n a č e n ý t í m , že oblast vazby k DNA chimerické molekuly je tvořena celkem nebo částí Cro a regulační sekvence obsahuje sekvenci SEQ ID n^o2 nebo její derivát, které se případně několikrát opakují.

45. Vektor podle některého z nároků 41 až 44, v y z n a č e n ý t í m , že zainteresovanou kódující sekvencí je sekvence DNA kódující terapeutický produkt.

46. Vektor podle nároku 45, v y z n a č e n ý t í m , že terapeutickým produktem je toxický peptid nebo polypeptid.

47. Vektor podle nároku 46, v y z n a č e n ý t í m , že toxický terapeutický produkt je zvolen z množiny zahrnující difterický toxin, toxin pseudomonas, ricin A, thymidin-kinázu, cytosin-deaminázu, protein Grb3 a ScFv Y28.

48. Vektor podle některého z nároků 41 až 47, v y z n a č e n ý t í m , že se jedná o plasmidový vektor.

49. Vektor podle některého z nároků 41 až 47, v y z n a č e n ý t í m , že se jedná o plasmidový vektor.

č e n ý t í m , že se jedná o virální vektor.

50. Vektor podle nároku 49, v y z n a č e n ý t í m , že se jedná o defektní rekombinantní adenovir.

51. Vektor podle nároku 49, v y z n a č e n ý t í m , že se jedná o rekombinantní defektní retrovir.

52. Farmaceutická kompozice, v y z n a č e n á t í m , že obsahuje alespoň jeden vektor podle některého z nároků 41 až 51.

53. Nukleová kyselina obsahující sekvenci SEQ ID n^o4.

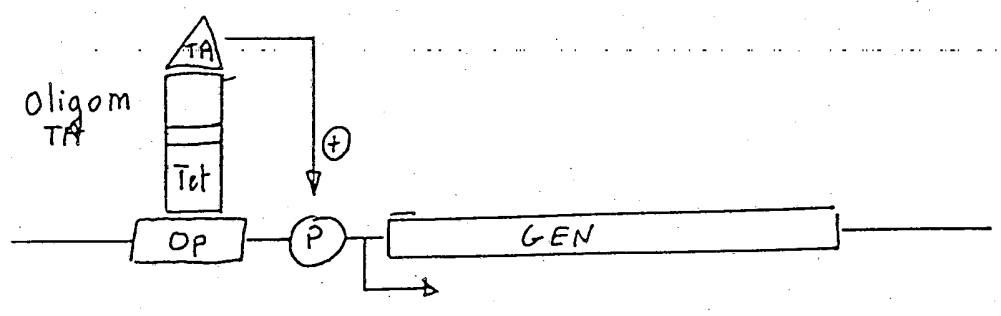
54. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , že transaktivátorem charakteristickým pro fyziologický nebo fyziopatologický stav je protein virálního, parazitního, mykobakteriálního nebo buněčného původu mající transkripční transaktivační aktivitu.

55. Molekula podle nároku 54, v y z n a č e n á t í m , že transaktivátorem je virální protein zvolený z množiny zahrnující protein Tat viru HIV, proteiny E6/EZ viru papillomu a protein EBNA viru Epsteina a Barrové.

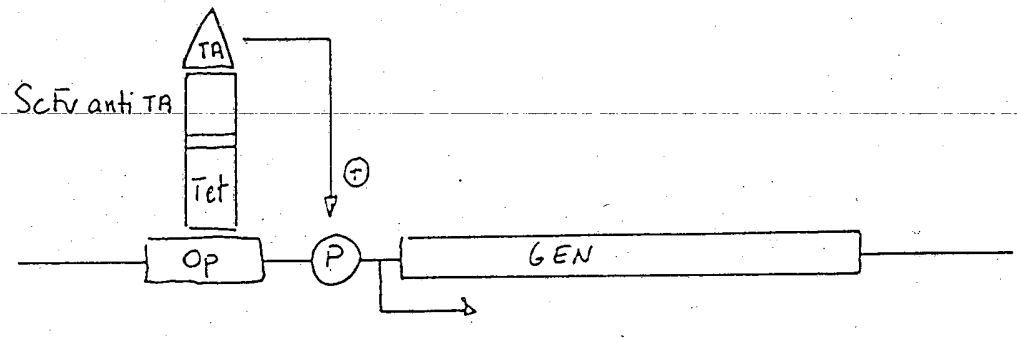
56. Molekula podle nároku 54, v y z n a č e n ý t í m , že transaktivátorem je buněčný protein, výhodně mutovaný nebo divoký protein p53.

57. Molekula podle nároku 1, v y z n a č e n á t í m , transaktivátorem nebo transaktivátorovým komplexem charakteristickým pro fyziologický nebo fyziopatologický stav je protein vyskytující se v infikované nebo hyperproliferační buňce.

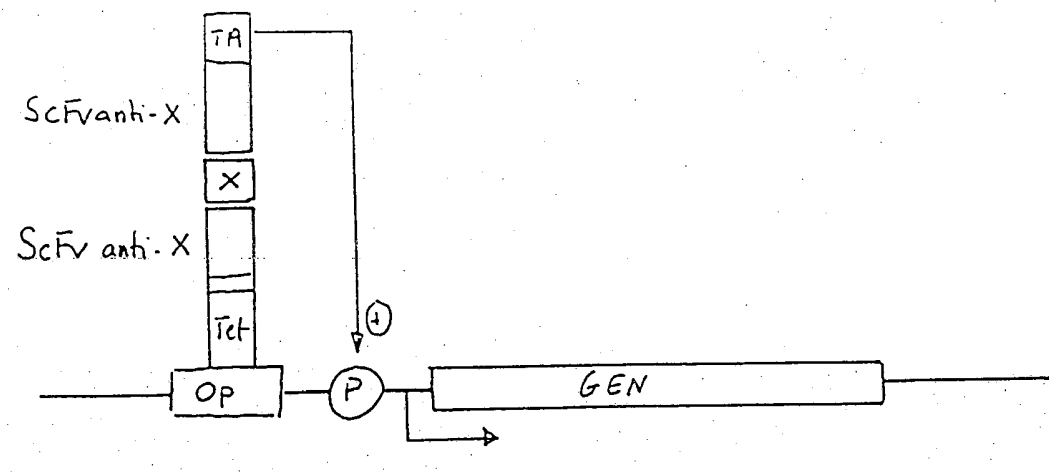
Zastupuje :



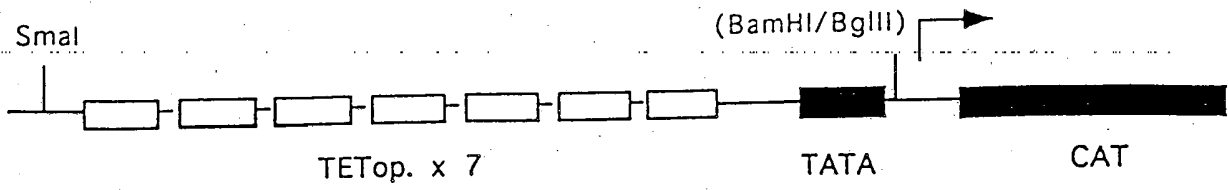
OBR. 1A



OBR. 1B

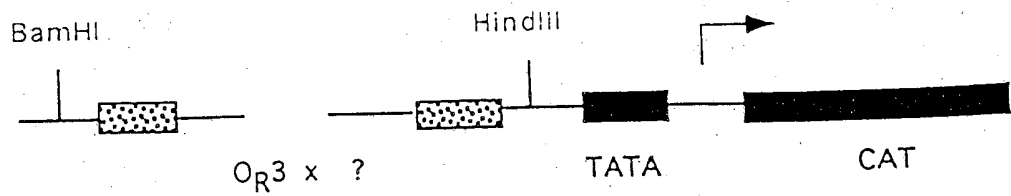


OBR. 2

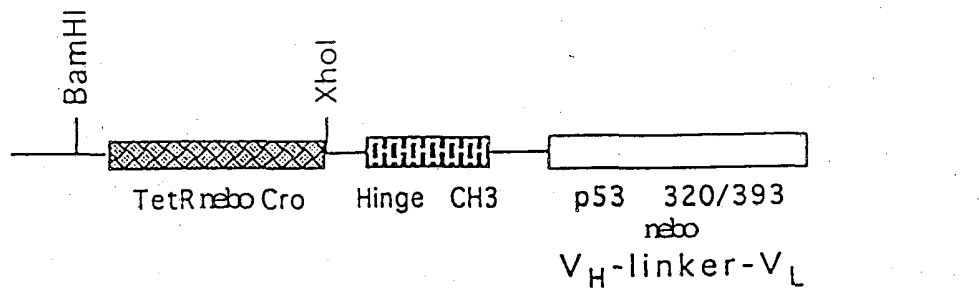
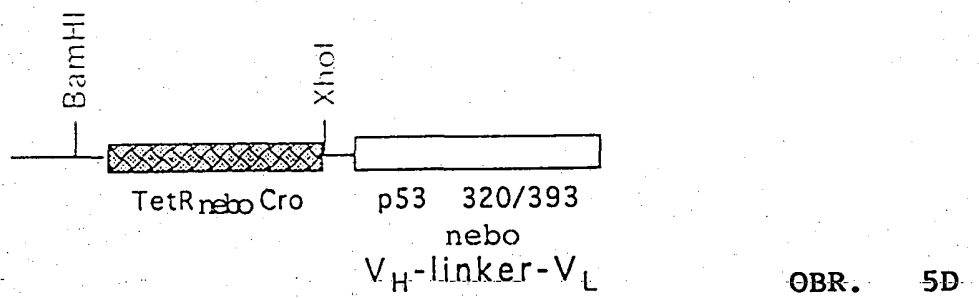
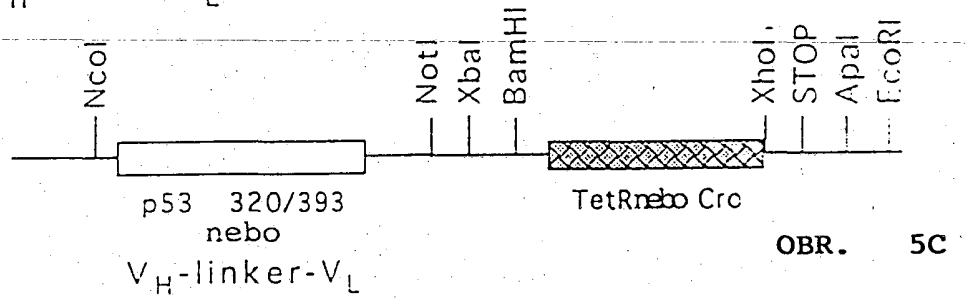
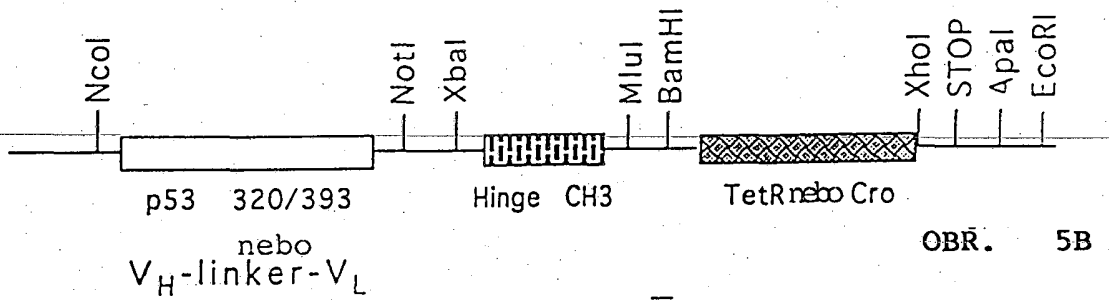
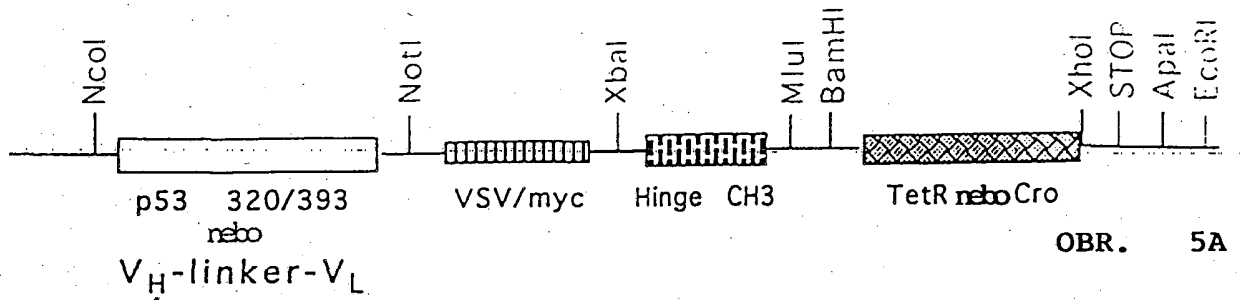


TETop. = GACTTTCAGCTTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTC

OBR. 3

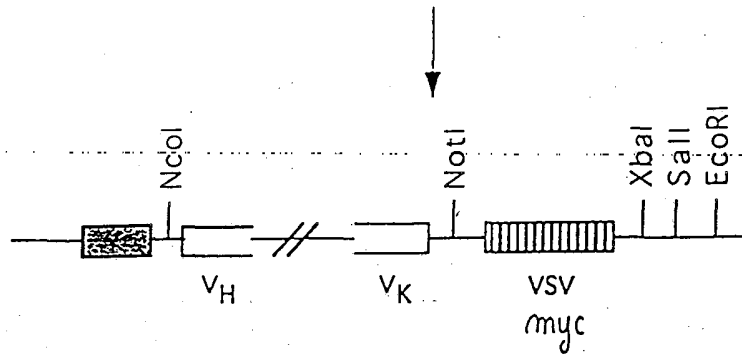


OBR. 4



4/10

ScFv + vsv/myc



(5474) XbaI Hinge CH3 MluI BamHI
 GGC TCT AGA CCC AAG CCC AGT ACC CCC CCA GGT TCT TCA ACG CGT GGA TCC ATG TCC AGA TTA GAT AAA AGT AAA G
 ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA G
 TET Rep.

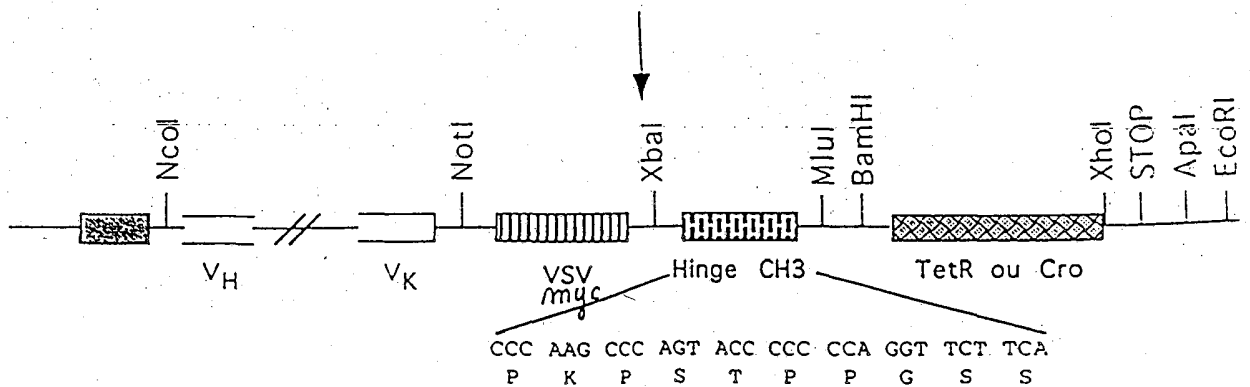
TET Rep. XhoI Apal EcoRI
 ... CAA CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC CTC GAG TAA GGG CCC GAA TTC CGT ACG

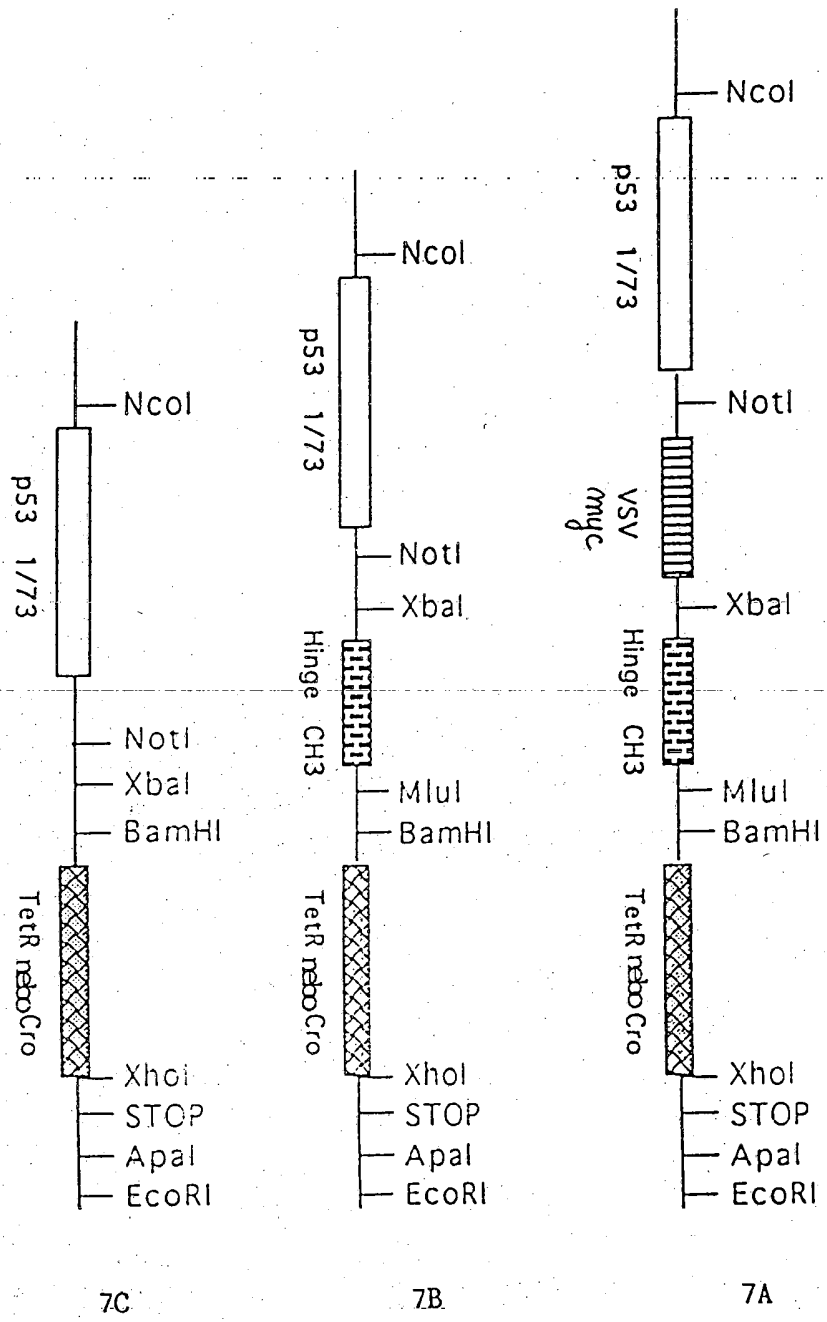
(5475) CGT ACG GAA TTC GGG CCC TTA CTC GAG GGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG TTG

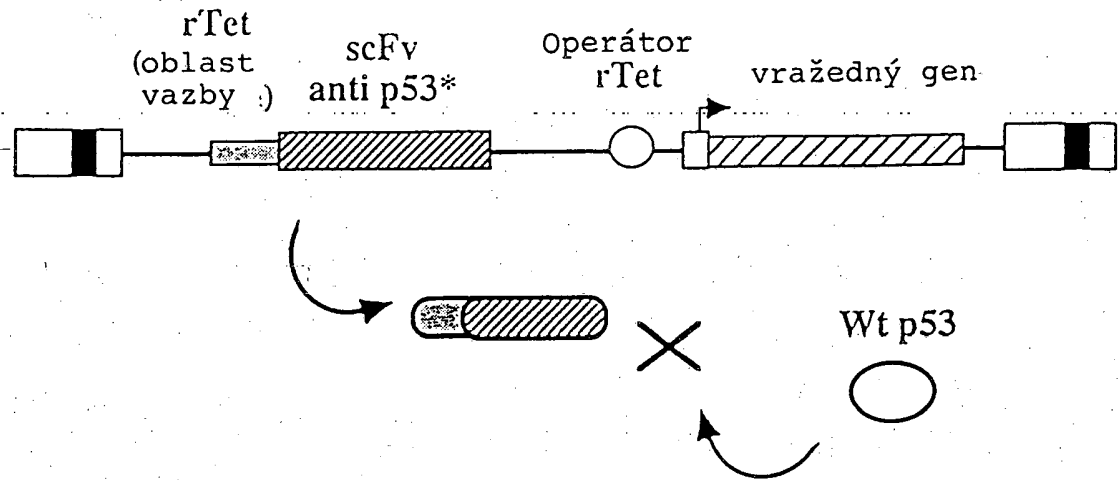
XbaI Hinge CH3 MluI BamHI
 (5531) GGC TCT AGA CCC AAG CCC AGT ACC CCC CCA GGT TCT TCA ACG CGT GGA TCC ATG GAA CAA CGC ATA ACC CTG AAA
 ATG GAA CAA CGC ATA ACC CTG AAA

CRO XhoI Apal EcoRI CRO
 ... CCG AGT AAC AAA AAA ACA ACA GCA CTC GAG TAA GGG CCC GAA TTC CGT ACG

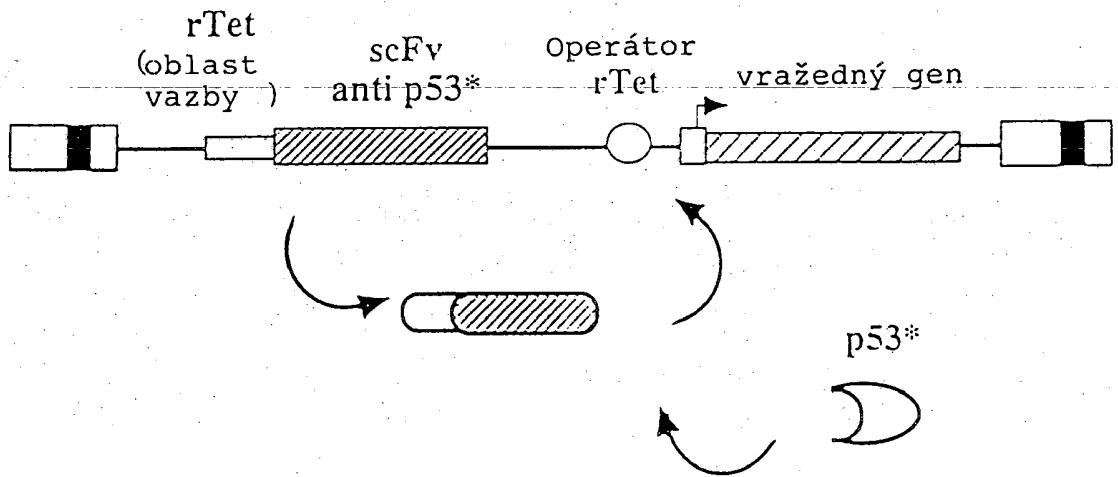
(5532) CGT ACG GAA TTC GGG CCC TTA CTC GAG TGC TGT TGT TTT TTT GTT ACT CGG



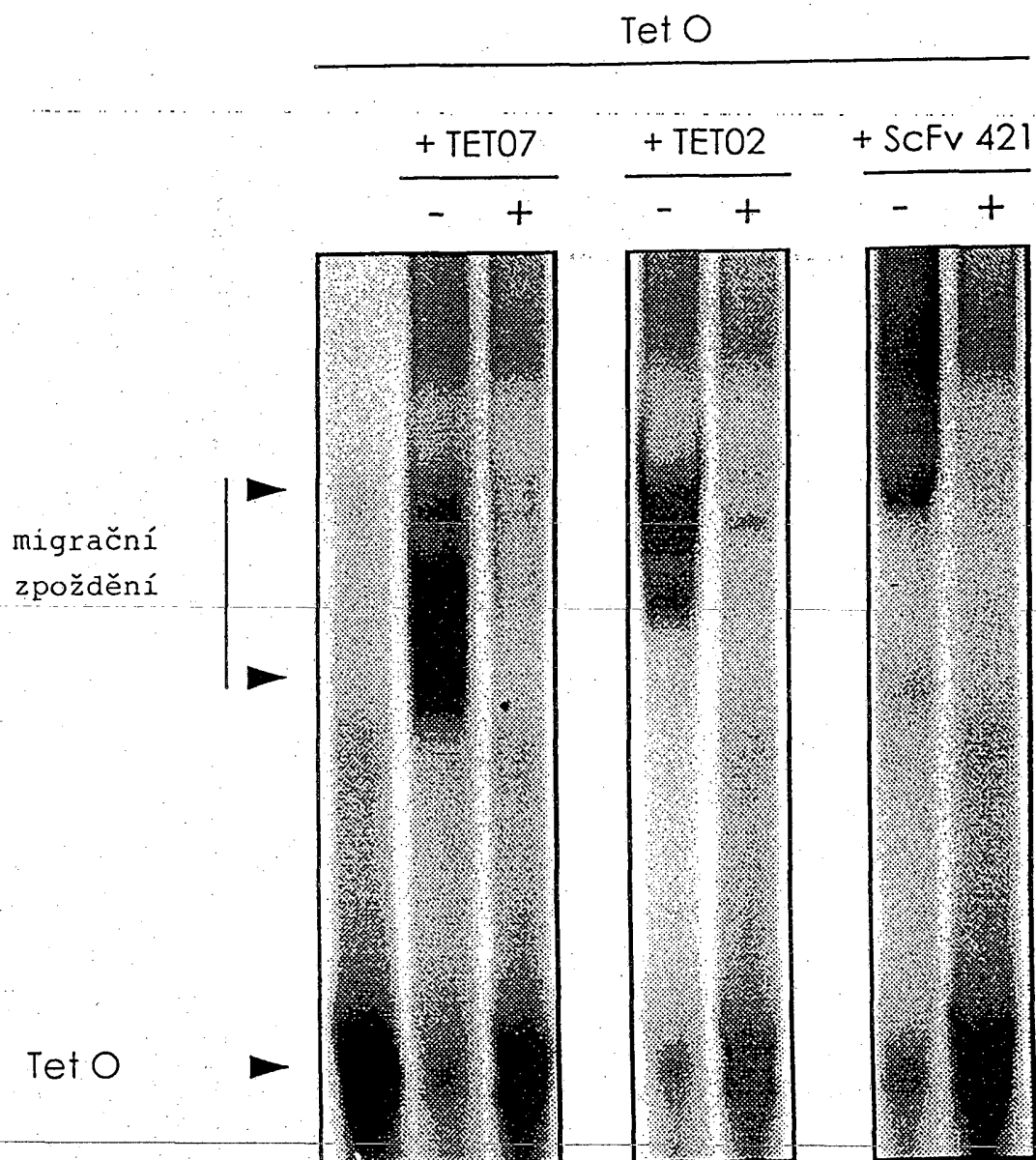




OBR. 8A

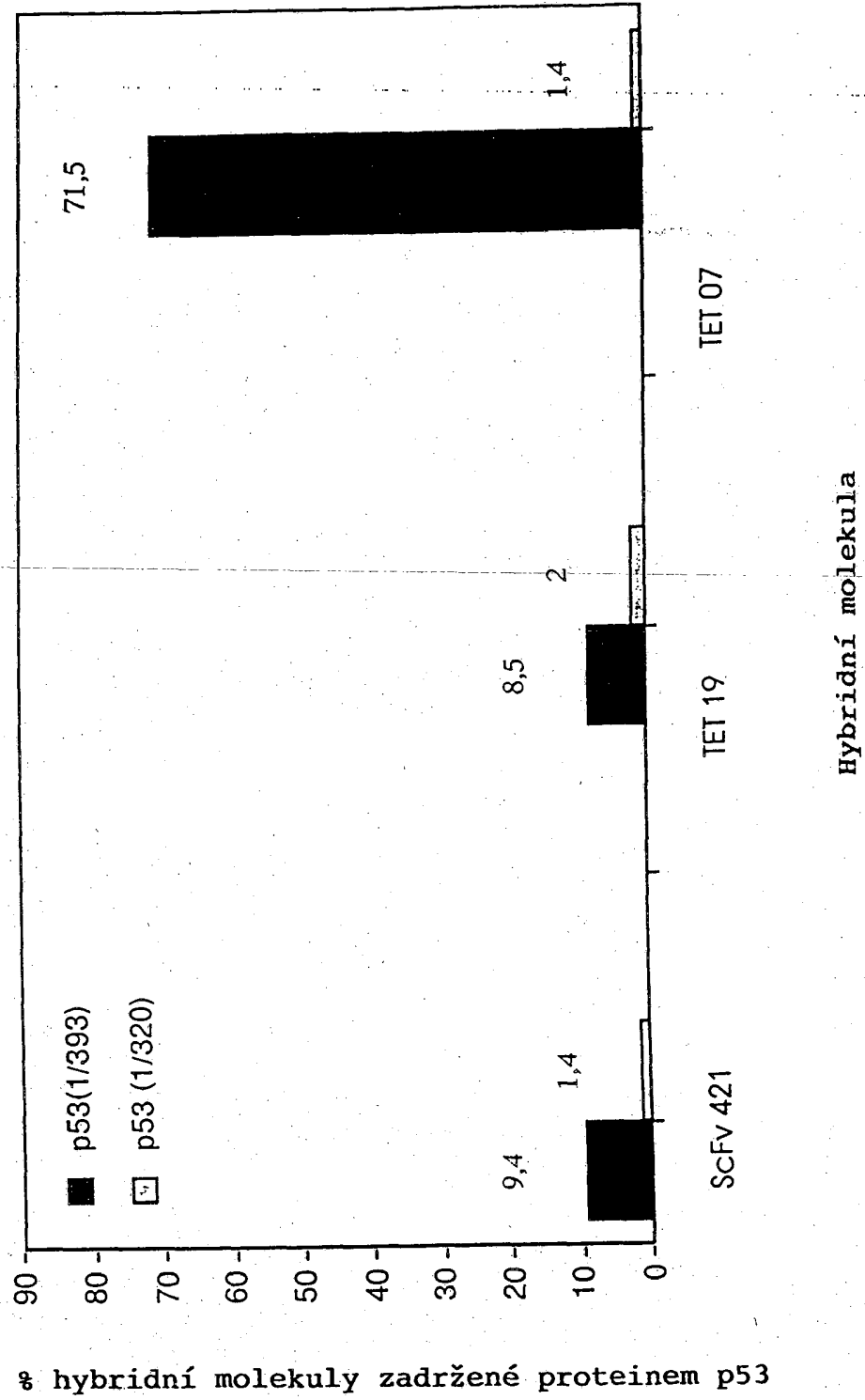


OBR. 8B



-: bez tetracyklinu
+: s tetracyklinem

Interakce mezi hybridními molekulami podle vynálezu a různými formami proteinu p53



Aktivace reportérového genu TET-LUC v buňkách SAOS-2

