

ÖZET

VİRAL VEKTÖR İMALATI

5 Mevcut buluş bir modifiye edilmiş memeli hücresi ile ilgilidir, burada hücrenin genomu bir promotör kontrolü altında CP77 kodlayan bir dizi içermesi için modifiye edilir, böylece modifiye edilmiş hücre hattı, modifiye edilmemiş hücre içinde daha az çoğalabilen veya hiç çoğalamayan bir çiçek virüsünün propagasyonunu sürdürür.

İSTEMLER

- 5 1. Bir modifiye edilmiş memeli hücresi olup, özelliği hücrenin genomunun, bir konstitütif promotör kontrolü altında CP77'yi kodlayan bir diziye içermesi için modifiye edilmesidir, böylece modifiye edilmiş hücre hattı, modifiye edilmemiş hücrede daha az çoğalabilen veya hiç çoğalamayan bir çiçek virüsünün propagasyonunu sürdürür ve burada hücrenin genomu ilaveten, bir konstitütif promotör kontrolü altında D13L'yi kodlayan bir dizi içerir.
- 10 2. İstem 1'e göre hücre olup, özelliği hücrenin genomunun ilaveten, bir promotör kontrolü altında K1L'yi kodlayan bir dizi içermesidir.
- 15 3. İstem 1'e veya istem 2'ye göre hücre olup, özelliği hücrenin, bir sürekli hücre hattı olmasıdır.
4. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre hücre olup, özelliği hücrenin, bir CHO hücresi olmasıdır.
- 20 5. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre hücre olup, özelliği hücrenin, bir insan hücresi, bir primat hücresi, bir hamster hücresi veya bir tavşan hücresi olmasıdır.
- 25 6. İstemler 2 ila 5'ten herhangi birine göre hücre olup, özelliği K1L geninin ekspresyonunun, bir konstitütif memeli promotörü kontrolü altında olmasıdır.
7. İstemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre hücre olup, özelliği CP77 geninin ekspresyonunun, bir permisif hücre hattında gözlenene eş-değer virüs verimleri üretmek için virüsün propagasyonunu desteklemesidir.
- 30 8. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre hücre olup, özelliği CP77 geninin ekspresyonunun, 500'den büyük olan bir virüs replikasyon amplifikasyon oranını desteklemesidir.

9. İstemler 1 ila 8'den herhangi birine göre hücre olup, özelliği CP77 geninin, memeli hücrelerinde ekspresyon için kodon optimize edilmiş nükleotidlerin bir bitişik dizisi tarafından kodlanmasıdır.
- 5 10. CHO hücrelerinde çoğalmayan bir orto-çiçek virüsünü çoğaltmak için bir proses olup, özelliği prosesin, çiçek virüsünün bir memeli hücre hattında *in vitro* çoğaltılmasını içermesidir, burada hücre hattı, CP77'yi kodlaması ve bir konstitütif promotör kontrolü altında eksprese etmesi için ve bir konstitütif promotör kontrolü altında D13L'yi eksprese etmesi için modifiye edilir.
- 10 11. İstem 10'a göre proses olup, özelliği modifiye edilmiş hücre hattının, K1L'yi kodlaması ve bir promotör kontrolü altında eksprese etmesi için modifiye edilmesidir.
- 15 12. İstem 10'a veya istem 11'e göre proses olup, özelliği modifiye edilmiş hücre hattının, bir insan hücresi, bir primat hücre hattı, bir hamster hücre hattı veya bir tavşan hücre hattı olmasıdır.
- 20 13. İstem 12'ye göre proses olup, özelliği hücre hattının bir CHO hücre hattı olmasıdır.

TARİFNAME VİRAL VEKTÖR İMALATI

İLGİLİ BAŞVURULAR

5

Bu başvuru, 1 Kasım 2013'te dosyalanmış 2013904242 Numaralı Avustralya Patent başvurusu ve 7 Şubat 2014'te dosyalanmış 2014900370 Numaralı Avustralya Patent başvurusu ile ilişkilidir ve bunlardan öncelik talep etmektedir.

10 BULUŞUN SAHASI

Mevcut buluş, çiçek virüsü-temelli ilaçları çoğaltmak ve böylelikle imal etmek için uygun olan hücrelerin ve hücre hatlarının geliştirilmesi ile ilgilidir. Özel olarak, spesifikasyon, terapötik veya profilaktik ajanların imalatı için bu tarz çiçek virüslerini çoğaltmak
15 amacıyla rekombinant modifiye edilmiş hücresel substratlar ile ilgilidir.

BULUŞUN ALT-YAPISI

Söz konusu spesifikasyonda referansların bibliyografik detayları, spesifikasyonun
20 sonunda listelenir.

Çiçek virüsü familyası, iki alt-familiya, *Chordopoxvirinae* ve *Entomopoxvirinae* içerir. *Chordopoxvirinae*, insanları enfekte eden türleri (örneğin, variola virüsünü, çiçek hastalığının nedensel ajanını, (1796'da Jenner tarafından bildirilen orijinal çiçek
25 hastalığı aşısından oluşturulan) inek çiçek virüsünü, (bir ikinci nesil çiçek hastalığı aşısı olarak kullanılan) vaksiniya virüsünü ve maymun çiçek virüsünü) içeren *Orthopoxviridae*'yi ve kuşları enfekte eden türleri, örneğin, kuş çiçek virüsünü ve kanarya çiçek virüsünü, içeren *Avipoxviridae* virüslerini içeren sekiz cinsi içerir. Bunların çiçek hastalığı aşılarında antijenler olarak kullanımını ek olarak, bir "omurga"
30 vektörler olarak rekombinant vaksiniya-temelli virüslerin ve kuş-çiçek virüslerinin kullanımına yönelik çok ilgi vardır. İntra-sitoplazmik vektörler olarak, *Orthopoxviridae*, *inter alia*, yabancı antijenleri konak sitoplazmasına ve hücre yüzeyi üzerinde sunulması için antijenleri peptitlere işleyen antijen işleme yollarına aktarabilir. Yabancı antijenleri kodlayan bu tarz vektörler, diğer aşılama stratejileri ile tedavi edilmesinin zor olduğu

kanıtlanmış olan, hastalıklar, örneğin, AIDS, tüberküloz, malarya ve kanser, için aşıların geliştirilmesinde kullanılır.

Chordopoxvirinae, boyut olarak para-çiçek virüslerinde 130 kb ila kuş-çiçek virüslerinde 300 kb'den fazla olan aralıkta lineer çift-sarmallı DNA genomlarına sahiptir ve bunların konak içindeki yaşam siklusu bütünüyle konak hücre sitoplazmasında geçirilir. Çiçek-virüsleri büyük ölçüde, özellikle erken mRNA sentezine dahil edilen prosesler için, bunların konak hücresinden ve konak hücre moleküllerinden bağımsız çalışır. Bununla birlikte, konak moleküllerinin ara ve geç viral transkripsiyonun başlatılması veya sonlandırılması için kullanıldığı görülür. Çiçek-virüsleri, viral replikasyona olanak sağlayan hücresel koşullara izin vermek için spesifik olarak konak sinyalleme yollarını hedef alan ve manipüle eden yapısal olarak çeşitli "konak aralık faktörleri" üretir. Çoğu çiçek-virüsü memeli hücrelerini bağlayabilir ve enfekte edebilir, ancak müteakip enfeksiyonun permisif olması (enfeksiyöz viriyonlar üretebilmesi) veya permisif-olmaması (büyük ölçüde enfeksiyöz viriyonlar üretememesi) dahil edilen spesifik çiçek-virüsüne ve spesifik hücre tipine bağlıdır. Çiçek virüsü-konak etkileşimleri, özellikle konak-aralık genleri, moleküler düzeyinde ve hangi faktörlerin hem viral hem de hücresel propagasyonu kolaylaştırmak amacıyla ilişkiyi modüle etmek için gerekli olduğuna yönelik güncel olarak görece zayıf bir kavrayış vardır. Konak aralık genlerinin bir incelemesi için, burada bütünüyle eklenmiş olan Werden et al., 2008, kaynağına başvurulabilir.

Çiçek hastalığı aşıları olarak ve bunu takiben viral vektörler olarak bunların kullanımına ilişkin vaksiniya suşları konusundaki gözlemler, 1960'ların başlarından günümüze kadar yayımlanmaktadır. Vaksiniyanın, çiçek hastalığı aşıları olarak kullanılan suşları içeren, belirli suşları, insan hücrelerinde çoğalabilir ve bundan dolayı sağlık risklerini, örneğin, viral ensefalit gelişmesini, temsil eder. Daha güvenli bir aşı geliştirmek amacıyla, Ankara'dan bir vaksiniya suşu ("CVA" olarak ifade edilir), insan-olmayan hücrelerde 500 kattan daha fazla geçirilmiştir. Bu proses sırasında, vaksiniya genomu orijinal CVA genomuna kıyasla en az altı majör silinmenin gelişmesini içererek büyük ölçüde değişmiştir. Modifiye edilmiş virüs, insanda daha az patojeniktir, ancak hala bir koruyucu immün yanıt meydana getirebilir. Bu atenüe edilmiş vaksiniya virüsü, MVA (Modifiye Edilmiş Vaksiniya Ankara) olarak ifade edilir ve ayrıca farklı geçiş numaraları olan virüslerin genetik ve fenotipik olarak farklı olduğu bulunduğundan, geçiş numarası ile de kategorize edilir. Bununla birlikte, geçiş numarası 515 MVA515'in genetik olarak

kararlı olduğu anlaşılmıştır. 1990'ların başlarında, MVA suşlarının, örneğin, MVA572'nin ve bunun türevinin, MVA F6'nın, permisif-olmayan hücrelerde (burada virüs çoğalmayacaktır) yüksek düzeylerde vaksiniya proteinleri ve heterolog (rekombinant) proteinler eksprese edebildiği gözlenmiştir; bu, söz konusu heterolog moleküller, örneğin, aşı veya terapi aktarımı için antijenleri kodlayanlar, için bir vektör olarak MVA'nın geliştirilmesine olanak sağlar.

Daha güncel olarak, MVA'nın bilinen altı büyük silinmesini CVA'ya uygulama ile MVA'nın kalitelerini taşıyan bir modifiye edilmiş vaksiniya virüsü üretmeye teşebbüs edilmiştir. İlginç bir şekilde, bu, MVA'nın atenüe edilmiş kalitelerini taşıyan bir virüs ile sonuçlanmamıştır. Konak aralık genlerinin yokluğunun gözlenen atenüasyondan sorumlu olabileceği önerilmiştir, bununla birlikte, bu doğrulanmamıştır (bakınız, örneğin, Meyer *et al.*, *Journal of General Virology* (1991) 72:1031-1038).

Çiçek-virüsleri, bir büyük, lineer dsDNA genomu, bir sitoplazmik propagasyon yeri ve bir kompleks viriyon morfolojisi ile karakterize edilen virüslerin geniş bir familyasını oluşturur. Vaksiniya virüsü, virüsün bu grubunun temsili virüsüdür ve viral morfojeniz açısından en çok çalışılır. Vaksiniya virüsü viriyonlarının, iki yanında "lateral cisimler" yer alan bir çeperli, bikonkav çekirdek özelliği gösteren bir kompleks iç yapısı olan "tuğla-şekilli" veya "ovoid" membrana-bağlı parçacıklar olarak görülür. Viriyon birleşme yolu, immatür viriyonlara (IV'lere) gelişen ve akabinde matür viriyonlara (MV'lere) evrilen yarım ayları içeren membranın bir fabrikasyonunu içerir. 70'ten fazla spesifik gen ürünü, vaksiniya virüsü viriyonlarına dahil edilir, burada 50'den fazla spesifik gende mutasyonların vaksiniya virüsü birleşmesi üzerinde etkileri şimdi tarif edilir.

Vaksiniya virüsü, bunun yüzey membranlarının konak hücrenin plazma membranı ile füzyonu, böylece çekirdeği (ve lateral cisimleri) sitoplazma için salma ve virüsün transkripsiyonel programını aktive etme, ile hücrelere girer. Viriyon çekirdekleri, erken mRNA'nın sentezi ve modifikasyonu için gerekli olan virüs-kodlu enzimlerin tam komplemanını içerir. Erken genler, DNA propagasyonu için gerekli olan enzimleri kodlar ve böylelikle erken gen ekspresyon pikleri olarak, viral DNA propagasyonu, "fabrikalar" olarak adlandırılan sitoplazmik yerlerde meydana gelir. Erken genler ayrıca, ara transkripsiyon faktörlerini ve ara genleri de kodlar, nihayetinde, geç transkripsiyon faktörlerini kodlar, böylece ara ve geç genler, viral DNA propagasyonunun ön-koşul başlatılmasından sonra ardı ardına eksprese edilir. Böylelikle, viral genlerin tam

komplemanı, erken, ara ve geç sınıfların sınıf-spesifik transkripsiyonel promotörler ve viral olarak kodlanmış transkripsiyon faktörleri ile ayırt edilmesi ile bir temporal kaskadda transkribe edilir. Dahası, yalnızca çoğaltılmış genomlar, ara ve geç transkripsiyon için kompetan şablonlardır. Genlerin bu iki sınıfı birlikte, viriyon yapısal proteinlerini, viriyon enzimlerini ve birleşme faktörlerini kodlar ve yeni projeni virüs parçacıklarının birleşmesi için gereklidir.

Kısa bir süre sonra, viral alım ve erken ekspresyon enfeksiyon-spesifik sitoplazmik alanları hücre içinde oluşur, bunlar yoğunluk açısından tekdüzedir ve bazen, zamanla boyutu artan sisternalardan türetilen endoplazmik retikulum (ER) ile çevrelenir. Bu alanlar, viral DNA propagasyonu yerlerini temsil eder ve bunlar sıklıkla "viral fabrikalar" olarak adlandırılır.

Viral birleşme, viral fabrikalar içinde katı yarım ay-şekilli yapıların (üç boyutlu kadehçiklerin) oluşması ile başlar. Yüksek rezolüsyonlu elektron mikrograflarında, bu yarım ay şekilli yapıların dış katmanı, "spiküller" olarak adlandırılan düzenli şekilde aralıklandırılmış çıkıntılardan oluşturulur. Yarım aylar, immatür viriyonlar (IV) olarak adlandırılan kapalı daireler (üç boyutlu küreler) halinde gelene kadar aynı eğriliği idame ettirirken, boyları görünür bir şekilde artar. IV, yoğunluk açısından tekdüze olan, ancak çevreleyen fabrikaya kıyasla ayırt edilebilir bir şekilde elektron açısından daha yoğun olan "viroplazm" materyali ile doldurulur. IV'ler oluştukça, enkapsüle edilmiş DNA'nın alımı ayrıca aşağıdaki şekilde gerçekleşir: bunlar IV'ler içinde "nükleoid" olarak adlandırılan bir elektron açısından yoğun, yuvarlak veya ovoid alt-alanlar olarak elektron mikrograflarında görülür. Kondense olmuş DNA'nın nükleoidlerini içeren IV'ler, sıklıkla "IVN" olarak ifade edilir. Bir kaç viriyon protein öncülünün proteolitik klevaj *yoluyla* matürasyonu, IVN'nin matür viriyonlara (MV) morfojenezi için gereklidir. Matür viriyonların büyük çoğunluğu, dış fabrikalarda bulunur ve bir fabrikanın periferinde veya en yakın fabrikadan bir anlamlı mesafe ile görünür bir şekilde ayrılmış kümeler olarak var olabilir.

30

Çiçek virüsü viriyonları, üç enfeksiyöz formda var olur: matür viriyonlar (MV), sarılı viriyonlar (WV) ve ekstraselüler viriyonlar (EV). MV, virüsün en basit formudur, çekirdeğin konkvallıklarını dolduran, iki yanında lateral cisimler yer alan bir bikonkav, DNA-içeren çekirdek içeren membranlanmış parçacıklardır. MV normal olarak özellikle hücrelerin içinde bulunur ve yalnızca hücre lizisi ile serbest bırakılır. WV, trans-Golgi

35

sisternalarından türetilen iki ilave lipid ikili-katmanı ile çevrelenen MV'den oluşur. Dış membranları karakteristik viral proteinler içeren WV, EV'nin öncülleridir ve ayrıca hücre içinde de bulunur. EV, en dış WV membranının plazma membranı ile füzyonu, böylece bir ilave membran içinde sarılı bir MV'yi serbest bırakma *yoluyla* ekzositoz yapılmış olan WV'den oluşur. EV'nin bir fraksiyonu, hücre yüzeyine tutturulmuş olarak bulunurken, bazıları ekstraselüler ortam içinde serbest halde bulunur. EV'nin, virüsün bir organizma içinde yayılması için önemli olduğu düşünülür.

Esansiyel genlerin virüslerden uzaklaştırılması ve konak hücrelerde komplementasyon, tedavi ve terapi amacıyla güvenli ve etkili viral vektörler üretmek için bir genel önerilen strateji olarak teknikte bilinir. Arttırılmış güvenliği, ekspresyonu ve/veya immünojenisitesi olan iyileştirilmiş atenüe edilmiş orto-çiçek vektörlerine yönelik bir ihtiyaç ve bu tarz orto-çiçek vektörlerini güvenli ve ekonomik bir şekilde çoğaltmanın ve imal etmenin yöntemleri için orantılı bir ihtiyaç vardır.

Çok sayıda memeli hücre hattı, araştırma amaçları için rekombinant proteinlerin üretilmesi için kullanılır. Bunlar, tavşan, hamster, primat ve insan kaynaklı hücre hatlarını, örneğin, sınırlandırma olmaksızın ve teknikte bilindiği üzere, HEK293, 293T, 143B, CHO, HeLa, Vero ve BHK, HepG2 ve 3T3 hücrelerini içerir. Göze çarpan bir şekilde, bununla birlikte, rekombinant terapötik proteinlerin büyük çoğunluğunun GMP üretimi CHO hücrelerinde yapılmaktadır; bu durum, bu hücre hattını insan terapötikleri için en iyi şekilde çalışılmış ve onaylanmış hücre hattı yapmıştır. CHO hücreleri, süspansiyon kültürleri için çok yüksek yoğunluklara kadar büyüyebilir ve ürünleri saflaştırmak için aşağı akış prosesleri çok iyi geliştirilmiştir. İlgili olarak, ne vaksiniya, örneğin, vaksiniya-COP veya vaksiniya-WR ne de bunun türevleri, örneğin, MVA ve NYVAC, CHO hücrelerin çoğalacaktır.

Lokal viral promotörler ve çiçek viral RNA polimerazı kontrolü altında çiçek virüsünden viral konak aralık genlerinin ekspresyonu teknikte bilinir.

Viral replikasyonu kurtarmak veya viral replikasyona izin vermek ve konak hücresi sağ kalımına izin vermek için vakitli bir şekilde bir memeli hücresinin genomundan belirli viral konak aralık genlerinin ekspresyonu daha önceden tarif edilmemiştir.

KISA AÇIKLAMA

Mevcut spesifikasyon, bir çiçek-viral konak aralık faktörünü eksprese etmesi için transforme edilmiş *in vitro* kültürlenmiş memeli hücrelerini ve viral vektörleri çoğaltmak için, bu tarz hücreleri kültürlemeyi içeren, bir yöntemi tarif eder.

5

Bir birinci yönünde, mevcut buluş, bir modifiye edilmiş memeli hücresi sağlar, burada hücrenin genomu, bir promotör kontrolü altında CP77'yi kodlayan bir dizi içermesi için modifiye edilir, böylece modifiye edilmiş hücre hattı, modifiye edilmemiş hücrede daha az çoğalabilen veya hiç çoğalamayan bir çiçek virüsünün propagasyonunu sürdürür.

10

Bir ikinci yönünde, mevcut buluş, CHO hücrelerinde çoğalmayan bir orto-çiçek virüsünü çoğaltmak için, çiçek virüsünün bir memeli hücre hattında *in vitro* çoğaltılmasını içeren, bir proses sağlar, burada hücre hattı, CP77'yi kodlaması ve bir promotör kontrolü altında eksprese etmesi modifiye edilir.

15

Çeşitli alternatif uygulamalarda, modifiye edilmiş hücreler ilaveten, bir promotör kontrolü altında D13L'yi kodlayan bir dizi içermesi ve/veya bir promotör kontrolü altında K1L'yi kodlayan bir dizi içermesi için modifiye edilir.

20

Burada "CP77", "K1L" ve "D13L" atıfları, fonksiyonel ortologları ve fonksiyonel varyantları içerir.

ÖZEL UYGULAMALARIN DETAYLI AÇIKLAMASI

25

Söz konusu buluş, özel prosedürler veya ajanlar, ajanların spesifik formülasyonları ve çeşitli tıbbi metodolojiler ile sınırlı değildir, böyle olunca da çeşitlilik gösterebilir. Burada kullanılan terminoloji, yalnızca özel uygulamaları tarif etme amacı taşır ve sınırlayıcı olması amaçlanmaz. Aksi tanımlanmadıkça, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, bu buluşun ait olduğu teknikte normal uzmanlığı olan bir kişi tarafından yaygın

30

bir şekilde anlaşılan ile aynı anlama sahiptir.

Burada tarif edilenlere benzer veya eş-değer herhangi bir materyal ve yöntem, mevcut buluşu tatbik etmek veya test etmek için kullanılabilir. Tatbik edenler özellikle aşağıdakilere yönlendirilir: Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, N.Y.; Ausubel *et al.*, (1999)

35

Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York; Murphy *et al.*, (1995) *Virus Taxonomy* Springer Verlag:79-87, Mahy Brian WJ and Kangro O Hillar (Eds): *Virology Methods Manual* 1996, Academic Press; ve Davison AJ and Elliott RM (Eds): *Molecular Virology, A practical Approach* 1993, IRL Press at Oxford University Press; Perkus *et al.*, *Virology* (1990) 179(1):276-86 veya tekniğin tanımları ve terimleri ve teknikte uzmanlığı olan kişi tarafından bilinen diğer yöntemler.

Burada tarif edilenlere benzer veya eş-değer herhangi bir yöntemin ve materyalin mevcut buluşun tatbikinde veya test edilmesinde kullanılabilmesine rağmen, terchi edilen yöntemler ve materyaller tarif edilir. Mevcut buluşun amaçları için, aşağıdaki terimler, aşağıda tanımlanır.

Bu spesifik boyunca, bağlam aksini gerektirmedikçe, "içermek", "içerir" ve "içeren" sözcüklerinin, bir ifade edilen adımın veya elemanın veya adımlar veya elemanlar grubunun dahil edilmesini, ancak herhangi bir başka adımın veya elemanın veya adımlar veya elemanlar grubunun dışlanmamasını gösterdiği anlaşılabilecektir. Böylelikle, "içeren" teriminin ve benzerlerini kullanımı, listelenen elemanların gerektiğini veya mecburi olduğunu, ancak diğer elemanların opsiyonel olduğunu ve bulunabileceğini veya bulunamayacağını gösterir. Atenüe edilmiş orto-çiçek vektörleri bağlamında, söz konusu vektörler, bir esansiyel matürasyon veya birleşme geninin silinmesini, bununla birlikte, örneğin, vektöre bir antijenin veya başka proteinin kapsanması için, ilave modifikasyonu içermek ile atenüasyon için modifiye edilir.

"Oluşan" ile, "oluşan" ifadesini takip edenleri içerdiği ve bunlarla sınırlı olduğu kastedilir. Böylelikle, "oluşan" ifadesi, listelenen elemanların gerektiğini veya mecburi olduğunu ve başka elemanların bulunamayacağını gösterir. "Esas olarak oluşan" ile, ifadesinden sonra listelenen herhangi bir elemanı içerdiği ve listelenen elemanlar için açıklamada belirtilen aktiviteye veya etkiye müdahale etmeyen veya katkı sağlamayan diğer elemanlar ile sınırlı olduğu kastedilir. Böylelikle, "esas olarak oluşan" ifadesi, listelenen elemanların gerektiğini veya mecburi olduğunu, ancak diğer elemanların opsiyonel olduğunu ve bunların listelenen elemanların aktivitesini veya etkisini etkileyip etkilememesine bağlı olarak bulunabileceğini veya bulunamayacağını gösterir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "bir", "biri" ve "bu" tekil formları, bağlam açık bir şekilde aksini söylemedikçe, çoğul yönleri de içerir. Böylelikle, örneğin, "bir hücre" atfı, bir tek hücreyi aynı zamanda iki veya daha fazla hücreyi içerir; "bir organizma" atfı, bir organizmayı aynı zamanda iki veya daha fazla organizmayı içerir; ve benzeri. Bazı uygulamalarda, "biri", "bir veya birden fazla" anlamına gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "ve/veya", ilişkili listelenen maddelerin birinin veya birden fazlasının herhangi bir ve tüm olası kombinasyonlarını aynı zamanda alternatif (veya) şeklinde yorumlandığında kombinasyonların yokluğunu ifade eder ve kapsar.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "atenüasyon" veya "atenüe edilmiş", viral vektör virülansında bir düşüş anlamına gelir. Virülans, bir virüsün bir özel konakta hastalığa neden olma yetisi olarak tanımlanır. Enfeksiyöz virüsleri üretemeyen bir çiçek-viral vektör başlangıçta hücreleri enfekte edebilir, ancak büyük ölçüde konak içinde kendi kendine tamamen kopyalayamaz veya çoğalamaz veya bir rahatsızlığa neden olamaz. Bu, vektör bunun proteinini veya nükleik asidini konak hücre sitoplazmasına aktardığından, ancak süjeye zarar vermediğinden, arzu edilebilir.

"Kontrol elemanı" veya "kontrol dizisi" ile, bir özel çiçek virüsü, vektör, plazmid veya hücre içinde bir operatif olarak bağlanmış kodlama dizisinin ekspresyonu için gerekli olan nükleik asit dizileri (örneğin, DNA) kastedilir. Ökaryotik hücreler için uygun olan kontrol dizileri, transkripsiyonel kontrol dizilerini, örneğin, promotörleri, poliadenilasyon sinyallerini, transkripsiyonel hızlandırıcıları, translasyonel kontrol dizilerini, örneğin, translasyonel hızlandırıcıları ve iç ribozom bağlama yerlerini (IRES), mRNA kararlılığını modüle eden nükleik asit dizilerini aynı zamanda bir transkribe edilmiş polinükleotid tarafından kodlanan bir ürünü bir hücre içindeki bir intraselüler kompartımana veya ekstraselüler ortama hedefleyen hedefleme dizilerini içerir.

Diziler sağlandığında, karşılık gelen diziler kapsanır. "Karşılık gelir" "karşılık gelen" veya "-e karşılık gelen" ile, bir referans nükleik asit dizisine büyük ölçüde dizi özdeşliği (örneğin, referans nükleik asit dizisinin tümünü veya bir kısmına en az yaklaşık %50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 veya hatta en fazla %100 dizi özdeşliği) gösteren bir nükleik asit dizisi veya bir referans amino asit dizisine büyük ölçüde dizi benzerliği veya özdeşliği (örneğin,

35

referans amino asit dizisinin tümüne veya bir kısmına en az %50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 veya hatta en fazla %100 dizi benzerliği veya özdeşliği) gösteren bir amino asit dizisi kastedilir.

Bir rahatsızlığı tedavi etme veya önleme bağlamında veya bir hedef antijene veya organizmaya bir immün yanıtı modüle etmek için, "etkili miktar" ile, bir ajanın (örneğin, burada tarif edildiği üzere bir atenüe edilmiş orto-çiçek vektörünün) veya bunu içeren bileşimin bu tarz tedaviye veya profilaksiye ihtiyacı olan bir bireye, bir tek doz halinde veya bir serinin parçası olarak, bu rahatsızlığın bir semptomuna yakalanmanın önlemesi, bu tarz semptomlarının kontrol altında tutulması ve/veya var olan semptomlarının tedavi edilmesi için veya hedef antijene veya organizmaya immün yanıtı modüle etmek için etkili olan bir miktarının uygulanması kastedilir. Etkili miktar, tedavi edilecek olan bireyin sağlığına ve fiziksel rahatsızlığına, tedavi edilecek olan bireyin taksonomik grubuna, bileşimin formülasyonuna, tıbbi durumun değerlendirilmesine ve diğer ilgili faktörlere bağlı olarak çeşitlilik gösterecektir. Miktarın, rutin denemeler yoluyla belirlenebilen bir görece geniş aralık içinde yer alması beklenir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "kodlamak", "kodlayan" ve benzeri terimler, bir nükleik asidin bir başka nükleik asit veya bir polipeptit sağlama kapasitesini ifade eder. Örneğin, bu polipeptit üretmek için transkribe edilebildiğinde ve/veya aktarılabildiğinde veya bu polipeptit üretmek için transkribe edilebilen ve/veya aktarılabilen bir forma işlenebildiğinde, bir nükleik asit dizisinin bir polipeptidi "kodladığı" söylenir. Bu tarz bir nükleik asit dizisi, bir kodlama dizisi veya hem bir kodlama dizisi hem de bir kodlamayan dizi içerebilir. Böylelikle, "kodlamak", "kodlayan" ve benzeri terimler, bir DNA molekülünün transkripsiyonundan kaynaklanan bir RNA ürününü, bir RNA molekülünün translasyonundan kaynaklanan bir proteini, bir DNA molekülünün bir RNA ürünü oluşturmak için transkripsiyonundan ve RNA ürününün müteakip translasyonundan kaynaklanan bir proteini veya bir DNA molekülünün bir RNA ürünü sağlamak için transkripsiyonundan, RNA ürününün bir işlenmiş RNA ürünü (örneğin, mRNA) sağlamak için işlenmesinden ve işlenmiş RNA ürününün müteakip translasyonundan kaynaklanan bir proteini içerir.

"Endojen" terimi, bir konak organizma içinde normal olarak bulunana bir gen veya nükleik asit dizisini veya segmentini ifade eder.

5 "Eksprese edilebilen", "eksprese edilmiş" terimleri ve bunların varyasyonları, bir hücrenin bir nükleotid dizisini RNA'ya transkribe etme ve opsiyonel olarak mRNA'yı bir biyolojik veya biyokimyasal fonksiyon sağlayan bir peptit veya polipeptit sentezlemek için aktarma yetisini ifade eder.

10 Burada kullanıldığı şekliyle, "gen" terimi, opsiyonel olarak bu prosese yardım eden elemanların eklenmesi ile mRNA üretmek için kullanılabilmekte olan bir nükleik asit molekülünü içerir. Genler, bir fonksiyonel protein üretmek için kullanılabilmekte olabilir veya olmayabilir. Genler, hem kodlayan hem de kodlamayan bölgeler (*örneğin*, intronlar, regülatör elemanlar, promotörler, hızlandırıcılar, sonlandırma dizileri ve 5' ve 3' aktarılmamış bölgeler) içerebilir.

15 "Heterolog nükleik asit dizisi", "heterolog nükleotid dizisi", "heterolog polinükleotid", "yabancı polinükleotid", "ekzojen polinükleotid" ve benzeri terimler, deneysel manipülasyonlar ile bir organizmanın genomu içine uygulanan herhangi bir nükleik asidi (*örneğin*, bir IRES içeren bir nükleotid dizisini) ifade etmek için birbiri yerine 20 kullanılır ve uygulanan genin modifikasyondan önceki viral genomik diziye kıyasla bazı modifikasyonlar (*örneğin*, bir nokta mutasyonu, en az bir nükleotidin silinmesini, substitüsyonunu veya eklenmesini, bir endonükleaz klevaj yerinin varlığını, bir loxP yerinin varlığını, vb.) içermesi kaydıyla bu organizmada bulunan gen dizilerini içerebilir.

25 "Heterolog polipeptit", "yabancı polipeptit" ve "ekzojen polipeptit" terimleri, yukarıda tanımlandığı üzere, bir "heterolog nükleik asit dizisi", "heterolog nükleotid dizisi", "heterolog polinükleotid", "yabancı polinükleotid" ve "ekzojen polinükleotid" ile kodlanan herhangi bir peptidi veya polipeptidi ifade etmek için birbiri yerine kullanılır.

30 "Memeli hücresi" terimi, çiçek-virüsü vektörünü çoğaltmak amacıyla buluşun atenué edilmiş orto-çiçek vektörünü içeren bir vektörün bunun içine uygulanabildiği bir hücre anlamına gelir. Bir uygulamada, hücre bir sürekli hücre hattıdır. Modifiye edilmiş hücrenin sürekli olarak bölünebilen bir hücre hattı olması daha az mecburidir. Bir memeli veya daha yüksek ökaryotik hücre, mevcut buluşa uygun şekilde modifiye 35 edilebilir ve bunu takiben bir sürekli olarak bölünen hücre hattı haline gelmesi için

transforme edilebilir veya ölümsüz hale getirilebilir. Bununla birlikte, modifikasyondan önce hücre, teknikte bilinen, kolay bir şekilde bir iyi karakterize edilmiş ve sürekli olarak bölünen biyoteknoloji uyumlu sürekli hücre hattıdır. Bu tarz hücrelere kolaylıkla, depolama kuruluşlarından, örneğin, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) veya Avrupa Hücre Kültürleri Koleksiyonu'ndan (ECACC), erişilebilir.

Uygun memeli hücre hatları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, ATCC'den erişilebilen, RK18, BHK, VERO, HBOC-143B, HaCat, HepG2, HeLa, HT1080, HEK-293, RD, COS-7, CHO, Jurkat, HUT, SUPT, C8166, MOLT4/klon8, MT-2, MT-4, H9, PM1, CEM, miyelom hücreleri (örneğin, SB20 hücrelerini) ve CEMX174'ü içerir.

Heterolog genleri eksprese eden modifiye edilmiş hücre hatları üretmek için teknikte bilinen herhangi bir genom mühendisliği yöntemi kullanılabilir. Genleri piggyBac vektörleri kullanılması ile hücresel genom içine yerleştirmek için transpozon teknolojisinin kullanılmasına atıf yapılır. Bununla birlikte, geni hücrelere uygulamak için, sınırlandırma olmaksızın, retrovirüs transdüksiyonunu (örneğin, MOMLV, vb.), lentivirüs transdüksiyonunu, plazmid transfeksiyonunu ve entegrasyonunu, hücre hatlarını aktarmak için başka viral sistemi, örneğin, Adenovirüs, AAV'yi (Adenovirüs ilişkili Virüsü), EBV'yi ve lineer DNA ile homolog rekombinasyon ile yer spesifik içeri yerleştirme için genom düzeltme tekniklerini, mühendislik uygulanmış meganükleazları, transkripsiyon-aktivatör benzeri efektör nükleazları (TAL-nükleazını), Çinko-fermuarı-nükleazlarını (ZFN'leri) ve CRISPR'leri, içeren, çok sayıda yöntem bilinir.

Bir uygulamada, memeli hücresi, bir CHO hücresidir. Viral konak ad genlerini kodlamayan, önceki tekniğin CHO hücre hatları, insanlarda büyük ölçüde çoğalamayan vaksiniyanın veya vaksiniya türevlerinin imalatını desteklemez. Teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilindiği üzere, hamsterın, *Cricetulus griseus*, overinden türetilen, Çin hamsterı over (CHO) hücreleri, antikorları içeren rekombinant protein terapötiklerinin biyo-endüstriyel ve GMP üretimi için en yaygın şekilde kullanılan memeli hücresidir. Bu amaç için CHO hücrelerinin popülaritesi, kısmen, bunların çabuk büyümesinden ve yüksek protein üretiminden köken alır. Bunun sonucu olarak, CHO hücre hatları iyi karakterize edilmiştir. Uygun CHO hücre hatları, sınırlandırma olmaksızın, A2, A2H, XrS6, CHO-K1, CHO/dhfr, RR-CHO-K1, UT-I, P22, CHO-1C6, Lec1, Lec2, Lec8, Pro-5 ve CDKXB1 hatlarını içerir. ATCC CLL-61 veya ATCC CRL-9618 Erişim Numarası altında ATCC ile depolanan CHO-K1 hücre hattı sıklıkla kullanılır. CHO-K1 hücre hattı,

Puck T. (1957) tarafından bir erişkin Çin hamsterinin bir overinin bir biyopsisinden başlatılan parental CHO hücre hattından bir alt-klon olarak türetilmiştir. Mevcut spesifikasyon, modifiye edilmiş CHO hücrelerinden ziyade modifiye edilmiş hücreleri tarif eder.

5

Bazı uygulamalarda, memeli hücresi, bir insan hücresidir, bir primat hücresidir, bir hamster hücresidir veya bir tavşan hücresidir.

Hücreler, tek-hücreli olabilir veya sıvı kültürler, tek-katmanlar veya benzerleri olarak doku kültürü içinde büyütülebilir. Konak hücreler ayrıca, dokulardan doğrudan veya dolaylı olarak da türetilir veya hayvanları içeren bir organizma içinde de bulunabilir.

10

Burada tasarlandığı üzere bir immün yanıtı "indüklemenin", bir immün yanıt meydana getirmeyi veya stimüle etmeyi ve/veya bir önceden var olan immün yanıtı güçlendirmeyi içerdiği anlaşılabacaktır.

15

Burada kullanıldığı şekliyle, "iç ribozomal giriş geri" veya "IRES" terimi, iç ribozomal giriş yerinin aşağı akış (*yani*, 3' ucunda) yer olan bir operatif olarak bağlanmış kodlama bölgesinin translasyonunu sağlamak için, aynı mRNA içinde bir kodlama bölgesinin içindeki bir yerde veya mRNA'nın 5' ucunun 3' tarafındaki bir yerde bir mRNA'nın translasyonunu başlatmaya olanak sağlayan bir viral, hücresel veya sentetik (*örneğin*, rekombinant) nükleotid dizisini ifade eder. Bu, translasyonu 5' başlık yapısından bağımsız ve mRNA'nın 5' ucundan bağımsız hale getirir. Bir IRES dizisi, bir operatif olarak bağlanmış kodlama bölgesinin translasyonunun başlatılması için ihtiyaç duyulan gerekli *cis*-etki eden diziler sağlar.

20

25

Burada kullanıldığı şekliyle, "izole edilmiş" teriminin, burada bileşiğin doğal olarak içinde bulunduğu farklı bir ortamda olan bir hücreyi, söz konusu bir bileşiği (*örneğin*, bir rekombinant çiçek-virüsünü, bir nükleik asit molekülünü, *örneğin*, bir genomu, bir polipeptidi, *vb.*) tarif etmesi kastedilir. "İzole edilmiş" teriminin, söz konusu bileşik için büyük ölçüde zenginleştirilmiş ve/veya burada söz konusu bileşiğin kısmen veya büyük ölçüde saflaştırıldığı örnekler içindeki bileşikler içermesi kastedilir.

30

Burada kullanıldığı şekliyle, "operatif olarak bağlı" veya "operatif olarak bağlanmış" terimi, bir jukstapozisyonu ifade eder, böylece bu şekilde tarif edilen bileşenler, bunların

35

hedeflenen şekilde fonksiyon göstermesine izin veren bir ilişki içindedir. Örneğin, bir kodlama dizisine "operatif olarak bağlanmış" transkripsiyonel kontrol dizisi, transkripsiyonel kontrol dizisi ile uyumlu koşullar altında kodlama dizisinin ekspresyonuna izin vermesi için kodlama dizisine kıyasla transkripsiyonel kontrol

5 dizisinin konumlandırılmasını ve/veya oryantasyonunu ifade eder. Bir başka örnekte, bir orto-çiçek virüsü kodlama dizisine operatif olarak bağlı bir IRES, orto-çiçek virüsü kodlama dizisinin başlıktan bağımsız translasyonuna izin vermesi için orto-çiçek virüsü kodlama dizisine kıyasla IRES'in konumlandırılmasını ve/veya oryantasyonunu ifade eder.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "açık okuma çerçevesi" ve "ORF", bir kodlama dizisinin translasyon başlatma ve sonlandırma kodonları arasında kodlanan amino asit dizisini ifade etmek için burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır. "Başlatma kodonu" (örneğin, ATG) ve "sonlandırma kodonu" (örneğin, TGA, TAA, TAG), bir kodlama dizisi

15 içinde protein sentezinin (mRNA translasyonunun) sırasıyla başlatılmasını ve zincir sonlandırılmasını belirten bitişik üç nükleotidlik bir birimi ('kodon') ifade eder.

20

Burada kullanıldığı şekliyle, "ana virüs" teriminin, mevcut buluşun bir rekombinant virüsünü oluşturmak için heterolog nükleik asit dizisini katması için modifiye edilen bir virüse bir atıf olduğu anlaşılabacaktır.

25

Burada kullanıldığı şekliyle, "polinükleotid", "polinükleotid dizisi", "nükleotid dizisi", "nükleik asit" veya "nükleik asit dizisi, mRNA'yı, RNA'yı, cRNA'yı, cDNA'yı veya DNA'yı gösterir. Terim tipik olarak, en az 10 baz uzunluğunda, ribonükleotidler veya deoksiribonükleotidler veya nükleotidin her bir tipinin bir modifiye edilmiş formu olan, nükleotidlerin polimerik formunu ifade eder. Terim, RNA'nın veya DNA'nın tek ve çift sarmallı formlarını içerir.

30

"Polipeptit", "peptit", "protein" ve "proteinli molekül", amino asit rezidülerinin bir polimerini içeren veya bundan oluşan molekülleri ve bunların varyantlarını ve sentetik analoglarını ifade etmek için burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır. Böylelikle, bu terimler, burada bir veya birden fazla amino asit rezidüsünün sentetik doğal-oluşumlu olmayan amino asitler, örneğin, bir karşılık gelen doğal oluşumlu amino asidin bir kimyasal analogu, olduğu amino asit polimerleri aynı zamanda doğal-oluşumlu amino asit polimerleri için geçerlidir.

35

Burada kullanıldığı şekliyle, "nükleik asit molekülleri", "polinükleotidler" ve benzerleri için kullanılan "rekombinant" teriminin, konak hücrelerde veya burada tarif edilen hücresiz sistemlerde transkribe edilebilen ve/veya aktarılabilen yapay nükleik asit yapıları (*yani*, kopyalamayan cDNA veya RNA; veya replikonlar, kendi kendini kopyalayan cDNA veya RNA) anlamına geldiği anlaşılr. Rekombinant nükleik asit molekülleri veya polinükleotidler, bir vektör içine yerleştirilebilir. Viral-olmayan vektörler, örneğin, plazmid ekspresyon vektörleri veya viral vektörler, kullanılabilir. Bu buluşa göre nükleik asit yapısının içeri yerleştirilmesinin vektörler çeşidi ve tekniği uzman kişi tarafından bilinir. Buluşa göre bir nükleik asit molekülü veya polinükleotid, mevcut buluş tarafından tarif edilen dizilimde doğada bulunmaz. Bir başka ifadeyle, bir heterolog nükleotid dizisi, bir ana virüs genomunun elemanları (*örneğin*, promotör, ORF, poliadenilasyon sinyali, ribozim) ile doğal olarak birleştirilmez.

Burada kullanıldığı şekliyle, "rekombinant virüs" teriminin, en az bir heterolog nükleik asit dizisi içeren bir "ana virüs" için bir atıf olduğu anlaşılacaktır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "dizi özdeşliği" terimi, bir karşılaştırma penceresi boyunca bir nükleotid-nükleotid temelinde veya bir amino asit-amino asit temelinde dizilerin ne dereceye kadar özdeş olduğunu ifade eder. Böylelikle, bir "dizi özdeşliğinin yüzdesi", karşılaştırma penceresi boyunca iki optimal olarak hizalanmış diziyi karşılaştırma, eşleşmiş pozisyonların sayısını elde etmek için burada özdeş nükleik asit bazının (*örneğin*, A, T, C, G, I) veya özdeş amino asit rezidüsünün (*örneğin*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys ve Met) her iki dizide bulunduğu pozisyonların sayısını belirleme, eşleşmiş pozisyonların sayısını karşılaştırma penceresi içindeki toplam pozisyon sayısına (*yani*, pencere boyutuna) bölme ve dizi özdeşliğinin yüzdesini elde etmek için sonucu 100 ile çarpma ile hesaplanır. Mevcut buluşun amaçları için, "dizi özdeşliği" teriminin, yazılıma eşlik eden referans manüelden kullanıldığı üzere standart varsayılan parametreler kullanılarak DNASIS bilgisayar programı (Windows için Versiyon 2.5; Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, ABD firmasından erişilebilir) ile hesaplanan "eşleşme yüzdesi" anlamına geldiği anlaşılacaktır.

"Sinyal dizisi" veya "sinyal peptidi terimleri, bir proteinin sitozolden belirli organellere, örneğin, mesela, nükleusa, mitokondriyal matrikse ve endoplazmik retikuluma, ko- veya

post-translasyonel taşınmasını yönlendiren bir kısa (yaklaşık 3 ila yaklaşık 60 amino asit uzunluğundaki) peptidi ifade eder. Bir ER hedefleme sinyal peptidine sahip olan proteinler için, sinyal peptitler tipik olarak, proteinler ER'ye taşındıktan sonra, sinyal peptidazı ile öncül formda yarılr ve elde edilen proteinler sekretuvar yol boyunca bunların intraselüler (örneğin, Golgi cisimciği, hücre membranı veya hücre duvarı) veya ekstraselüler lokasyonlarına hareket eder. Burada kullanıldığı şekliyle, "ER hedefleme sinyal peptitleri", ER membranı yoluyla proteinin parçasının veya tümünün ER'nin lümeni içine yerleştirilmesini takiben genellikle enzimatik olarak uzaklaştırılan amino-ucu hidrofobik dizileri içerir. Böylelikle, bir dizinin bir sinyal öncül formunun bir proteinin bir öncül formunun parçası olarak bulunabileceği, ancak genellikle proteinin matür formunda bulunmayacağı teknikte bilinir.

"Benzerlik", aşağıda Tablo A'da tanımlandığı üzere özdeş olan veya konservatif süstitüsyonları oluşturan amino asitlerin yüzde numarasını ifade eder. Benzerlik, dizi karşılaştırma programları, örneğin, GAP (Deveraux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12: 387-395) kullanılarak belirlenebilir. Böylelikle, burada alıntı yapılanlar için bir benzer veya büyük ölçüde farklı uzunluktaki diziler, hizalama içine boşlukların yerleştirilmesi ile karşılaştırılabilir, bu tarz boşluklar, örneğin, GAP tarafından kullanılan karşılaştırma algoritması ile, belirlenir.

20

TABLO A: Emsal Konservatif Amino Asit Süstitüsyonları

Orijinal Rezidü	Emsal Süstitüsyonlar
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln

Orijinal Rezidü	Emsal Süstitüsyonlar
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile,
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Bir karşılaştırma penceresini hizalamak için dizilerin optimal hizalanması, algoritmaların bilgisayarlı uygulamaları (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0'de, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA, GAP, BESTFIT, FASTA ve TFASTA) ile veya inceleme ve seçilen çeşitli yöntemlerin herhangi biri ile üretilen (*yani*, karşılaştırma penceresi boyunca en yüksek yüzdeli homoloji ile sonuçlanan) en iyi hizalama ile yürütülebilir. Referans ayrıca, örneğin, Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.*25:3389, kaynağında açıklanan, programların BLAST familyasına da yapılabilir. Dizi analizinin detaylı bir tartışması, Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15, kaynağının Unit 19.3'ünde bulunabilir.

Burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılan "süje", "hasta", "konak" veya "birey" terimleri, bunun için terapinin veya profilaksinin arzu edildiği herhangi bir süjeyi, özellikle bir omurgalı süjeyi ve hatta daha özel olarak bir memeli süjeyi, ifade eder. Buluşun kapsamı içinde kalan uygun omurgalı hayvanlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, primatları (*örneğin*, insanları, maymunları ve şebekleri ve maymunların türlerini, *Macaca* cinsinden (*örneğin*, sinomolgus maymunlarını, *örneğin*, *Macaca fascicularis* ve/veya rhesus maymunlarını (*Macaca mulatta*)) ve babunları (*Papio ursinus*) aynı zamanda marmosetleri (*Callithrix* cinsinden türleri), sincap maymunlarını (*Saimiri* cinsinden türleri) ve pembe maymunları (*Saguinus* cinsinden türleri) aynı

zamanda şebeklerin türlerini, örneğin, şempanzeleri (*Pan troglodytes*) içerir), kemirgenleri (örneğin, fareleri, sıçanları, gine domuzlarını), lagomorfları (örneğin, tavşanları, yabani tavşanları), bovinleri (örneğin, sığırları), küçükbaşları (örneğin, koyunları), keçigilleri (örneğin, keçileri), domuzgilleri (örneğin, domuzları), ekuinleri (örneğin, atları), kaninleri (örneğin, köpekleri), felinleri (örneğin, kedileri), kuşgilleri (örneğin, tavukları, hindileri, ördekleri, kazları, evcil kuşları, örneğin, kanaryaları, muhabbet kuşlarını, vb.), deniz memelilerini (örneğin, yunusları, balinaları), sürüngenleri (yılanları, kurbağaları, kertenkeleleri, vb.) ve balıkları içeren Chordata alt-şubesinin herhangi bir üyesini içerir. Tercih edilen bir süje, bir rahatsızlığın tedavisine veya profilaksisine ihtiyacı olan bir insandır. Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen terimlerin semptomların var olduğunu ima etmediği anlaşılabacaktır.

"Transgen" terimi, bir konak organizmanın bir genomu içine yapay olarak uygulanmış veya uygulanmak üzere olan ve bu konağın projesine aktarılan genetik materyali tarif etmek için burada kullanılır. Bazı uygulamalarda, bu, burada bunun içine uygulandığı bir memeli hücrelerine veya bir orto-çiçek vektörüne arzu edilen özelliği sağlar veya başka durumda arzu edilen bir terapötik veya tanısal sonuca yol açar.

Burada kullanıldığı şekliyle, "tedavi", "tedavi etme" ve benzeri terimler, arzu edilen bir farmakolojik ve/veya fizyolojik etkiyi elde etmeyi ifade eder. Etki, bir hastalığı veya bunun semptomunu tamamen veya parsiyel olarak önleme açısından profilaktik olabilir ve/veya bir hastalık ve/veya hastalığa atfedilebilen advers etki için bir parsiyel veya tam kür açısından terapötik olabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "tedavi", bir memelide, özellikle bir insanda, bir hastalığın herhangi bir tedavisini kapsar ve aşağıdakileri içerir:

(a) hastalığa yatkın olabilen ancak henüz buna sahip olduğu şeklinde tanı koyulmamış olan bir süjede hastalığın gerçekleşmesini önleme; (b) hastalığı inhibe etme, yani, bunun gelişmesini durdurma; ve (c) hastalığı rahatlatma, yani, hastalığın regresyonuna neden olma.

Bir organizma, polipeptit veya nükleik asit dizisi açısından "doğal-suş", "doğal", "natif" ve benzeri terimler için, bu organizma, polipeptit veya nükleik asit dizisi doğal oluşumludur veya değiştirilmemiş, mutasyona uğratılmamış veya başka şekilde insan eli ile manipüle edilmemiş en az bir doğal oluşumlu organizmada mevcuttur.

Varyantlar, bir referanslanmış moleküle veya bunların komplementer formlarına bunun tümü veya parçası boyunca yeterli şekilde benzer olan, böylece selektif hibridizasyonun orta derecede veya yüksek derecede zorlayıcı koşullar altında başarılabildiği veya en az yaklaşık 15 nükleotid içeren bir karşılaştırma penceresi boyunca bir referanslanmış çiçek-virüsü konak aralık faktörünü tanımlayan nükleotid dizilerine yaklaşık %60 ila %90 veya %90 ila 98 dizi özdeşliğine sahip olan, nükleik asit moleküllerini içerir. Tercihen, hibridizasyon bölgesi, yaklaşık 12 ila yaklaşık 18 veya daha fazla nükleobaz uzunluğundadır. Tercihen, bir özel nükleotid dizisi ve referans dizi arasındaki yüzde özdeşlik, en az yaklaşık %80 veya %85 veya daha tercihen yaklaşık %90 veya daha fazla, örneğin, yaklaşık %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla, benzerdir. %80 ila %100 aralığındaki yüzde özdeşlikleri kapsar. Nükleotid dizisinin uzunluğu, bunun önerilen fonksiyonuna bağlıdır. Homologlar kapsar. "Homolog", "homolog genler" veya "homologlar" terimleri geniş bir şekilde, diğer türlerden olanları içeren fonksiyonel ve yapısal olarak ilgili molekülleri ifade eder. Homologlar ve ortologlar, varyantların örnekleridir.

Nükleik asit dizisi özdeşliği, aşağıdaki şekilde belirlenebilir. Söz konusu nükleik asit dizisi, BLASTM programı versiyon 2.1 (Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402, kaynağına göre) kullanılarak, bir nükleik asit dizisi veri tabanını, örneğin, Genbankası veri tabanını (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> internet sitesinden erişilebilir), araştırmak için kullanılır. Program, boşluk-oluşturulmamış modda kullanılır. Varsayılan filtreleme, düşük karmaşıklık bölgelerinden kaynaklanan dizi homologilerini uzaklaştırmak için kullanılır. BLASTM'nin varsayılan parametreleri kullanılır.

Amino asit dizisi özdeşliği, aşağıdaki şekilde belirlenebilir. Söz konusu polipeptit dizisi, BLASTP programı kullanılarak, bir polipeptit dizisi veri tabanını, örneğin, Genbankası veri tabanını (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> internet sitesinden erişilebilir), araştırmak için kullanılır. Program, boşluk-oluşturulmamış modda kullanılır. Varsayılan filtreleme, düşük karmaşıklık bölgelerinden kaynaklanan dizi homologilerini uzaklaştırmak için kullanılır. BLASTP'nin varsayılan parametrelerinden yararlanılır. Düşük karmaşıklık dizileri için filtreleme, SEG programını kullanabilir.

Tercih edilen diziler, zorlayıcı koşullar altında bir referans diziyeye veya bunun komplemanına hibridize olacaktır. "Zorlayıcı koşullar altında hibridize olmak" terimi ve bunun dilsel eş-değerleri, bir nükleik asit molekülünün tanımlanmış sıcaklık ve tuz

konsantrasyonu koşulları altında bir hedef nükleik asit molekülüne (örneğin, bir DNA veya RNA blotu, örneğin, bir Southern blot veya Northern blot, üzerine immobilize edilmiş bir hedef nükleik asit molekülüne) hibridize olma yetisini ifade eder. Yaklaşık 100 bazdan daha uzun olan nükleik asit molekülüleri açısından, tipik zorlayıcı 5 hibridizasyon koşulları, natif dubleksin erime sıcaklığının (T_m) en fazla 25°C ila 30°C (örneğin, 10°C) altındadır (bakınız, genel olarak, Sambrook *et al.*, (yukarıda); Ausubel *et al.*, (1999)). Yaklaşık 100 bazdan daha uzun olan nükleik asit molekülüleri için T_m , $T_m = 81,5 + \%0,41 (G+C-\log (Na^+))$ formülü ile hesaplanabilir. 100 bazdan daha kısa olan nükleik asit molekülüleri açısından, emsal zorlayıcı hibridizasyon koşulları T_m 'nin 5°C ila 10 10°C altındadır.

Mevcut bağlamda "silinme" terimi, hedef genin kodlama bölgesinin tümünün veya parçasının uzaklaştırılmasıdır. Terim ayrıca, hedef genin gen ekspresyonunu kesip 15 çıkaran veya kodlanan proteinin düzeyini veya aktivitesini kesip çıkaran veya büyük ölçüde aşağı yönde regüle eden mutasyonun veya transformasyonun herhangi bir formunu da kapsar.

"Gen" atfı, ekzonlara veya bir genin açık okuma çerçevesine karşılık gelen DNA'yı içerir. Burada bir "gen" atfının ayrıca aşağıdakileri de içerdiği sayılır: transkripsiyonel 20 ve/veya translasyonel regülatör dizilerden ve/veya bir kodlama bölgesinden ve/veya aktarılmamış dizilerden (yani, intronlardan, 5'- ve 3'-aktarılmamış dizilerden) oluşan bir klasik genomik gen; veya genin kodlama bölgelerine (yani, ekzonlara) ve 5'- ve 3'-aktarılmamış dizilerine karşılık gelen mRNA veya cDNA.

25 "Regülatör eleman" veya "regülatör dizi" ile, bir özel konak hücrede bir operatif olarak bağlanmış kodlama dizisinin ekspresyonu için gerekli olan nükleik asit dizileri (örneğin, DNA) kastedilir. Prokaryotik hücreler için uygun olan regülatör diziler, örneğin, bir promotörü ve opsiyonel olarak bir cis-etki eden diziye, örneğin, bir operatör dizisini ve bir ribozom bağlama yerini içerir. Ökaryotik hücreler için uygun olan kontrol dizileri, 30 promotörleri, poliadenilasyon sinyallerini, transkripsiyonel hızlandırıcıları, translasyonel hızlandırıcıları, mRNA kararlılığını modüle eden ön-bilgi veya arka-bilgi dizilerini aynı zamanda bir transkribe edilmiş polinükleotid tarafından kodlanan bir ürünü bir hücre içindeki bir intraselüler kompartımana veya ekstraselüler ortama hedeflemek için hedefleme dizilerini içerir.

Mevcut modifiye edilmiş memeli hücrelerini etkilemek için uygun kimerik yapılar, bir regülatör diziye operatif olarak bağlı, bir orto-çiçek konak aralık faktörünü kodlayan bir nükleik asit dizisi içerir. Regülatör dizi uygun şekilde, hücre içinde ekspresyon için uygun olacak olan transkripsiyonel ve/veya translasyonel kontrol dizileri içerir. Tipik olarak, transkripsiyonel ve translasyonel regülatör kontrol dizileri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir promotör dizisini, bir 5' kodlamayan bölgeyi, bir *cis*-regülatör bölgeyi, örneğin, transkripsiyonel regülatör protein veya translasyonel regülatör protein için bir fonksiyonel bağlama yerini, bir yukarı akış açık okuma çerçevesini, ribozomal-bağlama dizilerini, transkripsiyonel başlangıç yerini, translasyonel başlangıç yerini ve/veya bir ön-bilgi dizisini kodlayan nükleotid dizisini, sonlandırma kodonunu, translasyonel durdurma yerini ve bir 3' aktarılmamış bölgeyi içerir. Teknikte bilindiği üzere konstitütif veya indüklenebilen promotörler tasarlanır. Promotörler, doğal oluşumlu promotörler veya birden fazla promotörün elemanlarını birleştiren hibrit promotörler olabilir.

15 Tasarlanan promotör dizileri, memeli hücreleri için natif olabilir veya bir alternatif kaynaktan türetilir, burada bölge seçilen organizma içinde fonksiyoneldir. Promotör seçimi, hedeflenen konak hücreye bağlı olarak çeşitlilik gösterecektir. Örneğin, memeli hücrelerinde ekspresyon için kullanılabilen promotörler, diğerleri arasında, ağır metaller, örneğin, kadmiyum, yanıtta indüklenebilen metalotiyonein promotörünü, β -aktin promotörünü aynı zamanda viral promotörleri, örneğin, SV40 büyük T antijeni promotörünü, insan sitomegalovirüs (CMV) hemen erken (IE) promotörünü, Rous sarkom virüsü LTR promotörünü, fare mamari tümör virüsü LTR promotörünü, adenovirüs majör geç promotörünü (Ad MLP), herpes simpleks virüsü promotörünü ve 25 bir HPV promotörünü, özellikle HPV yukarı akış regülatör bölgesini (URR) içerir. Bu promotörlerin tümü iyi tarif edilmiştir ve teknikte kolaylıkla erişilebilir.

Hızlandırıcı elemanlar ayrıca burada, memeli yapılarının ekspresyon düzeylerini arttırmak için de kullanılabilir. Örnekler, örneğin, Dijkema *et al.*, (1985) *EMBO J.* 4:761, 30 kaynağında tarif edildiği üzere, SV40 erken gen hızlandırıcısını, örneğin, German *et al.*, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777, kaynağında tarif edildiği üzere, Rous Sarkom Virüsünün uzun uç tekrarından (LTR) türetilen hızlandırıcı/promotörü ve örneğin, Boshart *et al.*, (1985) *Cell* 41:521, kaynağında tarif edildiği üzere, insan CMV'sinden türetilen elemanları, örneğin, CMV intron A dizisine dahil edilen elemanları 35 içerir.

Kimerik yapı ayrıca, bir 3' aktarılmamış dizi de içerebilir. Bir 3' aktarılmamış dizi, bir genin, bir poliadenilasyon sinyali ve mRNA işlenmesini veya gen ekspresyonunu etkileyebilen herhangi bir başka regülatör sinyal içeren bir DNA segmenti içeren kısmını ifade eder. Poliadenilasyon sinyali, mRNA öncülünün 3' ucuna poliadenilik asit yollarının eklenmesini etkileme ile karakterize edilir. Poliadenilasyon sinyalleri, varyasyonların olağandışı olmamasına rağmen, 5' AATAAA-3' kanonikal formuna homolojinin varlığı ile yaygın bir şekilde bilinir. 3' aktarılmamış regülatör DNA dizisi tercihen, yaklaşık 50 ila 1.000 nts içerir ve bir poliadenilasyon sinyaline ve mRNA işlenmesini veya gen ekspresyonunu etkileyebilen herhangi bir başka regülatör sinyale ek olarak transkripsiyonel ve translasyonel sonlandırma dizileri içerebilir.

Bazı uygulamalarda, kimerik yapı ilaveten, yapıyı içeren hücrelerin seleksiyonuna izin vermesi için bir seçilebilen belirteç geni içerir. Seleksiyon genleri teknikte iyi bilinir ve söz konusu hücre içinde ekspresyon için uygun olacaktır.

Bir uygulamada, orto-çiçek yapısal veya birleşme geninin ekspresyonu, bir promotör kontrolü altındadır. Bir sınırlayıcı-olmayan uygulamada, promotör, bir hücresel konstitütif promotördür, örneğin, insan EF1 alfa (insan elongasyon faktörü 1 alfa geni promotörüdür), DHFR (dihidrofolat redüktaz geni promotörüdür) veya konak hücre üzerinde anlamlı toksik etkiler yokluğunda viral propagasyonu sürdürmek için CP77'nin bir yeterli düzeyinin ekspresyonunu yönlendiren PGK (fosfoglisarat kinaz geni promotörüdür). Promotörler ayrıca, indüklenebilen, örneğin, hücresel indüklenebilen promotör de olabilir, MTH (bir metalotiyonein geninden) viral promotörler, örneğin, CMV, RSV, SV-40 ve MoU3 de memeli hücrelerinde kullanılır.

Bir birinci yönünde, mevcut buluş burada hücrenin genomunun bir promotör kontrolü altında CP77'yi kodlayan bir dizi içermesi için modifiye edildiği bir modifiye edilmiş memeli hücresi sağlar, böylece modifiye edilmiş hücre hattı modifiye edilmemiş hücrede daha az çoğalabilen veya hiç çoğalamayan bir çiçek-virüsünün propagasyonunu sürdürür.

Bir ikinci yönünde, mevcut buluş, CHO hücrelerinde çoğalmayan bir orto-çiçek virüsünü çoğaltmak için, çiçek virüsünün bir memeli hücre hattında *in vitro* çoğaltılmasını içeren,

bir proses sağlar, burada hücre hattı, CP77'yi kodlaması ve bir promotör kontrolü altında eksprese etmesi modifiye edilir.

- 5 Bir uygulamada, hücrenin genomu ilaveten bir promotör kontrolü altında D13L'yi kodlayan bir dizi içerir ve/veya ilaveten bir promotör kontrolü altında K1L'yi kodlayan bir dizi içerir.

Bir başka uygulamada, hücre, bir sürekli hücre hattıdır, tercihen bir CHO hücresidir.

- 10 Diğer uygulamalarda, hücre, bir insan hücresi, bir primat hücresi, bir hamster hücresi veya bir tavşan hücresi, olabilir.

Bir başka uygulamada, CP77 geni, D13L geni ve/veya K1L geni, bir memeli promotörü kontrolü altındadır.

15

Bir başka uygulamada, CP77 geninin ekspresyonu, bir permisif hücre hattında gözlenene eş-değer virüs verimleri üretmek için virüsün propagasyonunu destekler ve tercihen 500'den büyük olan bir virüs replikasyon amplifikasyon oranını destekler.

- 20 Bir başka uygulamada, CP77, D13L ve/veya K1L, memeli hücrelerinde ekspresyon için kodon optimize edilmiş nükleotidlerin bir bitişik dizisi tarafından kodlanır.

Bir örnek K1L dizisi, SEQ ID NO: 6'da ve SEQ ID NO: 7'de sağlanır.

- 25 Spesifikasyon geniş bir şekilde, modifiye edilmiş (rekombinant veya transforme edilmiş) hücreler ile ve kültürlenmiş daha yüksek ökaryotik konak hücrelerde virüs vektörlerinin *in vitro* imalatı için bir proses ile ilgilidir, burada hücre *in vitro* hücrelerin bir popülasyonu içinde veya bu *vasıta*yla virüs vektörünün çoğaltılmasını hızlandıracak veya kolaylaştıracak bir şekilde genetik olarak modifiye edilir. Bir sınırlayıcı-olmayan
- 30 uygulamada, spesifikasyon modifiye edilmiş Çin hamsteri over (CHO) hücrelerinde vaksiniya-temelli çiçek-virüslerinin propagasyonunu sağlar.

- 35 Teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilindiği üzere, hamsterın, *Cricetulus griseus*, overinden türetilen Çin hamsteri over (CHO) hücreleri, antikorları içeren rekombinant protein terapötiklerinin biyo-endüstriyel ve GMP üretimi için en yaygın şekilde kullanılan

memeli hücresidir. Bu amaç için CHO hücrelerinin popülaritesi, kısmen, bunların çabuk büyümesinden ve yüksek protein üretiminden köken alır. Bunun sonucu olarak, CHO hücre hatları iyi karakterize edilmiştir. Uygun CHO hücre hatları, sınırlandırma olmaksızın, A2, A2H, XrS6, CHO-K1, CHO/dhfr, RR-CHO-K1, UT-I, P22, CHO-1C6, Lec1, Lec2, Lec8, Pro-5 ve CDKXB1 hatlarını içerir. ATCC CLL-61 veya ATCC CRL-9618 Erişim Numarası altında ATCC ile depolanan CHO-K1 hücre hattı sıklıkla kullanılır. CHO-K1 hücre hattı, Puck T. (1957) tarafından bir erişkin Çin hamsterinin bir overinin bir biyopsisinden başlatılan parental CHO hücre hattından bir alt-klon olarak türetilmiştir. Mevcut spesifikasyon, modifiye edilmiş CHO hücrelerinden ziyade modifiye edilmiş hücreleri tarif eder.

Üretilen virüsün verimini maksimuma çıkarmak için, hücre hatları, örneğin, CHO hücreleri, standart teknikler kullanılarak süspansiyon kültürüne uyarlanabilir. Bir rekombinant veya modifiye edilmiş hücreye atfı, bunun projenisini içerir. Hücreler, dondurulmuş formu içeren herhangi bir formda veya sıvı süspansiyon formunda satılabilir. Bir çiçek-virüsü vektörü ile enfekte edilmiş hücreler satılabilir.

Burada CP77'ye ve burada belirlendiği üzere bir memeli konak hücresinin genomunda bir heterolog gen olarak eksprese edildiğinde çiçek viral büyümesini destekleyebilen fonksiyonel ortologlarına ve bunların modifiye edilmiş formlarına atfı, Sphener *et al.* (1988) ve Hsiao *et al.*, (2006), kaynaklarında ifade edilen inek çiçek virüsü konak aralık geni anlamına gelir. "Modifiye edilmiş formlar" atfı, doğal-suş veya referans diziden bir varyasyonu (örneğin, bir silinmeyi, süstitüsüyonu veya eklenmeyi) içerir. Bir referans nükleotid dizisi, SEQ ID NO: 1'de sağlanır. Modifiye edilmiş formlar, kodlama bölgesi veya bunun en az 200 bitişik baz-çifti içeren bir veya birden fazla kısmı boyunca en az %80 dizi özdeşliği paylaşır. Modifiye edilmiş formlar, burada tarif edildiği üzere, CHO hücrelerinin içeren bir memeli veya başka daha yüksek ökaryotik hücrelerde ekspresyon için optimize edilen kodon optimize edilmiş formları içerir. CP77 atfı, ortologları, yani, diğer türlerde bulunan ile aynı fonksiyonu olan veya farklı adlar ile tanımlanmış genleri içerir. İnek çiçek virüsü konak aralık faktörü, CP77, ayrıca VHR1, CHOh_r. ve CPXV025, olarak da ifade edilir. Vaksiniyanın Western Reserve (WR) suşundaki CHOh_r/CP77 geni büyük ölçüde fragmente edilir ve bir fonksiyonel faktör üretmez. CP77, MVA'da ve Kopenhag suşunda yoktur.

Burada "CP77", "D13L" ve "K1L" atfı, fonksiyonel ortologları ve fonksiyonel varyantları içerir. "Fonksiyonel", eksprese eden hücre sitoplazması içinde çiçek-virüsü propagasyonunu desteklemek için, bir kültürlenmiş hücrenin memeli genomundan yönlendirilen ekspresyonun (yani, transkripsiyonun ve translasyonun) burada tarif edilen kalitesini ifade eder. "Çoğalmak" terimi, intraselüler propagasyonu ve interselüler propagasyonu içerir ve matür viral parçacıkların üretilmesini kapsar.

Bir uygulamada, modifiye edilmiş hücrelerin bir popülasyonu, bir modifiye edilmemiş kontrol hücresinde daha az çoğalabilen veya büyük ölçüde çoğalamayan bir çiçek-virüsünün propagasyonunu sürdürür. Çoğalamama yetisi, hücreden hücreye veya süjeden süjeye aktarımın tipik olarak gerçekleşmediği anlamına gelir.

"Modifiye edilmemiş kontrol hücresi" atfı, CP77'den, K1L'den ve SPI-1'den oluşan gruptan seçilen en az bir viral konak aralık faktörünü kodlaması için ve bir promotör kontrolü altında bunun genomundan bunu eksprese etmesi için modifikasyondan önce var olduğu şekilde modifiye edilmiş hücreyi aynı zamanda teknikte bilinen diğer uygun kontrol hücrelerini içerir.

Örneğin, çiçek-virüsleri, örneğin, MVA ve vaksiniya, CHO hücrelerinde çoğalamaz. Bununla birlikte, burada sürpriz bir şekilde belirlendiği üzere, bir promotör kontrolü altında bunların genomundan CP77 eksprese etmesi için rekombinant olarak modifiye edilmiş CHO hücreleri, yalnızca vaksiniyanın değil aynı zamanda vaksiniyanın, örneğin, MVA'nın, türevlerinin de propagasyonunu destekleyebilir. Söz konusu modifiye edilmiş CHO-CP77 hücrelerinde propagasyondan sonra, MVA ve vaksiniya modifiye edilmemiş CHO hücrelerinde veya başka uygun kontrolde hala çoğalamaz.

Burada "çiçek-virüsü" atfı, bir ilaç, profilaktik, tanısal veya terapötik ajan olarak, söz konusu bir heterolog molekülü (örneğin, söz konusu bir antijeni) kodlayan bir rekombinant çiçek-virüsü vektörünü içerir. Bu tarz rekombinant çiçek-virüsü vektörleri tipik olarak, çiçek-viral indüklü olmayan hastalıklara veya rahatsızlıklara karşı aşılarda kullanılması içindir. Ayrıca, çiçek-virüsü terimi, bir çiçek-virüsü enfeksiyonuna, örneğin, variyola veya çiçek hastalığı enfeksiyonuna, karşı bir terapötik veya profilaktik aşı olarak kullanılması için önerilen izole edilmiş çiçek-virüslerini ve bunların türevlerini içerir.

Burada "vaksiniya-temelli" atfı, vaksiniyayı ve vaksiniya virüsünün türevlerini ve modifiye edilmiş formlarını içerir. Vaksiniya temelli türevler, herhangi bir şekilde sınırlandırmadan, MVA'yı ve NYVAC'yi içerir. MVA ve NYVAC atfı, teknikte bilinen bu çiçek-virüslerinin suşlarını veya türevlerini içerir. Modifiye edilmiş formlar, bir ila on
5 veya daha fazla gende modifikasyonlara sahip olabilir. "Modifikasyon" teriminin, doğal-suş veya referans diziden bir varyasyonu (örneğin, bir silinmeyi, sübstitüsyonu veya eklenmeyi) kastetmesi amaçlanır. "Atenüe edilmiş" atfı, ilgili bir süjede çoğalmayan veya aynı virüsün bir atenüe-edilmemiş formuna kıyasla büyük ölçüde daha az bir dereceye kadar çoğalan çiçek-virüsünü içerir. Terim ayrıca, bir süjede patojenik-
10 olmayan virüsleri de içerir.

Bir uygulamada, hücre bir sürekli hücre hattıdır. Modifiye edilmiş hücrenin sürekli olarak bölünebilen bir hücre hattı olması daha az mecburidir. Bir memeli veya daha yüksek ökaryotik hücre, mevcut buluşa uygun şekilde modifiye edilebilir ve bunu
15 takiben bir sürekli olarak bölünen hücre hattı haline gelmesi için transforme edilebilir veya ölümsüz hale getirilebilir. Bununla birlikte, modifikasyondan önce hücre, teknikte bilinen, kolay bir şekilde bir iyi karakterize edilmiş ve sürekli olarak bölünen biyoteknoloji uyumlu sürekli hücre hattıdır. Bu tarz hücrelere kolaylıkla, depolama kuruluşlarından, örneğin, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) veya Avrupa
20 Hücre Kültürleri Koleksiyonu'ndan (ECACC), erişilebilir.

Uygun memeli hücre hatları, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, örneğin, ATCC'den erişilebilen, RK18, BHK, VERO, HBOC-143B, HaCat, HepG2, HeLa, HT1080, HEK-293, RD, COS-7, CHO, Jurkat, HUT, SUPT, C8166, MOLT4/klon8, MT-2, MT-4, H9,
25 PM1, CEM, miyelom hücrelerini (örneğin, SB20 hücrelerini) ve CEMX174'ü içerir.

Bir uygulamada, hücre, bir CHO hücresidir. Viral konak ad genlerini kodlamayan, önceki tekniğin CHO hücre hatları, insanlarda büyük ölçüde çoğalamayan vaksiniyanın veya vaksiniya türevlerinin imalatını desteklemez.

30

Bazı hücrelerde, hücre, bir insan hücresidir, bir primat hücresidir, bir hamster hücresidir veya bir tavşan hücresidir.

Mevcut modifiye edilmiş memeli hücrelerini etkilemek için uygun kimerik yapılar, bir
35 regülatör diziye operatif olarak bağlı, bir çiçek-viral konak aralık faktörünü kodlayan bir

nükleik asit dizisi içerir. Regülatör dizi uygun şekilde, hücre içinde ekspresyon için uygun olacak olan transkripsiyonel ve/veya translasyonel kontrol dizileri içerir. Tipik olarak, transkripsiyonel ve translasyonel regülatör kontrol dizileri, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir promotör dizisini, bir 5' kodlamayan bölgeyi, bir *cis*-regülatör bölgeyi, örneğin, transkripsiyonel regülatör protein veya translasyonel regülatör protein için bir fonksiyonel bağlama yerini, bir yukarı akış açık okuma çerçevesini, ribozomal-bağlama dizilerini, transkripsiyonel başlangıç yerini, translasyonel başlangıç yerini ve/veya bir ön-bilgi dizisini kodlayan nükleotid dizisini, sonlandırma kodonunu, translasyonel durdurma yerini ve bir 3' aktarılmamış bölgeyi içerir. Teknikte bilindiği üzere konstitütif veya indüklenabilen promotörler tasarlanır. Promotörler, doğal oluşumlu promotörler veya birden fazla promotörün elemanlarını birleştiren hibrit promotörler olabilir.

Tasarlanan promotör dizileri, memeli hücreleri için natif olabilir veya bir alternatif kaynaktan türetilir, burada bölge seçilen organizma içinde fonksiyoneldir. Promotör seçimi, hedeflenen konak hücreye bağlı olarak çeşitlilik gösterecektir. Örneğin, memeli hücrelerinde ekspresyon için kullanılabilen promotörler, diğerleri arasında, ağır metallere, örneğin, kadmiyuma, yanıtta indüklenabilen metalotiyonein promotörünü, β -aktin promotörünü aynı zamanda viral promotörleri, örneğin, SV40 büyük T antijeni promotörünü, insan sitomegalovirüs (CMV) hemen erken (IE) promotörünü, Rous sarkom virüsü LTR promotörünü, fare mamari tümör virüsü LTR promotörünü, adenovirüs majör geç promotörünü (Ad MLP), herpes simpleks virüsü promotörünü ve bir HPV promotörünü, özellikle HPV yukarı akış regülatör bölgesini (URR) içerir. Bu promotörlerin tümü iyi tarif edilmiştir ve teknikte kolaylıkla erişilebilirdir.

Hızlandırıcı elemanlar ayrıca burada, memeli yapılarının ekspresyon düzeylerini arttırmak için de kullanılabilir. Örnekler, örneğin, Dijkema *et al.*, (1985) *EMBO J.* 4:761, kaynağında tarif edildiği üzere, SV40 erken gen hızlandırıcısını, örneğin, Gorman *et al.*, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777, kaynağında tarif edildiği üzere, Rous Sarkom Virüsünün uzun uç tekrarından (LTR) türetilen hızlandırıcıyı/promotörü ve örneğin, Boshart *et al.*, (1985) *Cell* 41:521, kaynağında tarif edildiği üzere, insan CMV'sinden türetilen elemanları, örneğin, CMV intron A dizisine dahil edilen elemanları içerir.

Kimerik yapı ayrıca, bir 3' aktarılmamış dizi de içerebilir. Bir 3' aktarılmamış dizi, bir genin, bir poliadenilasyon sinyali ve mRNA işlenmesini veya gen ekspresyonunu etkileyebilen herhangi bir başka regülatör sinyal içeren bir DNA segmenti içeren kısmını ifade eder. Poliadenilasyon sinyali, mRNA öncülünün 3' ucuna poliadenilik asit yollarının eklenmesini etkileme ile karakterize edilir. Poliadenilasyon sinyalleri, varyasyonların olağandışı olmamasına rağmen, 5' AATAAA-3' kanonikal formuna homolojinin varlığı ile yaygın bir şekilde bilinir. 3' aktarılmamış regülatör DNA dizisi tercihen, yaklaşık 50 ila 1.000 nts içerir ve bir poliadenilasyon sinyali ve mRNA işlenmesini veya gen ekspresyonunu etkileyebilen herhangi bir başka regülatör sinyale ek olarak transkripsiyonel ve translasyonel sonlandırma dizileri içerebilir.

Bazı uygulamalarda, kimerik yapı ilaveten, yapıyı içeren hücrelerin seleksiyonuna izin vermesi için bir seçilebilen belirteç geni içerir. Seleksiyon genleri teknikte iyi bilinir ve söz konusu hücre içinde ekspresyon için uygun olacaktır.

15

Bir uygulamada, viral konak aralık geninin ekspresyonu, bir promotör kontrolü altındadır. Bir sınırlayıcı-olmayan uygulamada, promotör, bir hücresel konstitütif promotördür, örneğin, insan EF1 alfa (insan elongasyon faktörü 1 alfa geni promotörüdür), DHFR (dihidrofolat redüktaz geni promotörüdür) veya konak hücre üzerinde anlamlı toksik etkiler yokluğunda viral propagasyonu sürdürmek için CP77'nin bir yeterli düzeyinin ekspresyonunu yönlendiren PGK (fosfogliserat kinaz geni promotörüdür). Promotörler ayrıca, indüklenebilen, örneğin, hücresel indüklenebilen promotör de olabilir. MTH (bir metalotiyonein geninden) viral promotörler, örneğin, CMV, RSV, SV4 ve MoU3 de memeli hücrelerinde kullanılır.

25

Uygun şekilde, bir uygulamada, viral konak aralık geninin ekspresyonu, permisif hücre hatlarında gözlenene eş-değer virüs verimleri üretmek için virüsün propagasyonunu destekler. Viral konak aralık geninin ekspresyonu, örneğin, 500'den büyük olan bir virüs replikasyon amplifikasyon oranını destekler. Viral konak aralık geninin ekspresyonu, anlamlı konak hücre toksisitesi yokluğunda viral propagasyonu destekler. Anlamlı konak hücre toksisitesi, viral konak aralık faktörü ekspresyonunun, prematüre konak hücresi ölümünden veya bölünememeden dolayı viral verimi düşüren bir düzeyini ifade eder. Uzmanlığı olan kişi, konak hücresi parametrelerini, örneğin, konak hücresi sağ kalımını ve çoğalmasını ve viral parametreleri, örneğin, viral konak aralık geni

30

ekspresyonunu, viral replikasyonu ve viral verimi kalitatif veya kantitatif bir şekilde değerlendirmek için yöntemlere aşınadır.

5 Bir uygulamada, çiçek-virüsü, bir fonksiyonel CP77'yi veya CP77 ortoloğunu kodlayan bir orto-çiçek virüsü dışındaki bir kordo-çiçek virüsüdür. İnek çiçek virüsü, CP77'yi kodlar ve bundan dolayı bu yönde kapsamaz. Orto-çiçek virüsleri, bufalo çiçek virüsünü, inek çiçek virüsünü, deve çiçek virüsünü, ektromeli virüsünü, maymun çiçek virüsünü, tavşan çiçek virüsünü, rakun çiçek virüsünü, tetera çiçek virüsünü, vaksiniya virüsünü, tarla faresi çiçek virüsünü, kokarca çiçek virüsünü ve atların Uasin Gishu hastalığı virüsünü içerir. Diğer cinsler, para-çiçek virüslerini, avi-çiçek virüslerini, kapri-çiçek virüslerini, lepori-çiçek virüslerini, domuz-çiçek virüslerini, mollusci-çiçek virüslerini ve yata-çiçek virüslerini içerir.

15 Bir uygulamada, çiçek-virüsü MVA'dır veya MVA'nın insanda/bir süjede büyük ölçüde kopyalayamayan bir türevidir.

Bir uygulamada, çiçek-virüsü vaksiniyadır veya vaksiniyanın insanda *in vivo* büyük ölçüde kopyalayamayan bir türevidir.

20 Bir başka uygulamada, çiçek-virüsü, bir çiçek viral aşısı olarak kullanılması için uygundur.

25 Bir ilave uygulamada, çiçek-virüsü, söz konusu bir heterolog molekül, örneğin, söz konusu bir tıbbi antijeni, kodlayan ve eksprese eden bir rekombinant çiçek-viral vektördür, burada rekombinant çiçek-viral vektör, bir süjede bir tanısal, terapötik veya profilaktik ajan olarak kullanılması içindir.

Burada K1L atfı, Shisler ve Jin (2004) tarafından tarif edilen gen ve bunun ortologları veya modifiye edilmiş formları anlamına gelir.

30

Burada SPI-1 atfı, Brookes *et al.*, (1995) tarafından tarif edilen konak aralık geni ve bunun ortologları veya modifiye edilmiş formları anlamına gelir.

35 Bazı uygulamalarda ve şüpheye mahal vermemek için, mevcut hızlandırılmış viral propagatif proses, çiçek-viral genomuna genlerin eklenmesini gerektirmez. Bu, elbette,

diğer amaçlar için, örneğin, sınırlandırma olmaksızın, aşı amaçları için söz konusu antijenler olarak heterolog molekülleri kodlaması için veya bir süjede bir immün yanıt meydana getirmesi için, viral vektörlerin modifikasyonlarını, dışlamaz.

- 5 Konak hücre nükleusundan çiçek-viral konak aralık geninin transkripsiyonu ve kodlanan ürünün translasyonu, enfekte edilmiş hücre içinde gerçekleşir ve konak hücre sitoplazmasında çiçek viral propagasyonu için yeterlidir. Herhangi bir özel etki modu sınırlandırması olmaksızın, CP77'nin bir viral koruma ajanı olduğu önerilir.
- 10 Bir açıklayıcı uygulamada, enfekte edilmiş hücre hattı tarafından eksprese edilen çiçek-viral konak aralık geni, CP77'dir. Örnek 4'te gösterildiği üzere, bir CHO hücresi nükleusu CP77'yi kodlaması ve eksprese etmesi için modifiye edildiğinde, bu bir permisif hücre hattı, örneğin, 143B, olmuşçasına, bu viral amplifikasyonu sürdürebilir. Tipik olarak, konflüent plaklar, enfeksiyondan sonraki iki gün içinde gözlenir.
- 15 Bir başka uygulamada, modifiye edilmiş hücre içinde viral propagasyon düzeyi, en az 10 ila 5000 olan bir amplifikasyon oranı sağlar. Amplifikasyon oranları, bazı uygulamalarda, 500 ile 3000 aralığındadır veya 1000 ile 4000 aralığındadır.
- 20 Bir başka uygulamada, heterolog çiçek viral konak aralık geninin promotör yönlendirmeli ekspresyonu, hücre içinde çiçek viral konak aralık heterolog geni ekspresyonunun bir düzeyini sağlar. CP77 ekspresyonunun düzeyi, permisif hücrelerde inek çiçek virüsü tarafından üretilene benzer olabilir veya bunu aşabilir.
- 25 Bir başka uygulamada, heterolog çiçek viral konak aralık geninin promotör yönlendirmeli ekspresyonu, hücre içinde heterolog gen ekspresyonunun en azından bir permisif hücre içindeki viral propagasyon düzeyinde viral propagasyona izin vermek için yeterli olan bir düzeyini sağlar.
- 30 Bir uygulamada, bir CHO hücre hattında çiçek viral üretim, bir pozitif kontrol hücresindeki çiçek viral üretimin düzeyine eşittir veya bunu aşar.

Bir uygulamada, CHO hücrelerin MVA viral üretiminin düzeyi, CEF hücrelerinde MVA viral üretiminin düzeyine büyük ölçüde eşittir veya bunu aşar.

Bir uygulamada, CP77, K1L ve/veya SPI-1, memeli hücrelerinde ekspresyon için kodon optimize edilmiş nükleotidlerin bir bitişik dizisi tarafından kodlanır.

Burada ilaveten tarif edildiği üzere, CP77'yi kodlayan kodon optimize edilmiş nükleik asit dizisi, Brighton Red suşunun (UniprotKB/Swiss-Prot:P12932.1) inek çiçek CP77 proteinini kodlayan diziye %80'den daha az veya %75'ten daha az nükleotid dizi özdeşliğine sahip olabilir. Bazı uygulamalarda, kodon optimize edilmiş dizi, SEQ ID NO: 1'de izah edilen diziye sahiptir veya SEQ ID NO: 1'de izah edilen diziye en az %70 dizi özdeşliğine sahip olan bir nükleik asit dizisi içeren bir fonksiyonel varyanttır. Bazı uygulamalarda, CP77 virüs konak aralık faktörü, SEQ ID NO: 2'de izah edilen bir amino asit dizisine sahiptir veya SEQ ID NO: 2'de izah edilen amino asit dizisine en az %70 amino asit dizisi özdeşliğine sahiptir.

Bazı uygulamalarda, burada tarif edildiği üzere, bunların genomundan CP77'yi eksprese eden modifiye edilmiş memeli hücrelerinin bir popülasyonunu, örneğin, bir klonal popülasyonunu, içeren veya esas olarak bundan oluşan bir kit tasarlanır. Bazı uygulamalarda, modifiye edilmiş hücre, bir vaksiniya virüsü içermez.

Mevcut tarifname ilaveten, CHO hücrelerinde çoğalmayan bir çiçek-virüsünü imal etme yöntemini veya buna yönelik bir prosesi tanımlar, proses *in vitro* bir memeli hücre hattında çiçek-virüsünü çoğaltmasını içerir, burada hücre hattı CP77'yi kodlaması ve bir promotör kontrolü altında eksprese etmesi için modifiye edilir. Proses ilaveten, viral parçacıkları izole etmeyi içerebilir.

Hücre hattı uygun bir şekilde, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından, bir ilacın veya terapötik, tanısal veya profilaktik ajanın imalatı için uygun olduğu bilinen bir memeli hücre hattıdır.

Spesifikasyon, bir modifiye edilmiş CHO hücrelerini tarif eder, burada CHO hücresi CP77'yi kodlaması ve bir promotör kontrolü altında bunun genomundan bunu eksprese etmesi için modifiye edilir.

Bir uygulamada, modifiye edilmiş CHO hücre hattı, CP77'yi eksprese etmeyen bir modifiye edilmemiş kontrol CHO hücresinde daha az çoğalabilen veya hiç çoğalamayan bir virüsün propagasyonunu sürdürür.

Bir uygulamada, virüs, CP77'yi kodlayan bir orto-çiçek virüsü dışındaki bir orto-çiçek virüsüdür. Teknikte bilindiği üzere, inek çiçek virüsü, CP77'yi kodlayan bir çiçek virüsüdür.

5

Bazı uygulamalarda, virüs, vaksiniyadır veya vaksiniyanın insanda/bir süjede büyük ölçüde kopyalayamayan bir türevidir.

Bazı uygulamalarda, virüs, MVA'dır.

10

Bir başka uygulamada, spesifikasyon insanda büyük ölçüde kopyalamayan bir çiçek-virüsünü çoğaltmanın bir yöntemini sağlar, yöntem aşağıdakileri içerir: (i) CP77'yi eksprese etmesi için transforme edilmiş bir CHO hücrelerini kültürleme; ve (ii) (i)'den elde edilen kültürlenmiş CHO hücrelerini insanda büyük ölçüde kopyalamayan çiçek-virüsü ile enfekte etme.

15

Bir başka uygulamada, spesifikasyon insanda büyük ölçüde kopyalamayan bir çiçek-virüsünü çoğaltmanın bir yöntemini sağlar, yöntem aşağıdakileri içerir: (i) CP77'yi ve D13L'yi ve/veya K1L'yi eksprese etmesi için transforme edilmiş bir CHO hücrelerini kültürleme ve (ii) (i)'den elde edilen kültürlenmiş CHO hücrelerini insanda büyük ölçüde kopyalamayan çiçek-virüsü ile enfekte etme.

20

Bir başka uygulamada, spesifikasyon MVA'yı çoğaltmanın bir yöntemini sağlar, yöntem aşağıdakileri içerir: (i) CP77'yi ve D13L'yi ve/veya K1L'yi eksprese etmesi için transforme edilmiş bir CHO hücrelerini kültürleme ve (ii) (i)'den elde edilen kültürlenmiş CHO hücrelerini MVA ile enfekte etme.

25

Bir başka uygulamada, spesifikasyon insanda büyük ölçüde kopyalamayan bir vaksiniya türevini çoğaltmanın bir yöntemini sağlar, yöntem aşağıdakileri içerir: (i) CP77'yi ve D13L'yi ve/veya K1L'yi eksprese etmesi için transforme edilmiş bir CHO hücrelerini kültürleme ve (ii) (i)'den elde edilen kültürlenmiş CHO hücrelerini vaksiniya türevi ile enfekte etme.

30

Bir başka uygulamada, spesifikasyon bir heterolog proteini kodlayan MVA'yı çoğaltmanın bir yöntemini sağlar, yöntem aşağıdakileri içerir: (i) CP77'yi ve D13L'yi

35

ve/veya K1L'yi eksprese etmesi için transforme edilmiş bir CHO hücrelerini kültürleme ve (ii) (i)'den elde edilen kültürlenmiş CHO hücrelerini MVA ile enfekte etme.

5 Bir başka uygulamada, spesifikasyon insanda büyük ölçüde kopyalamayan, bir heterolog proteini kodlayan bir vaksiniya türevini çoğaltmanın bir yöntemini sağlar, yöntem aşağıdakileri içerir: (i) CP77'yi ve D13L'yi ve/veya K1L'yi eksprese etmesi için transforme edilmiş bir CHO hücrelerini kültürleme ve (ii) (i)'den elde edilen kültürlenmiş CHO hücrelerini vaksiniya türevi ile enfekte etme.

10 Bir başka uygulamada, mevcut spesifikasyon operatif olarak regülatör elemanlara, örneğin, bir memeli hücre hattında ekspresyon için bir promotöre, bağlı bir virüs konak aralık geninin nükleik asit dizisini içeren bir yapay olarak oluşturulmuş vektör, polinükleotid veya plazmid sağlar. Bazı uygulamalarda, virüs geni, inek çiçek ankirin tekrar alanı-içeren protein CP77 genidir (UniProtKBSwiss-Prot P12932.1 [025LBR
15 CP77 proteini]. Bir uygulamada, virüs konak aralık geni, örneğin, CP77, bir memeli hücre hattında ekspresyon için kodon optimize edilmiştir. Uygun vektörler ve plazmidler teknikte bilinir.

20 Bir uygulamada, polinükleotid, CP77'yi kodlar. Bazı uygulamalarda, polinükleotid, (memeli hücrelerinde, örneğin, CHO'da, ekspresyon için kodon optimize edilmiş) SEQ ID NO: 1'de izah edilen nükleotid dizisini içerir. Bazı uygulamalarda, izole edilmiş polinükleotid, SEQ ID NO: 1'de izah edilen nükleotid dizisini veya bunun SEQ ID NO: 2'de gösterilen amino asit dizisini kodlayan bir varyantını içerir.

25 Bir başka uygulamada, mevcut spesifikasyon, bir virüs konak aralık geninin bir memeli hücrelerine kararlı yerleştirilmesi için bir transpozisyon aktarım vektörünü tarif etmiştir.

30 Mevcut tarifname ayrıca, bir virüse büyük ölçüde permisif-olmayan bir memeli veya daha yüksek ökaryotik kültür hücrelerini bir virüse permisif olan bir hücreye transforme etmenin bir yöntemini de sağlar, yöntem hücreyi CP77'yi eksprese etmesi için transforme etmeyi içerir.

35 Bazı uygulamalarda, yöntem hücreyi bir memeli promotörü kontrolü altında bir kodlanmış CP77'nin ekspresyonunu yönlendirebilen bir vektör ile transfekte etmeyi içerir.

Bazı uygulamalarda, vektör, bir memeli promotörü kontrolü altında CP77'yi kodlayan bir transpozisyon aktarım vektörüdür.

- 5 Bir sınırlayıcı-olmayan uygulamada, promotör, bir hücrel konstitütif promotördür, örneğin, insan EF1 alfa (insan elongasyon faktörü 1 alfa geni promotörüdür), DHFR (dihidrofolat redüktaz geni promotörüdür) veya konak hücre üzerinde anlamlı toksik etkiler yokluğunda viral propagasyonu sürdürmek için CP77'nin bir yeterli düzeyinin ekspresyonunu yönlendiren PGK (fosfoglisarat kinaz geni promotörüdür). Promotörler
- 10 ayrıca, indüklenebilen, örneğin, hücrel indüklenebilen promotör de olabilir, MTH (bir metalotiyonein geninden) viral promotörler, örneğin, CMV, RSV, SV4 ve MoU3 de memeli hücrelerinde kullanılır.

Bazı uygulamalarda, hücre, bir CHO hücresidir.

15

Bazı uygulamalarda, virüs, bir çiçek virüsüdür.

Bazı uygulamalarda, çiçek-virüsü, insanda patojenik-olmayan veya kopyalamayan bir vaksiniya türevidir.

20

"İzole edilmiş" ile, buna normal olarak bunun natif halinde eşlik eden bileşenlerden büyük ölçüde veya esas olarak yoksun olan materyal kastedilir. Örneğin, burada kullanıldığı şekliyle, bir "izole edilmiş polinükleotid" veya bir "izole edilmiş polipeptit" ve benzerlerini, bir polinükleotid veya polipeptit molekülünün bunun doğal hücrel ortamından ve hücrenin diğer bileşenleri ile ilişki halinden *in vitro* izolasyonunu ve/veya saflaştırılmasını ifade eder. Sınırlandırma olmaksızın, bir izole edilmiş bileşim, kompleks, polinükleotid, peptit veya polipeptit, saflaştırma ile izole edilen bir natif diziyi veya rekombinant veya sentetik araçlar ile üretilen bir diziyi ifade edebilir.

25

- 30 Varyantlar, bir referanslanmış moleküle veya bunların komplementer formlarına bunun tümü veya parçası boyunca yeterli şekilde benzer olan, böylece selektif hibridizasyonun orta derecede veya yüksek derecede zorlayıcı koşullar altında başarılabildiği veya en az yaklaşık 15 nükleotid içeren bir karşılaştırma penceresi boyunca bir referanslanmış çiçek-virüsü konak aralık faktörünü tanımlayan nükleotid
- 35 dizilerine yaklaşık %60 ila %90 veya %90 ila 98 dizi özdeşliğine sahip olan, nükleik asit

moleküllerini içerir. Tercihen, hibridizasyon bölgesi, yaklaşık 12 ila yaklaşık 18 veya daha fazla nükleobaz uzunluğundadır. Tercihen, bir özel nükleotid dizisi ve referans dizi arasındaki yüzde özdeşlik, en az yaklaşık %80 veya %85 veya daha tercihen yaklaşık %90 veya daha fazla, örneğin, yaklaşık %95, %96, %97, %98, %99 veya daha fazla, benzerdir. %80 ile %100 aralığındaki yüzde özdeşlikleri kapsanır. Nükleotid dizisinin uzunluğu, bunun önerilen fonksiyonuna bağlıdır. Homologlar kapsanır. "Homolog", "homolog genler" veya "homologlar" terimleri geniş bir şekilde, diğer türlerden olanları içeren fonksiyonel ve yapısal olarak ilgili molekülleri ifade eder. Homologlar ve ortologlar, varyantların örnekleridir.

10

Nükleik asit dizisi özdeşliği, aşağıdaki şekilde belirlenebilir. Söz konusu nükleik asit dizisi, BLASTM programı versiyon 2.1 (Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402, kaynağına göre) kullanılarak, bir nükleik asit dizisi veri tabanını, örneğin, Genbankası veri tabanını (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> internet sitesinden erişilebilir), araştırmak için kullanılır. Program, boşluk-oluşturulmamış modda kullanılır. Varsayılan filtreleme, düşük karmaşıklık bölgelerinden kaynaklanan dizi homolojilerini uzaklaştırmak için kullanılır. BLASTM'nin varsayılan parametreleri kullanılır.

15

Amino asit dizisi özdeşliği, aşağıdaki şekilde belirlenebilir. Söz konusu polipeptit dizisi, BLASTP programı kullanılarak, bir polipeptit dizisi veri tabanını, örneğin, Genbankası veri tabanını (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> internet sitesinden erişilebilir), araştırmak için kullanılır. Program, boşluk-oluşturulmamış modda kullanılır. Varsayılan filtreleme, düşük karmaşıklık bölgelerinden kaynaklanan dizi homolojilerini uzaklaştırmak için kullanılır. BLASTP'nin varsayılan parametrelerinden yararlanılır.

20

25 Düşük karmaşıklık dizileri için filtreleme, SEG programını kullanabilir.

"Zorlayıcı koşullar altında hibridize olmak" terimi ve bunun dilbilgisel eş-değerleri, bir nükleik asit molekülünün tanımlanmış sıcaklık ve tuz konsantrasyonu koşulları altında bir hedef nükleik asit molekülüne (örneğin, bir DNA veya RNA blotu, örneğin, bir Southern blot veya Northern blot, üzerine immobilize edilmiş bir hedef nükleik asit molekülüne) hibridize olma yetisini ifade eder. Yaklaşık 100 bazdan daha büyük olan nükleik asit molekülleri açısından, tipik zorlayıcı hibridizasyon koşulları, natif dubleksin erime sıcaklığının (T_m) en fazla 25°C ila 30°C (örneğin, 10°C) altındadır (bakınız, genel olarak, Sambrook *et al.*, (yukarıda); Ausubel *et al.*, (1999)). Yaklaşık 100 bazdan daha uzun olan nükleik asit molekülleri için T_m , $T_m = 81,5 + \%0,41 (G+C-\log (Na^+))$

30

35

formülü ile hesaplanabilir. 100 bazdan daha kısa olan nükleik asit molekülleri açısından, emsal zorlayıcı hibridizasyon koşulları Tm'nin 5°C ila 10°C altındadır.

"Vektör" ile, bir polinükleotid molekülü, örneğin, bunun içine bir polinükleotidin yerleştirilebileceği veya klonlanabileceğini, bir plazmidden, bakteriyofajdan, mayadan, virüsten, memeliden, kuştan, sürüngenden veya balıktan türetilen, uygun şekilde bir DNA molekülü kastedilir. Bir vektör tercihen, bir veya birden fazla eşsiz restriksiyon yeri içerir ve bir hedef hücre veya doku veya bir progenitör hücre veya bunun dokusunu içeren bir tanımlanmış konak hücre için otonom replikasyon yapabilir veya klonlanmış dizinin yeniden-üretilebilir olacağı şekilde tanımlanmış konağın genomuna entegre edilebilir. Bu doğrultuda, vektör bir otonom bir şekilde kopyalayan vektör, *yani*, bir ekstra-kromozomal varlık olarak var olan, replikasyonu kromozomal replikasyondan bağımsız olan, bir vektör, *örneğin*, bir lineer veya kapalı dairesel plazmid, bir ekstra-kromozomal eleman, bir mini-kromozom veya bir yapay kromozom, olabilir. Vektör, kendi kendin replikasyonu garantilemek için herhangi bir araç içerebilir. Alternatif olarak, vektör, konak hücreye uygulandığında, genom içine entegre edilen ve içine entegre edildiği kromozom(lar) ile birlikte kopyalanan bir vektör olabilir. Bir vektör sistemi, bir tek vektör veya plazmid, birlikte konak hücrenin genomuna uygulanacak olan toplam DNA'yı içeren iki veya daha fazla vektör veya plazmid veya bir transpozon, içerebilir. Vektör seçimi tipik olarak, vektörün, vektörün içine uygulanacağı konak hücre ile uyumluluğuna bağlı olacaktır. Vektör ayrıca, uygun transformantların seleksiyonu için kullanılabilen bir seleksiyon belirteci, örneğin, bir antibiyotik direnç geni de içerebilir. Bu tarz direnç genlerinin örnekleri, teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından bilinir.

25

"Gen" atfı, bir genin ekzonlarına karşılık gelen cDNA'yı içerir. Burada bir "gen" atfının ayrıca aşağıdakileri de içerdiği sayılır: transkripsiyonel ve/veya translasyonel regülatör dizilerden ve/veya bir kodlama bölgesinden ve/veya aktarılmamış dizilerden (*yani*, intronlardan, 5'- ve 3'-aktarılmamış dizilerden) oluşan bir klasik genomik gen; veya genin kodlama bölgelerine (*yani*, ekzonlara) ve 5'- ve 3'-aktarılmamış dizilerine karşılık gelen mRNA veya cDNA.

"Regülatör eleman" veya "regülatör dizi" ile, bir özel konak hücrede bir operatif olarak bağlanmış kodlama dizisinin ekspresyonu için gerekli olan nükleik asit dizileri (*örneğin*, DNA) kastedilir. Prokaryotik hücreler için uygun olan regülatör diziler, örneğin, bir

35

promotörü ve opsiyonel olarak bir cis-etki eden diziyi, örneğin, bir operatör dizisini ve bir ribozom bağlama yerini içerir. Ökaryotik hücreler için uygun olan kontrol dizileri, promotörleri, poliadenilasyon sinyallerini, transkripsiyonel hızlandırıcıları, translasyonel hızlandırıcıları, mRNA kararlılığını modüle eden ön-bilgi veya arka-bilgi dizilerini aynı zamanda bir transkribe edilmiş polinükleotid tarafından kodlanan bir ürünü bir hücre içindeki bir intraselüler kompartımana veya ekstraselüler ortama hedeflemek için hedefleme dizilerini içerir.

Komplementer diziler ve bu dizilerin parçaları kapsanır. Bir nükleik asit molekülü ile bağlantılı olarak kullanıldığında "kompleman" ve "komplementer" terimi, Watson-Crick baz-eşleşmesi ile belirlendiği üzere komplementer nükleik asit dizisini ifade eder. Örneğin, 5'CCATG3' nükleik asit dizisinin komplemanı, 5'CATGG3' dizisidir.

"Spesifik olarak hibridize olma" ifadesi ve benzerleri, bu dizi bir kompleks karışım (örneğin, toplam hücre) DNA veya RNA içinde bulunduğunda, zorlayıcı koşullar altında bir molekülün yalnızca bir özel nükleotid dizisini bağlamasını, bununla dubleks oluşturmasını veya buna hibridize olmasını ifade eder.

Burada birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılan, "süje" veya "birey" veya "hasta" terimleri, bunlar için terapinin veya profilaksinin arzu edildiği herhangi bir süjeyi, özel olarak bir omurgalı süjeyi ve hatta daha özel olarak bir memeli süjeyi, ifade eder. Buluşun kapsamı içinde kalan uygun omurgalı hayvanlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, primatları, kuşgilleri, çiftlik hayvanlarını (örneğin, koyunları, inekleri, atları, eşekleri, domuzları), laboratuvar test hayvanlarını (örneğin tavşanları, fareleri, sıçanları, gine domuzlarını, hamsterları), evcil hayvanları (örneğin, kedileri, köpekleri) ve yakalanmış vahşi hayvanları (örneğin, tilkileri, geyikleri, yaban köpeklerini) içerir. Tercih edilen bir süje, bir primattır, örneğin, tedaviye veya profilaksiye ihtiyacı olan bir insandır. Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen terimlerin semptomların var olduğunu ima etmediği anlaşılabacaktır.

30

Burada sağlanan çeşitli uygulamalar aşağıdaki sınırlayıcı-olmayan örnekler ile ilaveten tarif edilir.

ÖRNEK 1

35

VACV-COP, CHO hücrelerinde büyüyemez

Materyaller ve Reaktifler

- 5 – VACV-COP, VSS02, SEMI 20213, Titre: $1,6 \times 10^8$ pfu/mL
- Vero: WHO-VERO-MCB geçiş No 141, 08/08/2005, Virax Holdings Limited
- CHO: SA-Pathology 7.05.2004
- Büyüme ortamı: RPMI, %10 FBS, Pen/Strep
- İdame ortamı: RPMI, % 2 FBS, Pen/Strep

10

CHO ve Vero hücreleri, *her bir* hücre hattı için bir 6-Gözlü plaka (6-WP) içinde konflüansa kadar kültürlenmiştir. Her bir göz, oda sıcaklığında 45 dakika boyunca 4×10^4 pfu VACV-COP VSS02 ile enfekte edilmiştir ve akabinde bundan sonra $37^\circ\text{C}/\%5 \text{ CO}_2$ 'de inkübe edilmiştir. Her bir hücre hattından, 2 gözün içerikleri burada enfeksiyondan 24 saat, 48 saat, 72 saat sonra hasat edilmiştir ve bir araya getirilmiştir (havuzlanmıştır). Viral ekstraktlar, üç kere dondurma-çözülme ile yapılmıştır ve titrasyonlar için hazır olana kadar -80°C 'de saklanmıştır. Her bir ekstrakt, Örnek 4'te tarif edilen Protokol'de tarif edildiği üzere Vero hücreleri kullanılarak titre edilmiştir.

15

20

Dondurma-çözülmeden sonra, bir homojenizasyon probu, bu büyük çözünmeyen topakları dağıtıp parçalamak için kullanılabilir. Hasat edilecek olan her bir göz, 2 mL MM içerir. Her bir zaman noktası için, *her bir* zaman noktası için 4 mL'lik bir toplam hacim vermesi için 2 göz havuzlanmıştır. TE tamponu, her bir zaman noktası için 6 mL'lik bir toplam hacim vermesi için eklenebilir.

25

Titrasyon sonuçları, viral verim sonuçları ve üretim verimleri, Tablo 1'de tablo haline getirilir. Sonuçlar, VACV-COP'nin, burada viral üretimin zamanla arttığı Vero hücrelerinden farklı olarak CHO hücrelerinde bir düşük moi 'den çoğalamadığını gösterir. VACV-COP, CHO hücrelerinde permisif-değildir.

30

ÖRNEK 2

Vero'ya kıyasla CHO'da VACV+PH22 [CP77] için çok-adımlı büyüme

35

- CP77, VACV'de aktiftir

CP77'yi kodlayan inek çiçek virüsü BR025L genini eksprese eden bir rekombinant VACV-COP'nin (VACV-PH22 [CP77]) CHO'daki propagasyon potansiyeli, bir çok-adımlı büyüme çalışmasında Vero hücrelerine kıyasla belirlenmiştir.

5

VACV-PH22, CHO konak aralık proteinini, CP77'yi, kodlayan inek çiçek virüsünün Brighton suşundan natif 025L ORF'yi eksprese eden bir rekombinant vaksiniya virüsü Kopenhag suşudur. Vaksiniyada bu ORF ayrıca, BR025L natif promotörü kontrolü altındadır. Natif BR025L geni (natif promotör ve ORF), ayrıca bir kırmızı flüoresan proteini, DsRed-Express2 de kodlayan pPH22 oluşturmak için klonlanmıştır. pPH22, BR025L genini ve DsRed genini VACV-COP'nin B19R ORF'si içine yerleştirecek olan, 10 çözünebilen ve hücre yüzeyi IFN alfa/beta reseptör proteinini kodlayan, bir entegrasyon vektörüdür. BR025L'nin ve DsRed'in VACV-COP içine yerleştirilmesi, CHO'yu bir düşük 15 çoklulukta VACV-COP ile enfekte etmenin ve pPH22 ile transfeksiyonun bir sonucu olarak homolog rekombinasyon ile başarılmıştır. Yalnızca BR025L genini içeren virüs, CHO hücrelerinde ilaveten çoğaltılacaktır, bu kırmızı flüoresan enfekte edilmiş hücrelerin veya plakların varlığı ile görsel olarak doğrulanabilir.

Homolog rekombinasyondan 3 gün sonra ekstrakte edilen virüs, CHO içinde üç kere 20 çoğaltılmıştır ve akabinde CHO hücrelerinde bu çok-adımlı büyüme çalışmasında kullanılmadan önce Vero hücreleri içinde titre edilmiştir.

Materyaller ve reaktifler

- 25 – VACV-COP, VSS02, SEMI 20213, Titre: $1,6 \times 10^8$ pfu/mL
- VACV-PH22 [CP77], Titre: 8×10^6 pfu/mL
- Vero: WHO-VERO-MCB geçiş No 141, 08/08/2005
- CHO: SA-Pathology 7.05.2004
- Büyüme ortamı: CHO ve Vero için RPMI, %10 FBS, Pen/Strep
- 30 – İdame ortamı: CHO ve Vero için RPMI, %2 FBS, Pen/Strep

CHO ve Vero hücreleri, *her bir* hücre hattı için 2 x T25 balonlar içinde konflüansa kadar 35 kültürlenmiştir. Her bir hücre hattının 1 balonu, oda sıcaklığında 45 dakika boyunca 1×10^5 pfu VACV-COP VSS02 ile ve her biri 1×10^5 pfu VACV-PH22 ile enfekte edilmiştir ve akabinde bundan sonra $37^\circ\text{C}/\%5 \text{ CO}_2$ 'de inkübe edilmiştir. Her bir hücre hattından,

her bir balonun içerikleri burada enfeksiyondan 96 saat sonra hasat edilmiştir. Viral ekstraktlar, üç kere dondurma-çözülme ile yapılmıştır ve titrasyonlar için hazır olana kadar -80°C'de saklanmıştır. Her bir ekstrakt, Örnek 4'te detaylandırılan protokolda tarif edildiği üzere Vero hücreleri kullanılarak 24 gözlü plaka formatları halinde titre edilmiştir.

Enfeksiyonlar, T25 balonu, *her bir* hücre hattı için 2 balon içinde, yapılmıştır, burada balon 1, VACV-COP ile enfeksiyondur ve balon 2, VACV-PH22 ile enfeksiyondur. Hasat etme yalnızca, enfeksiyondan 96 saat sonra gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, Tablo 2'de tablo haline getirilir. Tablo 2'den, aşağıdakiler görülebilir: CHO hücreleri, VACV-COP viral projeni üretimini destekleyemez. Bu, Örnek 1'de tarif edilen sonuçları konfirme eder. İlaveten, VACV-COP, 200 katın üstündeki inokülüm düzeyine çoğaltılmış bir permisif hücre hattının, bu çalışmada Vero hücrelerinin, enfeksiyonu olarak canlıdır, bu nedenle, buradaki konak hücre restriksiyonundan dolayı, sonuçlar CHO'da görülür. Bununla birlikte, CP77, bir rekombinant vaksiniya virüsü, VACV-PH22, tarafından eksprese edildiğinde, yaklaşık 700 kat inokülüm amplifikasyonu başarılmıştır. Vero hücrelerinin VACV-PH22 ile enfeksiyonu ayrıca inokülümü de çoğalttığından, CP77'nin ekspresyonu vaksiniya konak aralığını yalnızca CHO hücreleri ile sınırlandırmaz. Bununla birlikte, amplifikasyon düzeyi, CP77 olmadan vaksiniya kadar iyi olmayabilir. Titrasyon sonuçlarının standart hatası bu derece büyük olduğundan, verimdeki farklılık anlamlı olmayabilir.

Bu sonuçlar, viral genomdan eksprese edilen CP77'nin bir permisif hücre substratından, örneğin, Vero'dan, beklenene benzeyen verimler üretme ile permisif-olmayan CHO hücre hattında VACV-COP'nin çoğalmasına olanak sağlamada yeterli olmaktan fazlası olduğunu gösterir.

CHO hücrelerinin vaksiniya virüsü enfeksiyonu sırasında CP77 proteini için olası bir fonksiyon, Hsiao *et al.*, (2006), tarafından bildirilmiştir. Bunlar, CP77'nin HMG20A'yı bağladığını ve bunu viral fabrikalar içinde yer alan yeni sentezlenmiş vaksiniya genomundan uzaklaştırdığını, böylece vaksiniya yaşam siklusunun CHO hücrelerinde devam etmesine olanak sağladığını öne sürer. CP77'nin, HMG20a'nın genomu bağlamasından ve "kilitlemesinden" dolayı aksi durumda CHO hücrelerinde erişilebilir olmayacak olan yeni sentezlenmiş genomun paketlenme için erişilebilir olmasına olanak sağladığını öne sürülür. CP77'nin fonksiyonu permisif hücre hatlarında, örneğin, Vero'da,

viral amplifikasyon için gerekli olmadığından, burada bu fonksiyona sahip olan, en azından CHO hücrelerinde inaktif olabilen veya bulunmayabilen, ancak permisif hücre hatlarında aktif olabilen veya bulunabilen, bir alternatif eş-değer protein, hatta bir hücresel protein, olduğu burada önerilir. Alternatif protein, CP77'yi gereksiz hale getirebilir ve böylece vaksiniyanın evrimi üzerine, bunun fonksiyon kaybı geniş konak aralığı için esansiyel olmadığından, bu müteakiben silinebilir veya yeniden düzenlenebilir.

ÖRNEK 3

10

p-LL07-CHO'nın (CP77'yi eksprese eden poliklonal hücre hattının) yapılması

Bir CHO hücre hattı, CP77 proteinini eksprese etmesi için yapılmıştır. Bir yeşil flüoresan protein (EGFP) eksprese eden bir VACV-COP rekombinant virüsü, enfeksiyonun bir kaç günü içinde bir konflüent enfeksiyona gelişen plaklar oluşturur.

Vaksiniya-COP (SCV401C), Kopenhag suşunun (VACV-CAP) Güçlendirilmiş Yeşil Flüoresan Proteinin (EGFP) protein kodlama dizisine operatif olarak bağlanmış bir güçlü vaksiniya virüsü erken/geç promotöründen oluşan ve çiçek-virüsü erken transkripsiyonel durdurma dizisi ile sonlandırılan A39R ORF bir ekspresyon kaseti içine yerleştirilmiş bir rekombinant vaksiniya virüsüdür. Permisif-olmayan ve permisif hücrelerin enfeksiyonu üzerine, EGFP enfekte edilmiş hücreler içinde eksprese edilecektir, bu bir flüoresan mikroskop kullanılarak görselleştirilebilir. Permisif hücrelerde, yeşil flüoresansın, virüs hücrelerin popülasyonu boyunca yayıldıkça, hücreden hücrede yayıldığı görülebilir.

CP77 proteini kodlama dizisi, inek çiçek virüsü Brighton Red suşu UhiProtKB/Swiss-Prot: P12932.1'in 025L ORF'si tarafından kodlanan CP77'nin amino asidinden DNA dizisini geri-oluşturma (geri translasyon veya ters translasyon) ile GeneArt GmbH (Almanya) tarafından sentetik olarak yapılmıştır ve memeli hücresinde (CHO hücrelerinde) ekspresyon için kodon optimize edilmiştir. CP77'nin protein kodlama dizisinin ekspresyonu için kodon optimize edilmiş nükleotid dizisi için bakınız SEQ ID NO: 1.

pPH51'den (kodon optimize edilmiş CP77 protein kodlama dizisi barındıran bir klonlama plazmidinden) kodon optimize edilmiş CP77 protein kodlama dizisi, PCR primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır, burada 5' primer, başlangıç kodonu etrafına bir kozak dizisi eklemek için tasarlanmıştır ve 3' primer, durdurma kodonundan önce bayrak-etiket dizisi eklemek için tasarlanmıştır. Çoğaltılmış PCR ürünü DNA2.0 Inc (ABD) firmasından satın alınan transpozon piggybac vektörü pJ507-2 (Hyg+) içine Bsa I klonlama yeri vasıtasıyla alt-klonlanmıştır. Bsal içine klonlama etkili bir şekilde, pLL07 oluşturmak için komet GPF kodlama dizisini CP77 proteini kodlama dizisi ile değiştirir. CP77 şimdi, insan konstitüif Elongasyon Faktörü 1 alfa promotörü (EF1a) kontrolü altında olan bir hale gelir ve her ikisi transfekte edilmiş hücrelerin genomu içine kararlı bir şekilde entegre edildiğinde, higromisin direnç geni ile birlikte-eksprese edilir.

CHO'nun CP77'nin ve higromisin direnci ekspresyon kasetlerinin transpozon yardımıyla kararlı içeri yerleştirilmesi ile transdüksiyonu: CHO hücreleri bir 6 gözlü plakaların gözleri içine ekilmiştir, böylece bir gece boyu inkübasyondan sonra, bunlar %50 konflüans civarındadır. Qiagen firmasından Effectene transfeksiyon reaktifi kullanılarak, 1 ug pLL07, üreticinin talimatları izlenerek %50 konflüent CHO hücrelerinin 1 gözüne transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş hücreler akabinde, büyüme ortamı içinde gece boyu inkübe edilmiştir. Sonraki gün, ortam aktarılmış hücreleri seçmek için 500 ug/mL higromisin B içeren büyüme ortamı ile değiştirilmiştir. Seleksiyon ortamı, her 2-3 günde bir değiştirilmiştir ve aktarılmış hücreler sayı açısından büyümeye başladığında, bunlar TrypLE Select (Life Technologies) kullanılarak geri-kazanılmıştır ve ilave hücre genişlemesi için bir T25 balon içine ekilmiştir.

25

CP77 ekspresyonunun western blotlama (Bayrak Etiketli) ile doğrulanması

Tavşan anti-CP77 serumlarını meydana getirme: Tavşanlara, CP77 proteininin bir kısa iç amino asit dizisini temsil eden KHL proteinine bağlı bir 15 amino asitlik peptit enjekte edilmiştir. Bu amino asit dizisi aşağıdaki şekildedir: SGSDVNIRSNNGYTC - UniProtKBSwiss-Prot P12932.1 [025LBR CP77 proteini] SEQ ID NO: 2'nin 481 ila 495 arasındaki amino asit pozisyonları.

1 ay arayla, toplamda üç enjeksiyon, bu KHL konjuge edilmiş amino asit dizisine karşı antikolar meydana getirmek için yapılmıştır. Enjekte edilmiş tavşandan elde edilen

35

kan, eksprese edilmiş bakteriyel ve Ni-NTA saflaştırılmış N-ucu His-etiketli CP77 proteinine karşı western blot ile test edilmiştir. Tavşan anti-CP77 serumunun, rekombinant CP77 proteinini net bir şekilde tanıdığı gösterilmiştir.

- 5 *CP77 ekspresyonunun p-LL07-CHO ile test edilmesi:* İki T25 balonuna, CHO ve p-LL07-CHO ekilmiştir ve bunlar her bir balon içindeki hücre tek-katmanları %100 konflüansa ulaşana kadar kültürlenmiştir. Her bir balondan elde edilen hücreler, hasat edilmiştir, PBS ile yıkanmıştır ve akabinde 200 uL içinde yeniden-süspanse edilmiştir. Buna, yeniden-süspanse edilmiş hücrelerin her bir tüpüne 50 µL 5X SDS-PAGE
- 10 yükleme tamponu eklenmiştir ve akabinde bunlar 98°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Her bir hücre proteini ekstraktının 15 uL'si, %10'luk iki SDS-PAGE jeline yüklenmiştir, elektroforez uygulanmıştır ve akabinde elektro-blotlama ile Hybond ECL nitroselüloz üzerine blotlanmıştır.
- 15 Elektro-blotlanmış membranlara akabinde, membran üzerindeki tüm mevcut spesifik olmayan antikor bağlama yerlerini bloke etmek için Tween 20 içeren Tris Tamponlu Salin (TBST) içinde çözünmüş %5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca muamele edilmiştir. Membranlar akabinde, antikorlar ile problanmadan önce TBST içinde bir kaç kere yıkanmıştır. Membran 1, HRP içinde konjuge edilmiş anti-
- 20 DDDDK etiket antikor [M2]'nin (ab49763, Sapphire Bioscience) 1:5000'lik seyreltmesi ile gece boyu 4°C'de problanmıştır. Membran 2, anti-CP77 anti-serumlarının 1:100'lük seyreltmesi ile gece boyu 4°C'de problanmıştır, TBST ile 3 kere yıkanmıştır ve akabinde sekonder antikor, HRP konjuge edilmiş anti-tavşan antikorunun (GE Healthcare) 1:5000'lik seyreltmesi ile 2 saat boyunca problanmıştır. Her iki membran
- 25 akabinde TBST ile 3 kere yıkanmıştır ve kullanıcı manüeli ile talimat verildiği üzere bunlara ECL western blotlama saptama reaktifleri (GE Healthcare) ile muamele edilmiştir ve bunlar X-ışını filmine maruz bırakılmıştır.

- 30 *CHO'da ve p-LL7-CHO'da plak analizi:* CHO ve p-LL7-CHO hücreleri, çok sayıda 6 gözlü plakalata ekilmiştir ve hücre tek-katmanları %100 konflüent olana kadar kültürlenmiştir.

- 35 Bir erken/geç vaksiniya virüsü promotörü (SCV401C) kontrolü altında bir EGFP ekspresyon kaseti (yeşil flüoresan protein) barındıran bir rekombinant Vaksiniya virüsü (Kopenhag suşu), hücreleri enfekte etmek için kullanılmıştır. SCV401C'nin bilinmeyen

titresinden dolayı, 10 µl stok virüs ilk olarak, 1 ml MM ortamı (Seyreltme 1: 1:100) içinde seyreltilmiştir ve akabinde her bir göz 500 µl viral diluent ile enfekte edilmiştir. Enfeksiyondan sonraki Gün 1'de, çok sayıda hücrenin yeşil flüoresan ışık yaydığı yerlerde yüksek moi enfeksiyon fark edilmiştir. 2 ml MM ortamına 100 µl Seyreltme 1

5 ekleme ile Seyreltme 1'in bir ilave 1:20'lik seyreltmesini (Seyreltme 2) gerçekleştirmeye karar verilmiştir. Akabinde, bu her bir gözü 500 µl Seyreltme 2 ile enfekte etmek için kullanılmıştır.

Viral enfeksiyonlar, GFP filtre (Kat#U-MGFPHQ, Olympus) ile flüoresan mikroskop

10 altında (Olympus IX51) incelenmiştir. Görüntü, cellSens Digital Imaging Software (Olympus) kullanılarak çekilmiştir.

Sonuçlardan, yeşil flüoresan protein eksprese eden VACV-COP'nin (SCV401C) beklenildiği üzere CHO hücrelerinde çoğalmadığı görülmüştür. Yeşil flüoresan ışık

15 yayan tek hücreler, hücreye giren, bunun EGFP'yi içeren genini eksprese eden ancak yeni enfeksiyöz viral parçacıklar üretemeyen ve bundan dolayı enfeksiyonu komşu hücelere yayamayan virüsün sonucudur. Bununla birlikte, CP77 eksprese eden bir CHO hücre hattında, vaksiniya virüsü, enfeksiyondan sonraki gün 1 ile enfeksiyonun odaklarını oluşturmak için komşu hücelere yayılan yeni enfeksiyöz virüsler üretebilir.

20 Bu enfeksiyon odakları, enfeksiyondan hemen sonraki iki gün ile bir konflüent enfeksiyon haline gelir, burada gün 3 ile tüm hücre tek-katmanlı SCV401C ile enfekte edilmiştir. Konak aralık proteini, CP77, eksprese eden CHO hücreleri, parental (natif) CHO hücrelerinden farklı olarak vaksiniya virüsü enfeksiyonlarına permisiftir.

25 HMG20A, HMG kutu alanı içeren proteinlerin bir familyasına aittir. HMG proteinleri, bozulmuş DNA yapılarını, örneğin, krusiformları, tanıyan kromozom yeniden-modelleme proteinleridir. Bunlar ayrıca, DNA içindeki minör oyuğu bağlama ile DNA eğilmesini de indükleyebilir. Böylelikle, HMG kutusu-içeren proteinlerin DNA replikasyonu, rekombinasyonu veya onarımı sırasında kromozom yeniden-

30 modellenmesinde önemli olduğu düşünülür. Buna ek olarak, belirli HMG kutusu-içeren proteinler, promotör yerindeki transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girme ile fen transkripsiyonunu etkileyebilir.

Hsiao et al., 2006, tarafından yayımlanan çalışma, CHO-K1 hücrelerinde CP77'nin

35 HMG20A'yı bağladığını göstermiştir. Bu konak hücre proteininin, HMG20A'nın,

vaksiniya ile enfekte edilmiş CHO hücrelerinin viral fabrikalarında viral DNA'yı bağladığı görülür ve bu konak hücre proteininin viral fabrikalar içindeki DNA'yı "kilitlediği" ve akabinde vaksiniya yaşam siklusunun sonraki evresini önlediği ve böylece projeni enfeksiyöz virüsün üretilmesini önlediği öne sürülmüştür. İnek çiçek virüsü tarafından

5 CP77'nin ekspresyonunun, HMG20A'yı viral DNA'nın dışına çıkardığı ve viral yaşam siklusunun projeni enfeksiyöz virüs parçacıklarının nihai üretimi ile yeniden-başlamasına izin verdiği görülür.

Bununla birlikte, bir viral enfeksiyon yokluğunda CHO'da CP77'nin ekspresyonu ile, bir

10 kişi bu proteinin, nükleusa yer değiştirmeden önce sitoplazma içinde bulunan yeni sentezlenmiş HMG20A'yı sıkıştırmasını bekleyecektir. Eğer durum bu olsaydı, nükleus içindeki HMG20A'nın fonksiyonu kaybedilecekti ve bu DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımı sırasında kritik bir rol oynadığından artı gen transkripsiyonu sırasında bunun fonksiyonundan dolayı, bir kişi CP77'nin

15 ekspresyonunun hücre çoğaltılması ve idamesi sırasında CHO hücresinin bütünlüğüne zarar vermesini bekleyecektir. CP77 eksprese eden CHO hücre hattı, parental CHO hücre hattına kıyasla çok sayıda jenerasyon boyunca bunun kopyalama yetisi üzerinde fark edilebilen etkiler olmadan bir sürekli kültür olarak kolaylıkla idame ettirildiğinden, bunun beklenmedik bir şekilde söz konusu durum olmadığı görülür.

20

ÖRNEK 4

Çok-adımlı büyüme çalışmaları

25 Çok-adımlı büyüme kinetiği çalışması, p-LL07-CHO'da yürütülmüştür: Konak aralık geni CP77 eksprese eden bir CHO hücre hattının vaksiniya virüsü enfeksiyonuna permisif doğası değerlendirilmiştir ve viral üretim düzeyi bir doğal olarak permisif insan hücre hattında - 143B'de - elde edilen üretim düzeyleri ile karşılaştırılmıştır.

30 Amaç, p-LL07-CHO, CHO ve 143B hücre hatlarında VACV-COP'nin propagasyon karakteristiğini karşılaştırmaktır. Bu çalışmada, p-LL07-CHO tarafından eksprese edilen CP77'nin işlevselliği, CHO (permisif-olmayan) ve 143B (permisif) hücrelerde bunun amplifikasyon karakteristiğine kıyasla bu hücre hattında VACV-COP'nin amplifikasyon karakteristiğini inceleme ile test edilmiştir.

35

Materyaller ve Yöntemler

Hücre hattı düzeneği

- 5 *CHO düzeneği:* Bir 6-gözlü Plaka'ya (6WP) CHO hücreleri ekilmiştir ve plaka büyüme ortamı (RPMI+%10 FBS) içinde konflüent olanak kadar kültürlenmiştir.

143B düzeneği: Bir 6-gözlü Plaka'ya (6WP) 143B hücreleri ekilmiştir ve plaka büyüme ortamı (RPMI+%10 FBS) içinde konflüent olanak kadar kültürlenmiştir.

10

p-LL07-CHO düzeneği: Bir 6-gözlü Plaka'ya (6WP) p-LL07-CHO hücreleri ekilmiştir ve plaka büyüme ortamı (RPMI+%10 FBS+500 µg/ml Higromisin B) içinde konflüent olanak kadar kültürlenmiştir.

- 15 *VACV-COP'nin seyreltilmesi:* Her bir 6WP'nin her bir gözü, 500 µL'lik bir toplam hacim içinde 0,01 pfu ile enfekte edilmiştir. %100 konflüansta *her bir* göz için hücre sayısının 4×10^6 hücre olduğu varsayılmıştır. 0,01 pfu/göz olan bir enfeksiyon oranı için, *her bir* göz için 4×10^4 pfu gerekmiştir ve böylece stok virüsü, idame ortamı (RPMI/%2 FBS) içinde 8×10^4 pfu/mL'ye seyreltilmiştir.

20

Enfeksiyonlar: Kültür ortamı, her bir plakanın her bir gözünden uzaklaştırılmıştır, buraya seyreltilmiş virüsün 500 µL'si eklenmiştir ve hücrenin virüsü adsorbe etmesi için oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe olmaya bırakılmıştır. Virüs inokülümü akabinde uzaklaştırılmıştır ve her bir enfekte edilmiş göz, 1 mL steril PBS ile bir kere yıkanmıştır ve akabinde *her bir* göz için 2 mL MM içinde 37°C/%5 CO₂'de inkübe edilmiştir.

25

Hasat etme: Her bir plakadan gözlerin iki kümesi, burada enfeksiyondan sonra aşağıdaki zamanlarda hasat edilmiştir: 24 saat, 48 saat ve 72 saat. Hasat etme gününde, hücreler kültür ortamı içine kazınmıştır, burada her bir hücre hattından gözlerin iki kümesi birleştirilmiştir ve hücreler 1000 g'de 5 dakika boyunca sentrifügasyon ile pelet haline getirilmiştir. Her bir hücre peleti, 1 mL 10 mM TrisHCl, pH 8, içinde yeniden-süspanse edilmiştir. Yeniden-süspanse edilmiş pelet akabinde, üç siklus dondurma-çözölmeye tabi tutulmuştur ve titrasyon için hazır olana kadar -80°C'de saklanmıştır.

35

Titrasyonlar, 24-gözlü plakalarda %100 konflüansa kadar kültürlenmiş Vero ve 143B hücrelerinde yapılmıştır.

5 *Seyreltmeler:* Viral ekstraktlar, dondurucudan çıkarılmıştır, bunların buzu çözölmüştür ve herhangi görünebilir topağı homojenize etmek için sonike edilmiştir. Viral ekstraktlar, idame ortamı içinde 10^{-8} 'e seri seyreltilmiştir.

10 *Enfeksiyonlar:* Büyüme ortamı her bir gözden uzaklaştırılmıştır ve her bir seyreltmenin 1 mL'si (*her bir* seyreltme için 4 göz, 10^{-2} seyreltmeden başlayarak her bir virüs için bir plaka) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca enfekte edilmiştir. İnkübasyondan sonra, her bir plaka inkübatöre yerleştirilmiştir ve plakların gelişmesi için 3 gün boyunca $37^{\circ}\text{C}/\%5 \text{ CO}_2$ 'de inkübe edilmiştir.

15 *Titrenin Hesaplanması:* 20 ila 50 plak içeren seyreltme, plaklar sayılmıştır ve akabinde ortalaması alınmıştır. Bu ortalama sayı, seyreltmenin çarpmaya göre tersi ile çarpılmıştır ve 1 mL enfeksiyon kullanıldığından, elde edilen sayı, pfu/mL cinsinden titre olacaktır.

20 *Standart Hatanın Hesaplanması:* %95 güvende standart hata (SE), aşağıdaki formül kullanılarak ortalamaya oluşturan 4 titrasyon değerinden hesaplanmıştır: $1,95 \times (\text{SD}/\sqrt{n})$, burada: SD, bir küçük örnekten standart sapmadır, n, titrasyon tekrarlarının sayısıdır (bu durumda 4).

25 *Verimin Hesaplanması:* Bu, titre edilmiş olan viral ekstrakt içindeki virüsün toplam miktardır: Ortalama Titrasyon (pfu/mL) X Viral Ekstraktın Toplam Hacmi = pfu.

Amplifikasyon Oranının Hesaplanması: Bu sayı, inokülüm olarak kullanılan miktara kıyasla kat amplifikasyonunu temsil eder: pfu cinsinden verim/pfu cinsinden inokülüm boyutu.

30

Çok-adımlı büyüme kinetiği çalışmaları, 6 gözlü plakalar - *her bir* zaman noktası için *her bir* hücre hattı için iki göz - içinde çalışılmıştır. Her bir göz, 4×10^4 pfu VACV-COP ile enfekte edilmiştir ve hasat etme için her bir hücre hattı ve zaman noktası için 2 göz hasat edilmiştir ve birleştirilmiştir bundan bir viral ekstrakt hazırlanmıştır. Bu viral ekstraktı, 1 mL'lik toplam hacim 8×10^4 pfu (4×10^4 pfu X 2) olan bir inokülüm boyutundan

35

elde edilen 2 birleştirilmiş enfeksiyonu temsil eder, akabinde titre edilmiştir. Titrasyon, iki indikatör hücre hattı 143B ve Vero kullanılarak yürütülmüştür.

5 Titrasyon ve viral verim sonuçları sırasıyla Tablolar 3'te ve 4'te tablo haline getirilir. VACV-COP, permisif-olmayan CHO hücrelerinde çoğalmamıştır, yani, bu girdi inokülümde kullanılan miktara kıyasla daha az virüs üretmiştir. Bununla birlikte, konak-aralık geni CP77'yi eksprese eden CHO hücre hattında virüs amplifikasyonu, (indikatör hücre hattı olarak 143B hücreleri kullanılan titrasyon sonuçlarına göre) girdi inokülüme kıyasla yaklaşık 2000 kat daha fazladır. Permisif hücreden amplifikasyon, girdi inokülüme kıyasla yaklaşık 3000 kat daha fazladır. Standart hatalar kesiştiğinden, p-LL07-CHO ve 143B hücreleri arasında amplifikasyondaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir.

15 İki hücre hattı arasındaki viral amplifikasyon Vero indikatör hücrelerinden elde edilen titrasyon sonuçları kullanılarak karşılaştırıldığında, amplifikasyonun 143B hücrelerine kıyasla p-LL07-CHO hücrelerinde marjinal olarak daha fazla olduğu görülecektir, bununla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı değildir.

20 Bu çalışmada, viral üretim düzeyi inokülüm olarak kullanılan virüsün miktarına kıyasla çok daha az olduğundan, vaksiniya virüsünün CHO hücrelerinde permisif olmadığı ilaveten konfirme edilmiştir. Bununla birlikte, CHO CP77 proteinini kodlayan inek çiçek virüsü konak aralık genini eksprese ettiğinde, bu şimdi vaksiniya virüsüne permisif hale gelir ve bir permisif hücre hattında görülen ile aynı düzeylerde virüs üretimini destekler. Vaksiniyanın üretilmesi amacıyla bu hücre hattını bir "kullanılabilir" permisif hücre substratına dönüştürmek için, bunun yalnızca bir konak aralık geninin, CP77'nin, ekspresyonunu gerektirmesi de kayda değerdir. CHO, bunun bakteriler kadar çabuk büyümesi, bunun biyolojik katkı maddeleri, örneğin, Fötal Bovin Serum için gereklilik olmadan tanımlanmış sentetik kültür ortamı içinde kültürlenebilmesi ve bir biyo-reaktör içinde bir hücre süspansiyonu olarak kültürlenebilmesi açısından bir biyoteknoloji dostu hücre hattı olduğundan, CHO'dan vaksiniya üretme çok arzu edilir. CHO ayrıca, biyolojik tıbbi ürünler üretmeye yönelik bir öyküye de sahiptir, iyi karakterize edilmiştir ve biyo-medikal kontrol ajansları, örneğin, FDA ve EMEA, tarafından bilinir ve sevilir.

35 Bir konstitütif hücresel promotör kontrolü altında CP77 proteinini eksprese eden bir transgenik CHO hücre hattı, yüksek düzeylerde projeni virüsü üreten bir doğal olarak

permisif hücre hattında görülen ile aynı düzeylerde vaksiniya virüsü replikasyonuna ve propagasyona permisiftir.

ÖRNEK 5

5

CNO-CP77 hücrelerinde MVA propagasyonu

CHO'da, 143B'de ve p-LL07-CHO'da MVA+GFP Propagasyonu

10 **Materyaller ve Yöntemler**

Büyüme ortamı (GM): %10 FBS, 2 mM L-Glutamin, Penisilin ve gentamisin, Hepes ile takviye edilmiş RPMI-1640.

15 *İdame ortamı (MM):* %2 FBS, 2 mM L-Glutamin, Penisilin ve gentamisin, Hepes ile takviye edilmiş RPMI-1640.

p-LL07-CHO'yu kültürleme konusunda notlar: p-LL07-CHO hücre hattının genel propagasyonu ve idamesi, GM artı 500 ug/mL higromisin B içinde yürütülmüştür, ancak
20 bununla birlikte, plakalamak ve enfeksiyondan önce %100 konflüansa kültürlemek için, hücreler higromisin B içermeyen GM içinde kültürlenmiştir.

Hücre düzeneği: 143B, CHO ve P-LL07-CHO hücreleri, çok sayıda 6-gözlü plakaya ekilmiştir ve hücre tek-katmanları %100 konflüent olana kadar 37°C/%5 CO₂'de
25 büyüme ortamı (GM) içinde kültürlenmiştir. *Her bir* hücre hattı için bir plaka, kültürlenmiştir.

Enfeksiyon

30 • Bir GFP ekspresyon kaseti (yeşil flüoresan protein) barındıran bir rekombinant MVA, 6-gözlü plakalar içinde kültürlenmiş hücreleri enfekte etmek için kullanılmıştır. MVA-GFP'nin bilinmeyen titresinden dolayı, virüs aşağıda olduğu üzere idame ortamı (MM) içinde seri olarak seyreltilmiştir:

- Seyreltme 1: stok virüsünün 20 ul'si, 2 ml MM ortamı (1:100 seyreltme) içinde seyreltilmiştir ve kuvvetli vorteksleme ile karıştırılmıştır.
- Seyreltme 2: Seyreltme 1'in 500 ul'si, 4,5 ml MM'ye (1:10³ seyreltme) eklenmiştir ve kuvvetli vorteksleme ile karıştırılmıştır.
- Seyreltme 3: Seyreltme 2'nin 500 ul'si, 4,5 ml MM'ye (1:10⁴ seyreltme) eklenmiştir ve kuvvetli vorteksleme ile karıştırılmıştır.
- Seyreltme 4: Seyreltme 3'ün 500 ul'si, 4,5 ml MM'ye (1:10⁵ seyreltme) eklenmiştir ve kuvvetli vorteksleme ile karıştırılmıştır.
- Her bir plakanın bir gözü, aşağıdaki virüs seyreltmeleri Seyreltme 2'in, Seyreltme 3'ün ve Seyreltme 4'ün 500 ul'si ile enfekte edilmiştir.
- Her bir plaka, 5 günlük bir periyot boyunca inkübe edilmiştir ve flüoresan hücrelerin odaklarının gelişmesi ve yayılması için incelenmiştir. Bu çalışmada, Seyreltme 4, bir üç günlük periyot boyunca flüoresan hücrelerin ayırt edilebilen odaklarını üretmiştir. Her bir plakanın enfekte edilmemiş gözleri, oto-flüoresans için kontrollerdir.

Mikroskop İncelemesi

Viral enfeksiyon, GFP filtre (Kat#U-MGFPHQ, Olympus) ile flüoresan mikroskop (Olympus IX51) altında incelenmiştir. Görüntü, cellSens Digital Imaging Software (Olympus) kullanılarak çekilmiştir.

Bulgular

Sonuçlar, yeşil flüoresan protein (GFP) eksprese eden MVA'nın beklenildiği üzere CHO ve 143B hücrelerinde çoğalmadığını göstermiştir. Yeşil flüoresan ışık yayan tek hücreler, hücreye giren, bunun GFP'yi içeren genini eksprese eden ancak yeni enfeksiyöz viral parçacıklar üretemeyen ve bundan dolayı enfeksiyonu komşu hücrelere yayamayan virüsün sonucudur. Bununla birlikte, CP77 eksprese eden bir CHO hücre hattında, MVA, gün 3 ile ilave gelişme ile, enfeksiyondan sonraki gün 1 ile

enfeksiyonun odaklarını oluşturmak için komşu hücrelere yayılan yeni enfeksiyöz virüsler üretebilir.

ÖRNEK 6

5

p-LL07-CHO enfeksiyonundan hasat edilen MVA'nın konak aralık restriksiyonunun konfirmasyonu

Hücre düzeneği

10

143B, CHO ve BHK-21 hücreleri, çok sayıda 6-gözlü plakaya ekilmiştir ve hücre tek-katmanları %100 konflüent olana kadar 37°C/%5 CO₂'de büyüme ortamı (GM) içinde kültürlenmiştir. *Her bir hücre hattı için bir plaka, kültürlenmiştir.*

Örnek 5'ten hasat edilen virüs

Örnek 5'te Seyreltme 3 ile enfekte edilmiş P-LL07-CHO gözünden MVA+GFP, aşağıda olduğu üzere 5 günlük enfeksiyondan sonra hasat edilmiştir:

- 20 • Hem süpernatant hem de hücreler, gözden toplanmıştır ve enfekte edilmiş hücreleri pelet haline getirmek için 1000 g'de 5 dakika boyunca sentrifüj edilmiştir.
- Hücre peleti, 500 µl 100 mM Tris-HCl, pH 8, tamponu içinde yeniden-süspanse edilmiştir.
- 25 • Yeniden-süspanse edilmiş hücre peleti, enfekte edilmiş hücrelerden virüsü serbest bırakmak için en az üç kere dondurulmuştur ve çözölmüştür.

Enfeksiyon

- 30 • Ham viral ekstraktın bilinmeyen titresinden dolayı, virüs Örnek 5'teki ile aynı şekilde MM ortamı içinde seri olarak seyreltilmiştir.
- Her bir plakanın bir gözü, aşağıdaki virüs seyreltmeleri Seyreltme 2'nin, Seyreltme 3'ün ve Seyreltme 4'ün 500 µl'si ile enfekte edilmiştir.
- Her bir plaka, 5 günlük bir periyot boyunca inkübe edilmiştir ve flüoresan
- 35 hücrelerin odaklarının gelişmesi ve yayılması için incelenmiştir. Bu deneyde,

Seyreltme 3, bir üç günlük periyot boyunca flüoresan hücrelerin ayırt edilebilen odaklarını üretmiştir.

Mikroskop İncelemesi

5

Viral enfeksiyon, GFP filtre (Kat#U-MGFPHQ, Olympus) ile flüoresan mikroskop (Olympus IX51) altında incelenmiştir. Görüntü, cellSens Digital Imaging Software (Olympus) kullanılarak çekilmiştir.

10 Bulgular

CP77 eksprese eden CHO hücre hattından hasat edilen MVA, permisif-olmayan hücre hattı CHO (hamster) ve 143B hücresi (insan) içinde çoğalamama ile, hala bunun sınırlandırılmış konak aralığını idame ettirmiştir. CHO ve 143B hücrelerinin enfeksiyonu sonrasında üç günlük periyot boyunca yeşil flüoresan fokusların yokluğu, enfeksiyöz projeni virüsünün bu hücre hatlarında üretilmediğini gösterir. Bununla birlikte, sonraki 3 gün boyunca boyut açısından büyüyen enfeksiyonun yeşil flüoresan odakları enfeksiyondan sonraki gün 1 ile görülebileceği gibi, bu MVA BHK21 hücreleri (hamster) için bunun konak aralığını hala idame ettirmiştir.

20

Sonuçlar

- Konak aralık proteini CP77'yi eksprese eden CHO hücreleri, parental (natif) CHO hücrelerinden farklı olarak MVA enfeksiyonlarına permisiftir.
- CP77 eksprese eden bir CHO hücre hattında çoğaltılmış MVA, permisif-olmayan hücre hatları, örneğin, CHO ve 143B (insan), için bunun konak aralığını arttırmamıştır.

25

ÖRNEK 7

30

pLL07'nin Yapılması

Alt-Yapı Bilgi: pPH51 DNA şablonundan CP77 (CHO kodon optimize edilmiş) CDS PCR ürünü, pLL07 oluşturmak için Clontech InFusion klonlama sistemi ile pJ507-2

(Hyg+) PiggyBac sistemine klonlanmıştır. Bayrak-etiketli CP77 dizisi, pJ507-2'nin Bsal'i içine yerleştirilmiştir, böylece komet GFP dizisini (SEQ ID NO: 3) uzaklaştırmıştır.

5 pPH51 plazmid DNA'sından CP77-CHO genini PCR ile çoğaltmak için kullanılan PCR primer çifti:

AACACGTCTCGGGGGgccgccaccATGTTCTGACTACCTGGAAAATGAGGAAGTG

(SEQ ID NO: 4) ve

CAGGAAGACGCTTTTtcaCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCCTGCTGCTCGAA

GATCTTGACT (SEQ ID NO: 5). Bayrak Etiket dizisi, Inf-LL07-CP77-Rv primeri içinde

10 koyu renkte gösterilir.

Plazmid İÇERİ YERLEŞTİRME/KASET Konfigürasyonu aşağıdaki şekildedir. İçeri yerleştirme/Kaset Haritası. pLL7 klonu #3, dizileme için gönderilmiştir.

15 pLL07 referans dosyası "pLL07_ref.sbd" ile birlikte 15 ABI dizileme dosyaları, burada Lasergene DNASTar Seqman bilgisayar programına girilmiştir ve 1 konsensüs bitişik haline birleştirilmiştir. Referans dizisinin başlangıcı ve sonu ile eşleşmesi için kırpılmış, bundan sonra referans dizi olarak ifade edilen, hizalama dizileri, konsensüs dizinin oluşturulması üzerinde etkiye sahip olmama suretiyle hizalamadan silinmiştir. Bitişğin

20 konsensüs dizisi, "pLL07_#3 consensus.seq" adlı bir DNA dizi dosyası olarak kaydedilmiştir. Bitişğin okuma yönü belirlenmiştir ve referans dizi ile aynı okuma yönünü temsil ettiği bulunmuştur. Megalign (DNASTar) kullanılarak, "pLL07_#3 consensus", referans dizi ve pLL07_#3 içindeki dizi arasındaki uyumsuzlukları tanımlamaya yardımcı olmak için "pLL07_ref.sbd" referans dizisine manüel olarak

25 hizalanmıştır. Seqman (varsayılan ayarlar) kullanılarak AGRF-dizileme servisinden pLL07Klon#3 için 15AB1 dosyalarını birleştirme, pLL07 içeri yerleştirme referans dizisinin tam boyunu kapsayan bir konsensüs bitişik ile sonuçlanmıştır. pLL07_#3 içindeki dizi ve referans dizi arasında uyumsuzluk yoktur. pLL07_#3 bitişik konsensüs içindeki içeri yerleştirme dizileri, referans diziyeye özdeştir.

30

ÖRNEK 8

Memeli hücrelerinde G1L'nin ve I7L'nin ekspresyonu

Bayrak-etiketli-G1L'yi veya Bayrak-etiketli-I7L'yi kodlayan ekspresyon plazmidleri yapılmıştır ve bu proteinleri eksprese eden transgenik 143B hücre hatları yapmak için kullanılmıştır. Bu hücrelerin aktarılmış hücreleri pozitif bir şekilde seçmek için Geneticin varlığında çoğaltılmış olmasına ve PCR analizinin bu hücre hatlarının genomları içinde bu proteini kodlayan dizilerin varlığını konfirme etmesine rağmen, western blot analizi, bir anti-DDDDK antikoru ile problandığında, eksprese edilmiş Bayrak-etiketli-proteinlerin varlığını saptayamamıştır.

C-ucu Bayrak-etiketli COP-G1L'nin ve COP-I7L'nin protein kodlama dizileri, burada GeneArt (Life Technologies) ile sentezlenmiştir ve DNA2.0 Inc (ABD) firmasından satın alınan pJ503-2'nin (piggyBac - neomisin antibiyotik seleksiyonu) Bsa I yerine alt-klonlanmıştır. Bu klonlama prosedürü, komet-GFP'yi Bayrak-etiketli-G1L veya -I7L protein kodlama dizileri ile değiştirir. Elde edilen klonlar, G1L piggyBac vektörü için pLL08 ve I7L piggyBac vektörü için pLL10 olarak gösterilmiştir.

Bu iki plazmid vektörünün önemli özellikleri aşağıdaki şekildedir: bayrak-etiketli protein kodlama dizileri, konstitütif insan promotörü EF1alfa kontrolü altındadır, NPT II ekspresyon kaseti (neomisin direnç geni) ile birlikte bu ekspresyon kasetinin iki yanında, bir yapay transpozon elemanı oluşturmak için Sol ve Sağ Transpozon sınırları yer alır. Transpozon elemanın konak genom içine geri-dönüşümsüz entegrasyonuna aracılık eden Transpozon enzimi ekspresyon kaseti yapay transpozon elemanının dışındadır ancak aynı plazmide dahil edilir. Bu transpozon elemanlarını taşıyan hücreler, G418'i (Geneticin) hücre büyüme ortamına dahil etme ile pozitif bir şekilde seçilebilir.

Plazmid vektörü pLL08 (Bayrak-etiketli-G1L) ve pLL10 (Bayrak-etiketli-I7L), aktarılmış iki transgenik hücre hattı; (G1L ekspresyon kaseti içeren) G1L-143B ve (I7L ekspresyon kaseti içeren) I7L-143B, oluşturmak için 143B hücrelerine transfekte edilmiştir. Başarılı transpozon entegrasyonu olan hücreler, Geneticin'in büyüme ortamına dahil edilmesi ile çalışılabilen miktarlarda çoğaltılmıştır. Başarılı entegrasyonu doğrulamak için, toplam hücresel DNA, kitin talimat manüelinden talimatlar izlenerek Qiagen firmasından DNeasy DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak bu transgenik hücrelerden ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilmiş DNA akabinde, G1L'nin ve I7L'nin PCR amplifikasyonuna spesifik PCR primer çiftleri kullanılarak PCR amplifikasyon

reaksiyonları için şablon olarak kullanılmıştır. Her iki hücre hattı, bunların genomları içinde G1L ve I7L DNA dizisinin varlığı için pozitifdir.

Bu hücre hatları tarafından G1L ve I7L ekspresyonu için test etmek için, Western blot analizi, HRP'ye (anti-DDDDK antikoru. Abcam #ab49763) konjuge edilmiş bir anti-Bayrak Etiketli antikoru [M2] kullanılarak her bir Bayrak-etiketli proteinin varlığını saptama ile yürütülmüştür. G1L-143B ve I7L-143B hücre hatlarından ekstrakte edilmiş toplam proteinin kullanıldığı bu western blot analizinin sonuçları, anti-Bayrak-etiketli antikorunun beklenildiği üzere 143B'den ekstrakte edilen herhangi bir proteini tanımadığını ve bir Bayrak-etiket-CP77 transgenik CHO hücre hattında (CP77-CHO) eksprese edildiğinde bir Bayrak-etiket proteinini tanıyabildiğinde, anti-bayrak-etiket antikorunun bayrak-etiketli proteinleri tanıyabildiğini konfirme ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, G1L-143B örneğinden protein ekstraktında Bayrak-etiketli-G1L proteini saptanamaz. Bakteriyel olarak eksprese edilmiş Bayrak-etiketli-I7L proteini, anti-Bayrak-etiket antikoru ile saptanabilir, ancak antikoru I7L-143B hücre hattı tarafından Bayrak-etiketli-I7L ekspresyonunu saptayamaz.

G1L ve I7L ekspresyon kasetleri bunların ilgili hücre hattında saptanabileceğinden, sonuçlar ya eksprese edilmiş proteinlerin bir vaksiniya enfeksiyonu yokluğunda sentezden sonra çabuk bir şekilde parçalandığı, yani, hem G1 hem de I7 proteinlerinin virüs spesifik enzimler olması ve bunların vaksiniya spesifik enzim substratları olmadan kararsız olabileceği veya bu iki ekspresyon kasetini yönlendiren promotörün kusurlu olması olabilir. Bir başka hipotez, bir vaksiniya enfeksiyonu yokluğunda bu proteinlerin ekspresyonunun hücreler için "toksik" olmasıdır ve Genetecin seleksiyon prosesi sırasında, NPT II ekspresyon kasetini değil ancak transgenik G1L ve I7L ekspresyon kasetlerini susturmuş olan hücrelerin, G1L veya I7L proteinlerini eksprese etmemiş olan Genetecin dirençli hücrelerin amplifikasyonuna olanak sağlamasıdır. pJ503-2 piggyBac plazmidi, 143B hücrelerinde COP-D13L'nin ekspresyonu için laboratuvarımızda başarılı bir şekilde kullanıldığından, EF1alfa promotörünün fonksiyonel olduğu ve bu proteinlerin bir vaksiniya enfeksiyonu yokluğunda kararsız olduğu veya bu proteinlerin ekspresyonunu yönlendiren promotörün burada Genetecin varlığında hücre amplifikasyonu sırasında "toksik" proteinlerin ekspresyonunu önlemek için selektif bir şekilde susturulduğu önerilmiştir.

35 ÖRNEK 9

Bir esansiyel yapısal matürasyon veya birleşme proteininin bir örneği olarak D13L, memeli hücresi tarafından eksprese edilir ve D13L geninin silinmesi olmadan vaksiniyayı kurtarır ve D13L silinmiş vaksiniya, enfekte edilmiş hücrelerde proteini eksprese eder

Birleşme/matürasyon prosesini bloke etme ile vaksiniyayı atenüe etmenin bir örneği olarak - *D13-Kurtarma Hücre Hattının Yapılması*, Kopenhag suşunun D13L ORF'si, silinme için hedef alınmıştır. Bunu yaparken, bu proteini eksprese eden bir hücre hattının ilk olarak yapılması gerekecektir, böylece bir COP-D13L-silinmiş virüs çoğaltılabilir. Kurtarma hücre hattının yapılması için, bu hücre hattı "biyoteknoloji" dostu olduğundan, sıklıkla CHO olarak ifade edilen, Çin Hamsteri Over hücre hattı seçilmiştir. Bir COP-D13L silinmesi olan enfeksiyöz vaksiniya virüsünü kurtarmak için, bu hücre hattının, vaksiniya virüsününü değil hücrenin transkripsiyon mekanizmasını kullanarak bunun nükleer genomundan D13-proteinini eksprese etmesi gerekir. Hücresel eksprese edilmiş D13-proteininin protein amino asit dizisi, DYKDDDDK'nın (Bayrak-etiket, Hopp et al., 1988) bir C-ucu etiketli amino asit dizisini içerir ve karşılık gelen nükleotid dizisini üretmek için CHO kodon optimize edilmiştir. Bir memeli promotöründen ve bir memeli poli-adenilasyon sinyal dizisinden oluşan bu etiketli D13L-CHO kodon optimize edilmiş ekspresyon kasetinin nükleer DNA içine kararlı entegrasyonu, Urschitz et al., 2010 ve Matasci et al., 2011, tarafından bildirilen tipteki Transpozon entegrasyon teknolojisi ile başarılmıştır. CHO'nun transdüksiyonu, DNA2.0 Inc (ABD) firmasından satın alınan piggyBac vektör sisteminin kullanılması ile başarılmıştır.

25

D13L protein kodlama dizisinin yapılması - D13L protein kodlama dizisi, Vaksiniya virüsü Kopenhag suşunun D13L ORF'si tarafından kodlanan D13-amino asidinden DNA dizisini yeniden-oluşturma ile GeneArt of Life Technologies tarafından sentetik olarak yapılmıştır ve CHO hücrelerinde ekspresyon için kodon optimize edilmiştir. VACV-COP D13L ORF'nin protein kodlama dizisi, Dizi listesinde gösterilir.

30

D13L hücre aktarma vektörünün yapılması - pLL17'den kodon optimize edilmiş D13-protein kodlama dizisi (D13Lcho-Etiketli) PCR ile çoğaltılmıştır ve pLL19 üretmek için DNA2.0 Inc (Kat # pJ503-2) firmasından satın alınan transpozon piggyBac vektörü pJ503-2 (KometGFP ve Neo+ taşıyan pHULK piggyBac Memeli Ekspresyon Vektörü)

35

içine Bsa I klonlama yerleri vasıtasıyla alt-klonlanmıştır. In-Fusion klonlama (Clontech: ligazsız klonlama) ile Bsal arasına klonlama, komet GPF kodlama dizisini çıkarır ve bunu *in vitro* homolog rekombinasyon ile etiketli D13-protein kodlama dizisi ile değiştirir. D13Lcho-Etiketli protein kodlama dizisi şimdi, insan Elongasyon Faktörü 1

5 alfa promotörü (EF1a) kontrolü altındadır ve her ikisi transfekte edilmiş hücrelerin genomuna kararlı bir şekilde entegre edildiğinde, Neomisin direnç geni ile birlikte-eksprese edilecektir. Konak genomu içine kararlı integrasyona, piggyBac vektörünün Sol ve Sağ Transpozon sınırı ile bağlanmış DNA dizisinin Transpozon integrasyonu ile aracılık edilir.

10

D13LchoEtiketli dizinin PCR amplifikasyonu, aşağıdaki primer çifti kullanılarak yapılmıştır:

İleri Primer dizisi:

15

Inf-LL19-D13LC-Fw:

5'-AACACGTCTCGGGGgcccgccaccATGAACAACACCATCATCAA-3'

Büyük harf ile, koyu ve altı çizili metin halindeki dizi, In-Fusion klonlama için gerekli olan pJ503-2 (Neo+) içindeki komet GFP'nin yukarı akış Bsa I yerine homolog diziyi temsil eder. Küçük harf ile kırmızı ve altı çizili metin halindeki dizi, bir modifiye edilmiş Kozak dizisidir. Normal büyük harf ile yazılmış metin halindeki dizi, pLL17 içindeki D13Lcho-Etiketli dizinin 5' ucuna homologdur.

25

Geri Primer Dizisi:

Inf-LL19-D13LC-Rv:

5'-CAGGAAGACGCTTTTTCACTTGTCGTCGTCGTCCTTAG- 3'

30

Büyük harf ile, koyu ve altı çizili metin halindeki dizi, In-Fusion klonlama için gerekli olan pJ503-2 (Neo+) içindeki komet GFP'nin aşağı akış Bsa I yerine homolog diziyi temsil eder. Normal büyük harf ile yazılmış metin halindeki dizi, pLL17 içindeki D13Lcho-Etiketli dizinin 3' ucuna homologdur. Beklenen 1719bp'lik PCR ürünü, pLL19 oluşturmak için üreticinin talimatları izlenerek InFusion klonlama (Clontech) ile Bsal ile

35 kesilmiş pJ503-2 (Neo+) içine klonlanmıştır.

D13-proteinini eksprese eden bir CHO hücre hattının yapılması: p-LL19-CHO -CHO hücreleri, bir 6-gözlü plakanın gözlerine ekilmiştir, böylece bir gece boyu inkübasyondan sonra, bunlar %50 konflüans civarındadır. Qiagen firmasından (Kat #
 5 *301425) Effectene transfeksiyon reaktifi kullanılarak, 1 ug pLL19, üreticinin talimatları izlenerek %50 konflüent CHO hücrelerinin 1 gözüne transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş hücreler akabinde, büyüme ortamı (RPMI 1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/Pen-Strep) içinde gece boyu inkübe edilmiştir. Sonraki gün, ortam aktarılmış hücreleri seçmek için 1000 ug/mL Geneticin içeren büyüme ortamı ile değiştirilmiştir. Seleksiyon*
 10 *ortamı, her 2 ila 3 günde bir değiştirilmiştir. Aktarılmış hücreler %90 ila 100 konflüansa kadar büyüdüğünde, bunlar TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp, Kat #12563-029) kullanılarak geri-kazanılmıştır ve ilave hücre genişlemesi için bir T25 balon içine ekilmiştir.*

15 *D13L ekspresyonunun Western blotlama ile doğrulanması - Tavşan anti-D13 anti-serumlarının üretilmesi: Tavşanlara, natif D13-proteininin C-ucu amino asidini temsil eden KHL proteinine bağlı bir 16 amino asitlik peptit enjekte edilmiştir. Bu amino asit dizisi aşağıdaki şekildedir: CYDQGVSTITKIMGDNN. 1 ay arayla, toplamda üç enjeksiyon, bu amino asit dizisine karşı antikorlar meydana getirmek için yapılmıştır.*
 20 *Enjekte edilmiş tavşandan elde edilen serum, aşağıdaki hücre ekstraktlarına karşı western blot analizi ile test edilmiştir: 143B tam hücre ekstraktı, Bayrak-etiketli-D13L eksprese eden 143B transgenik hücre hattından (p-LL06-143b) tam ekstrakt ve VACV-COP enfekte edilmiş 143B hücre ekstraktı. Sonuçlar açık bir şekilde, tavşan anti-D13 serumunun D13-proteinini net bir şekilde spesifik olarak tanıyabildiğini göstermiştir.*

25 *CHO-aktarılmış hücre preparasyonu - D13cho-Etiketli aktarılmış CHO poliklonal genişletilmiş hücre hattı (p-LL19-CHO), normal CHO hücreleri ile olduğu gibi, bir T25 balon içinde %100 konflüansa kadar kültürlenmiştir. Her bir balondan elde edilen hücreler, TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp, Kat #12563-029) ile hasat edilmiştir,*
 30 *düşük hızlı sentrifügasyon (300 g, 5 dakika) ile pelet haline getirilmiştir, PBS ile yıkanmıştır ve 200 µL PBS içinde yeniden-süspanse edilmiştir.*

Western Blot analizi - 50 uL 5x SDS-PAGE yükleme tamponu her bir hücre süspansiyonuna eklenmiştir ve akabinde bunlar 98°C'de 5 dakika boyunca inkübe
 35 *edilmiştir, her bir hücre proteini ekstraktının 15 uL'si, %10'luk iki SDS-PAGE jeline*

yüklenmiştir, elektroforez uygulanmıştır ve akabinde elektro-blotlama ile Hybond ECL nitroselüloz üzerine blotlanmıştır. Elektro-blotlanmış membranlara akabinde, membran üzerindeki tüm mevcut spesifik-olmayan antikor bağlama yerlerini bloke etmek için Tween 20 içeren Tris Tamponlu Salin (TBST) içinde çözünmüş %5'lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca muamele edilmiştir. Membranlar akabinde, antikorlar ile problemlenmeden önce TBST içinde bir kaç kere yıkanmıştır. Membran 1, HRP içinde konjuge edilmiş anti-DDDDK etiket antikoru [M2]'nin (Abcam, Kat # ab49763) 1:5000'lik seyreltmesi ile gece boyu 4°C'de problemlenmiştir. Membran 2, Tavşan D13-anti-serumlarının 1:2000'lik seyreltmesi ile gece boyu 4°C'de problemlenmiştir, TBST ile 3 kere yıkanmıştır ve akabinde sekonder antikor, HRP konjuge edilmiş anti-tavşan antikorunun (Abcam, Kat # ab97069) 1:5000'lik seyreltmesi ile 2 saat boyunca problemlenmiştir. Her iki membran akabinde TBST ile 3 kere yıkanmıştır ve kullanıcı manüeli ile talimat verildiği üzere bunlara ECL western blotlama saptama reaktifleri (GE Healthare) ile muamele edilmiştir ve bunlar X-ışını filmine maruz bırakılmıştır.

ÖRNEK 10

VACV-COP'nin D13L ORF silinmesi ile atenüasyonu

20

Vaksiniya virüsünü atenüe etmek için, COP-D13L ORF'sinin protein kodlama dizisinin büyük bir kısmı ile birlikte korunmuş geç promotör dizisi, homolog rekombinasyon ile silinme için tahsis edilmiştir ve bunun yerine, bir seleksiyon/raportör kaset yerleştirilmiştir, böylece homolog rekombinasyon ile başarılı silinme, D13-proteinini eksprese eden bir CHO hücre hattında seçilebilir ve burada enfeksiyon kırmızı flüoresans ile görselleştirilebilir. Seleksiyon/raportör kaseti, bir vaksiniya promotörü kontrolü altında CP77 eksprese eden CHO konak aralık geninden ve DsRed-Express2 dizisinden oluşur.

30

COP-D13L silinme homolog rekombinasyon vektörünün yapılması - VACV-COP'den homolog rekombinasyon ile D13L ORF'sinin silinmesi için, COP-D13L ORF'sinin her iki yanında yer alan iki homolog rekombinasyon kolu tasarlanmıştır. Bununla birlikte, COP-D12L ORF'nin promotör dizisi, COP-D13L ORF'sinin 3' ucu içine uzanabileceğinden, COP-D13L ORF'sinin 3' ucunun yaklaşık olarak 200 bp'si aynen bırakılmıştır.

35

Homolog rekombinasyon kolları F1'in ve F2'nin yapılması - Homolog rekombinasyon kolları, aşağıda gösterilen primer çiftleri kullanılarak VACV-COP genomik DNA'sından PCR ile çoğaltılmıştır. Koyu ve altı çizili metin, F1 ve F2 kollarını seleksiyon/rapor kasetine ve Clontech firmasından In-Fusion kiti içinde sağlanan lineer hale getirilmiş pUC19'a birleştirmek için In-Fusion kollarını temsil eder. In-Fusion ligasyonu, pLL09 olarak gösterilen daire haline getirilmiş plazmid ile sonuçlanacaktır.

10 *VACV-COP DNA'sından D13L-F1 kolunu PCR ile çoğaltmak için kullanılan PCR primer çifti:*

Inf-PCR-D13L-F1-Fw: 5'-CGGTACCCGGGGATCACGAAAAATAATAGTAACCA-3'. Koyu ve altı çizili metin (15bp), ClonTech In-Fusion kiti ile sağlanan lineer hale getirilmiş pUC19 plazmidinin sol ucuna homolog diziyi temsil eder.

15

Inf-PCR-D13L-F1-Rv: 5'-AATTTAGTGTGCGCGTGGAAAAAGCTTACAATAAACTC-3'. Koyu ve altı çizili metin (15bp), Seleksiyon/Raportör kasetinin 5' ucuna homolog diziyi temsil eder. Beklenen PCR ürünü boyutu: 657 bp

20 *VACV-COP DNA'sından D13L-F2 kolunu PCR ile çoğaltmak için kullanılan PCR primer çifti:*

Inf-PCR-D13L-Fw: 5'-ATATTTAAATGCGCGCAATAATGGAACAAGAACCCT-3'. Koyu ve altı çizili metin (15bp), Seleksiyon/Raportör kasetinin 3' ucuna homolog diziyi temsil eder.

25

Inf-PCR-D13L-F2-Rv: 5'-CGACTCTAGAGGATCGCGCTGAGGTCGGCAACTACG-3'. Koyu ve altı çizili metin (15bp), ClonTech In-Fusion kiti ile sağlanan lineer hale getirilmiş pUC19 plazmidinin sağ ucuna homolog diziyi temsil eder. Beklenen PCR ürünü boyutu: 621p

30

Seleksiyon/raportör kasetinin yapılması – Seleksiyon/raportör ekspresyon kaseti, inek-çiçek virüsü 025L ORF'sinden (Brighton Red suşu) CP77 CHO konak-aralık geninden ve DsRed-Express2'nin kırmızı flüoresan protein kodlama dizisinden oluşur. Bu ekspresyon kaseti Life Technologies GeneArt tarafından sentetik olarak yapılmıştır,

35

böylece CP77 proteini kodlama dizisi, bunun natif promotörü (CP77 ATG başlangıç kodonunun yukarı akış dizisinin 100 bp'si) kontrolü altındadır ve çiçek-virüsü erken transkripsiyonel durdurma dizisi (T_sNT) ile sonlandırılmıştır. DsRed proteini kodlama dizisi, bir vaksiniya erken/geç promotörü kontrolü altındadır ve ayrıca çiçek-virüsü erken transkripsiyonel durdurma dizisi içinde sonlandırılmıştır.

pLL09'un birleşmesi - Seleksiyon/Raportör kaseti ile birlikte D13L-F1 ve D13L-F2 PCR ürünleri, pLL09 üretmek için ClonTech firmasından InFusion Kit'i içinde sağlanan pUC19 içine üreticinin talimatları izlenerek In-Fusion klonlama ile birleştirilmiştir.

10

Homolog rekombinasyon ile COP-D13L'nin silinmesi ve SCV104 üretmek için plak saflaştırma - COP-D13L ORF'si, protein kodlama dizisinin büyük bölümünü ve "TAAAT" korunmuş geç promotör elemanını silme ile inaktif hale getirilmiştir. COP-D13L ORF'si, bir vaksiniya virüsü geç promotörü kontrolü altındadır, burada korunmuş geç promotör elemanı, promotör aktivitesi için kritiktir (Moss, 2007) - bunun silinmesi COP-D13L ORFsinin susturulmuş hale gelmesi ile sonuçlanacaktır. Protein kodlama dizisinin ve korunmuş promotör elemanın silinmesi, VACV-COP ve pLL09 arasındaki homolog rekombinasyondan etkilenir, burada homolog rekombinasyonun sonucu, CP77-DsRed ekspresyon kasetinin silinmiş bölge içine yerleştirilmesidir. Bu ekspresyon kasetinin içeri yerleştirilmesi, şimdi SCV104 olarak gösterilen, rekombinant virüsün CHO hücrelerinde, ancak yalnızca bir fonksiyonel D13-proteini eksprese eden hücrelerde, örneğin, p-LL19-CHO'da, çoğalmasına olanak sağlar. Homolog rekombinasyondan sonra, "sarkıntı" parental virüsü (VACV-COP) kontamine etme, birbirini takip eden plak saflaştırma turları ile elimine edilmiştir. Kontamine eden parental virüsün varlığı, içeri yerleştirme yerinin PCR analizi ile görüntülenmiştir.

25

Homolog rekombinasyon - Büyüme ortamı (RPMI-1640/%10 FCS/2 mM Glutamax/Pen-Strep ve 1000 ug/mL Geneticin) içeren üç T25 balona, p-LL19-CHO ekilmiştir ve 37°C/%5 CO₂'de %100 konflüent olana kadar kültürlenmiştir. Enfeksiyon gününde, iki balon, 0,01 pfu/hücre olan bir moi'de VACV-COP ile enfekte edilmiştir, burada diğer balon enfekte edilmemiştir (enfekte edilmemiş kontrol). Balon 1 ve 2 oda sıcaklığında 45 dakika boyunca enfekte edildikten sonra, virüs inokülümleri uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin tek-katmanı, PBS ile iki kere yıkanmıştır. Yıkamadan sonra, 4 ml İdame Ortamı (MM: RPMI-1640/%2 FCS/2 mM Glutamax/Pen-Strep), ayrıca aynı yıkama adımından da geçmiş balon 3'ü içeren her bir balona eklenmiştir.

35

Transfeksiyon, Effectene Transfeksiyon reaktifi (Qiagen, Kat No 301425) kullanılarak ve üreticinin talimatları izlenerek yürütülmüştür. Özet olarak, 16 uL Güçlendirici, 150 uL EC tamponu içinde lineer hale getirilmiş 2 ug pLL09'a eklenmiştir ve iyice
 5 karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika boyunca beklemeye bırakılmıştır. Buna, 25 µl Effectene Transfeksiyon reaktifi eklenmiştir ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca beklemeye bırakılmıştır. Son olarak, 1 ml MM (RPMI-1640/%2 FCS/2 mM Glutamax/Pen-Strep) karışıma eklenmiştir ve kibar bir şekilde iyice birbirine karıştırılmıştır. Bu transfeksiyon akabinde, önceden VACV-COP ile enfekte edilmiş
 10 balon 1'e eklenmiştir.

Balonlar 1 (homolog rekombinasyon), 2 (yalnızca enfeksiyon kontrol), 3 (enfekte edilmemiş kontrol), 37°C/%5 CO₂'de gece boyu inkübe edilmiştir, burada sonraki gün her bir balona, her bir balon için 5 mL'lik taze MM ile bir ortam değişimi yapılmıştır ve
 15 ilaveten CPE'nin tamamı yalnızca balon 1'de görülebilece kadar 37°C/%5 CO₂'de inkübe edilmiştir. VACV-COP CHO hücrelerine enfeksiyöz-olmadığından balon 2'de enfeksiyon bulguları olmamalıdır ve tek-katman balon 3'te sağlıklı görünmelidir.

Gece boyu enfeksiyondan sonra, kırmızı flüoresan hücreler, bir çevrik flüoresan
 20 mikroskop ile inceleme altında net bir şekilde ayırt edilebilir olabilir. Hücreleri kültür ortamı içine kazıma, akabinde düşük hızlı sentrifügasyon (oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 500 g) ile pelet haline getirme ve hücre peletini 1 mL 10 mM Tris-HCl, pH 8, içinde yeniden-süspanse etme ile balon 1 içindeki hücreleri hasat etmeye karar verilmiştir. Bir viral ekstrakt, çok sayıda dondurma ve çözülme siklusları ile
 25 hazırlanmıştır ve plak saflaştırma fazı için hazır olarak -80°C'de saklanmıştır. Viral yapı, SCV104 olarak gösterilmiştir.

Plak saflaştırma prosesi - Gerekçe, homolog rekombinasyon ekstraktını seri olarak seyreltmektir ve her bir seyreltmeyi bir 48 gözlü plaka içinde kültürlen p-LL19-CHO
 30 hücrelerinin bir satırını enfekte etmek için kullanmaktır. Amaç, virüsü her bir göz için aşağıya 1 pfu enfeksiyona seyreltmektir ve akabinde hasat edilmeden önce yaklaşık olarak 30 saatlik enfeksiyondan sonra yalnızca 1 flüoresan plak içeren hücreleri aramaktır.

p-LL19-CHO hücreleri, bir 48-gözlü plakanın her bir gözüne ekilmiştir ve 37°C/%5 CO₂'de 1000 ug/mL Geneticin içeren büyüme ortamı (RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep) içinde %100'e kadar kültürlenmiştir.

- 5 Enfeksiyon için, homolog rekombinasyon ekstraktının (SCV104) buzu çözölmüştür ve topakları ve aggregatları dağıtıp parçalamak kısa bir süre sonike edilmiştir. Viral ekstraktın 10⁻⁵'ine aşağıya on-katlık seri seyreltme, 1 mL'lik hacimlerde MM (RPMI/%2 FBS/Glutamax/PenStrep) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir seyreltme için, 48-gözlü plakanın bir satırına, büyüme ortamı her bir gözden uzaklaştırıldıktan sonra
- 10 seyreltilmiş virüsün 500 uL'si ekilmiştir ve bunlar PBS ile bir kere yıkanmıştır. 48-gözlü plaka, viral adsorpsiyonun gerçekleşmesi için 45 dakika boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Viral adsorpsiyondan sonra, virüs inokölümü her bir gözden dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır, burada rezidüel inokölüm, her bir göz için 500 uL PBS'den oluşan bir yıkama adımı ile uzaklaştırılmıştır. Yıkamadan sonra, 500 uL MM (RPMI/%2
- 15 FBS/Glutamax/PenStrep) her bir göze eklenmiştir ve akabinde enfeksiyonların flüoresan kırmızı odakları bir flüoresan mikroskop altında net bir şekilde görölebilene kadar 37°C/CO₂'de inkübe edilmiştir.

- 20 Hasat etmek için, yalnızca olası en düşük seyreltmede bir tek flüoresan odak içeren gözler seçilmiştir. Seçilmiş gözlerden ortam dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır ve 100 uL 10 mM TrisHCl, pH 8, eklenmiştir. Plaka üç kere dondurulmuştur çözölmüştür ve akabinde seçilmiş gözlerin içerikleri, geri-kazanılmıştır. Her bir geri-kazanılmış plak için, plak saflaştırma prosesi, beş kere daha tekrar edilmiştir.

- 25 Bir seçilmiş klon akabinde akabinde ilaveten, büyüme ortamını gözden uzaklaştırma ve PBS içinde 500 uL'ye seyreltilmiş viral ekstraktın 10 uL'sini ekleme ile, %100 konflüansta p-LL19-CHO hücreleri içeren bir 6-gözlü plakanın 1 gözünü enfekte etme ile çoğaltılmıştır. Oda sıcaklığında 45 dakikadan sonra, 2 mL MM göze eklenmiştir ve hücrelerin büyük çoğunluğu bir flüoresan mikroskop altında kırmızı flüoresan ışık
- 30 yayana kadar 3 gün boyunca 37°C/%5 CO₂'de ilaveten inkübe edilmiştir. Enfekte edilmiş göz içindeki hücreler, kültür ortamı içine kazanmıştır ve akabinde 500 g'de 5 dakika boyunca pelet haline getirilmiştir. Pelet haline getirilmiş hücreler, 500 uL 10 mM TrisHCl, pH 8, içinde yeniden-süspanse edilmiştir ve bir viral ekstrakt yapmak için kısa bir süre sonike edilmiştir.

SCV104'ün D13L ORF'sinin içine CP77/DsRed ekspresyon kaseti yerleştirilmesinin PCR ile doğrulanması - Homolog rekombinasyondan ve plak saflaştırmasından sonra D13L ORF'sinin gerçekten CP77/DsRed ekspresyon kaseti ile sübstüte edilip edilmediğini belirlemek için PCR analizi yapılmıştır. Bir PCR primer çifti, iki yanında yer alan homolog rekombinasyon kollarının bölgesi dışını bağlaması için tasarlanmıştır, böylece bunlar, "uygulanmış" DNA'dan ziyade "natif" DNA dizisini bağlayacaklardır. Bu şekilde primer çifti tasarlama, bu primer çiftinin PCR amplifikasyonu için DNA şablonları olarak VACV-COP'yi ve SCV104'ü kullanabileceği ve PCR ürünlerinin boyutunun ekspresyon kasetinin D13L ORF'sinin içine yerleştirilmesi veya içeri yerleştirme olmayan virüsün, yani, VACV-COP, saptanması için gösterge olacağı anlamına gelir. Bu PCR analizi yalnızca içeri yerleştirmenin varlığını göstermez, aynı zamanda rezidüel kontamine etme parental virüsün (VACV-COP) çok sayıda plak saflaştırma turundan sonra hala mevcut olup olmadığını da belirleyebilir. VACV-COP'nin istenmeyen iz kontaminasyonunun varlığı, bu kontaminant SCV104'e *in trans* D13 yardımı sağlayabileceğinden ve böylece SCV104'ün atenüasyonunu azaltılabileceğinden hiç arzu edilmez.

QIAGEN DNeasy Doku Kiti'ni (Kat # 69504) kullanılarak DNA ekstraksiyonları – Viral DNA, üreticinin talimatı izlenerek DNeasy Doku kiti kullanılarak yukarıda SCV104 çoğaltılmış virüsün 200 uL'sinden ekstrakte edilmiştir. Özet olarak, bu 200 uL viral ekstrakta 20 ul Proteinaz K ekleme ve iyice karıştırma ile yapılmıştır. Buna, 200 uL tampon AL eklenmiştir ve 56°C'de (ısıtma bloku) 10 dakika boyunca inkübe etmeden önce iyice içine karıştırılmıştır. İnkübasyondan sonra, 200 uL %100 etanol eklenmiştir ve iyice içine karıştırılmıştır ve akabinde toplam hacim, bir spin kolonuna eklenmiştir. Sıvı, üretici kullanıcı el kitabı ile talimat verildiği üzere sentrifügasyon ile spin kolondan geçirilmiştir, akabinde spin kolonu AW1 ve AW2 tamponları ile yıkanır. Spin kolona bağlı DNA, iki kere 100 uL AE tamponu ile ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılmış DNA, bir tek tüp içine birleştirilmiştir ve PCR analizi için hazırdır ve PCR analizi için hazır olana kadar 4°C'de saklanmıştır.

PCR amplifikasyonu - SCV104'ten (bakınız, yukarıdaki bölüm 4.2.3.1) ekstrakte edilmiş DNA, içeri yerleştirmenin D13L ORF'si içinde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla PCR amplifikasyonu için bir şablon olarak kullanılmıştır. Aşağıda tarif edilen PCR primerleri, D13L ORF'sinin dışında iki yanında yer alan dizileri bağlar, böylece SCV104 DNA'sından amplifikasyon, parental virüsten, VACV-COP'tan, çoğaltılmış

2881 bp'lik bir PCR ürününün aksine 4360 bp'lik bir PCR ürününü çoğaltmalıdır. PCR analizi, SCV104'ün 6. plak saflaştırılmış klonlarının yalnızca, 4000 bp'den büyük ve 5000 bp'den küçük olanlara karşılık gelen bir ürünü çoğaltır, bu SCV104'ün D13L ORF'si içinde CP77/DsRed kaseti içerdiğini gösterir. 3000 bp civarında bir PCR ürününün olmaması, SCV104 çoğaltılmış stoklarda saptanabilen düzeylerde parental virüs kontaminasyonu olmadığı anlamına gelir.

Primer çiftinin detayları

10 ID_D12L_LL04_İleri: 5'-TACAAAATCAAATAATGGTCGAAAC-3'

ID_A2L_LL04_Geri: 5'-TGCCAAGAAAACACTCCTTCTAAGACAAT-3'

ÖRNEK 11

15

SCV104'ü Plak Enfektivite Analizleri ile atenüasyon için test etme

D13L ORF'si tarafından kodlanan protein viral birleşme için esansiyel olduğundan, bir kili, bir SCV104 kurtarılmış virüsün hücreye girişimin vaksiniya virüsü için permisif olan normal hücrelerde enfeksiyöz projeni viriyonları üretmeyebileceği ve bundan dolayı ilk enfeksiyonun, enfeksiyonun giderek genişleyen odaklarını oluşturmak için komşu hücrelere yayılmama yetisini bekleyecektir. Durumun bu olup olmadığını konfirm etmek için, bu buluşta tarif edilen D13L silinmiş virüs (SCV104), daha az sayıda plak oluşum biriminin bir 6-gözlü plaka içinde kültürlenmiş hücreleri enfekte etmek için kullanılabileceği bir noktaya kadar seri olarak seyreltilmiştir, böylece enfekte eden virüsün hücreden hücreye yayılması, günler süren bir periyot boyunca görüntülenebilir. Bu çalışmada, üç hücre hattı çalışılmıştır: vaksiniya virüsüne permisif olan 143B hücresi, vaksiniya virüsüne permisif olmayan, ancak vaksiniya virüsü CP77 proteinini eksprese ettiğinde permisif olabilen CHO hücreleri ve D13L proteinini eksprese eden bir rekombinant hücre hattı olan p-LL19-CHO. Bu buluşta tarif edilen, D13L ORF'si içine yerleştirilmiş bir CP77/DsRed ekspresyon kasetine sahip olan, böylece D13-proteini fonksiyonunun eksprese edilemediği, virüs p-LL19-CHO hücre hattında enfeksiyonun yalnızca enfeksiyöz odaklarını oluşturmalıdır. 143B hücresi tek-katmanı içinde enfeksiyonların odaklarının varlığı, kontaminant *in trans* D13L yardımı sağlayacağından, viral popülasyon karışımı içinde kontamine etme vaksiniya virüsünün

varlığını gösterir. CHO tek-katmanı içinde enfeksiyonların odaklarının varlığı, CP77/DsRed kasetinin içeri yerleştirilmesinin D13L ORF'sini inaktive etmediği anlamına gelir.

- 5 *Hücre düzeneği* - 143B, CHO ve p-LL19-CHO hücreleri 6 gözlü plakalara ekilmişti ve hücre tek-katmanları %100 konflüent olana kadar 37°C/%5 CO₂'de büyüme ortamı (RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep ve yalnızca p-LL19-CHO için 1000 ug/mL Geneticin) içinde kültürlenmiştir.
- 10 *Enfeksiyon* - Çoğaltılmış 3. plak saflaştırılmış viral ekstrakt, hücreleri enfekte etmek için kullanılmıştır. Bu virüsün bilinmeyen titresinden dolayı, stok virüsün 10⁻⁴'e 10-katlık seri seyreltilmesi aşağıdaki şekilde yapılmıştır: ilk olarak 60 ul stok virüs, 6 ml MM ortamı içinde seyreltilmiştir (Seyreltme 1, 1:100 seyreltme) ve akabinde ilave seyreltmeler 800 ul Seyreltme 1 ile 7,2 ml MM ortamına ekleme ile hazırlanmıştır (Seyreltme 2; 10⁻³ seyreltme) ve akabinde bir 10⁻⁴'lük seyreltme yapmak için tekrar edilmiştir. Enfeksiyon için, her bir seyreltmenin 500 uL'si, bir 6-gözlü plakanın her bir gözüne eklenmiştir - her bir hücre hattı için bir plaka kullanılmıştır. Viral adsorpsiyon, oda sıcaklığında 45 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir, bundan sonra viral inokülüm her bir gözden uzaklaştırılmıştır ve her bir göz, her bir göze 2 mL MM eklenmeden önce PBS ile iyice yıkanmıştır. Plakalar 37°C/%5 CO₂'de inkübe edilmiştir ve bir flüoresan mikroskop altında günlük olarak gözlenmektedir. 10⁻²'lik seyreltme, gözlem için en iyi viral enfeksiyon hızını üretmiştir.

- 25 *Mikroskop incelemesi* - Viral enfeksiyon, DsRed filtre (Kat#U-MRFPHQ, Olympus) ile flüoresan mikroskop (Olympus IX51) altında incelenmiştir. Görüntü, CellSens Digital Imaging Software (Olympus) kullanılarak çekilmiştir.

- Sonuçlar* - 10⁻²'lik seyreltme enfeksiyonu, başlangıç tek hücre enfeksiyonunu ve enfeksiyonun komşu hücrelere yayılmasını gözlemlemek için en iyi sonuçları üretmiştir.
- 30 143B hücresinin incelenmesi, gün 1'de tek hücre enfeksiyonlarının varlığını gösterir, burada virüs gün 2 ve gün 3 ile komşu hücrelere yayılamaz, bu virüsün tek hücrelere girişimin gerçekleştiğini, ancak enfeksiyöz viral projeninin gün 2 ve gün 3 ile üretilmediğini gösterir. Bu aynı zamanda, CHO tek enfekte edilmiş hücreleri için de doğrudur, yani, enfeksiyöz viral projeni başlangıç tek hücre enfeksiyonlarından
- 35 üretilmiştir.

p-LL19-CHO hücre hattının incelenmesi, başlangıç tek hücre enfeksiyonunun gün 1 ile enfeksiyonun küçük odakları kadar görülen projeni enfeksiyöz virüsü üretmiştir. Enfeksiyonların bu odakları gün 2 ve gün 3 ile boyları çabucak artar, bu viral
5 amplifikasyonun zamanla gerçekleştiğini gösterir.

Bu doğrultuda, herhangi bir vaksiniya virüsünden bir fonksiyonel vaksiniya yarım ay iskele proteini kodlayan dizinin uzaklaştırılması bu virüsü fazla bir şekilde atenüe edecektir. Bu virüsün ilk enfeksiyon üzerinde enfeksiyöz projeni virüsü üretememesine
10 rağmen, bunun proteininin, özellikle DsRed'in, ekspresyonu, görsel görüş kırmızı flüoresanstan bulgalandığı üzere, ilk tek enfekte edilmiş hücrelerde gerçekleşir. Bu virüs, vaksiniya virüsü enfeksiyonundan bağımsız olarak vaksiniya yarım ay iskele proteinini eksprese eden bir hücre hattından kurtarılabilir. Transgenik hücre hattı tarafından vaksiniya yarım ay iskele proteininin konstitütif ekspresyonu, bu hücre
15 hattının büyümesi veya fizyoloji üzerinde advers etkiye sahip değildir.

ÖRNEK 12

D13L eksprese eden C11-LL19-HeLa hücre hattının yapılması

20

Bir D13L silinmesi olan bir flüoresan-olmaya SCV'yi titre etmek için, litik plak oluşumunu destekleyen bir vaksiniya permisif hücre hattından oluşan, D13 proteinini eksprese eden bir kurtarma hücre hattı yapılmıştır. CHO hücrelerinde, CP77 eksprese eden vaksiniya virüsü veya CP77'nin hücre hattı ekspresyonu kristal viyole ile
25 boyanabilen ve göz ile sayılabilen litik plak oluşumlarını desteklemez. Bir titrasyon hücre hattı oluşturmak için, HeLa hücreleri, D13 proteini eksprese etmesi için bir konstitütif memeli promotöründen, başlangıç kodonu etrafında Kozak dizisi içeren ve bir poliadenilasyon sinyal dizisi içinde sonlanan D13-proteini kodlama dizisinden oluşan bir ekspresyon kasetinin kararlı entegrasyonu ile aktarılmıştır. Bu kaset akabinde,
30 konak hücre genomik DNA'sı içine karar gen transferine ve antibiyotik seleksiyonu ile başarılı entegrasyon için seleksiyona olanak sağlayan bir plazmid vektörü içine klonlanmıştır. Aktarılmış hücreler akabinde, D13 ekspresyon kaseti içeren hücreleri seçmek için antibiyotik seleksiyonu kullanılması ile çoğaltılmıştır ve akabinde hücrelerin tek-katmanlarını her bir hücre için 0,001 pfu olan bir moi'de enfekte etme ve 3 günlük
35 bir periyot boyunca en büyük plağı üreten hücre-hattı klonunu seçme ile SCV104

(D13L ORF silinmesi) ile bir plak analizi yapılmıştır. SCV104 sahip olduğu D13L ORF'sini iki ekspresyon kaseti ile değiştirir: biri CP77 proteininin ekspresyonu içindir ve diğeri bir kırmızı flüoresan proteininin ekspresyonu içindir. D13 proteini eksprese eden bir HeLa hücre hattının SCV104 ile enfeksiyonu, kırmızı flüoresan litik plaklar ile sonuçlanacaktır.

pLL19 - D13 hücre aktarma vektörünün yapılması: pLL19'un yapılması aşağıda tarif edilir. Bu plazmidde, C-ucu Bayrak-etiketli D13-proteini kodlama dizisi, konstitüif insan Elongasyon Faktörü 1 alfa promotörü kontrolü altındadır ve hücresel genomik DNA içine kararlı gen transferine transpozisyon ile aracılık edilir. Transpozisyon ayrıca, bir Neomisin antibiyotiği seleksiyon ekspresyon kasetini de içeri yerleştirir, böylece aktarılmış hücreler büyüme ortamına G418/Geneticin eklenmesi ile pozitif bir şekilde seçilebilir.

D13-Bayrak etiketli ekspresyon kasetinin pLL19 ile transdüksiyon ile HeLa hücreleri içine kararlı yerleştirilmesi: HeLa hücreleri, bir T25 balon içine ekilmiştir ve RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep büyüme ortamı içinde yaklaşık olarak %50 konflüansa kadar kültürlenmiştir. Qiagen (Kat # 301425) firmasından Effectene transfeksiyon reaktifi kullanılarak, 1 ug pLL19, üreticinin talimatları izlenerek %50 konflüent HeLa hücrelerinin T25 balonuna transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş hücreler akabinde büyüme ortamı (RPMI 1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/Pen-Strep) içinde gece boyu inkübe edilmiştir. Sonraki gün, ortam aktarılmış hücreleri seçmek için 1000 ug/mL Geneticin içeren taze büyüme ortamı ile değiştirilmiştir. Hücrelerin çoğu öldüğünde, kalan hücreler, bunların TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp, Kat #12563-029) ile balon yüzeyinden ayırma ile geri-kazanılmıştır ve tek hücre büyüme ortamı ve 1000 ug/mL Geneticin içeren 96-gözlü plakalar içinde ayrılmıştır. Bu plakalar, hücrelerin kolonileri her bir göz içinde görülebilene kadar 37°C/%5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Seleksiyon ortamı, her 2 ila 3 günde bir değiştirilmiştir. Hücrelerin her bir kolonisi, geri-kazanılmıştır ve aşağıdakine kültürleme ile seri olarak genişletilmiştir: 48-gözlü plaka ila 24-gözlü plaka ila 6-gözlü plaka ila T75 balon ve bir dondurulmuş hücre stoku yapmak için hazır olana kadar 1:5'lik ayırma oranı ile T75 balon içinde idame ettirilmiştir.

SCV104 plak oluşumunu en iyi destekleyen bir monoklonal hücre hattı için tarama: SCV104, inek çiçek virüsü 025L promotörü artı CP77 proteinini kodlayan ORF

ile değiştirilmiş D13L ORF'sine ve bir kırmızı flüoresan protein ekspresyon kasetine (DsRed Express2) sahip olan bir vaksiniya virüsüdür. CP77 ekspresyonu, HeLa hücrelerinde plak oluşumu için önemli değildir veya gerekli değildir, ancak bu virüs D13 proteininin hücre hattı ekspresyonu yokluğunda çoğaltılmayacaktır. Bununla birlikte,

5 D13-proteinini eksprese eden HeLa hücre hattında, SCV104 çoğalabilmelidir ve diğer komşu hücrelere yayılabilmelidir ve bunu yaparken hücre tek-katmanı içinde kırmızı flüoresan litik plaklar oluşturmaktadır. Bu virüs, plak oluşumunu en iyi destekleyen klonu seçmek için klonal LL19-HeLa hücre hattında bir plak oluşum çalışmasında kullanılmıştır.

10

Hücre hattı düzeneği: LL19-HeLa'nın çok sayıda hücre hattı klonu 6 gözlü plakaların gözleri içine ekilmiştir ve 37°C/%5 CO₂'de 1000 ug/mL Geneticin içeren büyüme ortamı içine %100 konflüansa kadar kültürlenmiştir.

15

Virüs enfeksiyonu: SCV104, virüsü MM (RPMI-1640/%2 FBS/2 mM Glutamax/pentastrep) içinde 10³ pfu/ml'ye seyreltme ile her bir hücre için 0,001 pfu'da hücreleri enfekte etmek için kullanılmıştır. 1 ml seyreltilmiş virüs enfeksiyon için her bir göze eklenmiştir. Bir 6-gözlü plakanın her bir gözü konflüent olduğunda yaklaşık olarak 1x10⁶ hücre içerir, bundan dolayı 1 ml 10³ pfu/ml 0,001 olan bir moi ile sonuçlanır. 0,001 olan bir

20 moi, tek enfekte edilmiş hücrelerden plak oluşumlarını garanti edecektir. Tüm plakalar oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir, böylece virüs hücreleri adsorbe edebilir ve bundan sonra 1 mL MM her bir göze eklenmiştir ve tüm plakalar akabinde 37°C/%5 CO₂'de inkübe edilmiştir böylece hücrelere senkronize viral girişi teşvik edilmiştir, akabinde zamanla hücreden hücreye yayılma ile sonuçlanan viral

25 amplifikasyon gerçekleşmiştir. Kırmızı flüoresan plak oluşumu, bir flüoresan mikroskop altında günlük olarak gözlenmiştir.

30

Mikroskop incelemesi: Üç günlük bir periyot boyunca viral enfeksiyon ve plak oluşumu DsRed filtre (Kat# U-MRFPHQ, Olympus) ile flüoresan mikroskop (Olympus IX51) altında incelenmiştir. Görüntü, CellSens Digital Imaging Software (Olympus) kullanılarak çekilmiştir.

Bulgular: Enfeksiyondan sonraki gün 1'de, tüm enfeksiyonlar, kırmızı flüoresanslı sporadik küçük odaklar ile sonuçlanmıştır. Gün 3 ile, tüm klonal hücre hatları, büyükçe

kırmızı flüoresan litik plak üretmiştir, burada klon 11 (C11), test edilen tüm klonların anlamlı olarak en büyük plak boyutlarını üretmiştir.

Sonuçlar: Bu bulgular, C11 klonunun (C11-LL19-HeLa), bir SCV104 enfeksiyonundan test edilen tüm klonların en büyük plak oluşumunu desteklemek için yeterli D13 proteini eksprese ettiğini gösterir. Bu hücre hattı klonu (C11), vaksiniya virüsünü titre etmek için yaygın bir şekilde kullanılan titrasyonun litik plak sayma yöntemi kullanılarak bir D13L silinmiş vaksiniya virüsünü kantifiye etmek için mükemmeldir.

10 ÖRNEK 13

CP77 ve D13L eksprese eden p-LL07-LL29-CHO hücre hattının yapılması

CHO hücreleri içinde bir D13L ORF'si silinmesi olan bir VACV-COP virüsünü kurtarmak için, D13 ve CP77 proteinlerini eksprese eden bir CHO hücre hattının yapılması gerekecektir. Bu, ekspresyonu yönlendirmek için bir memeli promotöründen, D13 ve CD77 proteinlerini kodlayan bir CHO tercihli kodon optimize edilmiş DNA dizilemesinin akabinde bir poliadenilasyon sinyal dizisinden oluşan bir D13 memeli ekspresyon kasetini ve CP77 memeli ekspresyon kasetini yapma ile yapılmıştır. Bu kasetler burada akabinde konak hücre genomik DNA'sına kararlı gen transferine ve antibiyotik seleksiyonu ile başarılı entegrasyon için seleksiyona olanak sağlayan plazmid vektörlerine klonlanmıştır. Aktarılmış hücreler akabinde, hem D13 hem de CP77 ekspresyon kasetlerini içeren hücreleri seçmek için antibiyotik seleksiyonu kullanılması ile çoğaltılmıştır. CP77'nin ekspresyonunu doğrulamak için, Güçlendirilmiş Yeşil Flüoresan protein eksprese eden bir vaksiniya virüsü (SCV505) transgenik hücre hattını enfekte etmek için kullanılmıştır, burada flüoresan plak gelişimi 4 günlük bir periyot boyunca izlenmiştir. 4 günlük periyot boyunca giderek genişleyen yeşil flüoresan plak boyutu, hücre hattı tarafından CP77 ekspresyonunu konfirme etmiştir. D13 proteininin ekspresyonunu doğrulamak için, CP77 (SCV104) ve DsRed flüoresan proteini eksprese eden bir D13L silinmiş vaksiniya virüsü transgenik hücre hattını enfekte etmek için kullanılmıştır, burada plak gelişimi 4 günlük bir periyot boyunca izlenmiştir. 4 günlük periyot boyunca giderek genişleyen kırmızı flüoresan plak boyutu, hücre hattı tarafından D13 proteini ekspresyonunu konfirme etmiştir.

35 ***pLL07 - CP77 gen transfer plazmidinin yapılması***

CP77 proteini kodlama dizisinin yapılması: CP77 protein kodlama dizisi, inek çiçek virüsü Brighton Red suşu UhiProtKB/Swiss-Prot: P12932.1'in 025L ORF'si tarafından kodlanan CP77'nin amino asit dizisinden DNA dizisini geri-oluşturma (geri translasyon veya ters translasyon) ile GeneArt GmbH (Almanya) tarafından sentetik olarak yapılmıştır ve Çin Hamsterı Over (CHO) hücrelerinde ekspresyon için kodon optimize edilmiştir.

CP77 hücre aktarma vektörünün yapılması: pPH51'den (kodon optimize edilmiş CP77 protein kodlama dizisi barındıran bir klonlama plazmidinden) kodon optimize edilmiş CP77 protein kodlama dizisi, PCR primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır, burada 5' primer, başlangıç kodonu etrafına bir Kozak dizisi eklemek için tasarlanmıştır ve 3' primer, durdurma kodonundan önce Bayrak-etiket dizisi eklemek için tasarlanmıştır. Çoğaltılmış PCR ürünü DNA2.0 Inc (ABD) firmasından satın alınan transpozon piggybac vektörü pJ507-2 (Hyg+) içine BsaI klonlama yeri vasıtasıyla alt-klonlanmıştır. BsaI içine klonlama etkili bir şekilde, pLL07 oluşturmak için kometGPF kodlama dizisini CP77 proteini kodlama dizisi ile değiştirir. CP77 şimdi, insan konstitütif Elongasyon Faktörü 1 alfa promotörü (EF1a) kontrolü altında olan bir hale gelir ve her ikisi transfekte edilmiş hücrelerin genomu içine kararlı bir şekilde entegre edildiğinde, higromisin direnç geni ile birlikte-eksprese edilir. Konak genomu içine kararlı integrasyona, piggyBac vektörünün Sol ve Sağ Transpozon sınırı ile bağlanmış DNA dizisinin Transpozon entegrasyonu ile aracılık edilir.

pPH51 plazmid DNA'sından CP77-CHO genini PCR ile çoğaltmak için kullanılan PCR primer çifti:

İleri Primer dizisi:

AACACGTCTCGGGGGgccgccaccATGTTCTGACTACCTGGAAAATGAGGAAGTG
(SEQ ID NO: 4)

Geri Primer dizisi:

CAGGAAGACGCTTTTtcaCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCCTGCTGCTCGAAG
ATCTTGTA (SEQ ID NO: 5). Durdurma kodonundan (küçük harf) sonra gelen
Bayrak Etiket dizisinin altı çizilidir.

5 **pLL29 - D13 gen transfer plazmidinin yapılması**

CHO-kodon optimize edilmiş D13 proteini kodlama dizisi, DNA2.0 Inc (Kat # pJ503-2)
firmasından satın alınan pJ503-02 (KometGFP ve Neo+ taşıyan pHULK piggyBac
Memeli Ekspresyon Vektörü) içine Bsa I klonlama yerleri vasıtasıyla klonlamadan önce
10 C-ucu Bayrak-etiket dizisini HA-etiket dizisi ile değiştirmek için (önceden tarif edildiği
üzere) pLL19'dan PCR ile çoğaltılmıştır.

D13L-HA hücre aktarma vektörünün yapılması: pLL19'dan C-ucu Bayrak-etiket
dizisi içermeyen kodon optimize edilmiş D13-protein kodlama dizisi PCR ile
15 çoğaltılmıştır ve pLL29 üretmek için DNA2.0 Inc (Kat # pJ503-2) firmasından satın
alınan transpozon piggyBac vektörü pJ503-2 (KometGFP ve Neo+ taşıyan pHULK
piggyBac Memeli Ekspresyon Vektörü) içine Bsa I klonlama yerleri vasıtasıyla alt-
klonlanmıştır. In-Fusion klonlama (Clontech: ligazsız klonlama) ile Bsal yerleri arasında
klonlama, kometGPF kodlama dizisini çıkarır ve bunu *in vitro* homolog rekombinasyon
20 ile yeni HA-etiketli D13-protein kodlama dizisi ile değiştirir. D13LchoHA-Etiketli protein
kodlama dizisi şimdi, insan Elongasyon Faktörü 1 alfa promotörü (EF1a) kontrolü
altındadır ve her ikisi transfekte edilmiş hücrelerin genomuna kararlı bir şekilde entegre
edildiğinde, Neomisin direnç geni ile birlikte-eksprese edilecektir. Konak genomu içine
kararlı integrasyona, piggyBac vektörünün Sol ve Sağ Transpozon sınırı ile bağlanmış
25 DNA dizisinin Transpozon integrasyonu ile aracılık edilir. pLL29'un bir plazmid haritası
aşağıda gösterilir.

**D13Lcho-HA etiketli dizinin PCR amplifikasyonu aşağıdaki primer çifti
kullanılarak yapılmıştır:**

30

İleri Primer dizisi:

Inf-LL19-D13LC-Fw:

5'-AACACGTCTCGGGGGGCCGCCACCATGAACAACACCATCATCAA -3'

35

Geri Primer dizisi:

Inf-LL27-D13L-Rv:

5'-GAGAGCAAGGACGGCTTTGAGGATAAATCTGTGGAACATCATATCGAATAGTTTGTTATTCGCGG
ATGATCT-3'

5

Altı çizili metindeki dizi, HA kodlama dizisini temsil eder. "tta", durdurma kodonunu temsil eder.

10 CP77-Bayrak etiketli ve D13-HA etiketli ekspresyon kasetlerinin pLL07 ve pLL29 ile eş-
zamanlı transdüksiyon ile CHO hücreleri içine kararlı ikili yerleştirilmesi

CHO hücreleri, bir T25 balonuna ekilmiştir, RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-
strep büyüme ortamı içinde yaklaşık olarak %50 konflüansa kadar kültürlenmiştir.
Qiagen firmasından (Kat # 301425) Effectene transfeksiyon reaktifi kullanılarak, 1 ug
15 pLL07 ve 1 ug pLL29, üreticinin talimatları izlenerek %50 konflüent CHO hücrelerinin
T25 balonuna transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş hücreler akabinde, büyüme
ortamı (RPMI 1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/Pen-Strep) içinde gece boyu inkübe
edilmiştir. Sonraki gün, ortam aktarılmış hücreleri seçmek için 500 ug/mL Geneticin ve
250 ug/mL Higromisin B içeren büyüme ortamı ile değiştirilmiştir. Seleksiyon ortamı,
20 hücrelerin çoğu ölene kadar her 2 ila 3 günde bir değiştirilmiştir ve tek hücrelerden
türetilmiş olan hücrelerin kalan kolonilerini ayrılmıştır. Aktarılmış hücreler %90 ila 100
konflüansa kadar büyüdüğünde, bunlar TrypLE Select (Gibco-Invitrogen Corp, Kat
#12563-029) kullanılarak geri-kazanılmıştır ve ilave hücre genişlemesi için bir T75
balon içine ekilmiştir. Bu yeni poliklonal hücre hattı, p-LL07-LL29-CHO olarak
25 gösterilmiştir.

Vaksiniya virüsünü ve D13L ORF'si silinmiş vaksiniya virüsünü kurtarma ile D13 ve CP77 ekspresyonunun doğrulanması

30 SCV505, Güçlendirilmiş Yeşil Flüoresan Protein (EGFP) eksprese eden ve yalnızca
CP77 proteini varlığında CHO hücrelerinde çoğalan bir vaksiniya virüsüdür. Bu virüs,
bu hücre hattı tarafından CP77 ekspresyonunu doğrulamak için p-LL07-LL29-CHO'da
bir plak enfektivite çalışmasında kullanılmıştır. SCV104, inek çiçek virüsü 025L
promotörü artı CP77 proteinini kodlayan ORF ile değiştirilmiş D13L ORF'sine ve bir

kırmızı flüoresan protein ekspresyon kasetine (DsRed Express2) sahip olan bir vaksiniya virüsüdür. Bu virüs, D13 proteininin hücre hattı ekspresyonu yokluğunda çoğalmayacaktır. Bu virüs, bu hücre hattı tarafından D13 ekspresyonunu doğrulamak için p-LL07-LL29-CHO'da bir plak enfektivite çalışmasında kullanılmıştır.

5

p-LL07-LL29-CHO hücre hattı plak-enfektivite çalışması

Bu çalışmada, SCV505 (D13⁺ CP77⁻ EGFP⁺) ve SCV104 (D13⁻ CP77⁺ DsRed⁺) tarafından enfeksiyondan p-LL07-LL29-CHO tarafından D13 ve CP77 ekspresyonunu kalifiye etmeye yardımcı olmak için çeşitli hücre hatları kullanılmıştır. Aşağıdaki hücre hatlarında beklenen sonuçları aşağıdaki şekildedir:

Vero: Bu hücre hattı normal olarak vaksiniya virüsü enfeksiyonuna permisiftir. Bu virüs normal olarak bu hücre hattında enfeksiyöz olduğundan, SCV505 enfeksiyonu için YEŞİL flüoresans ile saptandığı üzere çoğaltılmış virüsün zamanla hücreden hücreye yayılmasını gösteren plak oluşumu. Bununla birlikte, hücre hattı veya virüs tarafından D13 proteini ekspresyonu olmadığından çoğaltılmış virüsün zamanla hücreden hücreye yayılımının olmadığını gösteren, SCV104 enfeksiyonu için KIRMIZI flüoresans olmaması veya yalnızca bununla saptandığı üzere plak oluşumu olmadığı görülmelidir.

20

C11-LL19-HeLa: Bu, pLL19 transdüksiyonu vasıtasıyla D13 proteinini eksprese eden bir vaksiniya virüsü permisif hücre hattıdır. D13'ün hücre hattı ekspresyonuna bakılmaksızın YEŞİL flüoresans ile saptandığı üzere çoğaltılmış virüsün zamanla hücreden hücreye yayılmasını gösteren SCV505 enfeksiyonundan plak oluşumu beklenir. Bu virüs şimdi D13 proteininin hücre hattı ekspresyonundan dolayı bu hücre hattında çoğalabildiğinden, SCV104 enfeksiyonundan plak oluşumu beklenir.

CHO: Bu hücre hattı vaksiniya virüsü enfeksiyonuna permisif-değildir. KIRMIZI veya YEŞİL flüoresans olmaması veya yalnızca tek hücre KIRMIZI veya YEŞİL flüoresans ile saptandığı üzere SCV505 ve SCV104 enfeksiyonlarından plak oluşumu görülmemesi beklenir. Bu, bu virüsün CP77 eksprese edebilmesine ve SCV505'i kurtarması gereken hücre hattı tarafından CP77 proteini ekspresyonu yokluğuna rağmen, SCV104'ü kurtarması gereken hücre hattı tarafından D13 proteini ekspresyonu yokluğundan dolayı çoğaltılmış virüsün zamanla hücreden hücreye yayılmasının olmadığını gösterir.

35

p-LL07-LL29-CHO: Bu, hem D13 hem de CP77 proteinlerini eksprese eden bir CHO hücre hattıdır. YEŞİL flüoresans ile saptandığı üzere çoğaltılmış virüsün zamanla hücreden hücreye yayılmasının CP77 proteininin hücre hattı ekspresyonunu gösterdiğini gösteren SCV505'ten plak oluşumu beklenir. KIRMIZI flüoresans ile saptandığı üzere çoğaltılmış virüsün zamanla hücreden hücreye yayılmasının D13 proteininin hücre hattı ekspresyonunu gösterdiğini gösteren SCV104'ten plak oluşumu beklenir.

Hücre hattı düzenekleri: Vero, CHO, C11-LL19-HeLa ve p-LL07-LL29-CHO hücre hatları, çok sayıda 6 gözlü plakanın iki setine ekilmiştir (SCV505 enfeksiyonu için biri ve SCV104 enfeksiyonu için diğeri) ve 37°C/%5 CO₂'de %100 konflüansa kadar (aşağıda olduğu üzere) karşılık gelen büyüme ortamı içinde kültürlenmiştir:

- Vero, CHO: RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep
- C11-LL19-Hela: RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep artı 1000 ug/mL Geneticin
- p-LL07-LL29-CHO: RPMI-1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep artı 500 ug/mL Geneticin ve 250 ug/ml Higromisin B

20

Virüs enfeksiyonu: SCV104 ve SCV505, virüsü MM (RPMI-1640/%2 FBS/2 mM Glutamax/pen-strep) içinde 10³ pfu/ml'ye seyreltme ile her bir hücre için 0,001 pfu'da hücreleri enfekte etmek için kullanılmıştır. 1 ml seyreltilmiş virüs enfeksiyon için her bir göze eklenmiştir. Bir 6-gözlü plakanın her bir gözü konflüent olduğunda yaklaşık olarak 1x10⁶ hücre içerir, bundan dolayı 1 ml 10³ pfu/ml 0,001 olan bir moi ile sonuçlanır. 0,001 olan bir moi, tek enfekte edilmiş hücrelerden plak oluşumlarını garanti edecektir. Tüm plakalar oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir, böylece virüs hücreleri adsorbe edebilir ve bundan sonra 1 mL MM her bir göze eklenmiştir ve tüm plakalar akabinde 37°C/%5 CO₂'de inkübe edilmiştir böylece hücrelere senkronize viral girişi teşvik edilmiştir, akabinde zamanla hücreden hücreye yayılma ile sonuçlanan viral amplifikasyon gerçekleşmiştir. Flüoresan plak oluşumu, bir flüoresan mikroskop altında günlük olarak gözlenmiştir.

Mikroskop incelemesi: Dört günlük bir periyot boyunca viral enfeksiyon ve plak oluşumu SCV104 virüsü için DsRed filtre (Kat# U-MRFPHQ, Olympus) ve SCV505 için

GFP filtre (Kat# U-MGFPHQ, Olympus) ile flüoresan mikroskop (Olympus IX51) altında incelenmiştir. Görüntü, CellSens Digital Imaging Software (Olympus) kullanılarak çekilmiştir.

5 Bulgular:

0,001 olan moi 'de CHO hücrelerinin SCV104 ve SCV505 ile enfeksiyonu: enfeksiyondan sonra gün 1'de, her iki virüsün hücrelerin içine girdiğini, ancak enfeksiyonu komşu hücrelere yaymak için henüz çoğalmadığını gösteren yalnızca sporadik tek hücre flüoresansı görülebilir. Bununla birlikte, bu enfeksiyondan sonraki gün 2 ile gün 4 arasında aynı ilerlemede kalmıştır, yani, yalnızca tek hücre enfeksiyonları görülmüştür ve zamanla komşu hücrelere viral yayılma yoktur.

0,001 olan moi 'de Vero hücrelerinin SCV104 ve SCV505 ile enfeksiyonu: SCV505 ile enfeksiyon beklenildiği şekildedir, tümünün tüm plakların gün 4 ile hücre tek-katmanlarının bir konflüent enfeksiyonuna birleştiği bir noktaya kadar boyunun arttığı minik plaklar enfeksiyondan sonraki gün 1'de oluşmuştur. Bu, gün 1'den başlayarak çoğalan virüsün enfeksiyondan sonraki gün 4 ile tamlılığa kadar enfeksiyonu yaydığını gösterir. Bununla birlikte, bu SCV104 enfeksiyonundan tamamen farklıdır. Enfeksiyondan sonraki gün 1'de, sonraki 3 gün boyunca aynı kalan yalnızca sporadik tek hücre flüoresansı görülebilir. Bu, virüs D13L ORF'sinden yoksun olduğundan ve viral genom replikasyonunun sonra viral birleşmeyi başlatamayacağından ve ayrıca bu hücre hattı viral amplifikasyonu kurtarmaya yardımcı olmak için D13 proteinini eksprese etmediğinden, SCV104'ün bu hücre hattında artmadığını ve çoğalamadığını göstermiştir.

C11-LL19-HeLa hücrelerinin (D13 proteini eksprese eden HeLa hücre hattının) 0,001'de SCV104 ve SCV505 ile enfeksiyonu: SCV505 ile enfeksiyon beklenildiği şekildedir, tüm plakların gün 4 ile hücre tek-katmanlarının bir konflüent enfeksiyonuna birleştiği bir noktaya kadar boyu artan küçük plaklar enfeksiyondan sonraki gün 1'de oluşmuştur. Bu, gün 1'den başlayarak çoğalan virüsün enfeksiyondan sonraki gün 4 ile tamlılığa kadar enfeksiyonu yaydığını gösterir. SCV104 ile enfeksiyon da, bu hücre hattı tarafından üretilen D13 proteininin SCV104'teki D13L ORF'si yokluğu için kompleman (tamamlayıcı) olduğunu gösteren aynı sonuçları üretir ve bu hücre hattı tarafından üretilen miktar, bir aynen D13L ORF'sine sahip olan SCV505 ile

karşılaştırılabilir viral amplifikasyonu ve enfeksiyon yayılmasını desteklemek için yeterlidir.

p-LL07-LL29-CHO hücrelerinin (D13 ve CP77 proteinleri eksprese eden CHO hücre hattının) moi 0,001'de SCV104 ve SCV505 ile enfeksiyonu: Hem SCV104 hem de SCV505 için, enfeksiyondan sonraki gün 1'de minik enfeksiyon odakları gözlemlenmiştir. Sonraki 3 gün boyunca, bu enfeksiyon odakları, enfeksiyondan sonraki gün 4 ile nihayetinde konflüent enfeksiyonlara birleşen giderek artan bir şekilde daha büyük plaklara genişlemiştir. Bu, CP77'nin SCV505 amplifikasyonunu ve propagasyonunu desteklediğini eksprese edilmekte olduğunu ve D13 proteinin ayrıca SCV104 amplifikasyonunu ve propagasyonunu desteklediğini eksprese edilmekte olduğu göstermiştir.

Sonuç: Bu bulgular, CP77 ve D13 proteini eksprese eden bir CHO hücre hattının bir D13L silinmiş vaksiniya virüsünün üretilmesi ve imal edilmesi için hücre substratı olarak kullanılabileceğini gösterir. Normal permisif hücrelerin enfeksiyonu sırasında, bir D13L silinmiş virüs, viral birleşmeyi başlatamayabilecektir ve bundan dolayı bunun enfeksiyöz yaşam siklusunu tamamlayamayacaktır, böylece bu durum bunu güvenlik açısından insan ve hayvan aşılamları için bir mükemmel viral aşı aktarım vektörü yapacaktır. Bununla birlikte, bu hayli atenüe edilmiş vaksiniye vektörü, bu hücre hattı CHO konak-aralık proteinini (CP77) ve eksik birleşme proteinini (D13-proteinini) eksprese ettiğinde, biyoteknoloji dostu CHO hücre hattında imal edilebilir.

ÖRNEK 14

25

Western blotlama ile p-LL07-LL29-CHO hücre hattının D13 ve CP77 proteini ekspresyon analizi

Alt-yapı bilgi

30

p-LL07-LL29-CHO tarafından eksprese edilen D13 ve CP77 proteinleri, etiketlenir ve D13 ve CP77 proteininin C-ucu uçlarındaki amino asit etiket dizisini spesifik olarak tanıyan bir antikor kullanılarak saptanabilir. D13 ve CP77 proteinlerini spesifik olarak tanıyan antikorların yokluğunda, western-blot analizi, p-LL07-LL29-CHO hücre hattında D13 ve CP77 proteinlerinin ekspresyonunu konfirme etmek için bu anti-etiket antikorları

35

kullanılarak yürütülebilir. D13 proteininin C-ucu ucu, "YPYDVPDYA" HA-etiket amino asit dizisini içerir, burada CP77 proteininin C-ucu ucu, "DYKDDDDK" Bayrak-etiket amino asit dizisini içerir.

5 **Western-blot analizi metodolojisi**

Aşağıdaki hücre hatları, T75 balonları içine ekilmiştir ve uygun seleksiyon antikorları içeren büyüme ortamı (RPMI 1640/%10 FBS/2 mM Glutamax/Pen-Strep) içinde %100 konflüansa kadar kültürlenmiştir. Seleksiyon antibiyotikleri olmadan CHO, 500 ug/mL Geneticin ve 250 ug/ml Higromisin B ile p-LL07-LL29-CHO, 250 ug/ml Higromisin B ile p-LL07-CHO ve 1000 ug/mL Geneticin ile C11-LL19-HeLa. Konflüent hücre tek-katmanı ayrılmıştır ve 37°C'de 10 dakika boyunca TrypLE Select ile tek hücre süspansiyona parçalanmıştır. Her bir balondan hücreler, geri-kazanılmıştır ve 300 g'de 5 dakika boyunca sentrifügasyon ile pelet haline getirilmiştir ve PBS ile iki kere yıkanmıştır. Nihai yıkamadan sonra, hücre peletleri 500 uL PBS içinde yeniden-süspanse edilmiştir. 4× SDS-PAGE yükleme tamponu, 1× olan bir nihai konsantrasyonu vermesi için protein ekstraktına eklenmiştir ve 98°C'de 2 ila 3 dakika boyunca ısıtılmıştır. Denatüre edilmiş protein örneklerine bir Biorad Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gel (gradyan jel) yoluyla 200 V'de 30 ila 45 dakika boyunca elektroforez uygulanmıştır. Elektroforezden sonra, ayrılmış proteinler 100 V'de 1 saat boyunca elektro-blotlama ile nitroselüloz membrana transfer edilmiştir.

Protein saptaması için, nitroselüloz membran, spesifik-olmayan antikor bağlama yerlerini bloke etmek için PBS içinde %5'lik yağsız süt tozu içinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. HA etiketli proteinlerin saptanması için, membran bloke etme tamponu içinde konjuge edilmiş Anti-HA HRP'nin (Abcam Kat# AB1265) 1:1000'lik bir seyreltmesi içinde gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Bayrak-etiketli proteinlerin saptanması için, bir ayrı elektro-blotlanmış nitroselüloz membran, bloke etme tamponu içinde konjuge edilmiş Anti-Bayrak HRP'nin (Abeam Kat# AB49763) 1:1000'lik bir seyreltmesi içinde gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Membranlar akabinde PBS ile üç kere yıkanmıştır, her bir yıkama 5 dakika sürmüştür ve akabinde bir BioRad XRS jel doc sistemi kullanılarak görüntü almadan önce bir kaç dakika boyunca ECL substratı (Thermo Scientific Pierce ECL Western-blot substratı, Kat No 32106) içinde inkübe edilmiştir.

Sonuçlar

HA-etiketi saptanması vasıtasıyla D13 proteininin saptanması: anti-HA-etiketi antikoru, p-LL07-LL29-CHO'dan hazırlanan bir tam hücre proteini ekstraktından beklenen boyuttaki bir proteini saptayabilmiştir, ancak CHO hücrelerin hazırlanan bir tam hücre proteini ekstraktından proteini saptayamamıştır. Bu, p-LL07-LL29-CHO'nun D13 proteinini eksprese etmekte olduğunu açık bir şekilde göstermiştir.

Bayrak-Etiketi vasıtasıyla CP77 proteininin saptanması: anti-Bayrak-etiketi antikoru, p-LL07-LL29-CHO'dan ve p-LL07-CHO'dan (yalnızca CP77 eksprese eden CHO hücre hattından) hazırlanan bir tam hücre proteini ekstraktından beklenen boyuttaki bir proteini saptayabilmiştir, ancak CHO hücrelerin hazırlanan bir tam hücre proteini ekstraktından proteini saptayamamıştır. Bu, p-LL07-LL29-CHO'nun ve p-LL07-CHO'nun CP77 proteinini eksprese etmekte olduğunu açık bir şekilde göstermiştir.

Bayrak-etiketi saptanması vasıtasıyla D13 proteininin saptanması: C11-LL19-HeLa tarafından eksprese edilen D13-proteini, D13-proteinini bir C-ucu Bayrak-etiketi ile eksprese etmiştir ve bu hücre hattından yapılan tam hücre proteini ekstraktının bir western blotı yapıldığında, anti-Bayrak-etiketi antikoru, beklenen boyuttaki bir proteini saptayabilmiştir. Bu, C11-LL19-HeLa'nın D13 proteinini eksprese etmekte olduğunu açık bir şekilde göstermiştir.

Mevcut buluşun kapsamından ayrılmadan, çok sayıda modifikasyon teknikte uzmanlığı olan kişiler için aşikar olacaktır.

TABLO A

Dizi tanımlayıcılarının özeti

DİZİ ID

AÇIKLAMA

NO:

- | | |
|---|--|
| 1 | Memeli hücrelerinde (CHO) ekspresyon için kodon optimize edilmiş CP77'nin nükleotid dizisi |
| 2 | SEQ ID NO: 1 ile kodlanan CP77'nin amino asit dizisi |
| 3 | pLL07'nin nükleotid dizisi |

Dizi tanımlayıcılarının özeti

DİZİ ID	AÇIKLAMA
NO:	
4	pPH51 plazmidinden CP77-CHO geni için ileri primer
5	pPH51 plazmidinden CP77-CHO geni için geri primer
6	Vaksiniya Kopenhag K1L geninin nükleotid dizisi (Genbankası M35027.1'den ekstrakte edilmiştir)
7	SEQ ID NO: 6 ile kodlanan vaksiniya Kopenhag K1L'nin amino asit dizisi (Genbankası M35027.1'den ekstrakte edilmiştir)
8	VACV-COP-D13L-ORF
9	C-ucu bayrak-etiketi (DYKDDDK) ile hamster hücresi ekspresyonu için kodon optimize edilmiş SEQ ID NO: 1'i kodlayan nükleotid dizisi
10	Inf-LL19-D13LC'nin ileri primeri
11	Inf-LL19-D13LC'nin geri primeri
12	Bayrak-etiket proteini
13	D13L protein peptidi
14	Inf-PCR-D13L-F1'in ileri primeri
15	Inf-PCR-D13L-F1'in geri primeri
16	Inf-PCR-D13L-F2'nin ileri primeri
17	Inf-PCR-D13L-F2'nin geri primeri
18	CP77+DsRed ekspresyon kaseti 2903bp
19	CP77+DsRed ekspresyon kaseti
20	ID_D12L-LL04'ün ileri primeri
21	ID_A2L_LL04'ün geri primeri
22	CP77/DsRed seleksiyonu ile VACV-COP D13L'nin silinmesi için pLL09 homolog rekombinasyon vektörü
23	Hücrel nükleer genomik DNA'ya kararlı entegrasyon için pLL19 Etiketli-D13L-CHO kodon optimize edilmiş transpozon aracılı aktarma vektörü

TABLO 1**Titrasyon Sonuçları**

	24 saat	48 saat	72 saat
CHO	53pfu/mL	0	0
Vero	8.5×10^2 pfu/mL	14.25×10^6 pfu/mL	27.7×10^6 pfu/mL

Viral verimler (çıktı)

5

Enfeksiyon için kullanılan virüsün miktarı (Girdi), 4×10^4 pfu/mL'dir. Karşılaştırma için, verimler, 10^4 'lü değerleri olarak ifade edilir. Değerler, *her bir* zaman noktası için ortalama verimi, yani, 3 mL (2 göze bölünmüş 6 mL) hasattan elde edilen verimi, sunar.

	24 saat	48 saat	72 saat
CHO	0.0159×10^4 pfu	0	0
Vero	0.255×10^4 pfu	4275×10^4 pfu	8310×10^4 pfu

10

Üretim verimi (Çıktı/girdi oranı)

Aşağıdaki tablo, yukarıda üretilen virüsün verimini, her bir hasat zaman noktasında her bir hücre hattından elde edilen girdi düzeyini, yani, ÇIKTI/GİRDİ oranını, gösterir.

15

	24 saat	48 saat	72 saat
CHO	0.004	0	0
Vero	0.06	1069	2078

TABLO 2**pfu/mL cinsiden titrasyon sonuçları**

Virüs/Hücre hattı	Seyreltme	Sayım	Titre
VACV-COP/CHO	10^{-1}	0	0pfu/mL

pfu/mL cinsiden titrasyon sonuçları

Virüs/Hücre hattı	Seyreltme	Sayım	Titre
		0	
		0	
		0	
	Ortalama	0	
		2	
		2	
VACV-COP/Vero	10^{-7}	4	2.8×10^7 pfu/mL +/- %34
		3	
	Ortalama	2.8	
		8	
		5	
VACV-PH22/Vero	10^{-6}	12	0.75×10^7 pfu/MI +/- %43
		5	
	Ortalama	7.5	
		6	
		9	
VACV-PH22/CHO	10^{-7}	8	7.3×10^7 pfu/mL +/- %20
		6	
	Ortalama	7.3	

Her bir göz için enfeksiyondan elde edilen ortalama virüs çıktısı (verim)

Her bir balon için virüs ekstrakt hacmi, 1 mL'dir. Titrasyon için plakalama hacmi, 1 mL'dir. Bundan dolayı, virüs verimi, 1 mL (plakalama hacmi) ile çarpılmış pfu/mL cinsinden titrasyona eşittir.

Virüs	Hücre hattı	<i>Her bir balon için verim</i>
VACV-COP	CHO	0 pfu
	Vero	2.8×10^7 pfu
VACV-PH22	Vero	0.75×10^7 pfu
	CHO	7.3×10^7 pfu

Her bir pfu inokülüm için verim, yani, 1 pfu inokülümden üretilen toplam pfu

Her bir balon için inokülüm boyutu: 1×10^5 pfu

5

Virüs	Hücre hattı	<i>Her bir pfu inokülüm için verim</i>
VACV-COP	CHO	0 pfu/girdi pfu
	Vero	280 pfu/girdi pfu (inokülasyon için kullanılan her pfu için üretilen 280pfu)
VACV-PH22	Vero	75 pfu/girdi pfu (inokülasyon için kullanılan her pfu için üretilen 75pfu)
	CHO	730 pfu/girdi pfu (inokülasyon için kullanılan her pfu için üretilen 730pfu)

TABLO 3

Bu, her bir 1 mL viral ekstraktın titrasyonudur.

10

Hücre substratı	İndikatör Hücre hattı					
	Titrasyon pfu/mL	143B SE	SE %'si	Titrasyon pfu/mL	Vero SE	SE %'si
CHO	5.38E+03	5.74E+02	%10,70	7.25E+02	2.17E+02	%30.00
p-LL07-CHO	1.88E+08	2.45E+07	%13.10	3.95E+07	1.13E+07	%28,50

İndikatör Hücre hattı						
Hücre substratı	143B			Vero		
	Titrasyon pfu/mL	SE	SE %'si	Titrasyon pfu/mL	SE	SE %'si
143B	2.73E+08	3.95E+07	%14,50	3.73E+07	5.45E+06	%14.60

TABLO 4

Tablo 4, her bir 1 mL viral ekstrakt içinde virüsün toplam miktarını sağlar.

5

İndikatör hücre hattı				
Hücre substratı	143B		Vero	
	Verim pfu	SE	Verim pfu	SE
CHO	5.38E+03	5,74E+02	7.35E+02	2.17E+02
p-LL07-CHO	1.88E+08	2.45E+07	3.95E+07	1.13E+07
143B	2,73E+08	3,95E+07	3.73E+07	5.45E+06

TABLO B

Suş	ORF	Genom	Protein
Kopenhag	COP-D13L	M35027	AAA48114
Lister klonu 107	List-114	DQ121394	ABD52596
LC16mO	mO-149L	AY678277	AAW23819
LC16m8	M8-149L	AY678275	AAW23537
WR	WR-118	NC_006998	YP_233000
Dryvax-3737	VACV-114	DQ377945	ABD57648
Acambis-2000	VACAC2_129	AY313847	AAR17961
Acambis klonu 3	VACCL3-129	AY313848	AAQ93215
CVA	CVA-124	AM501482	CAM58288

Suş	ORF	Genom	Protein
Tiantan klonu 10	TT10-148	JX489137	AGJ91839
İnek Çiçek Virüsü GRI-90 suşu	CPXV-GRI-E13L	X94355	CAD90667
İnek Çiçek Virüsü Brighton Red	CPXV-131	NC_003663	NP_619914

BİBLİYOGRAFYA

- Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402
- Ausubel *et al.* (1999) *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47). John Wiley & Sons, New York
- Boshart *et al.* (1985) *Cell* 41:521
- Brooks *et al.* (1995) *J. Virol.* 69(12):7688-7698
- Dijkema *et al.* (1985) *EMBO J.* 4:761
- Drillien R. *et al.* (1978) *J Virol.* 28(3):843-50
- Gonnan *et al.*, (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777
- Ham RG. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53: 288-293
- Hsiao JC, *et al.* (2006) *J. Virol.* 80(15):7714-28
- Kibler *et al.* (2011) *PLOS ONE* 6(11)
- Meisinger-Henschel *et al.* (2007) *J. Gen. Virol.* 88(12):3249-3259
- Murphy *et al.* (1995) *Virus Taxonomy* Springer Verlag:79-87
- Puck TT, *et al.* (1958) *J. Exp. Med.* 108:945-956
- Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, N.Y.
- Shisler *et al.* (2004) *J. Virol.* 78(7):3553-3560
- Spehner D, *et al.* (1988) *J Virol.*, 62(4):1297-1304
- Werden SJ, *et al.* (2008) Chapter 3: Poxvirus Host Range Genes. In: *Advances in Virus Research*. 71

DİZİ LİSTESİ

5

<110> Sementis Limited

<120> VİRAL VEKTÖR İMALATI

<130> 35226179/WJP

<160> 11

5

<170> PatentIn versiyonu 3.5

<210> 1

<211> 2031

10

<212> DNA

<213> Yapay

<220>

15

<223> Memeli hücrelerinde (CHO) ekspresyon için kodon optimize edilmiş CP77'nin nükleotid dizisi

<400> 1

atgttcgact	acctggaaaa	tgagggaagt	gccctggacg	agctgaagca	gatgctgcgg	60
gaccgggacc	ccaacgacac	ccggaaccag	ttcaagaaca	acgccctgca	cgcctacctg	120
tttaacgagc	actgcaacaa	cgtggaagt	gtcaagctgc	tgctggactc	cggcaccac	180
ccccgcaca	agaactggcg	gcagctgacc	ccccgggcg	agtacacca	ctcccggcac	240
ggcaaagtga	acaaggatat	cggcatggtg	ctgctggaag	ctaccggcta	ctccaacatc	300
aacgacttca	acatcttcac	ctacatgaag	tccaagaacg	tggacatcga	cctgatcaag	360
gtgctggtg	aacacggctt	cgaactctcc	gtgaagtgcg	agaagcacca	ctccgtgac	420
gagaactacg	tgatgaccga	cgaacccgtg	cctgagatca	tgcacctgtt	catcgagaac	480
ggctgctccg	tgatctacga	ggacgaggac	gacgagtacg	gctacgccta	cgaqgaatac	540
cactcccaga	acgacgacta	ccagccccgg	aactgcggca	ccgtgctgca	cctgtacatc	600
atctcccacc	tgtactccga	gagcgactcc	cgtctcttgcg	tgaaccccg	ggtggtcaag	660
tgcctgatca	accacggcat	caacccctcc	agcatcgata	agaactactg	caccgcccctg	720
cagtactaca	tcaagtctcc	ccacatcgac	atcgatatcg	tgaagctgct	gatgaagggc	780
atcgacaaca	ccgcctacag	ctacatcgac	gacctgacct	gctgcacccg	gggcacatcg	840
gccgactacc	tgaacagcga	ctaccggtac	aacaaggacg	tggacctgga	tctggtcaaa	900
ctgttccctg	aaaacggcaa	gcctcacggc	atcatgtgct	ccatcgtgcc	cctgtggcgg	960
aacgacaaa	agacaatctc	cctgatccctg	aaaaccatga	actccgacgt	gctgcagcat	1020
atcctgatcg	agtacatcac	cttctccgat	atcgacatct	ctctggtcga	gtacatgctg	1080
gaatacggcg	ctgtggtcaa	caaagaggcc	atccacggct	acttcaagaa	catcaacatc	1140
gactcctaca	ccatgaagta	cctgctgaaa	aaagaggggc	gcgacgccgt	caaccacctg	1200
gacgacggcg	agatccccat	cggccacctg	tgcaagagca	actacggccg	gtacaacttt	1260
tacaccgaca	cctaccggca	gggcttccgg	gacatgtcct	acgcctgccc	catcctgtcc	1320
accatcaaca	tctgcctgcc	ctacctgaag	gacatcaata	tgatecgataa	gcggggcgag	1380
acactgctgc	acaaggccgt	gcgctacaac	aagcagtcct	tgggtgccct	gctgctggaa	1440
agcggtcccg	acgtgaacat	ccggtccaac	aacggctaca	cctgtatcgc	tatcgccatc	1500
aacgagtcct	ggaacatcga	gctgctgaat	atgctgctgt	gccacaagcc	tacctggac	1560
tgcgtgatcg	actccctgcg	cgaatcagc	aacatcgtgg	acaacgccta	cgccatcaag	1620
cagtgcacga	gatacgccat	gattatcgac	gactgcacat	cctccaagat	ccccgagtc	1680
atctccaagc	actacaacga	ctacattgac	atctgcaacc	aggaactgaa	cgaatgaag	1740
aaaatcatcg	tgggcggcaa	cacctgttc	agcctgatct	tcaccgatca	cggcgccaag	1800
atcatccacc	gctacgcca	caaccccgag	ctgcgggcct	actacgagtc	caagcagaac	1860
aagatctacg	tggaggtcta	cgaatcatc	agcaacgcca	tctggaagca	caacaagatt	1920
cacaagaaca	tggagtcctg	ggacgacaac	acctacatct	ccaacctgcc	ctataccatc	1980
aagtacaaga	tcttcgagca	gcaggattac	aaggatgacg	atgacaagtg	a	2031

<210> 2

<211> 676

<212> PRT

<213> Yapay

5

<220>

<223> SEQ ID NO: 1 ile kodlanan CP77'nin amino asit dizisi

<400> 2

10

```

Met Phe Asp Tyr Leu Glu Asn Glu Glu Val Ala Leu Asp Glu Leu Lys
 1           5           10           15

Gln Met Leu Arg Asp Arg Asp Pro Asn Asp Thr Arg Asn Gln Phe Lys
      20           25           30

Asn Asn Ala Leu His Ala Tyr Leu Phe Asn Glu His Cys Asn Asn Val
 35           40           45

Glu Val Val Lys Leu Leu Leu Asp Ser Gly Thr Asn Pro Leu His Lys
 50           55           60

Asn Trp Arg Gln Leu Thr Pro Leu Gly Glu Tyr Thr Asn Ser Arg His
 65           70           75           80

Gly Lys Val Asn Lys Asp Ile Ala Met Val Leu Leu Glu Ala Thr Gly
      85           90           95

Tyr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Asn Ile Phe Thr Tyr Met Lys Ser Lys

```

100	105	110
Asn Val Asp Ile Asp Leu Ile Lys Val Leu Val Glu His Gly Phe Asp		
115	120	125
Phe Ser Val Lys Cys Glu Lys His His Ser Val Ile Glu Asn Tyr Val		
130	135	140
Met Thr Asp Asp Pro Val Pro Glu Ile Ile Asp Leu Phe Ile Glu Asn		
145	150	155
Gly Cys Ser Val Ile Tyr Glu Asp Glu Asp Asp Glu Tyr Gly Tyr Ala		
165	170	175
Tyr Glu Glu Tyr His Ser Gln Asn Asp Asp Tyr Gln Pro Arg Asn Cys		
180	185	190
Gly Thr Val Leu His Leu Tyr Ile Ile Ser His Leu Tyr Ser Glu Ser		
195	200	205
Asp Ser Arg Ser Cys Val Asn Pro Glu Val Val Lys Cys Leu Ile Asn		
210	215	220
His Gly Ile Asn Pro Ser Ser Ile Asp Lys Asn Tyr Cys Thr Ala Leu		
225	230	235
Gln Tyr Tyr Ile Lys Ser Ser His Ile Asp Ile Asp Ile Val Lys Leu		
245	250	255
Leu Met Lys Gly Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp Leu		
260	265	270
Thr Cys Cys Thr Arg Gly Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr		
275	280	285
Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu Phe Leu Glu		
290	295	300
Asn Gly Lys Pro His Gly Ile Met Cys Ser Ile Val Pro Leu Trp Arg		
305	310	315
Asn Asp Lys Glu Thr Ile Ser Leu Ile Leu Lys Thr Met Asn Ser Asp		
325	330	335
Val Leu Gln His Ile Leu Ile Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Asp Ile Asp		
340	345	350

Ile Ser Leu Val Glu Tyr Met Leu Glu Tyr Gly Ala Val Val Asn Lys
 355 360 365
 Glu Ala Ile His Gly Tyr Phe Lys Asn Ile Asn Ile Asp Ser Tyr Thr
 370 375 380
 Met Lys Tyr Leu Leu Lys Lys Glu Gly Gly Asp Ala Val Asn His Leu
 385 390 395 400
 Asp Asp Gly Glu Ile Pro Ile Gly His Leu Cys Lys Ser Asn Tyr Gly
 405 410 415
 Arg Tyr Asn Phe Tyr Thr Asp Thr Tyr Arg Gln Gly Phe Arg Asp Met
 420 425 430
 Ser Tyr Ala Cys Pro Ile Leu Ser Thr Ile Asn Ile Cys Leu Pro Tyr
 435 440 445
 Leu Lys Asp Ile Asn Met Ile Asp Lys Arg Gly Glu Thr Leu Leu His
 450 455 460
 Lys Ala Val Arg Tyr Asn Lys Gln Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Glu
 465 470 475 480
 Ser Gly Ser Asp Val Asn Ile Arg Ser Asn Asn Gly Tyr Thr Cys Ile
 485 490 495
 Ala Ile Ala Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ile Glu Leu Leu Asn Met Leu
 500 505 510
 Leu Cys His Lys Pro Thr Leu Asp Cys Val Ile Asp Ser Leu Arg Glu
 515 520 525
 Ile Ser Asn Ile Val Asp Asn Ala Tyr Ala Ile Lys Gln Cys Ile Arg
 530 535 540
 Tyr Ala Met Ile Ile Asp Asp Cys Ile Ser Ser Lys Ile Pro Glu Ser
 545 550 555 560
 Ile Ser Lys His Tyr Asn Asp Tyr Ile Asp Ile Cys Asn Gln Glu Leu
 565 570 575
 Asn Glu Met Lys Lys Ile Ile Val Gly Gly Asn Thr Met Phe Ser Leu
 580 585 590
 Ile Phe Thr Asp His Gly Ala Lys Ile Ile His Arg Tyr Ala Asn Asn
 595 600 605

Pro Glu Leu Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Lys Gln Asn Lys Ile Tyr Val
 610 615 620

Glu Val Tyr Asp Ile Ile Ser Asn Ala Ile Val Lys His Asn Lys Ile
 625 630 635 640

His Lys Asn Ile Glu Ser Val Asp Asp Asn Thr Tyr Ile Ser Asn Leu
 645 650 655

Pro Tyr Thr Ile Lys Tyr Lys Ile Phe Glu Gln Gln Asp Tyr Lys Asp
 660 665 670

Asp Asp Asp Lys
 675

<210> 3

<211> 11742

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> pLL07'nin nükleotid dizisi

10

<400> 3

tcagaattgg ttaattgggt gtaacactga cccctatttg tttatttttc taaatacatt	60
caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa	120
ggaagaatat gagccatatt caacgggaaa cgtcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg	180
atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa	240
tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt tctgaaacat ggcaaaggta	300
gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggetgacg gaatttatgc	360
cacttccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga tgcattggtta ctcaccactg	420
cgatccccgg aaaaacagcg ttccaggtat tagaagaata tcttgattca ggtgaaaata	480
ttgttgatgc gctggcagtg ttctgcgcgc ggttgcactc gattctgtt tgtaattgtc	540
cttttaacag cgatcgcgta ttctgcctcg ctccaggcgca atcacgaatg aataacggtt	600
tqgttgatgc gagtgatatt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga	660
aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct	720
cacttgataa ccttattttt gacgagggga aattaatag ttgtattgat gttggacgag	780
tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccactctatg gaactgcctc ggtgagtttt	840
ctccttcatt acagaaacgg ctttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata	900
aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaact catgaccaa atcccttaac	960
gtgagttacg cgcgcgtcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	1020

ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct	1080
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg	1140
cttcagcaga ggcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt tagccacca	1200
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	1260
tgcctgcagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagangat agttacggga	1320
taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac	1380
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga	1440
agggagaaag ggggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag	1500
ggagcttcca gggggaaaac cctgggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg	1560
acttgaagct cgaattttgt gatgctcgtc aqggggggcg agcctatgga aaaacgccaq	1620
caacggggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct ttgtctcaca ttttcttcc	1680
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttaggtgag ctgataccgc	1740
tctcactatc ggcctttagc cctatctatc attggttata tagcctaatc caatattgga	1800
tattggccat tgcatacgtt gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt	1860
ccaatatgac cgcctggttg gcattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg	1920
gggtcattag ttcatagcc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc	1980
ccgctggtc gaccgcccaa cgaacccgcg ccattgacgt caataatgac gtatgtccc	2040
atagtaacgc caataaggac ttccattga cgtcaatggg tggagtattt accgtaaact	2100
gccacttg gctacatca agtgatcat atgccaagtc cgcacctat tgacgtcaat	2160
gacggtaaat ggcgcgctg gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttccact	2220
tggcagtaca tctacgtatt agtcatgct attaccatgc tgatggggtt ttggcagtac	2280
accaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac	2340
gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaataac	2400
cccgcgccgt tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga	2460
gctcgtttag tgaaccgtca gatcactaga agctttattg cggtagttta tcacagttaa	2520
attgctaacg cagtcaggcc aacatgggct ctacgctgga cgaagagcac atcctgagcg	2580
ccctgctgca gagcgacgac gaactggtag gcgaggacag cgacagcgag gtcagcgacc	2640
acgtgtccga ggacgacgtc cagtcgcaca ccgaggaagc cttcatcgac gaggtgcacg	2700
aagtgcagcc taccagcagc ggctccgaga tcttgagcga gcagaacgtg atcgagcagc	2760
ctggcagctc cctggccagc aacagaatcc tgacctgcc ccagagaacc atcagaggca	2820
agaacaagca ctgctggtcc acctccaaga gcaccaggcg gagcagagtg tccgccctga	2880

acatcgtgcg gagccagagg ggcgccacca gaatgtgcag aaacatctac gacccctgc	2940
tqtqcttcaa qctqtlcttc accqacqaa loatcaqqa qatcqtqaa tqqaccaacq	3000
ccgagatcaq cctgaagagg cggqagagca tqaccagcg caccctcaga gacaccaacg	3060
aggacgagat ctacgccttc ttccgcatcc tgggtgatgc cgcctgaga aaggacaacc	3120
acatgagcac cgaagacctg ttccagagat cctgagcat ggtgtacctg tccgtgatga	3180
gcagagacag attcgacttc ctgatcagat cctgagcat ggacgacaag agcatcagac	3240
ccaccctgcg ggagaaggac gtgttcaccc ccgtgcggaa gatctgggac ctgttcacac	3300
accagtgcac ccagaactac acccctggcg cccacctgac catcgatgag cagctgctgg	3360
gcttcagagg cagatgcctc ttccagagtgt acatcccca caagcccgac aagtacggca	3420
tcaaqaacct qatqalqlc qacaqccqa ccaaqtaac qalcaacgc atqccclacc	3480
tgggcagagg caccacagaca aacggcgtgc cctgqgga gtactacgtg aaagaactga	3540
gcaagcctgt gcatggcagc tgcaggaaca tcacatgga caactggttc accagcatcc	3600
cctggccaa gaacctcctg caggaaacct acaagctgac catcgtgggc accgtgcgga	3660
gcaacaagcg ggagatccca gagggtgtga agaacagcag atccagacct gtqggaacaa	3720
gcatgtcttg ctccgagggc cccctgaccc tgggtgacct caagcccaag cccgccaaga	3780
tgggtgtacct cctgtccagc tgcgacgagg acgccagcat caacgagagc accggcaagc	3840
cccagatggt gatgtactac aaccagacca agggcgcggt ggacacctg gaccagatgt	3900
gcagcgtgat gacatgagc agaaaagcca acagatggcc tatggccctg ctgtacggca	3960
tgatcaatat cgcctgcac aacagcttca tcactacag ccacaacgtg tccagcaagg	4020
gcgagaaggt gcagagccgg aagaaattca tgcggaacct gtacatgagc ctgacctca	4080
qcttcataq aaagaqactq qaagccccc cctqaaqag atacctccq qacaacatca	4140
gcaacatcct gcccaggaa gtgccaggaa caagcgagca cagcaccgag gaacctgtga	4200
tgaagaagag gacctantgc acctactgtc ccagcaagar cagaagaaag gccaaagcca	4260
gctgcaagaa atgcaaaaa gtgatctgcc gggagcaca catcgacatg tgcagagct	4320
gtttctgatt cagacatgat aagatacatt gatgagttt gacaaaccac aactagaatg	4380
cagtcaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctctatt tctaaccatt	4440
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag	4500
ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taagcaggtt	4560
taacctaga aaqalagtc qcqlaaaatt gacqcatqca ttcttqaat attqctctct	4620
ctttctaat agcgcgaatc cgtcgtgtg catttaggac atctcagtc ccgcttggaq	4680
ctcccgtag gctgtctgt caatgcggta agtgtcaatg attttgaact ataagcagcg	4740
cgtgagtcac aatgacgcat gatttatctt tacgtgactt ttaagattta actcatagga	4800

taattatatt gttatttcat gttctactta cgtgataact tattatatat atattttctt	4860
gttatagata tctttcttta tgttttaaat gcactgacct cccacattcc ctttttagta	4920
aaatattcag aaataattta aatacatcat tgcantgaaa ataaatgttt tttattaggc	4980
agaatccaga tgcacaaggc ccttcataat atccccagt ttagtagttg gacttaggga	5040
adaaaggaa ctttaantaga aattggacag caagaagcg agctattcct ttgcccctgg	5100
acgagtgcctg gggcgctcgt ttccactatc ggcgagtact tctacacagc catcggtcca	5160
gacggccgcg cttctgcggg cgatttgtgt acgcccagca gtcccggctc cggatcggac	5220
gattgcctcg catcgacct gcgcccagc tgcacatcg aatttgcct caaccaagct	5280
ctgatagagt tggccaagac caatgcggag catatacgcc cggagccgcg gcgatccctgc	5340
aaagtcaggc tgcctccgt cgaagtagcg cgtctgctgc tccatacaag ccaaccaagg	5400
cctccagaag aagatgttgg cgacctcgt ttgggaatcc cgaacatcg cctcgctcca	5460
gtcaatgacc gctgttatgc ggccattgtc cgtcaggaca ttgttgagc cgaatccgc	5520
gtgagagagc tgcggacttc cggggcagtc ctgggacaa agctatagct catcgagagc	5580
ctgcgcagc gacgcactga cgggtgcgtc catcacagtt tgcagtgat acacatgggg	5640
atcagcaatc gcgcatatga aatcacgcca tgtagtgtat tgaccgattc cttgcggtcc	5700
gaatgggccc aaccgcctcg tctggctaag atcgccgca gcgatcgcat ccatggcctc	5760
cgcgaccggc tgcagaacag cgggcagttc ggtttcaggc agatcttga acgtgacacc	5820
ctgtgcacgg cgggagatgc aataggtcag gctctcgtc aattccccaa tgtcaagcac	5880
ttccggatc gggagcggg ccgatgcaa gtgcgataa acataacgat ctttgtagaa	5940
accatcggcg cagctattta ccgcaggac atatccagc cctccacat cgaagctgaa	6000
agcagagat tcttcgacct ccgagagctg catcaggctg gacacgctgt cgaacttttc	6060
gatcagaaac ttctcgacag acgtcgcggt gagttcaggc tttttcatgg tggcggaaga	6120
aaagcccggc gatgaggaag aggagaacag cgcggcagac gtgcgctttt gaagcgtgca	6180
gaatgcgggg cctccggagg accttcgggc gcccgcccc cccctgagcc cgcacctgag	6240
ccgccccccg gaccacccc ttcccagcct ctgagcccag aaagcgaagg agcaagctg	6300
ctattgccc ctgccccaaa ggcctaccc cttccattgc tcagcgtgc tgtccatctg	6360
cacgagacta gtgagtcgt ctacttccat ttgtcacgtc ctgcacgac cgagctgcgg	6420
ggcggggggg aacttctga ctaggggagg agtagaagg gccgcgaagg gccacccaaa	6480
gaacggagcc ggttggcgcc taccgggtga tgtggaatgt gtgcgaggcc agaggccact	6540
tgtgtagcgc caagtgcaca gcggggctgc taaagcgcat gctccagact gccttgggaa	6600
aaagccctcc cctaccgggt agagaaactt gatctgtcgc cgaattcaa gcttcgtgag	6660

gctccgggtgc ccgtcagtg a cctgctatac tctggagacg gcacatcgcc cacagtcccc	6720
qaqaaatttq qaqqqqlcqq caallqaacc qqlqcciaqa qaaqqlqqc cqqqqltaac	6780
tgggaaagtq atgtcgtgta ctgqctccgc ctttttcccg aggggtgggg agaaccgtat	6840
ataagtgcag tagtcgcctg gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgcgc cagaacacag	6900
gtaagtgcag tgtgtggttc ccgcgggcct ggctctctta cgggttatgg cccttgctg	6960
ccctgaatta cttccacctg gctccagtac gtgattcttg atcccgagct ggagccaggg	7020
gggggcttg cgttttagga ggccttcgc ctggtgcttg agttgaggac tggcctgggc	7080
gctggggccg ccgcgtgcga atctgggtgg accttcgcgc ctgtctcgt gctttcgata	7140
agtcctagc catttaaat ttttgatgac gtgctgcgac gcttttttc tggcaagata	7200
qtcttqtaaa tqccqqccag qalcqacaca ctqqlatltc qqltttttgg cccqccqcc	7260
ggagcggggc ccgtcgttc cagcgcacat gttcggcgag gggggcctg cgaagcgggc	7320
caccgagaat ccgacggggg tagtctcaag ctgcccggcc tgcctcgtg cctggcctcg	7380
cgcgcctg tatcgcccg ccctggggcg caagcctgg ccggtcgga ccagttgcgt	7440
gagcggaaag atggccgctt cccggccctg ctccagggg ctcaaaatgg aggaagggc	7500
gtcggggaga ggggggggt gagtacacca caaaaaggaa aagggccttt cgttcctcag	7560
ccgtcgttc atgtgactc agggagtacc ggggcgcgtc caggcacctc gattagttct	7620
ggagcttttg gagtacgtc tctttaggtt ggggggaggg gttttatgc atggagtctc	7680
cccacactga gtgggtggg actgaagtta ggcagcttg gcaattgat taattctct	7740
tggaatttgg cttttttgag tttggtctt ggttcattct caagcctcag acagtgttc	7800
aaagtttttt tcttccattt caggtgtcgt gaacacgtct cggggggccg ccaccatgtt	7860
cgaactacct qaaaaatqaa aaqtqgcct qaacqacgt aaqcaqatgc tqccqqaacc	7920
ggaccccaac gacacccgga accagttcaa gaacaacgcc ctgcacgct acctgtttta	7980
cgagcactgc aacaangtgg aagtggtaaa gctgctgct gactcggga ccaacccct	8040
gcacaagaa tggcggcagc tgacccccc gggcgagtac accaactccc ggcacggcaa	8100
agtgaacaag gatataccca tgggtcgtct ggaagctacc ggctactcca acatcaacga	8160
cttcaacatc ttcacctaca tgaagtccaa gaacytggac atcgacctga tcaaggtgct	8220
ggtggaacac ggcttcgact tctccgtgaa gtgcgagaag caccactccg tgatcgagaa	8280
ctacgtgatg accgaagacc ccgtgcctga gatcatcgac ctgttcacgc agaacggctg	8340
ctccqtgac tacqaqqacq aqqacqacqa ctacqqtac qccacqaqq aataccactc	8400
ccagaacgac gactaccagc cccggaactg cggcacctg ctgcacctgt acatcatctc	8460
ccacctgtac tccgagagcg actcccggtc ttgctgaa cccgaggtgg tcaagtgcct	8520
gateaaccac ggcataaacc cctccagcat cgataagaa tactgcacc cctgcagta	8580

ctacatcaag tcttcccaca tcgacatcga tctcgtgaag ctgctgatga agggcatcga	8640
caacaccgcc tacagctaca tcgacgacct gacctgctgc acccggggca tcatggccga	8700
ctacctgaac agcgactacc ggtacaacaa ggacgtggac ctggatctgg tcaaaactgtt	8760
cctggaaaac ggcaagcctc acggcatcat gtgctccatc gtgcccctgt ggcggaacga	8820
naagagaca atcttccctga tcttgaanaa catgaactcc gacgtgctgc agcatatcct	8880
gatcgagtac atcaccttct ccgatatcga catctctctg gtcgagtaca tgctggaata	8940
cggcgctgtg gtcaacaaag aggccatcca cggctacttc aagaacatca acatcgactc	9000
ctacaccatg aagtacctgc tgaaaaaaga gggcggggac gccgtcaacc acctggacga	9060
cggcgagatc cccatcggcc acctgtgcaa gagcaactac gcccggtaca actttttacac	9120
cgacacctac cggcagggct tccgggacat gtctacgcc tgcacctacc tgtccacct	9180
caacatctgc ctgccttacc tgaaggacat caatatgac gataagcggg gcgagacct	9240
gctgcacaag gccgtgcgct acaacaagca gtccctgggt tccctgctgc tggaaagcgg	9300
ctccgagctg aacatccggt tccatccggt ctacacctgt ctggtatctg ccatcaacga	9360
gtcccggaac atcgagctgc tgaatatgct gctgtgccac aagcctacc tggactgcgt	9420
gatcgactcc ctgcgcgaga tcagcaacat cgtggacaac gccacgccca tcaagcagtg	9480
catcagatac gccatgatta tcgacgactg catctctctc aagatccccg agtccatctc	9540
caagcactac aacgactaca ttgacatctg caaccaggaa ctgaacgaga tgaagaaaat	9600
catcgtcggc ggcaacacca tgttcagcct gatcttcacc gatcacggcg ccaagatcat	9660
ccacgctac gccaaacaac ccgagctgcg ggctactac gagtccaagc agaacaagat	9720
ctacgtcgag gtctacgaca tcatcagcaa cggcatcgtg aagcacaaca agattcacao	9780
gaacatcgag tccgtggacg acaaacctc catctccaac ctgcctata ccatcaagta	9840
caagatcttc gagcagcagg attacaagga tgacgatgac aagtgaaaaa gcgtcttctc	9900
gttctcatca catcatatca aggttatata ccatcaatat tgcacagat gttacttagc	9960
cttttaatat ttctctaatt tagtgtatat gcaatgatag ttctctgatt tctgagattg	10020
agtttctcat gtgtaatgat tattttaggt ttctctttca tctgttcaaa tttttgtcta	10080
gttttatttt ttactgattt gtaagacttc tttttataat ctgcataatta caattctctt	10140
tactggcgtg ttgcaaatat ttctgtcat tctatggcct gacttttctt aatggttttt	10200
taattttaaa aataagtctt aatattcatg caatctaatt aacaatcttt tctttgtggt	10260
taggactttg agtcataaga aatttttctc tactctgaag tcatgatggc atgcttctat	10320
attattttct aaaagattta aagttttgcc ttctccattt agacttataa ttactggaa	10380
tttttttgtg tgtatggtat gacatatggg ttccctttta tttttacat ataatatat	10440

```

ttccctgttt ttctaaaaaa gaaaaagatc atcattttcc cattgtaaaa tgccatattt 10500
ttttcatagg tcacttacat atatcaatgg gtctgtttct gagctctact ctattttatc 10560
agcctcactg tctatcccca cacatctcat gctttgctct aaatcttgat atttagtgga 10620
acattctttc ccattttgtt ctacaagaat atttttgtta ttgtctttgg gctttctata 10680
tacattttga aatgagggtg acaagttaat aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa 10740
agattgactg gtattcttaa ctatgttgct ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta 10800
atgcctttgt atcatgctat tgcttcccggt atggtttcca tttctctctc ctgtataaa 10860
tcttggttgc tgtctcttta tgaggagtg tggtccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg 10920
tgactgtgt ttgtgacgc aacccccact ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc 10980
ctttccggga ctttcgcttt cccctccct attgccacgg cggaaactcat cgcgcctgc 11040
cttgcccgct gctggacagg ggctcggtc ttgggcaactg acaattccgt ggtgtgtgcg 11100
gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc gctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg 11160
acgtccttct gctacgtccc ttgggcccctc aatccagcgg accttcttcc ccgcggcctg 11220
ctgcggctc tgcggcctct tccgcctctt cgccttcgcc ctacagcagag tcggatctcc 11280
ctttgggccc cctccccgca tcgcctgcta ttgtcttgcc aatcctcccc ctgtctgtcc 11340
tgccccaccc cccccccag aatagaatga cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc 11400
tcattttatt aggaaggac agtgggagtg gcacctcca gggcaagga aggcacgggg 11460
gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta gaaggacat ttgttacttt atagaagaaa 11520
ttttgagttt ttgttttttt ttaataaata aataaacata aataaattgt ttgttgaatt 11580
tattattagt atgtaagtgt aaatataata aaacttaata tctattcaaa ttaataaata 11640
aacctcgata tacagaccga taaaacacat gcgtcaattt tacgcatgat tatctttaac 11700
gtacgtcaca atatgattat ctttctaggg ttaagaagac tg 11742

```

<210> 4

<211> 54

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> pPH51 plazmidinden CP77-CHO geni için ileri primer

10

<400> 4

aacacgtctc ggggggccgc caccatgttc gactacctgg aaaatgagga agtg 54

<210> 5

<211> 65

<212> DNA

<213> Yapay

5 <220>

<223> pPH51 plazmidinden CP77-CHO geni için geri primer

<400> 5

```
caggaaagacg ctttttcact tgtcatcgtc atccttqtaa tctgctgct cgaagatctt      60
gtact                                                                    65
```

10

<210> 6

<211> 855

<212> DNA

<213> Yapay

15

<220>

<223> Vaksiniya Kopenhag K1L geninin nükleotid dizisi (Genbankası M35027.1'den ekstrakte edilmiştir)

20 <400> 6

```

atggatctgt cacgaattaa tacttggaag tctaagcagc tgaaaagcct tctctctagt      60
aaagatacat ttaaggcgga tgtccatgga catagtgcct tgtattatgc aatagctgat      120
aataacgtgc gtctagtatg tacgttggtg aacgctggag cattgaaaaa tctctctagag      180
aatgaatttc cattacatca ggcagccaca ttagaagata ccaaaatagt aaagattttg      240
ctattcagtg gaatggatga ttcacaattt gatgacaaag gaaacaccgc attgtattat      300
gcggttgata gtggtaacat gcaaacggtg aaactgtttg ttaagaaaaa ttggagactg      360
atgttctatg ggaaaactgg atggaaaact tcattttatc atgccgtcat gcttaatgat      420
gtaagtattg tatcatactt tctttcagaa ataccatcta cttttgatct ggctattctc      480
cttaqttgta ttcacaccac tataaaaaat ggacacgtgg atatgatgat tctcttgctc      540
gactatatga cgtcgacaaa caccaataat tcccttctct tcattccgga cattaaattg      600
gctatagata ataaagacat tgagatgta caggctctgt tcaaatacga cattaatata      660
tactctgta atctggaaaa tgtactattg gatgatgccg aaataactaa gatgattata      720
gaaaagcatg ttgaatacaa gtctgactcc tatacaaaag atctcgatat cgtcaagaat      780
aataaattgg atgaataat tagcaaaaac aaggaactca gactcatgta cgtcaattgt      840
gtaaagaaaa actaa                                                                855

```

<210> 7

5 <211> 284

<212> PRT

<213> Yapay

<220>

10 <223> SEQ ID NO: 6 ile kodlanan vaksiniya Kopenhag K1L'nin amino asit dizisi
(Genbankası M35027.1'den ekstrakte edilmiştir)

<400> 7

```

Met Asp Leu Ser Arg Ile Asn Thr Trp Lys Ser Lys Gln Leu Lys Ser
1           5           10           15

```

15

Phe Leu Ser Ser Lys Asp Thr Phe Lys Ala Asp Val His Gly His Ser
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Tyr Ala Ile Ala Asp Asn Asn Val Arg Leu Val Cys Thr
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ala Gly Ala Leu Lys Asn Leu Leu Glu Asn Glu Phe Pro
 50 55 60
 Leu His Glu Ala Ala Thr Leu Glu Asp Thr Lys Ile Val Lys Ile Leu
 65 70 75 80
 Leu Phe Ser Gly Met Asp Asp Ser Gln Phe Asp Asp Lys Gly Asn Thr
 85 90 95
 Ala Leu Tyr Tyr Ala Val Asp Ser Gly Asn Met Gln Thr Val Lys Leu
 100 105 110
 Phe Val Lys Lys Asn Trp Arg Leu Met Phe Tyr Gly Lys Thr Gly Trp
 115 120 125
 Lys Thr Ser Phe Tyr His Ala Val Met Leu Asn Asp Val Ser Ile Val
 130 135 140
 Ser Tyr Phe Leu Ser Glu Ile Pro Ser Thr Phe Asp Leu Ala Ile Leu
 145 150 155 160
 Leu Ser Cys Ile His Thr Thr Ile Lys Asn Gly His Val Asp Met Met
 165 170 175
 Ile Leu Leu Leu Asp Tyr Met Thr Ser Thr Asn Thr Asn Asn Ser Leu
 180 185 190
 Leu Phe Ile Pro Asp Ile Lys Leu Ala Ile Asp Asn Lys Asp Ile Glu
 195 200 205
 Met Leu Gln Ala Leu Phe Lys Tyr Asp Ile Asn Ile Tyr Ser Val Asn
 210 215 220
 Leu Glu Asn Val Leu Leu Asp Asp Ala Glu Ile Thr Lys Met Ile Ile
 225 230 235 240
 Glu Lys His Val Glu Tyr Lys Ser Asp Ser Tyr Thr Lys Asp Leu Asp
 245 250 255
 Ile Val Lys Asn Asn Lys Leu Asp Glu Ile Ile Ser Lys Asn Lys Glu
 260 265 270
 Leu Arg Leu Met Tyr Val Asn Cys Val Lys Lys Asn
 275 280

5 <210> 8

<211> 551

<212> PRT

<213> Yapay

<220>

5 < 223> VACV-COP-D13L ORF

<400> 8

Met Asn Asn Thr Ile Ile Asn Ser Leu Ile Gly Gly Asp Asp Ser Ile
1 5 10 15

Lys Arg Ser Asn Val Phe Ala Val Asp Ser Gln Ile Pro Thr Leu Tyr
20 25 30

Met Pro Gln Tyr Ile Ser Leu Ser Gly Val Met Thr Asn Asp Gly Pro
35 40 45

Asp Asn Gln Ala Ile Ala Ser Phe Glu Ile Arg Asp Gln Tyr Ile Thr
50 55 60

Ala Leu Asn His Leu Val Leu Ser Leu Glu Leu Pro Glu Val Lys Gly
65 70 75 80

Met Gly Arg Phe Gly Tyr Val Pro Tyr Val Gly Tyr Lys Cys Ile Asn
85 90 95

His Val Ser Ile Ser Ser Cys Asn Gly Val Ile Trp Glu Ile Glu Gly
100 105 110

Glu Glu Leu Tyr Asn Asn Cys Ile Asn Asn Thr Ile Ala Leu Lys His
115 120 125

Ser Gly Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Asp Ile Ser Ile Gly Leu Thr Pro
130 135 140

Asn Asp Thr Ile Lys Glu Pro Ser Thr Val Tyr Val Tyr Ile Lys Thr
145 150 155 160

Pro Phe Asp Val Glu Asp Thr Phe Ser Ser Leu Lys Leu Ser Asp Ser
165 170 175

Lys Ile Thr Val Thr Val Thr Phe Asn Pro Val Ser Asp Ile Val Ile
180 185 190

Arg Asp Ser Ser Phe Asp Phe Glu Thr Phe Asn Lys Glu Phe Val Tyr
 195 200 205
 Val Pro Glu Leu Ser Phe Ile Gly Tyr Met Val Lys Asn Val Gln Ile
 210 215 220
 Lys Pro Ser Phe Ile Glu Lys Pro Arg Arg Val Ile Gly Gln Ile Asn
 225 230 235 240
 Glu Pro Thr Ala Thr Val Thr Glu Val His Ala Ala Thr Ser Leu Ser
 245 250 255
 Val Tyr Thr Lys Pro Tyr Tyr Gly Asn Thr Asp Asn Lys Phe Ile Ser
 260 265 270
 Tyr Pro Gly Tyr Ser Gln Asp Glu Lys Asp Tyr Ile Asp Ala Tyr Val
 275 280 285
 Ser Arg Leu Leu Asp Asp Leu Val Ile Val Ser Asp Gly Pro Pro Thr
 290 295 300
 Gly Tyr Pro Glu Ser Ala Glu Ile Val Glu Val Pro Glu Asp Gly Ile
 305 310 315 320
 Val Ser Ile Gln Asp Ala Asp Val Tyr Val Lys Ile Asp Asn Val Pro
 325 330 335
 Asp Asn Met Ser Val Tyr Leu His Thr Asn Leu Leu Met Phe Gly Thr
 340 345 350
 Arg Lys Asn Ser Phe Ile Tyr Asn Ile Ser Lys Lys Phe Ser Ala Ile
 355 360 365
 Thr Gly Thr Tyr Ser Asp Ala Thr Lys Arg Thr Ile Phe Ala His Ile
 370 375 380
 Ser His Ser Ile Asn Ile Ile Asp Thr Ser Ile Pro Val Ser Leu Trp
 385 390 395 400
 Thr Ser Gln Arg Asn Val Tyr Asn Gly Asp Asn Arg Ser Ala Glu Ser
 405 410 415
 Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile Asn Asp Pro Phe Ile Lys Gly Ile Asp
 420 425 430
 Phe Lys Asn Lys Thr Asp Ile Ile Ser Arg Leu Glu Val Arg Phe Gly
 435 440 445

Asn Asp Val Leu Tyr Ser Glu Asn Gly Pro Ile Ser Arg Ile Tyr Asn
450 455 460

Glu Leu Leu Thr Lys Ser Asn Asn Gly Thr Arg Thr Leu Thr Phe Asn
465 470 475 480

Phe Thr Pro Lys Ile Phe Phe Arg Pro Thr Thr Ile Thr Ala Asn Val
485 490 495

Ser Arg Gly Lys Asp Lys Leu Ser Val Arg Val Val Tyr Ser Thr Met
500 505 510

Asp Val Asn His Pro Ile Tyr Tyr Val Gln Lys Gln Leu Val Val Val
515 520 525

Cys Asn Asp Leu Tyr Lys Val Ser Tyr Asp Gln Gly Val Ser Ile Thr
530 535 540

Lys Ile Met Gly Asp Asn Asn
545 550

<210> 9

<211> 1680

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> SEQ ID NO:1'i kodlayan CHO kodon optimize edilmiş nükleotid dizisi

10

<400> 9

```

atgaacaaca ccatcatcaa ctccctgata ggcgggcgacg actccatcaa gcggtccaac      60
gtgttcgccc tggactccca gatccccacc ctgtacatgc cccagtagat ctccctgtcc      120
ggcgtgatga ccaacgacgg ccctgacaac caggtatcgc cctccttcga gatccgggat      180
cagtacatca ccgccctgaa ccacctggtg ctgtccctgg aactgcccga agtgaagggc      240
atgggcagat tcggctacgt gccctacgtg ggctacaagt gcatcaacca cgtgtccatc      300
tccagctgca acggcgtgat ctgggaaatc gagggcgagg aactgtacaa caactgcatt      360
aacaacacaa tcgccctgaa gcaactccggc tactcctccg agctgaacga catctccatc      420
ggcctgaccc ccaacgacac catcaaagaa cctccaccg tgtacgtgta catcaagacc      480
cccttcgacg tggagatata cttctccagc ctgaagctgt ccgactccaa gatcacctg      540
accgtgacct tcaacctgtg gtccgacatc gtgatccggg actccagctt cgacttcgag      600
acattcaaca aagaatttgt gtacgtgccg gagctgtcct tcateggcta catggtcaag      660
aacgtgcaga tcaagcccag cttcatcgag aagcctcgga gagtgatcgg ccagatcaac      720
cagcctaccg ccacgtgac agaggtgcac gccgccacat cctgagcgt gtacaccaag      780
cctactacg gcaacaccga caacaagttc atctcctacc ccggctacag ccaggacgag      840
aaggactaca tcgacgcta cgtgtcccgg ctgctggacg acctcgtgat cgtgtctgat      900
ggcccccta ccggtaccc tgagtctgcc gagatcgtgg aagtgccga ggacggcatc      960
gtcagcatcc aggacgccga tgtgtatgtg aagatcgaca acgtgccga caacatgtcc      1020
gtgtacctgc acaccaacct gctgatgttc ggaccccga agaattcctt catctacaac      1080
atctccaaga agttctcgc catcacgggc acctactccg acgccacca ggcgaccatc      1140
ttcgcccaca tctccacag catcaacatc atcgacacct ccattcccgt gtccctgtgg      1200
acctctcaga gaaacgtgta caacggcgac aacagatccg ccgagtcaa ggccaaggac      1260
ctgttcatca acgacccctt catcaagggc atcgacttca agaacaagac cgacatcatc      1320
tcccggctgg aagtgcctt cgqcaacgac gtgctgtact ccgagaacgg ccctatcagc      1380
cggatctaca acgagctgct gaccaagtcc aacaacggca ccagaacct gacctttaac      1440
tttaccacca agatcttctt ccggcccacc acctaccgg ctaacgtgtc cagaggcaag      1500
gacaagctga gcgtgcccgt ggtgtactcc acctggacg tgaaccaccc catctactac      1560
gtgcagaaac agctggtggt cgtgtgcaac gatctgtaca aggtgtccta cgaccagggc      1620
gtgtccatta ccaagatcat gggcgataac aacgactaca aggacgacga cgacaagtga      1680

```

<210> 10

5 <211> 44

<212> DNA

<213> sentetik primer

<400> 10

aacacgtctc ggggggcccgc caccatgaac aacaccatca tcaa 44

<210> 11

5 <211> 40

<212> DNA

<213> sentetik primer

<400> 11

10 caggaagacg cttttcact tgcgtcgtc gtcctttag 40

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Yapay

<220>

< 223> Bayrak-Etiket proteini

20 <400> 12

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 13

<211> 16

25 <212> PRT

<213> Yapay

<220>

<223> D13L peptidi

30

<400> 13

Cys Tyr Asp Gln Gly Val Ser Ile Thr Lys Ile Met Gly Asp Asn Asn
1 5 10 15

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> sentetik primer
 5
 <400> 14
 cggtacccgg ggatcacgaa aaataatagt aacca 35

 <210> 15
 10 <211> 38
 <212> DNA
 <213> sentetik primer

 <400> 15
 15 aatttagtgt gcgcgtggaa aaagcttaca ataaactc 38

 <210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 20 <213> sentetik primer

 <400> 16
 atatttaa at gcgcgcaata atggaacaag aaccct 36

 25 <210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> sentetik primer

 30 <400> 17
 cgactctaga ggatcgcgct gaggtcggca actacg 36

 <210> 18
 <211> 668

<212> PRT

<213> Yapay

<220>

5 <223> CPXV-125L Brighton Red'in dizisini içeren CP77 proteini

<400> 18

Met Phe Asp Tyr Leu Glu Asn Glu Glu Val Ala Leu Asp Glu Leu Lys

1		5		10		15													
Gln	Met	Leu	Arg	Asp	Arg	Asp	Pro	Asn	Asp	Thr	Arg	Asn	Gln	Phe	Lys				
		20						25					30						
Asn	Asn	Ala	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Phe	Asn	Glu	His	Cys	Asn	Asn	Val				
		35					40					45							
Glu	Val	Val	Lys	Leu	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Thr	Asn	Pro	Leu	His	Lys				
	50					55					60								
Asn	Trp	Arg	Gln	Leu	Thr	Pro	Leu	Gly	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ser	Arg	His				
65					70					75					80				
Gly	Lys	Val	Asn	Lys	Asp	Ile	Ala	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Ala	Thr	Gly				
				85					90						95				
Tyr	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Tyr	Met	Lys	Ser	Lys				
			100					105					110						
Asn	Val	Asp	Ile	Asp	Leu	Ile	Lys	Val	Leu	Val	Glu	His	Gly	Phe	Asp				
		115					120					125							
Phe	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	His	His	Ser	Val	Ile	Glu	Asn	Tyr	Val				
	130						135				140								
Met	Thr	Asp	Asp	Pro	Val	Pro	Glu	Ile	Ile	Asp	Leu	Phe	Ile	Glu	Asn				
145					150					155					160				
Gly	Cys	Ser	Val	Ile	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Tyr	Gly	Tyr	Ala				
				165					170						175				
Tyr	Glu	Glu	Tyr	His	Ser	Gln	Asn	Asp	Asp	Tyr	Gln	Pro	Arg	Asn	Cys				
			180					185						190					
Gly	Thr	Val	Leu	His	Leu	Tyr	Ile	Ile	Ser	His	Leu	Tyr	Ser	Glu	Ser				
		195					200					205							
Asp	Ser	Arg	Ser	Cys	Val	Asn	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Cys	Leu	Ile	Asn				
	210					215					220								
His	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ile	Asp	Lys	Asn	Tyr	Cys	Thr	Ala	Leu				
225					230					235					240				
Gln	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Ser	Ser	His	Ile	Asp	Ile	Asp	Ile	Val	Lys	Leu				
				245					250					255					

Leu Met Lys Gly Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp Leu
 260 265 270

Thr Cys Cys Thr Arg Gly Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr
 275 280 285

Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu Phe Leu Glu
 290 295 300

Asn Gly Lys Pro His Gly Ile Met Cys Ser Ile Val Pro Leu Trp Arg
 305 310 315 320

Asn Asp Lys Glu Thr Ile Ser Leu Ile Leu Lys Thr Met Asn Ser Asp
 325 330 335

Val Leu Gln His Ile Leu Ile Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Asp Ile Asp
 340 345 350

Ile Ser Leu Val Glu Tyr Met Leu Glu Tyr Gly Ala Val Val Asn Lys
 355 360 365

Glu Ala Ile His Gly Tyr Phe Lys Asn Ile Asn Ile Asp Ser Tyr Thr
 370 375 380

Met Lys Tyr Leu Leu Lys Lys Glu Gly Gly Asp Ala Val Asn His Leu
 385 390 395 400

Asp Asp Gly Glu Ile Pro Ile Gly His Leu Cys Lys Ser Asn Tyr Gly
 405 410 415

Arg Tyr Asn Phe Tyr Thr Asp Thr Tyr Arg Gln Gly Phe Arg Asp Met
 420 425 430

Ser Tyr Ala Cys Pro Ile Leu Ser Thr Ile Asn Ile Cys Leu Pro Tyr
 435 440 445

Leu Lys Asp Ile Asn Met Ile Asp Lys Arg Gly Glu Thr Leu Leu His
 450 455 460

Lys Ala Val Arg Tyr Asn Lys Gln Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Glu
 465 470 475 480

Ser Gly Ser Asp Val Asn Ile Arg Ser Asn Asn Gly Tyr Thr Cys Ile
 485 490 495

Ala Ile Ala Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ile Glu Leu Leu Asn Met Leu
 500 505 510

Leu Cys His Lys Pro Thr Leu Asp Cys Val Ile Asp Ser Leu Arg Glu
515 520 525

Ile Ser Asn Ile Val Asp Asn Ala Tyr Ala Ile Lys Gln Cys Ile Arg
530 535 540

Tyr Ala Met Ile Ile Asp Asp Cys Ile Ser Ser Lys Ile Pro Glu Ser
545 550 555 560

Ile Ser Lys His Tyr Asn Asp Tyr Ile Asp Ile Cys Asn Gln Glu Leu
565 570 575

Asn Glu Met Lys Lys Ile Ile Val Gly Gly Asn Thr Met Phe Ser Leu
580 585 590

Ile Phe Thr Asp His Gly Ala Lys Ile Ile His Arg Tyr Ala Asn Asn
595 600 605

Pro Glu Leu Arg Ala Tyr Tyr Glu Ser Lys Gln Asn Lys Ile Tyr Val
610 615 620

Glu Val Tyr Asp Ile Ile Ser Asn Ala Ile Val Lys His Asn Lys Ile
625 630 635 640

His Lys Asn Ile Glu Ser Val Asp Asp Asn Thr Tyr Ile Ser Asn Leu
645 650 655

Pro Tyr Thr Ile Lys Tyr Lys Ile Phe Glu Gln Gln
660 665

<210> 19

<211> 2903

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> CP77+DsRed ekspresyon kaseti dizisi

10

<400> 19

gcgcgcacac taaattatct tttattaata attgtacaag tttttgatct ggtataaata	60
cattcaaaaa tgataattta atgacattag ttgtgcgggt gtatagagtt cacagtaqct	120
cattcacttc tattcagtc aaatgtttga ttatctggaa aatgaggagg tggctctcga	180
tgaacttaaa cagatgttga gagatagaga tcctaataat accaggaacc aattcaagaa	240
taatgctcta catgcatacc ttttcaatga gcactgtaat aatgttgagg ttgtcaaact	300
actactagac agtggtaact atccattaca caaaaattgg agacagctta ctccattagg	360
ggaatacaca aatagtagac atggtaaagt taataaggat atagcgatgg ttctactaga	420

agctactgga tatagcaaca taaatgactt taatatattc acctatatga aatccaaaaa	480
tgtagatatt gacttgataa aggtattggt agaacatgga tttagattta gtgttaaagt	540
cgaaaaacat catttcagtta tagaaaatta tgtaattgaca gatgatccctg ttccctgaaat	600
tattgattta ttcatagaaa atggatgcag tgttatttat gaggacgagg atgatgagta	660
cggtacggg tatgaagaat atcactcaca aaatgacgat tacaacacg gaaattgcgg	720
tacagtatta catctgtata tcctctctca tctgtattca ggtcgggatt cgagatcatg	780
tgtgaaccgg gaagttgtta aatgtctgat taatcatgga atcaacccat cttctataga	840
taaaaactat tgtacagctc ttcaatatta tattaagtca tctcatatag atatagacat	900
cgttaaattg ttaatgaaag gaatagataa caccgcttat tcatatatag acgatctaac	960
atgttqtact cgaqqaatta tggctqatta tctaaatagt gattatagat acaataaaga	1020
tglagattta gatttgytca aattgttttt ggagattgga aaacggcagc gaataattgt	1080
tagtattgta ccactatgga gaaatgataa ggaaaccatc tctttgatat tgaaaacaat	1140
gaacttgggt gtccctcacc atataactaat tgggtatata aaatttcagc atataatata	1200
ctctctagtg gaatacatgt tggaaatagg agctgtggta aataaagagg ctattcacgg	1260
atactttaaa aatattaata ttgattctta cccgatgaaa tatctactaa aaaaggaagg	1320
gggagatgcc gtcaatcatc tcgatgatgg agagatcccg attggacacc tatgtaaatc	1380
caactatgga cgttataatt tctacactga tacatacaga cagggttttc gtgatatgtc	1440
ttatgcttgc ccaattctta gtactataaa catttgccca ccttatctta aagacattaa	1500
catgattgac aaacgaggag aaacactctc tcaaacgggt gttagatata ataaacaatc	1560
tctagtgtct ttactgctag aatccggttc agatgtcaac attagatcaa ataacggata	1620
tacatgtata gccattgcaa tcaacgaatc tagaaacatt gaactgtctg acatgctatt	1680
atgtcataaa cctacattag attgtgtgat tgattcattg agagaaatat ctaacatagt	1740
agataatgcc tatgctataa aacaatgtat tagatatgcc atgattatag atgactgtat	1800
atcgtctaag attccagagt ccataagtaa acactataat gattatatag atatttgcaa	1860
tcaagaattg aacgagatga aaaaaataat agtgggaggc aacactatgt tctcattaat	1920
atttactgat catggagcta aaattattca tcggtatgcc aataatccag aattacgtgc	1980
gtattatgag tcaaaacaaa ataaaatata cgtggaagta tatgatatta ttccaatgc	2040
gatagtcaag cataataaaa ttcataaaaa catagaatca gttgatgaca atacctacat	2100
ttctaatttg cttatacca tcaaatacaa aatattcgag caacaataag tattttttat	2160
caaaaaattg aaattttatt tttttttttt ggaatataaa taatatggat agcactgaga	2220
acgtcatcaa gcccttcatt cgcttcaagg tgcacatgga gggctccgtg aacggccacg	2280

```

agttcgagat cgagggcgag ggcgagggca agccctacga gggcaccag accgccaagc 2340
tgcaqgtgac caagggcgac cccctgccct tcgcctggga catcctgtcc cccaqgttcc 2400
agtacggctc caaggtgtac gtgaagcacc ccgcgcacat ccccgactac aagaagctgt 2460
ccttccccga qggcttcaag tgggagcgcg tgatgaactt cgaggacggc ggcgtggtga 2520
ccgtgaccca ggactcctca ctgcaggacg gcaccttcat ctaccacgtg aagttcatcg 2580
gcgtgaactt cccctccgac ggcctcgtaa tgcagaagaa gactctgggc tgggagccct 2640
ccaccgagcg cctgtacccc cgcgacggcg tgctgaaggc cgagatccac aaggcgctga 2700
agctgaaggc cgcgggccac tacctggtgg agttcaagtc aatctacatg gccaaagaagc 2760
ccgtgaagct gcccggtac tactacgtgg actccaagct ggacatcacc tcccacaacg 2820
aggactacac cgtggtggag cagtacgaac gcgcggaggc ccgccaccac ctgttccagt 2880
agtttttata tttaaattgcg cgc 2903

```

<210> 20

<211> 25

5 <212> DNA

<213> sentetik primer

<400> 20

tacaaaatca aataatggtc gaaac 25

10

<210> 21

<211> 29

<212> DNA

<213> sentetik primer

15

<400> 21

tgccaagaaa acactccttc taagacaat 29

<210> 22

20 <211> 6809

<212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> VACV-COP D13L with CP77/DsRed seleksiyonu ile VACV-COP D13L'nin silinmesi için pLL09 homolog rekombinasyon vektörü

<400> 22

	tcgcgcggttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
	ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
	accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
	attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgtat	300
5	tacgccagct ggcgaaagg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360

tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaaatt cgagctcggt acccggggat	420
cacqaaaaat aataqlaacc aallaqlatq qgaaaacttt tlaqcacata tqaqatclaa	480
aaaaagtggt actatggtag aggattatgg acacgagtac gttttttag atgagaggtt	540
ttctacttgc tcattagaag tataaaaaaa tagttccgta attaaatggc taagcgagta	600
agccttccag atgtggttat ttcagcaccct aaagcagtcct ttaagcccg ctaagaagaa	660
gcactcggtt gtatactacc aaagtattat aaatctatgg cagatgtgtc tattaagaca	720
aatagtgtaa ttgataagtg ttgggtttgt aatcaagatt tgggttttag acctattagt	780
attgagacat acaagggtgg tgaagtaggg tattctgtt ctaaaatatg tagggattcg	840
ttggcttcta tggttasgtc tcacgtagct cttagagaag aacccaaaaat ttctttgttg	900
cccttaqtat tctatqaaa laaqqaaaaa gttataaata caataaactt actaaqaal	960
aaagacggcg tttacggaag ctgttaactt aaqgaaaact cacaatttat agatatttct	1020
ctacggagtt tattgtaagc tttttccacg cgcacactaa attatttttt attaataatt	1080
gtacaagttt ttgatctggt ataaatacat tcaaaaatga taattcaatg acattagttg	1140
tgcgggtgta tagagttcac agtagctcat tcacttctat tcagtcaaaa tgtttgatta	1200
tctggaaaat gagggaggtg ctctcgatga acttaaacag atgttgagag atagagatcc	1260
taatgatacc aggaacaaat tcaagaataa tgctctacat gcataccttt tcaatgagca	1320
ctgtaataat gttgaggttg tcaaaactact actagacagt ggtactaatc cattacacaa	1380
aaatggaga cagtttactc cattagggga atacacaaat agtagacatg gtaagttaa	1440
taaggatata gcgatggttc tactagaagc tactggatat agcaacataa atgactttaa	1500
tatatccacc tatatgaaat ccaaaaatgt agatattgac ttgataaagg tattggtaga	1560
acatqgattt qattttaqt ttaaatqca aaaacatcat tcaqttataq aaaattatqt	1620
aatgacagat gatcctgttc ctgaaattat tgatttatcc atagaaaatg gatgcagtgt	1680
tatttatgag gaggaggatg atgagtaggg atacgggrat gaagaatata actcacaaa	1740
tgacgattat caaccacgaa attgcgggtac agtattacat ctgtatatca tctctcatct	1800
gtattcagag tcggattcga gatcatgtgt gaaccacgaa gttgttaaat gtctgattaa	1860
tcatggaaac aacccatctt ctatagataa aaactattgt acagctcttc aatattatat	1920
taagtcatct catatagata tagacatcgt taaattgtta atgaaaggaa tagataaac	1980
ggcttattca tatatagacg atctaactat ttgtactcga ggaattatgg ctgattatct	2040
aaataqtqat tataqalaca alaaaqatq atatttaqat ttqqtcaaat tqttttlqqa	2100
gaatggaaaa ccgcacggaa taatgtgtag tattgtacca ctatggagaa atgataagga	2160
aacctctct ttgatattga aaacaatgaa ctgggatgtc ctccaacata tactaattga	2220
gtatataaca ttcagcgata tcgatatctc tctagtggaa tacatgttgg aatatggagc	2280

tgtggtaa	aaagaggcta	ttcacggata	ctttaaaaat	attaatattg	attcttacac	2340
gatgaaat	ctactaaaaa	aggaaggggg	agatgccgtc	aatcatctcg	atgatggaga	2400
gatcccgatt	ggacacctat	gtaaatccaa	ctatggacgt	tataatttct	acactgatac	2460
atacagacag	ggttttcgtg	atatgtctta	tgcttgccca	attcttagta	ctataaacat	2520
ttgctacct	tatcttaaa	acattaacat	gattgacaaa	cgaggagaaa	cacttcttca	2580
caaggctggt	agatataata	aacaatctct	agtgtcttta	ctgctagaat	ccggttcaga	2640
tgtaacatt	agatcaata	acggatatac	atgtatagcc	attgcaatca	acgaatctag	2700
aaacattgaa	ctgctgaa	tgctattatg	tcataaacct	acattagatt	gtgtgattga	2760
ttcattgaga	gaaatatcta	acatagtaga	taatgcctat	gctataaaac	aatgtattag	2820
atatgccatg	attatagatg	actgtatctc	gtctaagatt	ccagatccca	taagttaaca	2880
ctataatgat	tatatagata	tttgcaatca	agaattgaac	gagatgaaa	aaataatagt	2940
gggaggcaac	actatgttct	cattaatatt	tactgatcat	ggagctaaaa	ttattcatcg	3000
gtatgcaat	aaataagat	tacgtgggta	ttatgagta	aaacaaata	aaataatagt	3060
ggaagtatat	gatattat	ccaatgcgat	agtgaagcat	aataaaattc	ataaaaaacat	3120
agaatcagtt	gatgacaata	cctacatttc	taatttgcc	tataccatca	aatacaaaat	3180
attcgagcaa	caataagtat	tttttatcaa	aaaattgaaa	ttttattttt	tttttttggg	3240
atataaataa	tatggatagc	actgagaacg	tcataaagcc	cttcatgcgc	ttcaagggtgc	3300
acatggaggg	ctccgtgaac	ggccacgagt	tcgagatcca	ggccgagggc	gagggcaagc	3360
cctacgaggg	cacccagacc	gccaagctgc	aggtgaccaa	ggggggcccc	ctgcccttcg	3420
cctgggacat	cctgtcccc	cagttccagt	acggctccaa	ggtgtacgtg	aagcaccocg	3480
ccgacatccc	cgactacaag	aagctgtcct	ccccgaggg	cttcaagtg	gagcgcgtga	3540
tgaacttcga	ggacggcggc	gtggtgaccg	tgaccagga	ctcctcactg	caggacggca	3600
ccttcactta	ccacgtgaag	ttcatcggtg	tgaacttccc	ctccgacggc	cccgtaatgc	3660
agaagaagac	tctgggctgg	gagccctcca	ccgagcgct	gtacccccgc	gacggcgtgc	3720
tgaagggcga	gatccacaag	gcgctgaagc	tgaaggcgg	cgccactac	ctggtggagt	3780
tcaagtcgat	ctacatggcc	aagaagcccg	tgaagctgcc	cgctactac	tacgtggact	3840
ccaagctgga	catcacctcc	cacaacgagg	actacacgt	ggtggagcag	tacgaacgcg	3900
ccgagggccc	ccaccacctg	ttccagtagt	ttttatattt	aaatgcgcgc	aataatggaa	3960
caagaaccct	aacttttaac	tttacaccaa	agatattctt	tagggcgaca	actattacgg	4020
ccaatgtatc	tagggggaaa	gataaactat	ctgttcgagt	agttttattcc	accatggatg	4080
tcaaccatcc	aatctattat	gtacaaaaac	aattggtagt	tgtatgtaat	gacctgtata	4140

aggatattta cgaacaagg gtaagtatta ccaagattat gggagataat aactaataat	4200
aatqaaaaca aactalaaq liqlaaalq atqaaalqt aaaaaatlc cqqaaqqaa	4260
cgcattgctt tcttcattt tatqaaacat tcccagaact taatctgtct ctaggtaaaa	4320
gcccattacc tagtctggaa tacggagcta attactttct tcagatttct agagttaatg	4380
atctaantag aatgcagacc gacatgttaa aactttttac acatgatata atgttaccag	4440
aaagcgatct agataaagtc tatqaaattt taaagattaa tagcgtaaag tattatggga	4500
ggagtactaa agcggagacc gtagttggcg aactcagacc gatcctctag agtcgacctg	4560
caggcatgca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc	4620
gtcaccaatt ccacacaca tacgagcccg aagcataaag tgtaaaacct ggggtgcta	4680
atqaqlaac taactacal laallqqtl ccqctcactc ccqctttcc aqtcqqaaa	4740
cctgtcgtgc cagctgcatt aatqaatcg ccaacggcg gggagaggcg gtttgcgtat	4800
tggcgctct tccgttctct cgcctcactg ctcgctgcgc tcggctgttc ggcgcgcgc	4860
agcgtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	4920
aggaagaac atgtgagcaa aagccagca aaagccagg aaccgtaaaa agcccgctt	4980
gttgggttt ttcctataggc tccggccccc tgacgagcat caaaaaatc gacgtcaag	5040
tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagtc	5100
cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tactctgcgc cttttctccc	5160
ttcgggaagc gtcgggttt ctcatagctc acgtcttggg tatctcagtt cgggttaggt	5220
cgttcgtcc aagctgggt gtgtgacga acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt	5280
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	5340
agccactqct aacaqatta qcaqacqag gtatgtaggc qgtcctacac aqttcttqaa	5400
gtggtggct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctggc ctctgctgaa	5460
gcagttacc ttgggaaaaa ggttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccacggctgg	5520
tagcgtggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga	5580
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtg gacgaaaaact cacttaagg	5640
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atctctttaa attaaaaatg	5700
aagttttaa tcaattataa gtatatatga gtaacttgg tctgacagtt accaatggtt	5760
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcattcatag ttgcctgact	5820
ccccctctc taqalaacta cqaacqqa qqqcttacca tctqcccca qtctqcaal	5880
gataccgca gacccacgt caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagcccg	5940
aaaggccgag cgcagaagt gtctgcaac ttctccgac tccatccagt ctattaattg	6000
ttgcgggaa gctagagtaa gtagttggc agttaatagt ttgcgcaac ttgttgcct	6060

```

tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggttc 6120
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgtttgtc aaaaaagcgg ttagctcctt 6180
cggctcctcg atcgttgta gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc 6240
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcctttctg tgactggtga 6300
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 6360
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa 6420
acgtttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 6480
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 6540
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcgcgcaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 6600
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt ttcaggggtt attgtctcat 6660
gagcggatac atatttgaa gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 6720
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 6780
aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtc 6809

```

<210> 23

<211> 11161

5 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> Hücresel nükleer genomik DNA'ya entegrasyon için pLL19 Etiketli-D13L-CHO

10 kodon optimize edilmiş transpozon aracılı aktarma vektörü

<400> 23

tcagaattgg ttaattgggt gtaacactga cccctatttg tttatttttc taaatacatt	60
caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa	120
ggaagaatat gagccatatt caacgggaaa cgtcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg	180
atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa	240
tctatcgctt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt tetgaaacat ggcaaaggta	300
gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc	360
cacttccgac catcaagcat ttatccgta ctctgatga tgcattggtt ctcaccactg	420
cgatccccgg aaaaacagcg ttccaggtat tagaagaata tctgattca ggtgaaaaa	480
ttgttgatgc gctggcagtg ttctgcgcc ggttgacctc gattctggt tctaattgtc	540
ctttaacag cgatcgcgta ttctgcctcg ctcaggcgca atcacgaatg aataacggtt	600
tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga	660
aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct	720

cacttgataa ccttattttt gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag	780
tcqqaatcqc aqaccqatalc caqqalettt ccatacclatq qaactqcctc qqtqaqlttt	840
ctccctcatt acagaaaacgg cttttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata	900
aattgcagtt tcatttgatg ctogatgagt ttttctaact catgacccaa atcccttaac	960
gtgagttacg cgcgcgtcgt tccactgagc gtcagacccc gttagaaaaga tcaaaggatc	1020
ttcttgagat cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct	1080
accagcgggtg gtttgttttc eggataaaga gctaccaaact ctttttcaga aggttaactgg	1140
cttcagcaga gcgcagatac caaataactgt tttcttagtg tagccgtagt tagccacca	1200
cttcagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc	1260
tqctqccat qccqalaaql cqlqlcttac cqqqltggac tcaaqaqat aqtlaccqa	1320
taaggcgacg cggtcgggt gaacggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaa	1380
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgaactatga gaaagcgcca cgttcccg	1440
agggagaaag gcggacaggt atccggttag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag	1500
ggagcttcca gggggaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccaccttg	1560
acttgagcgt cgaattttgt gatgctctgc agggggggg agcctatgga aaaaagcag	1620
caacgcggcc tttttacggt tcttgccct ttgctggcct ttgctcaca tgttttttc	1680
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttagagtga ctgataccgc	1740
tctcaatatt ggcatttagc catattatc attggtata tagcatcaat caatattg	1800
tattggccat tgcatacgt gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt	1860
ccaatatgac cgcctggtg gcattgatta ttgactagt attaatagta atcaattacg	1920
qqctcattaq ttcatacccc atatatggaq ttcgcqgta cataacttac qtaaatqqc	1980
ccgcctggct gaccgcccac cgaacccccc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc	2040
atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtaatt aggttaant	2100
gcccacttg cagtacatca agtgtatcat atgccaagtc cgcacctat tgacgtcaat	2160
gacggtaaat ggcgcgctg gcattatgcc cagtacatga cttacggga ctttctact	2220
tggcagtaaa tctacgtatt agtcacgct attaccatgc tgatgcggt ttggcagtac	2280
accaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac	2340
gtcaatggga gtttgtttt gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaataac	2400
cccccctt tqaacqaaal qqqcqqtaqq cqlqlacqqt qqqaqqicta tataaqcaga	2460
gctcgtttag tgaacggtca gatcactaga agctttattg cggtagttta tcacagttaa	2520
attgctaacg cagtcaggcc aacatgggct ctagcctgga cgaacagcac atctgagcg	2580
ccctgctgca gacgagcagc gaactgggtg gcgaggacag cgaacagcag gtcagcgacc	2640

acgtgtccga ggacgacgtg cagtcgaca ccgaggaagc cttcatcgac gaggtgcacg	2700
aagtgcagcc taccagcagc ggctccgaga tcctggacga gcagaacgtg atcgagcagc	2760
ctggcagctc cctggccagc aacagaatcc tgacctgccc ccagagaacc atcagaggca	2820
agaacaagca ctgctggtec acctccaaga gcaccaggcg gacgagagtg tccgccctga	2880
acatcgtgng gagccagagg ggcgccacca gaatgtgcag aaacatctac gacccccctg	2940
tgtgtctcaa gctgttcttc accgacgaga tcatcagcga gatcgtgaag tggaccaacg	3000
ccgagatcag cctgaagagg cgggagagca tgaccagcgc caccttcaga gacaccaacg	3060
aggacgagat ctacgccttc ttccggcctcc tgggtgatgc cgcctgaga aaggacaacc	3120
acatgagcac cgacgacctg ttcgacagat ccttgagcat ggtgtacgtg tccgtgatga	3180
gcagagacag attcgaactc ctgatcaqat gctcagaat ggcagacaag agcatcaqac	3240
ccacctgccc ggagaacgac gtgttcaccc ccgtgctgaa gatctgggac ctgttcctcc	3300
accagtgcac ccagaactac acccctggcg cccacctgac catcgatgag cagctgctgg	3360
gcttcagagg cagatgcccc ttcagagtggt acatccacca ccagcctgagc aagtcaggca	3420
tcaagatcct gatgatgtgc gacagcggca ccaagtacat gatcaacggc atgccctacc	3480
tgggcagagg caccagaca aacggcgtgc ccttggcgga gtactacgtg aaagaactga	3540
gcaagcctgt gcatggcagc tgcaggaaca tcacatgcga caactggttc accagcatcc	3600
ccttggccaa gaacctcctg caggaacctt acaagctgac catcgtgggc accgtgcgga	3660
gcaacaagcg ggaatccca gagggtcctga agaacagcag atccagacct gtgggaacaa	3720
gcatgttctg cttcgacggc cccctgaccc tgggtgtccta caagcccaag cccgccaaag	3780
tgggtgtacct cctgtccagc tgcgacgagg acgccagcat caacgagagc accggcaagc	3840
cccagatggc gatgtactac aaccagacca agggcgccgt ggcacacctg gaccagatgt	3900
gcagcgtgat gacatgcagc agaaagacca acagatggcc tatggccctg ctgtacggca	3960
tqatcaatat cgcctgcata aacagcttca tcatctacag ccacaacgtg tccagcaagg	4020
gcgagaaggc gcagagccgg aagaaattca tgcggaacct gtacatgagc ctgacctcca	4080
gcttcatgag aaagagactg gaagccccc cctgaagag atacctccgg gacaacatca	4140
gcaacatcct gcccaggaa gtgccaggaa caagcagcga cagcaccgag gaaccctga	4200
tgaagaagag gacctactgc acctactgtc ccagcaagat cagaagaaag gccaacgcca	4260
gctgcaagaa atgcaaaaaa gtgatctgcc gggagcaca catcgacatg tgcagagct	4320
gtttctgatt cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg	4380
cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tghtaaccatt	4440
ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag	4500

ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taagcaggtt 4560
 taaccttaqa aaqalaqlcl qcqlaaaatl qacqcalqca ttcttqaaat attqctclcl 4620
 ctttetaaat agcgcgaatc cgtcgctgtg catttaggac atctcagtcg ccgcttgag 4680
 cteccgtgag gcggtgcttg caatgcggta agtgtcactg attttgaact ataacgacg 4740
 cgtgagtcaa aatgacgcct gatttatctt tacgtgactt ttaagattta actcatacga 4800
 taattatatt gttatttcat gttctactta cgtgataact tatttatat atattttctt 4860
 gttatagata tctttcttta tgttttaaat gaactgaact cccacattcc ctttttagta 4920
 aaatattcag aaataattta aatacatcat tgcaatgaaa ataatgttt tttattagga 4980
 agaattcaga tgctcaaggc ctttcataat atccccagt ttagtagttg gacttaggga 5040
 acaaagqaac ctttaalaqa aatlcqacaq caaqaagcgc aqlcaqaaqa actcqtcaa 5100
 aaggcgatag aagcgcatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa gacgagga 5160
 gcggtcagcc cattegcgcg caagtctctt agcaatatca cgggtagcca acgctatgtc 5220
 ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcatg aatccagaaa agcggccatt 5280
 ttccaccatg atattcgga agcaggaatc gccatgggtc acgacgagat cctcgccgtc 5340
 gggcatgccc gctttgagcc tggcgaacag ttggcgggg ggcagccct gatgttcttc 5400
 gtccagatca tctgatcga caagacgggc ttccatccga gtacgtgttc gctcgatgg 5460
 atgtttcgt tgggtgtcga atggacaggt agccggatca agcgtatga gccgcgcct 5520
 tgcataagcc atgatggata cttctcggc aggagcaayy tgagatgaa ggcgatctg 5580
 ccccggaact tcgccaata gcagccagtc ccttcgcgt tcagtgaac cgtcgagac 5640
 agctgcgcaa ggaacgcgcg tcgtggccag ccacgatagc cgcgctgcct cgtcctgcag 5700
 ttcatlcagq qcaccqaca qctcgtctt gacaaaaaqa accqqgcgc cctcgcctga 5760
 cagccggaac acgcgccat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagt catagccga 5820
 tagctctcc acccaaggg ccggagagcc tgggtgcaat ccactctgt caatcatggt 5880
 ggcggacga aagcccgga atgaggaaga ggagaacagc ggcgcagag tgcgttttg 5940
 aagcgtgcag aatgcgggc ctcggagga ccttcgggcg ccgcgccgc cctgagacc 6000
 gcccttgagc ccgcccccg acccaacct tccagccct tgagcccaja aagcgaagga 6060
 gcaaagctgc tattggcgc tgcaccaag gctaccgc ttccattgt cagcgtgt 6120
 gtccatctgc acgagactag tgagtgtgc tacttccatt tgtcacgtcc tgcacgagc 6180
 qaactcqqq qcqqqqqqa acttccctac taqqqaqqa qlaqaaggt qcqcqaagq 6240
 gccacaaaag aacggagccg gttgcgcct accggtgat gtggaatgt tgcgagcca 6300
 gaggccactt gtgtagcgc aagtgcgcg cggggctgt aaagcgcctg ctcagactg 6360
 ccttgggaaa agcgcctcc ctaccggta gagaacctg atctgtcgc gcaattcaa 6420

cttcgtgagg	ctccggtgcc	cgtcagtgac	ctgctatact	ctggagacgg	cacatcgccc	6480
acagtccccg	agaagttagg	aggggtcggc	aattgaaccg	gtgcctagag	aaggtggcgc	6540
ggggtaaact	gggaaagtga	tgtcgtgtac	tggtcccgcc	ttttcccgga	gggtggggga	6600
gaaccgtata	taagtgcagt	agtcgccgtg	aacgttcttt	ttcgcaacgg	gtttgcgcgc	6660
agaacacagg	taagtgcagt	gtgtggttcc	cgggggacct	gactctttac	gggttatagg	6720
ccttgccgtg	cctgaattac	ttccacctgg	ctccagtaac	tgattcttga	tcccagactg	6780
gagccagggg	cgggccttgc	gctttaggag	cccttcggcc	tcgtgcttga	gttgaggcct	6840
ggcctggcgc	ctggggcgcc	cgcgtgcgaa	tctggtggca	ccttcggcgc	tgtctcgtg	6900
ctttcgataa	gtctctagcc	attttaaatt	tttgatgacg	tgctgcgacg	ctttttttct	6960
ggcaagatac	tcttqtaaat	gcccgcacag	atctgcacac	tggtatttcg	gtttttgggc	7020
cgggggcggg	cgacggggcc	cgtgcgtccc	agcgccacat	ttggggagag	cggggcctgc	7080
gagcgcggcc	accgagaatc	ggacgggggt	agtcctcaag	tgcccgccct	gctctggtgc	7140
ctgggactcgt	gcgggactgt	atcgccacgg	ctgggggggc	agggcggccc	cgggtgggac	7200
cagttgcgtg	agcggaaaga	tgcccgcttc	ccggccctgc	tccagggggc	tcaaaatgga	7260
ggacgcggcg	ctcgggagag	cgggcgggtg	agtcacccac	acaaaggaaa	agggcctttc	7320
cgtcctcagc	cgtcgttcca	tgtgactcca	cggagtaccc	ggcgccgtcc	aggcacctcg	7380
attagttctg	gagcttttgg	agtacgtcgt	ctttaggttg	gggggagggg	ttttatgcga	7440
tggagtttcc	ccacactgag	tgggtggaga	ctgaagttag	gccagcttgg	cacttgatgt	7500
aattctcctt	ggaatttggc	ctttttgagt	ttggatcttg	gttcattctc	aagcctcaga	7560
cagtggttca	aagttttttt	cttccatttc	aggtgtcgtg	aacacgtctc	ggggggcgcc	7620
caaccatgaa	caacaccatc	atcaactccc	tgatcggcgg	cgacgactcc	atcaagcggc	7680
ccaacgtgtt	cgcctgggac	tcccagatcc	ccacctgta	catgccccag	tacatctccc	7740
tgtccggcgt	gatgaccaac	gacggccctg	acaaccaggc	tatcgccctc	ttcgagatcc	7800
gggatcagta	catcaccgcc	ctgaaccacc	tggtgctgtc	cctggaactg	cccgaagtga	7860
agggcatggg	cagattcggc	tacgtgcctc	acgtgggcta	caagtgcata	aaccacgtgt	7920
ccatctccag	ctgcaacggc	gtgatctggg	aaatcagggg	cgagggaactg	tacaacaact	7980
gcattaacaa	cacaatcgcc	ctgaagcact	ccggctactc	ctccgagctg	aacgacatct	8040
ccatcgccct	gacccccaac	gacaccatca	aagaaccttc	caccgtgtac	gtgtacatca	8100
agacccccct	cgacgtggaa	gataccttct	ccagcctgaa	gctgtccgac	tccaagatca	8160
ccgtgaccgt	gaccttcaac	cctgtgtccg	acatcgtgat	ccgggactcc	agcttcgact	8220
tcgagacatt	caacaaagaa	tttgtgtacg	tgcccagact	gtccttcata	ggctacatgg	8280

tcaagaacgt gcagatcaag cccagcttca tgcagaagcc tgggagagt atcggccaga	8340
tcaaccaacc taccgccacc qlqacaqaq lqcaqccgc cacatccctq aqcqtqlaca	8400
ccaagcccta ctacggcaac accgacaaca agttcatctc ctaccccggc tacagccagg	8460
acgagaagga ctacatcgac gccatcgtgt cccggctgct ggaagacctc gtgatcgtgt	8520
ctgatggccc cctcacgggc taccctgagt ctgccgagat cgtggaagtg cccgaggacg	8580
gcctcgtcag catccaggac gccgatgtgt atgtgaagat cgacaacgtg ccagacacaa	8640
tgtccgtgta cctgcacacc aacctgctga tgttcggcac ccggaagaat tccctcatct	8700
acaacatctc caagaagttc tccgccatca ccggcaccta ctccgacgac accaagcgga	8760
ccatcttcgc ccacatctcc cacagcatca acatcatcga cacctccatc cccgtgtccc	8820
tgttqaccctc tcaqaqaac qlqlacaacq ccqacaacaq atccqccqag tccaaqqcca	8880
aggacctgtt catcaacgac ccttcatca agggcatcga ctccaagaac aagaccgaca	8940
tcatctcccq gctggaagtg cgttcggca acgacgtgct gtactccgag aacggcccta	9000
tcagccggat ctacaacgag ctgctgacca agtccacaa ccgcaccaga acctgacct	9060
ttaactttac ccccaagatc ttcttcgggc ccaccaccat caccgctaac gtgtccagag	9120
gcaaggacaa gctgagcgtg cgggtggtgt actccaccat ggaagtgaa caccatct	9180
actacgtgca gaaacagctg gtggtcgtgt gcaacgatct gtacaagggt tccatcgacc	9240
agggcgtgtc cattaccaag atcatgggag ataacaacga ctacaaggac gacgacgaca	9300
agtcaaaaag cgtcttctct ttctcatcac atcatatcaa ggttatatac catcaatatt	9360
gccacagatg ttacttagcc ttttaatttt tctctaatrr agtgtatatg caatgatagt	9420
tctctgattt ctgagattga gtttctcatg tgtaatgatt atttagagtt tctctttcat	9480
ctgttcaaat ttttctctag ttttattttt tactgatttg taaqacttct ttttataatc	9540
tgcataattac aattctcttt actggggtgt tgcaaatatt ttctgtcatt ctatggcctg	9600
actttcttta atggtttttt aattttaaaa ataagcttta atattcatgc aattcaatta	9660
acaatctttt ctttgtggtt aggactttga gtcataagaa attttctct acactgaagt	9720
catgatggca tgcttctata ttattttcta aaagatttaa agttttgcct tctccattta	9780
gacttataat tcactggaat ttttttctgt gtatggtatg acataagggt tcccttttat	9840
ttttacata taaatatatt tccctgtttt tctaaaaaag aaaaagatca tcattttccc	9900
attgtaaaat gccatatttt ttctcatagg cacttacata tatcaatggg tctgtttctg	9960
aqctctactc tatlllatca qccleactql ctatcccccac acatctcatq ctttqclcla	10020
aatcttgata tttagtggaa cattctttcc catttcttc tacaagaata tttttgttat	10080
tgtctttggg ctttctatat acattttgaa atgaggttga caagtcaata atcaacctct	10140
ggatcacaaa atttgtgaaa gattgaactg tattctaac tatgtctctc cttttacgt	10200

atgtggatac gctgcttttaa tgccctttgta tcatgctatt gcttcccgtg ttgctttcat	10260
tttctcctcc ttgtataaat cctggttgcg gtctctttat gaggaattgt qgcccgttgt	10320
caggcaacgt qgcgtggtgt gcaactgtgt ttctgacgca acccccactg gttggggcat	10380
tgccaccacc tgtcagctcc ttcccggaac ttctgcttc cccctcccta ttgccacggc	10440
ggaactcacc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt tgggcactga	10500
caattccgtg gtgttgctcg ggaaatcacc gtcccttctc ttgctgctcg cctgtgttgc	10560
cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcgga	10620
ccttccctcc cgcggcctgc tgccggctct ggggcctctt ccgcctcttc gccttcgcc	10680
tcagaacgagt cggatctccc ttggggcgc cccccgcct cgcctgctat tgtcttgcca	10740
atccctcccc ttgctgtcct gcccacccc acccccaga atagaatgac acctactcag	10800
acaatgcgat gcaatttct cattttatta ggaaggaca gtgggagtgg caccttcag	10860
ggtcaaggaa ggcacggggg aggggcacac aacagatggc tggcaactag aaggcacatt	10920
tgttacctta tagaagaaat tttaggttt ttgttttttt taataataa ataacataa	10980
ataaatgtt ttgtgaattt attattagta tgtaagtgt aatataataa aacttaatat	11040
ctattcaaat taataataa acctcgatat acagaccgat aaaacacatg cgtcaatttt	11100
acgcattgatt atctttaacg tacgtcaca tatgattatc ttcttagggt taagaagact	11160
g	11161