



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00642**

(22) Data de depozit: **10/10/2019**

(41) Data publicării cererii:
29/04/2021 BOPI nr. **4/2021**

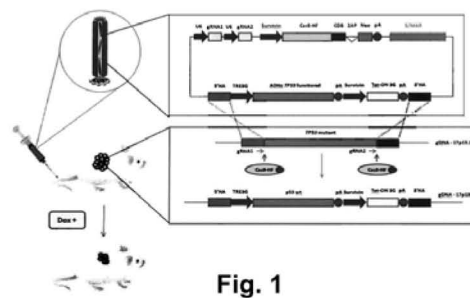
(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU"
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CHIRA SERGIU, STR.PRIMĂVERII, NR.4,
AP.363, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• NEAGOE IOANA-CORNELIA STANCA,
BD. NICOLAE TITULESCU NR. 2, BL. 2A,
AP. 57, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• GULEI DIANA, STR.DIMITRIE GUSTI,
NR.4-6, AP.4B, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) **SISTEM BIOLOGIC BAZAT PE UN VECTOR VIRAL HIBRID
ȚINTIT ANTI-TUMORAL PENTRU RESTABILIREA
GENOTIPULUI NORMAL AL GENEI SUPRESOARE
TUMORALE TP 53 ÎN CELULE MALIGNE**

(57) Rezumat:

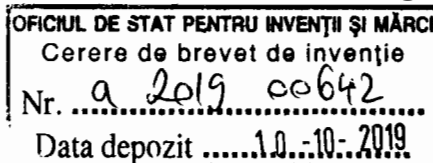
Invenția aparține domeniului biomedical și se referă la un sistem hibrid derivat din virusuri bacteriene, cu proprietatea de a ținti celulele tumorale și a restaura funcția normală a proteinei p53, inducând astfel apoptoza în celulele transduse. Sistemul vectorial bazat pe bacteriofagul M13, conform invenției, este modificat la nivelul capsidei prin tehnici de inginerie genetică cu tripeptida ciclică a motivului RDG de legare la integralele supraexprimate pe celulele tumorale. Elementele genetice necesare restaurării funcției normale a proteinei p53 prin editare genomică CRISP/Cas9 sunt clonate sub forma a 4 casete de exprimare cu specificitate tumorală ridicată. Aceste elemente genetice vor conduce la înlocuirea genei mutante TP53 din celulele tumorale cu o casetă de exprimare a unei copii funcționale a TP53. Prin inducția cu doxiciclină, această copie este transcrisă și tradusă în proteina p53 activă, care își va exercita efectul pro-apoptotic și anti-proliferativ. O reprezentare schematică a principiului de funcționare a sistemului vectorial din invenție se regăsește în fig. 1.



Revendicări: 6
Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





Sistem biologic bazat pe un vector viral hibrid țintit anti-tumoral pentru restabilirea genotipului normal al genei supresoare tumorale *TP53* în celulele maligne

1. Domeniul de aplicatie al inventiei

Prezenta inventie descrie un nou **concept biotehologic** de țintire a celulelor tumorale pentru restabilirea genotipului normal al genei supresoare de tumori *TP53* și inducerea apoptozei în celulele transduse, utilizând un sistem vectorial derivat din virusuri bacteriene și adaptat prin procedee biotehnologice pentru a funcționa în celulele eucariote, respectiv în celule umane maligne.

2. Introducere în subiectul invenției

Prin prelevanța sa ridicată în populația umană, cancerul reprezintă unul din domeniile fundamentale ale cercetării biomedicale, și numeroase abordări terapeutice au fost evaluate pentru a mări specificitatea și eficacitatea tratamentelor aflate în uz clinic. În pofida acestor eforturi, chirurgia, chimioterapia și radioterapeutică au rămas principalele metode utilizate în tratamentul curativ și paliativ al afecțiunilor maligne, însă nespecificitatea și reacțiile adverse asociate acestor terapii au un impact profund asupra calității vieții pacientului[1]. Astfel, investigarea de terapii alternative care să țintească doar celulele malignizate, fără ca cele normale să fie afectate, rămâne încă un obiectiv de atins. O caracteristică comună în aproximativ 50% din totalitatea afecțiunilor maligne umane este prezența de mutații în gena supresoare de tumori *TP53*. Proteina codificată, p53, este implicată în importante procese celulare: controlul ciclului celular, mecanismele de reparare a ADN-ului genomic și apoptoza, printre altele[2]. Fiindcă dereglarea acestor mecanisme celulare este asociată afecțiunilor maligne, **restaurarea funcției normale a proteinei p53 a devenit o țintă în dezvoltarea de terapii anti-canceroase.**

3. Limitările soluțiilor actuale în restaurarea funcției proteinei p53 în celulele tumorale

Diverși **compuși chimici și peptide** sintetice au arătat că aceștia pot fi capabili de restaurare a fenotipului normal al proteinei p53 și, implicit, o inducere a apoptozei și senescentei în celulele tumorale [3]. Însă **răspunsul este dependent de expunerea continuă la acești**

compuși terapeutici, fapt ce, în tratamentul clinic, poate conduce la reacții adverse nedorite. În plus, acești compuși nu înlătură permanent proteina mutantă p53 din celule, astfel ca aceasta, în lipsa tratamentului, continuă să persiste în forma mutanta, promovând fenotipul malign. În afara acestor abordări terapeutice bazate pe compuși chimici și peptide, **bioterapiile** au prins contur în căutarea de tratamente alternative celor conventionale, care ar putea depăși neajunsurile legate de specificitatea și eficiența lor. Aceste bioterapii utilizează vehicule sau vectori derivați din **virusuri**, în special adenovirali, pentru a transfera gena normală *TP53* și a ținti celula tumorală, iar prin eliberarea conținutului genetic al vectorului în interiorul celulei, gena normală *TP53* este exprimată pentru inducerea apoptozei și morții celulare[4]. O altă categorie de bioterapii este reprezentată de molecule circulare de **ADN derivate din bacterii**, numite generic **plasmide**, care încorporează în construcția lor gena *TP53* normală. Însă țintirea celulelor tumorale prin acest tip de vectori non-virali întâmpină numeroase **limitări legate de specificitate, stabilitate în mediul extracelular, dar și de internalizare intracelulară**[5]. Virusurile au în urma lor milioane de ani de evoluție pentru a infecta celulele țintă, motiv pentru care prezintă un interes deosebit în dezvoltarea de bioterapii țintite. Însă aceștia întâmpină limitări, neajunsurile legate de **potențialul imunogenic al virusurilor** și costurile de producție ridicate limitând utilizarea acestora în clinică [6]. De asemenea, **administrarea lor este restricționată la nivelul tumorii**, fapt ce poate constitui o problemă de invazivitate legată de localizarea tumorii și numărul de metastaze.

Toate aceste abordări terapeutice se axează pe ceea ce poate fi numită “**terapia genică de compensare**” a genei mutante cu o genă funcțională. Astfel, varianta mutantă a genei va persista în continuare, fapt ce poate **compromite răspunsul terapeutic** scontat.

În pofida a numeroase trialuri clinice demarate, doar un singur produs de terapie genică bazată pe gena *TP53* normală a fost aprobat pentru uz clinic în China, denumit GendicineTM. Acest vector utilizează un virus adenoviral modificat genetic pentru transferul genei normale *TP53* în celule malignizate și inducerea apoptozei și regresiei tumorale[7]. Acest tip de vector viral recombinant a fost inițial dezvoltat pentru tratamentul tumorilor solide din sfera ORL, însă aplicabilitatea sa a fost extinsă spre alte tipuri de tumori solide, cum este cancerul de plămân, de sân, ovarian, etc. Însă, ca și monoterapie, este eficient în tratamentul unui număr restrâns de tumori maligne. Cel mai frecvent este asociat cu chimioterapia și radioterapia pentru a obține un

răspuns terapeutic superior. Administrarea sa este în principal intratumorală, fiind asociată cu simptome specifice gripei, datorită originii vectorului din virusul gripal, serotipul 5. Expriarea proteinei p53 în forma sa normală în celulele tumorale este însă tranzitorie, fără nivele detectabile la 3 săptămâni după administrarea vectorului[7]. Acest fapt ridică unele semne de întrebare legate de eficacitatea pe termen lung a tratamentului, atât din pricina instabilității unei exprimări continue a proteinei normale p53 și persistenței formei mutante în celulele maligne, cât și de distribuția vectorului la nivelul masei tumorale. Dacă distribuția nu este uniformă și complet omogenă, celule neinduse cu vector pot conduce la o recidivă tumorală. În cazul administrării sistemice, vectorul nu prezintă specificitate pentru celulele tumorale, fiind regăsit în diferite țesuturi, reducând astfel și mai mult eficiența acestuia și potențiale reacții adverse la acest tip de administrare.

În acest context, invenția de față oferă un model experimental pentru restaurarea stabilă și de durată a genotipului normal al genei TP53 în celulele tumorale și implicit a fenotipului proteinei codificate p53. Acest sistem poate fi administrat sistemic intravenos, fără reacții secundare imune sau citotoxice și este țintit tumoral pentru a putea fi internalizat doar de către celulele maligne, cele normale să rămânând neafectate. Prin faptul că acest sistem este pretabil administrării sistemice, se asigură o distribuție omogenă la nivelul masei tumorale și o eficiență superioară produsului GendicineTM.

4. Scopul invenției

În invenția de față este descris un sistem vectorial derivat din bacteriofagi și adaptat prin modificarea capsidei virale pentru transducerea țintită a celulelor tumorale umane, și exprimarea stabilă a fenotipului normal al proteinei p53. Acest obiectiv este atins prin înlocuirea genei mutante *TP53* din genomul tumoral cu o copie funcțională a acesteia, utilizând o variantă îmbunătățită a tehnologiei de editare genomică CRISPR/Cas9, cu efecte secundare nespecifice reduse asupra genomului. Această tehnologie de modificare a secvențelor de ADN din celule a apărut în ultimii ani ca o necesitate de modificare țintită a secvențelor nucleotidice ale ADN-ului din genomul celular într-o manieră mai simplificată față de cele aflate în practică[8]. În pofida versabilității sale, aplicabilitatea în scopuri terapeutice este limitată de generarea de modificări adiționale nespecifice în ADN-ul genomic[9]. Astfel, prin invenția de față, se aduce o

îmbunătățire la nivelul specificității CRISPR/Cas9 prin reducerea duratei de activitate nucleazică.

Elementele constitutive ale vectorului sunt construite în așa manieră, încât funcționalitatea acestuia este restricționată la nivelul celulei tumorale, fără ca celule sănătoase să fie afectate, iar exprimarea copiei functionale a *TP53* poate fi ajustată prin administrarea unui antibiotic uzual, doxiciclina. Astfel, răspunsul pro-apototic și anti-proliferativ al vectorului poate fi „dozat” încât să se obțină efectul scontat. Prin acest design inovativ, utilizatorul poate obține un control spațio-temporal al sistemului al exprimării genei supresoare de tumori *TP53*. În plus, acest tip hibrid de vector viral derivat din bacteriofagi poate fi produs la titru (cantitate) ridicat, utilizând echipamente uzuale în laboratoarele de cercetare și reactivi generali de microbiologie.

5. Soluția oferită de invenție la problema stadiului actual al cunoașterii

Modele actuale de transfer și restaurare a fenotipului normal al proteinei supresoare de tumori în celulele maligne sunt bazate pe conceptul de „terapie genică de complementare”, ceea ce înseamnă că pe lângă copia normală a genei transferate care exprimă proteina normală, în genomul tumoral va persista în continuare și gena mutantă care poate promova fenotipul malign, interferând cu răspunsul pro-apototic și anti-tumoral scontat. Un alt neajuns al acestor modele de transfer genic bazate pe vectori adenovirali sau non-virali sunt legate de nespecificitatea și eficiența țintirii celulelor tumorale, în plus față de dezvoltarea unui răspuns imun sever în cazul vectorilor adenovirali. Designul și complexitatea de obținere a acestor tipuri de vectori limitează aplicabilitatea lor din motive tehnice și economice. Prin designul său inovativ, modelul vectorial propus în prezenta invenție permite înlocuirea genei mutante *TP53* din genomul celulei tumorale, inducerea apoptozei și inhibiția fenotipului malign prin restaurarea stabilă și de lungă durată a funcției normale a proteinei supresoare de tumori p53. Un aport inovativ suplimentar este că nivelul de proteină p53 în celula tumorală poate fi ajustat prin administrarea unui antibiotic uzual, doxiciclina.

6. Descrierea detaliată a invenției

Modelul vectorial propus în invenția de față este constituit în esență din 4 casete de exprimare pentru atingerea obiectivului stabilit, de înlocuire a genei mutante *TP53* din genomul

celulelor malignizate cu o copie de ADN complementar (ADNc) a genei *TP53* (conform figurii 1). Prima casetă de exprimare este compusă din două module de transcriere a două molecule de ARN de ghidaj pentru nucleaza Cas9 (ARNg1 și ARNg2), aflate sub influența promotorului U6.

A doua casetă cuprinde o variantă a nucleazei Cas9, cu specificitate ridicată (Cas9-HF) care a fost modificată prin fuziunea la capatul N-terminal a unui semnal de ubiquitinare și degradare pe calea proteasomală, denumit prescurtat CDB (Cyclin Destruction Box), care limitează activitatea nucleazică a Cas9 până la sfârșitul mitozei, când este degradată pe cale proteasomală. Prin intermediul unei secvențe de legătură, 2AP, Cas9-HF/CDB este coexprimată cu un marker de fluorescență GFP, pentru selecția celulelor transfectate cu acest vector prin FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), față de celulele netransfectate. Cele două proteine, Cas9-HF/CDB și GFP, sunt traduse într-un singur lanț polipeptidic, care ulterior este clivat de o protează celulară la nivelul secvenței 2AP, eliberând cele două proteine.

A treia casetă exprimă factorul de transcriere sensibil la doxiciclină, denumit TetON3G, care în forma nestimulată este inactiv. Prin administrarea de doxiciclină, se produc modificări conformaționale la nivelul structurii terțiare și cuaternare a TetON3G, care îi permite să se lege de un promotor complementar, denumit TRE3G, și să activeze transcrierea genei aflate în aval de acesta. Acest tip de promotor reglează transcrierea copiei funcționale de ADNc a genei *TP53* în funcție de nivelul de factor transcriptional TetON3G activ.

Atât gena care exprimă nucleaza Cas9-HF/CDB, cât și factorul transcriptional TetON3G, sunt reglate de către promotorul cu specificitate tumorală Survivin, restricționând astfel funcționalitatea sistemului doar la nivelul celulelor maligne, în celulele normale nefiind activ.

Pentru a transfera încărcătura genetică conținută în cele 4 casete de exprimare, vectorul este încorporat în genomul unui bacteriofag M13 modificat genetic care exprimă pe capsida virală un peptid ciclic al motivului RGD (cRGD) pentru legarea de integrinele $\alpha_v\beta_{III}$, care sunt supraexprimate pe celulele tumorale. În acest fel, tropismul vectorului este directionat numai spre celulele maligne, internalizarea vectorului făcându-se pe cale endosomală. Prin includerea unei secvențe S/MAR (Scaffold/Matrix Associated Region), vectorul se ancorează la nivelul centromerilor cromozomilor din celulă, fiind replicat cu fiecare ciclu celular, și asigurându-se

menținerea vectorului ca episom în celulele descendente. Acest tip de element genetic S/MAR a fost mai descris ca fiind capabil să mențină *in vitro* vectori virali ca episomi, mai mult de 100 generații celulare succesive [11].

Ulterior eliberării din vezicula endosomală, conținutul genetic este eliberat în citoplasmă și ajunge în nucleu cu ocazia primului ciclu celular, fiind ancorat prin intermediul secvenței S/MAR de centromerii cromozomilor. Cele două molecule transcrise de ARNg, direcționează pe baza complementarității nucleaza Cas9-HF/CDB la capetele care delimitează locusul genei *TP53* pe genomul tumoral, iar prin formarea triplexului de ARNg/ADN genomic, Cas9-HF/CDB creează o breșă de tăiere la nivelul celor două catene de ADN. Recombinarea omoloagă între secvențele complementare dintre vector și genomul viral va conduce la înlocuirea genei mutante *TP53* cu caseta de exprimare a copiei funcționale de ADNc a *TP53*.

Administrarea doxiciclinei activează factorul transcripțional TetON3G, iar prin legarea acestuia la promotorul TRE3G, copia funcțională a genei *TP53* este transcrisă și tradusă în proteina p53 activă, care își va putea exercita astfel efectul pro-apoptotic și anti-proliferativ.

7. Avantajele modelului experimental prezentat în invenție

Prezenta invenție oferă o alternativă mai fiabilă și sigură din punct de vedere al specificității și eficienței transferului genei normale *TP53* în celulele maligne, în plus față de evitarea unui potențial răspuns imun față de sistemul vectorial de transfer în cazul administrării sistemice prin injectare intra-venosă. Acest răspuns imun este o etapă limitativă importantă în dezvoltarea de bioterapii, putând duce la reducerea eficienței țintirii tumorale sau chiar într-un șoc anafilactic, ca în cazul trialului din 1999 care a condus la decesul pacientului ca urmare a unei sincope datorate dozei administrate de adenovirus modificat genetic [10].

Din punct de vedere economic, invenția oferă posibilitatea de producere a vectorului în culturi de *E.coli*, care necesită un mediu de creștere simplu și echipamente uzuale de microbiologie, având rata de multiplicare rapidă, rezultând într-un titru ridicat de vector în interval redus de timp.

8. Modul de realizare a modelului experimental prezentat în invenție

Modul de concepere a sistemului țintit tumoral este, în primul pas, derivat din vectorul comercial Gene Art CRISPR Vector (Invitrogen), care conține structura de bază pentru inserarea elementelor adiționale pentru obținerea constructului final. Acest vector, în forma liniarizată, cuprinde promotorul U6 pentru transcrierea ulterioară a unui ARNg, și caseta de exprimare pentru nucleaza Cas9. Această nuclează este coexprimată cu markerul de fluorescență OFP prin intermediul unui peptid linker de clivaj. În prima etapă, vectorul este recircularizat cu o secvență linker care cuprinde două situsuri de recunoaștere pentru enzimele de restricție *NheI* și *SmaI*, fapt care va permite vectorului să fie propagat mai departe în *E.coli*, și prin intermediul situsurilor *NheI* și *SmaI* să fie inserată secvența pentru ARNg1. A doua casetă de exprimare pentru ARNg2 este inserată în aval de caseta ARNg1 la nivelul unui situs pentru enzima de restricție *BstZ17I*. În etapa următoare, nucleaza Cas9 împreună cu promotorul nespecific CMV (cytomegalic virus) va fi înlocuită cu o nouă caseta constituită din promotorul cu selectivitate tumorală Survivin, o variantă a Cas9 cu specificitate ridicată (Cas9-HF) la care se este fuzionată la capatul 3' o secvență CDB (Cyclin Destruction Box), prin tehnica de clonare In-Fusion. În etapele următoare se va construi fragmentul care va fi inserat în genomul tumoral prin recombinare omoloagă între cele două secvențe omoloage (5'HA și 3'HA) din vector și secvențele complementare din genomul tumoral care delimitează gena mutanta *TP53*. Acest fragment este compus din caseta de exprimare a unei copii funcționale de ADNc a genei *TP53*, sub influența promotorului de răspuns la tetraciclină/doxicilina TRE3G. A doua casetă cuprinde secvența codificatoare pentru activatorul transcriptional Tet-ON3G, activat de tetraciclină/doxicilina TRE3G, care este transcris de promotorul Survivin. Întregul construct CRISPR-TP53 va fi inserat într-un genom modificat genetic al bacteriofagului M13KO7. Acest genom conține gena pentru proteina capsidei virale pIII recombinaată cu un motiv ciclic al peptidului RGD (cRGD). În plus, genomul mai cuprinde o secvență S/MAR pentru menținerea episomală a vectorului în celula tumorală pe parcursul mai multor generații celulare succesive. Sistemul vectorial hibrid rezultat poate fi folosit pentru țintirea celulelor tumorale și restaurarea genotipului normal al genei *TP53*.

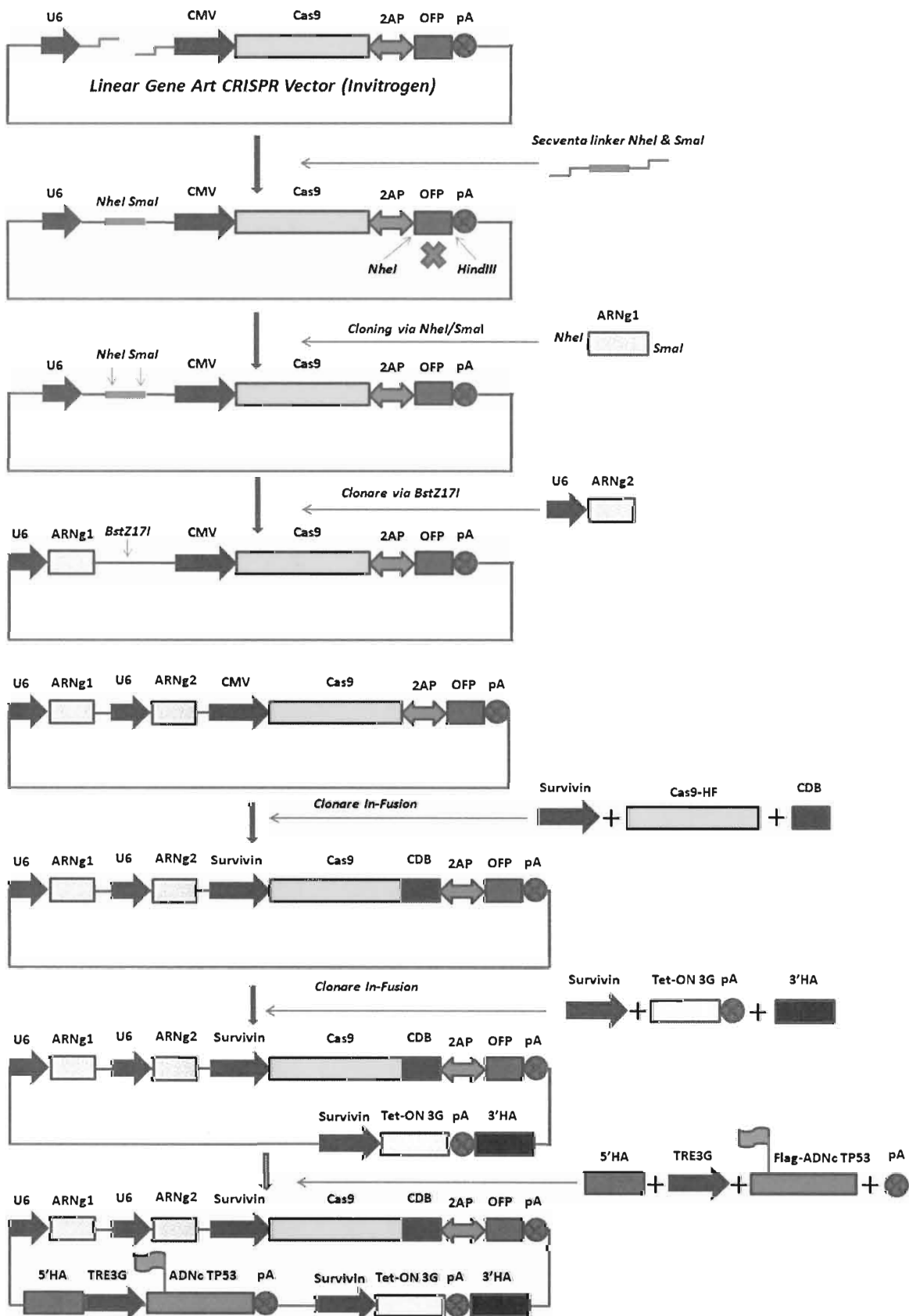
9. Aplicabilitatea invenției prezentate

Invenția de față, prin caracteristicile sale unice, poate constitui o bază experimentală pentru implementarea de terapii anti-tumorale în trialuri clinice pe pacienți umani, cu tumori al căror genotip are alterată funcția genei supresoare de tumori *TP53*. Statusul mutational al acestei gene este asociat cu un prognostic defavorabil și rezistență la chimioterapia standard. Acest sistem vectorial poate fi implementat ca tratament în afecțiunile maligne fie ca monoterapie, fie complementată cu chimioterapice, pentru a spori eficiența acestuia în tipurile de cancer mai complexe și agresive. Un avantaj major al acestui vector este posibilitatea de a fi produs la scară industrială cu costuri reduse, și stabilitatea preparatului injectabil la temperatura mediului ambiant pe termen scurt, sau la frigider pe termen îndelungat, fiind astfel disponibil în zone geografice izolate și subdezvoltate, unde accesul la o infrastructură adecvată nu este disponibil.

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Rivlin, N., et al., *Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis*. Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 466-74.
3. Brown, C.J., et al., *Reactivation of p53: from peptides to small molecules*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(1): p. 53-62.
4. Roth, J.A., *Adenovirus p53 gene therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(1): p. 55-61.
5. Wang, K., et al., *Non-viral Delivery Systems for the Application in p53 Cancer Gene Therapy*. Curr Med Chem, 2015. **22**(35): p. 4118-36.
6. Chira, S., et al., *Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 30675-703.
7. Zhang, W.W., et al., *The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic*. Hum Gene Ther, 2018. **29**(2): p. 160-179.
8. Sanchez-Rivera, F.J. and T. Jacks, *Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(7): p. 387-95.
9. Fu, Y., et al., *High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 822-6.
10. Raper, S.E., et al., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 148-58.
11. Verghese, S.C., et al., *S/MAR sequence confers long-term mitotic stability on non-integrating lentiviral vector episomes without selection*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(7): p. e53.

REVENDICARI

1. Un sistem vectorial derivat din bacteriofagi M13, modificat prin tehnici de inginerie genetica la nivelul capsidei virale cu un motiv ciclic altripeptidului RGD pentru transducția țintită a celulelor tumorale prin legarea de integrinele $\alpha_v\beta_{III}$. Acest vector conține în constituția lui, pe lângă elementele impachetării în virioni, și o secvență umană S/MAR prin care vectorul viral se ancorează la centromerii cromozomilor din celula tumorală și se replica cu fiecare ciclu celular, menținându-se ca episom în generațiile celulare succesive.
2. Un plasmid care conține elemente ale sistemului de editare genomică CRISPR/Cas9, a cărui funcționalitate este restricționată la nivelul celulei maligne prin exprimarea nucleazei Cas9 de către promotorul specific tumoral Survivin.
3. Un plasmid care prezintă elemente de reglaj al exprimării genice a sistemului de răspuns la tetracilină/doxiciclină (Tet-ON). Acest sistem de reglaj este restricționat ca funcționalitate la nivelul celulelor maligne prin utilizarea promotorului specific tumoral Survivin.
4. O variantă modificată a unei nucleaze Cas9 cu specificitate ridicată, Cas9-HF, prin fuziunea la capătul a unei secvențe CDB (cyclin destruction box) care limitează durata de activitate nucleică până la sfârșitul mitozei.
5. Un plasmid care conține o copie funcțională de ADNc a genei supresoare de tumori TP53, a cărei activitate este reglată de elementele de reglaj ale sistemului de răspuns la tetracilină/doxiciclină. Acestea împreună sunt flancate de două secvențe omoloage cu secvențe care delimitează locusul TP53 din genomul tumoral.
6. Un sistem vectorial constituit din elementele genetice ale revendicărilor 2, 3, 4 și 5 ale prezentei invenții, clonate în bacteriofagul țintit tumoral de la revendicarea 1 a invenției de față.



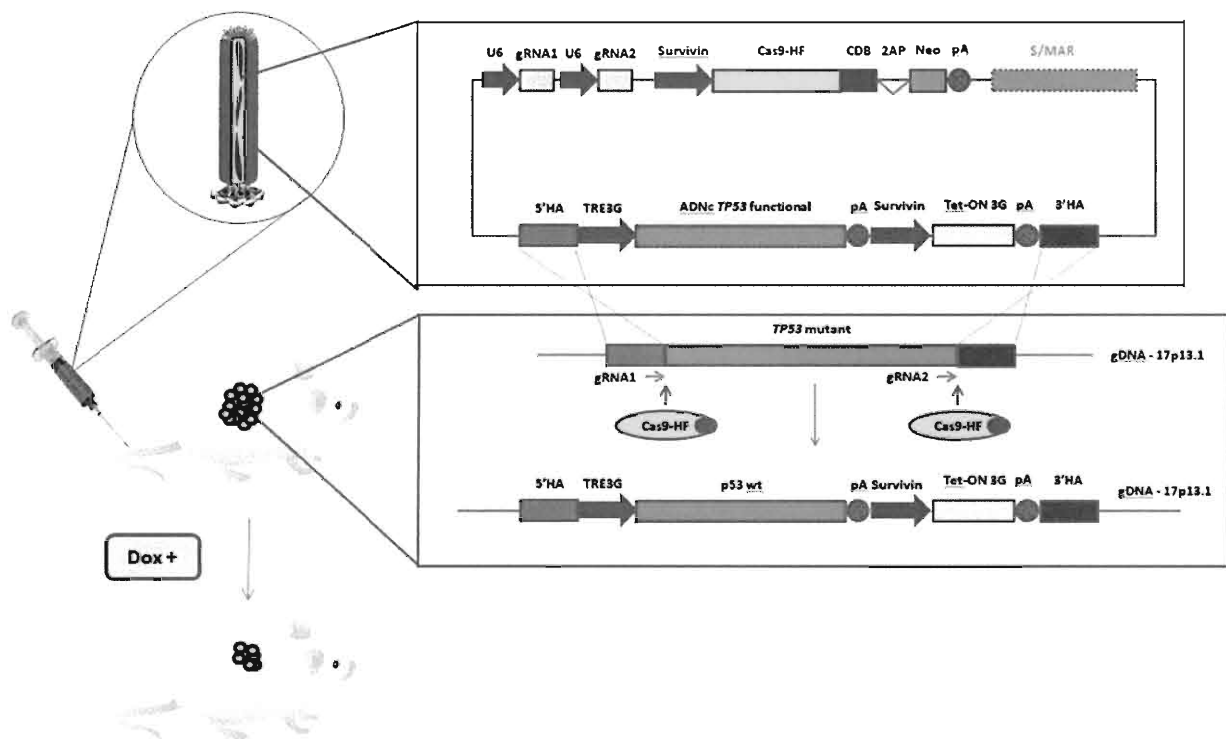


Figura 1. Principiul de functionare a modelului experimental propus pentru restaurarea genotipului normal al genei supresoare de tumori TP53, pe modele *in vivo* de tumori maligne. Legenda se regaseste in descrierea inventiei.

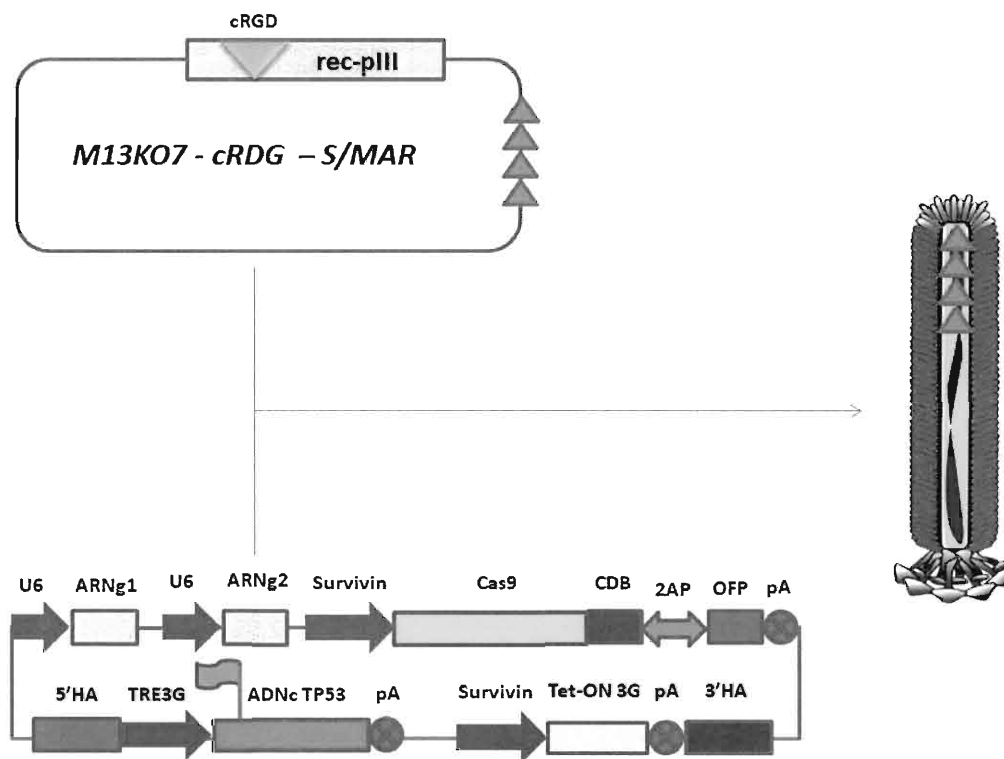


Figura 2.Reprezentare schematică a metodologiei de obținere a sistemului biologic țintit tumoral derivat din virusuri bacteriene, prin tehnici de inginerie genetică și biologie moleculară.