PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2002 - 756

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/90
C 12 N 15/85
C 12 N 5/10
A 61 K 48/00
A 61 K 31/70
A 01 K 67/027

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.08.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19941186**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/DE00/02947**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/16345**

(71) Přihlašovatel:
DRÖGE Peter, Köln, DE;

(72) Původce:
Dröge Peter, Köln, DE;
Christ Nicole, Köln, DE;
Lorbach Elke, Köln, DE;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Sekvenčně specifická rekombinace DNA v eukaryontních buňkách

(57) Anotace:

Popisuje se způsob sekvenčně specifické rekombinace DNA v eukaryontních buňkách, který zahrnuje zavedení první sekvence DNA do buňky, zavedení druhé sekvence DNA do buňky a provedení sekvenčně specifické rakombinace integrázou bakteriofága lambda Int. V preferovaném provedení se popisuje způsob, který dále zahrnuje sekvenčně specifickou rekombinaci DNA pomocí Int a faktoru Xis. Dále se popisují vektory a jejich použití jako farmaceutická činidla.

CZ 2002 - 756 A3

PV 2002-756
16.04.02
28823

Sekvenčně specifická rekombinace DNA v eukaryontních buňkách

Oblast techniky

Vynález popisuje způsob sekvenčně specifické rekombinace DNA v eukaryontních buňkách, který zahrnuje zavedení první sekvence DNA do buňky, zavedení druhé sekvence DNA do buňky a provedení sekvenčně specifické rekombinace integrázou Int bakteriofága *lamba*. Výhodné provedení vynálezu popisuje způsob, který dále zahrnuje provedení sekvenčně specifické rekombinace DNA pomocí Int a faktoru Xis. Vynález dále popisuje vektory a jejich použití jako léčebných prostředků.

Dosavadní stav techniky

Řízená manipulace eukaryontních genomů je důležitá metoda zkoumání funkce (funkcí) specifických genů v živých organizmech. Mimo to uvedená manipulace se používá při genových terapeutických metodách v medicíně. V této spojitosti je zvláště důležité vytvoření transgenních zvířat, změna genů nebo genových segmentů (tzv. „genové cílení") a cílené začlenění cizorodé DNA do genomu vyšších eukaryont. V poslední době by se tyto technologie mohly zdokonalit způsoby charakterizace a aplikace sekvenčně specifických rekombinantních systémů.

Konzervativní sekvenčně specifické DNA rekombinázy se dělí do dvou rodin. Zástupci první rodiny se nazývají „integrázy" a katalyzují štěpení a opětné spojení řetězců DNA mezi dvěmi definovanými nukleotidovými sekvencemi, které se budou nazývat rekombinantní sekvence. Rekombinantní sekvence mohou být buď na dvou různých nebo na jedné stejné molekule DNA, což vede k intermolekulární respektive intramolekulární rekombinaci. V druhém případě výsledek reakce závisí na vzájemné orientaci rekombinantních sekvencí. V případě inverzní, to znamená

obrácené orientace rekombinantních sekvencí, se objeví inverze segmentů DNA ležících mezi rekombinantními sekvencemi. V případě přímých, to znamená tandemových repetic rekombinantních sekvencí, dochází k výskytu delecí v substrátu DNA. V případě intermolekulární rekombinace, to znamená, jestliže obě rekombinantní sekvence se nachází na dvou různých molekulách DNA, dochází k fúzi dvou molekul DNA. Zatímco členové integrázové rodiny obvykle katalyzují intramolekulovou stejně jako intermolekulovou rekombinaci, rekombinázy druhé rodiny tzv. „invertázy/resolvázy" jsou schopny katalyzovat pouze intramolekulární rekombinaci.

Rekombinázy, které se používají hlavně při manipulaci eukaryontních genomů, patří do rodiny integráz. Uvedené rekombinázy jsou rekombináza Cer pocházející z bakteriofága *P1* a rekombináza Flp pocházející z kvasinek (popisuje se v publikaci Muller, U. (1999) Mech. Develop., 82, pp.3). Rekombinantní sekvence, na které se rekombináza Cre váže, se nazývají *loxP*. Sekvence *LoxP* je nukleotidová sekvence obsahující 34 bp, přičemž obsahuje dvě invertované nukleotidové sekvence o délce 13 bp, mezi nimiž leží mezerník obsahující 8 bp (popisuje se v publikaci Hoess, R. et al., (1985), J. Mol. Biol., 181, pp. 351). Vazebné sekvence pro Flp nazvané *FRT* se vytvořily podobným způsobem. Avšak liší se od *loxP* (popisuje se v publikaci Kilby, J. et al., (1993) Trends Genet., 9, pp. 413). Rekombinantní sekvence se nemohou navzájem nahrazovat, to znamená, že Cre není schopná rekombinovat sekvence *FRT* a FLP není schopné rekombinovat sekvence *loxP*. Oba rekombinační systémy jsou aktivní po dlohou vzdálenost, to znamená, že segment DNA, aby se opačně orientoval nebo deletoval a byl lemován dvěmi sekvencemi *loxP* nebo *FRT*, může obsahovat několik 100 000 párů bazí.

S uvedenými dvěma systémy se dosáhlo například tkáňově specifické rekombinace v myším systému, chromozomální

16.04.02

translokace v rostlinách a zvířatech a řízené indukce exprese genů (popisuje se v publikaci Muller, U. (1999) Mech. Develop., 82, pp.3). DNA polymeráza beta se deletovala v určitých tkáních myší tímto způsobem. (popisuje se v publikaci Gu, H. et al., (1994) Science, 265, pp. 103). Dalším příkladem je specifická aktivace onkogenu nádorového viru SV40 v čočkách myší vedoucí k vytvoření nádoru pouze v těchto tkáních. Strategie Cre-*loxP* se používá také ve spojení s indukovatelnými promotory. Například exprese rekombinázy se regulovala promotorem indukovatelným interferonem, což vede k deleci specifického genu v játrech ale nikoli v jiných tkáních a nebo v jiných tkáních k této situaci dochází pouze v malém rozsahu (popisuje se v publikaci Kuhn, R. et al., (1995) Science, 269, pp. 142).

Dva zástupci rodiny invertáza/resolváza se použily při manipulaci eukaryontních genomů. Mutant invertázy Gin bakteriofága *Mu* může katalyzovat inverzi fragmentu DNA v rostlinných protoplastech bez kofaktorů. Zjistilo se, že tento mutant je hyperrekombinantivní, to znamená, že katalyzuje štěpení řetězce DNA v jiné než přirozeně rekombinantních sekvencích. To vede k neúmyslné částečně letální rekombinaci u genomů rostlinných protoplastů. β-rekombináza z mikroorganizmu *Streptococcus pyogenes* katalyzuje rekombinaci v myší buněčné kultuře mezi rekombinatními sekvencemi, jako řízené repetice vedoucí k excizi segmentu. Současně s delecí se také detekovala inverze, což poskytuje řízené použití systému při manipulaci nevhodných eukaryontních genomů.

Manipulace eukaryontních genomů s rekombinázou Cre a Flp vykazují podstatné nevýhody. V případě delece to znamená rekombinaci dvou tandemových opakovaných rekombinantních sekvencí *loxP* nebo *FRT* v genomu, kde existuje nevratná ztráta segmentu DNA ležícího mezi tandemovými repeticemi. Gen

18.04.02

lokalizovaný na tomto segmentu DNA bude v případě buňky a organizmu permanentně ztracen. Proto není možná rekonstrukce počátečního stavu při analýzách genové funkce například v pozdějším stádiu vývoje organizmu. Nezrušitelná ztráta segmentu DNA delecí může zabránit inverzi segmentu DNA. Gen se může deaktivovat inverzí, aniž se ztratí a může být aktivován v pozdějším stádiu vývoje nebo u dospělých zvířat způsobem časově regulované exprese rekombináz prostřednictvím zpětné rekombinace. Použití obou rekombináz Cre a Flp u této modifikované metody nese jisté nevýhody. Inverze nemůže být regulována, protože rekombinantní sekvence se nebudou měnit jako výsledek rekombinantních jevů. Objevují se opakované rekombinantní jevy, které způsobují deaktivaci genu, což způsobuje inverzi segmentu DNA u některých cílových buněk, nejvýhodněji u 50 % cílových buněk. Vyvijí se úsilí řešit tento problém alespoň z části konstrukcí mutovaných sekvencí *loxP*, které se nemohou použít při další reakci po jednoduché rekombinaci. Nevýhodou je jedinečnost reakce, to znamená, že nedochází k následné aktivaci zpětnou rekombinací po deaktivaci genu inverzí.

Další nevýhodou rekombináza Flp je její omezená tepelná stabilita při teplotě 37 °C limitující účinnost rekombinační reakce u vyšších eukaryont, například u myší, které mají tělesnou teplotu přibližně 39 °C. Zkonstruovali se mutanti Flp, kteří vykazují vyšší teplotní stabilitu ve srovnání s rekombinázou divokého typu, avšak vykazují stále nižší účinnost rekombinace ve srovnání s rekombinázou Cre.

Použití sekvenčně specifických rekombináz v oblasti medicíny, například při genové terapii, kde rekombinázy mohou integrovat segment DNA do genomu lidské cílové buňky stabilním a cílovým způsobem. Rekombinázy Cre a Flp mohou katalyzovat intermolekulární rekombinaci. Obě rekombinázy rekombinují plazmidovou DNA, která nese kopii své rekombinantní sekvence

18.04.02

s odpovídající rekombinantní sekvencí, která se začlenila do eukaryontního genomu prostřednictvím homologní rekombinace. Je však nutné, aby tato reakce byla proveditelná s „přirozeně" se vyskytujícími rekombinantními sekvencemi v eukaryontním genomu. Sekvence *loxP* a *FRT* obsahují 34 a 54 nukleotidů. Výskyt této rakombinantní sekvence jako část genomu je statisticky vysoce nepravděpodobná. Dokonce jestliže rekombinantní sekvence je nevýhodná, vzhledem k tomu, že shora v textu popsaná zpětná reakce stále existuje, to znamená, že rekombináza Cre a Flp mohou vyjmout začleněný segment DNA po úspěšném začlenění intramolekulární rekombinací.

Jedním problémem podle vynálezu je poskytnout jednoduchý a řiditelný rekombinantní systém a požadované pracovní postupy. Dalším problémem vynálezu je vytvoření rekombinantního systému a požadovaných pracovních postupů, které se mohou provést stabilní a cílené začlenění požadované sekvence DNA.

Uvedené problémy řeší předmětná věc charakterizovaná v uvedených nárocích.

Termín „transformace" nebo „transformovat" znamená libovolné zavedení sekvence nukleové kyseliny do buňky. Zavedení se může například provést transfekcí nebo lipofekcí nebo se může provést použitím vápníku, elektrošokem nebo injekcí do oocytů. Termín „transformace" nebo „transformovat" také znamená zavedení sekvence nukleové kyseliny viru obsahující například rekombinantní sekvenci(e) a terapeutický gen nebo genový fragment způsobem, který je pro virus přirozený. Sekvence nukleové kyseliny viru se nemusí vyskytovat jako holá sekvence nukleové kyseliny, ale může být chráněna obalem virového proteinu. Termín se netýká pouze způsobu, který je obvykle známý pod pojmem „transformace" nebo „transformovat".

16.04.02

Termín „derivát" obvykle popisuje sekvence *attB* a *attP* a sekvence *attL* a *attP*, které vykazují úpravy ve formě jedné nebo více, maximálně šesti, s výhodou dvou, tří, čtyř nebo pěti substitucí na rozdíl od přirozeně se vyskytujících rekombinantních sekvencí.

Termín „homologie" nebo „homologní" nebo „podobný" s ohledem na rekombinantní sekvence vztahující se na sekvenci nukleové kyseliny je shodný ze 70 %, s výhodou z 80 %, výhodněji z 85 %, ještě výhodněji z 90 %, ještě výhodněji z 95 % a nejvýhodněji z 99 % s přirozeně se vyskytujícími rekombinantními sekvencemi.

Termín „vektor" se vztahuje k přirozeně se vyskytující nebo synteticky vytvořené konstrukci vhodné pro pohlcení, pomnožení, expresi nebo transmisi nukleových kyselin, jako jsou například plazmidy, fágemidy, kosmidy, umělé chromozomy, bakteriofágy, viry nebo retroviry.

Integráza (obvykle označená jako „Int") bakteriofágu *lambda* patří podobně jako Cre a Flp k rodině integráz sekvenčně specifických konzervativních DNA rekombináz. Rekombináza Int katalyzuje integrační rekombinaci mezi dvěmi různými rekombinantními sekvencemi, jmenovitě *attB* a *attP*. sekvence *attB* obsahuje 21 nukleotidů a původně se izolovala z genomu mikroorganizmu *E. coli* (popisuje se v publikaci Mizuuchi, M. and Mizuuchi, K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 pp.3220). Na druhou stranu sekvence *attP* obsahující 243 nukleotidů je daleko delší a objevuje se přirozeně v genomu bakteriofága *lambda* (popisuje se v publikaci Landy A. and Ross, W. (1977) Science, 197, pp.1147). Rekombináza Int obsahuje sedm vazebných míst, z nichž všechny se nacházejí v sekvenci *attP* a dvě v *attB*. Biologická funkce rekombinázy Int je sekvenčně specifické začlenění kruhového fágového genomu do lokusu *attB* v chromozomu mikroorganizmu *E. coli*.

18.04.02

Rekombináza Int protřebuje proteinový ko-faktor, který se nazývá integrační hostitelský faktor (obvykle se označuje jako „IHF") vhodný pro integrační rekombinaci (popisuje se v publikaci Kikuchi, Z. and Nash, H. (1978) J. Biol. Chem., 253, 7149). IHF je nutný pro vytvoření funkčního rekombinantního komplexu se sekvencí *att*P. Druhý ko-faktor vhodný pro integrační reakci je vytvoření negativního superhelikálního vinutí DNA sekvence *att*P. Nakonec rekombinace mezi sekvencemi *att*B a *att*P vede k vytvoření dvou nových rekombinantních sekvencí, jmenovitě *att*L a *att*R, které slouží jako substrátové a rozeznávací sekvence při další rekombinační reakci a sestřihu. Závěr týkající se začlenění bakteriofága *lambda* se popisuje v publikaci Landy, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp. 913.

Vystřižení genomu fága z bakteriálního genomu se katalyzuje také rekombinázou Int. Vedle rekombinázy Int a IHF je nutný další ko-faktor, který je kódován také bakteriofágem *lambda*. Tímto ko-faktorem je exciznáza (obvykle označována jako „XIS"), která má dvě vazebná místa v sekvenci *att*R (popisuje se v publikaci Gottesman, M. and Weisberg, R. (1971) The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 113). Na rozdíl od integrační rekombinace DNA není nutné v případě excezivní rekombinace negativní superhelikální vinutí rekombinantních sekvencí. Negativní superhelikální vinutí DNA však zvyšuje účinnost rekombinační reakce. Další zlepšení účinnosti excize se může dosáhnout použitím druhého ko-faktoru, jmenovitě FIS (faktor pro inverzi stimulace), který působí ve spojení s Xis (popisuje se v publikaci Lany, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp 913). Excize je geneticky zcela obrácená reakce integrace. To znamená, že se opět vytvoří sekvence *att*P a *att*B. Závěr týkající se excize bakteriofága *lambda* se uvádí v publikaci Landy, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp. 913.

16.04.02

Podstata vynálezu

Vynález popisuje způsob sekvenčně specifické rekombinace DNA v eukaryontních buňkách, který zahrnuje a) zavedení první sekvence DNA do buňky, b) zavedení druhé sekvence DNA do buňky a c) provedení sekvenčně specifické rekombinace integrázou Int bakteriofágu lambda. Výhodná je metoda, kde první sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*B podle SEQ ID NO: 1 nebo její derivát a druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*P podle SEQ ID NO: 2 nebo její derivát. Dále se preferuje metoda, kde první sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*L podle SEQ ID NO: 3 nebo její derivát a druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*R podle SEQ ID NO: 4 nebo její derivát, kde v kroku c) se provede sekvenčně specifická rekombinace pomocí rekombinázy Int a faktoru Xis.

Způsob podle vynálezu se může provést ne pouze s přirozeně se vyskytujícími sekvencemi *att*B a/nebo *att*P nebo *att*L a/nebo *att*R, ale také s upravenými například substituovanými sekvencemi *att*B a/nebo *att*P nebo *att*P nebo *att*L. Pozorovaly se integrační rekombinace bakteriofága *lambda* a mikroorganizmu *E. coli* mezi homologními sekvencemi *att*P a *att*B (mutanti sekvencí divokého typu), které vykazují jednu substituci nebo kombinaci následujících substitucí v poloze *att*B: G, T (v poloze -9), A, C, G (v poloze -8), C, A, T (v poloze -7), T, G, A (v poloze -6), C, A (v poloze -5), A (v poloze -4), G, A (v poloze -3), A, C, G (v poloze -2), A, C, G (v poloze -1), A, C, G (v poloze 0), T, C, G (v poloze +1), A, C, G (v poloze +2), T, G, C (v poloze +3), A, G, T (v poloze +4), A, C, G (v poloze 15), G, T (v poloze +6), G, T (v poloze +7), G, T, A (v poloze +8), C, G, A (v poloze +9), C, G, A (v poloze + 10), T, A, C (v poloze +11) (popisuje se v publikaci Nash, H. (1981) Annu. Rev. Genet., 15, pp 143, Nussinov, R. and Weisberg, R. (1986) J. Biomol. Struct. Dynamics, 3, pp 1134) a/nebo v sekvenci *att*P: T (v poloze +1), C (v poloze +2) a A (v poloze +4)

(popisuje se v publikaci Nash, H. (1981) Annu. Rev. Genet., 15, pp. 143).

Vynález popisuje způsob, kde používané sekvence *attB* a *attP* vykazují jednu nebo více substitucí v porovnání s přirozeně se vyskytující sekvencí *attB* podle SEQ ID NO: 1 a sekvence *attP* podle SEQ ID NO: 2. Dále vynález popisuje způsob, kde používané sekvence *attL* a *attR* mají jednu nebo více substitucí v porovnání s přirozeně se vyskytující sekvencí *attL* podle SEQ ID NO: 3 a sekvence *attR* podle SEQ ID NO: 4. Výhodná je metoda, kde rekombinantní sekvence mají jeden, tři, čtyři nebo pět substitucí. Substituce se mohou vyskytovat ve dvou oblastech přesahu (popisuje se na obrázku č. 6A, prázdný obdélník) a v oblasti jádra (popisuje se na obrázku č. 6A, čárkovaně). Celá oblast přesahu, která obsahuje sedm nukleotidů, se může také substituovat. Více se preferuje metoda, kde jsou substituce zavedeny do sekvence *attB* a *attP*, buď v oblasti jádra nebo přesahu. Preferované je zavedení substituce do oblasti přesahu a současné zavedení jedné nebo více substitucí do oblasti jádra.

V případě metody podle vynálezu není nezbytné zavést odpovídající substituci do sekvence *attP*, jestliže je zavedena substituce do sekvence *attB* nebo zavést odpovídající substituci do sekvence *attR*, jestliže v sekvenci *attL* je zavedena substituce a opačně. Úprava ve formě substituce do rekombinantních sekvencí se vybrala tak, že rekombinace se může provést navzdory úpravám. Příklady takových substitucí jsou uvedeny například v publikaci Nash, H. (1978) J. Biol. Chem., 253, 7149) a Nussinov, R. and Weisberg, R. (1986) J. Biomol. Struct. Dynamics, 3, pp 1134). Je možné provést další modifikace, například metodami mutageneze a jejich použití se může testovat testovací rekombinací.

16.04.02

Vynález dále popisuje způsob, kde je možné použít sekvenci *attB* v porovnání s přirozeně se vyskytující sekvencí *attB* podle SEQ ID NO: 1 nebo použití sekvence *attP* v porovnání s přirozeně se vyskytující sekvencí *attP* podle SEQ ID NO: 2 nebo užívanou sekvenci *attL* v porovnání s přirozeně se vyskytující sekvencí *attL* podle SEQ ID NO: 3 nebo používanou sekvenci *attR* podle SEQ ID NO: 4, která má jednu nebo více substitucí. Proto jedna nebo více substitucí v jedné z rekombinantních sekvencí nezbytně nezahrnuje odpovídající substituci ve druhé rekombinační sekvenci.

V preferovaném provedení vynálezu sekvence *attB* obsahuje 21 nukleotidů a odpovídá původně izolované sekvenci z genomu mikroorganizmu *E. coli* (popisuje se v publikaci Mizuuchi, M. and Mizuuchi, K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp.3220) a sekvence *attP* obsahuje 243 nukleotidů a odpovídá původně izolované sekvenci z genomu bakteriofága *lambda* (popisuje se v publikaci Landy, A. and Ross, W. (1977) Science, 197, pp. 1147).

V dalším provedení vynálezu sekvence *attL* obsahuje 102 nukleotidů a sekvence *attR* obsahuje 162 nukleotidů. Obě sekvence odpovídají původně izolovaným sekvencím z genomu mikroorganizmu *E. coli* (popisuje se v publikaci Landy, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp. 913).

Za účelem uskutečnit způsob podle vynálezu může první sekvence DNA obsahovat vedle rekombinantní sekvence další sekvence DNA, které umožňují začlenění do požadovaného cílového lokusu v genomu eukaryontní buňky. Tato rekombinace se provádí prostřednictvím homologní rekombinace, která je zprostředkována mechanizmy vnitřní buněčné rekombinace. V případě uvedené rekombinace další sekvence DNA musí být homologní s DNA cílového lokusu nachází se stejně na 3´a 5´konci sekvencí *attB* a *attL*. Odborníci znají, jak vysoký musí

být stupeň homologie a jak dlouhé musí být 3´a 5´sekvence, aby proběhla homologní rekombinace s dostatečnou pravděpodobností (popisuje se v publikaci Capecchi, M. (1989) Science, 244, pp. 1288).

Druhá sekvence DNA s rekombinantními sekvencemi *attP* a *attR* může také obsahovat sekvence DNA, které jsou nezbytné v případě integrace do požadovaného cílového lokusu prostřednictvím homologní rekombinace. V případě metody podle vynálezu první a/nebo druhá sekvence DNA může obsahovat další sekvence DNA. Výhodný je způsob, kde obě sekvence DNA obsahují další sekvence DNA.

Zavedení první a druhé sekvence DNA s dalšími sekvencemi DNA nebo bez nich se může uskutečnit postupně a ve společné transformaci, kde sekvence DNA jsou přítomny na dvou různých molekulách DNA. Výhodná je metoda, kde je přítomna první a druhá sekvence DNA s dalšími sekvencemi nebo bez nich a zavedla se do eukaryontních buněk na jediné molekule DNA. Dále první sekvence DNA se může zavést do buňky a druhá sekvence DNA se může zavést do jiné buňky, ve které se buňky následně fúzují. Termín fúze znamená křížení organizmů stejně jako buněčná fúze v nejširším smyslu.

Způsob podle vynálezu se může použít k inverzi segmentu DNA, který leží mezi nepřímo orientovanými rekombinačními sekvencemi při intramolekulární rekombinaci. Dále způsob podle vynálezu se může použít při deleci segmentu DNA, který leží mezi přímo orientovanými rekombinačními sekvencemi při intramolekulární rekombinaci. Jestliže rekombinantní sekvence jsou každá začleněna v orientaci 5´-3´ nebo 3´-5´, jsou přítomny v přímé orientaci. Rekombinantní sekvence jsou v přímé orientaci, jestliže například sekvence *attB* je začleněna v orientaci 5´-3´ a sekvence *attP* je integrovaná v orientaci 3´-5´. Jestliže rekombinantní sekvence je každá

16.04.02

začleněna prostřednictvím homologní rekombinace do intronových sekvencí v orientaci 5´a 3´ exonu a rekombinace se uskuteční integrázou, exon se invertuje v případě nepřímých orientovaných rekombinačních sekvencí a deletuje v případě přímo orientovaných rekombinačních sekvencí. S tímto postupem polypeptid kódovaný genem může ztratit svou aktivitu nebo funkci nebo transkripce se může zastavit inverzí nebo delecí tak, že nedojde k vytvoření úplného transkriptu. Tímto způsobem se může například zkoumat biologická funkce kódovaného polypeptidu.

První a/nebo druhá sekvence DNA může obsahovat další sekvence nukleové kyseliny kódující jeden nebo více polypeptidů. Strukturální protein, enzym nebo regulační protein se může zavést prostřednictvím rekombinačních sekvencí do genomu, který je dočasně exprimován po intramolekulární rekombinaci. Zavedený polypeptid může být endogenní nebo exogenní. Dále se může zavést markerový protein. Mohou se najít příklady aplikací podle vynálezu provedené za použití rekombináz Cre a Flp, například v publikaci Kilby, N. et al., (1993), Trends Genet., 9, pp. 413.

Způsob podle vynálezu se může použít k deleci nebo inverzi segmentů DNA ve vektorech intramolekulární rekombinací v epizomálních substrátech. Deleční reakce se může použít například k deleci balících sekvencí z tzv. pomocných virů. Tato metoda má široké použití při průmyslové produkci virových vektorů při genové terapii (Hardy, S, et al., (1997), J. Virol., 71, pp. 1842).

Intermolekulární rekombinace vede k fúzi dvou molekul DNA, přičemž každá má kopii sekvencí *att*B a *att*P nebo *att*L a *att*R. Například sekvence *att*B se může zavést první prostřednictvím homologní rekombinace ve známém dobře charakterizovaném genomovém lokusu buňky. Následně vektor nesoucí *att*P se může

16.04.02

začlenit do uvedené genomové sekvence *attB* prostřednictvím intermolekulární rekombinace. V této metodě se preferuje exprese mutantního genu integrázy Int-h/218, který se nachází na druhém vektoru DNA, který je společně transfekován. Další sekvence se nacházejí na vektoru, který nese *attP*, například gen pro určitý markerový protein lemovaný sekvencemi *loxP/FRT*. Použitím tohoto přístupu je možné dosáhnout, že například v porovnávací expresívní analýze různých genů v buněčném typu nejsou ovlivněny pozitivními nebo negativními vlivy genomového integračního lokusu.

Aby se provedla metoda podle vynálezu integráza musí působit na rekombinantní sekvence. Integráza nebo gen integrázy a/nebo faktor Xis nebo gen faktoru Xis může být přítomen v eukaryontní buňce už před zavedením první a druhé sekvence DNA. Geny rekombináz se mohou také zavést mezi zavedením první a druhé sekvence DNA nebo po zavedení první a druhé sekvence DNA. Integráza používaná při sekvenčně specifické rekombinaci je přednostně exprimována v buňce, ve které se provádí reakce. Z tohoto důvodu třetí sekvence DNA obsahující integrázový gen se zavedla do buněk. Jestliže se provádí sekvenčně specifická rekombinace se sekvencemi *attL/attR* může se dále do buněk zavést gen faktoru Xis (čtvrtá sekvence DNA). Nejvíce preferovaný je způsob, kde třetí a/nebo čtvrtá sekvence DNA se začlenila do eukaryontního genomu buňky prostřednictvím homologní rekombinace nebo náhodně. Dále preferovaná je metoda, kde třetí a/nebo čtvrtá sekvence DNA obsahuje regulační sekvence, které umožňují prostorovou a/nebo dočasnou expresi integrázového genu a/nebo genu faktoru Xis.

V tomto případě prostorová exprese znamená, že rekombináza a faktor Xis se exprimuje pouze v určitém typu buňky, přičemž se použijí buněčně specifické promotory a katalyzují rekombinaci pouze v těchto buňkách, například v jaterních buňkách, ledvinových buňkách, v buňkách nervů nebo v buňkách

16.04.02

imunitního systému. Při regulaci exprese integráza/faktor Xis se může dosáhnout dočasné exprese tím, že se aktivují promotory v určitém stádiu vývoje nebo u dospělého organizmu v určitém časovém okamžiku. Dále dočasné exprese je možné dosáhnout použitím indukovatelných promotorů, například promotory závislými na interferonu a tetracyklinu (popisuje se v publikaci Muller, U. (1999) Mech. Develop., 82, pp. 3).

Integráza používaná způsobem podle vynálezu může být divokého typu a modifikovaná integráza bakteriofága *lambda*. Integráza divokého typu je pouze schopna uskutečnit rekombinační reakci s ko-faktorem, jmenovitě s IHF, přičemž se preferuje použití modifikované integrázy způsobem podle vynálezu. Jestliže se použije integráza divokého typu při způsobu podle vynálezu, je navíc nutná při průběhu rekombinační reakce IHF. Upravená integráza se modifikuje tak, že uvedená integráza může provést rekombinační reakci bez IHF. Vytvoření upravených polypetidů a testování požadované aktivity je obsahem stavu techniky a může se jednoduše provést (popisuje se v publikaci Erlich, H. (1989) PCR Technology, Stockton Press. Dva mutanti Int jsou výhodné integrázy bakteriofágu *lambda* označené jako Int-h a Int-h/218 (popisuje se v ublikaci Miller et al., (1980) Cell, 20, pp. 721, Christ, N. and Droge, P. (1999) J. Mol. Biol., 288, pp. 825. Int-h zahrnuje lyzinový zbytek místo glutamátového zbytku v poloze 174 ve srovnání s Int divokého typu. Rekombináza Int-h/218 zahrnuje další lyzinový zbytek místo glutamátového zbytku v poloze 218 a vytvořil se mutagenezí PCR genu Int-h. Uvedení mutanti mohou katalyzovat rekombinaci mezi sekvencemi *attB*/*attP* stejně jako mezi *attL*/*attR* bez ko-faktoru IHF, Xis a negativní super-helix v mikroorganizmu *E. coli* a *in vitro*, to je s čištěnými substráty v reakční zkumavce. V eukaryontních buňkách mutanti potřebují pouze ko-faktor Xis pro rekombinaci mezi *attL*/*attR*. Další zlepšení účinnosti rekombinace mezi *attL*/*attR* se může dosáhnout dalším ko-faktorem, například FIS.

Výhodný je mutantní Int-h/218, protože tento mutant může katalyzovat integrační reakci nezávislou na ko-faktoru se zvýšenou účinností (popisuje se v publikaci Christ, N. and Droge, P (1999) J. Mol. Biol., 288, pp. 825).

Způsob podle vynálezu se může provést ve všech eukaryontních buňkách. Buňky mohou být přítomny například v buněčné kultuře a obsahují všechny typy rostlinných a zvířecích buněk. Příkladem buněk mohou být oocyty, embryogenní kmenové buňky, hematopoietické kmenové buňky nebo libovolný typ diferenciovaných buněk. Preferuje se způsob, kde eukaryontní buňka je savčí buňka. Výhodnější je metoda, kde savčí buňka je lidská buňka, opičí buňka, myšší buňka, krysí buňka, králičí buňka, buňka křečka, kozí buňka, bovinní buňka, ovčí nebo prasečí buňka.

Preferované provedení vynálezu popisuje způsob, kde se uskutečnila druhá sekvenčně specifická rekombinace DNA integrázou bakteriofága *lambda* a faktorem Xis. Druhá rekombinace potřebuje sekvence *att*L a *att*R vytvořené první rekombinací sekvencí *att*B a *att*P nebo jeho deriváty. Proto druhá sekvenčně specifická rekombinace je omezena způsobem použitým při první sekvenčně specifické rekombinaci sekvencí *att*B a *att*P nebo jejích derivátů. Mutanti divokého typu a Int mohou také katalyzovat tzv. integrační rekombinaci bez přidání dalších faktorů, to znamená, že rekombinují sekvence *att*B a *att*P a nikoli sekvence *attL* s *att*R, jestliže se stabilně integrují do genomu buněk. Integráza divokého typu nutná pro tzv. excizní rekombinaci faktorů IHF, Xis a negativního super vinutí. Mutanti integrázy Int Int-h a Int-h/28 potřebují pro excizní rekombinaci pouze faktor Xis. Je možné provést dvě rekombinační reakce jednu po druhé řízeným způsobem, jestliže v buňce jsou přítomny další faktory pro druhou rekombinační reakci. Spolu s jinými už užívanými rekombinačními systémy se může vyvinout nová strategie pro řízenou manipulaci vyšších

16.04.02

může vyvinout nová strategie pro řízenou manipulaci vyšších eukaryontních genomů. To je možné, protože různé rekombinační systémy používají pouze jejich vlastní rekombinantní sekvence.

Například systém Int se může použít při integraci sekvencí *loxP* a/nebo *FRT* cíleným způsobem do genomového lokusu eukaryontního genomu a do aktivního a neaktivního genu, kdy pak následuje řízená exprese Cre a/nebo Flp. Systém Int se může dále použít při deleci sekvencí *loxP/FRT* z genomu po použití, to je rekombinace pomocí rekombinázy.

Dále se preferuje způsob, kde je do buněk zavedena další sekvence DNA obsahující gen faktoru Xis. Nejvíce se preferuje způsob, kde další sekvence DNA dále obsahují regulační sekvenci DNA, které zvyšují prostorovou a/nebo dočasnou expresi genu faktoru Xis.

Po úspěšné integrační intramolekulární rekombinaci (inverzi) pomocí rekombinázy Int vedoucí k aktivaci/deaktivaci genu v určitém buněčném typu se může uvedený gen opět později deaktivovat nebo aktivovat pomocí vyvolané prostorové a/nebo dočasné exprese Xis se současnou expresí Int.

Dále se vynález týká použití sekvence *att*B podle SEQ ID NO: 1 nebo jejího derivátu a sekvence *att*P podle SEQ ID NO: 2 nebo jejího derivátu nebo sekvence *att*L podle SEQ ID NO: 3 nebo jejího derivátu a sekvence *att*R podle SEQ ID NO: 4 nebo jejího derivátu v sekvenčně specifické rekombinaci DNA v eukaryontních buňkách. Eukaryontní buňka může být přítomna v buněčném agregátu organizmu, například savce, který ve své buňce neobsahuje žádnou integrázu nebo faktor Xis. Uvedený organizmus se může použít pro šlechtění s jinými organizmy, které mají ve svých buňkách integrázu nebo faktor Xis tak, že se vytvoří potomstvo, kde sekvenčně specifická rekombinace se uskuteční v buňkách potomků. Vynález také popisuje použití integrázy nebo genu integrázy a faktoru Xis nebo genu fakotru

16.04.02

Xis při sekvenčně specifické rekombinaci v eukaryontních buňkách.

Dále se identifikovala sekvence v lidském genomu (zde označená jako *att*H), která vykazuje homologii 85 % se sekvencí *att*B. Sekvence *att*H se může použít jako rekombinantní sekvence v případě integrace cizorodé DNA do lidského genomu. Proto druhá rekombinační sekvence *att*P se může upravit tak, že integráza může provést rekombinační reakci s vysokou účinností. Je možné demonstrovat, že sekvence *att*H se může rekombinovat s verzí sekvence *att*P upravenou člověkem, která je zde označena jako sekvence *att*P* a je znázorněna jako SEQ ID NO: 5 pomocí Int-h v mikroorganizmu *E. coli*. Experimenty s lidskými buňkami demonstrovaly, že *att*H se rekombinuje se sekvencí *att*P* také jako část lidského genomu, jestliže se rekombináza Int-h dočasně syntetizuje uvedenými buňkami.

Tato skutečnost umožňuje, že cizorodá kruhová DNA, která má rekombinantní sekvenci může být stabilně začleněná do přirozeně se vyskytujícího lokusu *att*H lidského genomu cíleným způsobem. Sekvence *att*H je pouze jedním příkladem rekombinantní sekvence, která se přirozeně vyskytuje v lidském genomu. Další sekvence se mohou identifikovat v projektu lidského genomu, které vykazují homologii se sekvencí *att*B a mohou se použít při integraci cizorodé DNA do lidského genomu. Odpovídající rekombinantní sekvence attP v cizorodé kruhové DNA se vybrala v závislosti na přítomnosti uvedené sekvence v lidském genomu a její homologii se sekvencí *att*B. Výhodná je cizorodá kruhová DNA zahrnující sekvenci nukleové kyseliny přirozeně se vyskytující sekvence *att*P. Více se preferuje derivát přirozeně se vyskytující sekvence *att*P, který obsahuje maximálně šest, s výhodou jednu až pět, zvláště tři substituce. Nejvýhodnější je cizorodá cirkulární DNA

obsahující sekvenci nukleové kyseliny *attP** podle SEQ ID NO: 5, která vykazuje přibližnou 95 % homologii se sekvencí *attP*.

Integráze se může zavést do buněk buď jako polypeptid nebo prostřednictvím expresívního vektoru. Gen integrázy může být dále přítomen jako exprimovatelná sekvence nukleové kyseliny na molekule DNA, která obsahuje upravenou nebo přirozenou sekvenci *attP* nebo sekvenci *attP**.

Cizorodá kruhová DNA zahrnující přirozenou sekvenci *attP* nebo její derivát nebo homolog, zvláště sekvenci *attP** podle SEQ ID NO: 5 obsahuje také terapeutický gen nebo genový fragment, který se zavede do genomu. Terapeutické geny mohou být například gen CFTR, gen ADA, gen receptoru LDL, gen β-globinu, gen faktoru VIII nebo IX, gen alfa-1-antitrypsinu nebo gen dystropinu. Cizorodou kruhovou DNA může být například virový vektor, který se už použil v somatické genové terapii. Vektor může být také buněčně specifický tak, že pouze transfekuje tyto buňky, které jsou nutné pro genovou terapii, například buňky plicního epitelu, kmenové buňky kostní dřeně, T lymfocyty, B lymfocyty, buňky jater, buňky ledvin, nervové buňky, buňky kosterních svalů, hematopoietické kmenové buňky nebo fibroblasty. Odborníkovi je zřejmé, že tento výčet je pouze výběr terapeutických genů a cílových buněk a jiné geny a cílové buňky se mohou také použít při genové terapii. Genové fragmenty obsahují například delece terapeutických genů, jednotlivé exony, antisense sekvence nukleové kyseliny nebo ribozymy. Genové fragmenty mohou obsahovat segmenty genu, který zahrnuje trinukleotidové repetice genu, například gen syndromu lámavosti X.

IHF musí být přítomen, jestliže se při rekombinaci používá integráza divokého typu. Preferuje se použití upravené intagrázy, kde může dojít k rekombinaci bez přítomnosti IHF. Zvláště se preferuje použití rekombinázy Int-h nebo Int-h/218.

18.04.02

Vynález dále popisuje přirozeně se vyskytující sekvenci *attP* nebo její derivát nebo homolog. Vynález zvláště popisuje sekvenci *attP** nukleové kyseliny podle SEQ ID NO: 5. Dále vynález popisuje vektor obsahující přirozeně se vyskytující sekvenci *attP* nebo její derivát, zvláště sekvenci nukleové kyseliny *attP** podle sekvence SEQ ID NO: 5 a dále sekvenci nukleové kyseliny obsahující terapeutický gen nebo fragment genu. Výhodný je vektor, kde terapeutický gen obsahuje gen CFTR, ADA, gen receptoru LDL, gen alfa-globinu nebo beta-globinu, gen alfa-1-antitrypsinu, faktor VIII nebo faktor IX nebo jeho fragment. Vektor může obsahovat regulační elementy DNA, které regulují expresi terapeutického genu nebo genového fragmentu.

Dále vynález popisuje použití vektoru jako léčebného prostředku v lidské nebo veterinární medicíně. Dále vynález popisuje použití vektoru pro výrobu léčivého prostředku pro somatickou genovou terapii.

Vektory podle vynálezu mohou být aplikovány například intravenózní nebo intramuskulární injekcí. Vektory se mohou také aplikovat aerosoly. Další aplikace je odborníkovi zřejmá.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek č. 1 zobrazuje schéma rekombinantních reakcí, jmenovitě integraci a excizi katalyzovanou integrázou Int. Je zobrazena superhelikální plazmidová DNA nesoucí kopii rekombinatní sekvence *attP*. Sekvence *attP* obsahuje pět tzv. vazebných míst pro ramena rekombinázy Int (P1, P2, P1´, P2´, P3´), dvě vazební místa pro jádro rekombinázy Int (C a C´, označeno černou šipkou), tři vazebná místa pro IHF (H1, H2, H´), dvě vazebná místa pro Xis (X1, X2) a tzv. oblasti přesahu (vyznačeno prázdnými obdélníky), kde dochází k výměně

16.04.02

současného řetězce DNA. Partnerská sekvence v případě *attP, attB* je zobrazena na lineárním segmentu DNA a obsahuje dvě vazebná mísa pro jádro rekombinázy Int (B a B´, označeno otevřenou šipkou) a oblast přesahu. V případě rekombinace mezi *attB* a *attP* jsou nezbytné rekombinázy Int a IHF, což vede k začlenění plazmidu do segmentu DNA, který nese *att*B. Vytvořily se dvě nové hybridní rekombinantní sekvence *att*L *a att*R a slouží jako cílové sekvence při excizi. Tato reakce vyžaduje rekombinázu Int a IHF a dále kofaktor Xis kódovaný fágem *lambda*.

Obrázek č. 2A zobrazuje schéma integrázového expresívního vektoru a obrázek č. 2B zobrazuje schéma westernovy analýzy. (A) Vektor pKEXInt zahrnuje gen integrázy divokého typu, vektor pKEXInt-h zahrnuje gen mutantu Int-h a vektor pKEXInt-h/218 zahrnuje gen mutantu Int-h/218. Kontrolní vektor (pKEX) nezahrnuje gen Int. Geny integrázy divokého typu (Int) a dva mutanti (Int-h a Int-h/218) jsou zobrazeny jako šedé obdelníky. Dále jsou přítomny signální sekvence kódujících oblastí určené pro zpracování RNA, které by měly garantovat zvýšenou vnitrobuněčnou stabilitu mRNA (znázorněno tečkovanými obdelníky) a jsou označeny jako SV40, t-Ag sestřih a signály polyA. Exprese integrázových genů se děje pomocí promotoru cytomegaloviru (CMV). (B) Po zavedení vektoru, jak je zobrazeno, do reportních buněčných linií B2 a B3, se připravily buněčné lyzáty a separovaly se proteiny podle jejich molekulární hmotnosti na SDS page. Přítomnost proteinu Int-h se zviditelnila polyklonálními myšími protilátkami proti rekombináze divokého typu Int (dráhy 2 a 4). Poloha rekombinázy Int na gelu je označena šipkou.

Obrázek č. 3 zobrazuje schéma substrátových vektorů. (A) Vektor pGFP*attP*/*attP*. Znázorněný je vektor linearizovaný restrikčním enzymem ApaLI. Velká černá šipka označuje polohu a orientaci dvou rekombinanntích sekvencí *att*B a *att*P, které

16.04.02

lemují gen GFP (zelený fluorescenční protein), jenž je umístěn v opačné orientaci vzhledem k promotoru CMV. PA označuje signál polyA. Do vektoru se dále zavedl gen neo nesoucí rezistenci, který se exprimuje pomocí promotoru viru SV40 a umožňuje selekci stabilních reportních buněčných linií. Také jsou označeny místa, která rozeznává restrikční enzym NcoI. Integrační rekombinace mezi sekvencemi *attB* a *attP* vede k inverzi genu GFP a tak k jeho expresi. Malá prázdná a vyplněná šipka označuje polohu a orientaci jednotlivých primerů PCR a jsou označeny jako p1 až p7. (B) vektor pGFP*attL*/*attR*. Vektor je shodný s pGFP*attB*/*attP*, zahrnuje však *attL* a *attR* místo *attB* a *attP*. Gen GFP vykazuje orientaci 3´-5´vztaženo na promotor CMV. Šrafovaný rámeček označuje polohu sondy, která se použila při Southernově analýze.

Obrázek č. 4 A až D znázorňuje schéma detekce integrační rekombinace v reportních buněčných linií způsobem PCR po separaci molekul DNA v agarózových gelech (1,2 % hmotnost/objem), kde se DNA zviditelnila barvením v ethidiumbromidu. (A) Reverzní transkriptáza PCR (RT-PCR). Vektory pKEX a pKEXInt-h (obrázek č. 2A) se odděleně zavedly do reportní buněčné linie B1 až B3 elektroporací. Průběh RT-PCR analýzy z izolované mRNA polyA vykazuje očekávaný produkt s párem primerů p3/p4 (obrázek č. 3), pouze v případě, kdy se buňky ošetřily pKEXInt-h (dráha 1, 3 a 5). Gen β-aktinu ze stejné RNA se amplifikoval jako kontrola obsahu RNA. Dráha M: marker DNA, dráha 0: kontrola RT-PCR bez templátu RNA, (B, C) Genomová PCR analýza. Z buněčných linií se 72 hodin po elektroporaci izolovala genomová DNA a amplifikovala se páry primerů p3/p4 (obrázek č. 3) a p1/p2 (obrázek č. 3). Číslování a označení linií odpovídají obrázku č. 4A. (D) Deleční test. Izolovaná genomová DNA se amplifikovala použitím páru primerů p5/p6 (obrázek č. 3). Poloha produktu PCR (o velikosti 420

16.04.02

bp), která se očekávala po deleci místo inverze je označena šipkou. Číslování a označení drah odpovídá obrázku 4A.

Obrázek č. 5A a B zobrazují schéma detekce inverze v reportních buněčných liniích pomocí PCR a Southernovy hybridizace po separaci molekul DNA v agarózovém gelu (1,2 % hmotnost/objem). (A) Analýza PCR. Frakce genomové DNA, která se izolovala z buněčných linií B1, B2, B3 a BL60, které se ošetřily vektory pKEX a pKEXInt-h, se amplifikovaly pomocí párů primerů p3/p4 a p5/p7 (obrázek č. 3). Produkty PCR jdoucí zpět k inverzi genu GFP katalyzovaného integrázou se zviditelnily v drahách 1, 3 a 5. V dráze M se nachází marker velikosti DNA fragmentů, v dráze O je kontrala reakce PCR bez genomové DNA. (B) Southernova analýza: Zbytek frakce analyzované DNA zobrazený na obrázku č. 5A se inkuboval s restrikčním enzymem NcoI, který se separoval elektroforézou na agarózovém gelu na základě jeho molekulové hmotnosti a postupně se přenesl na nitrocelulózovou membránu. GFP nesoucí fragmenty DNA se zviditelnily použitím radioaktivně značené sondy (obrázek č. 3B), aby se detekovala rekombinace. V dráze 9 se nachází nerekombinovaný pGFP*attB*/*attP*, v dráze 10 se nachází pGF/*attB*/*attP*.

Na obrázku č. 6 jsou zobrazeny sekvence nukleové kyseliny obsahující *attB* a *attH*. Obrázek č. 6B zobrazuje částečné sekvence *attP* a *attP**. (A) Porovnání sekvencí *attB* a *attH*. Vazebná místa jádra rekombinázy Int B a B´v sekvenci *attB* jsou značeny čárkou nad sekvencí. Vazebná místa jádra rekombinázy Int H a H´v sekvenci *attH* jsou značeny nad sekvencí čárkou. Přesahující sekvence jsou charakterizovány prázdnými obdelníky. Rozdíly v sekvencích jsou značeny dvojitými svislými čarami. Číslování zbytků v jádru a oblastí přesahu se vztahují k centru přesahu označeného O a definovaného v publikaci Landy and Ross (1977), Science, 197, pp. 1147). Sekvence od polohy -9 do +11 je *attB* a *attH*. (B) Porovnání

16.04.02

sekvencí mezi částečnými sekvencemi *attP* a *attP**, což odpovídá sekvencím *attB* a *attH*. Značky jsou používány jako na obrázku 6A.

Na obrázku č. 7 je schématicky znázorněna rekombinace mezi sekvencemi *attH* a *attP** na vektoru pACH v mikroorganizmu *E. coli* po separaci elektroforézou na agarózovém gelu. Substrátový vektor pACH se společně transformoval prokaryontními expresívními vektory vhodnými pro Int, Int-h nebo Int-h/218 do mikroorganizmu *E. coli* kmen CSH26 nebo CSH26 delta IHF. Plazmidová DNA se izolovala 36 hodin po selekci, inkubovala se s restrikčními enzymy HindIII a AvaI, separovala se a zviditelnila elektroforézou na agarózovém gelu. Poloha restikčních fragmentů vytvořená inverzí se označila jako „invers". Poloha DNA, která nemusí rekombinovat, se označila jako pACH. V drahách 1 a 12 jsou markery velikosti DNA, v drahách 2 a 3 je expresívní vektor a DNA nerekombinovaného pACH. V drahách 4 až 7 je DNA izolovaná z CSH26. V dráze 8 až 11 je DNA izolovaná z CSH delta IHF.

Na obrázku č. 8 je znázorněno schéma strategie integrace vektoru pEL13 do genomového lokusu *attH* a princip detekční metody. Integrační vektor pEL13 nese gen rezistence (označený šipkou s „hygr"), gen pro Int-h (označený šipkou s „int h") řízeného promotorem CMV a kopii sekvence *attP** (prázdné čtverce s „attP*/P*OP*´"). Int-h se exprimuje po zavedení do vektoru do buněk BL60 elektroporací (obrázek č. 2B). Následně rekombinace katalyzuje intermolekulární rekombinaci mezi sekvencí *attP** a chromozomální *attP* (šrafovaný obdelník označený s att"H/OH´") vedoucí k začlenění vektoru pEL13 do genomu buněk BL60. Buňky, které se stabilně začlenily do vektoru se mohou vybrat a identifikovat pomocí PCR s párem primerů *attX1/B2* (šipky označené „*attX1*" a „B2"). EcoRV a SphI označují místa, která rozeznávají příslušné restrikční enzymy.

Obrázek č. 9 znázorňuje schéma detekce intermolekulární rekombinace mezi *attP** (pEL13) a *attH* v buňkách BL60. Genomová DNA se izolovala a amplifikovala pomocí páru primerů attX1/B2 (obrázek č. 8) z 31 různých buněčných populací po elektroporaci pEL13 a následné selekci trvající několik týdnů. Produkty PCR se separovaly a zviditelnily se elektroforézou na agarózovém gelu. Poloha očekávaného produktu (295 bp) je označena v gelech šipkou. Následně se produkty analyzovaly sekvenováním DNA. Na pravé straně se nachází marker velikosti DNA.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Produkce expresívních a substrátových vektorů

Expresívní vektory

Eukaryontní expresívní vektory vhodné pro integrázu Int divokého typu (pKEXInt), Int-h (pKEXInt-h), Int-h/218 (pKEXInt-h/218) a pEL13 jsou deriváty pKEX-2-XR (popisuje se v publikaci Rittner et al., (1991), Methods Mol. Cell. Biol., 2, pp. 176). Uvedený vektor zahrnuje lidský cytomegalovirový promotor/zesilovací element (CMV) a RNA sestřih a elementy polyadenylačního signálu opičího viru 40 (SV40) Geny integrázy Int se klonovaly PCR s následujícími primery

(**3343**) 5´- GCTCTAGACCACCATGGGAAGAAGGCGAAGTCA-3´

lokalizovaným na 5´konci genu integrázy Int a

(**3289**) 5´-AAGGAAAGCGGCCGCTCATTATTTGATTTCAATTTTGTCC- 3´

lokalizovaném na 3´ konci. Amplifikace se provedla po první denaturaci při teplotě 95 °C po dobu 4 minut v 30 cyklech denaturace (teplota 95 °C, po dobu 45 vteřin), navázání primerů proběhlo při teplotě 55 °C po dobu 45 vteřin, syntéza DNA proběhla při teplotě 72 °C po dobu 2 minut a konečný krok syntézy trval 4 minuty při teplotě 72 °C. Výsledný fragment PCR se klonoval do vektoru pKEX-2-XR pomocí XbaI a NotI.

16.04.02

Mutant Int-h se vytvořil z vektoru pHN16, jako templát (popisuje se v publikaci Lange-Gustafson, B. and Nash, H. (1989), J. Biol. Chem., 259, pp 12724). Integráza Int divokého typu a Int-h/218 se vytvořila z pTrcInt a pTrcInt-h/218 jako templát (popisuje se v publikaci Christ, N. and Droge, P. (1999) J. Mol. Biol., 288, pp. 825). pEL13 nese navíc vedle genu Int-h kopii sekvence *attP**.

Pomocí PCR mutageneze se ze sekvence *attP* zkonstruovala sekvence *attP**. Použily se následující oligonukleotidy:

(**O3**) 5´-GTTCAGCTTTTTGATACTAAGTTG-3´,

(**O4**) 5´-CAACTTAGTATCAAAAAGCTGAAC-3´,

(**PC**) 5´-TTGATAGCTCTTCCGCTTTCTGTTACAGGTCACTAATACC-3´

(**PD**) 5´-ACGGTTGCTCTTCCAGCCAGGGAGTGGGACAAAATTGA-3´.

Amplifikace se provedla po prvním stupni denaturace při teplotě 95 °C po dobu 4 minut s 30 cykly denaturace (teplota 95 °C, po dobu 45 vteřin), navázání primerů proběhlo při teplotě 57 °C po dobu 1 minuty a 30 vteřin, syntéza DNA proběhla při teplotě 72 °C po dobu 1 minuty a 30 vteřin a konečná syntéza proběhla při teplotě 72 °C po dobu 4 minut. Produkt PCR se inkuboval s restrikčním enzymem SapI a ligoval se do pKEXInt-h, který se štěpil restrikčním enzymem SapI. Kontrolní plazmid pKEX nenese žádný gen integrázy Int.

2. Substrátové vektory

Substrátové vektory jdou deriváty pEGFP (Clontech). Rekombinantní kazety jsou řízeny promotorem CMV, což garantuje silnou konstitutivní expresi. pGFP*attB*/*attP* se zkonstruoval vystřižením genu GFP (zelený fluorescenční protein) z pEGFP pomocí restrikčního enzymu AgeI a BamHI. Sekvence *attB* divokého typu se začlenila jako dvouřetězcový oligonukleotid do vektoru štěpeného restrikčním enzymem AgeI za použití následujících oligonukleotidů:

16.04.02

(B1OB) 5′-CCGGTTGAAGCCTGCTTTTTTATACTAACTTGAGCGAACGC-3

(BOB1) 5′-AATTGCGTTCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCAGGCTTCAA-3′.

Sekvence *attP* divokého typu se amplifikovala pomocí PCR z vektoru pAB3 (Droge, P. and Cozzarelli, N. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci., 86, pp. 6062) použitím následujících primerů:

(p7) 5′-TCCCCCCGGGAGGGAGTGGGACAAAATTGA-3′

(p6) 5′-GGGGATCCTCTGTTACAGGTCACTAATAC-3′.

Amplifikace se provedla po první kroku denaturace při teplotě 95 °C po dobu 4 minuty s 30 cykly denaturace (teplota 95 °C, 45 vteřin), navázání primerů probíhá při teplotě 54 °C po dobu 30 vteřin), syntéza DNA probíhá při teplotě 72 °C po dobu 32 vteřin) a konečný krok syntézy trvá po dobu 4 minut při teplotě 72 °C. Fragment PCR nesoucí sekvenci *attP* se štěpil restrikčním enzymem XmaI a BamHI a ligoval se s restrikčním fragmentem, který nese gen GFP. Uvedený restrikční fragment GFP se generoval z pEGFP restrikčními enzymy AgeI a EcoRI. Ligační produkt se klonoval do vektoru, který nese sekvenci *attB*, štěpeného MfeI/BamHI. Výsledný substrátový vektor nese gen GFP v opačné orientaci s ohledem na promotor CMV, jeho funkčnost při integrační rekombinaci se testovala Int divokého typu v mikroorganizmu *E. coli*.

S výjimkou rekombinantních sekvencí pGFP*attL*/*attR* je shodný s pGFP*attB*/*attP*. Vektor se konstruoval tak, že se nejdříve rekombinuje pGFP*attB*/*attP* v mikroorganizmu *E. coli*, což vede k vytvoření sekvence *attL* a *attR*. Následně s ohledem na promotor CMV se vystřihl správně orientovaný gen GFP s částečnou restrikční reakcí s enzymy BsiEI a HindIII. Gen GFP se nejdříve celý amplifikoval PCR použitím následujících primerů, aby se začlenil v opačné orientaci s ohledem na promotor CMV.

16.04.02

(**p2**) 5′-AATCCGCGGTCGGAGCTCGAGATCTGAGTCC-3′

(**p3**) 5′- AATCCCAAGCTTCCACCATGGTGAGCAAGGG-3′ (obrázek č. 3).

Amplifikace se provedla po prvním denaturačním kroku při teplotě 95 °C (po dobu 4 minuty) s 30 cykly denaturace (teplota 95 °C, po dobu 45 vteřin), navázání primerů proběhlo při teplotě 56 °C po dobu 45 vteřin a syntéza DNA se provedla při teplotě 72 °C po dobu 1 minuty a konečný krok syntézy se provedl při teplotě 72 °C po dobu 4 minuty. Fragment PCR se štěpil restrikčním enzymem HindIII a následně BsiEI a integroval se do částečně štěpeného vektoru, který zahrnuje sekvenci *att*L a *att*R v opačné orientaci. Tak pGFP*att*L/*att*R ukazuje stejnou globální strukturu jako pGFP*att*B/*att*P s výjimkou přítomnosti *att*L/*att*R místo *att*B/*att*P.

Lidský homolog *att*B *att*H se amplifikoval z čištěné lidské DNA použitím PCR s následujícími primery:

(**B3**) 5′-GCTCTAGATTAGCAGAAATTCTTTTTG-3′

(**B2**) 5′-AACTGCAGTAAAAAGCATGCTCATCACCCC-3′.

Amplifikace se provedla pro prvním kroku denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 minut ve 30 cyklech denaturace, která probíhá při teplotě 95°C po dobu 45 vteřin, navázání primerů probíhá při teplotě 42 °C po dobu 1,45 minut, syntéza DNA probíhá při teplotě 72 po dobu 1,45 minuty a konečná syntéza probíhá po dobu 10 minut při teplotě 72 °C. Primerové sekvence vhodné pro přípravu sekvence *att*H se vybraly z EST (přístupové číslo N31218, EMBL-databáze). Neúplná sekvence *att*H přítomná v databázi se ověřila a doplnila sekvenací izolovaného produktu PCR (192 bp). Následně se fragment štěpil retrykčním enzymem XbaI a PstI a začlenil se do stejným způsobem upraveného vektoru pACYC187 (získaného z instituce New England Biolabs). Sekvence *Att*P* se vytvořila cílenou mutagenezí, jak se popisuje v publikaci Christ, N. and Droge, P. (1999) J.

16.04.02

Mol. Biol., 288, pp 825) a začlenila se do vektoru, který nese sekvenci *att*H v opačné orientaci ve srovnání s *att*H. Na základě této konstrukce vzniká testovací vektor pACH.

Z mikroorganizmu *E. coli* kmene DH5α se izolovala plazmidová DNA (popisuje se v publikaci Hanahen, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, pp. 557) afinitní chromatografií (Qiagen, Německo). Expresívní a substrátové vektory stejně jako konstrukce vytvořené PCR se kontrolovaly na základě fluorescence pomocí 373A DNA-sekvenační systém (Applied Biosystems). Reakce PCR se provedly pomocí sady „Master Mix Kit" a výsledné produkty se analyzovaly elektroforézou na agarózovém gelu (0,8 % (hmotnost/objem) v pufru TBE.

Příklad 2: Buněčná kultura a konstrukce reportních buněčných linií

Dočasná exprese a rekombinantní analýzy se provedly s lidskou buněčnou linií Burkitova lymfomu (BL60, popisuje se v publikaci Wolf, J. et al., (1990) Cancer Res., 50, pp. 3095)). Buňky BL60 se kultivovaly v kultivačním médiu RPMI 1640 (od firmy Life Technologies, Inc.) obohacené 10 % fetálním telecím sérem a zahrnují 2 mM L-glutamin, streptomycin (0,1 mg/ml) a penicilin (100 jednotek/ml).

Reportní buněčné linie BL60 s pGFP*att*B/*att*P nebo pGFP*att*L/*att*R stabilně integrované do genomu se zkonstruovaly následujícím způsobem: přibližně 20 μg každého vektoru se linearizovalo restrikčním enzymem ApaLI a čistil se extrakcí směsí fenol/chloroform, sráželo se ethanolem a zavedlo se do buněk v přibližném počtu 2 x 10^7 elektroporací při 260 V a 960 mF za použití zařízení „Bio-Rad Gene Pulser". Stabilní buněčné linie se vybraly pomocí G418/Genetizin (300 μg/ml) a následně se charakterizovaly PCR, sekvenováním DNA a Southernovou analýzou.

16.04.02

Příklad 3: Rekombinační analýza *in vivo*

Aby se provedla intramolekulární rekombinace *in vivo* přibližně 2 x 10^7 buněk reportní buněčné linie BL 60 se transfekovalo 40 μg každého kruhového expresívního vektoru elektroporací, jak se popisuje v příkladu 2. Buňky se sklízely po 72 hodinách centrifugací a genomová DNA z poloviční množství buněk se izolovala afinitní chromatografií podle instrukcí výrobce (Qiaamp Blood Kit, Qiagen, Německo). Z poloviční množství buněk se izolovala RNA (Rneisy kit, Qiagen, Německo) nebo se připravil buněčný lyzát westernovou analýzou (příklad 4).

Rekombinační analýza s vektorem pACH se provedla v mikroorganizmu *E. coli*, jak se popisuje shora v textu (popisuje se v publikaci Christ and Droge, P. (1999) J. Mol. Biol. 288, pp. 825) použitím rekombináz Int, Int-h a Int-h/218. Očekávaná rekombinace pACH vede k inverzi a prokázala se restrikční analýzou restrikčními enzymy HindIII a AvaI.

Intermolekulární rekombinace při integraci pEL13 do genomu lokalizovaném na lokusu *attH* buněk BL60 se provedla následujícím způsobem: 2x10^7 buněk se transfekovalo 20 μg kruhového pEL13 pomocí elektroporace, jak se popisuje shora v textu. Buňky se nanesly na plotny v koncentraci 1x10^6 buněk/ml v selekčním médiu (200 μg/ml hygromycinu B) po 48 hodinách a inkubace probíhala po dobu 6 až 8 týdnů. Z části buněčné populace, která přežila se po inkubaci podle instrukcí výrobce připravila genomová DNA (Qiaamp Blood Kit, Qiagen, Německo).

16.04.02

Aby se zlepšila intramolekulární, integrační a excizní rekombinace 0,4 μg genomové DNA se amplifikovalo pomocí PCR za použití 20 až 50 pmol následujícího primerů:

(**p1**) 5′-GGCAAACCGGTTGAAGCCTGCTTTT-3′;

(**p2**) 5′-AATCCGCGGTCGGAGCTCGAGATCTGAGTCC-3′;

(**p3**) 5′-AATCCCAAGCTTCCACCATGGTGAGCAAGGG-3′;

(**p4**) 5′-AACCTCTACAAATGTGGTATGG-3′,

(**p5**) 5′-TACCATGGTGATGCGGTTTTG-3`;

(**p6**) 5′-GGGGATCCTCTGTTACAGGTCACTAATAC;

(**p7**) 5′-TCCCCCCGGGAGGGAGTGGGACAAAATTGA-3′.

Amplifikace se provedla po prvním kroku denaturace při teplotě 95 °C (po dobu 5 minut) při 30 cyklech denaturace (teplota 95 °C, po dobu 45 vteřin), pak proběhlo navázání primerů při teplotě 57 °C po dobu 45 vteřin a syntéza DNA při teplotě 72 °C po dobu 1,5 minuty a konečný krok syntézy proběhl při teplotě 72 °C po dobu 4 minuty.

Intermolekulární integrační rekombinace pEL13 se detekovala následujícím způsobem. Přibližně 400 ng genomové DNA izolované z přeživší buněčné populace se inkubovalo s následujícími oligonukleotidy, které se použily jako primery PCR:

(**attx1**) 5′-AGTAGGAATTCAGTTGATTCATAGTGACTGC-3′

(**B2**) 5′-AACTGCAGTAAAAAGCATGCTCATCACCCC-3′.

Amplifikace se provedla po prvním kroku denaturace při teplotě 95 °C (po dobu 4 minuty) při 30 cyklech denaturace (teplota 95 °C, po dobu 45 vteřin), pak proběhlo navázání primerů při teplotě 52 °C po dobu 45 vteřin a syntéza DNA při teplotě 72 °C po dobu 45 vteřin a konečný krok syntézy proběhl při teplotě 72 °C po dobu 4 minuty.

16.04.02

PCR s reverzní transkriptázou se provedla s izolovanou RNA v množství 4 μg. Nejdříve se syntetizovala cDNA použitím primerů oligo-dT podle instrukcí výrobce (použitím sady „First Strand Synthesis Kit", Pharmacia). Pak se čtvrtina uvedené cDNA použila jako templát pro následnou reakci PCR za použití primerů p3 a p4. Aby se testovala delece místo inverze, izolovaná genomová DNA se amplifikovala pomocí primerů p5 a p6. Transkripty beta aktinu se analyzovaly použitím uvedené cDNA pomocí primerů

(**AS**) 5′-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3′

(**S**) 5′-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3′.

Podmínky PCR byly stejné jako v případě použití primerů p1 až p7.

Southernova analýza se v podstatě provedla podle protokolu uvedeného v publikaci Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning (2 nd Edt.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Přibližně 10 μg genomové DNA se štěpilo na fragmenty pomocí restrikční endonukleázy NcoI a jednotlivé fragmenty se separovaly na elektroforézou na agarózovém gelu (0,8 % hmotnostní/objem) v pufru TBE a přes noc se převedly na nylonovou membránu. Sonda GFP určená pro detekci rekombinace se vytvořila pomocí PCR použitím primerů p2 a p3. Radioaktivní značení se provedlo použitím dATP a dCTP značeným ^{32}P podle instrukcí výrobce (Megaprime. Amersham).

Příklad 4: Westernova analýza

Buněčné lyzáty dočasně transfekovaných buněk se vytvořily povařením buněk v pufru vhodném pro sondu (New England Biolabs) po dobu 5 minut. Proteiny se separovaly v 12,5 % SDS polyakrylamidovém gelu podle jejich molekulové hmotnosti a přes noc se přenesly na nitrocelulózovou membránu (Immobilon P, Millipore). Membrána se ošetřila 1 % blokačním roztokem (BM Chemiluminiscence Western Blotting Kit, Boehringer Mannheim,

16.04.02

Německo) a inkubovala se s myšími monoklonálními protilátkami řízenými proti Int divokého typu v ředění 1 : 50 000 (protilátky od A. Landy, USA). Aby se zviditelnilo poloha integrázy v gelu použily se sekundární protilátky spojené s peroxidázou (BM Chemiluminiscence Western Blotting Kit, Boehringer Mannheim, Německo). Jako kontrola se použily extrakty buněk mikroorganizmu *E. coli* obsahující Int.

Příklad 5: Výsledky

1. Syntéza Int-h v buňkách BL60

Aby se testovalo, zda Int-h může katalyzovat rekombinaci v lidských buňkách, je nezbytné ukázat, že v uvedených buňkách se syntetizuje rekombináza. Proto se začlenil eukaryontní expresívní vektor pKEXInt-h nesoucí gen Int-h řízený promotorem CMV. Po zavedení pKEXInt-h do dvou různých reportních buněčných linií jmenovitě B2 a B3 se analýzou RT-PCR detekovaly úplné a správně modifikované transkripty. Buněčné lyzáty se zkoumaly westernovou analýzou 72 hodin po elektroporaci vektoru pKEXInt-h. Detekce rekombinázy se provedla myšími polyklonálními protilátkami určenými proti Int. divokého typu. Jako kontrola se do buněk zavedl vektor pKEX.

Výsledky ukazují, že protein, který vykazuje očekávanou molekulovou hmotnost je přítomen v buňkách ošetřených elektroporací s pKEXInt-h. Uvedený protein se nemohl detekovat, jestliže se použil vektor pKEX.

2. Integrační intramolekulární rekombinace v lidských buňkách katalyzovaná Int-h

Westernova analýzy demonstrovala, že protein Int-h se syntetizoval ze dvou reportních buněčných linií, přičemž se vycházelo z vektoru pKEXInt-h. Uvedené buňky obsahují

16.04.02

substrátový vektor pGFP*attB*/*attP*, jako cizorodou DNA začleněnou do jejich genomu. Dvě rekombinantní sekvence vhodné pro integrační rekombinaci, jmenovitě *attB* a *attP* se nacházejí ve vzájemně obrácené orientaci a lemují gen GFP. Samotná gen GFP se nachází v obrácené orientaci vůči promotoru CMV, který se nachází proti směru exprese sekvence *attB*. Rekombinace mezi sekvencemi *attB* a *attP* pomocí Int-h vede k inverzi genu GFP a tak k jeho expresi. Celkem se zkonstruovaly tři reportní buněčné linie (B1 až B3). Southernova analýza jejich genomové DNA ukázala, že několik kopií pGFP*attB*/*attP* jako přímé repetice se mohou začlenit do genomu B1 a B3, zatímco buněčná linie B2 obsahuje pouze jednu kopii. Začleněné sekvence se ověřily pomocí PCR a následnou sekvenací.

Za účelem testovat rekombinaci mezi sekvencemi *attB* a *attP* se do buněčných linií zavedly vektory pKEXInt-h a pKEX odděleně. Buňky se sklízely 72 hodin po elektroporaci, RNA se izolovala z části uvedených buněk a zkoumala se exprese GFP pomocí RT-PCR za použití páru primerů p3/p4. Uvedené primery se použily k amplifikaci 0,99 kb dlouhého fragmentu DNA, jestliže se gen GFP obrátil došlo k rekombinaci. Výsledky demonstrovaly, že produkt se detekoval ve všech třech buněčných linií. Jestliže vektor pKEX se zavedl do buněk nedetekoval se žádný produkt. Analýzy sekvence DNA izolovaného produktu PCR potvrdila, že se přepisovala kódující oblast genu GFP a že se v transkriptu detekovala sekvence *attR* místo *attP*. Jako kontrola množství RNA ve všech šesti buněčných linií stejně jako se úspěšně analyzoval pomocí PCR první řetězec DNA transkriptu beta-aktinu syntetizovaný reverzní transkriptázou. Výsledky ukázaly, že transkript byl přítomen většinou ve stejném množství.

Rekombinace se detekovala také přímým PCR genomové DNA. Výsledky demonstrovaly, že očekávané produkty se mohly detekovat pouze páry primerů p3/p4 (0,99 kb) a p1/p2 (0,92

16.04.02

kb), jestliže vektor pKEXInt-h se zavedl do buněk. Analýza uvedených produktů sekvenováním DNA potvrdila, že *attR* a *attL* jsou přítomny v genomu a že gen GFP má po rekombinaci opačnou orientaci. Tyto experimenty se opakovaly třikrát, přičemž rekombinace mezi *attB* a *attP* se detekovaly ve všech třech buněčných liniích pomocí RT-PCR a/nebo PCR. Detekce delece genu GFP pomocí PCR byla negativní párem primerů p5/p6. Amplifikovat se mohl pouze očekávaný fragment o velikosti 1,3 kb, který je začleněný ve vektoru.

Nesilnější signál, který ukazuje inverzi mezi sekvencemi *attB* a *attP*, se opakovaně získal pomocí PCR s buněčnou linií B3 v dalším experimentu. Jako výsledek se genomová DNA štěpila pomocí restrikčního enzymu NcoI a testovala se Southernovou analýzou, kdy se jako sonda použil gen GFP. Výsledky ukázaly, že restrikční fragment genomové DNA se detekoval v buněčné linii B3, která se očekávala jako výsledek inverze mezi *attB* a *attP*.

Aby se testovalo, zda Int divokého typu a mutant Int-h/218 mohl katalyzovat intramolekulární integrační rekombinaci, také vektory pKEXInt-h, pKEXInt-h/218 a jako kontrola pKEX se zavedly do reportní buněčné linie B3 elektroporací v dalším experimentu, jak se popisuje v příkladu 2. Genomová DNA se izolovala po 72 hodinách a testovala se rekombinace prostřednictvím PCR s páry primerů p5/p7 a p3/p4, jak se popisuje v příkladu 3. Výsledky ukázaly, že oba mutanti Int by mohly katalyzovat rekombinaci mezi *attB* a *attP*, avšak Int divokého typu není aktivní.

3. Excizní rekombinace mezi sekvencemi *attL* a *attR* nebyly detekovatelné

Protože Int-h by mohl katalyzovat také excizní rekombinaci mezi *attL* a *attR* v nepřítomnosti kofaktorů IHF a Xis tří reportních buněčných linií BL60, které mají stabilně

16.04.02

integrovaný vektor pGFP*attL*/*attR* do genomu. Uvedené buněčné linie zahrnují gen GFP obrácené orientaci s ohledem na promotor GMV sousedící se sekvencí *attL* a *attR* místo *attB* a *attP*. Rekombinační analýzy se provedly pomocí pKEXInt-h, jako expresívního vektoru v případě rekombinázy, jak se popisuje v příkladu 3. Demonstrovaly však, že mezi sekvencí *attL* a *attR* se pomocí RT-PCR nebo PCR nedetekovaly ani inverze ani delece.

4. Identifikace a charakterizace přirozeně se vyskytující nukleotidové sekvence v lidském genomu, která je podobná sekvenci *attB*

Mutanti rekombinázy Int katalyzují integrační intramolekulární rekombinaci v lidských buňkách, jak se demonstrovalo v příkladu 3. Jedna za dvou rekombinantních sekvencí, která se podílí na uvedené reakci, jmenovitě sekvence *attB*, je 21 bp dlouhá a tvoří přirozenou část genomu mikroorganizmu *E. coli*. Ukázalo se, že některé rozdíly v sekvenci, která se nazývá rozeznávaná oblast jádra sekvence *attB* jsou tolerovány rekombinázou Int-h v rekombinaci s *attP* (popisuje se v publikaci Nash (1981) Annu. Rev. Gent., 15, pp. 143). Ze statistického hlediska přítomnost funkčních sekvenčních homologů se sekvencí *attB* v lidském genomu. V databázi se může identifikovat stále neúplná sekvence, jako část exprimované sekvence tag (EST). Uvedená sekvence se pak izolovala pomocí PCR z lidské DNA a klonovala se. Analýza sekvence DNA doplnila sekvenci a dále Southernova analýza s genomovou DNA buněk BL60 demonstrovala, že uvedená sekvence je částí stále neznámého lidského genu v přítomnosti genomu jako genu s jednou kopií.

Uvedená sekvence označená jako *attH* se liší od sekvence *attB* divokého typu ve třech polohách. Dva z nukleotidů se nachází na levé straně rozeznávací oblasti jádra rekombinázy Int (B) a třetí je část, která se nazývá oblast přesahu. Protože shoda oblasti přesahu dvou rekombinantních sekvencí je

16.04.02

nezbytná pro účinnou rekombinaci rekombinázou Int-h, respektive nukleotid v poloze 0 v přesahu sekvence *attP* se změnil z thymidinu na guanin, což vede k sekvenci *attP**. Sekvence *attH* a *attP** se začlenily jako sekvence s opačnou orientací do vektoru (pACH) a testovala se jejich schopnost rekombinace do mikroorganizmu *E. coli*. Výsledky ukázaly, že rekombináza Int-h a Int-h/218 katalyzovaly inverzi mezi sekvencí *attH* a *attP** v nepřítomnosti IHF. Analýza sekvence DNA izolovaných rekombinantních produktů potvrdilo, že rekombinace mezi sekvencí *attH*/*attP** se provádí očekávaným mechanizmem. Naopak rekombináza Int divokého typu může rekombinovat sekvence *attH*/*attP** dokonce v přítomnosti IHF pouze velmi nedostatečně. Pak sekvence *attH* je potencionální integrační sekvence v případě rekombinázy Int-h, která katalyzuje začlenění cizorodé DNA, jenž zahrnuje kopii sekvence *attP**.

5. Integrační intermolekulární rekombinace mezi sekvencemi *attH* a *attP** v lidských buňkách

Aby se ukázalo, že sekvence *attH* se jako přirozená část lidského genomu může rakombinovat se sekvencí *attP** v intermolekulární reakci, zkonstruoval se vektor pEL13. Uvedený vektor zahrnuje kopii sekvence *attP** vedle genu rekombinázy Int-h, který řídí promotor CMV a gen rezistence na hygromycin, jenž slouží jako selekční marker. Po zavedení vektoru pEL13 do buněk BL60 může se syntetizovat Int-h a katalyzuje intermolekulární rekombinaci mezi genomovou sekvencí *attH* a *attP** jako částí vektoru pEL13.

Vektor pEL13 se zavedl do buněk BL60 elektroporací, jak se popisuje v příkladu 2. Uvedené buňky se po 72 hodinách vystavily selekčnímu tlaku a ředily se. U populace buněk, které přežily, se po 6 až 8 týdnech testovaly PCR s páry primerů attx1/B2. Výsledky ukázaly, že u 13-ti z 31 buněčných

16.04.02

populací se detakovalo začlenění sekvence *att*H. Sekvenční analýza DNA produktů PCR z různých přístupů potvrdila shodu rekombinačních produktů.

Seznam sekvencí

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Escherichia coli

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

ctgctttttt atactaactt g 21

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 243 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Bakteriofág lambda

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgttgtg 60
ttttacagta ttatgtagtc tgtttttttat gcaaaatcta atttaatata ttgatattta 120
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tatactaagt tggcattata aaaaagcatt 180
gcttatcaat ttgttgcaac gaacaggtca ctatcagtca aaataaaatc attatttgat 240
ttc 243

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE

(A) DÉLKA: 102 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(iii) DRUH MOLEKULY: DNA

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Escherichia coli

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

ctgctttttt atactaagtt ggcattataa aaaagcattg cttatcaatt tgttgcaacg 60
aacaggtcac tatcagtcaa ataaaaatca ttatttgatt tc 102

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 162 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Escherichia coli

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgttgtg 60
ttttacagta ttatgtagtc tgtttttttat gcaaaatcta atttaatata ttgatattta 120
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tatactaact tg 162

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 243 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(iii) DRUH MOLEKULY: DNA

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(B) umělá sekvence

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace: specifikace umělé sekvence: oligonukleotid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgttgtg 60

ttttacagta ttatgtagtc tgtttttttat gcaaaatcta atttaatata ttgatattta 120

tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt gatactaagt tggcattata aaaaagcatt 180

gcttatcaat ttgttgcaac gaacaggtca ctatcagtca aaataaaatc attatttgat 240

ttc 243

16.04.02

PV 2002-456

28823

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob sekvenčně specifické rekombinace DNA v eukaryontní buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

a) zavedení první sekvence DNA do buňky, která obsahuje sekvenci *att*B podle SEQ ID NO: 1 nebo její derivát, sekvenci *att*P podle SEQ ID NO: 2 nebo její derivát, sekvenci *att*L podle SEQ ID NO: 3 nebo její derivát nebo sekvenci *att*R podle SEQ ID NO: 4 nebo její derivát,

b) zavedení druhé sekvence DNA do buňky, jestliže první sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*B podle SEQ ID NO: 1 nebo její derivát, uvedená druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*P podle SEQ ID NO: 2 nebo její derivát a naopak nebo jestliže uvedená první sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*R podle SEQ ID NO: 4 nebo její derivát uvedená druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*L podle SEQ ID NO: 3 nebo její derivát,

c) provedení sekvenčně specifické rekombinace integrázou Int bakteriofágu *lambda* .

2. Způsob sekvenčně specifické rekombinace DNA v eukaryontní buňce obsahující ve svém genomu první sekvenci DNA, která se buď v eukaryontní buňce přirozeně vyskytuje nebo se do ní dříve zavedla rekombinací DNA, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kroky b) a c) definované v nároku 1.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená první sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*B podle SEQ ID NO: 1 nebo její derivát a uvedená druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *att*P podle SEQ ID NO: 2 nebo její derivát.

4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená první sekvence DNA obsahuje sekvenci *attL* podle SEQ ID NO: 3 nebo její derivát a uvedená druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *attR* podle SEQ ID NO: 4 nebo její derivát, kde v kroku c) je navíc přítomen faktor Xis.

5. Způsob podle libovolného nároku 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se do buňky navíc zavedla třetí nebo třetí a čtvrtá sekvence DNA obsahující gen Int nebo gen Int a gen faktoru Xis.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená třetí nebo uvedená třetí a/nebo čtvrtá sekvence DNA dále obsahuje regulační sekvenci DNA ovlivňující prostorovou a/nebo dočasnou expresi genu Int a/nebo genu faktoru Xis.

7. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená Int je upravená integráza.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená upravená Int je Int-h nebo Int-h/218.

9. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v kroku c) je navíc zahrnut „integrační hostitelský faktor" (IHF).

10. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená první a/nebo druhá sekvence DNA dále obsahující sekvence DNA

ovlivňuje začlenění uvedené první a/nebo druhé sekvence DNA do genomu eukaryontních buněk homologní rekombinací.

11. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 10, vyznačující se tím, že uvedená první a/nebo druhá sekvence DNA dále obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující polypeptid.

12. Způsob podle nároku 11, vyznačující se tím, že uvedený polypeptid je strukturální protein, endogenní nebo exogenní enzym, regulační protein nebo markerový protein.

13. Způsob podle libovolného z nároků 1 a 3 až 12, vyznačující se tím, že uvedená první a druhá sekvence DNA se zavedly do eukaryontní buňky na stejné molekule DNA.

14. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 13, vyznačující se tím, že uvedená eukaryontní buňka je savčí buňka.

15. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že uvedená savčí buňka je lidská, opičí, myší, krysí, králičí, křeččí, kozí, bovinní, ovčí nebo prasečí buňka.

16. Způsob podle libovolného z nároků 1 až 3 a 5 až 15, vyznačující se tím, že dále tím, že zahrnuje

d) provedení druhé sekvenčně specifické rekombinace DNA po první sekvenčně specifické rekombinaci DNA po krocích a) až c) pomocí Int a faktoru Xis, kde uvedená první sekvence DNA obsahuje uvedenou sekvenci *attB* podle SEQ ID NO: 1 nebo

její derivát a uvedená druhá sekvence DNA obsahuje sekvenci *attP* podle SEQ ID NO: 2 nebo její derivát nebo naopak.

17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e do uvedených buněk se dále zavádí další sekvenci DNA, která obsahuje gen faktoru Xis.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená další sekvence DNA obsahuje další regulační sekvenci DNA ovlivňující prostorovou a/nebo dočasnou expresi uvedeného genu faktoru Xis.

19. Použití sekvence *attB* podle SEQ ID NO: 1 nebo jejího derivátu a sekvence *attP* podle SEQ ID NO: 2 nebo jejího derivátu nebo sekvence *attL* podle SEQ ID NO: 3 nebo jejího derivátu a sekvence *attR* podle SEQ ID NO: 4 nebo jejího derivátu v sekvenčně specifické rekombinaci DNA v eukaryontních buňkách.

20. Sekvence nukleové kyseliny podle SEQ ID NO: 5 nebo její derivát, která zahrnuje až šest substitucí s podmínkou, že derivát není sekvence *attP* divokého typu.

21. Vektor, který obsahuje uvedenou sekvenci nukleové kyseliny podle nároku 20 a sekvenci nukleové kyseliny kódující terapeutický gen nebo její fragment DNA.

22. Vektor podle nároku 21, kde uvedený terapeutický gen je gen CFTR, gen ADA, gen receptoru LDL, gen β-globinu, gen faktoru VIII nebo gen faktoru IX, gen alfa-1-antitrypsinu nebo gen dystropinu nebo genový fragment jednoho z uvedených genů.

16.04.02

23. Vektor podle nároku 21 nebo 22, kde uvedená další sekvence nukleové kyseliny obsahuje další expresívní a/nebo transkripční elementy.

24. Vektor podle libovolného z nároků 21 až 23 vhodný pro použití jako léčebného prostředku v lidské nebo veterinární medicíně.

25. Použití vektoru podle libovolného z nároků 21 až 23 při výrobě léčebného prostředku pro somatickou genovou terapii.

26. Eukaryontní buňka, kterou je možné získat podrobením uvedené eukaryontní buňky podle nároku 1 nebo 2 způsobu podle libovolného z nároků 1 až 18.

27. Transgenní organizmus obsahující alespoň jednu buňku podle nároku 26.

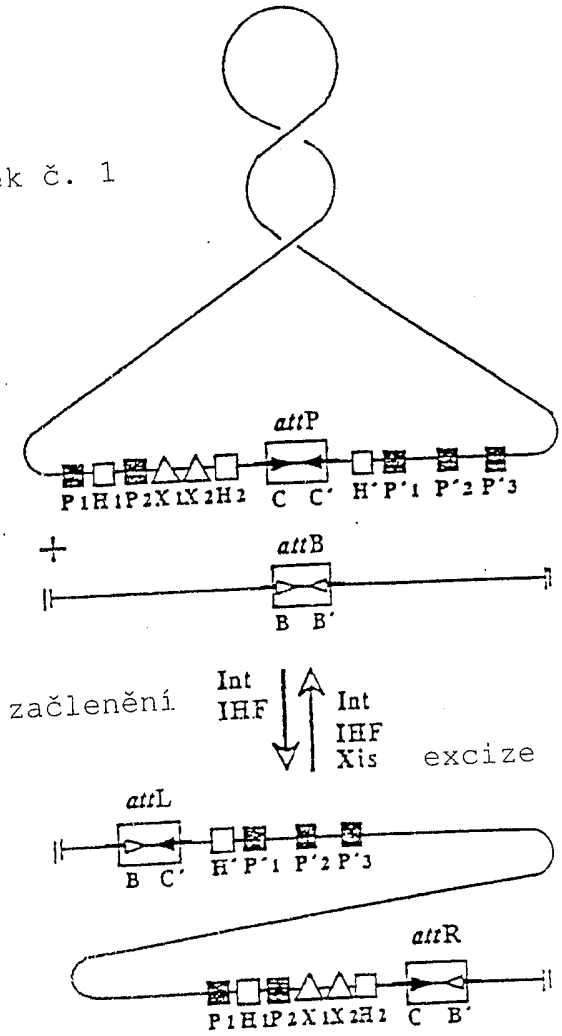
28. Organizmus podle nároku 27, kterým je myš, krysa, králík nebo křeček.

16.04.02

PV 2002-756

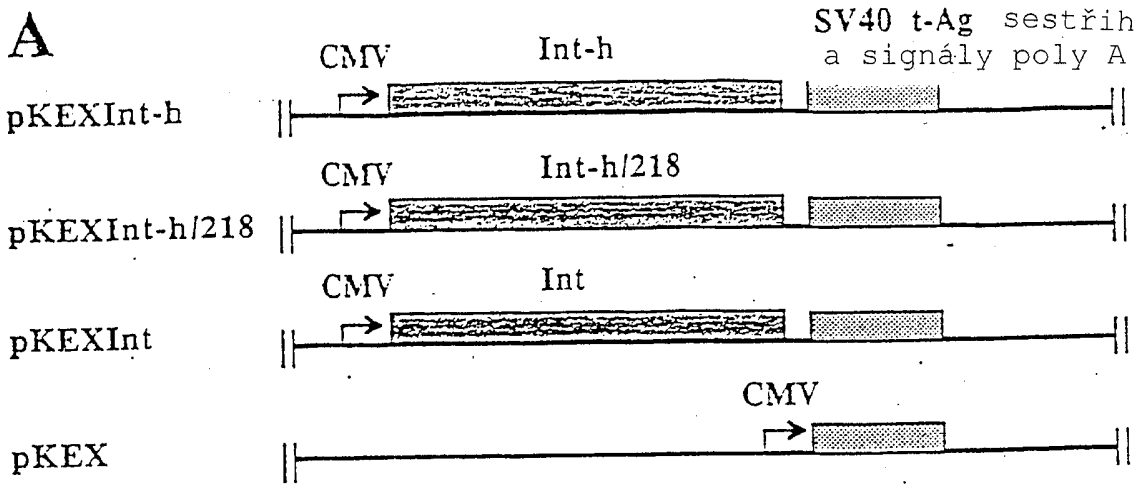
28805

Obrázek č. 1



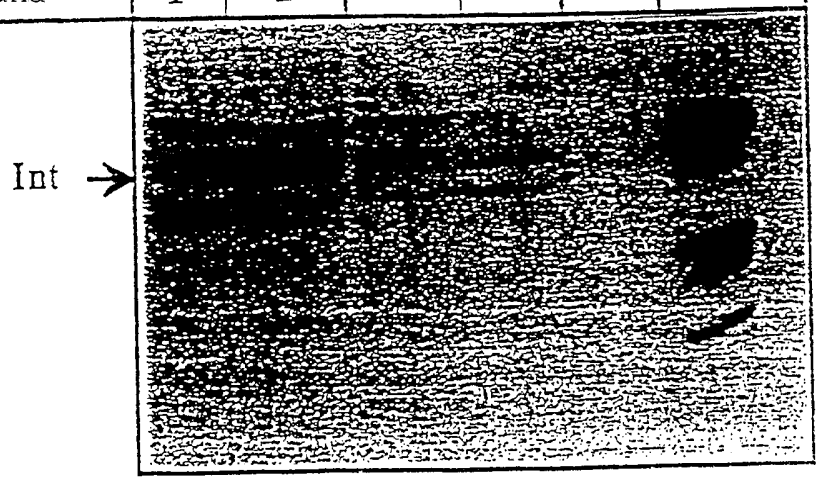
Obrázek č. 2

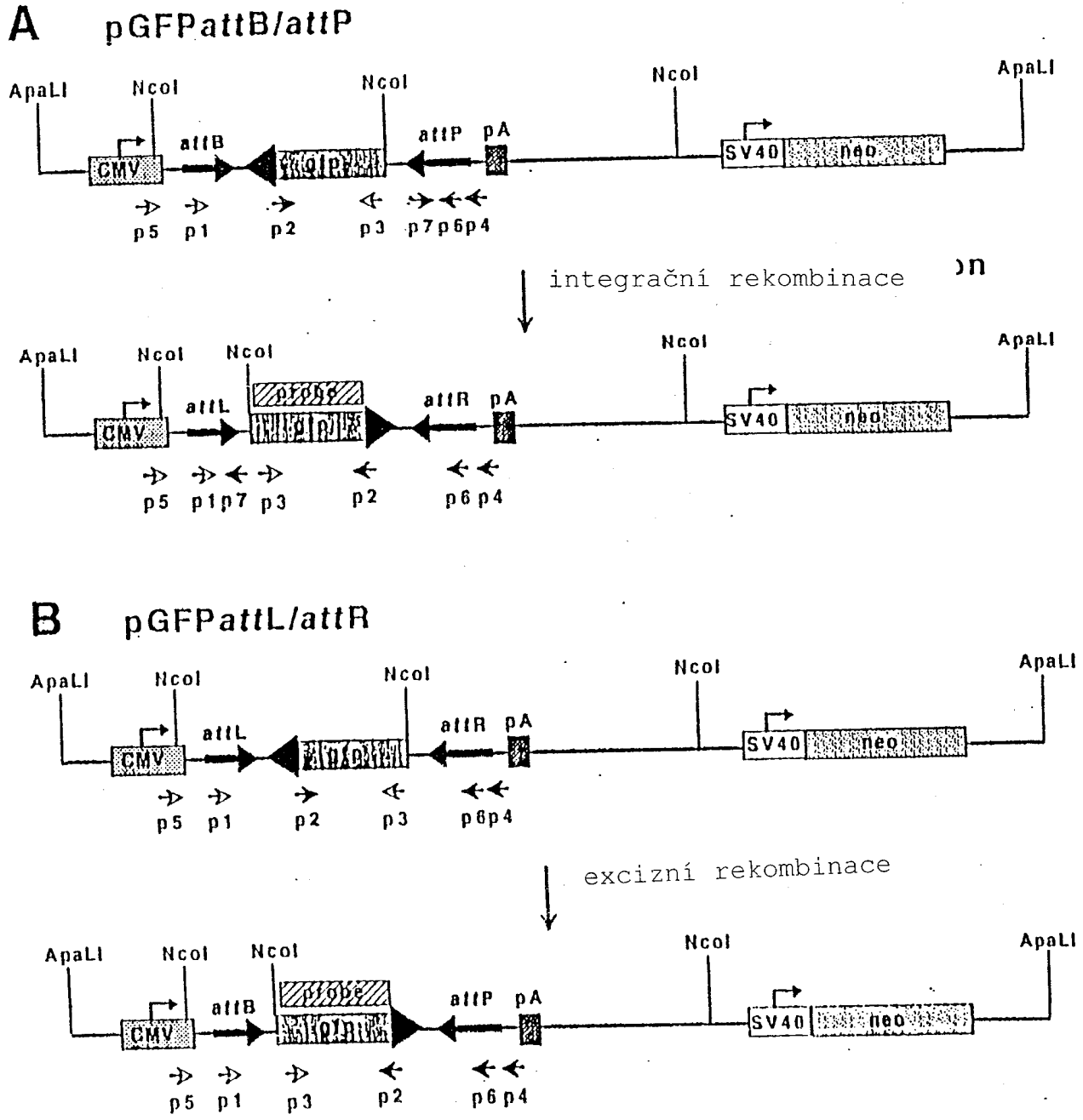
A



B

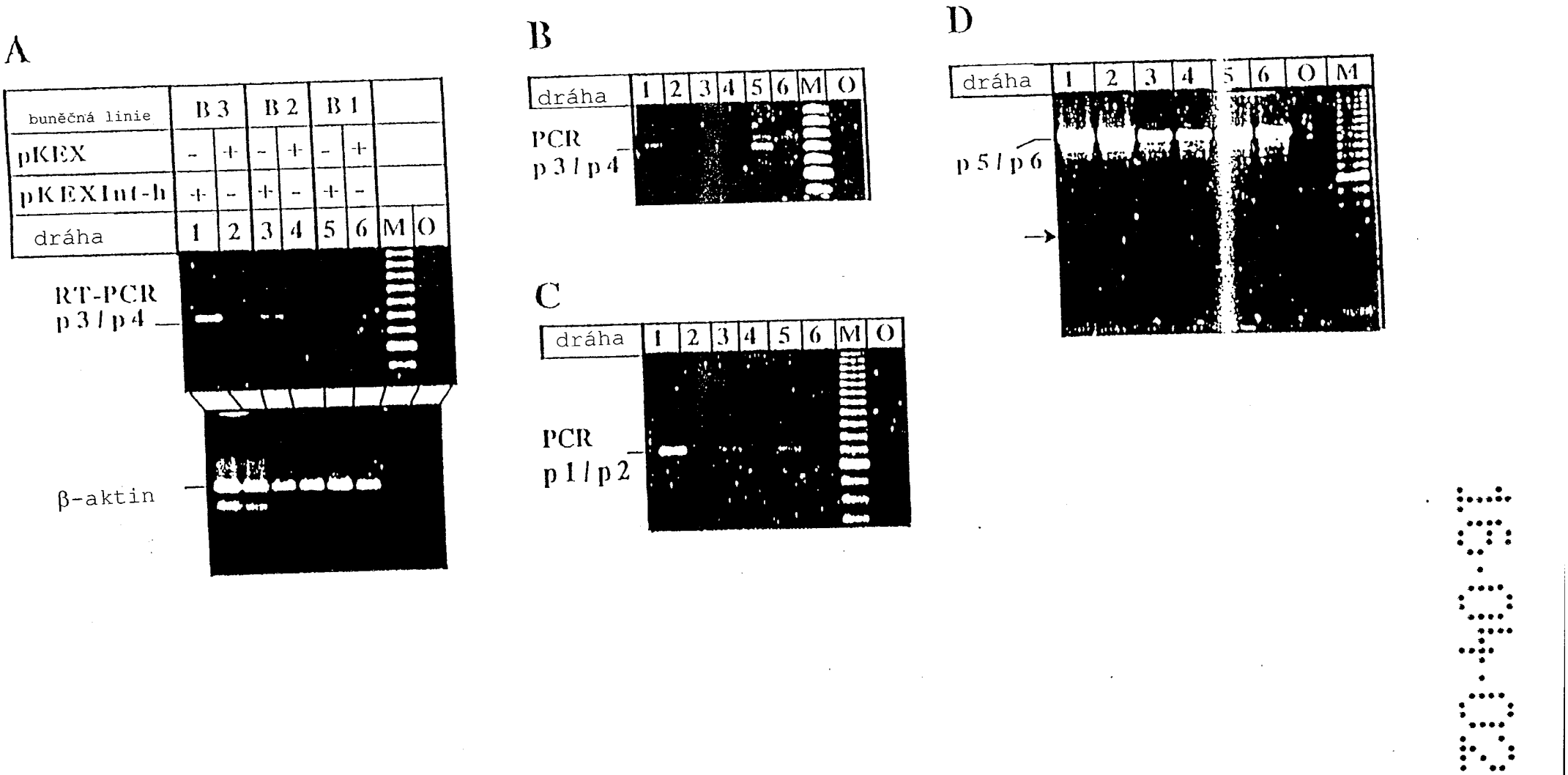
buněčná linie	B2	B2	B3	B3		
pKEX	+	-	+	-		
pKEXInt-h	-	+	-	+		
dráha	1	2	3	4		M




A pGFPattB/attP
ApaLI
NcoI
NcoI
NcoI
ApaLI
attB
attP
pA
CMV
SV40
neo
p5 p1 p2 p3 p7 p6 p4
integrační rekombinace
ApaLI
NcoI
NcoI
NcoI
ApaLI
attL
attR
pA
CMV
SV40
neo
p5 p1 p7 p3 p2 p6 p4
B pGFPattL/attR
ApaLI
NcoI
NcoI
NcoI
ApaLI
attL
attR
pA
CMV
SV40
neo
p5 p1 p2 p3 p6 p4
excizní rekombinace
ApaLI
NcoI
NcoI
NcoI
ApaLI
attB
attP
pA
CMV
SV40
neo
p5 p1 p3 p2 p6 p4

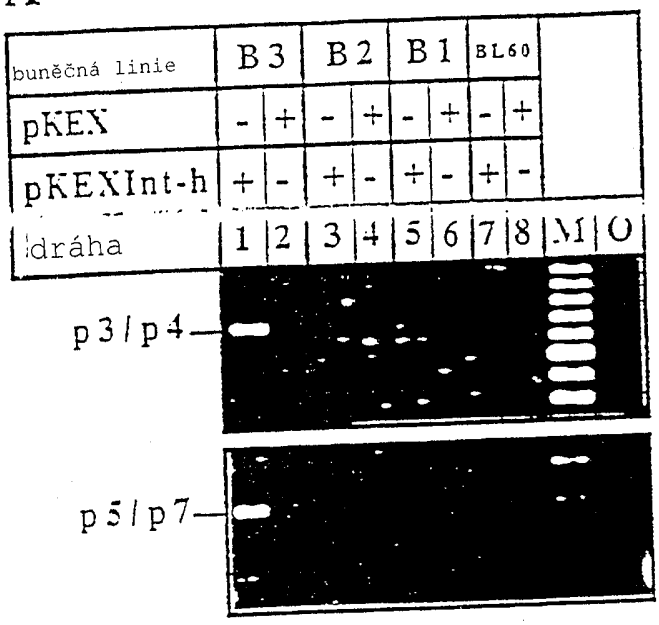
Obrázek č. 3

Obrázek č. 4

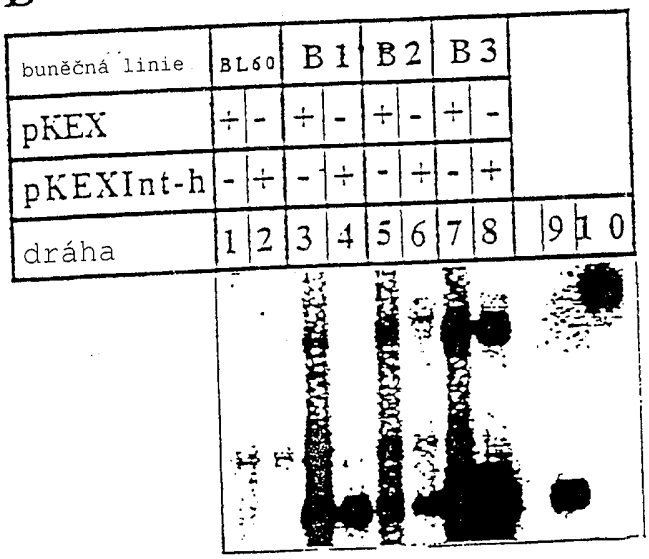

A
buněčná linie
B 3
B 2
B 1
pKEX
pKEXInt-h
dráha
1 2 3 4 5 6 M O
RT-PCR
p 3 / p 4
β-aktin
B
dráha
1 2 3 4 5 6 M O
PCR
p 3 / p 4
C
dráha
1 2 3 4 5 6 M O
PCR
p 1 / p 2
D
dráha
1 2 3 4 5 6 O M
p 5 / p 6

Obrázek č. 5

A

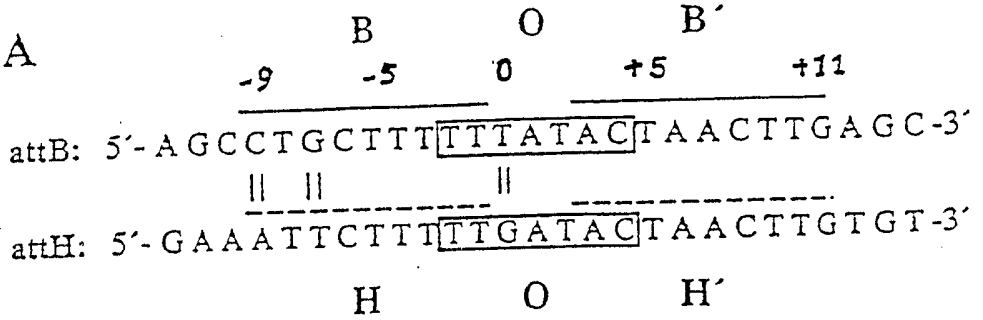


B

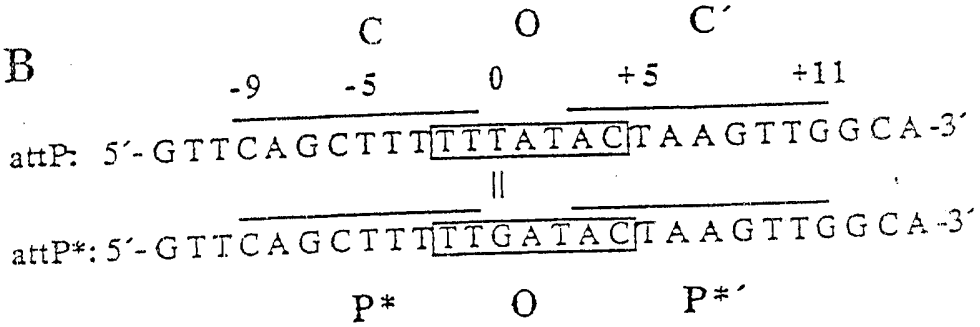


Obrázek č. 6

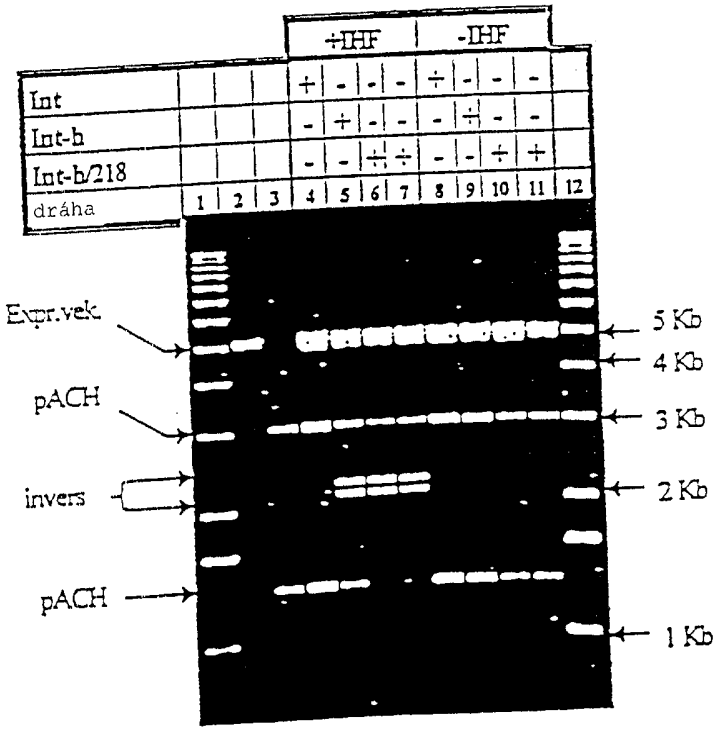
A



B

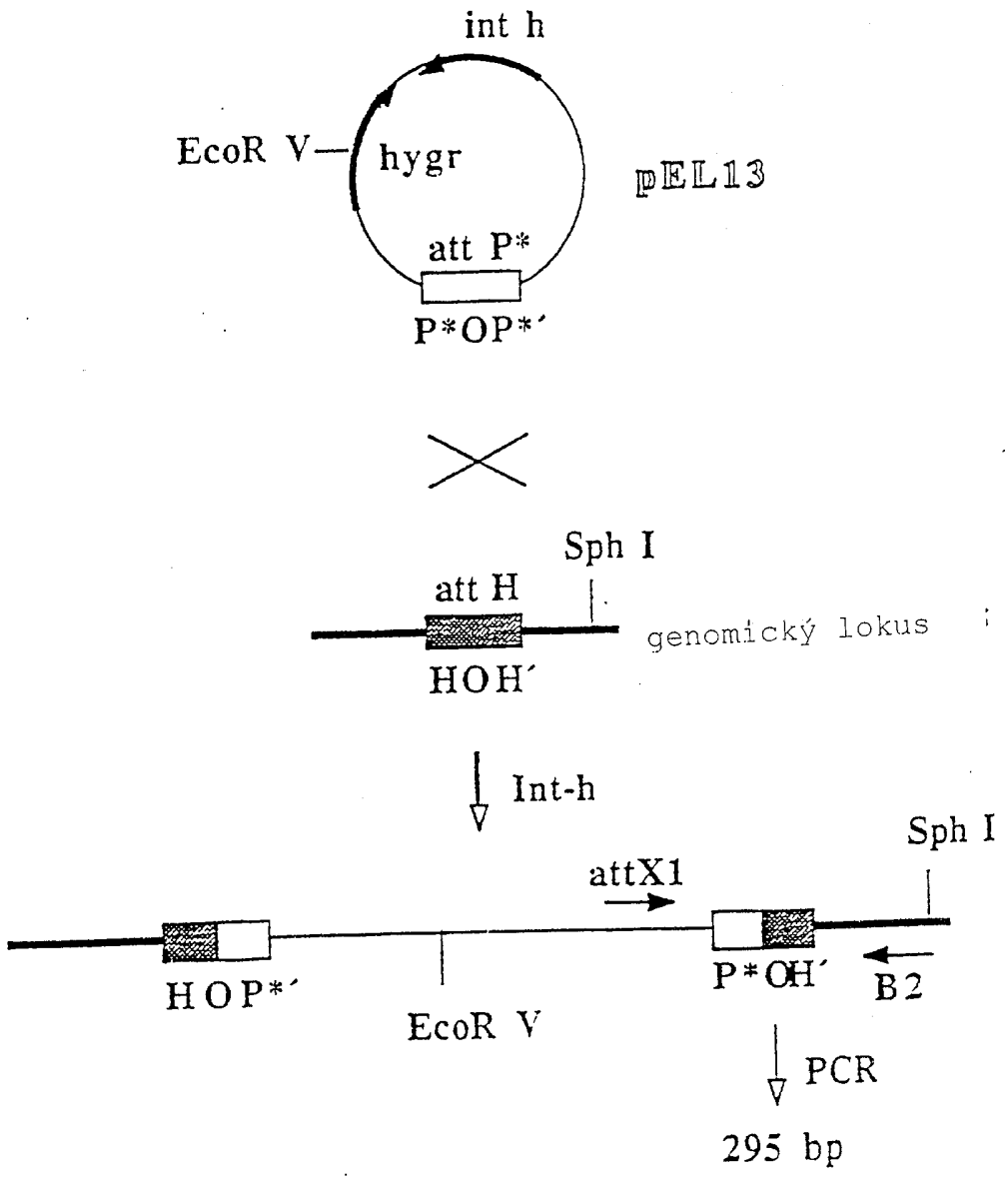


Obrázek č. 7



16.04.02

Obrázek č. 8



Obrázek č. 9

