(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 954601 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 954601

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/85
C12N 5/10
A61K 48/00
A61K 35/76

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.09.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **28.09.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.02.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **15.09.1994 PCT/US1994/010469**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

15.09.1993 US 122791 18.02.1994 US 198450

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Dubensky, Jr., Thomas W., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Ibanez, Carlos E., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Chang, Stephen M. W., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Jolly, Douglas J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •Driver, David A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 •Polo, John M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Rekombinanttisia alfavirusvektoreita
Rekombinat alfavirusvektorer

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

75555 ATCC 75891 ATCC

Rekombinantti alfa-virusvektorit - Rekombinanta alfavirus vektorer

Tämä keksintö koskee yleisesti rekombinanttivirusten, kuten vektorit ja tarkemmin rekombinantti alfa-virusten, kuten Sindbis-virus, käyttöä, jotka kykenevät ekspressoimaan heterologisia sekvenssejä kohdesoluissa.

26 tunnettua virusta ja virusalatyyppiä on luokiteltu alfavirussuvussa käyttämällä hemagglutinaatioinhibiitio- (HI) määritystä. Lyhyesti, HI-testi erottelee 26 alfa-virusta 3 pääkompleksiin: Venezuelan encephalitis (VE) kompleksi, Semliki Forest (SF) kompleksi ja western encephalitis (WE) kompleksi. Lisäksi 4 muuta virusta, eastern encephalitis (EE), Barmah Forest, Middleburg ja Ndumu, saavat yksilöllisen luokittelun, joka perustuu HI-serologiseen määritykseen.

Alfa-virussuvun jäsenet on myös luokiteltu perustuen niiden suhteellisiin kliinisiin piirteisiin ihmisissä: alfa-virukset, jotka pääasiassa liittyvät yhteen aivotulehduksen kanssa ja alfa-virukset, jotka pääasiallisesti liittyvät kuumeeseen, ihottumaan ja usean nivelen tulehdukseen. Edelliseen ryhmään kuuluvat VE- ja WE-kompleksit ja EE. Yleensä infektio tällä ryhmällä voi johtaa pysyvään sairauden jälkitilaan, käytöksen muutokset ja oppimiskyvyttömyydet tai kuolema mukaanluettuina. Jälkimmäisessä ryhmässä on SF-kompleksi, joka koostuu yksittäisistä alfa-viruksista, Chikungunya, O'nyong-nyong, Sindbis, Ross River ja Mayaro. Mitä tähän ryhmään tulee, vaikka on raportoitu vakavista epidemioista, infektio on yleensä itse-rajoittuva, jolla ei ole pysyvää sairauden jälkitilaa.

Sindbis-virus on Togo-virusperheen alfa-virussuvun prototyyppijäsen. Vaikka ei yleensä ilmeistä, sisältyy Sindbis-virusinfektion kliinisiin oireisiin kuumetta, niveltulehdusta ja ihottumaa. Sindbis-virus on jakaantunut koko Euroopaan, Afrikkaan, Aasiaan ja Australiaan, parhaan epidemiolo-

gisen tiedon tullessa Etelä-Afrikasta, missä 20 % väestöstä on seropositiivisia (Katsaus, katso Peters ja Dalrymple, Fields Virology (2. painos), Fields et al (toim.), B.N. Raven Press, New York, NY, kappale 26, ss. 713-762). Infektiivinen Sindbis-virus on eristetty ihmisen seerumista vain Ugandassa tapahtuneen taudin äkillisen esiintymisen aikana ja yksittäisessä tapauksessa Keski-Afrikassa.

Alfaviruksen morfologia ja muotoutuminen on yleensä hyvin yhtenäistä. Erityisesti koteloituneet 60-65 nm partikkelit infektoivat useimpia selkärankaisen soluja, kun taas tuottava infektio on sytopaattinen. Toisaalta selkärangattomien solujen infektio, esimerkiksi moskiitoista johdetut, eivät johda mihinkään avoimeen sytopatologiaan. Tyypillisesti alfa-virukset lisääntyvät BHK-21- tai vero-soluissa, joissa kasvu on nopeata, saavuttaen maksimisaannon 24 h:ssa infektiosta. Kenttäkantoja eristetään tavallisesti primäärisestä linnun alkion, esimerkiksi kananpoika, fibroblastiviljemistä.

Alfa-virusten genominen RNA (49S RNA) on segmentoimaton, positiivinen polaarisuudeltaan, noin 11-12 kb pituudeltaan ja sisältää 5′ aukko- ja 3′-adenylaatiohännän. Infektiivinen koteloitunut virus tuotetaan kokoamalla viruksen nukleokapsidiproteiineja viruksen genomiseen RNA:han sytoplasmassa ja puhkaisemalla solumembraaninen läpi, jossa on viruksen koodaamia glykoproteiineja. Viruksen sisäänmeno tapahtuu endosytoosilla clatherin-peittämien kuoppien kautta, virusmembraanin fuusio endosomin kanssa, nukleokapsidin vapautuminen ja virusgenomin päällyksen poistaminen. Virusreplikaation aikana genominen 49S RNA toimii mallina komplementaarisen negatiivisen juosteen synteesille. Negatiivinen juoste puolestaan toimii mallisäikeenä genomiselle RNA:lle ja sisäisesti aloitetulle 26S subgenomiselle RNA:lle. Ei-rakenteelliset proteiinit transloidaan genomisesta RNA:sta. Alfa-virus rakenneproteiinit transloidaan subgenomisesta 26S RNA:

sta. Kaikkia virus-geenejä ekspressoidaan polyproteiinina ja prosessoidaan yksittäisiksi proteiineiksi proteolyyttisellä pilkkomisella translaation jälkeen.

Rekombinantti-alfa-virusvektorien käyttö käsittelemään yksilöitä vaatii, että niitä kyetään kuljettamaan ja varastoimaan pitkiä aikajaksoja halutussa lämpötilassa, siten että rekombinanttiviruksen infektiivisyys ja elinkyky säilyy. Tämän hetkisiin menetelmiin varastoida rekombinanttiviruksia sisältyy yleensä varastointi nesteinä ja alhaisissa lämpötiloissa. Sellaisilla menetelmillä on ongelmia Kolmannen Maailman maissa, joissa ei tyypillisesti ole sopivia jäädytysmahdollisuuksia. Esimerkiksi, joka vuosi Afrikassa miljoonia lapsia kuolee infektiotauteihin, kuten tuhkarokko. Rokotteita, jotka ovat tarpeellisia estämään näitä tauteja, ei voida jakaa suurelle osalle näitä maita, koska jääkaappia ei helposti ole lähettyvillä.

Lisäksi nesteinä ja alhaisissa lämpötiloissa varastointia varten näillä virusformulaatioilla on usein alustakomponentteja, jotka eivät ole toivottuja injektoitaviksi potilaisiin. Siispä alalla on tarve menetelmälle säilöä puhdistettua rekombinantti virusvektoria (ja erityisesti, alfa-virusvektorit) lyofilisoidussa muodossa kohotetuissa lämpötiloissa ja tämän muodon ollessa sopiva injektoitavaksi potilaisiin.

Tämä keksintö esittää rekombinantti alfa-virusvektoreita, jotka ovat sopivia käytettäväksi lukuisiin sovellutuksiin, mukaanluettuna esimerkiksi geeniterapia, ja antaa lisäksi muita vastaavia etuja.

Lyhyesti esitettynä, tämä keksintö antaa alfa-virus-vektorirakenteita ja alfa-viruspartikkeleita, yhtä hyvin kuin menetelmät valmistaa ja käyttää samaa. Eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan alfa-virus-vektorirakenteita, joissa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA:n syn-

teesin in vitro cDNA:sta, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja, virusreuna-alue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio estetään, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi. Tämän keksinnön muissa näkökohdissa virusreunusaluetta on modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio vähenee.

Vielä eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan alfavirus-vektorirakenteita, joissa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA:n synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA:n synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja, ensimmäinen virus-reuna-alue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio estetään, toinen virusreunusalue, joka on modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio vähenee, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi.

Vielä eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan alfavirus cDNA-vektorirakenteita, joissa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA:n synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA:n synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja, virus-reuna-alue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio estetään, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription lopetusta.

Eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan alfa-virus cDNA-vektorirakenteita, joissa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA:n synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen

transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja, virus-reuna-alue, joka on modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio vähenee, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription lopetusta.

Eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan alfa-virus cDNA-vektorirakenteita, joissa on promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA:n synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen eirakenteellisia proteiineja, ensimmäinen virusreuna-alue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio estetään, jonka jälkeen on toinen virusreuna-alue, joka on modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virus-transkriptio vähenee, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription lopetusta.

Eräässä suoritusmuodossa edellä kuvatut vektorirakenteet sisältävät heterologisen sekvenssin. Tyypillisesti sellaisessa vektorirakenteessa on heterologinen nukleotidisekvenssi, joka on suurempi kuin 100 emästä, yleensä heterologinen nukleotidisekvenssi on suurempi kuin 3 kb ja edullisesti heterologinen nukleotidisekvenssi on suurempi kuin 5 kb ja edullisemmin heterologinen nukleotidisekvenssi on suurempi kuin 8 kb. Erilaisissa suoritusmuodoissa heterologinen sekvenssi on sekvenssi, joka koodaa proteiinia, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu IL-1:stä, IL-2:sta, IL-3:sta, IL-4:stä, IL-5:stä, IL-6:sta, IL-8:sta, IL-9:stä, IL-10:stä, IL-11:sta, IL-12:sta, IL-13:sta, IL-14:sta, IL-15:stä, α-, ß- ja γ-IFN:stä, G-CSF:stä ja GM-CSF:stä.

Vielä muissa suoritusmuodoissa, edellä kuvatuissa vektorirakenteissa on valittu heterologinen sekvenssi, joka voi olla viruksesta, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu influenssaviruksesta, HPV:stä, HBV:stä, HCV:stä, EBV:stä, HIV:stä,

HSV:stä, FeLV:stä, FIV:stä, Han-viruksesta, HTLV I:stä, HTLV II:sta ja CMV:stä. Eräässä edullisessa suoritusmuodossa heterologinen sekvenssi, joka saadaan HPV:stä, koodaa proteiinia, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu E5:stä, E6:sta, E7:stä ja L1:stä.

Vielä muissa suoritusmuodoissa, edellä kuvatuissa vektorirakenteissa on valittu heterologinen sekvenssi, joka koodaa HIV-proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu HIV gp120:stä ja gag:stä.

Edellä kuvatut heterologiset sekvenssit voivat olla antisense-sekvenssejä. Edullisissa suoritusmuodoissa antisense-sekvenssi valitaan ryhmästä, joka koostuu sekvensseistä, jotka koodaavat influenssavirusta, HPV:tä, HBV:tä, HCV:tä, EBV:tä, HIV:ä, HSV:tä, FeL:ää, FIV:ä, Hanta virusta, HTLV I:tä, HTLV II:ta ja CMV:tä

Eräässä toisessa suoritusmuodossa, edellä kuvatuissa vektorirakenteissa ei ole alfa-viruksen rakenneproteiineja. Muissa suoritusmuodoissa valittu heterologinen sekvenssi sijaitsee myötävirtaan viruksen liitosalueesta. Edellä kuvatuissa vektorirakenteissa, joissa on toinen virus, voi valittu heterologinen sekvenssi tietyissä suoritusmuodoissa sijaita myötävirtaan toisesta virusliittymisalueesta, vektorirakenteessa voi edelleen olla polylinkkeri, joka sijaitsee viruksen liitosalueen jälkeen. Edullisissa suoritusmuodoissa sellaisissa polylinkkereissä ei ole villityypin alfa-viruksen restriktioendonukleaasin tunnistussekvenssiä.

Vielä eräässä suoritusmuodossa voi edellä kuvatuissa vektorirakenteissa valittu heterologinen sekvenssi sijaita nukleotidisekvenssissä, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja.

Erityisissä suoritusmuodoissa edellä kuvatuissa vektorirakenteissa on virusliitosalue, joka koostuu kuviossa 1 nähdystä nukleotidisekvenssistä, nukleotidistä numero 7579 nuk-

leotidiin numero 7597 (SEQ. ID Nro. 1). Vaihtoehtoisissa suoritusmuodoissa, missä vektorirakenteeseen sisältyy toinen virusliitos, sisältää vektorirakenteet E3 adenovirusgeenin, joka on myötäpäivään toisesta virusliitosalueesta, ja voi myös lisäksi sisältää retroviruspakkaussekvenssin, joka sijaitsee ensimmäisen virusliitosalueen ja toisen virusliitosalueen välissä.

Muissa näkökohdissa tämä keksintö tarjoaa eristetyn rekombinantti alfa-virusvektorin, jossa ei ole toiminnallista virusliitosaluetta, ja joka edullisissa suoritusmuodoissa tuottaa subgenomisen fragmentin vähentyneen virustranskription.

Vielä lisänäkökohdassa tämä keksintö antaa ekspressiokasetin, jossa on promoottori ja yksi tai useampi alfa-viruksen rakenneproteiini, promoottorin ollessa kykenevä ohjaamaan alfa-viruksen rakenneproteiinien ekspressiota.

Erilaisissa suoritusmuodoissa ekspressiokasetti kykenee ekspressoimaan alfa-vruksen kapsidiproteiinia, kuten Sindbis rakenneproteiini, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu 6K:sta, E3:sta, E2:sta ja E1:stä.

Vielä eräässä näkökohdassa tämä keksintö antaa ekspressiokasetin, joka koostuu promoottorista, yhdestä tai useammasta alfa-viruksen rakenneproteiinista ja heterologisesta ligandisekvenssistä, promoottorin kyetessä ohjaamaan alfa-viruksen rakenneproteiinien ekspressiota ja heterologista sekvenssiä. Erilaisissa suoritusmuodoissa heterologinen ligandisekvenssi valitaan ryhmästä, joka koostuu VSVG:stä, HIV gp120:stä, vasta-aineesta, insuliinistä ja CD4:stä.

Tietyissä suoritusmuodoissa edellä kuvattuihin ekspressiokasetteihin kuuluu promoottori, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu MuLV:stä, MMTV:stä, alfa-viruksen liitosalueesta, CMV:stä ja VA1RNA:sta.

Vielä eräässä näkökohdassa tämä keksintö tarjoaa alfa-viruspartikkelin, joka kohdesoluun viemisen jälkeen tuottaa infektoidun solun, joka on elävä ainakin 72 h infektion jälkeen. Annetaan myös kohdesolut, jotka tämän keksinnön alfaviruspartikkelin infektion jälkeen ovat eläviä ainakin 72 h infektion jälkeen.

Eräässä toisessa näkökohdassa tämä keksintö antaa rekombinantti alfa-viruspartikkelin, joka kohdesoluun viemisen jälkeen tuottaa infektoidun solun, joka on elävä ainakin 72 h infektion jälkeen, partikkelissa on myös vektorirakenne, joka ohjaa ainakin yhden antigeenin tai sen modifioidun muodon ekspressiota kohdesoluissa, jotka on infektoitu alfaviruspartikkelilla, antigeenin tai sen modifioidun muodon ollessa kykenevä stimuloimaan immuunivasteen eläimessä. Erilaisissa suoritusmuodoissa ekspressoitu antigeeni tai sen muodifioitu muoto saa esiin solun välittämän immuunivasteen, edullisesti HLA luokka I-restriktoitu immuunivaste.

Vielä eräässä näkökohdassa tämä keksintö antaa rekombinantti alfavirus-partikkelin, jossa on vektorirakenne, joka kykenee ohjaamaan lievityksen ekspression soluissa, jotka on infektoitu alfa-viruspartikkelilla, lievityksen ollessa kykenevä inhiboimaan patogeenisen aineen toiminnan, joka on tarpeellinen patogeenisyyteen. Erilaisissa suoritusmuodoissa patogeeninen aine on virus, sieni, protozoa tai bakteerit ja inhiboitu toiminta valitaan ryhmästä, joka koostuu patogeenisen aineen adsorptiosta, replikaatiosta, geenieksprossiosta, kokoamisesta ja poistumisesta infektoiduista soluista. Muissa suoritusmuodoissa patogeeninen aine on syöpäsolu, syöpää edistävä kasvutekijä, immuunisysteemin häiriö, sydämen ja verisuonten häiriöt, kuten uudelleen ahtautuminen, ostepporoosi ja miespuolinen mallikaljuuntuminen ja inhibitoitu toiminta valitaan ryhmästä, joka koostuu solun elävyydestä ja solun replikaatiosta. Muissa suoritusmuodoissa vektorirakenne ohjaa toksisen lievityksen ekspressiota infektoiduissa kohdesoluissa vasteena sellaisissa soluissa olevaan kokonaisuuteen, joka liittyy yhteen patogeenisen aineen

kanssa; edullisesti lievittävä aine kykenee selektiivisesti inhiboimaan patogeenisen geenin ekspressiota tai inhiboimaan patogeenisen aineen tuottaman proteiinin aktiivisuutta. Vielä lisäsuoritusmuodoissa lievittävä aine koostuu inhiboivasta peptidistä, joka on spesifinen virusproteaasille, antisense RNA:sta, joka on komplementaarinen RNA-sekvenssien kanssa, jotka ovat tarpeellisia patogeenisyydelle, sense RNA:sta, joka on komplementaarinen RNA-sekvenssien kanssa, jotka on tarpeellisia patogeenisyydelle, tai patogeenisen aineen viallisesta rakenneproteiinista, sellaisen proteiinin kyetessä inhiboimaan patogeenisen aineen kokoamista.

Vielä lisäsuoritusmuodoissa edellä kuvattu alfa-viruspartikkeli, joka ohjaa lievittävän aineen ekspressiota, erityisemmin ohjaa geenituotteen, joka kykenee aktivoimaan muuten eiaktiivisen prekursorin aktiiviseksi patogeenisen aineen inhibiittoriksi, ekspressiota, esimerkiksi herpestymidiinikinaasigeenituote, tuumorisupressorigeeni tai proteiini, joka aktivoi yhdisteen, jolla on vähän tai ei ollenkaan sytotoksisuutta, toksiseksi tuotteeksi patogeenisen aineen läsnäollessa, täten tehostaen paikallistettua terapiaa patogeenista ainetta vastaan. Vaihtoehtoisesti, alfa-viruspartikkeli ohjaa proteiinin, joka on toksinen patogeenisestä aineesta johdetun proteiinin prosessoinnin tai modifikaation jälkeen, raportoivan tuotteen, joka on alfa-viruksella infektoitujen kohdesolujen pinnalla ja joissa on patogeeninen aine, tai RNA-molekyylin, joka toimii antisense tai ribozyymi-spesifisesti patogeeniseen RNA-molekyyliin.

Tietyissä suoritusmuodoissa edellä kuvatussa alfa-viruspartikkelissa proteiini on herpestymidiinikinaasi tai CD4.

Vielä lisänäkökohdissa tämä keksintö antaa alfa-viruspartikkelin, joka ohjaa geenin, joka kykenee supressoimaan immuunisysteemin yhtä tai useampaa elementtiä alfa-viruksella infektoiduissa soluissa, ekspressoitumista, ja alfa-viruspartikkelin, joka ohjaa blokkauselementtien ekspressiota soluissa, jotka on infektoitu Sindbis-viruksella, blok-

kauselementin ollessa kykenevä sitoutumaan joko reseptoriin tai sellaiseen aineeseen siten, että reseptori/aine-vuorovaikutus blokataan.

Muissa näkökohdissa tämä keksintö antaa menetelmän stimuloida immuunivastetta antigeenia vastaan, mihin sisältyy että vastaanottavaiset kohdesolut infektoidaan alfa-viruspartikkelilla, joka ohjaa ainakin yhden antigeenin tai sen modifioidun muodon ekspressiota kohdesoluissa, jotka on infektoitu alfa-viruksella, antigeeni tai sen modifioitu muoto, joka kykenee stimuloimaan immuunivasteen eläimessä. Edullisessa suoritusmuodossa kohdesolut infektoidaan in vivo.

Tämän keksinnön vielä muissa näkökohdissa tarjotaan menetelmä stimuloida immuunivaste patogeeniseen antigeeniin, mihin sisältyy että infektoidaan vastaanottavaiset kohdesolut alfa-virus-partikkelilla, joka ohjaa patogeenisen antigeenin modifioidun muodon ekspressiota kohdesoluissa, jotka on infektoitu alfa-viruksella, modifioidun antigeenin ollessa kykenevä stimuloimaan immuunivasteen eläimessä, mutta jolla on alentunut patogeenisyys suhteessa patogeeniseen antigeeniin.

Tämän keksinnön vielä muissa näkökohdissa tarjotaan menetelmä stimuloida immuunivaste antigeeniin, mihin sisältyy että infektoidaan vastaanottavaiset kohdesolut alfa-virus-partikkelilla, joka ohjaa peptidin, jolla on lukuisia epitooppeja, yhden tai useamman epitoopeista ollessa johdettu erilaisista proteiineista, ekspressiota.

Vielä eräässä keksinnön näkökohdassa tarjotaan menetelmä stimuloida immuunivaste lämminverisessä eläimessä, mihin sisältyy että infektoidaan lämminveriseen eläimeen liittyvät vastaanottavaiset kohdesolut nukleiinihapposekvensseillä, jotka koodaavat joko yksilöllistä luokka I tai luokka II MHC-proteiinia tai sen yhdistelmiä, ja infektoidaan solut alfa-viruspartikkelilla, joka ohjaa ainakin yhden antigeenin tai sen modifioidun muodon ekspressiota kohdesoluissa, jotka

on infektoitu alfa-viruspartikkelilla, antigeenin tai sen modifioidun muodon ollessa kykenevä stimuloimaan immuunivasteen eläimessä.

Eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan menetelmä inhiboida patogeenistä ainetta, mihin sisältyy, että infektoidaan vastaanottavaiset kohdesolut alfa-virus-partikkelilla, joka ohjaa lievityksen ekspressiota soluissa, jotka on infektoitu alfa-viruspartikkelilla, lievityksen ollessa kykenevä inhiboimaan patogeenisen aineen, joka on tarpeellinen patogeenisyydelle, toimintaa.

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa tarjotaan eukaryoottisia lisääntyviä vektorin aloitussysteemejä. Lyhyesti, eräässä keksinnön suoritusmuodossa eukaryoottinen lisääntyvä vektorin aloitussysteemi koostuu 5'-promoottorista, rakenne joka kykenee ekspressoimaan heterologista nukleotidisekvenssiä, joka kykenee replikoimaan solussa joko autonomisesti tai reaktiona yhteen tai useampaan tekijään, ja transkription lopetussekvenssi. Eräässä toisessa näkökohdassa annetaan DNA eukaryoottinen lisääntyvä vektorin aloitussysteemi, jossa on 5'-promoottori, rakenne, joka kykenee ekspressoimaan heterologista RNA-sekvenssiä, joka kykenee replikoimaan solussa joko autonomisesti tai reaktiona yhteen tai useampaan tekijään, ja transkription lopetussekvenssi. Edullisessa suoritusmuodossa, rakenne, joka kykenee ekspressoimaan yhtä tai useampaa heterologista nukleotidisekvenssiä, on Sindbis cDNA-vektorirakenne. Muissa suoritusmuodoissa rakenne on virusvektori, joka valitaan ryhmästä, joka koostuu poliovirukseista, rinoviruksesta, rokkoviruksesta, retroviruksesta, influenssaviruksesta, adenoviruksesta, adeno-assosioituneesta viruksesta, herpesviruksesta, SV40-viruksesta, HIV:stä, tuhkarokosta, astroviruksesta, Semliki Forest viruksesta ja coronaviruksesta. Lisäsuoritusmuodossa eukaryoottinen lisääntyvä vektorin aloitussysteemi sisältää lisäksi polyadenylaatiosekvenssin.

Vielä eräässä näkökohdassa tämä keksintö antaa edellä kuvatun alfa-virus RNA-vektorimolekyylin, joka kykenee ohjaamaan lievityksen ekspressiota kohdesolussa. Lievittävällä aineella on tässä alfa-virus RNA ekspressiovektorikonfiguraatiossa, ekspressoituna, sama vaikutus kuin edellä alfa-viruspartikkeleille kuvatut näkökohdat. Alfa-virus RNA ekspressiovektoriin kuuluu, järjestyksessä, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virusliitosalue, heterologinen sekvenssi, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 25 peräkkäisen polyadenylaatiojäännöksen jakso, ja viedään kohdesoluihin suoraan fysikaalisin keinoin RNA-molekyylinä, kompleksina jossa on erilaisia liposomiformulaatioita, tai RNA-ligandikompleksina, jossa on alfa-virus RNA-vektorimolekyyli, polykationiyhdiste, kuten polylysiini, reseptori-spesifinen ligandi ja mahdollisesti psoraleeni-inaktivoitu virus, kuten Sendai- tai Adenovirus.

Tämä keksintö antaa myös pakkaussolulinjat ja tuottajasolulinjat, jotka ovat sopivia tuottamaan rekombinantti alfaviruspartikkeita. Sellaiset pakkaus- tai tuottajasolulinjat saattavat olla joko nisäkkäästä tai ei-nisäkkäästä (esim. hyönteissolut, kuten sääskisolut).

Suurta määrää alfa-viruksia voidaan käyttää tämän keksinnön yhteydessä. Tyypillisiin esimerkkeihin kuuluvat Aura, Venezuelan Equine Encephalitis, Fort Morgan, Ross River, Semliki Forest Virus ja Mayaro.

Nämä ja tämän keksinnön muut näkökohdat tulevat ilmeisiksi viittaamalla seuraavaan yksityiskohtaiseen kuvaukseen ja liitettyihin piirroksiin. Lisäksi alla esitetään erilaisia viitteitä, joissa kuvataan tarkemmin tiettyjä menetelmiä tai koostumuksia (esim. plasmidit jne). Nämä viitteet on liitetty tähän viitteeksi kokonaisuutenaan.

Kuvio 1 on kaavamainen kuvaus Sindbis-viruksen genomisesta järjestyksestä.

Kuvio 2 on kuvaus, joka kuvaa Sindbis RNA genomin amplifikaatiomenetelmän RT-PCR:llä.

Kuvio 3A-H esittää tyypillisen eukaryoottisen lisääntyvän vektorin aloitussysteemin, joka on johdettu Sindbis:stä, sekvenssin (katso myös SEQ. ID Nro 89).

Kuvio 4 on kaavamainen kuvaus Sindbis perusvektorista ja Sindbis-lusiferaasivektorista.

Kuvio 5 on kuvaus Sindbis auttajavektorirakenteesta.

Kuvio 6 on graafinen kaavio, joka valaisee Sindbis-lusiferaasivektorin ekspressiota ja vapautusta.

Kuvio 7 on erään menetelmän kuvaus modifioida Sindbis liitosalue.

Kuvio 8 on kaavamainen kuvaus Sindbis-viruksen pakkausekspressiokaseteista.

Kuvio 9 on pylväsdiagrammi, joka kuvaa Sindbis-lusiferaasivektorin pakkausta LTR/SindIBspE-soluissa.

Kuvio 10 on kaavamainen kuvaus, kuinka Astro-virus tai muita heterologisia viruksia voidaan käyttää ekspressoimaan Sindbis rakenneproteiineja.

Kuvio 11 on kaavamainen kuvaus mekanismista aktivoida toimintakyvytön virusliitosalue "RNA loop-out:lla".

Ennen kuin keksintöä esitetään eteenpäin, sen ymmärtämiselle saattaa olla hyödyllistä ensin esittää tiettyjen termien kuvaukset, joita tämän jälkeen käytetään.

"Alfa-virusvektorirakenne" viittaa kokoonpanoon, joka kykenee ohjaamaan kiinnostuksen kohteena olevan (olevien) sekvenssi(e)n tai geeni(e)n ekspressiota. Vektorirakenteessa pitäisi olla 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan viruksen RNA:n synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, samoin kuin sekvenssi(t), jo(t)ka ekspressoituna koodaavat biologisesti aktiivisia alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja (so. NSP1, NSP2, NSP3 ja NSP4). Lisäksi vektorirakenteessa pitäisi olla virusliitosalue, joka voi tietyissä suoritusmuodoissa olla

modifioitu, jotta estetään, inhiboidaan tai vähennetään subgenomisen fragmentin virustranskriptiota ja, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi. Vektorirakenteessa voi myös olla nukleiinihappomolekyyli(t), jonka (joide)n koko on riittävä sallimaan elävän viruksen tuoton, samoin kuin yksi tai useampi restriktiokohta. Kun alfa-virusvektorirakenne on cDNA-vektorirakenne, siinä pitäisi lisäksi olla 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA:n synteesin cDNA:sta, ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription lopetusta ja silmukan tunnistamista.

"Ekspressiokasetti" viittaa rekombinanttisesti tuotettuun molekyyliin, joka kykenee ekspressoimaan alfa-viruksen rakenneproteiinia (-proteiineja). Ekspressiokasetissa täytyy olla promoottori ja sekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen rakenneproteiinia (-proteiineja). Mahdollisesti ekspressiokasetissa saattaa olla transkription lopetus-, silmikoinnin tunnistus- ja polyadenylaatiokohdat. Edullisissa promoottoreissa on CMV- ja adenovirus- VA1RNA promoottorit. Lisäksi ekspressiokasetissa saattaa olla selektoitavia markkereita, kuten Neo, SV2 Neo, hygromysiini, phleomysiini, histidinoli ja DHFR.

"Alfa-virus-partikkeli" viittaa kapsidiin, jossa on alfa-virusvektori. Alfa-viruspartikkelissa saattaa olla lukuisia vektoreita, tämän keksinnön alfa-virusrakenteet mukaanluettuina. Alfa-viruskapsidi on edullisesti lipidikaksoiskerroksessa, kuten solumembraani, jonka sisään viruksen koodaamat proteiinit sulkeutuvat.

A. Alfa-viruslähteet

Kuten edellä on huomautettu, tämä keksintö antaa alfa-virusvektorirakenteet, alfa-viruspartikkelien sisältäessä sellaisia rakenteita, samoin kuin menetelmät käyttää sellaisia vektorirakenteita ja -partikkeleita. Lyhyesti, sekvenssejä jotka koodaavat villityypin alfa-virusta, joka on sopiva käytettäväksi valmistettaessa edellä kuvattuja vektoriraken-

teita ja -partikkeleita, voidaan saada helposti antamalla esitys, joka tarjotaan tässä luonnollisesti esiintyvistä lähteistä tai säilytyspaikoista (esm. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland).

Tyypillisiin esimerkkeihin sopivista alfa-viruksista kuuluvat Aura (ATCC VR-368), Bebaru-virus (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), Chikungunya virus (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), Eastern equine encephalomyelitis virus (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), Getah virus (ATCC VR-369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), Mayaro virus (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), Mucambo virus (ATCC VR-580), ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), Pixuna virus (ATCC VR-372, ATCC VR-12-45), Ross River virus (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest virus (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Sindbis virus (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Triniti (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Venezuelan equine encephalomyelitis (ATCC VR-69), Venezuelan equine encephalomyelitis virus (ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), Western equine encephalomyelitis (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) ja Y-62-33 (ATCC VR-375).

B. Sekvenssit jotka koodaavat villityypin Sindbis-virusta

Eräässä erityisessä tämän keksinnön suoritusmuodossa voidaan sekvenssejä, jotka koodaavat villityypin alfa-virusta, saada Sindbis-viruksesta. Erityisesti eräässä keksinnön suoritusmuodossa (ja kuten on kuvattu tarkemmin alla esimerkissä 1), Sindbis cDNA-klooni voidaan saada liittämällä Sindbis-viruksen cDNA-kloonin 5'-pää bakteriofaagi RNA-polymeraasipromoottoriin ja cDNA-kloonin 3'-pää vähintään 25 nukleotidin polyadenosiini- (poly A) juosteeseen. Erityisesti ensimmäisen cDNA-juosteen synteesi virus-RNA-mallisäikeestä voidaan saada aikaan 3'oligonukleotidialukkeella, jossa on peräkkäinen sekvenssi, jossa on entsyymin tunnistussekvenssi, 25 desoksitymidiininukleotidien sekvenssi ja noin 18 nukleoti-

din jakso, joka on komplementaarinen virus 3'-pään kanssa ja 5'-alukkeen kanssa, jossa on puskurinukleotidit, entsyymin tunnistussekvenssi, bakteriofaagipromoottori ja sekvenssi, joka on komplementaarinen viruksen 5'-pään kanssa. Jokaisen näissä alukkeissa olevan entsyymin tunnistuskohdan pitäisi olla erilainen kuin toinen eikä olla Sindbis-viruksessa. Lisäksi ensimmäinen nukleotidi, joka on liitetty bakteriofaagi RNA polymeraasipromoottorin 3'-päähän, pitäisi olla RNA-viruksen oikea ensimmäinen nukleotidi. RNA, joka on transkriptoitu in vitro virus cDNA-kloonista, jolla on edellä kuvattu rakenne ja linearisoitu pilkkomalla ainutlaatuisella dT:dA 3' distaalisella restriktioentsyymillä, aloittaa sopivaan eukaryoottiseen soluun viemisen jälkeen saman infektiosyklin, joka on luonteenominaista villityypin viruksen, josta cDNA kloonattiin, infektiolle. Tähän virus cDNA-klooniin, joka tuottaa RNA:ta, joka kykenee aloittamaan infektion in vitro
transkription jälkeen, viitataan alla "infektiivisenä cDNA-kloonina".

C. Rekombinantti alfa-virus vektorirakenteiden tuottaminen inaktivoiduilla virusliitosalueilla

Infektiivistä cDNA-kloonia, joka valmistettiin kuten edellä on kuvattu (tai käyttämällä sekvenssejä, jotka koodaavat alfa-virusta, jota saadaan muista lähteistä), voidaan helposti käyttää valmistamaan tämän keksinnön alfa-virusvektorirakenteita. Lyhyesti, eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan rekombinantti alfa-virusvektorirakenteet, joissa on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen eirakenneproteiineja, virusliitosalue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin virustranskriptio estetään, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi. Kuten alla keskustellaan tarkemmin, alfa-virusvektorirakenteet, joissa on inaktivoidut virusliitosalueet, eivät transkriptoi subgenomista fragmenttia, tehden ne sopiviksi lukuisiin sovellutuksiin.

1. RNA polymeraasipromoottori

Kuten edellä huomautettiin, tämän keksinnön tietyissä suoritusmuodoissa annetaan alfa-virusvektorirakenteet, joissa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA-synteesin in vitro cDNA:sta. Erityisesti, edullisiin 5'-promoottoreihin kuuluvat RNA-polymeraasipromoottorit, kuten T7, T3 ja SP6.

2. Sekvenssit, jotka aloittavat transkription

Kuten edellä huomautettiin, keksinnön edullisisssa suoritusmuodoissa tämän keksinnön alfa-virusvektorirakenteissa on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription. Tyypillisiä esimerkkejä sellaisista sekvensseistä ovat villityypin Sindbis-viruksen (katso kuvio 3) nukleotidit 1-60, nukleotidit 10-75 tRNA Asparagiinille (Schlesinger et al., U.S. patentti Nro. 5 091 309) ja 5'-sekvenssit muista Togaviruksista, jotka aloittavat transkription.

3. Alfa-viruksen ei-rakenneproteiinit

Tämän keksinnön alfa-virusvektorirakenteissa pitäisi olla myös sekvenssit, jotka koodaavat Alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja (NSP). Esimerkkinä Sindbis-viruksesta on 4 Sindbis ei-rakenneproteiinia, NSP1, NSP2, NSP3 ja NSP4, jotka koodaavat proteiineja, jotka mahdollistavat viruksen itsereplikaation. Ei-rakenneproteiineja 1-3 (NSP1-NSP3) eräässä tämän keksinnön suoritusmuodossa koodaavat villityypin Sindbis-viruksen (katso kuvio 3) nukleotidit 60-5750. Nämä proteiinit tuotetaan polyproteiinina ja myöhemmin leikataan ei-rakenneproteiineiksi NSP1, NSP2 ja NSP3. NSP4:ää koodaa eräässä suoritusmuodossa nukleotidit 5928-7579 (katso kuvio 3).

Ammattimiehelle on ilmeistä, että voidaan käyttää suurta määrää sekvenssejä, jotka koodaavat alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja edellä keskusteltujen lisäksi, voidaan käyttää

tässä keksinnössä ja uskotaan sen vuoksi kuuluvan fraasin "Alfa-virus ei-rakenneproteiinit" piiriin. Esimerkiksi eräässä keksinnön suoritusmuodossa johtuen geneettisen koodin degeneraatiosta, voi enemmän kuin yksi kodoni koodata annettua aminohappoa. Siksi voidaan luoda suuri määrä nukleiinihapposekvenssejä, jotka koodaavat alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja. Keksinnön muissa suoritusmuodoissa voidaan tehdä suuri määrä muita ei-rakenneproteiinijohdannaisia, esimerkiksi erilaiset substituutiot, insertiot tai deleetiot mukaanluettuina, jonka nettotulos ei muuta alfa-viruksen ei-rakenteellisten proteiinien biologista aktiivisuutta. Tämän keksinnön yhteydessä alfa-viruksen ei-rakenteellisten proteiinien uskotaan olevan "biologisesti aktiivisia" in toto, jos ne edistävät vektorirakenteen itse-replikaatioita. Itse-replikaatio, joka viittaa virusnukleiinihappojen replikaatioon, mutta ei infektiivisen viruksen tuottoa, voida määrittää RNaasi suojausmäärityksillä, jotka suoritetaan ajan kuluessa. Ammattimiehelle on helppoa toteuttaa sellaisten johdannaisten valmistusmenetelmät, kun hänelle annetaan tässä tarjottu tieto (katso myös, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. painos), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

4. Virusliitosalueet

Keksinnön tässä näkökohdassa alfa-virusrakenteissa on myös virusliitosalue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin virustranskriptio estetään. Lyhyesti, alfa-virusliitosalue kontrolloi normaalisti subgenomisen fragmentin transkription aloitusta. Sindbis-viruksen tapauksessa normaali virusliitosalue alkaa tyypillisesti nukleotidistä numero noin 7579 ja jatkuu läpi ainakin numeroon 7612 (ja mahdollisesti toiselle puolelle). Minimissään uskotaan nukleotidien 7579-7602 (5'-ATC TCT ACG GTG GTC CTA AAT AGT - SEQ.ID. Nro 1) olevan tarpeellisia subgenomisen fragmentin transkriptiolle. Tähän alueeseen (nukleotidit 7579-7602) viitataan tämän jälkeen "minimaalinen liitosalueydin".

Keksinnön edullisissa suoritusmuodoissa (ja kuten alla on kuvattu tarkemmin) virusliitosalue inaktivoidaan, jotta estetään subgenomisen fragmentin virustranskriptio. Kuten on käytetty tämän keksinnön yhteydessä, "inaktivoitu" tarkoittaa, että fragmentti joka vastaa subgenomisen fragmentin aloituspistettä mitattuna RNaasi suojausmäärityksellä, ei ole havaittu. (Vastaavat määritykset on kuvattu, Melton et al., Nuc. Acids. Res. 12:7035-7056, 1984; Calzon et al., Methods in Enz. 152:611-632, 1987 ja Kekule et al., Nature 343:457-461, 1990).

Eräässä keksinnön suoritusmuodossa virusliitosalue inaktivoidaan tylpistämällä virusliitosalue nukleotidissä 7597 (so. virusliitosalue koostuu silloin kuviossa 3 osoitetusta sekvenssistä, nukleotidistä 7579 nukleotidiin 7597). Tämä tylpennys estää subgenomisen fragmentin transkription ja lisäksi sallii täydellisen NSP4-alueen synteesin (jota nukleotidit 5928-7579 koodaavat).

Kuten ammattimiehelle on selvää, kun hänelle annetaan tässä tarjotut tiedot, suuri määrä muita deleetioita, substituutioita tai insertioita voidaan myös tehdä, jotta virusliitosalue inaktivoidaan. Esimerkiksi keksinnön muissa suoritusmuodoissa virusliitosaluetta voidaan tylpentää edelleen alueeseen, joka koodaa NSP4:ää, täten estäen virustranskriptio subgenomisesta fragmentista samalla säilyttäen NSP4:n biologisen aktiivisuuden. Vaihtoehtoisesti, muissa suoritusmuodoissa johtuen geneettisen koodin korvautuvuudesta, nukleotidisubstituutiot voidaan tehdä sekvenssissä, joka koodaa NSP4:ää, jonka puhdas teho ei muuta NSP4:n biologista aktiivisuutta, siitä huolimatta silti estää subgenomisen fragmentin transkription.

5. Alfa-virus RNA polymeraasin tunnistussekvenssi ja polyA-häntä

Kuten edellä huomautettiin, tämän keksinnön alfa-virusvektorirakenteissa pitäisi olla myös alfa-virus RNA-polymeraasin

tunnistussekvenssi (kutsutaan myös "alfa-viruksen replikaasin tunnistussekvenssiksi"). Lyhyesti alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi tarjoaa tunnistuskohdan, josta virus aloittaa negatiivisen juosteen replikaation. Alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssinä voidaan käyttää lukuisia sekvenssejä. Esimerkiksi eräässä suoritusmuodossa tämän keksinnön Sindbis-vektorirakenteissa on Sindbis polymeraasin tunnistussekvenssi, jota nukleotidit 11 647-11 703 koodaavat (katso kuvio 3). Muissa suoritusmuodoissa Sindbis polymeraasin tunnistus tylpennetään pienimmäksi alueeksi, joka silti voi toimia tunnistussekvenssinä (esim. kuvion 3 nukleotidit 11 684-11 703).

Tämän keksinnön edullisissa suoritusmuodoissa vektorirakenteessa voi lisäksi olla poly-A-häntä. Lyhyesti, poly-A-häntä voi olla minkä kokoinen tahansa, joka on riittävä edistämään stabiilisuutta sytoplasmassa, täten lisäten viruksen elinkierron aloituksen tehokkuutta. Keksinnön erilaisissa suoritusmuodoissa poly-A-hännässä on ainakin 10 adenosiininukleotidiä ja edullisimmin ainakin 25 adenosiininukleotidiä.

D. Muita alfa-virusvektorirakenteita

Edellä yleisesti kuvattujen vektorirakenteiden lisäksi voidaan myös valmistaa suuri määrä muita alfa-virus-vektorirakenteita käyttämällä tässä annettua tietoa.

1. Modifioidut virusliitosalueet

Eräässä tämän keksinnön näkökohdassa annetaan alfa-virusvektorirakenteet, joissa virusliitosalue on modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virustranskriptio vähenee. Lyhyesti, solujen infektio villityypin alfa-viruksella johtaa tavallisesti solukuolemaan subgenomisen fragmentin runsaan virustranskription tuloksena, mikä on aloitettu virusliitosalueesta. Tämä RNA-molekyylien suuri runsaus voi peittää infektoidun solun transkriptiosysteemin, viime kädessä johtaen solun kuolemaan. Sovellutuksisssa, joissa toivotaan,

että kohdesolun infektion pitäisi johtaa terapeuttiseen vaikutukseen (esim. kohdenukleiinihapon juosteen jakautuminen tai heterologisen proteiinin pidentynyt ekspresso), mieluummin kuin solukuolemaan, voidaan tehdä lukuisia modifikaatioita alfa-virusvektorirakenteelle, jotta vähennetään subgenomisen fragmentin virustranskription tasoa ja täten pidennetään vektorilla infektoidun kohdesolun elämää. Tämän keksinnön yhteydessä subgenomisen fragmentin virus transkription katsotaan olevan "vähentynyt", jos se tuottaa vähemmän subgenomista fragmenttia kuin standardi villityypin alfa-virus (Sindbis virus ATCC Nro VR-1248), määritettynä RNaasi suojausmäärityksellä.

Virusliitosalueet voidaan modifioida lukuisilla menetelmillä, jotta vähennetään subgenomisen fragmentin virustranskription tasoa. Esimerkiksi eräässä tämän keksinnön suoritusmuodossa johtuen geneettisen koodin korvautuvuudesta, nukleotidisubstituutiot voidaan tehdä virusliitosalueeseen 7579-7597, jonka puhdas teho ei muuta aminohapposekvenssiä NSP4 (tai muissa suoritusmuodoissa, NSP4:n biologista aktiivisuutta), ja silti vähentää subgenomisen fragmentin virustranskription tasoa. Jos modifioidussa vektorirakenteessa on nukleotidejä 7597:n toisella puolella (esim. 7602 tai 7612), voidaan tehdä todennäköisesti lisää substituutioita, vaikka sellaisten substituutioiden ei tarvitse perustua geneettiseen korvautuvuuteen, koska NSP4 loppuu 7597:ään. Tyypillisiä esimerkkejä modifioiduista virusliitosalueista on kuvattu tarkempaan alla esimerkissä 3.

2. Tandem virusliitosalueet

Keksinnön muissa suoritusmuodoissa annetaan alfa-virusrakenteet, joissa on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfaviruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, ensimmäinen virusliitosalue, joka on inaktivoitu siten, että estetään subgenomisen fragmentin virustranskriptio, toinen virusliitosalue, jota on modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virustran-

skriptio vähenee, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi. Sellaisiin vektorirakenteisiin viitataan "tandem" vektorirakenteina, koska niissä on ensimmäinen inaktivoitu (tai "kykenemätön") virusliitosalue, samoin kuin toinen modifioitu (tai "synteettinen") virusliitosalue. Keksinnön edullisissa suoritusmuodoissa inaktivoitua liitosaluetta seuraa suoraan toinen modifioitu virusliitosalue.

Sovellutuksissa, joissa vaaditaan alhaista subgenomisen transkription tasoa, voidaan insertoida myötävirtaan minimaalinen liitosalue tandemina inaktivoituun liitosalueeseen. Jotta asteittain lisätään subgenomisen transkription tasoa haluttuun vaikutukseen, sekvenssit, jotka vastaavat koko liitosaluetta, voidaan lisätä tandem-liitosalueeseen, kasvuina.

3. Adenovirus E3-geeni

Keksinnön eräässä toisessa näkökohdassa adenovirus E3-geeni insertoidaan tandem-vektorirakenteeseen, joka on toisen virusliitosalueen jälkeen, jotta säädellään HLA-ekspressiota alfaviruksella infektoiduissa soluissa. Lyhyesti, keksinnön erilaisissa suoritusmuodoissa toivotaan geenin, joka on terapeuttinen, toistuvia ymppäämisiä samaan yksilöön. Kuitenkin, alfa-viruksen, kuten Sindbis-virus, toistuvat ymppäämiset saattavat johtaa erityisten vasta-aineiden tai solun välittämän immuunivasteen kehittymistä Sindbis-viruksen eirakenneproteiinia (NSP) vastaan. Täten saattaa olla tarpeellista lievittää isännän immuunivastetta, joka on kohdistettu vektori-spesifisiin proteiineihin, jotta annetaan toistettavat annokset samalle yksilölle.

Siksi keksinnön eräässä suoritusmuodossa Adenovirus tyyppi 2 aikaisen alueen geeni 3:n tuotteita käytetään, jotta vähennetään kokonaisia histokompatibilitiantigeenien, jotka ekspressoituvat infektoitujen solujen pinnalla, ekspressiota. Lyhyesti, E3 19 000 daltonin (E3/19K) proteiini sitoutuu ja muodostaa molekulaarisen kompleksin luokka I H-2/HLA-anti-

geenien kanssa solulimakalvostossa estäen terminaaliset glykosylaatioreitit, jotka ovat tarpeellisia luokka I H-2/HLA-antigeenien valmistumiselle ja sen jälkeiselle kuljetukselle solumembraaniin. Kohdesoluissa, jotka on infektoitu alfavirusvektorilla, joka koodaa Ad 2 E3-proteiinia, viruksen rakenneproteiinien samanaikaista ekspressoitumista luokka I antigeenien yhteydessä ei tapahdu. Täten on mahdollista antaa toistuvia annoksia alfa-virusvektoria, joka ekspressoi Ad 2 E3-proteiinia terapeuttisena lievittävänä komponenttina samaan yksilöön. Tyypillinen esimerkki Adenovirus E3-geenin käytöstä on esitetty tarkemmin alla esimerkissä 4A.

4. CMV H301-geeni

Muita menetelmiä voidaan myös käyttää, jotta vähennetään isännän immuunivastetta virus NSP:tä vastaan. Esimerkiksi, keksinnön eräässä toisessa näkökohdassa Human Cytomegalovirus ("HCMV") H301-geeni kloonataan alfa-virusvektorirakenteeseen, edullisesti välittömästi toisen virusliitosalueen jälkeen tandemvektorissa, jotta estetään isännän CTL-vaste, joka on virus-spesifisiä proteiineja vastaan, joita ekspressoidaan vektorilla infektoiduissa soluissa.

Lyhyesti, ß2-microglobuliini- (ß2m) proteiini sitoutuu korkeimpien eukaryoottien luokan I päähistokompatibiliteettimolekyylien a-ketjun α1-, α2- ja α3-domeeneihin. Estämällä vuorovaikutus ß2m:n ja MHC:n välillä luokka I tuotteet pitävät infektoidut solut tunnistamattomina cytotoksisille T-soluille. Siksi, kuten alla esimerkissä 4B on kuvattu tarkemmin, HCMV H301-geenituotteen ekspressiota terapeuttisena lievittävänä komponenttina voidaan käyttää, jotta vähennetään isännän immuunivastetta virus NSP:lle.

5. Retroviruspakkaussekvenssi

Keksinnön eräässä toisessa näkökohdassa retrovirus pakkaussekvenssi insertoidaan tandem-vektoriin ja asennetaan ensimmäisen (inaktivoitu) virusliitosalueen ja toisen, modifi-

oidun virusliitosalueen väliin. Lyhyesti, retroviruspakkaussekvenssit antavat merkin RNA-genomin pakkauksesta retroviruspartikkeliin. Kuten alla on kuvattu yksityiskohtaisemmin, voidaan retroviruspakkaussekvenssiä käyttää, jotta pakataan alfa-virusvektori retroviruspartikkeliin käyttämällä retroviruspakkaussolulinjaa. Tämä esitetään, jotta lisätään alfavirusvektorin siirron tehokkuutta alfa-virus pakkaussolulinjaan.

6. Moninkertaisten heterologisten geenien ekspressio

mRNA:n, jotka on transkriptoitu villityypin alfa-viruksella infektoituihin soluihin, genominen pituus ja subgenominen pituus ovat polykistronisia, koodaten vastaavasti, neljää virus ei-rakenneproteiinia (NSP) ja neljää virus rakenneproteiinia (SP). Genominen ja subgenominen mRNA transloidaan kuten polyproteiinit, ja prosessointi yksittäisiksi ei-rakenne- ja rakenneproteiineiksi saadaan aikaan translaation jälkeisellä proteolyyttisellä pilkkomisella, jota katalysoi viruksen koodaamat NSP- ja SP-spesifiset proteaasit.

Tässä kuvattujen alfa-virusvektoreiden tietyissä sovellutuksissa toivotaan enemmän kuin yksi heterologinen geeni. Esimerkiksi, jotta hoidetaan metabolisia häiriöitä, kuten Gaucherin syndrooma, vaaditaan moninkertaisia annoksia alfavirusvektoreita tai -partikkeleita, koska hoidollisen lievittävän aineen kesto on rajoitettu. Siksi keksinnön tietyissä suoritusmuodoissa voi olla toivottavaa ekspressoida yhtä aikaa kohdesolussa Ad 2 E3-geeniä (katso esimerkki 4) yhdessä terapeuttisen lievittävän aineen kanssa, kuten glukocebrosidaasigeeni (katso esimerkki 11). Villityypin viruksessa kuitenkin rakenneproteiini ("SP") polykistroninen lähetti käännetään yksittäiseksi polyproteiiniksi, joka sen jälkeen prosessoidaan yksittäisiksi proteiineiksi pilkkomalla SP-koodatuilla proteaaseilla. Täten moninkertaisten heterologisten geenien ekspressio polykistronisesta lähetistä vaatii mekanismia, joka on erilainen kuin villityypin virus, koska SP-proteaasigeeni tai peptidejä, jotka on tunnistettu

pilkkomista varten, ei ole läsnä alfa-virusvektoreiden korvausalueella.

Siksi keksinnön eräässä suoritusmuodossa alfa-virusvektorit voidaan rakentaa asettamalla sopivat signaalit joko ribosomi läpiluku tai sisäinen ribosomin sisääntulo kistronien välissä. Eräs sellainen tyypillinen menetelmä ekspressoida moninkertaisia heterologisia geenejä on esitetty alla esimerkissä 5.

Keksinnön vielä eräässä suoritusmuodossa signaalien, jotka edistävät joko ribosomin läpilukua tai sisäistä ribosomin sisääntuloa välittömästi myötävirtaan viallisesta liitosaluevektorista pKSSINBVd1JR, sijainti, on kuvattu (katso esimerkki 3). Tässä vektorikonfiguraatiossa subgenomisen lähetin synteesiä ei voi tapahtua; kuitenkin heterologisia proteiineja ekspressoidaan genomin pituiselta mRNA:lta joko ribosomin läpiluvulla (scanning) tai sisäisellä ribosomin sisääntulolla. Suhteessa villityyppiin virustranskription alhainen taso tällä alfa-virusvektorilla pidentäisi infektoidun kohdesolun elämää.

Keksinnön vielä eräässä toisessa suoritusmuodossa signaalien, jotka edistävät joko ribosomin läpilukua tai sisäistä ribosomin sisääntuloa välittömästi myötävirtaan viallisesta liitosaluevektorista pKSSINBVd1JRsjr tai pKSSINBV, sijainti, on kuvattu. Lyhyesti, koska subgenomisen mRNA:n synteesi tapahtuu soluissa, jotka on infektoitu pKSSINBVd1JRsjr- ja pKSSINBV-vektoreilla, joko ribosomin läpilukusekvenssin tai sisäisen ribosomin sisääntulosekvenssin laittaminen kahden heterologisen geenin väliin sallii molempien proteiinien, joita subgenominen mRNA polykistronilähetti koodaa, translaation. Edelleen lisäksi tulevia heterologisia geenejä voidaan laittaa subgenomiselle mRNA-alueelle, edellyttäen että sopiva translaation aloitussignaali sijaitsee translaation AUG aloituskodonin 5'-päässä. Heterologis(t)en geeni(e)n lukumäärää, joka voidan insertoida subgenomiseen mRNA-aluee-

seen, kuten tässä on kuvattu, rajoittaa vain vektorin pakkauksen hillintä.

Erilaisia sekvenssejä, jotka sallivat joko ribosomin läpiluvun, aukosta riippumattoman translaation tai sisäisen ribosomin sisääntulon, voidaan laittaa Sindbis-vektoreihin pKSSINBVd1JRsjr, pKSSINBV tai pKSSINBVd1JRsjr edellä keskusteltuihin konfiguraatioihin. Näiden translaatiokontrollisekvenssien lähde ovat pikornavirukset polio ja EMCV, ihmisen immunoglobuliinin raskaan ketjun sitovan proteiinin 5' eikoodaava alue ja synteettinen, ainakin 15 bp sekvenssi, joka vastaa osittain Kozakin konsensus-sekvenssiä tehokasta translaation aloitusta varten. Vaikka tässä ei ole kuvattu yksityiskohtaisesti, nämä signaalit, jotka vaikuttavat translaation aloitukseen, voidaan myös laittaa liitosalueesta myötävirtaan ja heterologisten geenien väliin kaikissa modifioiduissa liitosalueen vektoreissa, joita on kuvattu esimerkissä 3.

7. Alfa-virus cDNA-vektorirakenteet

Kuten edellä on huomautettu, tämä keksintö antaa myös alfavirus cDNA-vektorirakenteet. Esimerkiksi keksinnön eräässä näkökohdassa annetaan alfa-virus cDNA-vektorirakenteet, joissa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA:n synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virusliitosalue, joka joko on aktiivinen tai joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin transkriptio estetään, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription lopetusta. Erilaisissa suoritusmuodoissa virusliitosaluetta voidaan modifioida siten, että subgenomisen fragmentin virustranskriptio pelkästään vähenee mieluummin kuin inaktivoituu. Muissa suoritusmuodoissa toinen virusliitosalue voidaan insertoida ensimmäisen inaktivoidun virusliitosalueen jälkeen, toisen

virusliitosalueen ollessa modifioitu siten, että subgenomisen fragmentin virustranskriptio vähenee.

Edellä on keskusteltu erilaisista alfa-virus cDNA-vektorirakenteiden näkökohdista, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virusliitosalue, joka joko on aktiivinen tai joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fragmentin transkriptio estetään ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi mukaanluettuna. Lisäksi edellä on keskusteltu myös modifioiduista liitosalueista ja tandemliitosalueista. Alfa-virus cDNA-vektorirakenteet kuitenkin eroavat 5'-promoottorin lisäyksellä, joka kykenee aloittamaan virus-RNA:n synteesin cDNA:sta. Tyypillisiin esimerkkeihin sopivista promoottoreista kuuluvat lac-promoottori, metallotioniini-promoottori, CMV-promoottori ja lämpöshokkipromoottori.

Kuten edellä on huomautettu, alfa-virus cDNA-vektorirakenteessa on myös 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription lopetusta. Tyypillinen esimerkki sellaisesta sekvenssistä on esitetty yksityiskohtaisemmin esimerkissä 2.

8. Kudos-spesifinen ekspressio

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa annetaan alfa-virusvektorirakenteet, jotka kykenevät ekspressoimaan toivottua heterologista sekvenssiä vain valitussa kudoksessa. Yksi sellainen tyypillinen esimerkki on esitetty kuviossa 11. Lyhyesti, kuten kuviossa 11A on esitetty, rekombinantti alfavirusvektori rakennetaan siten, että vektorin kohdesoluun sisääntuomisen jälkeen (kuvio 11A) sisäisesti invertoidut sekvenssit, jotka reunustavat transkription kontrollialueita (esim. modifioitu liitosalue) silmukoituvat ulos (katso kuvio 11B), täten estäen subgenomisten sekvenssien trasnkription ("G.O.I") synteettisestä liitoalueesta.

Toisaalta vektorin aktivointi voidaan saavuttaa, jos invertoidut toistuvat pätkät on suunniteltu myös hybridisoitumaan spesifiseen solun RNA-sekvenssiin, joka on luonteenominaista valitulle kudokselle tai solutyypille. Sellainen solun RNA repii rikki epäkelpoisen varsisilmukkarakenteen täten sallien stabiilimman sekundäärisen varsisilmukkarakenteen muodostumisen (kuviot 11C ja 11D). Tämä sekundäärinen varsisilmukkarakenne sallii subgenomisen lähetin transkription asettamalla liitosalueen takaisin sen oikeaan asemalliseen konfiguraatioon.

Täysipitkiä alfa-virusvektoreita voidaan myös transkriptoida käyttämällä sekundääristä varsisilmukkarakennetta hyödyntämällä viruspolymeraasin kykyä vaihtaa mallisäikeet negatiivisen juosteen synteesin aikana käyttämällä juostehyppäysmekanismia, jota nimitetään kopiovalinnaksi (King, RNA genetics II, CRC Press, Inc., Boca Raton Fla., Domingo et al. (toim.) ss. 150-185, 1988). Kun kerran on tapahtunut yksi onnistunut transkriptiokierros, tuloksena olevassa RNA-transkriptissä ei ole invertoituja toistuvia pätkiä, koska ne on deletoitu polymeraasi kopiovalintapahtuman seurauksena. Tämä uudestaan syntetisoitu RNA-molekyyli toimii nyt primäärisenä RNA-vektoritranskriptinä, joka transkriptoi ja ekspressoi kuin mikä tahansa muu kykenevä genominen alfavirusvektori, joka on aiemmin kuvattu. Tässä RNA-vektorikonfiguraatiossa kykenemättömän Sindbis-vektorin kudos- tai solu-spesifinen aktivointi voidaan saavuttaa, jos spesifiset RNA-sekvenssit, joita on vain kohdennetuissa solu- tai kudostyypeissä, käytetään invertoitujen toistuvien pätkien suunnittelussa. Tällä tavalla alfaviruksia, kuten Sindbis, voidaan työstää olemaan kudos-spesifisiä ekspressiovektoreita käyttämällä samanlaisia invertoituja sekvenssejä kuin edellä kuvattiin.

Käyttämällä tätä vektorisysteemiä saavuttamaan kudos-spesifinen ekspressio auttaa terapeuttista alfa-virusvektoria tai -partikkelia jaettavaksi systeemisesti potilaaseen. Jos vektorin pitäisi infektoida solu, joka ei ekspressoi sopivia

RNA-lajeja, on vektori vain kykenevä ekspressoimaan ei-rakenteellisia proteiineja eikä kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä. Ilmeisesti vektori hajotetaan harmittomasti.

Edellä kuvattujen vektorien käyttö auttaa varsinaista kudosspesifistä ekspressiota, joka on mahdollista lukuisille terapeuttisille sovellutuksille, esimerkiksi kohdentavat vektorit erityyppisten syöpien hoitoon mukaanluettuina. Tämä järjellinen perusta on riippuvainen tuumori-spesifisten markkereiden spesifisestä ekspressiosta, kuten karsinoembryonaalinen kasvain-spesifinen antigeeni (CEA) ja alfa-fetoproteiini kasvainmarkkeri. Lyhyesti, käyttämällä sellaista kasvain-spesifistä RNA:ta kohdistamaan spesifisiä kasvaimia, sallitaan toksisten molekyylien, lymfokiinien tai alla keskusteltujen esilääkkeiden kasvain-spesifinen ekspressio. Sellaisia menetelmiä voidaan käyttää suurelle märälle kasvaimia, esimerkiksi paksu-peräsuoli-, keuhko-, rinta-, munasarja-, rakko- ja eturauhassyövät, koska kaikki nämä kasvaimet ekspressoivat CEA:ta. Vektoreiden yksi tyypillinen kuvaus, joka on sopiva käytettäväksi tämän keksinnön tässä näkökohdassa, on esitetty tarkemmin alla esimerkissä 15.

Lyhyesti, CEA oli eräs ensimmäisistä kuvatuista kasvain-spesifisistä markkereista yhdessä alfa-fetoproteiinikasvainmarkkerin kanssa. CEA on normaali glykoproteiini suolen, haiman ja maksan alkiokauden kudoksessa ensimmäisten kahden kolmen kuukauden jakson aikana sikiökauden kehityksessä (Pathologic Basis of Disease, 3. toimitus 1984, Robbins et al, toimittaja). Aikaisemmin CEA:n uskottiin olevan spesifinen paksusuolen adenokarsinoomalle, kuitenkin myöhempien sensitiivisten radioimmuunimääristysten kehittämisellä tuli ilmeiseksi, että CEA:ta oli plasmassa monissa endodermaalisesti johdetuissa syövissä, erityisesti haima, mahalaukku ja keuhkoputki.

Tämän keksinnön kanssa läheisesti yhteenkuuluvissa näkökohdissa alfa-virus soluspesifiset ekspressiovektorit voidaan rakentaa ekspressoimaan viruksen antigeenejä, ribozyymiä,

antisensesekvenssejä tai immunostimulatoorisia tekijöitä, kuten gamma-interferon (γ-IFN) tai IL-2 viruksella infektoitujen solutyyppien kohdennettuun käsittelyyn. Erityisesti jotta kohdennetaan alfa-virusvektorit spesifiseen vieraaseen organismiin tai patogeeni-infektoituihin soluihin, alfa-virusvektorin invertoidut toistuvat pätkät voidaan valita hybridisoitumaan mihin tahansa patogeeni-spesifiseen RNA:han, esimerkiksi kohdennetut solut, jotka patogeenit, kuten HIV, CMV, HBV, HPV ja HSV on infektoinut.

Keksinnön vielä muissa näkökohdissa spesifisiä elinkudoksia voidaan kohdentaa hoitamaan kudos-spesifisiä metabolisia sairauksia käyttämällä geeninvaihtoterapiaa. Esimerkiksi maksa on tärkeä kohdekudos, koska se on vastuussa monista kehon metabolisista toiminnoista ja liittyy moniin metabolisiin geneettisiin häiriöihin. Sellaisiin sairauksiin kuuluvat monet glykogeenin varastosairaudet, fenyyliketonivirtsaisuus, Gaucherin tauti ja perhepiirissä esiintyvä kolestrolin liiallinen määrä veressä. Tällä hetkellä on monia maksa-spesifisiä entsyymejä ja markkereita, jotka on sekvenssoitu, joita voidaan käyttää muokkaamaan sopivia invertoituja toistuvia pätkiä alfa-virusvektoreille. Sellaisiin maksaspesifisiin cDNA:hin kuuluvat sekvenssit, jotka koodaavat S-adenosyylimetioniinisyntetaasia (Horikawa et al., Biochem. Int. 25:81, 1991); lesitiini: kolesteroliasyylitransferaasi (Rogne et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148:161, 1987); samoin kuin muita maksa-spesifisiä cDNA:ta (Chin et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 478:120, 1986). Sellaista maksaspesifistä alfa-virusvektoria voitaisiin käyttää jakamaan pienitiheyksistä lipoproteiinireseptoria (Yamamoto et al., Cell 39:27, 1984) maksasoluille hoitamaan perhepiirissä esiintyvää kolestrolin liiallista määrää veressä (Wilson et al., Mol. Biol. Med. 7:223, 1990).

E. Heterologiset sekvenssit

Kuten edellä on huomautettu, voivat tämän keksinnön alfavirusvektorirakenteet kuljettaa suurta määrää nukleotidisekvenssejä. Nukleotidisekvenssit pitäisi edullisesti olla riittävän kokoisia sallimaan elävien virusten tuoton. Tämän keksinnön yhteydessä minkä tahansa mitattavan tiitterin tuotto infektiivistä virusta herkillä yksinkertaisilla kerroksilla katsotaan olevan "elävän viruksen tuotto". Tämä voi olla minimissään alfavirusvektorirakenne, jossa ei ole yhtään lisäksi tulevaa heterologista sekvenssiä. Kuitenkin muissa suoritusmuodoissa vektorirakenteessa voi olla lisäksi tulevia heterologisia tai vieraita sekvenssejä. Edullisissa suoritusmuodoissa heterologinen sekvenssi koostuu ainakin noin 100 emäksen, 2 kb:n, 3,5 kb:n, 5 kb:n 7 kb:n heterologisesta sekvenssistä tai jopa ainakin 8 kb:n heterologisesta sekvenssistä.

Kuten ammattimiehelle, jolle annetaan tämän esityksen tiedot, on ilmeistä, että pakkaustehokkuus ja siten virustiitteri riippuvat jossakin määrin pakattavan sekvenssin koosta. Täten, jotta lisätään pakkaamistehokkuutta ja elävän viruksen tuottoa, voidaan ei-koodaavia lisäsekvenssejä lisätä vektorirakenteeseen. Lisäksi keksinnön tietyissä suoritusmuodoissa voi olla toivottavaa lisätä tai laskea virustiitteriä. Tämä lisääminen tai laskeminen voidaan saada aikaan lisäämällä tai vähentämällä heterologisen sekvenssin kokoa ja täten pakkaamistehokkuutta.

Vektorirakenteessa saattaa olla lukuisia heterologisia sekvenssejä, esimerkiksi sekvenssit, jotka koodaavat lievittäviä aineita, kuten lymfokiniinit, toksiinit, esilääkkeet, antigeenit, jotka stimuloivat immuunivastetta, ribozyymit ja proteiinit, jotka osallistuvat tai estävät immuunivasteen, samoin kuin antisensesekvenssit (tai sensesekvenssit "antisensesovellutuksia" varten). Kuten edellä on huomautettu keksinnön erilaisissa suoritusmuodoissa tässä annetut alfavirusvektorirakenteet voivat sisältää (ja ekspressoida tietyissä suoritusmuodoissa) kahta tai useampaa heterologista sekvenssiä.

1. Lymfokiinit

Keksinnön eräässä suoritusmuodossa heterologinen sekvenssi koodaa lymfokiiniä. Lyhyesti, lymfokiinit toimivat lisäämään, aktivoimaan tai erilaistamaan immuunivaikuttajien soluja. Tyypillisiin esimerkkeihin lymfokiineistä kuuluvat gammainterferon, kasvainkuoliotekijä, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, GM-CSF, CSF-1 ja G-CSF.

Keksinnön kaltaisissa suoritusmuodoissa heterologinen sekvenssi koodaa immunologista kofaktoria. Lyhyesti, kuten on käytetty tämän keksinnön yhteydessä, "immunomodulatorinen kofaktori" viittaa tekijöihin, jotka kun yksi tai useampi immuunivasteeseen liittyvistä soluista valmistaa, tai kun lisätään ulkoa päin soluihin, aikaansaa immuunivasteen, joka on erilainen laadultaan tai potenssiltaan, joka olisi ollut kofaktorin puuttuessa. Vasteen laatua tai potenssia voidaan mitata erilaisilla määrityksillä, jotka ovat ammattimiehille tuttuja, esimerkiksi in vitro määritykset, jotka mittaavat solun lisääntymistä (esim. ^{3}H tymidiinin sisäänotto) ja in vitro sytotoksiset määritykset (esim. joka mittaa ^{51}Cr vapautumista) (katso Warner et al., AIDS Res. and Human Retroviruses 7:645-655, 1991).

Tyypillisiin esimerkkeihin immunomodulatorisista kofaktoreista kuuluvat alfa-interferoni (Finter et al., Drugs 42(5):749-765, 1991; USA patentti Nro. 4 892 743; USA patentti nro 4 966 843; WO 85/02862; Naga et al., Nature 284: 316-320, 1980; Familletti et al., Methods in Enz. 78:387-394, 1981; Twu et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:2046-2050, 1989; Faktor et al., Oncogene 5:867-872, 1990), beta-interferoni (Seif et al., J. Virol. 65:664-671, 1991), gamma-interferonit (Radford et al., American Society of Hepatology: 2008-2015, 1991); Watanabe et al., PNAS 86:9456-9460, 1989; Gansbacher et al., Cancer Research 50:7820-7825, 1990; Maio et al., Can. Immunol. Immunother. 30:34-42, 1989; USA Patentit Nro 4 762 791 ja 4 727 138), G-CSF (USA patentit

Nro 4 999 291 ja 4 810 643), GM-CSF (WO 85/04188), TNF (Jayaraman et al., J. Immunology 144:942-951, 1990), Interleukin-2 (IL-2) (Karupiah et al., J. Immunology 144:290-298, 1990; Weber et al., J. Exp. Med. 166.1716-17333, 1987; Gransbacher et al., J. Exp. Med. 172:1217-1224, 1990; USA patentti Nro 4 738 927), IL-4 (Tepper et al., Cell 57:503-512, 1989; Golumbek et al., Science 254:713-716, 1991; USA Patentti Nro 5 017 691), IL-6 (Brakenhof et al., J. Immunol. 139:4116-4121, 1987;WO 90/06370), IL-12, IL-15, ICAM-1 (Altman et al., Nature 338:512-514, 1989), ICAM-2, LFA-1, LFA-3, MHC luokka I molekyylit, MHC luokka II molekyylit, $ß_2$-mikroglobuliini, chaperonit, CD3, B7/BB1, MHC-linkkiytyneet proteiinit tai niiden analogit.

Valinta, mikä immunomodulatorinen kofaktori liitetään alfavirusvektorirakenteeseen, saattaa perustua kofaktorin tunnettuihin terapeuttisiin vaikutuksiin tai määritetään kokeellisesti. Esimerkiksi kroonisissa hepatiitis-B-infektioissa on alfa-interferonin havaittu olevan tehokas kompensoimaan potilaan immunologista vajautta ja täten auttamaan palautumaan sairaudesta. Vaihtoehtoisesti, sopiva immunomodulatorinen kofaktori voidaan määrittää kokeellisesti. Lyhyesti, potilaasta, jolla on hepatitissairaus, otetaan ensin verinäytteet. Ääreisveren lymfosyytit (PBL) stimuloidaan uudestaan in vitro autologuksella tai HLA-yhteensopivilla soluilla (esim. EBV transformoidut solut) ja transdusoidaan alfa-virusvektorirakenteella, joka ohjaa hepatitisantigeenin immunogeenisen osan ekspressiota, ja immunomodulatorinen kofaktori. Stimuloituja PBL:iä käytetään tehostajina CTL-määrityksessä HLA-yhteensopivat transdusoidut solut kohteina. Lisäys CTL-vasteessa verrattuna siihen, mikä nähtiin samssa määrityksessä, joka suoritettiin käyttämällä HLA-yhteensopivaa stimulaattoria ja kohdesoluja, jotka oli transdusoitu vektorilla, joka koodaa antigeeniä yksin, merkitsee hyödyllistä immunomodulatorista kofaktoria. Keksinnön eräässä suoritusmuodossa on immunomodulatorinen kofaktori gamma-interferoni erityisen edullinen.

Eräs toinen esimerkki immunomodulatorisesta kofaktorista on B7/BB1 kostimulatorinen tekijä. Lyhyesti, T-solujen täyden toiminnallisen aktiivisuuden aktivointi vaatii kahta signaalia. Yksi signaali annetaan antigeeni-spesifisen T-solureseptorin vuorovaikutuksella peptidien kanssa, jotka ovat sitoutuneet tärkeimpiin histokompatibiliteettikompleksi- (MHC) molekyyleihin ja toisen signaalin, johon viitataan kostimulaattorina, antigeeniä esittävät solut jakavat T-solulle. Lyhyesti, T-solut vaativat toista signaalia interleukiini-1- (IL-2) tuottoon ja näyttää sisältävän B7/BB1-molekyylin vuorovaikutuksen antigeenejä esittäviin soluihin, joissa on CD28- ja CTLA-4-reseptorit T-lymfosyyteissä (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730, 1991a ja J. Exp. Med., 174:561-570, 1991). Keksinnön eräässä suoritusmuodossa voidaan B7/BB1 viedä kasvainsoluihin, jotta aiheutetaan $CD8^+$ T-solujen kostimulaatio siten, että $CD8^+$ T-solut tuottavat tarpeeksi IL-2:ta levitäkseen ja tullakseen täysin aktivoiduiksi. Nämä $CD8^+$ T-solut voivat tappaa kasvainsoluja, jotka eivät ekspressoi B7:ää, koska kostimulaatio ei enää vaadi lisää CTL-toimintaa. Vektoreita, jotka ekspressoivat sekä kostimulatorista B7/BB1-tekijää ja esimerkiksi immunogeenistä HBV ydinproteiinia, voidaan tehdä käyttämällä menetelmiä, jotka on kuvattu tässä. Näillä vektoreilla transdusoidut solut tulevat tehokkaimmiksi antigeeniä esittäviksi soluiksi. HBV ydinspesifinen CTL-vaste lisääntyy täysin aktivoidusta $CD8^+$ T-solusta kostimulatorisen ligandin B7/BB1 kautta.

2. Toksiinit

Keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa heterologinen sekvenssi koodaa toksiinia. Lyhyesti, toksiinit toimivat inhiboimaan suoraa solun kasvua. Tyypillisiin esimerkkeihin toksiineista kuuluvat risiini (Lamb et al., Eur. J. Biochem. 148:265-270, 1985), abriini (Wood et al., Eur. J. Biochem. 198:723-732, 1991; Evensen et al., J. of Biol. Chem. 266: 6848-6852, 1991; Collins et al., J. of Biol. Chem. 265:8665-8669, 1990; Chen et al., Fed. of Eur. Biochem. Soc. 309:115-118, 1992), kurkkumätätoksiini (Tweten et al., J. of Biol.

Chem. 260:10392-10394, 1985), koleratoksiini (Mekalanos et al., Nature 306:551-557, 1983; Sanchez ja Holmgren, PNAS 86:481-485, 1989), geloniini (Stirpe et al., J. of Biol. Chem. 255:6947-6953, 1980), pokeweed (Irvin, Pharmac. Ther. 21:371-387, 1983), antivirusproteiini (Barbieri et al., Biochem. J. 203:55-59, 1982; Irvin et al., Arch. Biochem. & Biophys. 200:418-425, 1980; Irvin, Arch. Biochem. & Biophys. 169:522-528, 1975), tritiini, Shigella toksiini (Calderwood et al., PNAS 84:4364-4368, 1987; Jackson et al., Microb. Path. 2:147-153, 1987), Pseudomonas exotoxin A (Carroll ja Collier, J. Biol. Chem. 262:8707-8711, 1987), herpes simplex virus tymidiinikinaasi (HSVTK)(Field et al., J. Gen. Virol. 49:115-124, 1980) ja E. coli guaniinifosforibosyylitransferaasi.

3. Esilääkkeet

Keksinnön muissa suoritusmuodoissa heterologinen sekvenssi koodaa "esilääkkeitä". Lyhyesti, kuten on käytetty tämän keksinnön yhteydessä, "esilääkkeet" viittaavat geenituotteeseen, joka aktivoi yhdisteen, jolla on vähän tai ei lainkaan sytotoksisuutta toksiseen tuotteeseen. Tyypillisiin esimerkkeihin sellaisista geenituotteista kuuluvat HSVT ja VZVTK, jotka selektiivisesti monofosforyloivat tiettyjä puriiniarabinosidejä ja substituoituja pyramidiiniyhdisteitä muuntaen ne sytotoksisiksi tai sytostaattisiksi metaboliiteiksi. Tarkemmin, lääkkeiden ganciclovir, acyclovir tai mikä tahansa niiden analogi, (esim. FIAU, FIAC, DHPG) HSVTK:lle, fosforyloi lääkkeen sen vastaavaksi aktiiviseksi nukleotiditrifosfaattimuodoksi.

Tyypillisiin esimerkkeihin muista esilääkkeistä, joita voidaan käyttää tämän keksinnön yhteydessä, kuuluvat: E. coli guaniinifosforibosyylitransferaasi, joka muuntaa tioksantiinin toksiseksi monofosfaatiksi (Besnard et al., Mol. Cell. BIol. 7:4139-4141, 1987); alkaalinen fosfataasi, joka muuntaa inaktiiviset fosforyloidut yhdisteet, kuten mitomysiini-

fosfaatti ja doksorubisiinifosfaatti toksisiksi defosforyloiduiksi yhdisteiksi; home- (esim. Fusarium oxysporum) tai bakteerisytosiinideaminaasi, joka muuntaa 5-fluorisytosiinin toksiseksi yhdisteeksi 5-fluoriurasiili (Mullen, PNAS 89:33, 1992); karboksipeptidaasi G2, joka pilkkoo glutamiinihapon para-N-bis (2-kloorietyyli-aminobentsoyyliglutamiinihapoksi täten luoden toksisen bentsoehapposinapin; ja Penisilliini-V-amidaasi, joka muuntaa doksorubisiinin ja melfalaanin fenoksiasetabidijohdananiset toksisiksi yhdisteiksi (katso yleisesti, Vrudhula et al., J. of Med. Chem. 36(7):919-923, 1993; Kern et al., Canc. Immun. Immunother. 31(4):202-206, 1990).

4. Antisense-sekvenssit

Keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa heterologinen sekvenssi on antisense-sekvenssi. Lyhyesti, antisense-sekvenssit on suunniteltu sitoutumaan RNA-transkripteihin ja täten estämään tietyn proteiinin solusynteesin tai estämään solua käyttämästä tuota RNA-sekvenssiä. Tyypillisiin esimerkkeihin sellaisista sekvensseistä kuuluvat antisense tymidiinikinaasi, antisense dihydrofolaattireduktaasi (Maher ja Dolnick, Arch. Biochem. & Biophys. 253:214-220, 1987; Bzik et al., PNAS 84:8360-8364, 1987), antisense HER2 (Coussens et al., Science 230:1132-1139, 1985), antisense ABL (Fainstein et al., Oncogene 4:1477-1481, 1989), antisense Myc (Stanton et al., Nature 310:423-425, 1984) ja antisense ras, samoin kuin antisense-sekvenssit, jotka blokkaavat minkä tahansa entsyymin nukleotidin biosynteettisellä reitillä. Lisäksi keksinnön muissa suoritusmuodoissa voidaan käyttää γ-interferonin ja ß-2-mikroglobuliinin antisense-sekvenssejä, jotta vähennetään immuunivastetta.

Lisäksi keksinnön lisäsuoritusmuodossa antisense RNA:ta voidaan käyttää kasvainta vastaan olevana aineena, jotta indusoidaan mahdollista luokka I:n rajoitettua vastetta. Lyhyesti, sen lisäksi että sitoudutaan RNA:han ja täten estetään spesifisen mRNA:n translaatio, suurten määrien spesifisiä

sekvenssejä uskotaan indusoivan interferonien lisääntynyttä ekspressiota (gamma-interferoni mukaanluettuna) johtuen suurten määrien kaksoisjuosteisen RNA:n muodostumisesta. Gamma-interferonin lisääntynyt ekspressio puolestaan edistää MHC luokka I antigeenien ekspressiota. Edullisiin antisense-sekvensseihin käytettäväksi tässä suhteessa kuuluu aktiini RNA, myosiini RNA ja histoni RNA. Antisense RNA, joka muodostaa yhteensopimattomuuden aktiini RNA:n kanssa, on erityisen edullinen.

5. Ribozyymit

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa annetaan alfa-virusvektoreita, jotka tuottavat ribozyymejä isäntäsolun infektion jälkeen. Lyhyesti, ribozyymejä käytetään pilkkomaan spesifisiä RNA:ta ja on suunniteltu siten, että se voi vaikuttaa vain yhteen spesifiseen RNA:han. Yleensä ribozyymin substraattia sitova sekvenssi on 10-20 nukleotidiä pitkä. Tämän sekvenssin pituus on riittävä sallimaan hybridisaation kohde RNA:n kanssa ja ribozyymin dissosiaation pilkotusta RNA:sta. Tyypillisiin esimerkkeihin luomaan ribozyymejä kuuluvat ne, jotka on kuvattu USA patenteissa nro. 5 116 742; 5 225 337 ja 5 246 921. Erityisen edullisia ribozyymejä käytettäväksi tässä keksinnössä ovat ne, jotka on esitetty tarkemmin alla esimerkeissä (esim. esimerkki 18).

6. Proteiinit ja muut solun ainesosat

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa alfa-virusvektorirakenne voi kuljettaa suurta määrää proteiineja tai muita solun ainesosia. Tyypillisiä esimerkkejä sellaisista proteiineista ovat luonnon tai muunnetut solun komponentit, samoin kuin vieraat proteiinit tai solun ainesosat, joita löytyy esimerkiksi viruksista, bakteereista, parasiiteista tai homeista.

(a) Muunnetut solukomponentit

Eräässä suoritusmuodossa annetaan alfa-virusvektorirakenteita, jotka ohjaavat immunogeenisen, ei-kasvaimia tuottava, muunnetun solukomponentin ekspressiota. Kuten tässä on käytetty, termi "immunogeeninen" viittaa muunnettuihin solukomponentteihin, jotka kykenevät, sopivissa olosuhteissa, aiheuttamaan immuunivasteen. Tämän vasteen täytyy olla solun välittämä ja voi myös sisältää nestevasteen. Termi "ei-kasvaimia tuottava" viittaa muunnettuihin solukomponentteihin, jotka eivät aiheuta solun transformaatiota tai indusoi kasvaimen muodostumista karvattomissa hiirissä. Fraasi "muunnettu solukomponentti" viittaa proteiineihin ja muihin solun ainesosiin, jotka joko liittyvät tekemään solun kasvaimia tuottavaksi, tai ovat liittyneet kasvaimia tuottaviin soluihin yleensä, mutta niitä ei vaadita tai ne eivät ole olennaisia tekemään solua kasvaimia tuottaviksi.

Ennen muuntamista solun komponentit voivat olla olennaisia normaalille solukasvulle ja säätelylle ja sisältävät, esimerkiksi proteiineja, jotka säätelevät solunsisäistä proteiinin hajoamista, transkription säätelyä, solukierron kontrollia ja solu-solu vuorovaikutusta. Muuntamisen jälkeen solukomponenteilla ei enää ole niiden sääteleviä toimintoja ja siksi solu saattaa kokea kontrolloimatonta kasvua. Tyypillisiin esimerkkeihin muunnettuista solukomponenteista kuuluvat ras*, p53*, Rb*, muunnettu proteiini, jota Wilms' kasvaingeeni koodaa, ubiquitin*, proteiini, jota koodaa DCC-, APC- ja MCC-geenit, rintasyöpägeeni BRCA1*, samoin kuin reseptorit tai reseptorin kaltaiset rakenteet, kuten neu, kilpirauhashormonireseptori, verihiutaleesta johdettu kasvutekijä- (PDGF) reseptori, insuliinireseptori, orvaskeden kasvutekijä- (EGF) reseptori ja paksusuolta stimuloiva tekijä- (CSF) reseptori.

Tämän keksinnön eräässä suoritusmuodossa annetaan alfa-virusrakenteet, jotka ohjaavat ei kasvaimia tuottavan, muunnetun ras- (ras*) geenin ekspressiota. Lyhyesti, ras*-geeni on kiinnostava kohde, koska se liittyy kausaalisesti neo-

plastiseen fenotyyppiin ja todella voi olla tarpeellinen kasvaimien muodostumisen induktioon ja ylläpitoon suuressa määrässä erilaisia syöpiä, kuten haimakarsinooma, paksusuolikarsinooma ja keuhkoadenokarsinooma. Lisäksi ras*-geenejä on esineoplastisissa kasvaimisssa ja siksi immuunikeskeytysterapiaa voidaan soveltaa ennen pahanlaatuisen kasvaimen havaitsemista.

Normaalit ras-geenit ovat ei-kasvainta tuottavia ja kaikkialla läsnäolevia kaikissa nisäkkäissä. Ne ovat erittäin hyvin säilyneet evoluutiossa ja niillä näyttää olevan tärkeä osuus solukierron ja normaalien kasvuominaisuuksien ylläpitämisessä. Normaali ras-proteiini on G-proteiini, joka sitoo GTP:tä ja sillä on GTPaasi-aktiivisuutta ja on mukana siirtämässä signaaleja ulkoisesta ympäristöstä solun sisään täten sallien solun vastata sen ympäristöön. Ras*-geenit toisaalta muuntavat neoplastisten solujen normaalia kasvusäätelyä kytkemällä solukäyttäytymisen pois ympäristöstä, täten johtaen neoplastisten solujen kontrolloimattomaan lisääntymiseen. Ras-geenin mutaation uskotaan olevan aikainen tapahtuma syövän syntymisessä (Kumar et al., Science 248: 1101-1104, 1990), mikä voi, jos käsitellään aikaisin, estää kasvainten muodostumisen.

Ras*-geenejä on suuressa määrässä syöpiä, esimerkiksi haima-, paksusuoli- ja keuhkosyöpä mukaanluettuina.

Suuressa määrässä syöpiä ras*-geeneissä havaittujen mutaatioiden spektri on melko rajoitettu. Nämä mutaatiot muuntavat ras-proteiinin GTPaasi-aktiivisuutta muuntamalla normaalin on/off katkaisimen jatkuvaan ON-asentoon. Kasvaimia tuottavat mutaatiot ras*:ssa tapahtuvat pääasiassa (in vivo) vain 3 kodonissa: 12, 13 ja 61. Kodoni 12-mutaatiot ovat kaikkein vallitsevimpia sekä ihmisen että eläimen kasvaimissa.

Taulukko 1 alla tiivistää tunnetut in vivo mutaatiot (kodonit 12, 13 ja 61), jotka aktivoivat ihmisen ras:n, samoin kuin mahdolliset mutaatiot, joilla on in vitro transformaa-

tioaktiivisuutta. Mahdollisia mutaatioita, joilla on in vitro-aktiivisuutta, tuotettiin systemaattisella normaalin kodonin korvaamisella aminohapoilla (esim. normaalia glysiiniä asemassa 12 korvattiin muilla aminohapoilla). In vitro mutaatiot, koska tällä hetkellä ei tiedetä tapahtuvan ihmisissä tai eläimissä, saattavat toimia perustana syöpää vastaan olevassa immunoterapiassa, jos niiden havaitaan lopuksi kasvavan in vivo.

Taulukko 1

Aminohapposubstituutiot, jotka aktivoivat ihmisen ras-proteiineja

Aminohappo	Gly	Gly	Ala	Gln	Glu	Asn	Lys	Asp
Mutanttikodoni	12	13	59	61	63	116	117	119
In vivo		Val	Asp		Arg			
		Arg	Val		His			
		Asp	Arg		Leu			
		Cys						
		Ala						
		Ser						
		Phe						
In vitro		Ala	Ser	Thr	Val	Lys	His	Glu His
		Asn			Ala		Ile	Arg Glu
		Gln			Cys			Ala
		Glu			Asn			Asn
		His			Ile			
		Ile			Met			
		Leu			Thr			
		Lys			Tyr			
		Met			Trp			
		Phe			Phe			
		Ser			Gly			
		Thr						
		Trp						
		Tyr						

Muutokset, kuten edellä on kuvattu, johtavat proteiinien, joissa on uusi (uudet) koodaussekvenssi(t). Tämän (näiden) sekvenssi(e)n koodaamia proteiineja voidaan käyttää markkereina kasvaimia tuottaville soluille ja immuunivastetta,

joka on ohjattu näitä uusia koodausalueita vastaan, voidaan käyttää tuhoamaan kasvaimia tuottavia soluja, joissa on muuttuneet sekvenssit (ras*).

Tämän keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa annetaan alfa-virusvektorirakenteet, jotka ohjaavat muunnetun p53-(p53*) geenin ekspressiota. Lyhyesti, p53 on tuman fosfoproteiini, joka alunperin keksittiin transformoitujen solujen uutteista ja täten luokiteltiin ensin oncogeeniksi (Linzer ja Levine, Cell 17:43-52, 1979; Lane ja Crawford, Nature 278:261-263, 1979). Myöhemmin havaittiin, että alkuperäiset p53 cDNA-kloonit olivat mutanttimuotoja p53:sta (Hinds et al., J. Virol. 63:739-746, 1989). Nyt näyttää ilmeiseltä, että p53 on kasvain supressorigeeni, joka negatiivisesti säätelee solukiertoa, ja että tämän geenin mutaatio saattaa johtaa kasvaimen muodostukseen. Paksusuolikarsinoomeista, joita on tutkittu, osoitti 75 % - 80 % molempien p53 alleelien menettämisen, toinen deleetiolla ja toinen pistemutaation kautta. Samanlaisia mutaatioita löydetään keuhkosyövästä ja aivo- ja rintakasvaimista.

Pääosa p53 mutaatioista (esim. p53*[1], p53*[2], jne) on rykelmänä aminohappojäännösten 130-290 välissä (katso Levine et al., Nature 351:453-456, 1991; katso myös seuraavat viitteet, jotka kuvaavat spesifisiä mutaatioita yksityiskohtaisemmin: Baker et al., Science 244:217-221, 1989; Nigro et al., Nature 342:705-708, 1989 (p53 mutaatiot muodostavat rykelmän neljään "kuumaan pisteeseen", jotka soveltuvat yhteen neljän hyvin säilyneen geenin alueen kanssa ja nämä mutaatiot havaitaan ihmisen aivo-, rinta-, keuhko- ja paksusuolen syövässä); Vogelstein, Nature 348:681-682, 1990; Takahashi et al., Science 246:491-494, 1989; Iggo et el., Lancet 335:675-679, 1990; James et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2858-2862, 1989; Mackay et al., Lancet 11:1384-1385, 1988; Kelman et al., Blood 74:2318-2324, 1989; Malkin et al., Science 250:1233-1238, 1990; Baker et al., Cancer Res. 50:7717-7722, 1991; Chiba et al., Oncogene 5:1603-1610, 1990 (aikaisen vaiheen, ei-pienen solun keuhkosyövän pato-

geenisyys liittyy somaattisiin mutaatioihin p53-geenissä kodonien 132-283 välillä); Prosser et al., Oncogene 5:1573-1579, 1990 (mutaatiot p53-geenissä, joka koodaa aminohappoja 126-224, tunnistettiin primäärisessä rintasyövässä); Cheng ja Hass, Mol. Cell. Biol. 10:5502-5509, 1990; Bartek et al., Oncogene 5:893-899, 1990; Rodrigues et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7555-7559, 1990; Menon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5435-5439, 1990; Mulligan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5863-5867, 1990; ja Romano et al., Oncogene 4:1483-1488, 1990 (p53-mutaation tunnistaminen kodonissa 156 ihmisen luusyövässä, joka on johdettu solulinjasta HOS-SL)).

p53-geenin tietyt muunnokset voivat johtua tietyistä spesifisistä toksiineista. Esimerkiksi, Bressac et al. (Nature 350:429-431) kuvaa spesifiset G-T-mutaatiot kodonissa 249 potilaissa, joilla on maksasolukarsinooma. Tämän mutaation yksi ehdotettu kausaalinen tekijä on aflatoksiini B_1, maksakarsinogeeni, jonka tiedetään olevan elintarvikekontaminantti Afrikassa.

Geenin neljä aluetta, jotka ovat erityisen alttiita, ovat jäännöksissä 132-145, 171-179, 239-248 ja 272-286. Kolme "kuumaa pistettä", jotka ovat näillä alueilla, jotka ovat erityisen kiinnostavia, ovat jäännöksissä 175, 248 ja 273 (Levine et al., Nature 351:453-456, 1991). Nämä muunnokset, samoin kuin muut, joita on kuvattu edellä, johtavat proteiini(e)n tuottoon, jo(i)ssa on uusi(a) koodaussekvenssi (koodaussekvenssejä). Näiden sekvenssien koodaamia uusia proteiineja voidaan käyttää kasvaimia tuottavien solujen markkereina ja immuunivastetta, joka on ohjattu näitä uusia koodaussekvenssejä vastaan, voidaan käyttää tuhoamaan kasvaimia tuottavia soluja, joissa on muuttunut sekvenssi (p53*).

Kun muuttunutta solukomponenttia koodaava sekvenssi on kerran saatu, on tarpeellista varmistaa, että sekvenssi koodaa ei-kasvaimia tuottavaa proteiinia. Erilaiset määritykset tunnetaan ja voidaan helposti saada aikaan, mikä arvioi eri-

tyisen solukomponentin kasvaimien muodostavuuden. Tyypillisiin määrityksiin kuuluvat rotan fibroblastimääritys, kasvaimen muodostus karvattomissa hiirissä tai rotissa, pesäkkeen muodostus pehmeässä agarissa ja transgeenisten eläinten valmistuksessa, kuten transgeeniset hiiret.

Kasvaimen muodostuminen karvattomissa hiirissä tai rotissa on erityisen tärkeä ja herkkä menetelmä määrittää tietyn solukomponentin kasvaimen muodostamiskyky. Karvattomilta hiiriltä puuttuu solun immuunisysteemi (so. sillä ei ole CTL:ää) ja tarjoaa siksi hyödyllisen in vivo mallin, missä testataan solujen kasvaimen muodostamismahdollisuutta. Normaaleilla ei-kasvaimia muodostavilla soluilla ei ole kontrolloimattomia kasvuominaisuuksia, jos infektoitu karvattomiin hiiriin. Transformoidut solut kuitenkin lisääntyvät nopeasti ja tuottavat kasvaimia karvattomissa hiirissä. Lyhyesti, eräässä suoritusmuodossa alfa-virusvektorirakennetta annetaan syngeenisille hiirisoluille, jonka jälkeen injektoidaan karvattomiin hiiriin. Hiiret tutkitaan visuaalisesti 2-8 viikon jakson ajan injektion jälkeen, jotta määritetään kasvaimen kasvu. Hiiret voidaan myös uhrata ja tehdä ruumiinavaus, jotta määritetään, onko kasvaimia. (Giovanella et al., J. Natl. Cancer Inst. 48:1531-1533, 1972; Furesz et al., Abnormal Cell, New Products and Risk, Hopps ja Petricciani (toim.), Tissue Culture Association, 1985; ja Levenbook et al., J. Biol. Std. 13:135-141, 1985).

Kasvaimien muodostumista voidaan myös arvioida visualisoimalla pesäkkeen muodostuminen pehmeässä agarissa (Macpherson ja Montagnier, Vir. 23:291-294, 1964). Lyhyesti, yksi normaalien ei-kasvaimia tuottavien solujen ominaisuus on "kosketus-inhibiitio" (so. solut lopettavat lisääntymisen, kun ne koskettavat naapurisoluja). Jos solut maljataan puolikiinteälle agari-kannattaja-alustalle, tulevat normaalit solut nopeasti kosketusinhiboiduiksi ja lakkaavat lisääntymästä, kun taas kasvaimia tuottavat solut jatkavat lisääntymistä ja muodostavat pesäkkeitä pehmeään agariin.

Transgeenisiä eläimiä, kuten transgeenisiä hiiriä, voidaan myös käyttää arvioimaan muunnetun solukomponentin kasvaimen muodostamista. (Stewart et al., Cell 38:627-637, 1984; Quaife et al., Cell 48:1023-1034, 1987; ja Koike et al., Proc. Natl Acad. Sci USA 86:5615-5619, 1989). Transgeenisissä eläimissä kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä voidaan ekspressoida kaikissa eläimen kudoksissa. Tämä huonosti säädelty transgeenin ekspressio voi toimia mallina uudelleen tuodun geenin kasvaimien tuottavuuden mahdollisuudelle.

Jos muunnettu solukomponentti liittyy yhteen tekemään solun kasvaimia tuottavaksi, silloin on tarpeellista tehdä muunnettu solukomponentti ei-kasvaimia tuottavaksi. Esimerkiksi, eräässä suoritusmuodossa kiinnostuksen kohteena oleva sekvenssi tai geeni, joka koodaa muunnettua solukomponenttia, lyhennetään jotta geenituote tehdään ei-kasvaimia tuottavaksi. Geeni, joka koodaa muunnettua solukomponenttia, voi olla lyhennetty eri kokoihin, vaikka edullista on pitää niin paljon kuin mahdollista muunnetusta solukomponentista. Lisäksi on tarpeellista, että mikä tahansa lyhennys jättää koskemattomaksi muunnetun solukomponentin ainakin jotkut immunogeeniset sekvenssit. Vaihtoehtoisesti, immunogeenisestä alueesta myötävirtaan voidaan viedä moninkertaisia translationaalisia lopetuskodoneita. Lopetuskodonien insertio lopettaa proteiinin ekspression ennenaikaisesti täten estäen proteiinin transformoivan osan ekspression.

Eräässä suoritusmuodossa ras*-geeni lyhennetään, jotta tehdään ras*-proteiini ei-kasvaimia tuottavaksi. Lyhyesti, ras*:n karboksi-loppuiset sallivat toiminnallisesti proteiinin kiinnittyä solumembraaniin. Näiden sekvenssien lyhennys tekee muunnetun solukomponentin 2. ras*-geeni lyhennetään edullisesti puriinirenkaan sitomiskohdassa, esimerkiksi sekvenssin ympärillä, joka koodaa amininohappoa numero 110. ras*-geenisekvenssi voidaan lyhentää siten, että niin vähän kuin noin 20 aminohappoa (mukaanluettuna alfa-virusvektorirakenne, koodaa muunnettu(j)a aminohappo(a), vaikka edulli-

sesti niin monta aminohappoa kuin mahdollista pitäisi ekspressoida (samalla ylläpitäen ei-kasvaimen muodostettavuus).

Eräässä toisessa suoritusmuodossa p53*-proteiinia modifioidaan lyhentämällä, jotta tehdään solukomponentti ei-kasvaimia tuottavaksi. Kuten edellä huomautettiin, eivät kaikki p53-proteiinin mutaatiot ole kasvaimia tuottavia ja siksi kaikkia mutaatioita ei tarvitse lyhentää. Siitä huolimatta edullisessa suoritusmuodossa p53* lyhennetään sekvenssiksi, joka koodaa aminohappoja 100-300, täten mukaanlukien kaikki neljä tärkeää "kuumaa pistettä".

Muita muunnettuja solukomponentteja, jotka ovat oncogeenisiä, voidaan myös lyhentää, jotta tehdään ne ei-kasvaimia tuottaviksi. Esimerkiksi sekä neu että bcr/abl voidaan lyhentää, jotta tehdään ne ei-kasvaimia tuottaviksi. Ei-kasvaimen tuottaminen voidaan varmistaa määrittämällä lyhennetty muunnettu solukomponentti, kuten edellä on kuvattu.

Pitäisi huomata, että jos muunnettu solukomponentti liittyy vain ei-kasvaimia tuottaviin soluihin yleensä eikä sitä tarvita tai ole olennainen tekemään solua kasvaimia tuottavaksi, siten on tarpeellista tehdä solukomponentti ei-kasvaimia tuottavaksi. Tyypillisiä esimerkkejä sellaisista muunnetuista solukomponenteista, jotka eivät ole kasvaimia tuottavia, ovat Rb*, ubiquitin* ja mucin*.

Kuten edellä huomautettiin, jotta tuotetaan sopiva immuunivaste, täytyy muunnetun solukomponentin olla myös immunogeeninen. Erityisen sekvenssin immunogeenisyys on usein vaikea ennustaa, vaikka T-soluepitoopeilla on usein immunogeeninen amfipaattinen alfa-heliksi-komponentti. Yleensä kuitenkin on edullista määrittää immunogeenisyys määrityksellä. Tyypillisiin määrityksiin kuuluvat ELISA, joka määrittää juuri tuodulle vektorille olevien vasta-aineiden läsnäolon, samoin kuin määritykset, jotka testaavat T-auttajasoluja, kuten gamma-interferonimääritykset, IL-2-tuoton määritykset ja lisääntymismääritykset.

Kuten edellä huomautettiin, tämän keksinnön eräässä toisessa näkökohdassa voidaan ekspressoida samanaikaisesti useita erilaisia muunnettuja solukomponentteja, jotta muodostetaan yleinen syöpää vastaan oleva hoito. Yleisesti, ammattimiehelle on ilmeistä, että voidaan tehdä suuri määrä yhdistelmiä. Edullisissa suoritusmuodoissa tämä terapeuttinen aine voidaan kohdentaa erityisen tyyppiseen syöpään. Esimerkiksi, melkein kaikissa paksusuolisyövissä on mutaatiot ras-, p53-, DCC APC- tai MCC-geeneissä. Alfa-virusvektorirakennetta, joka ekspressoi samanaikaisesti lukuisia näitä muunnettuja solukomponentteja, voidaan antaa potilaalle, jolla on paksusuolisyöpä, jotta käsitellään kaikkia mahdollisia mutaatioita. Tätä menetelmää voidaan myös käyttää hoitamaan muita syöpiä. Täten, alfa-virusvektorirakennetta, joka ekspressoi samanaikaisesti muciinia*, ras*:a, neu:ta, BRCA1*:tä ja p53*:a, voidaan käyttää hoitamaan rintasyöpää.

(b) Vieraista organismeista tai muista patogeeneista olevat antigeenit

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa annetaan alfa-virusvektorirakenteita, jotka ohjaavat vieraiden organismien tai muiden patogeenien antigeenien immunogeenisen osan ekspressiota. Tyypillisiin esimerkkeihin vieraista antigeeneista kuuluvat bakteeriantigeenit (esim. E. coli, streptokokki, stafylokokki, mykobakteeri, jne), homeantigeenit, parasiittiset antigeenit ja virusantigeenit (esim. influensavirus, Human Immunodeficiency Virus ("HIV"), Hepatitis A, B ja C Virus ("HAV", "HBV" ja "HCV", vastaavasti), Human Papiloma virus ("HPV"), Epstein-Barr virus ("EBV"), Herpes Simplex virus ("HSV"), Hantavirus, TTLV I, HTL V II ja Cytomegalovirus ("CMV"). Kuten tämän keksinnön yhteydessä on käytetty, "immunogeeninen annos" viittaa annokseen vastaavaa antigeenia, joka kykenee sopivissa olosuhteissa aiheuttamaan immuunivasteen, so. solun välittämä tai nestemäinen). "Annokset" voivat olla eri kokoisia, mutta edullisesti ovat ainakin 9 aminohappoa pitkiä ja niissä voi olla koko antigeeni. Solun välittämiä immuunivasteita voivat välittää major his-

tocompatability complex ("MHC") luokka I esitys, MHC luokka II esitys tai molemmat.

Keksinnön eräässä näkökohdassa annetaan alfa-virusvektorirakenteita, jotka ohjaavat Hepatitis B-antigeenien immunogeenisten osien ekspressiota. Lyhyesti, Hepatitis B-genomi koostuu rengasmaisesta DNA:sta, joka on noin 3,2 kb pituudeltaan ja on karakterisoitu (Tiollais et al., Science 213: 406-411, 1981; Tiollais et al., Nature 317:489-495, 1985; ja Ganem ja Varmus, Ann. Rev. Biochem. 56:651-693, 1987; katso myös EP 0 278 940, EP 0 241 021; WO 88/10301 ja USA patentti nrot. 4 696 898 ja 6 024 938, jotka on liitetty tähän viitteeksi). Hepatitis B-viruksella on useita erilaisia antigeegeenejä, mukaanluettuna muun muassa kolme HB "S" antigeeniä (HBsAgs) ja HBc antigeeni (HBcAg), HBe antigeeni (HBeAg) ja HBx antigeeni (HBxAg) (katso Blum et al., TIG 5(5):154-158, 1989). Lyhyesti, HBeAg on tuloksena P22 esiydin välituotteen proteolyyttisestä pilkkomisesta ja eritetään solusta. HBeAg-:tä löydetään seerumista 17 kD:n proteiinina. HBcAg on 183 aminohapon proteiini ja HBxAg on 145-154 aminohapon proteiini, riippuen alatyypistä.

HBsAgs:ää (merkitään "suuri", "keskikokoinen" ja "pieni") koodaa kolme Hepatitis B-genomin aluetta; S, esi-S2 ja esi-S1. Suurta proteiinia, jonka pituus vaihtelee 389-400 aminohappoon, koodaa esi-S1-, esi-S2- ja S-alueet ja sitä on glykosyloiduissa ja ei-glykosyloiduissa muodoissa. Keskimmäinen proteiini on 281 aminohappoa pitkä ja esi-S2- ja S-alueet koodaavat sitä. Pieni proteiini on 226 aminohappoa pitkä ja S-alue koodaa sitä. Sitä on kahdessa muodossa, glykosyloitu (GP 27^s) ja ei-glykosyloitu (P24^s). Jos kumpaakin näistä alueista ekspressoidaan erikseen, esi-S1-alue koodaa noin 119 aminohapon proteiinia, esi-S2-alue koodaa noin 55 aminohapon proteiinia ja S-alue koodaa noin 226 aminohapon proteiinia.

Kuten ammattimiehelle on ilmeistä, voidaan edellä kuvatut S-antigeenien erilaiset immunogeeniset osat yhdistää, jotta indusoidaan immuunivaste, kun annetaan yhtä tässä kuvattua

alfa-virusvektorirakennetta. Lisäksi johtuen suuresta immunologisesta vaihtelevuudesta, jota on eri maantieteellisillä alueilla HBV:n S avoimelle lukuraamille, antigeenien erityiset yhdistelmät voivat olla edullisia annettavaksi erityisillä maantieteellisillä alueilla. Lyhyesti, epitooppeja, joita on kaikissa ihmisen hepatitis B-virus S-näytteissä, kuvataan determinantti "a":ksi. Toisensa mahdottomaksi tekeviä alatyypin determinantteja on myös tunnistettu kaksidimensionaalisella kaksoisimmunodiffuusiolla (Ouchterlony, Prog. Allergy 5:1, 1958). Näitä determinantteja on merkitty "d" tai "y" ja "w" tai "r" (LeBouvier, J. Infect. 123:671, 1971; Bancroft et al., J. Immunol. 109:842, 1972; ja Courouce et al., Bibl. Haematol. 42:1-158, 1976). Immunologinen vaihtelevuus johtuu yksittäisistä nukleotidisubstituutioista hepatitis B viruksen S avoin lukuraamin kahdella alueella johtaen seuraaviin aminohappomuutoksiin: (1) lysiini-122 vaihto arginiiniin Hepatitis B viruksen S avoimessa lukuraamissa aiheuttaa alatyypin siirtymisen d:stä y:hyn ja (2) arginiini-160:n vaihto lysiiniin aiheuttaa siirtymisen r alatyypistä w:hen. Afrikkalaisissa on alatyyppi ayw vallitseva, kun taas USA:ssa ja Pohjois-Euroopassa alatyyppi adw_2 on yleisempi (Molecular Biology of the Hepatitis B Virus, McLachlan (toim.), CRC Press, 1991). Kuten ammattimiehelle on ilmeistä, on yleisesti edullista rakentaa vektori antamista varten, mikä on sopivaa erityiselle hepatitis B-viruksen alatyypille, mikä on vallitseva antamisen maantieteellisellä alueella. Erityisen alueen alatyypit voidaan määrittää kaksidimensionaalisella kaksoisimmunodiffuusiolla tai edullisesti sekvenssoimalla tuon alueen yksilöiltä eristetyn HBV-viruksen S avoin lukuraami.

HBV edustaa myös pol- ("HBV pol"), ORF 5- ja ORF 6-antigeenejä. Lyhyesti, HBV:n polymeraasi avoin lukuraami koodaa käänteistranskriptaasiaktiivisuutta, jota on virioneissa ja ytimen kaltaisissa partikkeleissa infektoituneissa maksoissa. Polymeraasiproteiini koostuu ainakin kahdesta domeenista: aminoterminaalinen domeeni, joka koodaa proteiinia, joka toimii alukkeena käänteistranskriptaasille, ja karboksiter-

minaalisesta domeenista, joka koodaa käänteistranskriptaasia ja RNaasi H-aktiivisuutta. HBV pol:n immunogeeniset osat voidaan määrittää käyttämällä tässä kuvattuja menetelmiä (esim. alla ja esimerkeissä 12Aii ja 13) käyttämällä alfavirusrakenteita, jotka on kuvattu alla ja annetaan, jotta tuotetaan immuunivaste lämminverisessä eläimessä. Samalla lailla, muita HBV-antigeenejä, kuten ORF 5 ja ORF 6 (Miller et al., Hepatology 9:322-327, 1989) voidaan ekspressoida käyttämällä alfa-virusvektorirakenteita, kuten tässä on kuvattu. Tyypillisiä esimerkkejä alfa-virusvektorirakenteista, jotka käyttävät ORF 5:tä ja ORF 6:ta, on esitetty alla esimerkeissä.

Kuten edellä huomautettiin, ainakin yksi hepatitis B antigeenin immunogeeninen osa on liitetty alfa-virusvektorirakenteeseen. Immunogeeninen (immunogeeniset) osa(t), jo(t)ka on liitetty alfa-virusvektorirakenteeseen, voi(vat) olla vaihtelevan mittainen (mittaisia), vaikka yleensä on edullista, että osat ovat ainakin 9 aminohappoa pitkiä ja voi sisältää koko antigeenin. Erityisen sekvenssin immunogeenisyys on usein vaikeata ennustaa, vaikka T-soluepitoopit voidaan ennustaa käyttämällä tietokonealgoritmeja, kuten TSITES (MedImmune, Maryland), jotta tutkitaan tarkasti mahdollisten T-auttajakohtien ja CTL-kohtien koodausalueet. Tästä analyysistä peptidejä syntetisoidaan ja käytetään kohteina in vitro sytotoksisessa määrityksessä. Muita määrityksiä voidaan kuitenkin käyttää esimerkiksi, ELISA mukaanluettuna, joka määrittää juuri sisääntuotua vektoria vastaan olevien vasta-aineiden läsnäolon, samoin kuin määritykset, jotka testaavat T-auttajasoluja, kuten gamma-interferonimääritykset, IL-2-tuottomääritykset ja lisääntymismääritykset.

Immunogeenisiä osia voidaan valita myös muilla menetelmillä. Esimerkiksi HLA A2.1 transgeenisen hiiren on osoitettu olevan hyödyllinen mallina virusantigeenien ihmisen T-solutunnistukselle. Lyhyesti, influenssa- ja hepatitis B virussysteemeissä, hiiri T-solureseptoriohjelmisto tunnistaa samat

antigeeniset determinantit, jotka ihmisen T-solut ovat tunnistaneet. Molemmissa systeemeissä CTL-vaste, joka on tuotettu HLA A2.1 transgeenisessä hiiressä, ohjataan itse asiassa kohti samaa epitooppia kuin HLA A2.1 haplotyypin ihmisen CTL:n tunnistamat (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173: 1007- 1015, 1991; Vitiello et al., Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia, 1992).

Erityisen edullisiin immunogeenisiin osiin liitettäväksi alfa-virusvektorirakenteisiin kuuluvat HBeAg, HBcAg ja HBsAgs, kuten on kuvattu tarkemmin alla esimerkissä 10.

Hepatitis B viruksen lisäksi tulevia immunogeenisiä osia voidaan saada lyhentämällä koodaussekvenssi erilaisissa sijainneissa, esimerkiksi seuraavat kohdat: Bst UI, Ssp I, Ppu M1 ja Msp I (Valenzuela et al., Nature 280:815-19, 1979; Valenzuela et al., Animal Virus Genetics: ICN/UCLA Symp. Mol. Cell Biol., 1980, B.N. Fields ja R.Jaenisch (toim.), ss. 57-70, New York: Academic). Lisää menetelmiä määrittää sopivia immunogeenisiä osia, samoin kuin menetelmät, on myös kuvattu alla hepatitis C:n yhteydessä.

Kuten edellä huomautettiin, alfa-virusvektoriin voidaan liittää enemmän kuin yksi immunogeeninen osa. Esimerkiksi, alfa-virusvektorirakenne voi ekspressoida (joko erikseen tai yhtenä rakenteena) HBcAg:n, HBsAgs:n, HBxAg:n kaikkia tai immunogeenisiä osia, samoin kuin HCV-antigeenien immunogeenisiä osia.

7. Heterologisten sekvenssien lähteet

Sekvenssejä, jotka koodaavat edellä kuvattuja proteiineja, voidaan saada helposti lukuisista lähteistä, sisältäen esimerkiksi säilytyspaikat kuten American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland) tai kaupallisista lähteistä, kuten British Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, England). Tyypillisiin esimerkkeihin kuuluu BBG 12 (jossa on GM-CSF-geeni, joka koodaa valmista 127 aminohapon proteii-

nia); BBG 6 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat gamma-interferonia), ATCC nro 39656 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat TNF:ää), ATCC Nro. 20663 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat alfa-interferonia), ATCC Nro. 31902, 31902 ja 39517 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat beta-interferonia), ATCC Nro 67024 (jossa on sekvenssi, joka koodaa Interleukiini-1b:tä); ATCC Nro 39405, 39452, 39516, 39626 ja 39673 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat Interleukiini-2:ta); ATCC Nro 59399, 59398 ja 67326 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat Interleukiini-3:a); ATCC Nro 57592 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat Interleukiini-4:ää); ATCC Nro 59394 ja 59395 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat Interleukiini-5:tä) ja ATCC Nro 67153 (jossa on sekvenssit, jotka koodaavat Interleukiini-6:ta).

Sekvenssit, jotka koodaavat muunnettuja solukomponentteja, kuten edellä on kuvattu, saadaan helposti lukuisista lähteistä. Esimerkiksi plasmideja, joissa on sekvenssit, jotka koodaavat muunnettuja solutuotteita, voidaan saada säilytyspaikasta, kuten American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland) tai kaupallisista lähteistä, kuten Advanced Biotechnologies (Columbia, Maryland). Tyypillisiin esimerkkeihin plasmideista, joissa on joitakin edellä kuvattuja sekvenssejä, kuuluvat ATCC Nro 41000 (jossa on G-T-mutaatio ras:n kahdennessatoista kodonissa) ja ATCC Nro 41049 (jossa on G-A-mutaatio kahdennessatoista kodonissa).

Vaihtoehtoisesti, plasmideja, jotka koodaavat normaaleja solukomponentteja, voidaan saada myös säilytyspaikasta, kuten ATCC (katso esimerkiksi ATCC Nro 41001, jossa on sekvenssi, joka koodaa normaalia ras-proteiinia; ATCC nro 57103, joka koodaa abl:ää; ja ATCC NRo 59120 tai 59121, joka koodaa bcr-lokusta) ja mutatoidaan muodostamaan muunnettu solukomponentti. Menetelmät mutagenisoida erityisiä kohtia voidaan helposti saada aikaan käyttämällä alalla tunnettuja menetelmiä (katso Sambrook et al., supra, 15.3, et seq.). Erityisesti normaalien solukomponenttien, kuten ras, pistemutaatioita voidaan helposti saada aikaan kohdistetulla eri-

tyisen kodonin mutaatiolla, esimerkiksi kodonit 12, 13 tai 61.

Sekvenssejä, jotka koodaavat edellä kuvattuja virusantigeenejä, voidaan samalla tavoin saada lukuisista lähteistä. Esimerkiksi molekulaarisesti kloonatut genomit, jotka koodaavat hepatitis B virusta voidaan saada lähteistä kuten American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland). Esimerkiksi ATCC Nro45020:ssa on kokonainen hepatitis B genominen DNA (uutettu puhdistetuista Dane-partikkeleista) (katso kuvio 3, Blum et al., TIG 5(5):154-158, 1989) pBR32-2:n Bam HI-kohdassa (Mortiarty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2606-2610, 1981).

Vaihtoehtoisesti cDNA-sekvenssejä, jotka koodaavat edellä kuvattuja heterologisia sekvenssejä, voidaan saada soluista, jotka ekspressoivat tai sisältävät sekvenssejä. Lyhyesti, eräässä suoritusmuodossa mRNA:lle solusta, joka ekspressoi kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä, tehdään käänteistranskriptio käyttämällä oligonukleotidi dT:tä tai satunnaisia alukkeita. Yksijuosteinen cDNA voidaan sitten amplifioida PCR:llä (katso USA patentti nro 4 683 202; 4 683 195 ja 4 800 159. Katso myös PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich (toim.), Stockton Press, 1989) käyttämällä oligonukleotidialukkeita, jotka ovat komplementaariset sekvenssien kanssa, jotka ovat haluttujen sekvenssien molemmilla puolin. Erityisesti, kaksoisjuosteinen DNA denaturoidaan kuumentamalla lämpöstabiilin Taq-polymeraasin, sekvenssi-spesifisten DNA-alukkeiden, dATP:n, dCTP:n, dGTP:n ja dTTP:n läsnäollessa. Kaksoisjuosteinen DNA tuotetaan, kun synteesi on valmis. Tätä sykliä voidaan toistaa monta kertaa johtaen halutun DNA:n kertoma-amplifikaatioon.

Sekvenssejä, jotka koodaavat edellä kuvattuja proteiineja, voidaan myös syntetisoida, esimerkiksi Applied Biosystems Inc. DNA-syntetisaattorissa (esim. APB DNA syntetisaattori malli 392 (Foster City, CA)).

F. Eukaryoottiset kerrokselliset vektorialoitussysteemit

Kuten edellä huomautettiin, antaa tämä keksintö myös eukaryoottiset kerrokselliset vektorialoitussysteemit, joissa on 5'-promoottori, rakenne (esim. alfa-virusvektorirakenne), joka kykenee ekspressoimaan heterologisia nukleotidisekvenssejä, jotka kykenevät replikoimaan solussa joko autonomisesti tai vasteena yhdelle tai useammalle tekijälle, ja transkription lopetussekvenssi. Lyhyesti, eukaryoottiset kerrokselliset vektorialoitussysteemit antavat kaksivaiheisen tai "kerroksellisen" mekanismin, joka kontrolloi heterologisten nukleotidisekvenssien ekspressiota. Ensimmäinen kerros aloittaa toisen kerroksen transkription ja siihen sisältyy 5'-promoottori, transkription lopetuskohta, samoin kuin yksi tai useampi pilkkomiskohta ja polyadenylaatiokohta, jos toivottua. Tyypillisiä esimerkkejä promoottoreista, jotka ovat sopivia tässä suhteessa, ovat mitkä tahansa virus- tai solupromoottorit, kuten CMV, retrovirus LTR, SV40, ß-aktiini, immunoglobuliinipromoottorit ja indusoituvat promoottorit, kuten metallotioniinipromoottori ja glukokortikoidipromoottori. Toinen kerros koostuu rakenteesta, joka kykenee ekspressoimaan yhtä tai useampaa heterologista nukleotidisekvenssiä, ja replikoimaan solussa joko autonomisesti tai vasteena yhdelle tai useammalle tekijälle. Keksinnön eräässä suoritusmuodossa rakenne voi olla Sindbis cDNA-rakenne, kuten edellä kuvattiin.

Suurta määrää muita cDNA- ja DNA-vektorirakenteita voidaan myös käyttää eukaryoottisessa kerroksellisessa vektorialoitussysteemissä, mukaanluettuina esimerkiksi virusvektorirakenteet, jotka ovat kehittyneet polioviruksesta (Evans et al., Nature 339:3385-388, 1989; ja Sabin, J. Biol. Standardization 1:115-118, 1973); rinoviurus, rokkovirukset, kuten kanarianlinturokkovirus tai vacciniavirus (Fisher-Hoch et al., PNAS 86:317-321, 1989; Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci 569:86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine 8:17-21, 1990; USA patentti nro 4603112, 4769330 ja 5017487; WO 89/01973); SV40 (Mulligan et al., Nature 277:108-114, 1979); retrovirus

(USA patentti nro 4 777 127, GB 2 200 651, EP 0 345 242 ja WO91/02805); influenssavirus (Luytjes et al., CEll 59:1107-1113, 1989; McMicheal et al., N. Eng. J. Med 309:13-17, 1983 ja Yap et al., Nature 273:238-239, 1978); adenovirus (Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991); parvovirus kuten adenoon liittyvät virukset (Samulski et al., J. Vir. 63:3822-3828, 1989; Mendelson et al., Virol. 166:154-165, 1988; PA 7/222 684); herpes (Kit, Adv. Exp. Med. Biol. 215:219-236, 1989); SV40; HIV (Poznansky, J. Virol. 65:532-536, 1991); tuhkarokko (EP 0 440 219); astrovirus (Munroe et al., J. Vir. 67:3611-3614, 1993); Semliki Forest Virus ja coronavirus, samoin muut virussysteemit (esim. EP 0 440 219; WO 92/06693; USA patentti nro 5 166 057).

Kuten edellä on huomautettu, keksinnön muissa suoritusmuodoissa annetaan eukaryoottiset kerrokselliset vektorialoitussysteemit, joissa on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfaviruksen transkription in vitro autenttisesta 5'-päästä, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja, virusliitosalue, heterologinen nukleotidisekvenssi, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja polyadenylaattisekvenssi. Alfa-virus cDNA-vektorirakenteen in vitro transkription jälkeen saatu alfa-virus RNA-vektorimolekyyli koostuu 5'-sekvenssistä, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssistä, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja, virusliitosalueesta, heterologisesta nukleotidisekvenssistä, alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssistä ja polyadenylaattisekvenssistä.

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa annetaan menetelmät jakaa heterologista nukleotidisekvenssiä lämminveriselle eläimelle, mihin sisältyy vaihe antaa eukaryoottinen kerroksellinen vektorialoitussysteemi lämminveriselle eläimelle. Eukaryoottisia kerroksellisia vektorialoitussysteemejä voidaan antaa lämminverisille eläimille joko suoraan (esim. laski-

monsisäisesti, lihaksen sisäisesti, vatsaontelon sisäisesti, ihonalaisesti, suun kautta, peräsuolen kautta, silmänsisäisesti, nenäontelon sisäisesti) tai erilaisilla fysikaalisilla menetelmillä, kuten lipofektio (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989), suora DNA-injektio (Acsadi et al., Nature 352:815-818, 1991); mikrosyöttöpommitus (Williams et al., PNAS 88:2726-2730, 1991); usean tyyppiset liposomit (katso esim. Wang et al., PNAS 84:7851-7855, 1987); $CaPO_4$ (Dubensky et al., PNAS 81:7529-7533, 1984); DNA ligandi (Wu et al., J. of Biol. Chem. 264: 16985-16987, 1989); nukleiinihappojen antaminen yksinään (WO 90/11092); tai DNA-linkkiytyneen antaminen tapetuille adenovirukselle (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992); polykationiyhdisteet, kuten polylysiini, reseptori-spesifiset ligandit; samoin kuin psoraleeni-inaktivoidut virukset, kuten Sendai tai adenovirus.

Eukaryoottisia kerroksellisia vektorialoitussysteemejä voidaan antaa lämminveriselle eläimelle spesifisen immuunivasteen stimulointitarkoituksiin; inhiboimaan aineen vuorovaikutusta isäntäsolureseptorin kanssa; ekspressoimaan toksisia lievittäviä aineita, mukaanluettuna esimerkiksi ehdolliset lievittävät aineet; immunologisesti säätelemään immuunisysteemiä; ekspressoimaan markkereita ja korvaamaan geeniterapiaa. Näistä ja muista käytöistä keskustellaan alla yksityiskohtaisemmin.

G. Sindbis pakkaussolulinjat

Keksinnön lisäsuoritusmuodoissa annetaan alfa-viruspakkauslinjat. Erityisesti tämän keksinnön eräässä näkökohdassa annetaan alfa-viruspakkaussolulinjat, missä virusrakenneproteiinit toimitetaan in trans stabiililta integroidulta ekspressiovektorilta. Sen jälkeinen alfa-virusvektori RNA-transkriptien transfektio tai infektio luo alfa-virusvektoria tuottavan solulinjan. Esimerkiksi keksinnön eräässä suoritusmuodossa alfa-virus RNA-vektorimolekyylit tuotetaan alunperin käyttämällä T6 in vitro RNA-polymeraasisysteemiä

transkriptoimaan cDNA-kloonista, joka koodaa kiinnostuksen kohteena olevaa geeniä ja alfa-viruksen ei-rakenteellisia proteiineja. Vektori-RNA voidaan sitten transfektoida alfa-viruspakkaussolulinjaan, missä vektori-RNA-transkriptit replikoivat runsaasti ja sen jälkeen viruksen rakenneproteiinit pakkaavat tuottaen infektiivisiä viruspartikkeleita. Alfavirus cDNA-molekyylin jatketun pituuden luonteen takia in vitro transkriptioprosessi on tehoton. Lisäksi vain 1 % - 10 % soluista, joita oli petrimaljalla, voidaan transfektoida onnistuneesti. Sen seurauksena, jotta optimoidaan vektorin tuottosolulinjan suoritus ja tiitteri, voidaan suorittaa kaksi peräkkäistä geenisiirtosykliä. Jotta tämä saadaan aikaiseksi, täytyy vektori ensin transfektoida primääriseen alfa-viruspakkaussolulinjaan. Tämä transfektoitu solulinja tuottaa sitten alhaiset tiitterit infektiivisiä viruspartikkeleita viljelmäsupernatanteissa. Näitä infektiivisiä supernatantteja käytetään sitten transdusoimaan tuore yksin kertainen kerros alfa-viruspakkaussoluja. Alfa-virusvektorin infektio pakkaussolulinjaan on edullisempi kuin transfektio sen korkeamman, soluihin RNA-siirtymistehokkuuden ja vektorin optimoidun soluun asettumisen takia. Tämä kaksivaiheläheistyminen johtaa pakatun infektiivisen rekombinantti Sindbis-vektorin korkeampaan ekspressioon ja korkeampaan pakkaustiitteriin.

Keksinnön tietyissä suoritusmuodoissa alfa-viruspartikkleit voivat epäonnistua transdusoimaan samaa pakkaussolulinjaa, koska solulinja tuottaa lisääntyneesti solun kuoriproteiineja, jotka blokkaavat solun reseptorit alfa-virusvektorin kiinnittymiselle. Sellaisissa tapauksissa voidaan luoda alfa-viruspartikkelin toinen tyyppi, joka kykenee infektoimaan alfa-viruspakkaussolut. Tämä viruspartikkelin toinen tyyppi täytyy tuottaa pakkaussolulinjalla, joka tunnetaan "hyppivänä solulinjana", joka tuottaa lyhytaikaisia vektoripartikkeleita sen seurauksena, että transfektoidaan in vitro transkriptoiduilla alfa-virus RNA-vektoritranskripteillä. Tämä hyppivä solulinja tehdään ohjaamaan uudestaan ohimenevästi tuotetun vektoripartikkelin kuorihakuisuutta anta-

malla vaihtoehtoisia viruskuoren proteiineja, jotka ohjaavat uudestaan alfa-virusvektoreita erilaisille solureseptoreille prosessissa, jotka kutsutaan pseudotyypittämiseksi. Tällä hetkellä on keksitty kaksi lähestymistapaa alfa-viruspartikkelin pseudotyypittämiselle. Ensimmäinen lähestymistapa koostuu alfa-viruksen pakkaussolulinjasta (kuvattu edellä), joka ekspressoi samanaikaisesti rakkulaisen suutulehduksen virus-G-proteiinia (VSV-G). VSV-G pseudotyypittämisen on osoitettu infektoivan suurta määrää solutyyppejä (Marsh, Adv. Virus Res. 36:107-151, 1989). Toinen lähestymistapa tuottaa pseudotyypitettyjä alfa-virusvektoripartikkelia, on käyttää retrovirus pakkaussolulinjoja (esim. WO 92/05266), joissa on retrovirus gag/pol- ja env-sekvenssit, jotka kykenevät pakkaamaan alfa-virus RNA-vektoria, jossa on retroviruspakkaussekvenssi.

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa stabiilisti integroituja alfa-virus DNA-ekspressiovektoreita käytetään tuottamaan alfa-virus vektori-RNA-molekyyliä, joka ylläpitää kykyä replikoitua itse. Tämä lähestymistapa voi osoittautua hyödylliseksi ylläpitämään suuret tasot ekspressiota pitkät viljelyjaksot, koska integroitu DNA-vektori ekspressoi jatkuvasti muuttumattomia RNA-vektoreita. Tässä konfiguraatiossa vektorit, joita aikaisemmin transkriboitiin plasmidista, jossa on SP6 RNA-polymeraasin tunnistuskohta, korvataan sopivalla promoottorisekvenssillä, jota käytetty kantasolulinja kuvaa. Tässä plasmidisekvenssissä voi olla myös selektoitava markkeri, joka on erilainen kuin ne, joita käytetään luomaan pakkaussolulinja. Tässä konfiguraatiossa DNA-perusteiset alfa-virusvektorit viedään transfektiolla pakkaussolulinjaan, kuten edellä kuvattiin, jonka jälkeen laimennuskloonataan, jotta löydetään korkeimman tiitterin tuottavat solulinjat.

1. Itsemurhavektori

Tämän keksinnön eräs lisänäkökohta koskee alfa-virusitsemurhavektoreita rajoittamaan villityypin alfa-viruksen leviä-

mistä pakkaus/tuottajasolulinjoihin. Lyhyesti, eräässä suoritusmuodossa alfa-virus itsemurhavektori koostuisi antisense- tai ribozyyme-sekvenssistä, joka on spesifistä villityypin alfa-viruksen sekvenssille, joka on luotu RNA-rekombinaatiotapahtumusta vektorin liitosalueen 3'sekvenssien ja pakkaussolulinjan ekspressiovektorin 5' alfa-virus rakennesekvenssien välillä. Antisense- tai ribotzyymimolekyyli olisi vain termostabiili spesifisen rekombinaatiosekvenssin läsnäollessa eikä sillä olisi mitään muuta vaikutusta alfaviruksen pakkaus/tuottajasolulinjaan. Vaihtoehtoisesti, toksista molekyyliä (kuten alla esitetyt) voidaan myös ekspressoida vektorin yhteydessä, joka ekspressoisi vain villityypin alfa-viruksen läsnäollessa.

2. Alfa-virusvektorit estämään metastaattisten kasvainten leviämistä

Tämän keksinnön eräs lisänäkökohta koskee alfa-virusvektoreiden käyttöä estämään tai vähentämään pahanlaatuisten kasvainten leviämistä. Lyhyesti, pahanlaatuisuuden laajuus tyypillisesti koskee kasvaimen verisuonitusta. Eräs syy kasvaimen verisuonitukselle on liuokoisten kasvainangiogeneesitekijöiden tuotto (TAF) (Paweletz et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 9:197, 1989), joita jotkut kasvaimet ekspressoivat. Tämän keksinnön eräässä näkökohdassa kasvaimen verisuonitusta saatetaan hidastaa käyttämällä alfa-virusvektoreita ekspressoimaan antisense- tai ribotzyymi RNA-molekyylejä, jotka ovat spesifisiä TAF:lle. Vaihtoehtoisesti, anti-angiogeneesitekijöitä (Moses et al., Science 248:1408, 1990; Shapiro et al., PNAS 84:2238, 1987) voidaan ekspressoida joko yksin tai yhdessä edellä kuvattujen ribotzyymi- tai antisense-sekvenssien kanssa, jotta hidastetaan tai inhiboidaan kasvaimen verisuonitusta. Vaihtoehtoisesti, alfa-virusvektoreita voidaan myös käyttää ekspressoimaan vasta-ainetta, joka on spesifinen TAF-reseptoreille ympäröivissä kudoksissa.

H. Menetelmät käyttää alfa-virusvektoreita

1. Immunostimulaatio

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa annetaan koostumukset ja menetelmät antaa alfa-virusvektorirakennetta, joka kykenee estämään, inhiboimaan, stabiloimaan tai kumoamaan infektiivisiä, syöpäisiä, auto-immuuni- tai immuunisairauksia. Tyypillisiä esimerkkejä sellaisista sairauksista ovat virusinfektiot, kuten HIV, HBV, HTLV I, HTLV II, CMV, EBV ja HPV, melanoomat, sokeritauti, siirre vs isäntä sairaus, Alzheimerin tauti ja sydänsairaudet.

Tarkemmin, tämän keksinnön eräässä näkökohdassa annetaan koostumukset ja menetelmät stimuloida immuunivastetta (joko nesteen tai solun välittämää) patogeeniselle aineelle, siten että patogeeninen aine joko tapetaan tai inhiboidaan. Tyypillisiin esimerkkeihin patogeenisistä aineista kuuluvat bakteerit, homeet, parasiitit, virukset ja syöpäsolut.

Keksinnön eräässä näkökohdassa patogeeninen aine on virus ja annetaan menetelmät stimuloida spesifistä immuunivastetta ja inhiboida viruksen leviämistä käyttämällä rekombinantti alfa-viruspartikkeleita jakamaan vektorirakennetta, joka ohjaa antigeenin tai sen modifioidun muodon ekspressiota, alttiina oleviin kohdesoluihin, jotka kykenevät joko (1) aloittamaan immuunivasteen virusantigeeniä vastaan tai (2) estämään viruksen leviäminen miehittämällä solureseptorit, joita tarvitaan viruksen vuorovaikutukseen. Proteiini koodaaman vektorinukleiinihapon ekspressio voi olla ohimenevä tai stabiili ajan kanssa. Milloin immuunivaste on tarkoitus stimuloida patogeeniseksi aineeksi, rekombinantti alfa-virus suunnitellaan edullisesti ekspressoimaan antigeenin modifioitua muotoa, joka stimuloi immuunivastetta ja jolla on alentunut patogeenisyys verrattuna natiiviin aineeseen. Tämä immuunivaste saadaan aikaan, kun solut ovat antigeenejä oikella tavalla, so. MHC luokka I ja/tai II molekyylien yhteydessä yhdes-

sä lisämolekyylien, kuten CD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 tai niiden analogien kanssa (esim. Altmann et al., Nature 338: 512, 1989). Solujen, jotka on infektoitu alfa-virusvektoreilla, odotetaan tekevän tämän tehokkaasti, koska ne matkivat tiiviisti oikeaa virus-infektiota ja koska ne : (a) kykenevät infektoimaan ei-replikoivia soluja, (b) eivät integroidu isäntäsolun genomiin, (c) eivät ole liittyneet yhteen minkään elämää uhkaavan sairauden kanssa ja (d) ekspressoivat runsaasti heterologista proteiinia. Näiden erojen takia voidaan alfa-virusvektoreiden helposti ajatella olevan turvallisia virus-vektoreita, joita voidaan käyttää terveisiin yksilöihin rokotuskäyttöön.

Keksinnön tällä näkökohdalla on lisäetu muihin systeemeihin verrattuna, joka saattaisi toimia samalla lailla siinä, että nykyiset solut ovat täysin eläviä ja terveitä ja ekspressoidaan alhaiset tasot virusantigeenejä, suhteessa heterologisiin geeneihin. Tämä on selvä etu, koska ekspressoidut antigeeniset epitoopit voidaan muuntaa antigeenin geenin alafragmenttien selektiivisellä kloonauksella rekombinantti alfa-virukseen johtaen vasteisiin, jotka ovat immunogeenisiä epitooppeja vastaan, jota immunodominantit epitoopit muuten voivat varjostaa. Sellaista lähestymistä voidaan laajentaa peptidin, jolla on moninkertaiset epitoopit, ekspressioon, yhden tai useamman epitoopeista ollessa johdettu erilaisista proteiineista. Lisäksi keksinnön tämä näkökohta sallii sytotoksisten T-lymfosyyttien (CTL) tehokkaan stimuloinnin, joka on ohjattu antigeenisiä epitooppeja ja antigeenien peptidifragmentteja vastaan, joita geenien alafragmentit koodaavat, solunsisäisen synteesin ja näiden peptidifragmenttien MHC luokka I molekyylien kanssa liittymisen kautta. Tätä lähestymistä voidaan hyödyntää kartoittamaan tärkeitä immunodominantteja epitoopeja CTL-induktiota varten.

Immuunivaste voidaan myös saada aikaan siirtämällä sopivaan immuunisoluun (kuten T-lymfosyytti) geeni, joka on spesifinen T-solureseptorille, joka tunnistaa kiinnostuksen kohtee-

na olevan antigeenin (sopivan MHC-molekyylin yhteydessä, jos tarpeellista), immunoglobuliinia varten, joka tunnistaa kiinnostuksen kohteena olevan antigeenin, tai kahden hybridiä varten, joka antaa CTL-vasteen MHC-yhteyden puuttuessa. Täten rekombinantti alfa-viruksella infektoituja soluja voidaan käyttää immunostimulanttina, immunomodulaattorina tai rokotteena.

Keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa annetaan menetelmät tuottaa inhibitoorisia lievittäviä aineita, missä alfa-virusvektorit jakavat ja ekspressoivat viallisia häiritseviä viruksen rakenneproteiineja, jotka inhiboivat viruksen kokoamista. Sellaiset vektorit voivat koodata viallista gag-, pol-, env- tai muita viruspartikkeliproteiineja tai peptidejä ja nämä inhiboisivat näkyvällä tavalla viruspartikkeleiden kokoamista. Tämä tapahtuu, koska viruspartikkelin normaalien alayksiköiden vuorovaikutusta häiritään vuorovaikutuksella viallisten alayksiköiden kanssa.

Keksinnön eräässä toisessa suoritusmuodossa annetaan menetelmät ekspressoida inhiboivia peptidejä tai proteiineja, jotka ovat spesifisiä viruproteaasille. Lyhyesti, viruproteaasi pilkkoo viruksen gag- ja gag/pol-proteiinit lukuisiin pienempiin peptideihin. Tämän pilkkomisen epäonnistuminen kaikissa tapauksissa johtaa infektiivisten retroviruspartikkelien täydelliseen inhibiitioon. Esimerkkinä HIV-proteaasin tiedetään olevan aspartyyliproteaasi ja peptidien, jotka tehdään proteiinien tai analogien aminohapoista, tiedetän inhiboivan näitä. Vektorit, jotka inhiboivat HIV:ä, ekspressoivat yhtä tai useampaa fuusioitua sellaisen peptidi-inhibiittorin kopiota.

Erääseen toiseen suoritusmuotoon sisältyy supressorigeenien jakaminen, jotka deletoituina, mutatoituina tai ei-ekspressoituina kaikissa solutyypeissä, johtavat kasvaimen muodostumiseen tuossa solutyypissä. Deletoidun geenin uudelleen tuonti virusvektorin avulla johtaa kasvainfenotyypin regressioon kaikissa soluissa. Esimerkkejä sellaisista syövistä

ovat hermotukikudoskasvain ja Wilmsin kasvain. Koska pahanlaatuisuuden voidaan katsoa olevan solun terminaalisen erilaistumisen inhibiitiota verrattuna solukasvuun, alfa-virusvektorin jakamisen ja geenituotteiden ekspression, mikä johtaa kasvaimen erilaistumiseen, pitäisi yleisesti johtaa myös regressioon.

Vielä eräässä suoritusmuodossa alfa-virusvektori antaa terapeuttisen vaikutuksen koodaamalla ribozyymiä (RNA entsyymi) (Haseloff ja Gerlach, Nature 334:585, 1989), joka pilkkoo ja täten inaktivoi RNA-molekyylejä vastaten patogeenistä toimintaa. Koska ribozyymit toimivat tunnistamalla spesifistä kohde-RNA:ta ja tämä sekvenssi on normaalisti 12-17 bp, sallii tämä erityisen RNA-lajin spesifisen tunnistamisen, kuten RNA tai retrovirusgenomi. Lisäspesifisyyttä voidaan saada aikaan joissakin tapauksissa tekemällä tästä ehdollisen toksisen lievittävän aineen (katso alla).

Eräs tapa lisätä inhibitooristen lievittävien aineiden tehokkuutta on ekspressoida viruksen inhibitoorisia geenejä geenien yhteydessä, jotka lisäävät resistentin solun infektion mahdollisuutta kyseessä olevalla viruksella. Tulos on ei-tuottava "kuollut-pää" tapahtuma, joka kilpailisi tuottavista infektiotapahtumista. HIV:n spesifisessä tapauksessa voidaan jakaa vektoreita, jotka inhiboivat HIV-replikaatiota (ekspressoimalla anti-sense:ä, tat:a, jne, kuten edellä on kuvattu) ja myös yliekspressoivat proteiineja, joita vaaditaan infektioon, kuten CD4. Tällä tavalla suhteellisen pieni lukumäärä vektori-infektoituja HIV-resistenssejä soluja toimii "kaatoaltaana" tai "magneettina" lukuisille ei-tuottaville fuusiotapahtumille vapaan viruksen tai viruksella infektoitujen solujen kanssa.

2. Blokkausaineet

Monet infektiiviset sairaudet, syövät, autoimmuunisairaudet ja muut sairaudet sisältävät viruspartikkelien vuorovaikutuksen solujen kanssa, solut solujen kanssa tai solut teki-

jöiden kanssa. Virusinfektioissa virukset tavallisesti menevät soluihin alttiiden solujen pinnalla olevien reseptorien kautta. Syövissä solut voivat vastata sopimattomasti tai ei lainkaan signaaleihin muista soluista tai tekijöistä. Autoimmuunisairaudessa on sopimaton "itse"-markkereiden tunnistus. Tässä keksinnössä sellaiset vuorovaikutukset voidaan blokata tuottamalla in vivo jommankumman vuorovaikutuksessa olevan partnerin analogi.

Tämä blokkaustoiminta saattaa tapahtua solunsisäisesti, solumembraanilla tai solun ulkopuolisesti. Viruksen tai erityisesti alfa-virusvektorin blokkaustoiminta, jossa on blokkausaineen geeni, voidaan välittää joko alttiin solun sisäpuolelta tai erittämällä blokkaavan proteiinin versio, jotta blokataan paikallisesti patogeeninen vuorovaikutus.

HIV:n tapauksessa vuorovaikutuksen kaksi tekijää ovat gp 120/gp 41 kuoriproteiini ja CD4-reseptorimolekyyli. Täten sopiva blokkaaja olisi vektorirakenne, joka ekspressoi joko HIV env-analogia, joka blokkaa HIV:n sisääntulon aiheuttamatta patogeenisiä vaikutuksia tai CD4-reseptorianalogi. CD4-analogia eritettäisiin ja se toimisi suojaamaan naapurisoluja, kun taas gp 120/gp 41 eritetään ja tuotetaan vain solunsisäisesti ikäänkuin suojaamaan vain vektorin sisältävää solua. Voi olla edullista lisätä ihmisen immunoglobuliinin raskaita ketjuja tai muita komponentteja CD4:ään, jotta lisätään stabiilisuutta tai komplementtilyysausta. Alfa-virusvektorin, joka koodaa sellaista hybridi-liukoista CD4:ää, jakaminen isännälle johtaa stabiilin hybridimolekyylin jatkuvaan toimittamiseen. Käsittelyn tehokkuus voidaan määrittää mittaamalla sairauden etenemisen tavalliset indikaattorit, vasta-ainetaso, virusnatigeenituotto, infektiiviset HIV-tasot tai ei-spesifisten infektioiden tasot, mukaanluettuina.

3. Lievittävien aineiden ekspressio

Tekniikoita, jotka ovat samanlaisia kuin edellä kuvatut, voidaan käyttää tuottamaan rekombinantti alfa-virusta, jossa on vektorirakenteet, jotka ohjaavat aineen (tai "lievittävän aineen") ekspressiota, joka kykenee inhiboimaan patogeenisen aineen tai geenin toimintaa. Tässä keksinnössä "kykenevä inhiboimaan toiminta" tarkoittaa, että lievittävä aine joko suoraan inhiboi toimintaa tai epäsuorasti tekee niin, esimerkiksi muuntamalla soluissa läsnäolevan aineen sellaisesta, joka ei normaalisti inhiboi patogeenisen aineen toimintaa, sellaiseksi joka inhiboi. Esimerkkejä sellaisista toiminnoista virussairauksiin ovat adsorptio, replikaatio, geeniekspressio, kokoaminen ja viruksen poistuminen infektoiduista soluista. Esimerkkeihin sellaisista toiminnoista syöpäsolulle tai syöpää edistävälle kasvutekijälle kuuluvat elävyys, solureplikaatio, muuttunut alttius ulkopuolisille signaaleille (esim. kosketusinhibiitio) ja tuottamisen puute tai anti-oncogeenisten proteiinien mutatoitujen muotojen tuottaminen.

(a) Inhibitoriset lievitävät aineet

Tämän keksinnön eräässä näkökohdassa alfa-virusvektorirakenne ohjaa geenin, joka voi häiritä patogeenisen aineen toimintaa, ekspressiota, esimerkiksi virus tai pahanlaatuiset sairaudet. Sellainen ekspressio voi olla joko pääasiassa jatkuvaa tai vasteena toisen aineen, joka liittyy joko patogeeniseen tilaan tai spesifisen tyyppisen solutyypin ("tunnistava aine") läsnäoloon solussa. Lisäksi vektorin jakamista voidaan kontrolloida kohdistamalla vektorin sisääntuloa erityisesti haluttuun solutyyppiin (esimerkiksi, viruksen infektoima tai pahanlaatuinen solu), kuten edellä on keskusteltu.

Eräs antamismenetelmä on leukoforeesi, jossa noin 20 % yksilön PBL:stä poistetaan milloin tahansa ja manipuloidaan in vitro. Täten noin 2 x 10^9 solua voidaan käsitellä ja korvata. Voidaan suorittaa myös toistuvat käsittelyt. Vaihtoehtoisesti luuydintä voidaan käsitellä ja annetaan amplifioida

tehoa kuten edellä on kuvattu. Lisäksi pakkaussolulinjat, jotka tuottavat vektoria, voidaan suoraan injektoida kohteeseen sallien rekombinanttivirionien jatkuvan tuoton.

Eräässä suoritusmuodossa alfa-virusvektoreita, jotka ekspressoivat RNA:ta, joka on komplementaarinen patogeenisten avaingeenitranskriptien kanssa (esimerkiksi virusgeenituote tai aktivoitu solun oncogeeni), voidaan käyttää inhiboimaan tuon transkriptin translaatiota proteiiniksi, kuten HIV tat-proteiinin translaation inhibiitio. Koska tämän proteiinin ekspressio on olennaista virusreplikaatiolle, soluista joissa on vektori, olisivat resistenttejä HIV-replikaatiolle.

Toisessa suoritusmuodossa, missä patogeeninen aine on yksijuosteinen virus, jossa on pakkaussignaali, RNA:ta, joka on komplementaarinen viruksen pakkaussignaalin kanssa (esim. HIV pakkaussignaali, kun lievittävä aine on kohdistettu HIV:ä vastaan), ekspressoidaan siten, että näiden molekyylien liittyminen viruksen pakkaussignaalin kanssa, inhiboi retrovirusten tapauksessa varsisilmukan muodostusta ja tRNA alukkeen sitoutumista, jota vaaditaan alfa-virus RNA-genomin oikeata koteloitumista tai replikaatiota varten.

Kolmannessa suoritusmuodossa voidaan tuoda sisään alfa-virusvektori, joka ekspressoi lievittää ainetta, joka kykenee selektiivisesti inhiboimaan patogeenisen geenin ekspressiota, tai lievittää ainetta, joka kykenee inhiboimaan patogeenisen aineen tuottaman proteiinin aktiivisuutta. HIV:n tapauksessa eräs esimerkki on mutantti tat-proteiini, jolta puuttuu kyky transaktiivisesti ekspressoida HIV LTR:ltä ja sekaantuu (transdominoivalla tavalla) tat-proteiinin normaaliin toimintaan. HTVL II tat-proteiinista on tunnistettu sellainen mutantti ("XII Leu^5-mutantti; katso Wachsman et al., Science 235:674. 1987). Mutantti transrepressori tat:n pitäisi inhiboida replikaatiota paljon, kuten on osoitettu anqalogiselle repressorille HSV-1:ssä (Friedmann et al., Nature 335:452, 1988).

Sellainen transkriptionaalinen repressoriproteiini voidaan valita kudosviljelmästä käyttämällä mitä tahansa virus-spesifistä transkriptionaalista promoottoria, jonka ekspressiota virus-spesifinen transaktivoitu proteiini stimuloi (kuten edellä on kuvattu). HIV:n spesifisessä tapauksessa solulinja, joka ekspressoi HIV tat-proteiinia ja HSVTK-geeniä, jota ohjaa HIV-promoottori, kuolee ACV:n läsnäollessa. Kuitenkin jos systeemiin tuodaan sarja mutatoituja geenejä, mutantti, jolla on sopivat ominaisuudet (so. repressoi transkription HIV-promoottorista villityypin tat:n läsnäollessa) kasvaa ja valitaan. Mutanttigeeni voidaan sitten eristää uudestaan näistä soluista. Solulinja, jossa on lukuisia kopioita ehdollisesti letaalista vektori/tat-systeemistä, voidaan käyttää varmistamaan, että näiden geenien endogeeniset mutaatiot eivät ole aiheuttaneet selvinneitä soluklooneja. Satunnaisesti mutagenisoitujen tat-geenien patteri tuodaan sitten näihin soluihin käyttämällä "rescuable" alfavirusvektoria (so. sellainen, joka ekspressoi mutantti tat-proteiinia, ja jossa on bakteerin replikaation aloitus ja lääkeresistenssimarkkeri kasvua varten ja valintaa varten bakteereissa). Tämä sallii suuren määrän satunnaisia mutaatioita arvioitavan ja sallii sujuvan sen jälkeen tapahtuvan toivotun mutanttisolulinjan kloonauksen. Tätä menetelmää voidaan käyttää tunnistamaan ja käyttämään hyväkseen mutaatioita lukuisissa viruksen transkriptionaalisissa aktivaattori/viruksen promoottorisysteemeissä mahdollisiin antivirusterapioihin.

4. Ehdolliset toksiset lievittävät aineet

Eräs toinen lähestymistapa inhiboida patogeenistä ainetta on ekspressoida lievittävää ainetta, joka on toksinen solulle, joka ekspressoi patogeenistä tilaa. Tässä tapauksessa lievittävän aineen ekspressiota vektorista pitäisi rajoittaa itsenäisen kokonaisuuden läsnäolo, joka liittyy patogeeniseen aineeseen, kuten spesifinen virus RNA-sekvenssi, joka tunnistaa patogeenisen tilan, jotta vältetään ei-patogeenisten solujen tuhoa.

Tämän menetelmän eräässä suoritusmuodossa rekombinantti alfa-viruksessa on vektorirakenne, jossa on toksinen geeni (kuten edellä on keskusteltu), jota ekspressoi solu-spesifinen vastaava vektori. Tällä tavalla nopeasti replikoivat solut, joissa on RNA-sekvenssit, jotka kykenevät aktivoimaan solu-spesifiset herkät vektorit, tuhoaa alfa-virusvektorirakenteen tuottama sytotoksinen aine ne edullisesti.

Samalla lailla kuin edellä olleessa suoritusmuodossa, voi alfa-virusvektorirakenteessa olla geeni fosforylaatiolle, fosforibosylaatiolle, ribosylaatiolle tai puriini- tai pyrimidiini-pohjaisen lääkkeen muu metabolia. Tälle geenille ei ole vastaavaa nisäkässoluissa ja saattaisi tulla organismeista, kuten virus, bakteeri, home tai protozoa. Esimerkkinä olisi E. coli guaniinifosforibosyylitransferaasigeenituote, joka on letaali tioksantiinin läsnäollessa (katso Besnard et al., Mol. Cell Biol. 7:4139-4141, 1987). Ehdollisesti letaaleilla, tämän tyyppisillä geenituotteilla (viitataan myös edellä "esi-lääkkeinä") on sovellutusta moniin tällä hetkellä tunnettuihin puriini- tai pyrimidiini-pohjaisiin syöpää vastaan oleviin lääkkeisiin, jotka usein vaativat solun sisäistä ribosylaatiota tai fosforylaatiota, jotta ne tulevat tehokkaiksi sytotoksisiksi aineiksi. Ehdollisesti letaali geenituote voisi myös metabolisoida ei-toksista lääkettä, joka ei ole puriini- tai pyrimidiinianalogi, sytotoksiseksi muodoksi (katso Searle et al., Brit. J. Cancer 53:377-384, 1986).

Nisäkäsviruksilla on yleensä taipumusta "välittömästi aikaisiin" geeneihin, jotka ovat tarpeellisia myöhemmälle transkriptionaaliselle aktivaatiolle muista viruspromoottorielementeistä. Tämän luonteiset RNA-sekvenssit ovat erinomaisia ehdokkaita aktivoimaan virusinfektion alfa-virusvektoreiden solunsisäisiä signaaleja (tai "tunnistamaan aineita"). Täten ehdollisesti letaalit geenit, joita alfa-virus soluspesifiset vektorit, jotka ovat herkkiä näille viruksen "välittömästi aikaisille" geenituotteille, ekspressoivat, voisivat nimenoamaan tappaa solut, jotka on infektoitu millä tahansa

erityisellä viruksella. Lisäksi koska ihmisen α- ja ß-interferonipromoottorielementit aktivoidaan transkriptionaalisesti vasteena suurelle määrälle ei-samankaltaisten virusten infektiolle, vektorien, jotka ekspressoivat ehdollisesti letaalia geenituotetta kuten HSVTK, sisääntuominen esimerkiksi vasteena interferonin tuotolle voisi johtaa solujen, jotka on infektoitu suurella määrällä erilaisia viruksia, tuhoon.

Tämän keksinnön eräässä toisessa näkökohdassa rekombinantti alfa-viruksen virusvektorissa on vektorirakenne, joka ohjaa geenituotteen, joka kykenee aktivoimaan muuten inaktiivisen prekursorin aktiiviseksi patogeenisen aineen inhibiittoriksi, ekspressiota. Esimerkiksi HSVTK-geenituotetta voidaan käyttää tehokkaammin metabolisoimaan mahdollisesti antivirusnukleosidianalogeja, kuten AZT tai ddC. HSVTK-geeniä voidaan ekspressoida solu-spesifisen herkän vektorin kontrollin alaisena ja viedä näihin solutyyppeihin. Solun mekanismien täytyy metabolisoida AZT (ja muut nukleosidivirusvastaiset) nukleotiditrifosfaattimuotoon, jotta nimenomaan inhiboidaan retrovirus käänteistranskriptaasi, ja täten HIV-replikaatio (Furmam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8333-8337, 1986). HSVTK:n (nukleosidi ja nukleosidikinaasi, jolla on hyvin laaja substraattispesifisyys) jatkuva ekspressio johtaa näiden lääkkeiden tehokkaammassa metaboliassa niiden biologisesti aktiiviseen nukleotiditrifosfaattimuotoon. AZT tai ddC-terapia on täten tehokkaampi, sallien alemmat annokset, vähemmän yleiseen tietouteen saatettua toksisuutta ja korkeampi potenssi tuottavaa infektiota vastaan. Lisäksi tulevat analogit, joiden nukleotiditrifosfaattimuodoilla on selektiivisyyttä retrovirus käänteistranskriptaasille, mutta solun nukleosidi- ja nukleotidikinaasien substraattispesifisyyden tuloksena eivät ole fosforyloidut, tehdään tehokkaammiksi.

Näiden alfa-virusvektoreiden antaminen ihmisen T-solu- ja makrofaagi-/monosyyttisolulinjoille, voi lisätä niiden resistenssiyttä HIV:ä vastaan AZT:n ja ddC:n läsnäollessa ver-

rattuna samoihin soluihin ilman retrovirusvektorin käsittelyä. Käsittely AZT:llä olisi alemmalla kuin normaaleilla tasoilla, jotta vältetään toksisia sivuvaiktuksia, mutta silti estetään tehokkaasti HIV:n leviäminen. Käsittelyn kulku olisi kuten on kuvattu blokkaajalle.

Eräässä suoritusmuodossa rekombinantti alfa-virusvektorilla on geeni, joka määrää tarkasti tuotteen, joka ei ole itsessään toksinen, mutta kun prosessoidaan tai modifioidaan proteiinilla, kuten proteaasi, joka on spesifinen virukselle tai muulle patogeenille, muunnetaan toksiseksi muodoksi. Esimerkiksi rekombinantti alfa-viruksessa voisi olla geeni, joka koodaa ristiin A-ketjun proproteiinia, joka tulee toksiseksi sen jälkeen kun prosessoitu HIV-proteaasilla. Erityisemmin, synteettinen inaktiivinen toksiinirisiinin tai difteria A ketjujen proproteiinimuoto voitaisiin pilkkoa aktiiviseen muotoon järjestämällä HIV:ä viraalisesti koodannut proteaasi tunnistamaan ja pilkkomaan sopivan "pro"-elementin.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa alfa-virusrakenne voi ekspressoida "raportoivaa tuotetta" kohdesolujen pinnalla vasteena tunnistavan aineen läsnäololle soluissa (kuten virusgeenin ekspressio). Sytotoksinen aine voi tunnistaa tämän pintaproteiinin, kuten raportoivan proteiinin vasta-aineet, tai sytotoksiset T-solut. Samalla lailla sellaista systeemiä voidaan käyttää havaitsemissysteeminä (katso alla) yksinkertaisesti tunnistamaan ne solut, joilla on erityinen geeni, joka ekspressoi tunnistavaa proteiinia.

Samalla lailla eräässä toisessa suoritusmuodossa sellaista pintaproteiinia voitaisiin ekspressoida, joka itsessään olisi terapeuttisesti edullinen. Erityisessä HIV:n tapauksessa ihmisen CD4-proteiinin ekspressio nimenomaan HIV-infektoiduissa soluissa voi olla edullista kahdella tavalla:
1. CD4:n sitoutuminen HIV env:hen solunsisäisesti voisi inhiboida elävien viruspartikkelien muodostuksen, paljon kuten liukoisen CD4:n on osoitettu tekevän vapaalle virukselle,

mutta ilman systemaattisen vapauttamisen ja mahdollisen immunogeenisyyden ongelmaa, koska proteiini jää membraaniin sitoutuneeksi ja on rakenteellisesti identtinen endogeenisen CD4:n kanssa (johon potilaan pitäisi olla immunologisesti tolerantti).

2. Koska CD4/HIV env-kompleksi on sekoitettu solukuoleman syyksi, johtaa CD4:n lisäekspressio (ylimäärän HIV-env:n läsnäollessa HIV-infektoiduissa soluissa) nopeampaan solukuolemaan ja täten inhiboi virusleviämistä. Tämä voi olla erityisesti sovellettavissa monosyyteille ja makrosyyteille, jotka toimivat virustuotannon varastona niiden suhteellisen taittuvuuden tuloksena HIV-indusoidulle sytotoksisuudelle (joka puolestaan ilmeisesti johtuu CD4:n suhteelisesta puuttumisesta niiden solupinnoilta).

Eräässä toisessa suoritusmuodossa alfa-virusvektori koodaa ribozyymiä, joka pilkkoo ja inaktivoi RNA-molekyylit, jotka ovat olennaisia vektorin infektoimalle solulle. Tekemällä ribozyymituotto riippuvaiseksi spesifisestä RNA-sekvenssistä, joka vastaa patogeenistä tilaa, kuten HIV tat, toksisuus on spesifistä patogeeniselle tilalle.

5. Markkereiden ekspressio

Edellä kuvattua tekniikkaa ekspressoida lievittävää ainetta solussa vasteena spesifiselle RNA-sekvenssille, voidaan myös muokata auttamaan erityisen geenin määrittämisessä solussa, joka ekspressoi identifioivaa proteiinia (esimerkiksi, erityisen viruksen kantama geeni) ja täten auttaa tuota virusta kantavien solujen määrittämistä. Lisäksi tämä tekniikka auttaa määrittämään virukset (kuten HIV) solujen, joissa on tunnistava proteiini liittyneenä virukseen, kliinisessä näytteessä.

Tämä modifikaatio voidaan saada aikaan antamalla genomi, joka koodaa tuotetta, jonka läsnäolo voidaan helposti tunnistaa ("markkerituote"), alfa-virusvektorissa, joka vastaa tunnistavan proteiinin läsnäoloon infektoidussa solussa.

Esimerkiksi HIV, kun se infektoi sopivia soluja, tekee tat:a ja rev:ä. Indikaattorisolut voidaan täten antaa genomin kanssa (kuten infektiolla sopivan rekombinantti alfa-viruksen kanssa), joka koodaa markkerigeeniä, kuten alkaalifosfataasigeeni, ß-galaktosidaasigeeni tai luciferaasigeeni, jota rekombinantti alfa-virus ekspressoi sen jälkeen kun aktivoitu tat- ja/tai rev RNA-transkriptillä. ß-galaktosidaasin tai alkaalifosfataasin tapauksessa solujen altistaminen substraattianalogeille johtaa värin tai fluoresenssin muutokseen, jos näyte on HIV-positiivinen. Luciferaasin tapuksessa näytteen altistaminen luciferaasille johtaa luminesenssiin, jos näyte on HIV-positiivinen. Solunsisäisille entsyymeille, kuten ß-galaktosidaasi, virustiitteri voidaan mitata suoraan laskemalla värilliset tai fluoresenssit solut tai tekemällä solu-uutteet ja suorittamalla sopiva määritys. Alkaalifosfataasin membraanisidosmuodolle virustiitteri voidaan mitata myös suorittamalla entsyymimääritykset solun pinnalla käyttämällä fluoresenssiä substraattia. Eritetyille entsyymeille, kuten alkaalifosfataasin muokattu muoto, määritetään pienistä näytteistä viljelmäsupernatanttia aktiivisuus, mikä sallii jatkuvan yksittäisen viljelyn tarkkailun ajan suhteen. Täten tämän markkerisysteemin erilaisia muotoja voidaan käyttää erilaisiin tarkoituksiin. Näihin sisältyvät aktiivisen viruksen lasku tai sensitiivisesti tai yksinkertaisesti mittaamalla viruksen leviäminen viljelmässä ja tämän leviämisen inhibiitio erilaisilla lääkkeillä.

Lisää spesifisyyttä voidaan liittää edellä olleeseen systeemiin testaamalla viruksen läsnäolo joko neutraloimalla tuota virusta vastaan olevat vasta-aineet tai ilman neutralointia. Esimerkiksi eräässä osassa testattavaa kliinistä näytettä voi olla läsnä vasta-aineiden neutralointi HIV:lle; kun taas eräässä toisessa osassa ei olisi neutraloivia vasta-aineita. Jos testit olivat negatiivisiä systeemissä, missä oli vasta-aineita, tämä auttaisi vahvistamaan HIV:n läsnäolon.

Analogisessa systeemissä in vitro määrityksessä erityisen geenin läsnäolo, kuten virusgeeni, voidaan määrittää solu-

näytteessä. Tässä tapauksessa näytteen solut infektoidaan sopivalla alfa-virusvektorilla, jossa on raportoiva geeni, jota ekspressoidaan vain sopivan virus RNA-transkriptin läsnäollessa. Raportoiva geeni, sen jälkeen kun on mennyt näytesoluihin, ekspressoi sen raportoitavaa tuotetta (kuten ß-galaktosidaasi tai luciferaasi) vain, jos isäntäsolu ekspressoi sopivia virusproteiineja.

Nämä näytteet ovat nopeampi ja herkempiä, koska raportoiva geeni voi ekspressoida suuremman määrän raportoitavaa tuotetta kuin tunnistavaa ainetta on läsnä, mikä johtaa amplifikaatiotehoon.

6. Immuunin alas-säätely

Kuten edellä kuvattiin lyhyesti, tämä keksintö antaa myös rekombinantti alfa-viruksen, jossa on vektorirakenne, joka kykenee supressoimaan yhden tai useamman elementin immuunisysteemissä kohdesoluissa, jotka on infektoitu alfa-viruksella.

Lyhyesti, spesifinen sopimattomien tai ei-haluttujen immuunivasteiden alas-säätely, kuten kroonisessa hepatiitiksessä tai heterologisten kudosten siirroksissa, kuten luuydin, voidaan manipuloida käyttämällä immuunisupressiivisiä virusgeenituotteita, jotka supressoivat siirrännäis- (MHC) antigeenin pintaekspression. Ryhmä C adenoviruksilla Ad2 ja Ad5 on 19 kd glykoproteiini (gp 19), jota koodaa E3-alueen virus. Tämä gp 19 molekyyli sitoutuu luokka I MHC-molekyyliin solulimakalvoston soluissa ja estää terminaalisen glykosylaation ja luokka I MHC:n translokaation solun pinnalle. Esimerkiksi ennen luuydinsiirtoa, luovuttajan luuydinsolut infektoidaan gp 19-koodaavilla vektorirakenteilla, jotka gp 19 ekspression jälkeen inhiboivat MHC luokka I:n siirrännäisantigeenien pintaekspression. Nämä luovuttajasolut voidaan siirtää pienen hylkimisreaktion riskillä ja saattavat vaatia minimaaliset immunosupressiiviset hoito-ohjeet siirrännäispotilaalle. Tämä saattaa sallia hyväksyttävän luovut-

taja-vastaanottaja kimeerisen tilan olemassaolon vähemmillä komplikaatioilla. Samanlaisia käsittelyjä voidaan käyttää hoitamaan niin kutsuttujen autoimmuunisairauksien aluetta, punahukka, multippeliskleroosi, nivelreuma tai krooninen hepatitis B-infektio.

Vaihtoehtoiseen menetelmään sisältyy antisenselähetin, ribozyymin tai muun spesifisen geenieksprессioinhibiittorin, joka on spesifinen T-solukloooneille, jotka ovat luonnossa autoreaktiivisiä. Nämä blokkaavat erityisten ei-haluttujen kloonien, jotka ovat vastuussa autoimmuunivasteesta, T-solureseptorin ekspression. Antisenselähettiin, ribozyymi tai muu geeni voidaan tuoda käyttämällä virusvektorijakosysteemiä.

7. Korvaus- tai kasvugeeniterapia

Tämän keksinnön eräs lisänäkökohta koskee eläimen solujen transformaatiota rekombinantti alfa-virusvektoreilla, jotka toimivat geenin siirtovälineinä toimittamaan geneettisiä sekvenssejä, jotka kykenevät ekspressoimaan terapeuttista proteiinia. Tämän keksinnön eräässä suoritusmuodossa virusvektorirakenne on suunniteltu ekspressoimaan terapeuttista proteiinia, joka kykenee estämään, inhiboimaan, stabiloimaan tai kääntämään perityn tai ei-perityn geneettisen vian metaboliassa, immuunisäätelyssä, hormonaalisessa säätelyssä, entsymaattisessa tai membraaniin liittyneessä rakenteellisessa toiminnassa. Tämä suoritusmuoto kuvailee myös mainittua virusvektoria, joka kykenee transdusoimaan yksittäiset solut, jolloin terapeuttista proteiinia kyetään ekspressoimaan systeemisesti tai paikallisesti solusta tai kudoksesta, jolloin terapeuttinen proteiini kykenee (a) korvaamaan puuttuvan tai viallisen solun proteiinin tai entsyymin tai (b) tuottamaan täydennyksen viallista vähän ekspressoituvaa solun proteiinia tai entsyymiä. Sellaisiin sairauksiin saattaa kuulua kystinen fibroosi, Parkinsonin tauti, kolestrolin liiallinen määrä veressä, adenosiinideaminaasivajaus, ß-glo-

biinihäiriöt, Hemofilia A & B, Gaucherin sairaus, sokeritauti ja leukemia.

Esimerkkinä tästä keksinnöstä, rekombinantti alfa-virus virusvektoria voidaan käyttää hoitamaan Gaucherin sairautta. Lyhyesti, Gaucherin sairaus on geneettinen häiriö, jolle on luonteenominaista entsyymin glukocerebrosidaasin puute. Tämän tyyppinen terapia on esimerkki yksittäisestä geenin korvatumisterapiasta, joka antaa toiminnallisen solun entsyymin. Tämä entsyymin puute johtaa glukocerebrosidaasin kerääntymiseen kehon kaikkien solujen lysosomeihin. Kuitenkin sairauden fenotyyppi ilmenee vain makrofaageissa, paitsi hyvin harvinaisissa sairauden hermosairausmuodoissa. Sairaus yleensä johtaa maksan ja pernan laajenemiseen ja vaurioihin luissa. (Katsausta varten katso Science 256:794, 1992 ja The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6. toim., Scriver et al.,, vol. 2, s. 1677).

8. Alfa-viruspartikkeleiden antaminen

Tämän keksinnön muissa näkökohdissa annetaan menetelmät antaa rekombinantti alfa-virusvektoreita tai -partikkeleita. Lyhyesti, virusvektorin antamisen lopullinen muoto on yleensä riippuvainen spesifisestä, käytetystä sovellutuksesta, paras tapa nostaa vektorin tehoa, ja mukavin tapa antaa. Yleensä tähän suoritusmuotoon kuuluu rekombinantti alfa-virusvektoreita, joita voidaan suunnitella jaettavaksi, esimerkiksi (1) suoralla injektiolla verenkiertoon; (2) suoralla injektiolla spesifiseen kudokseen tai kasvaimeen; (3) suun kautta tapahtuva antaminen; (4) nenään hengityksellä; (5) suora käyttö lihaskudokseen tai (6) transdusoitujen autologisten solujen ex vivo antaminen eläimeen. Täten terapeuttista alfa-virusvektoria voidaan antaa sellaisella tavalla, että vektori voidaan (a) transdusoida normaaliin terveeseen soluun ja transformoida solu terapeuttisen proteiinin tuottajaan tai aineeseen, jota eritetään systeemisesti tai paikallisesti, (b) transformoida epänormaaliin tai vialliseen soluun, transformoimalla solu normaaliin toimivaan

fenotyyppiin (c) transformoida epänormaaliin soluun siten, että se tuhoutuu ja/tai (d) transdusoida soluihin manipuloimaan immuunivastetta.

I. Transkriptiotekijäaktiivisuuden modulointi

Vielä eräässä suoritusmuodossa alfa-virusvektoreita voidaan käyttää, jotta säädellään infektoidussa solussa transkriptiotekijöiden kasvukontrolliaktiivisuutta. Lyhyesti, transkriptiotekijät vaikuttavat suoraan geeniekspression malliin sekvenssi-spesifisellä trans-aktivaatiolla tai -repressiolla (Karin, New Biologist 21:126-131, 1990). Täten ei ole yllättävää, että mutatoidut transkriptiotekijät edustavat oncogeenien perhettä. Alfa-virusgeenin siirtoterapiaa voidaan käyttää esimerkiksi palauttamaan kontrolli kasvainsoluille, joiden säätelemätön kasvu aktivoidaan oncogeenisillä transkriptiotekijöillä, ja proteiineja, jotka edistävät tai inhiboivat sitomista toimien yhdessä homo- ja hetordimeerien muodostuksessa trans-aktivoiden tai repressoiden transkriptiotekijäkomplekseja.

Eräs menetelmä kääntää solun lisääntymistä olisi inhiboida c-myc/Max heterodimeeri transkriptiotekijäkompleksin trans-aktivaatiopotentiaalia. Lyhyesti, tuman oncogeeni c-myc:ä ekspressoidaan lisäämällä soluja ja voidaan aktivoida useilla erillisillä mekanismeilla, retrovirus insertio, amplifikaatio ja kromosomaalinen translokaatio mukaanluettuina. Max-proteiinia ekspressoidaan leposoluissa ja itsenäisesti c-myc:stä, joko yksin tai yhdessä tunnistamattoman tekijän kanssa, toimii repressoimaan samojen geenien, jotka on aktivoitu myc/Max heterodimeerillä (Cole, Cell 65:715-716, 1991), ekspressiota.

Kasvainsolujen c-myc- tai c-myc/Max-lisääntymisen inhibiitio voidaan saada aikaiseksi Max:n yliekspressiolla kohdesoluissa, jota alfa-virusvektorit kontrolloivat. Max-proteiini on vain 160 aminohappoa (vastaten 480 nukleotidin RNA-pituutta) ja se liitetään helposti alfa-virusvektoriin joko itsenäi-

sesti tai yhdessä muiden geenien kanssa ja/tai antisense/ribozyymi-osien kanssa, jotka on kohdennettu tekijöille, jotka vapauttavat solun kasvukontrollin.

Homo/hetero-kompleksiliittymisen modulaatio on toinen lähestymistapa kontrolloida trasnkriptiotekijän aktivoimaa geeniekspressiota. Esimerkiksi trans-aktivoivan transkriptiotekijän NF-κB-kuljetus sytoplasmasta tumaan estetään, koska heterodimeerikompleksissa inhibiittoriproteiinin IκB:n kanssa. Sen jälkeen kun lukuisat aineet ovat indusoineet, tietyt sytokiniinit mukaanluettuina, IκB fosforyloituu ja NF-κB vapautuu ja kuljetetaan tumaan, missä se voi käyttää sen sekvenssispesifistä trans-aktivoivaa toimintaa (Baeuerle ja Baltimore, Science 242:540-546, 1988). NF-κB/IκB-kompleksin dissosiaatio voidaan estää peittämällä vasta-aineella IκB:n fosforylaatiokohta. Tämä lähestymistapa inhiboisi tehokkaasti NF-κB transkriptiotekijän trans-aktivoivan aktiivisuuden estämällä sen kuljetuksen tumaan. IκB:n fosforylaatiokohdan, spesifisen vasta-aineen tai proteiinin ekspressio kohdesoluissa voidaan saada aikaan alfa-virusgeeninsiirtovektorilla. Lähestymistapaa, joka on samanlainen kuin tässä kuvattu, voitaisiin käyttää estämään trans-aktivoivan transkriptioheterodimeerin tekijän AP-1 muodostumista (Turner ja Tijan, Science 243:1689-1694, 1989) inhiboimalla yhteenliittyminen jun- ja fos-proteiinien välillä.

J. Farmaseuttiset koostumukset

Kuten edellä on huomautettu, tämä keksintö antaa myös farmaseuttiset koostumukset, joissa on rekombinantti-Sindbis-partikkeli tai -virus tai Sindbis-vektorirakenne yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, laimentimen tai resipientin kanssa.

Lyhyesti, infektoivaa rekombinanttivirusta (edellä viitattu myös partikkeleina) voidaan säilyttää joko raaka- tai puhdistetussa muodossa. Jotta tuotetaan virus raakamuodossa, voidaan virusta tuottavia soluja ensin viljellä bioreakto-

rissa, missä viruspartikkelit vapautetaan soluista viljelyalustaan. Virus voidaan sitten säilyttää raakamuodossa ensin lisäämällä riittävä määrä formulaatiopuskuria viljelyalustaan, jossa on rekombinanttivirus, muodostamaan vesipitoisen suspension. Tietyissä edullisissa suoritusmuodoissa formulaatiopuskuri on vesipitoinen liuos, jossa on sakkaridia, suurimolekyylipainoinen rakennelisäaine ja puskuroiva komponentti vedessä. Vesipitoisessa liuoksessa voi olla myös yksi tai useampi aminohappo.

Rekombinanttivirusta voidaan myös säilyttää puhdistetussa muodossa. Tarkemmin, ennen formulaatiopuskurin lisäämistä raaka rekombinanttivirus, jota edellä on kuvattu, voidaan puhdistaa antamalla kulkea suodattimen läpi ja sitten konsentroidaan, kuten ristiinvirtauskonsertaatiosysteemillä (Filtron Technology Corp., Nortborough, Mass.). Eräässä suoritusmuodossa konsentraattiin lisätään DNaasia pilkkomaan vieras DNA. Pilkottu tuote suodatetaan kalvon läpi, jotta poistetaan ylimäärä alustakomponentteja ja aikaansaadaan rekombinanttivirus halutummassa puskuroidussa liuoksessa. Kalvosuodoksen annetaan sitten kulkea Sephadex S-500 geelipylvään läpi ja puhdistettu virus uutetaan. Riittävä määrä formulaatiopuskuria lisätään sitten tähän eluaattiin, jotta saavutetaan toivottu lopullinen ainesosien konsentraatio ja minimaalisesti laimennetaan rekombinanttivirusta. Vesipitoinen suspensio voidaan sitten varastoida, edullisesti -70°C:ssa tai kuivataan välittömästi. Kuten edellä, formulaatiopuskuri voi olla vesipitoinen liuos, jossa on sakkaridia, suurimolekyylipainoinen rakennelisäaine ja puskuroiva komponentti vedessä. Vesipitoisessa liuoksessa voi olla myös yksi tai useampi aminohappo.

Raaka rekombinanttivirus voidaan myös puhdistaa ioninvaihtopylväskromatografialla. Lyhyesti, raaka rekombinanttivirus, jota edellä on kuvattu, voidaan puhdistaa antamalla kulkea suodattimen läpi, jonka jälkeen suodos laitetaan pylvääseen, jossa on erittäin sulfonoitu selluloosamatriisi. Rekombinanttivirus voidaan sitten eluoida pylväästä puhdistetussa

muodossa käyttämällä korkeasuolapitoista puskuria ja korkeasuolapitoinen puskuri vaihdetaan halutumpaan puskuriin kuljettamalla eluaattimolekyyli ekslusiopylvään läpi. Sitten lisätään riittävä määrä formulaatiopuskuria, kuten edelölä on keskusteltu, puhdistettuun rekombinanttivirukseen ja vesipitoinen suspensio joko kuivataan välittömästi tai varastoidaan, edullisesti -70°C:ssa.

Vesipitoinen suspensio raa'assa tai puhdistetussa muodossa voidaan kuivata lyofilisaatiolla tai haihduttamalla ympäröivässä lämpötilassa. Lyhyesti, lyofilisaatioon sisältyy vesipitoisen suspension jäähdytysvaiheet lasipisteen alapuolella tai vesipitoisen suspension eutektisen pisteen lämpötilan alapuolella ja veden poistaminen jäähtyneestä suspensiosta sublimoimalla lyofilisoidun viruksen muodostumiseksi. Eräässä suoritusmuodossa formuloidun rekombinanttiviruksen erät laitetaan Edwards Refrigerated Chamber:iin (3 hyllyn RC3S-yksikkö) kiinnitettynä kylmäkuivaajaan (Supermodulto 12K). Käytetään monivaiheista kylmäkuivausmenetelmää, kuten Phillips et al., (Cryobiology 18:414, 1981) ovat kuvanneet, lyofilisoimaan formuloitu rekombinanttivirus, edullisesti lämpötiloista -40°C-45°C. Saadussa koostumuksessa on alle 10 % vettä lyofilisoidun viruksen painosta. Kun rekombinanttivirus on kerran lyofilisoitu, se on stabiili ja voidaan varastoida -20°C-25°C, kuten alla keskustellaan tarkemmin.

Haihduttavassa menetelmässä vesi poistetaan vesipitoisesta suspensiosta ympäröivässä lämpötilassa haihduttamalla. Eräässä suoristusmuodossa vesi poistetaan suihkukuivurilla (EP 520 748). Suihkukuivausmenetelmässä vesipitoinen suspensio jaetaan esilämmitetyn kaasun virtaukseen, tavallisesti ilma, minkä jälkeen vesi haihdutetaan nopeasti suspension pisaroista. Suihkukuivauslaitetta saa lukuisilta valmistajilta (esim. Drytec, Ltd, Tonbridge, Englanti; LabPlant, Ltd, Huddersfield, Englanti). Kun rekombinanttivirus on kerran dehydrattu, se on stabiili ja voidaan varastoida -20°C-25°C. Tässä kuvatuissa menetelmissä saatu kosteussisältö voidaan määrittää käyttämällä Karl-Fischer-laitetta (EM Science

Aquastar™ V1B volymetrinen titraaja, Cherry Hill, NJ) tai gravimetristä menetelmää.

Formulaatioihin käytetyt vesipitoiset liuokset, kuten edellä kuvattiin, koostuvat edullisesti sakkaridista, suurimolekyylipainoisesta rakennelisäaineesta, puskuroivasta komponentista ja vedestä. Liuoksessa voi olla myös yksi tai useampi aminohappo. Näiden komponenttien yhdistelmä toimii säilyttämään rekombinanttiviruksen aktiivisuuden jäähdytyksen ja lyofilisaation tai haihdutuskuivauksen jälkeen. Vaikka edullinen sakkaridi on laktoosi, voidaan muita sakkaridieja käyttää, kuten sakkaroosi, mannitoli, glukoosi, trehaloosi, inositoli, fruktoosi, maltoosi tai galaktoosi. Lisäksi voidaan käyttää sakkaridien yhdistelmiä, esimerkiksi laktoosi ja mannitoli tai sakkaroosi ja mannitoli. Erityisen edulliset konsentraatiot laktoosia on 3 - 4 paino-%. Sakkaridikonsentraatio on edullisesti 1-12 paino-%.

Suurimolekyylipainoinen rakennelisäaine auttaa estämään virusaggregaatiota jäähdytyksen aikana ja antaa rakenteellista tukea lyofilisoidussa tai kuivatussa tilassa. Tämän keksinnön yhteydessä rakennelisäaineiden katsotaan olevan "suurimolekyylipainoisia", jos ne ovat suurempia kuin 5000 mw. Edullinen suurimolekyylipainoinen rakennelisäaine on ihmisen seerumialbumiini. Muita aineita voidaan kuitenkin myös käyttää, kuten hydroksietyyliselluloosa, hydroksimetyyliselluloosa, dekstraani, selluloosa, gelatiini tai providoni. Erityisen edullinen konsentraatio ihmisen seerumialbumiinia on 0,1 paino-%. Edullisesti suurimolekyylipainoisen rakennelisäaineiden konsentraatio on 0,1-10 paino-%.

Aminohapot, jos läsnä, toimivat säilyttämään lisää viruksen infektiivisyyttä vesipitoisen suspension jäähdyttämisen ja sulattamisen jälkeen. Lisäksi aminohapot toimivat edelleen säilyttämään viruksen infektiivisyyttä jäähdytetyn vesipitoisen suspension sublimaation aikana ja kun lyofilisoidussa tilassa. Edullinen aminohappo on argiiniini, mutta muita aminohappoja, kuten lysiini, ornitiini, seriini, glysiini, glu-

tamiini, asparagiini, glutamiinihappo tai aspartiinihappo voidaan myös käyttää. Erityisen edullinen arginiinikonsentraatio on 0,1 paino-%. Aminohappojen konsentraatio on edullisesti alueella 0,1-10 paino-%.

Puskuroiva komponentti toimii puskuroimaan liuoksen ylläpitämällä suhteellisen vakion pH:n. Lukuisia puskureita voidaan käyttää riippuen toivotutsa pH-alueesta, edullisesti 7,0-7,8. Sopivia puskureita ovat fosfaattipuskuri ja sitraattipuskuri. Erityisen edullinen rekombinanttivirusformulaation pH on 7,4 ja edullinen puskuri on trometamiini.

Lisäksi on edullista, että vesipoisessa liuoksessa on neutraali suola, jota käytetään säätämään lopullinen, formuloitu rekombinantti alfa-virus sopivaan iso-osmoottiseen suolakonsentraatioon. Sopiviin neutraaleihin suoloihin kuuluvat natriumkloridi, kaliumkloridi tai magnesiumkloridi. Edullinen suola on natriumkloridi.

Vesipitoiset liuokset, joissa on toivotut konsentraatiot edellä kuvattuja komponentteja, voidaan valmistaa konsentroituina kantaliuoksina.

Ammattimiehille on ilmeistä, kun heille annetaan tässä annettu tieto, että voi olla edullista käyttää tiettyjä sakkarideja vesiliuoksessa, kun lyofilisoitua virusta on tarkoitus varastoida huoneenlämpötilassa. Tarkemmin, on edullista käyttää disakkarideja, kuten laktoosi tai trehaloosi, erityisesti varastoitavaksi huoneenlämpötilaan.

Kyseessä olevan keksinnön lyofilisoidut tai dehydratut virukset voidaan rakentaa uudestaan käyttämällä erilaisia aineita, mutta rakennetaan uudestaan käyttämällä vettä. Tietyissä tapauksissa laimeita suolaliuoksia, jotka saattavat lopullisen formulaation isotoniseksi, voidaan myös käyttää. Lisäksi voi olla edullista käyttää vesipitoisia liuoksia, joissa on komponentit, joiden tiedetään lisäävän uudelleen rakennetun viruksen aktiivisuutta. Sellaisiin komponenttei-

hin kuuluvat sytokiniinit, kuten IL-2, polykationit, kuten protamiinisulfaatti, tai muita komponentteja, jotka lisäävät uudelleen rakennetun viruksen transduusiotehokkuutta. Lyofilisoitu tai dehydrattu rekombinanttivirus voidaan rakentaa uudelleen millä tahansa sopivalla tilavuudella vettä tai uudelleenrakennusainetta, kuten edellä huomautettiin, jotka sallivat olennaisen ja edullisesti täydellisen lyofilisoidun tai dehydratun näytteen liukenemisen.

Seuraavat esimerkit annetaan valaisun vuoksi eikä rajoittamaan.

Esimerkit

Esimerkki 1

Sindbis genomisen pituisen cDNA:n kloonaus

Virusten, joilla on RNA-genomi, joiden polaarisuus on positiivinen, luonne on sellainen, että kun viedään eukaryoottiseen soluun, joka toimii permissiivisenä isäntänä, puhdistettu genominen nukleiinihappo toimii toiminnallisena lähetti RNA- (mRNA) molekyylinä. Täten tämä genominen RNA, puhdistettu viruksesta, voi aloittaa saman infektiosyklin, joka on luonteenominaista villityypin viruksen, josta RNA eristettiin, infektiolle.

Sindbis-viruskantaa Ar-399 (ATCC #VR-1248, Taylor et al., Am. J. Trp. Med. Hyg. 4:844, 1955), joka on eristetty sääskestä Culexus univittatus, lisätään hamsterin poikasen munuaissoluissa (BHK), infektoitu pienellä määrällä (0,1 PFU/solu). Vaihtoehtoisesti, Sindbis-viruskantaa hr (Lee Biomolecular, San Diego, CA) voidaan käyttää ja lisätä samoilla menetelmillä. Sindbis-virionit saostetaan kirkastetusta lysaatista 48 h infektion jälkeen 10 % (w/v) polyetyleeniglykolilla (PEG-8000) 0°C:ssa, kuten edellä on kuvattu. Sindbis-virionit, jotka ovat PEG-pelletissä, lyysataan 2 %:lla SDS:llä ja polyadenyloitu mRNA eristetään kromatografialla käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevia oligo dT-pylväitä (Invitrogen). Suoritetaan kaksi kierrosta ensimmäisen juos-

teen cDNA-synteesiä polyA:lla valitulla mRNA:lla käyttämällä oligonukleotidialuketta, jolla on alla osoitettu sekvenssi:

5'-TATATTCTAGA$(dT)_{25}$-GAAATG-3' (SEQ.ID Nro 2)

Alukkeessa on sen 5'-päässä viisi nukleotidi "puskurisekvenssiä" tehokasta restriktioendonukleaasipilkkomista varten, jonka jälkeen on Xba I tunnistussekvenssi, 25 peräkkäin olevaa olevaa dT-nukleotidiä ja kuusi nukleotidiä, jotka ovat täsmälleen komplementaarisia äärimmäisen Sindbis 3'-pään kanssa. Täten valinnassa ensimmäiselle kierrokselle cDNA-synteesissä on kaksi tasoa: (1) polyadenyloidut molekyylit, edellytyksenä toimivalle mRNA:lle ja (2) selektiivinen alukkeen käyttö Sindbis mRNA-molekyyleistä sekoituksessa, jossa on moninaisia mRNA-lajeja. Lisäksi käänteistranskriptaasi suoritetaan 10 mM MeHgOH:n läsnäollessa, jotta lievitetään keinotekoisia pysähdyksiä käänteistranskriptaasin aikana.

Primäärinen genominen pituus Sindbis cDNA:ta amplifioidaan PCR:llä kuudessa erillisessä segmentissä käyttämällä kuutta paria päällekkäin menevää aluketta. Komplementaarisien virussekvenssien lisäksi Sindbis 5'-pään etummaisessa alukkeessa on 19 nukleotidisekvenssiä, jotka vastaavat bakteerin SP6 RNA polymeraasipromoottoria, ja Apa I restriktioendonukleaasitunnistussekvenssi liittyneenä sen 5'-päähän. Apa I tunnistussekvenssiä edeltää viiden nukelotidin "puskurisekvenssi" tehokasta pilkkomista varten. Bakteerin SP6 RNA polymeraasi on tasapainotettu siten, että transkriptio in vitro johtaa vain yhden ainoan ei-virus G-ribonukleotidin sisällyttämisen A ribonukleotidiin, joka vastaa autenttista Sindbis 5'-päätä. Apa I tunnistussekvenssin sisällyttäminen helpottaa PCR-amplifikaation insertiota plasmidivektoriin (pKS II^+, Stratagene) polylinkkerisekvenssiin. Sindbis SP5-5'-eteenpäin olevan alukkeen sekvenssi ja kaikki alukeparit, jotka ovat tarpeellisia koko Sindbis-genomille, on osoitettu alla. Viitesekvenssi (GenBank tulonro SINCG) on Strauss et al., Virology 133:92-110.

Aluke	Sijainti	Seq ID Nro	Sekvenssi	Tunnistus Sekvenssi(5'>3')
SP6-1A	ApaI/SP6/+ SIN nts.1-18	3	TATATGGGCCCGATTTAGGTGAC ACTATAGATTGACGGCGTAGTAC AC	Apa I
1B	3182-3160	4	CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC	Age I
2A	3144-3164	5	ATACTAGCCACGGCCGGTATC	Age I
2B	5905-5885	6	TCCTCTTTCGACGTGTCGAGC	Eco RI
3A	5844-5864	7	ACCTTGGAGCGCAATGTCCTG	Eco RI
7349R	7349-7328	8	CCTTTTCAGGGGATCCGCCAC	Bam HI
7328F	7328-7349	9	GTGGCGGATCCCCTGAAAAGG	Bam HI
3B	9385-9366	10	TGGGCCGTGTGGTCGTCATG	Bcl I
4A	9336-9356	11	TGGGTCTTCAACTCACCGGAC	Bcl I
10394R	10394-10372	12	CAATTCGACGTACGCCTCACTC	Bsi WI
10373F	10373-10394	13	GAGTGAGGCGTACGTCGAATTG	Bsi WI
4B	XbaI/dT_{25}/ 11703-11698		TATATTCTAGA$(dT)_{25}$-GAAATG	Xba I

Sindbis cDNA:n PCR-amplifikaatio kuuden, edellä nähdyn alukesarjan kanssa suoritetaan erillisissä reaktioissa käyttämällä Thermalase termostabiilia DNA-polymeraasia (Amresco Inc. Solon, Ohio) ja puskurissa, jossa on 1,5 mM $MgCl_2$, jota toimittaja tarjoaa. Lisäksi reaktioissa on 5 % DMSO:ta ja Hot Start Wax helmiä (Perkin-Elmer) käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,5	
72	10	10

Amplifikaation jälkeen insertoidaan kuusi reaktiotuotetta ensimmäiseksi pCR II-vektoriin (Invitrogen), sitten käyttämällä edellä nähtyjä sopivia entsyymejä insertoidaan vaiheittain pKS II$^+$- (Stratagene) vektoriin Apa I- ja Xba I-kohtien väliin. Tätä kloonia merkitään pVGSP6GEN.

Sindbis genominen cDNA-klooni pVGSP6GEN linearisoidaan pilkkomalla Xba I:llä, joka katkaisee pVGSP6GEN:n kerran, välittömästi vierestä ja myötävirtaan 25 nukleotidiä pitkää dA:dT-venymää. Linearisoitu pVGSP6GEN-klooni puhdistetaan Gene Clean (BIO 101, La Jolla, CA) ja säädetään 0,5 mg/ml konsentraatioon. Linearisoidun pVGSP6GEN-kloonin transkriptio suoritetaan in vitro 40°C:ssa 90 min seuraavien reaktio-olosuhteiden mukaan: 2 ml DNA/4,25 ml H_2O/10 ml 2,5 mM NTPs(UTP, ATP, GTP, CTP)/(1,25 ml 20 mM m^7 G(5')ppp(5') G aukkoanalogi/(1,25 ml 100 mM DTT/5 ml 5X transkriptiopuskuri (Promega)/0,5 ml RNasin (Promega)/0,25 ml 10 mg/ml vasikan seerumialbumiini/(0,5 ml SP6 RNA polymeraasi (Promega). In vitro transkriptioreaktiotuotteet voidaan pilkkoa DNasi I:llä (Promega) ja puhdistaa perättäisellä fenoli/$CHCl_3$- ja eetteriuutolla, jonka jälkeen etanolisaostus tai vaihtoehtoisesti voidaan käyttää suoraan transfektioon. In vitro transkriptioreaktiotuotteet tai puhdistettu RNA kompleksoidaan kaupallisen kationisen lipidiyhdisteen kanssa (Lipofectin, GIBCO-BRL; Gaithersburg, MD) ja laitetaan hamsterin poikasen munuais-21- (BHK-21) soluille, joita on pidetty 60 mM petrimaljalla 75 % konfluenssissa. Transfektoituja soluja inkuboidaan 30°C:ssa. 94 h transfektion jälkeen havaitaan laajoja sytopatologisia vaikutuksia (CPE). Mitään silmiinpistävää CPE:tä ei havaita maljoilla, jotka eivät saa RNA:ta, joka on transkriptoitu Sindbis cDNA-kloonista. Lisäksi 1 ml superna-

tanttia, joka on otettu transfektoiduista soluista, lisätty tuoreeseen yksinkertaiseen kerrokseen BHK-21-soluja ja inkuboitu 30°C:ssa tai 37°C:ssä, johtaa silmiinpistävään CPE:hen 17 h:ssa. Tämä osoittaa, että Sindbis cDNA-klooni pVGSP6GEN on todellakin infektiivinen.

pVGSP6GEN:n sekvenssianalyysi, esitetty taulukossa 1, paljastaa moninkertaisia sekvenssieroja tässä kuvatun Sindbis genomisen kloonin ja virusklooninin, joka on Genbank:ssa, välillä. Monet sekvenssierot johtavat ei-säilyneiden aminohappomuutosten substituutioihin Sindbis-proteiineissa. Jotta osoitetaan, mitkä sekvenssimuutokset ovat ainutlaatuisia tässä kuvatulle kloonille tai ovat kloonaustekotuotteen tulos, virion RNA amplifioidaan RT-PCR:llä, kuten edellä kuvattiin ja sekvenssi, joka muistuttaa kyseessä olevia nukleotidejä, määritetään suoralla RT-PCR-amplikonituotteen sekvenssoinnilla käyttämällä saatavilla olevaa kittiä (Promega, Madison WI) ja verrataan vastaavaan pVGSP6GEN-sekvenssiin. Tämän tutkimuksen tulokset on annettu taulukossa 2. Lyhyesti, kolme ei-säilynyttä aminohappomuutosta, Gly->Glu, Asp->Gly ja Tyr->Cys, jotka ovat kloonaustekotuotteen tulos, havaitaan vastaavasti viruksen nukleotideissä 2245, 6193 ja 6730. Nämä nukleotidimuutokset, jotka johtavat ei-säilyneisiin aminohappomuutoksiin, kartoittuvat kaikki viruksen eirakenneproteiinigeeniin (NSP), nt2245-NSP2 ja nt6193-NSP4.

NSP 2- ja NSP 4-geenien korjaus saadaan aikaan RT-PCR:llä, kuten edellä on kuvattu, käyttämällä virion RNA:ta 5 kertaa plakkipuhdistetusta kannasta. SP6-1A/1B alukepari, jota edellä kuvattiin, on käytetty korjaamaan nt 2245-muutos. RT-PCR amplikonituote pilkotaan Eco 47III:llä ja Bgl II:llä ja 882 bp fragmentti puhdistetaan 1 %:lla agaroosi/TBE geelielektroforeesilla ja vaihdetaan vastaavaan pGSP6GEN-kloonin alueeseen, joka on valmistettu pilkkomalla Eco 47III:llä ja Bgl II:llä ja käsitellään CIAP:lla. Edellä kuvattua 3A/7349R alukeparia käytetään korjaamaan nt 6193- ja nt 6730-muutokset. RT-PCR-amplikonituote pilkotaan Eco RI:lla ja Hpa I:llä ja 1 050 bp fragmentti puhdistetaan 1 %:lla agaroosi/TBE

geelielektroforeesilla ja vaihdetaan vastaavaan pGSP6GEN-kloonin alueeseen. Tämä klooni tunnetaan pGSP6GENrep:nä. BHK-solujen transfektio in vitro transkriptoidulla RNA:lla pGSP6GENrep DNA:sta, joka on linearsoitu pilkkomalla Xba I:llä, kuten edellä on kuvattu, johtaa laajaan CPE:hen 18 h jälkitransfektioon.

Taulukko 1

Sindbis genomisen kloonin erot Viagene ja GenBank sekvenssien välillä

SINnt.#	Muutos	Kodonimuutos	Sijainti kodonissa	Aminohappomuutos
Ei-koodaava alue:				
45	T->C	N.A.	N.A.	N.A.
Ei-rakenne-proteiinit:				
353	C->T	UAU->UAC	3'	Tyr->Tyr
1095	A->C	AUA->CUA	1'	Ile->Leu
1412	T->C	UUU->UUC	3'	Phe->Phe
2032	A->G	GAG->GGG	2'	Glu->Gly
2245	G->A	GGG->GAG	2'	Gly->Glu
2258	A->C	UCA->UCC	3'	Ser->Ser
2873	A->G	CAA->CAG	3'	Gln->Gln
2992	C->T	CCC->CUC	2'	Pro->Leu
3544	T->C	GUC->GCC	2	Val->Ala
3579	A->G	AAA->GAA	1'	Lys->Glu
3822	A->G	ACC->GCC	1'	Thr->Ala
3851	T->C	CUU->CUC	3'	Leu->Leu
5351	A->T	CAA->CAU	3'	Gln->His
5466	G->A	GGU->AGU	1'	Gly->Ser
5495	T->C	AUU->AUC	3'	Ile->Ile
5543	A->T	ACA->ACU	3'	Thr->Thr
5614	T->C	GUA->GCA	2'	Val->Ala
6193	A->G	GAC->GGC	2'	Asp->Gly
6564	G->A	GCA->ACA	1'	Ala->Thr
6730	A->G	UAC->UGC	2'	Tyr->Cys

Rakenneproteiinit:

8637	A->G	AUU->GUU	1'	Ile->Val
8698	T->A	GUA->GAA	2'	Val->Glu
9108	AAG del	AAG->del	1'-3'	Glu->del
9144	A->G	AGA->GGA	1'	Arg->Gly
9420	A->G	AGU->GGU	1'	Ser->Gly
9983	T->G	GCU->GCG	3'	Ala->Ala
10469	T->A	AUU->AUA	3'	Ile->Ile
10664	T->C	UUU->UUC	3'	Phe->Phe
10773	T->G	UCA->GCA	1'	Ser->Ala

Taulukko 2

Sindbis genomisen kloonin artefakti-analyysi

SINnt.#	Aminohappo-muutos	Viagene ainutlaatuinen	Kloonaus-artefakti
Ei-rakenneproteiinit:			
2032	Glu->Gly	+*	
2245	Gly->Glu		+
2258	Ser->Ser	+*	
2873	Gln->Gln	+	
2992	Pro->Leu	+	
3544	Val->Ala		+
3579	Lys->Glu	+	
3822	Thr->Ala		+
3851	Leu->Leu		+
5351	Gln->His	+	
5466	Gly->Ser		+
5495	Ile->Ile		+
5543	Thr->Thr		+
6193	Asp->Gly		+
6730	Tyr->Cys		+

Rakenneproteiinit:

8637	Ile->Val	+
8698	Val->Glu	+
9108	Glu->del	+
9144	Arg->Gly	+

*Seos: Sekä Genbank että Viagene Sindbis-kantoja tässä nukleotidissä.

Esimerkki 2

Plasmidi DNA-vektoreiden luominen, jotka aloittavat Sindbis-infektion

Täysipitkän genomisen Sindbis-kloonin koon takia täysipitkien molekyylien in vitro transkriptio on melko tehotonta. Tämä johtaa alentuneeseen transfektiotehokkuuteen, viruksen infektiivisien keskusten nimissä, mitattuna plakin muodostuksella, suhteessa in vitro transkripoidun RNA:n transfektoituun määrään. Tämä asia on myös merkityksellinen Sindbis ekspressiovektoreiden in vitro transkriptiossa. Ehdokas cDNA-kloonien ja muiden Sindbis cDNA ekspressiovektoreiden kyvyn aloittaa infektiivinen sykli tai ohjata heterologisen sekvenssin ekspressiota, testausta helpottaisi suuresti, jos cDNA-klooni transfektoitaisiin alttiisiin soluihin DNA-molekyylinä, joka sitten ohjaa virus RNA:n synteesiä in vivo. On raportoitu niin korkeita transfektiotehokkuuksia kuin 100 % soluissa, jotka on transfektoitu DNA:lla, joka on kompleksoitu erilaisten kaupallisten synteettisten lipidivalmisteiden kanssa tai elektroporaatiolla. On myös osoitettu, että picornavirusten cDNA kykenee aloittamaan infektiivisen syklin, kun transfektoidaan alttiisiin soluihin (van der Werf et al., PNAS 83:2330-2334, 1986). Kirjallisuudessa ei kuitenkaan ole kuvattu, jos genominen Sindbis cDNA, kun laitetaan proximaalisesti nisäkäspromoottoriin ja transfektoidaan

soluihin, tuottaa RNA:ta, joka kykenee aloittamaan infektiivisen syklin, joka on luonteenominaista villityypin virukselle.

Tiedetään hyvin, että DNA-molekyylit, joilla on sopivat signaalit, voivat replikoida in vivo, kun viedään suoraan eläimiin (Dubensky et al., PNAS 81:7429-7533, 1984). Sindbis cDNA-vektorien antaminen suoraan DNA-molekyyleinä on toteutettavissa oleva joissakin sovellutuksissa, joissa Sindbis:n ohjaamalla lievittävien aineiden ekspressiolla on trans-vaikutus. Näihin sovellutuksiin kuuluvat immunomodulaatio ja sytokiniinien tai muiden terapeuttisten proteiinien ekspressio. Sindbis:n puitteissa Sindbis cDNA-ekspressiovektorien antaminen suoraan tarjoaa hyödyn, joka on yksinkertaisempi kuin Sindbis-partikkeleiden luominen.

Sindbis cDNA-vektorirakenteet, joissa on heterologinen terapeuttinen lievittävä sekvenssi, insertoidaan eukaryoottiseen RNA polymeraasi II ekspressiokasettiin. Tämä rakenne tunnetaan Eukaryotic Layered Vector Initiation System (ELVIS) ja siihen sisältyy seuraavat järjestetyt elementit: 5′ eukaryoottinen promoottori, joka kykenee aloittamaan virus RNA-synteesin autenttisessa Sindbis 5′-päässä, 5′-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan Sindbis-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa Sindbis ei-rakenneproteiineja, viruksen liitosalue, heterologinen sekvenssi, Sindbis RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi, transkription lopetussekvenssi ja 3′-polyadenylaatiosignaali. Tässä kuvatussa eukaryoottisessa Sindbis cDNA-ekspressiovektorissa voi olla myös sopivat silmukointisignaalit sijoitettuna, esimerkiksi Sindbis:n ja heterologisten geenialueiden väliin.

Sindbis cDNA-kooonin pVGSP6GENrep kyky aloittaa villityypin virukselle luonteenominainen infektiivinen sykli, määritetään ensin laittamalla genominen virus cDNA nisäkkään RNA polymeraasi II ekspressiokasettiin. Tämä rakenne saadaan aikaan kuten seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisesti. Klooni pVGSP6GENrep pilkotaan Bgl II:lla ja Xba I:llä, reak-

tiotuotteet elektroforesoidaan 0,8 % agaroosi/TBE-geelissä ja tuloksena oleva 9438 bp fragmentti leikataan pois, puhdistetaan Gene Clean:llä (BIO 101, Vista, CA) ja ligoidaan 4475 bp vektorifragmenttiin, joka on tuloksena pcDNA3:n käsittelystä (Invitrogen, San Diego, CA) Bgl II:lla, Xba I:llä ja CIAP:lla. Tämä rakenne tunnetaan pcDNASINbgl/xba:na.

Pitkä toistuva pää (LTR) Moloney hiiren leukemiaviruksesta (Mo-MLV) asetetaan 5'-viruspäähän siten, että ensimmäinen transkriptoitu nukleotidi on yksittäinen G-jäännös, joka aukotetaan in vivo, jonka jälkeen Sindbis 5'-pää. Tiedetään että in vitro transkriptoidut RNA:t, joissa on kolme ei-virus nukleotidiä niiden 5'-päässä, ovat infektiivisiä (Rice et al., J. Virol. 61:3809-3819, 1987). Mo-MLV LTR:n ja Sindbis 5'-pään rinnakkain asettaminen saadaan aikaan päällekkäisellä PCR:lla, kuten seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisesti. Mo-MLV LTR:n amplifikaatio ensimmäisessä primäärisessä PCR-reaktiossa saadaan aikaan reaktiossa, jossa on BAG-vektori (Price et al., PNAS 84:156-160, 1987) ja seuraava alukepari:

<u>Eteenpäin oleva aluke: BAGBgl2F1 (puskurisekvenssi/Bgl II tunnistussekvenssi/Mo-MLV LTR nt 1-22):</u>

5'- TATATAGATCTAATGAAAGACCCCACCTGTAGG

<u>Käänteisaluke: BAGwt441R2 (SIN nt 5-1/Mo-MLV LTR nt 441-406):</u>

5'-TCAATCCCCGAGTGAGGGGTTGTGGGCTCTTTTATTGAGC

Mo-MLV LTR:n PCR-amplifikaatio alukeparin kanssa, esitetty edellä, suoritetaan käyttämällä Thermalase termostabiilia DNA-polymeraasia (Amresco Inc. Solon, Ohio) ja puskurissa, jossa on 1,5 mM $MgCl_2$, jota toimittaja tarjoaa. Lisäksi reaktioissa on 5 % DMSO:ta ja Hot Start Wax helmiä (Perkin-El-

mer) käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	0,5	
72	10	1

Sindbis 5'-pään amplifikaatio toisessa primäärisessä PCR-reaktiossa saadaan aikaan reaktiossa, jossa on pVGSP6GENrep-klooni ja seuraava alukepari:

Eteenpäin oleva aluke: (Mo-MLV LTR nt 421-441/SIN nt 1-16:

5'- CCACAACCCCTCACTCGGGGATTGACGGCGTAGTAC

Käänteisaluke: (SIN nt 3182-3160):

5'-CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC

Mo-MLV LTR:n PCR-amplifikaatio on alukeparin kanssa ja amplifikaatioreaktion olosuhteet, kuten edellä osoitettu ja käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

457 bp ja 3202 bp tuotteet primäärisistä PCR-reaktioista puhdistetaan Gene Clean:llä ja käytetään yhdessä PCR-reaktiossa seuraavan alukeparin kanssa:

Eteenpäin oleva aluke: BAGBgl2F1 (puskurisekvenssi/Bgl II tunnistussekvenssi/Mo-MLV LTR nt 1-22):

5'- TATATAGATCTAATGAAAGACCCCACCTGTAGG

Käänteisaluke: (SIN nt 2300-2278):

5'-GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG

Alukkeen PCR-amplifikonituotteiden PCR-amplifikaatio on alukeparin kanssa ja amplifikaatioreaktion olosuhteet, kuten edellä osoitettu ja käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

Ensimmäisen primäärisen PCR-amplikonituotteen 25 3'-terminaalista emästä menee päällekkäin toisen primäärisen PCR-amplikonituotteen 25 5'-terminaalisen emäksen kanssa; tuloksena oleva 2752 bp päällekkäin menevä sekundäärinen PCR-amplikonituote puhdistetaan 0,8 % agaroosi/TBE-elektroforeesilla, pilkotaan Bgl II:lla ja 2734 bp tuote ligoidaan pcDNA-SINbgl/xba:han, jota on käsitelty Bgl II:llä ja CIAP:lla. Tuloksena oleva rakenne on 16 656 bp ja tunnetaan pVGELVIS:nä. pVGELVIS:n sekvenssi annetaan kuviossa 3. Sindbis nukleotidejä on sekvenssin emäksissä 1-11700.

pVGELVIS-plasmidi DNA on kompleksoitu Lipofectaminen kanssa (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) toimittajan ehdottamien olosuhteiden mukaisesti (noin 5 µg DNA/8 mg lipidireagenssia) ja lisätään 35 mm kaivoihin, joissa on BHK-21-soluja noin 75 % konfluenssilla. Sytopaattisia vaikutuksia (CPE), jotka

ovat luonteenominaisia villityypin Sindbis-virus-infektiolle, havaitaan 48 h infektion jälkeen. 1 ml lisääminen transfektiosupernatanttia tuoreisiin BHK-21 yksikerroksisiin kerroksiin tuottaa CPE:n 16 h:ssa. Nämä tiedot osoittavat virus cDNA:n ja RNA polymeraasi II ekspressiokasettisignaalien oikean rinnakkain asettamisen pVGELVIS-rakenteessa johtaen RNA-viruksen de novo aloitukseen DNA ekspressiomodulista. Tämä innovaatio ei vain lisää Sindbis-systeemin hyödyllisyyttä yleensä, mutta antaa myös toisen menetelmän fysikaaliselle geeninsiirtovektorille.

Vektorireplikaation tehokkuutta genomin pituisen RNA:n ensimmäisen, pVGELVIS:ltä tapahtuvan transkription jälkeen lisää myös modifikaatiot, jotka johtavat autenttisempaan 3'-päähän. Tätä tarkoitusta varten tehdääm kaksi erilaista modifikaatiota ELVIS-vektorirakenteelle. Ensimmäinen käyttää antigenomista hepatitis delta-viruksen (HDV) ribozyymisekvenssiä, joka on Sindbis polyadenylaatioalueen vieressä. Toiseen sisältyy Sindbis polyadenylaatioalueen deleetio ja myötävirran vektorisekvenssit johtaen Sindbis-nukleotidin 11 700 fuusioon vasikan kasvuhormonigeenin transkription lopetus/polyadenylaatiosekvenssiin.

HDV ribozyymiä sisältävä rakenne luodaan käyttämällä PCR-tekniikoita ja päällekkäinmeneviä oligonukleotidialukkeita, joissa on koko 84 nukleotidin antigenominen ribozyymisekvenssi (Perotta ja Been, Nature 350:434-6, 1991). HDV-sekvenssin lisäksi kahdella alukkeella on vierekkäin olevat restriktioentsyymikohdat tarkoituksiin insertoida ELVIS-vektoriin. Suoritetaan kaksi kierrosta PCR:ää: ensimmäiseksi käyttämällä oligonukleotidialukkeita HDV49-XC ja HDV17-68 (esitetty alla).

HDV17-68:

5'-TCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCCACT-3'
(SEQ.ID.Nro.)

HDV49-XC:

5'-**ACTTATCGATGGTTCTAGA**CTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCCTCCT-TC-3' (SEQ.ID.Nro.)

jonka jälkeen laimennetaan ensimmäinen pCR-reaktio ja sen jälkeen käytetään mallisäikeenä PCR:n toiselal kierroksella alukkeiden HDV49-XC:n (ensimmäisestä reaktiosta) ja HDVX-36 (katso alla) kanssa.

HDVX-36:
5'-ACGTCTAGATCTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGA-3'
(SEQ.ID.Nro.)

Synteesin jälkeen HDV-ribozyymifragmentti pilkotaan Xba I:llä, mikä pilkkoo reunustavissa sekvensseissä (tummennettu) ja ligoidaan ELVIS-vektori-DNA:han, joka on osittain pilkottu Xba I:llä pilkkomaan vain toisen sen kahdesta kohdasta. Insertion seulonta oikeaan kohtaan ja oikea aseman määritys suoritetaan restriktiokohdalla ja sekvenssianalyysillä. Tämä rakenne tunnetaan pVGELVISHDV:nä

Toisessa menetelmässä Sindbis-nukleotidin 11 700 fuusio vasikan kasvuhormonigeenin transkription lopetus/polyadenylaatiosekvenssiin Sindbis polyadenylaatioalueen deleetiolla ja myötävirran vektorisekvenssillä pVGELVIS saadaan aikaan päällekkäinmenevällä PCR:llä. Sindbis 3'-pään amplifikaatio ensimmäisessä primäärisessä PCR-reaktiossa saadaan aikaan reaktiossa, jossa on pVGELVIS ja seuraava alukepari:

<u>Eteenpäin oleva aluke: SIN10349F (SIN nt 10394-10372):</u>

5'- GACAGTGAGAACAGCCAGATGAG
(SEQ.ID.Nro.)

<u>Käänteisaluke: (SINBGH11700R (BGH nt13-1/SIN nt 11700-116-75):</u>

5'-CAGCGAGCTCTAGGAAATGTTAAAAACAAAATTTTGTTG
(SEQ.ID.Nro.)

pVGELVIS:n PCR-amplifikaatio alukeparin kanssa, esitetty edellä, suoritetaan käyttämällä Thermalase termostabiilia DNA-polymeraasia (Amresco Inc. Solon, Ohio) ja puskurissa, jossa on 1,5 mM $MgCl_2$, jota toimittaja tarjoaa. Lisäksi reaktioissa on 5 % DMSO:ta ja Hot Start Wax helmiä (Perkin-Elmer) käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	1,5	
72	10	1

BHG-geenin transkription terminaatio/polyadenylaatiosekvenssin amplifikaatio toiseen primääriseen PCR-reaktioon saadaan aikaan reaktiolla, jossa on pVGELVIS-klooni ja seuraava alukepari:

Eteenpäin oleva aluke: pCSIN1018F (SIN nt 11687-11700/PCDNA3 nt 1018-1039):

5'- CCACAACCCCTCACTCGGGGATTGACGGCGTAGTAC
(SEQ.ID.Nro.)

Käänteisaluke: pCDNA1633R (pCDNA 3 nt 1633-1608):
5'-GTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCAC
(SEQ.ID.Nro.)

BGH-geenin 5'-pään PCR-amplifikaatio on alukeparin kanssa ja amplifikaatioreaktion olosuhteet, kuten edellä osoitettu ja käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	

55	0,5	35
72	1,0	
72	10	1

1364 bp ja 629 bp tuotteet primäärisistä PCR-reaktioista puhdistetaan Gene Clean:llä ja käytetään yhdessä PCR-reaktiossa seuraavan alukeparin kanssa:

Eteenpäin oleva aluke: SIND310374F (5 nt puskuri/Hind III tunnistuskohta/SIN nt 10374-10394):

5'- TATATAAGCTTGAGGCGTACGTCGAATTGTCAG
SEQ.ID.Nro)

Käänteisaluke: pCDNA1575R (pCDNA 3 nts 1575-1552):

5'-GAAAAACCGTCTATCAGGGCGATG
(SEQ.ID.Nro)

Alukkeen PCR-amplifikonituotteiden PCR-amplifikaatio on alukeparin kanssa ja amplifikaatioreaktion olosuhteet, kuten edellä osoitettu ja käyttämällä alla esitettyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	2,0	
72	10	1

Ensimmäisen primäärisen PCR-amplikonituotteen 27 3'-terminaalista emästä menee päällekkäin toisen primäärisen PCR-amplikonituotteen 27 5'-terminaalisen emäksen kanssa; tuloksena oleva 1976 bp päällekkäin menevä sekundäärinen PCR-amplikonituote puhdistetaan 0,8 % agaroosi/TBE-elektroforeesilla, pilkotaan Hind III:lla ja Dra III:lla ja 1941 bp tuote ligoidaan pcDNA3:een, joka on pilkottu Hind III:lla ja Dra III:lla, jota on käsitelty CIAP:lla. Tämä rakenne tunnetaan

pCDNAELVIS3':na. pCDNAELVIS3'-rakenne pilkotaan Bsi WI:llä ja Pvu I:llä ja tuloksena oleva 5197 bp fragmentti puhdistetaan 0,8 % agaroosi/TBE-elektroforeesilla, ligoidaan 11 398 bp fragmentin kanssa, joka on eristetty pilkkomalla pVGELVIS Bsi WI:llä ja Pvu I:llä ja käsittely CIAP:lla, jonka jälkeen 0,8 % agaroosi/TBE-elektroforeesi ja Gene Clean. Tuloksena oleva rakenne on 16 595 bp ja tunnetaan pVGELVISdl3':na.

Jotta testataan pVGELVISHDV- ja pVGELVISdl3'-plasmidien kyky aloittaa villityypin Sindbis-virukselle luonteenominaista infektioita, DNA-kloonit on kompleksoitu Lipofectaminen kanssa (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) toimittajan ehdottamien olosuhteiden mukaisesti (noin 5 µg DNA/8 mg lipidireagenssia) ja lisätään 35 mm kaivoihin, joissa on BHK-21-soluja noin 75 % konfluenssilla. Jos CPE havaitaan tällä menetelmällä, voidaan käyttää 1 ml transfektiosupernatanttia infektoimaan tuoreet BHK-21 yksikerroksiset kerrokset tai vaihtoehtoisesti Sindbis-viruksen taso voidaan määrittää suoraan supernatanteista plakkimäärityksellä.

Muissa sovellutuksissa on toivottavaa asettaa CMV-promoottori, joka on pCDNA3-plasmidissa Sindbis-genomisen cDNA:n vieressä, siten että transkription aloitus in vivo vastaa autenttista 5-pää virusnukleotidiä. CMV promoottorin aloituskohta plasmidilla pcDNA3 määritetään kartoittamalla transkription aloituskohta in vitro. Tämä saadaan aikaan ensin pilkkomalla pcDNA3-plasmidi Dra III restriktioendonukleaasilla (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) valmistajan ohjeiden mukaan. Dra III pilkkoo plasmidin kerran nukleotidistä 1546 johtaen lineaariseen 5446 emäsparin DNA-molekyyliin. DNA puhdistetaan käyttämällä Geneclean II kittiä (BIO 101, San Diego, CA) täsmälleen, kuten ohjeissa on esitetty. Linearisoitu pcDNA3 transkriptoidaan HeLa Nuclear Extract in vitro Transcription System (Promega Corp., Madison, WI) reaktiossa, jossa on 3 µg linearisoitua pcDNA3:a, 400 µM kutakin ribonukleiinihappoa 3 mM $MgCl_2$ ja 8 yksikköä HeLa-solutumauutetta. 25 µl reaktiota inkuboidaan 1 h 35°C:ssa. 1 yksikkö RQ1 DNasia (Promega Corp., Madison, WI) ja 40 yksikköä

RNasia (Promega Corp., Madison, WI) lisätään reaktioon ja inkuboidaan 37°C:ssa 30 min eliminoimaan DNA mallisäie. Reaktio lopetetaan lisäämällä 175 µl Stop Mix (toimitetaan HeLa-uutteen kanssa). Reaktio uutetaan yhtä suurella tilavuudella fenoliklooriformisoarnyylialkoholilla (25:24:1), jonka jälkeen uutetaan kloroformisoarnyylialkoholilla (24:1). Reaktio saostetaan 500 µl absoluuttista etanolia. RNA pelletoidaan sentrifugoimalla 12 000 x G 15 min. Pelletti huuhdellaan 80 % etanolilla ja suspendoidaan uudestaan 20 µl:aan vettä.

Aluke, joka on komplementaarinen SP6-promoottorin kanssa (ATTTAGGTGACACTATAG, BRL Corp., Bethesda, MD) leimataan 5'-päähän ^{32}P:llä sekoittamalla 10 pmol aluketta kaksinkertaisella ylimäärällä gamma ^{32}P ATP:tä (INC Corp. Irvine, CA), 10 yksikköä T4 polynukleotidikinaasia (Promega Corp., Madison, WI) ja 1X kinaasipuskuria (toimitetaan T4 kinaasin kanssa). Reaktiota inkuboidaan 30 min 37°:ssa, sitten 5 min 95°C:ssa.

In vitro transkriptoitu RNA hybridisoidaan leimattuun alukkeeseen sekoittamalla 10 µl RNA:ta 1,5 pmol kanssa aluketta. Seosta kuumennetaan 90°C:een ja annetaan jäähtyä hitaasti. Seos tuodaan 50 mM Tris-HCl:iin, pH 8,3, 10 mM $MgCl_2$:iin, 50 mM NaCl:ään, 1 mM DTT:hen, 40 µM jokaista dNTP:tä ja 15 yksikköä AMV käänteistranskriptaasia (USB Corp., Cleveland, OH). Reaktioseosta inkuboidaan 42°C:ssa 30 min. Reaktio lopetetaan lisäämällä yksi kolmannes tilavuutta 95 % formamidia, 20 mM EDTA:ta, 0,05 % bromofenolisineä ja 0,05 % ksyleenisyanoli FF:ää.

pcDNA3 palsmidi sekvenssoidaan käyttämällä samaa, edellä kuvattua ^{32}P-leimattua aluketta käyttämällä fmol DNA sekvenssointisysteemiä (Promega Corp., madison, WI) täsmälleen ohjeiden mukaisesti. Sekvenssointireaktiot laitetaan 6 % denaturoivaan geeliin 2 µl alukkeen, jota on pidennetty in vitro RNA-reaktiossa, viereen. Geeliä elektroforesoidaan 1 h 1600 V:ssa, kuivataan ja altistetaan filmille yön yli. Täysi pitkää cDNA-juovaa voidaan verrata pcDNA3-sekvenssi-linjoihin, jotta määritetään transkription aloituskohta. Käyttämällä

tätä menetelmää voidaan CMV-promoottorin aloituskohta määrittää olevan täsmälleen 39 emästä myötävirtaan CMV-promoottoria nukleotidin numero 858 G-jäännöksessä (Invitrogen pcDNA3-vektorin numeroinnin mukaan).

pcDNA3-plasmidin CMV-promoottori asetetaan sitten rinnakkain Sindbis cDNA:n kanssa päällekkäisellä PCR:llä käyttämällä edellä kuvattuja menetelmiä pVGELVIS:n rakentamiseen. Minkä tahansa RNA-polymeraasi II-promoottorin transkription tarkka aloituskohta voidaan määrittää edellä kuvatuilla menetelmillä sallien sopivan promoottorin rinnakkain asettamisen ELVIS-konfiguraatioon. Indusoituvien promoottorien käyttö ELVIS-konfiguraatiossa sallii infektion aloittamisen kontrollin transfektoiduissa solulinjoissa.

Esimerkki 3

RNA- ja plasmidi-DNA Sindbis-vektoreiden valmistaminen

A. SINDBIS perusvektorin rakentaminen

Ensimmäinen vaihe SINDBIS perusvektorin rakentamisessa on kahden plasmidialakloonin, jossa on erilliset elementit viruksen 5′- ja 3′-päistä, joita käytetään sen jälkeen kokoamaan perusgeeninsiirtovektori, luominen. Ensimmäisessä plasmidin alakloonissa on 40 terminaalista nukleotidiä viruksen 3-päässä ja 25 emäksen dA:dT nukleotidien pätkä. Vektorin 3′-pää syntetisoidaan kemiallisesti sellaiseksi, että siinä on alla nähdyn alukeparin sekvenssi.

Eteenpäin oleva aluke: SIN1164F (puskurisekvenssi/Not I kohta/SIN nt 11664-11698):

5′- TATATGCGGCCGCTTTCTTTTATTAATCAACAAAATTTTGTTTTTAA
(SEQ.ID.Nro.)

Käänteisaluke: SINXba11700R (puskurisekvenssi/Sac I kohta dT25/SIN nt 11700-11692):

5′-TATATGAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATGTTAAAA

(SEQ.ID.Nro.)

Edellä olleet oligonukleotidit sekoitetaan yhdessä samoissa molaarisissa konsentraatioissa 10 mM $MgCl_2$:n läsnäollessa, kuumennettiin 100°C:een 5 min ja jäähdytettiin hitaasti huoneenlämpötilaan. Osittain kaksijuosteinen molekyyli täytetään sitten käyttämällä Klenowin DNA-polymeraasia ja 50 uM dNTP:tä. 89 bp molekyyli pilkotaan sitten Not I:llä ja Sac I:llä, puhdistetaan 2 % NuSieve/1 % agaroosigeelissä, ligoidaan pKS II+-palsmidiin, pilkotaan sitten Not I:llä ja Sac I:llä ja käsitellään CIAP:llä 10:1 moolisena ylimääränä insertti:vektori-suhde. Tämä rakenne tunnetaan pKSII3'SIN:nä.

Toisessa plasmidi alakloonissa on 5' 7643 bp, johon sisältyy Sindbis:n 5' terminaalinen RNA-polymeraasipromoottori. Tämän kloonin 3'-pää johdetaan PCR-amplifikaatiolla käänteisalukkeella, jossa on alla nähty sekvenssi.

Käänteisaluke: SINXho7643R (puskurisekvenssi/Xho I kohta/SIN nt 7643-7621):

5'-TATATCTCGAGGGTGGTGTTGTAGTATTAGTCAG
(SEQ.ID.Nro.)

Käänteinen aluke kartoittuu virusnukleotideistä 7643-7621 ja on 41 bp myötävirtaan liitosydinelementin 3'-päästä. Lisäksi virusnukleotidi 7643 on 4 nukleotidiä vastavirtaan rakenneproteiinien translaation aloituskohdasta. Ensimmäiset viisi 5'-nukleotidiä tässä alukkeessa, joiden jälkeen on 6 nukleotidiä, jotka koostuvat Xho I tunnistussekvenssistä, ovat mukana toimimaan "puskurisekvenssinä" PCR-amplikonituotteiden tehokkaalle pilkkomiselle.

Eteenpäin oleva aluke tässä reaktiossa on aluke 2A (kuvattu esimerkissä 1), jolla on seuraava sekvenssi:

ATACTAGCCACGGCCGGTATC (SEQ.ID. Nro)

pilkotaan entsyymeillä Sfi I ja Xho I. Tuloksena oleva 2526 bp fragmentti puhdistetaan geelissä. Sindbis cDNA-klooni pVGSP6GENrep pilkotaan Apa I:llä ja Sfi I:llä. 5144 bp fragmentti puhdistetaan geelissä ja ligoidaan yhteen 2526 bp Sfi I/Xho I pilkotun fragmentin kanssa ja Apa I ja Xho I pilkotun CIAP:lla käsitellyn pKSII+-plasmidin kanssa. Eristetään klooni, jossa on Sindbis-nukleotidit 1-7643, RNA-polymeraasipromoottori mukaanluettuna 5'-päässä, joka on pKSII+-plasmidissa. Tämä rakenne tunnetaan pKSII5'SIN:nä.

Täydellisen perusvektorin kokoaminen saadaan aikaan pilkkomalla pKS5'SIN Xho I:llä ja Sac I:llä, käsittelemällä CIAP:llä ja puhdistetaan geelissä suuri 10 533 bp fragmentti. pKS5'SIN 10 533 bp fragmentti ligoidaan yhdessä 168 bp pienen fragmentin kanssa, joka on tulos pKSII3'SIN:n pilkkomisesta Xho I:llä ja Sac I:llä. Tämä rakenne tunnetaan pHSSINBV:nä ja on esitetty kaavamaisesti kuviossa 4.

Tulikärpäsen luciferaasiraportoiva geeni insertoidaan Sindbis perusvektoriin, jotta osoitetaan heterologisen geenin ekspressio soluissa, jotka on transfektoitu RNA:lla, joka on tulos Sindbis vektorikloonin in vitro transkriptiosta. Tämä koe osoittaa Sindbis-vektorin yleistoiminnallisuuden.

B. Sindbis luciferaasivektorin rakentaminen

Sindbis luciferaasivektorin rakentaminen suoritetaan kokoamalla yhteen 3 itsenäisen plasmidin komponentit: pKSII5'-SIN, pKSII3'SIN ja pGL2-perusvektori. pGL2-perusvektoriplasmidissa (Promegan, Madison, WI) on koko tulikärpäsen luciferaasigeeni. Luciferaasigeeni insertoidaan ensin pKSII3'SIN-plasmidiin. Tämä tehdään puhdistamalla geelissä 2689 bp luciferaasi, jossa on fragmentti, joka on tulos pGL2-perusvektorin pilkkomisesta Bam HI:llä ja Hind III:lla, ja ligoidaan geelipuhdistettu 3008 bp suuri fragmentti, joka on seurausta pilkkomisesta Bam HI:llä ja Hind III:lla ja käsitellään pKSII3'SIN CIAP:lla. Tämä rakenne tunnetaan pKSII3'SIN-luc:na.

Sindbis luciferaasivektorin lopullinen kokoaminen saadaan aikaan pilkkomalla pKS5'SIN Xho I:llä ja Sac I:llä, käsitellään CIAP:lla ja puhdistetaan suuri 10533 bp fragmentti geelissä. pKS5'SIN 10533 bp fragmentti ligoidaan yhdessä 2854 bp pienen fragmentin kanssa, joka on tulos pKSII3'SIN-luc:n pilkkomisesta Xho I:llä ja Sac I:llä. Tässä rakenteessa on koko Sindbis ei-rakenteellinen geenin koodausalue ja 3'-viruselementit, jotka ovat tarpeellisia genomiselle replikaatiolle. Tulikärpäsen luciferaasigeeni laitetaan näiden kahden virus 5'- ja 3'-elementin väliin. Tämä rakenne tunnetaan pKSSINBV-luc:na ja nähdään kaavamaisesti kuviossa 4. SIN-BV-rakenteet FfiI:n ja SacI:n välissä vaihdetaan pGELVIS:een FfiI- ja XbaI-kohtien välissä. Heterologisten geenien ekspressiota havaitaan sen jälkeen kun on transfektoitu BHK-soluihin.

C. Luciferaasin ekspressio transfektoiduissa ja infektoiduissa BHK-soluissa

Jotta testataan Sindbis perusvektorin toiminnallisuus, luciferaasin ekspressio soluissa, jotka on transfektoitu RNA:lla, joka on transkriptoitu in vitro, kuten esimerkissä 1 on kuvattu, pKSSINBV-luc:sta, linearisoidaan pilkkomalla SacI:llä. Lisäksi komplementaarinen pakkausvektori, joka on deletoitu useimmista ei-rakennegeenialueesta, rakennetaan pilkkomalla pVGSP6GENrep BspEI:llä ja ligoidaan laimeissa olosuhteissa. Tämä rakenne tunnetaan pVGSP6GENd1Bsp:nä ja deletoidaan ei-rakennegeenisekvensseistä emäksien 422-7054 välistä. Tämä klooni on 8008 bp ja nähdään kaavamaisesti kuviossa 5. pVGSP6GENd1Bsp:n in vitro transkriptio on kuten esimerkissä 1 on kuvattu; linearisoitu Xba I:llä. Luciferaasin ekspressio transfektoiduissa soluissa testataan 24 h transfektion jälkeen. Transfektiot ja yhteistransfektiot suoritetaan kompleksoimalla in vitro transkriptiotuotteet lipofektiinin kanssa (Gibco-BRL, Gaithersberg, MD). Lisäksi käytetään 1 ml supernatanttia infektoimaan BHK-solujen konfluenttia yksikerroksista kerrosta ja luciferaasin ekspressio transfektoiduissa soluissa testataan 24 h infektion jäl-

keen. Tämän kokeen tulokset nähdään kuviossa 6. Tulokset osoittavat selvästi runsasta raportoivan geenin ekspressiota BHK-solujen transfektion jälkeen ja ekspressioaktiivisuuden siirtoa (esim. pakkaus), kun solut ovat transfektoitu yhtäaikaa in vitro transkriptoidun pVGSP6GENd1Bsp:n kanssa.

D. Muuttuneiden liitosalueen SINDBIS-vektoreiden rakentaminen

1. Jotta inaktivoidaan liitosalue, vaihdetaan nukleotidit NSP4 karboksipäässä ja liitosalueen päällekkäisessä osassa ja vektorinukleotidit, jotka vastaavat Sindbis:tä, lopetetaan ennen subgenomista aloituskohtaa Sindbis nt. 7598:ssa. Tämä rakenne nähdään kaavamaisesti kuviossa 7.

Lyhyesti, fragmentti PCR-amplifioidaan pKSSINBV-kloonista ei vaativissa reaktiosykliolosuhteissa käyttämällä käänteistä aluketta, jolla on seuraava sekvenssi:

TATATGGGCCCTTAAGACCATCGGAGCGATGCTTTATTTCCCC
(SEQ.ID.Nro)

Alleviivatut emäkset käänteisalukkeessa koskevat nukleotidivaihtoja liitosalueella ilman, että vaikutetaan koodattuihin aminohappoihin (katso alla). Kaikki nukleotidivaihdot ovat transversioita.

NSP 4:n 3'-pää (virus nt. 7580-7597):

TCT CTA CGG TGG TCC TAA (SEQ.ID.Nro)
ser leu arg trp ser stop (SEQ.ID.Nro)
G C A T
(johtuvat nt- vaihdokset käänteisalukkeesta)

Käänteisaluke on komplementaarinen Sindbis nt 7597-7566:n kanssa (paitsi nukleotideissä, kuten nähdään, missä liitosaluevaihdot on tehty) ja sisältää sen 5'-päässä 6 nukleotidiä, Apa I tunnistusekvenssin, jonka jälkeen on 5'-terminaa-

linen TATAT-häntä "puskurisekvenssi" tehokasta entsyymipilkkomista varten.

Eteenpäin oleva aluke tässä reaktiossa on aluke 2A (kuvattu esimerkissä 1), jolla on seuraava sekvenssi:

ATACTAGCCACGGCCGGTATC (SEQ.ID.Nro)

4464 bp amplikoni, joka on tulos PRC-reaktiosta pKSSINBV:n kanssa käyttämällä alukeparia, joka on kuvattu edellä, pilkotaan Sfi I:llä ja Apa I:llä ja geelipuhdistettu 2480 bp ligoidaan yhdessä geelipuhdistetun 5142 bp fragmentin kanssa, joka on tulos pKSSINBV:n pilkkomisesta Apa I:lla ja Sfi I:llä, ja geelipuhdistetun 2961 bp fragmentin kanssa, joka on tulos pKSII+:n pilkkomisesta Apa I:lla ja CIAP-käsittelystä. Tähän raketeeseen, joka koostuu Sindbis nukleotideistä 1-7597, mukaanluettuina muutokset edellä kuvatulla liitosalueella ja mukaanluettuna T7 bakteerin promoottori kiinnittyneenä Sindbis nt 1:een, viitataan pKS5'SINd1JR:nä.

Inaktivoidun liitosaluevektorin lopullinen rakenne saadaan aikaan ligoimalla 7622 bp suuri Sindbis-fragmentti, joka on tulos pKS5'SINd1JR:n pilkkomisesta Apa I:lla, 3038 bp fragmentin kanssa, joka on tulos pilkkomisesta Apa I:lla ja pKS-II3'SIN:n CIAP-käsittelystä. 5' Sindbis-elementin positiivinen suuntaus, suhteessa 3' Sindbis-elementtiin, varmistetaan restriktioendonukleaasianalyysillä. Tähän rakenteeseen viitataan pKSSINBVd1JR:nä.

Subgenomisen mRNA:n aloitus ja synteesi ei voi tapahtua pKSSINBVd1JR-vektorista. Jotta todistetaan tämä oletus, suoritetaan vertailevat RNaasi suojausmääritykset pKSSINBV- ja pKSSINBVd1JR-vektoreille. ^{32}P-päästä leimattua RNA-koetinta, joka on komplementaarinen osittain liitosalueen kanssa, mukaanluettuna subgenominen RNA:n aloituspiste virus nt 7598:ssa, käytetään hybridisoitumaan virus-RNA:n kanssa, joka on tulos BHK-21-solujen transfektiosta pKSSINBV- ja pKSSINBVd1JR-vektoreiden kanssa. RNaasi suojausmääritys osoittaa,

että soluilla, jotka on transfektoitu pKSSINBV:llä, on kaksi fragmenttia, genominen ja subgenominen spesifisyys, kun taas soluilla, jotka on transfektoitu pKSSINBVd1JR:llä, on vain yksi genomista spesifisyyttä oleva fragmentti. Nämä tulokset varmistavat, että liitosalue pKSSINBVd1JR-vektorissa on todella inaktivoitu.

2. Jotta testataan genomisen RNA:n translaatio alueelta, joka vastaa subgenomista RNA-lähettiä, luciferaasiraportoiva geeni insertoidan edellä kuvattuun inaktivoituun liitosalueen vektoriin pKSSINBVd1JR. Tämä rakenne saadaan aikaan pilkkomalla Xho I:llä ja Sac I:llä ja käsittelemällä CIAP:lla pKSSINBVd1JR-plasmidi ja geelipuhdistetaan saatu 10 197 bp fragmentti. pKSSINBVd1JR-fragmentti ligoidaan yhdessä 2854 bp pienen fragmentin kanssa, joka on tulos pKSII3'SIN-luc:n pilkkomisesta Xho I:llä ja Sac I:llä. Tässä rakenteessa on koko Sindbis ei-rakenteellinen geenikoodausalue, joka loppuu inaktivoituun liitosalueeseen Sindbis nt 7597:ssä, ja 3'-viruselementit, jotka ovat tarpeelliset genomin replikaatiolle; tulikärpäsen luciferaasigeeni laitetaan näiden kahden virus 5'- ja 3'-elementin väliin. Tämä vektori tunnetaan pKSSINBVd1JR:nä.

Raportoivan geenin ekspressio pKSSINBVd1JR-luc-vektorilta testataan transfektoiduissa BHK-21-soluissa. Toiminnallisen luciferaasiproteiinin translaatio määritetään luciferiini luminisenttimäärityksellä käyttämällä luminometriä määritykseen. Herkkyys tässä määrityksessä on 1 x 10-20 mol luciferaasia. Annettuna tuohon luciferaasin molekyylipaino 62 000 daltonia, tämä määrityksen rajoitus transformoi 6020 molekyyliä. Täten tyypillisessä kokeessa jos vain 0,6 % 1 x 10^6 solusta, jotka ovat petrimaljalla, transfektoidaan pKSSINBVd1JR-luc-vektorilla ja jos nämä transfektoidut solut ekspressoivat vain yhtä ainoata luciferaasin toiminnallista molekyyliä, määritetään entsymaattinen aktiivisuus käytetyllä määrityksellä. On tärkeää osoittaa tässä kokeessa, että pKSSINBVd1JR-luc-vektorin liitosalue on inaktivoitu. Tämä saadaan aikaan RNaasi suojaussysteemillä, jossa verrataan

viruksen RNA:ta, joka on syntetisoitu soluissa, jotka on transfektoitu pKSSINBVd1JR-luc- ja pKSSINBV-luc vektoreilla käyttämällä edellä kuvattua koetinta.

3. Minimaalinen -19->+5 liitosalue ydinoligonukleotidipari, joka koostuu Sindbis nt 7579-7602 (Levis et al., J. Virol. 64:1726-1733, 1990), syntetisoidaan in vitro, ja Apa I ja Xho I tunnistussekvenssit reunustavat, kuten nähdään:
oligonukleotidi 1:
CATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTC (SEQ.ID.Nro)

oligonukleotidi 2:
TCGAGACTATTTAGGACCACCGTAGAGATGGGCC (SEQ.ID.Nro)

Edellä olevat oligonukleotidit sekoitetaan yhdessä 10 mM Mg^{2+}:n läsnäollessa, kuumennetaan 100°C:een 5 min ja jäähdytetään hitaasti huoneenlämpötilaan. Hybridisoituneet oligonukleotidit ligoidaan 25:1 insertin moolisella suhteella pKSSINBVd1JR-vektoriin, joka on valmistettu seuraavasti: täydellin pilkkominen Xho I:llä, jonka jälkeen pilkotaan Apa I:llä osittaisissa olosuhteissa johtaen yhteen Apa I indusoituneeseen pilkkomiseen/molekyyli (kahdesta mahdollisesta pilkkomisesta), 10655 bp fragmentin geelipuhdistus ja CIAP-käsittely. Tämä vektori, jossa on koko NSP koodausalue, joka loppuu inaktivoituun liitosalueytimeen, joka on liittynyt synteettiseen liitosalueytimeen ja sen jälkeen 3'-viruselementit, joita tarvitaan replikaatioon, ja joka on pKS-II+-plasmidilla, tunnetaan pKSSINBVd1JRsjrc:nä.

Jotta säädellään subgenomisen mRNA:n synteesin tasoa, suoritetaan lisää modifikaatioita peräkkäin insertoidussa synteettisessä liitosalueen ytimessä plasmidissa pKSSINBVd1JRsjrc. Nämä modifikaatiot liitosalueen ytimessä saadaan aikaan kahdella lähestymistavalla; nukleotidivaihdokset liitosalueen ytimessä tai pidennykset reunustavien Sindbis-nukleotidien 5'- ja 3'-liitosalueen ytimen lopussa autenttisen vi-

russekvenssin mukaan. Minimaalinen liitosalueydin, ylettyen virus nt 7579-7602, nähdään alla.

ATCCTACGGTGGTCCTAAATAGT (SEQ.ID.Nro)

Vertaamalla genomista sekvenssiä kahdeksan alfa-viruksen välillä on aikaisemmin osoitettu, että on sekvenssivaihtelevuutta liitosalueen ytimessä. Alla esitettynä erityisille liitosaluesijainneille, on Sindbis nukleotidi, jonka jälkeen vastaava nukleotidi, jota on muissa alfa-viruksissa:

Nukleotidi-numero	Sindbis	Permissiivinen muutos
7579	A	C
7580	U	C
7581	C	U
7583	C	G
7589	U	C
7590	G	U
7591	G	A
7592	U	A
7600	A	U tai G
7602	U	G tai A

Liitosaluevaihdokset Sindbis nt:ssä 7579, 7580, 7581, 7583, 7589, 7590, 7591, 7592 johtavat aminohapon koodauspotentiaalin muutoksiin NSP4:n, joka menee päällekkäin liitosalueella, karboksiterminuksen kaikissa 5 kodonissa. Nämä muutokset, jotka havaittiin liitosalueella alfavirusten välillä NSP4 koodauspotentiaalin tasolla ja liitosalueen tasolla, voi cis-aktiivisuuden edustaa jompaakumpaa tai molempia permissiivisiä muutoksia NSP4:ssä ja liitosalueella, joka ei vaikuta toiminnallisuuteen tai toisaalta, yksinkertaisesti erilaiset virukset. Missä tahansa tapauksessa liitosalueen muutokset, jotka tässä on esitetty, ottavat huomioon peräkkäin insertoidun liitosalueytimen, josta ei tapahdu NSP-proteiinisynteesiä. Kuten edellä keskusteltu, koko NSP-alueen translaatio tapahtuu pKSSINBVd1JR-rakenteesta. Liitos-

aluemuutokset Sindbis:ssä nt:ssä 7600 ja 7602 ovat myötävirtaan NSP4 lopetuskodonista ja vastavirtaan rakenneproteiinien aloistuskodonista.

Nukleotidierojen sijainteihin liitosalueytimessä, joita on havaittu havaittiin useiden alfa-viruskantojen välillä, viitataan tässä permissiivisinä muutoksina. Nukleotidien sijainteihn liitosalueytimessä vastaten säilyneitä sekvenssejä useiden alfa-viruskantojen välillä, viitataan tässä ei-permissivisinä muutoksina.

Jotta vähennetään subgenomisen mRNA:n aloituksen tasoa synteettisestä liitosalueytimestä, muutokset tehdään erikseen nukleotideissä, jotka vastaavat permissiivisiä muutoksia ja nukleotideissä, jotka vastaavat ei-permissiivisiä muutoksia. Liitosalueen nukleotidit, jotka vastaavat permissiivisiä muutoksia, on annettu taulukossa edellä. 14 liitosalueen nukleotidiä, joille ei muutoksia huomata 8 sekvenssoidun alfa-viruksen joukossa (Semliki Forest virus, Middleburg virus, Ross River virus, O'Nyong virus, Eastern Equine Encephalitis virus, Western Equine Encephalitis virus ja Venezuelan Equine Encephalitis virus), annetaan alla:

<u>Nukleotidinumero:</u>

7582
7584
7585
7586
7587
7588
7593
7594
7595
7596
7597
7598
7599
7601

Muutokset liitosalueessa, jotka on huomattu alfa-virusten joukossa, voivat heijastaa tiettyä vuorovaikutusta annetun alfa-virus RNA-polymeraasin ja sen yhteen kuuluvan liitosalueen välillä. Täten muutokset "permissiivisien" nukleotidien joukossa saattavat johtaa yhtä merkittävään laskuun subgenomisen mRNA:n synteesien tasoissa kuin muutokset "ei-permissiivisien" nukleotidien joukossa liitosalueella. Toisaalta nämä voivat todella olla permisiivisen muutoksen kohtia liitosalueytimessä.

Yksittäinen autenttinen ei-permisiivinen muutos liitosalueytimessä on todennäköisesti Sindbis nt 7598 vastaten subgenomista mRNA:n aloituskohtaa. Tämän nukleotidin muutoksia peräkkäin insertoidussa liitosalueytimessä plasmidissa pKSSINd1JRsjr ei ole kuvattu tässä.

Permissiivisien nukleotidien substituutio in toto synteettiseen minimaaliseen -19->+5-liitosalueytimeen saadaan aikaan seuraavalla oligonukleotidiparilla, jotka on syntetisoitu in vitro, ja joita reunustavat Apa I ja Xho I tunnistussekvenssit, kuten nähdään:

oligonukleotidi 1:
CCCTTGTACGGCTAACCTAAAGGAC (SEQ.ID.Nro)

oligonukleotidi 2:
TCGAGTCCTTTAGGTTAGCCGTACAAGGGGGCC (SEQ.ID.Nro)

Edellä olevat oligonukleotidit sekoitetaan yhteen 10 mM Mg:n läsnäollessa, kuumennetaan 100°C:een 5 min ja jäähdytetään hitaasti huoneenlämpötilaan. Hybridisoituneet oligonukleotidit ligoidaan 25:1 insertin moolisessa suhteessa pKSSINBVd-1JR-vektoriin, joka on valmsitettu seuraavasti: täydellinen pilkkominen Xho I:llä, jonka jälkeen pilkotaan Apa I:llä osittaisissa olosuhteissa johtaen yhteen Apa I indusoituun pilkkomiseen/molekyyli (kahdesta mahdollisesta pilkkomisesta), puhdistetaan geelissä 10 655 bp fragmentti ja käsitellään CIAP:lla. Tämä vektori tunnetaan pKSSINd1JRsjrPc:nä.

Jokainen 13 (nt 7598 ei muuttunut) ei-permissiivisestä nukleotidistä liitosalueytimessä muutetaan yksilöllisesti käyttämällä seuraavia sääntöjä johtaen drastisempaan transversionaaliseen substituutiohon:

A->C
T->G
G->T
C->A

Esimerkiksi nt 7582 vaihdetaan T->G käyttämällä seuraavaa oligonukleotidiparia, joka on syntetisoitu in vitro, ja joita reunustavat Apa I ja Xho I tunnistussekvenssit, kuten nähdään:

oligonukleotidi 1:
CATCGCTACGGTGGTCCTAAATAGTC (SEQ.ID.Nro)

oligonukleotidi 2:
TCGAGACTATTTAGGACCACCGTAGCGATGGGCC (SEQ.ID.Nro)

(Nukleotidit, jotka tehostavat transversiota ei-permissivisissä liitoslauekohdissa, jotka nähdään paksunnetulla tyypillä)

Edellä olevat oligonukleotidit sekoitetaan yhteen 10 mM Mg:n läsnäollessa, kuumennetaan 100°C:een 5 min ja jäähdytetään hitaasti huoneenlämpötilaan. Hybridisoituneet oligonukleotidit ligoidaan 25:1 insertin moolisessa suhteessa pKSSINBVd-1JR-vektoriin, joka on valmistettu seuraavasti: täydellinen pilkkominen Xho I:llä, jonka jälkeen pilkotaan Apa I:llä osittaisissa olosuhteissa johtaen yhteen Apa I indusoituun pilkkomiseen/molekyyli (kahdesta mahdollisesta pilkkomisesta), puhdistetaan geelissä 10 655 bp fragmentti ja käsitellään CIAP:lla. Tämä vektori tunnetaan pKSSINd1JRsjrNP7582:na.

Käyttämällä edellä nähtyjä transversiomuutossääntöjä, muutokset jokaisessa 12 jäljelle jäävässä ei-permissiivisessä kohdassa liitosalueytimessä tehdään 12 erillisellä oligonukleotidiparilla, joita reunustavat Apa I ja Xho I tunnistussekvenssit, kuten edellä on kuvattu. Nämä vektorit tunnetaan:

pKSSINd1JRsjrNP7584
pKSSINd1JRsjrNP7585
pKSSINd1JRsjrNP7586
pKSSINd1JRsjrNP7587
pKSSINd1JRsjrNP7588
pKSSINd1JRsjrNP7593
pKSSINd1JRsjrNP7594
pKSSINd1JRsjrNP7595
pKSSINd1JRsjrNP7596
pKSSINd1JRsjrNP7597
pKSSINd1JRsjrNP7599
pKSSINd1JRsjrNP7601

Jotta testataan subgenomisen mRNA-synteesin suhteelliset tasot, insertoidaan luciferaasi raporttigeeni modifioituihin peräkkäisiin liitosaluevektoreihin. Tämä rakenne saadaan aikaan pilkkomalla Xho I:llä ja Sca I:llä ja käsittelemällä CIAP:lla peräkkäin insertoidut synteettisen liitosalueen ydinvektorit ja puhdistamalla geelissä saatu noin 10 200 bp fragmentti. Täten käsitelty vektorifragmentti ligoidaa yhteen 2854 bp pienen fragmentin kanssa, joka on tulos pKSII-3'SIN-luc:n pilkkomisesta Xho I:llä ja Sca I:llä. Näissä rakenteissa on koko Sindbis ei-rakennegeenikoodialue, joka loppuu inaktivoituun liitosalueeseen Sindbis nt 7597:ssä, peräkkäin insertoitu synteettinen liitosalueen ydin (modifioitu ja ei-modifioitu), tulikärpäsen luciferaasigeeni ja 3'-viruselementit, jotka ovat tarpeellisia genomin replikaatiolle. Näiden vektorien nimet ovat seuraavat:

Sindbis-luciferaasivektori	Peräkkäin insertoitu Liitosalue modifioitu
pKSSINd1JRsjr-luc	ei modifioitu

pKSSINd1JRsjrPc-luc	permisiiviset muutokset
pKSSINd1JRsjrNP7582-luc	ei-permisiivinen muutos
pKSSINd1JRsjrNP7584-luc	- "-
pKSSINd1JRsjrNP7585-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7586-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7587-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7588-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7593-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7594-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7595-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7596-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7597-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7599-luc	- " -
pKSSINd1JRsjrNP7601-luc	- " -

Olettaen, että translaation tehokkuudet ovat samat kaikissa luciferaasivektoreissa, jotka nähdään välittömästi edellä, subgenomisen synteesin suhteelliset tasot määritetään vertaamalla luciferaasitasoja, jotka on tuotettu 16 h BHK-21-solujen infektion jälkeen. Subgenomisen transkription suhteelliset tasot määritetään vertaamalla luciferaasin tuottoa vektoreilla pKSSINBV-luc ja pKSSINd1JRsjr-luc kaikkien modifioitujen liitosalueen, edellä nähtyjen luciferaasivektoreiden kanssa.

Oletetaan että vektoreilla, joissa on peräkkäin insertoitu synteettinen liitosalueydin (pKSSINd1JRsjr ja sen johdannaiset), on alhaisempi subgenomisen mRNA:n ekspression taso suhteessa pKSSINBV-rakenteeseen. Tietyissä suoritusmuodoissa saattaa olla tarpeellista lisätä subgenomisen mRNA:n ekspression tasoa, mitä on havaittu pKSSINd1JRsjr-vektorista. Tämä saadaan aikaan jatkamlla 5'- ja 3'-synteettiseen liitosalueydinpäähän 11 lisäksi tulevaa reunustavaa Sindbis-nukleotidiä autenttisen virussekvenssin mukaan.

Alla esitetty synteettinen oligonukleotidipari syntetisoidaan in vitro ja siinä on 46 Sindbis nt:ä, mukaanluettuna 24 nt (osoitettu paksunnettuna tyyppinä) minimaalisesta lii-

tosalueytimestä. Sindbis nt:jä reunustavat Apa I- ja Xho I-tunnistussekvenssit, kuten esitetään:

oligonukleotidi 1:
CGGAAATAAAGCATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTCAGCATAGTACC
(SEQ.ID.Nro)

oligonukleotidi 2:
TCGAGGTACTATGCTGACATTTAGGACCACCGTAGAGATGCTTTATTTC-CGGGCC
(SEQ.ID.Nro)

Edellä olevat oligonukleotidit sekoitetaan yhteen 10 mM Mg:n läsnäollessa, kuumennetaan 100°C:een 5 min ja jäähdytetään hitaasti huoneenlämpötilaan. Hybridisoituneet oligonukleotidit ligoidaan 25:1 insertin moolisessa suhteessa pKSSINBVd1JR-vektoriin, joka on valmistettu seuraavasti: täydellinen pilkkominen Xho I:llä, jonka jälkeen pilkotaan Apa I:llä osittaisissa olosuhteissa johtaen yhteen Apa I indusoituun pilkkomiseen/molekyyli (kahdesta mahdollisesta pilkkomisesta), puhdistetaan geelissä 10 655 bp fragmentti ja käsitellään CIAP:lla. Tämä vektori, jossa on koko NSP koodausalue, joka päättyy inaktivoituun liitosalueytimeen, joka on kiinnittynyt pidennettyyn synteettiseen liitosalueeseen ja jonka jälkeen ovat 3'-viruselementit, joita tarvitaan replikaatioon, ja joka on pKSII+-plasmidissa, tunnetaan pKSSINd1JR-sexjr:nä.

Jotta testataan subgenomisen mRNA-synteesin suhteelliset tasot, insertoidaan luciferaasi raporttigeenipidennettyyn, peräkkäiseen liitosaluevektoriin pKSSINd1JRsexjr. Tämä rakenne saadaan aikaan pilkkomalla Xho I:llä ja Sca I:llä ja käsittelemällä CIAP:lla pKSSINd1JRsexjr-plasmidi ja puhdistamalla geelissä saatu noin 10 200 bp fragmentti. Täten käsitelty vektorifragmentti ligoidaan yhteen 2854 bp pienen fragmentin kanssa, joka on tulos pKSII3'SIN-luc:n pilkkomisesta Xho I:llä ja Sca I:llä. Tässä rakenteessa on koko Sindbis ei-rakennegeeni, joka koodaa aluetta, joka loppuu inaktivoituun liitosalueeseen Sindbis nt 7597:ssä, peräkkäin

insertoitu synteettinen liitosalueen ydin, tulikärpäsen luciferaasigeenin ja 3'-viruselementit, jotka ovat tarpeellisia genomin replikaatiolle. Tämän vektorin nimi on pKSSINd1-JRsexjr-luc.

Subgenomisen transkription suhteelliset tasot määritetään vertaamalla luciferaasituottoa pKSSINd1JRsexjr-luc-vektorilla pKSSINBV-luc- ja pKSSINd1JRsjr-luc-vektoreihin.

Esimerkki 4

A. Adenoviruksen aikaisen alueen E3-geenin insertio Sindbis-vektoreihin

Jotta inhiboidaan isännän CTL kohdistettu vaste virusspesifisiä proteiineja vastaan, joita ekspressoidaan vektorilla infektoiduissa soluissa sovellutuksissa, joissa toivotaan toistuvaa terapeuttisen aineen antamista, Adenovirus tyyppi 2 (Ad 2) E3/19K geeni ATCC Nro VR-846 kloonataan pKSSINd1JR-sjr-plasmidiin, välittömästi myötävirtaan liitosalueydintä.

Lyhyesti, Ad 2 lisätään permisiivisessä solulinjassa, esimerkiksi HeLa- tai Vero-solut, ja sytopatologisten vaikutusten osoituksen jälkeen virionit puhdistetaan solulysaatista ja Ad 2 DNA puhdistetaan viruksesta.

Ad 2 DNA E3/19K geeni, jossa on aminoterminaalinen signaalisekvenssi, jonka jälkeen intraluminaalidomeeni ja karboksiterminaalinen sytoplasminen häntä, joka sallii E3/19K proteiinin sulkea itsensä solulimakalvostoon, sijaitsee virusnukleotidien 28 812 ja 29 288 välissä. Ad 2 E3 19K-geenin eristäminen viruksen genomisesta DNA:sta saadaan aikaan PCR-amplifikaatiolla, alukeparin näkyessä alla:

Ad 2 E3 eteenpäin oleva aluke (Ad 2 nukleotidit 28 812-28 835):

5'-TAT ATC TCC AGA TGA GGT ACA TGA TTT TAG GCT TG-3'
(SEQ.ID.Nro 14)

Ad 2 E3 käänteisaluke (Ad 2 nukleotidit 29 241-29 213):
5'-TAT ATA TCG ATT CAA GGC ATT TTC TTT TCA TCA ATA AAA C-3'
(SEQ.ID.Nro 15)

Ad 2 komplementaaristen sekvenssien lisäksi molemmissa alukkeissa on 5 nukleotidin "puskurisekvenssi" niiden 5'-päissä tehokasta PCR-amplikonituotteiden entsyymipilkkomista varten. Tämä sekvenssi on eteenpäin oleva aluke, jonka jälkeen on Xho I tunnistuskohta ja käänteisalukkeessa tämän sekvenssin jälkeen on Cla I tunnistuskohta. Täten 5'-3'-suunnassa, E3/19K-geeniä reunustaa Xho I ja Cla I tunnistuskohdat. E3/19K-geenin amplifikaatio Ad 2 DNA:sta saadaan aikaan seuraavalla PCR-syklin protokollalla:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,17	5
72	3,5	
94	0,5	30
70	3,5	
72	10	10

Amplifikaation jälkeen 451 bp amplikoni puhdistetaan 1,5 % agaroosigeelissä ja sen jälkeen pilkotaan Xho I- ja Cla I-entsyymeillä ja ligoidaan CIAP:lla käsiteltyyn pKSSINd1JRsjrc-plamidiin, joka on aiemmin pilkottu Xho I:lla ja Cla I:lla. Tätä kloonia merkitään pKSSINd1JRsjrcAdE3. Käyttämällä samaa kloonausstrategiaa insertoidaan Ad 2 E3/19K kaikkiin modifioituihin synteettisen liitosalueen vektoreihin, jotka on kuvattu esimerkissä 2.

B. Ihmisen sytomegalovirus H301-geenin insertio Sindbis-vektoreihin.

Jotta inhiboidaan isännän CTL:n ohjaama vaste virusspesifisiä proteiineja vastaan, jotka ekspressoituvat vektorilla infektoiduissa soluissa sovellutuksissa, joissa toivotaan

toistuvaa terapeuttisen aineen antamista, ihmisen sytomegalovirus (HCMV) H301-geeni kloonataan pKSSINd1JRsjr-plasmidiin, välittömästi myötävirtaan liitosalueen ytimestä.

Lyhyesti, HCMV-kanta AD169 (ATCC Nro VR-538) lisätään permissiivisessä solulinjassa, esimerkiksi primäärinen ihmisen esinahan fibroblastit (HFF) (GIBCO/BRL; Gaithersburg, MD) ja sytopatologisten todisteiden jäkeen virionit puhdistetaan solulysaatista ja HCMV DNA puhdistetaan myöhemmin virioneista.

HCMV H301-geeni sijaitsee virusnukleotidien 23 637 ja 24742 välissä. HCMV H301-geenin eristäminen viruksen genomisesta DNA:sta saadaan aikaan PCR-amplifikaatiolla, alukkeen näkyessä alla:

HCMV H301 eteenpäin oleva aluke (puskurisekvenssi/Xho I kohta/HCMV nukleotidit 23 637-23 660):

5'-TAT ATC TCC AGA TGA TGA CAA TGT GGTGTC TGA CG-3'
(SEQ.ID.Nro 16)

HCMV H301 käänteisaluke (puskurisekvenssi/Cla I kohta/HCMV nukleotidit 24 744-24 722):

5'-TAT ATA TCG ATT CAT GAC GAC CGG ACC TTG CG-3'
(SEQ.ID.Nro 17)

HCMV H301 geenin komplementaaristen sekvenssien lisäksi molemmissa alukkeissa on viiden nukleotidin "puskurisekvenssi" niiden 5'-päissä tehokasta PCR-amplikonituotteiden entsyymipilkkomista varten. Tämän eteenpäin olevassa alukkeessa olevan sekevnssin jälkeen on Xho I tunnistuskohta ja käänteisalukkeessa tämän sekvenssin jälkeen on Cla I tunnistuskohta. Täten 5'-3'-suuntaan olevaa HCMV H301 geeniä reunustaa Xho I- ja Cla I tunnistuskohdat. HCMV H301 geenin amplifikaatio HCMV DNA:sta saadaan aikaan seuraavalla PCR-sykliprotokollalla:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,17	5
72	3,5	
94	0,5	30
70	3,5	
72	10	10

Amplifikaation jälkeen 1129 bp amplikonituote puhdistetaan 1,0 % agaroosigeelissä ja sen jälkeen pilkotaan Xho I- ja Cla I-entsyymeillä ja ligoidaan CIAP:lla käsiteltyyn pKSSINd1JRsjrc-plamidiin,joka on aiemmin pilkottu Xho I:lla ja Cla I:lla. Tätä kloonia merkitään pKSSINd1JRsjrcH301. Käyttämällä samaa kloonausstrategiaa insertoidaan HCMV H301-geeni kaikkiin modifioituihin synteettisen liitosalueen vektoreihin, jotka on kuvattu esimerkissä 3.

Esimerkki 5

Moninkertaisten heterologisten geenien ekspressio Sindbis-vektoreista

Plasmidissa pBS-ECAT (Jang et la., J. Virol. 63:1651, 1989) on Encephalomycarditis viruksen (EMCV) 5' ei-transloitu alue virusgenomin nt:stä 260-848, jossa on sisäinen ribosomin sisääntulokohta (IRES). EMCV-nukleotidit 260-827 amplifioidaan pBS-ECAT:lta PCR:llä käyttämällä seuraavaa alukeparia:

EMCV IRES eteenpäin oleva aluke A (Insertiota varten seuraavaksi viallisesta liitosalueesta vektorissa pKSSINBVd1JR Apa I kohta):

5'-TAT ATG GGC CCC CCC CCC CCC AAC G-3' (SEQ.ID.Nro 18)

EMCV IRES eteenpäin oleva aluke B (Insertiota varten heterologisten geenien, jotka loppuvat Cla I-kohtiin ja alkavat Nco I-kohdilla, väliin):

5'-TAT ATA TCG ATC CCC CCC CCC CCA ACG-3' (SEQ.ID.Nro 19)

EMCV IRES käänteisaluke (käytettäväksi jommankumman alukkeen A tai B kanssa):

5'-TAT ATC CAT GGC TTA CAA TCG TGG TTT TCA AAG G-3' (SEQ.ID.Nro 20)

Amplikonia, joka on seurausta amplifikaatiosta eteenpäin olevan alukkeen A ja käänteisalukkeen kanssa, reunustaa Apa I ja Nco I tunnistuskohdat, 5 bp "puskurisekvenssin" sisäpuolella.

Amplikonia, joka on seurausta amplifikaatiosta eteenpäin olevan alukkeen B ja käänteisalukkeen kanssa, reunustaa Cla I ja Nco I tunnistuskohdat, 5 bp "puskurisekvenssin" sisäpuolella.

EMCV IRES-sekvenssin amplifikaatio pBS-ECAT-plasmidista saadaan aikaan seuraavalla PCR-sykliprotokollalla:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,17	5
72	3,5	
94	0,5	30
70	3,5	
72	10	10

Jotta insertoidaan pKSSINBVd1JR-vektoriin, 589 bp amplikoni pilkotaan Apa I:llä ja Nco I:llä, puhdistetaan 1,0 % agaroosigeelissä ja ligoidaan CIAP:lla käsiteltyyn vektoriin, joka on pilkottu Apa I:llä ja Nco I:llä. ATG joka vastaa heterologisen geenin, joka on tarkoitus insertoida välittö-

mästi myötävirtaan EMCV IRES-insertistä, aloituskodonia, modifioidaan sisältämään Nco I kohta (CCATGG).

Jotta insertoidaan pKSSINBV- tai pKSSINBVd1JRsjrc-vektoreihin heterologisten geenien väliin, 589 bp amplikoni pilkotaan Cla I:llä ja Nco I:llä, puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä ja ligoidaan bikistroniseen heterologiseen geenivektoriin, joka on pilkottu Cla I:llä ja Nco I:llä ja käsitelty CIAP:lla. Bikistronisessa heterologisessa geenikonfiguraatiossa heterologisen geenin 3'-pää vastavirtaan modifioidaan loppumaan Cla I tunnistuskohtaan. ATG joka vastaa toisen myötävirtaan olevan heterologisen geenin, joka on tarkoitus insertoida välittömästi myötävirtaan EMCV IRES-insertistä, aloituskodonia, modifioidaan sisältämään Nco I kohta (CCATGG). Täten 5'-3' komponenttien järjestys on: pKSSINBV tai pKSSINBVd1JRsjrc-geeni #1-Cla/Nco EMCV IRES-geeni #2-3'SIN. Insertio kaikkiin modifioituihin liitosalueen vektoreihin, jotka on kuvattu esimerkissä 2, seuraa strategiaa, joka on annettu tässä pKSSINBV- tai pKSSINBVd1JRsjrc-vektoreille.

pKSSINBVd1JR-vektori, jossa on bikistroninen hetrologinen konfiguraatio, rakennetaan jokaisen edellä kuvatun EMCV IRES-amplikonin kanssa. Ensimmäistä EMCV IRES-amplikonia reunustaa Apa I- ja Nco I-kohdat ja insertoidaan välittömästi myötävirtaan viallisen liitosalueena Apa I-kohdassa, kuten edellä on kuvattu. EMCV IRES-sekvenssin jälkeen tulee ensimmäinen heterologinen geeni, joka päättyy Cla I tunnistuskohtaan. Ensimmäisen heterologisen geenin jälkeen tulee toinen EMCV IRES-sekvenssi käyttämällä amplikonia, jota Cla I ja Nco I tunnituskohdat reunustavat. Toista heterologista geeniä seuraa toinen EMCV IRES-sekvenssi. Täten 5'-3' komponenttien järjestys on: SINBVd1JR-Apa/Nco EMCV IRES-geeni #1-Cla/Nco EMCV IRES-geeni #2-3'SIN.

Plasmidissa pP2-5' (Pelletier et al., Mol. Cell Biol. 8:

1103, 1988) on 5' ei-transloitu alue poliovirus P2/Lansing-kannasta virusgenomin nukleotidit 1-1872, joissa on polio IRES. Poliovirusnukleotidit 320-631 amplifioidaan pP2-5':stä PCR:llä käyttämällä seuraava alukeparia:

Polio IRES eteenpäin oleva aluke A (Insertiota varten seuraavaksi viallisesta liitosalueesta vektorissa pKSSINBVd1JR Apa I kohdassa):

5'-TAT ATG GGC CCT CGA TGA GTC TGC ACG TTC CTC-3'
(SEQ.ID.Nro 21)

POLIO IRES eteenpäin oleva aluke B (Insertiota varten heterologisten geenien, jotka loppuvat Cla I-kohtiin ja alkavat Nco I-kohdilla, väliin):

5'-TAT ATA TCG ATT CGA TGA GTC TGG ACG TTC CTC-3'
(SEQ.ID.Nro 22)

Polio IRES käänteisaluke (käytettäväksi jommankumman alukkeen A tai B kanssa):

5'-TAT ATC CAT GGA TCC AAT TTG CTT TAT GAT AAC AAT C-3'
(SEQ.ID.Nro 23)

Amplikonia, joka on seurausta PCR:stä Polio IRES edellä nähdyn eteenpäin olevan alukkeen A/käänteisalukeparin kanssa, reunustaa Apa I ja Nco I tunnistuskohdat, 5 bp "puskurisekvenssin" sisäpuolella.

Amplikonia, joka on seurausta PCR:stä Polio IRES eteenpäin olevan alukkeen B/käänteisalukeparin kanssa, reunustaa Cla I ja Nco I tunnistuskohdat, 5 bp "puskurisekvenssin" sisäpuolella.

Polio IRES-sekvenssin amplifikaatio pP2-5'-plasmidista saadaan aikaan seuraavalla PCR-protokollalla, joka nähdään esimerkissä 5:

Jotta insertoidaan pKSSINBVd1JR-vektoriin, 333 bp amplikoni pilkotaan Apa I:llä ja Nco I:llä, puhdistetaan 1,5 % agaroosigeelissä ja ligoidaan vektoriin, joka on pilkottu Apa I:llä ja Nco I:llä ja käsitelty CIAP:lla. ATG joka vastaa heterologisen geenin, joka on tarkoitus insertoida välittömästi myötävirtaan polio IRES-insertistä, aloituskodonia, modifioidaan sisältämään Nco I kohta (CCATGG).

Jotta insertoidaan pKSSINBV- tai pKSSINBVd1JRsjrc-vektoreihin heterologisten geenien väliin, 333 bp amplikoni pilkotaan Cla I:llä ja Nco I:llä, puhdistetaan 1,5 % agaroosigeelissä ja ligoidaan bikistroniseen heterologiseen geenivektoriin, joka on pilkottu Cla I:llä ja Nco I:llä ja käsitelty CIAP:lla. Bikistronisessa heterologisessa geenikonfiguraatiossa heterologisen geenin 3'-pää vastavirtaan modifioidaan loppumaan Cla I tunnistuskohtaan. ATG joka vastaa toisen myötävirtaan olevan heterologisen geenin, joka on tarkoitus insertoida välittömästi myötävirtaan polio IRES-insertistä, aloituskodonia, modifioidaan sisältämään Nco I kohta (CCATGG). Täten 5'-3' komponenttien järjestys on: pKSSINBV tai pKSSINBVd1JRsjrc-geeni #1-Cla/Nco polio IRES-geeni #2-3'SIN. Insertio kaikkiin modifioituihin liitosalueen vektoreihin, jotka on kuvattu esimerkissä 2, seuraa strategiaa, joka on annettu tässä pKSSINBV- tai pKSSINBVd1JRsjrc-vektoreille.

pKSSINBVd1JR-vektori, jossa on bikoistroninen heterologinen konfiguraatio, rakennetaan jokaisen edellä kuvatun polio IRES-amplikonin kanssa. Ensimmäistä polio IRES-amplikonia reunustaa Apa I- ja Nco I-kohdat ja insertoidaan välittömästi myötävirtaan viallisesta liitosalueesta Apa I-kohdassa, kuten edellä on kuvattu. Tämän polio IRES-sekvenssin jälkeen tulee ensimmäinen heterologinen geeni, joka päättyy Cla I tunnistuskohtaan. Ensimmäisen heterologisen geenin jälkeen tulee toinen polio IRES-sekvenssi käyttämällä amplikonia, jota Cla I ja Nco I tunnistuskohdat reunustavat. Toista heterologista geeniä seuraa toinen polio IRES-sekvenssi. Täten 5'-3' komponenttien järjestys on: SINBVd1JR-Apa/Nco polio IRES-geeni #1-Cla/Nco EMCV IRES-geeni #2-3'SIN.

220 bp BiP cDNA, joka vastaa 5' johtavaa aluetta ihmisen immunologuliinin raskaan ketjun sitovan proteiinin mRNA:ssa, amplifioidaan kloonista pGEM5ZBiP5' käyttämällä PCR:ää. Sekvenssi joka vastaa BiP cDNA:ta, määritettiin alunperin ihmisen GRP78-geenistä bakteriofaagi lambda hu28-1-kloonissa (Ting ja Lee, DNA 7:275-286, 1988). Eteenpäin oleva aluke, jota käytettiin PCR-reaktiossa, vaihtelee riippuen Sindbis-vektorista, mihin BiP cDNA insertoidaan. Käänteisaluke PCR-reaktiolle on sama kaikille Sindbis-vektoreille. BiP cDNA-sekvenssin amplifikaatio pGEM5ZBiP5':stä plasmidista, joka on tarkoitettu insertioon Sindbis-vektoriin pKSSINBVd1JR, välittömästi myötävirtaan viallisesta liitosalueesta, saadaan aikaan amplifioimalla seuraavalla eteenpäin olevalla alukkeella:

5'-TAT ATG GGC CCG GTC GAC GCC GGC CAA GAC-3'
(SEQ.ID.Nro 24)

BiP cDNA:n komplementaaristen sekvenssien lisäksi alkaen nukleotidistä 12, alukkeessa on 5 nukleotidi "puskurisekvenssi" sen 5'-päässä PCR-amplikonituotteiden tehokasta entsyymin pilkkomista varten. Sekvenssin jälkeen on Apa I tunnistuskohta.

BiP cDNA-sekvenssin amplifikaatio pGEM5ZBiP5'-plasmidista insertoitavaksi Sindbis-vektoreihin pKSSINBV tai pKSSINBVd1-JRsjrc, saadaan aikaan amplifioimalla seuraavalla eteenpäin olevalla alla nähdyllä alukkeella. Näitä vektoreita varten BiP cDNA insertoidaan kahden heterologisen geenin väliin, jotka on asetettu alueella, joka vastaa Sindbis rakennegeenejä.

5'-TAT ATA TCG ATG GTC GAC GCC GGC CAA GAC-3'
(SEQ.ID.Nro 25)

BiP cDNA:n komplementaaristen sekvenssien lisäksi alkaen nukleotidistä 12, alukkeessa on 5 nukleotidin "puskurisekvenssiä" sen 5'-päässä PCR-amplikonituotteiden tehokasta

entsyymin pilkkomista varten. Sekvenssin jälkeen on Cla I tunnistuskohta.

BiP cDNA-sekvenssin amplifikaatio pGEM5ZBiP5'-plasmidista insertoitavaksi Sindbis-vektoreihin pKSSINBVd1JR, pKSSINBV tai pKSSINBVd1JRsjrc, on:

5'-TAT ATC CAT GGT GCC AGC CAG TTG GGC AGC AG-3'
(SEQ.ID.Nro 26)

BiP cDNA:n komplementaaristen sekvenssien lisäksi alkaen nukleotidistä 12, alukkeessa on 5 nukleotidin "puskurisekvenssi" sen 5'-päässä PCR-amplikonituotteiden tehokasta entsyymin pilkkomista varten. Sekvenssin jälkeen on Nco I tunnistuskohta.

BiP cDNA:n amplifikaatio pGEM5ZBiP5' saadaan aikaan PCR-protokollalla, jotka on kuvattu edellä:

Jotta insertoidaan pKSSINBVd1JR-vektoriin, 242 bp amplikoni pilkotaan Apa I:llä ja Nco I:llä, puhdistetaan 2 % agaroosigeelissä ja ligoidaan vektoriin, joka on pilkottu Apa I:llä ja Nco I:llä ja käsitelty CIAP:lla. ATG joka vastaa heterologisen geenin, joka on tarkoitus insertoida välittömästi myötävirtaan BiP cDNA-insertistä, aloituskodonia, modifioidaan sisältämään Nco I kohta (CCATGG).

Jotta insertoidaan pKSSINBV- tai pKSSINBVd1JRsjrc-vektoreihin heterologisten geenien väliin, 242 bp amplikoni pilkotaan Cla I:llä ja Nco I:llä, puhdistetaan 2 % agaroosigeelissä ja ligoidaan bikistroniseen heterologiseen geenivektoriin, joka on pilkottu Cla I:llä ja Nco I:llä ja käsitelty CIAP:lla. Bikistronisessa heterologisessa geenikonfiguraatiossa heterologisen geenin 3'-pää vastavirtaan modifioidaan loppumaan Cla I tunnistuskohtaan. ATG joka vastaa toisen myötävirtaan olevan heterologisen geenin, joka on tarkoitus insertoida välittömästi myötävirtaan BiP cDNA-insertistä, aloituskodonia, modifioidaan sisältämään Nco I-kohta (CCAT-

GG). Täten 5'-3' komponenttien järjestys on: pKSSINBV tai pKSSINBVd1JRsjrc-geeni #1-Cla/Nco BiP-geeni #2-3'SIN. Insertio kaikkiin modifioituihin liitosalueen vektoreihin, jotka on kuvattu esimerkissä 2, seuraa strategiaa, joka on annettu tässä pKSSINBV- tai pKSSINBVd1JRsjrc-vektoreille.

pKSSINBVd1JR-vektori, jossa on bikistroninen heterologinen konfiguraatio, rakennetaan jokaisen edellä kuvatun BiP cDNA-amplikonin kanssa. Ensimmäistä BiP cDNA-amplikonia reunustaa Apa I- ja Nco I-kohdat ja insertoidaan välittömästi myötävirtaan viallisesta liitosalueesta Apa I-kohdassa, kuten edellä on kuvattu. Tämän BiP cDNA-sekvenssin jälkeen tulee ensimmäinen heterologinen geeni, joka päättyy Cla I tunnistuskohtaan. Ensimmäisen heterologisen geenin jälkeen tulee toinen BiP cDNA-sekvenssi käyttämällä amplikonia, jota Cla I ja Nco I tunnituskohdat reunustavat. Toista heterologista geeniä seuraa toinen BiP-sekvenssi. Täten 5'-3' komponenttien järjestys on: SINBVd1JR-Apa/Nco BiP-geeni #1-Cla/Nco BiP-geeni #2-3'SIN.

Sekvenssit, jotka edistävät ribosomin läpilukua, laitetaan välittömästi myötävirtaan viallisesta liitosalueesta pKSSINBVd1JR-vektorissa, mikä sallii ribosomaalisen pyyhkäisykartoituksen genomisessa mRNA:ssa ei-rakennegeenin lopetuksesta heterologisiin geeneihin. Heterologisia proteiineja ekspressoidaan genomin pituiselta mRNA:lta ribosomaalisella pyyhkäisykartoituksella. Tämän pitäisi pidentää infektoidun kohdesolun elmää, koska subgenomista transkriptiota ei tapahdu soluissa, jotka on infektoitu tällä vektorilla. Lisäksi, nämä samat ribosomaaliset pyyhkäisykartoitussekvenssit laitetaan heterologisten geenien väliin, joita on polykistronisissa subgenomisissa mRNA:ssa. Ribosomaalinen pyyhkäisykartoitussekvenssi, jota on tarkoitus käyttää pKSDINBVd1JR-vektorissa ja heterologisten geenien välissä polykistronisella mRNA-alueella, on:

5'-TTA ATT AAC GGC CGC CAC CAT GG-3' (SEQ.ID.Nro 27)

Lihavat kirjaimet viittaavat ochre stop-kodoniin ja AUG aloituskodoniin, vastaavasti. Emäkset, jotka on alleviivattu ja jotka ympäröivät stop-kodonia, viittavat Pac I tunnistuskohtaan ja emäkset, jotka on alleviivattu, ja jotka ympäröivät aloitus-kodonia, viittavat Nco I tunnistuskohtaan. 15 bp kistronien välinen etäisyys aloitus- ja stop-kodonien välillä sallii tehokkaan ribosomaalisen läpiluvun, kuten edellä on esitetty (Levine et al., Gene 108:167-174, 1991). Sekvenssit, jotka ympäröivät ATG-aloituskodonin emäksistä -9-+1, vastaa Kozakin konsensus-sekvenssiä tehokasta translationaalista aloitusta varten (Kozak, Cell 44:283-292, 1986). Milloin mahdollista, 3'-terminaalinen nukleotidi, joka vastaa karboksi-terminaalista aminohappoa, vaihdetaan T:hen kohdistetulla mutageneesillä. Myös 5'-terminaalinen nukleotidi, joka vastaa amino-terminaalista aminohappoa myötävirtaan olevassa kistronissa, vaihdetaan G:hen kohdistetulla mutageneesillä.

Kistronien välisen sekvenssin insertio heterologisten geenien väliin myötävirtaan viallisesta liitosalueesta vektorissa pKSDINBVd1JR, joka on modifioitu kuten edellä kuvattiin, saadaan aikaan insertoimalla kaksijuosteinen, alla esitetty, oligonukleotidipari kompatiibeleihin Pac I/Nco I-päihin:

Lue läpi sense-oligonukleotidi:
5'-TAA CGG CCG CCA C-3' (SEQ.ID.Nro 28)

Lue läpi antisense-oligonukleotidi:
5'-CCA TGG TGG GGG CCG TTA AT-3' (SEQ.ID.Nro 29)

Edellä olevat oligonukleotidit sekoitetaan yhtä suurissa moolisissa määrissä 10 mM $MgCl_2$:n läsnäollessa, kuumennetaan 95°C:een 5 min, sitten annetaan jäähtyä hitaasti huoneenlämpötilaan tuottaen toivotun kistronin välisen sekvenssin, jota reunustaa Pac I- ja Nco I-kohdat. Kistronin välinen sekvenssi ligoidaan sitten sopivaan vektoriin, jossa on Pac I- ja Nco I-kompatiibelit kohdat.

Esimerkki 6

Moninkertaisten heterologisten geenien ekspression yhteispakkauksella

Kuten edellä huomautettiin eräässä, keksinnön näkökohdassa, Sindbis ei-rakenneproteiinigeenit ja rakenneproteiinigeenit voidaan pakata yhdessä erillisinä positiivi-sense RNA-molekyyleinä, jotka ylläpitävät niiden replikaatiokompetenssin, jos jokaisessa RNA:ssa on cis-toimivat sekvenssit, joita tarvitaan replikaatioon ja pakkaukseen. Siksi tässä näkökohdassa kaikki yhdessä pakatut Aura-virusfragmenttien pitäisi myös sisältää 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan Aura RNA:n transkription, Aura-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja ainakin yksi kopio RNA pakkaussekvenssiä. Ainakin yhden yhdessä pakatun RNA-molekyylin täytyy sisältää sekvenssit, jotka koodaavat Aura-viruksen ei-rakenneproteiineja. Keksinnön edullisissa suoritusmuodoissa yksi tai useampi RNA-fragmenteista, joka on tarkoitus yhteispakata, sisältää myös viruksen liitosalueen, jonka jälkeen on heterologinen geeni.

A. Yhdessä pakattujen ekspressiokasettien rakentaminen moninkertaiseen ekspressioon

1. Heterologiset geenit

Jotta osoitetaan yhdessä pakkaamisen mahdollisuus, jotta sallitaan moninkertaisten heterologisten geenien ekspressio, luotiin kaksi vektorirakennetta. Ensimmäinen rakenne koostuu 5'-sekvenssistä, joka kykenee aloittamaan Sindbis-virus RNA:n transkription, Sindbis RNA-sekvenssit, joita tarvitaan pakkaamiseen, sekvenssit jotka koodaavat ei-rakenneproteiineja 1-4, Sindbis liitosalue, luciferaasigeeni ja Sindbis 3'-sekvenssit, joita tarvitaan miinusjuosteisen RNA:n synteesiin. Toinen rakenne koostuu 5'-sekvenssistä, joka kykenee aloittamaan Sindbis-viruksen transkription, Sindbis liitosalueesta, Sindbis-sekvensseistä, joita tarvitaan pakkaamiseen, sekvenssit jotka koodaavat LacZ-geeniä ja Sindbis

3'- sekvenssit, joita tarvitaan miinusjuosteisen RNA:n synteesiin. Näiden rakenteiden RNA-transkriptit, jotka on transfektoitu pakkaussolulinjaan, pakataan yhdessä tuottamaan vektoripartikkeli, joka kykenee siirtämään molempien luciferaasin ja ß-galaktosidaasin ekspressiota samaan eukaryoottiseen soluun.

ß-galaktosidaasi raporttigeeni insertoidaan Sindbis perusvektoriin (pKSSINBV), jonka jälkeen on Sindbis ei-rakenneproteiinien osan deleetio vektorista. Tämän rakenteen RNA transfektoidaan yhdessä Sindbis luciferaasivektorin (pKSSINBV-luc) RNA:n kanssa ja pakataan yhdessä yhdellä alla kuvatuista menetelmistä. Tuoreiden BHK-21-solujen infektio vektoripartikkeleilla, joissa on yhdessä pakattuja RNA ekspressiokasetteja, pitäisi johtaa sekä luciferaasin ja ß-galaktosidaasin ekspressioon samassa solussa.

B. ß-galaktosidaasi ekspressiokasetin rakentaminen

LacZ-geeni saadaan pilkkomalla pSV-ß-galaktosidaasivektori DNA (Promega Corp., Madison, WI) entsyymeillä HindIII ja SalI. 3749 bp fragmentti, jossa on lacZ-geeni, puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä. Sen jälkeen tämä fragmentti ligoidaan pSP72-plasmidiin (Promega Corp.), joka myös pilkotaan Hind III:lla ja SalI:llä ja puhdistetaan käyttämällä Geneclean:ä (Bio101 Corp., San Diego, CA). Tämä rakenne tunnetaan pSP72-lacZ:na. Plasmidi pSP72 pilkotaan entsyymeillä XhoI ja XbaI ja 3667 bp lacZ:n sisältävä fragmentti puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä. Sitten tämä fragmentti ligoidaan pKSSINBV:hen, joka on myös pilkottu XhoI:llä ja XbaI:llä ja puhdistetaan käyttämällä Geneclean:ä. Tämä Sindbis-rakenne, jossa on lacZ, tunnetaan pKSSINBV-lacZ:na. Plasmidi pKSSINBV-lacZ pilkotaan myöhemmin AgeI-entsyymillä, joka katkaisee Sindbis ei-rakenneproteiinin geenisekvenssien nukleotidit 3172 ja 6922. Jäljelle jäävä vektorifragmentti puhdistetaan Geneclean:llä ja sen päät ligoidaan uudestaan. Plasmidissa on nyt 3750 bp deleetio Sindbis ei-rakenneproteiinigeeneissä,

mikä toiminnallisesti inaktivoi ne. Tämä rakenne tunnetaan pKSSINBVd1NSP-lacZ:na.

pKSSINBVd1NSP-lacZ:n ja pKSSINBV-luc:n SP6-transkriptit valmistetaan kuten edellä on kuvattu. Nämä RNA-transkriptit transferoidaan yhdessä pakkaussoluihin, jotka ekspressoivat Sindbis rakenneproteiineja yhdellä edellä kuvatuista menetelmistä. Jokaisessa RNA-transkriptissä on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan Sindbis-viruksen transkription, RNA-sekvenssit, jotka vaaditaan pakkaamiseen, Sindbis liitosalue, raporttigeeni, Sindbis 3'-sekvenssit, joita vaaditaan miinusjuosteen synteesiin. pKSSINBV-luc-transkripteissä on myös Sindbis ei-rakenneproteiineja. Yhdessä transfektoiduissa soluissa molemmat RNA-transkriptit replikoidaan ja joissakin viruspartikkeleissa on molemmat RNA-transkriptit pakattu yhdessä samaan partikkeliin. Tuoreiden solujen infektio yhdessä pakattujen RNA-partikkeleiden kanssa johtaa soluun, joka ekspressoi molempia luciferaasia ja ß-galaktosidaasia.

C.Moninkertaisetn ekspressiokasettien yhdessäpakkaaminen nostamaan pakkauskapasiteettiä

Suuret geenit, kuten Factor VIII saattaisivat hyötyä yhdessäpakkaamisesta. cDNA:n, joka koodaa Factor VIII:a, insertio Sindbis perusvektoriin (pKSSINBV) johtaa RNA-transkriptiin, joka lähestyy 16 kb pituudeltaan. Lisääntyneen pituuden takia tämä RNA ei voisi replikoida tai pakata tehokkaasti. Käyttämällä edellä kuvattuja lähestymistapoja Sindbis ei-rakenneproteiinit ja Factor VIII geeni voitaisiin jakaa erilliksi, noin 8 kb ja 9 kb pituudeltaan, RNA-molekyyleiksi ja pakata yhdessä samoihin partikkeleihin.

D. Factor VIII ekspressiokasetin rakentaminen

pKSSINBV-rakenne on pilkottu entsyymillä SacI, joka pilkkoo välittömästi Sindbis 3'-pään ja poly A-sekvenssin jälkeen.

Ulostyöntyvät 3'-päät tehdään tylpiksi lisäämällä T4 DNA-polymeraasientsyymiä ja dNTP:tä ja inkuboidaan 10 min 16°C:ssa. Pilkottu fragmentti puhdistetaan käyttämällä Geneclean:ä ja ligoimalla 12 nukleotidin itse-komplementaariseen linkkeriin (5'-GTCACCGGTGAC-3') (SEQ.ID.Nro 30), jossa on SgrAI tunnistuskohta. Tämä vaihe on tarpeellinen, koska Factor VIII-geenissä on useita SacI-kohtia ja SgrAI tunnistuskohta on korvattu Sac I-kohtaan, jotta luodaan kohta plasmidin linearisoimiselle ennen SP6-transkriptiota. Tämä rakenne tunnetaan pKSSINBV-SgrAI:nä. pKSSINBV-SgrAI-rakenne pilkotaan entsyymeillä XbaI ja NotI ja puhdistetaan käyttämällä Geneclean:ä. Factor VIII cDNA-sekvenssi saadaan pilkkomalla entsyymeillä XbaI ja NotI. 8 kb fragmentti, joka koodaa Factor VIII:a, puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä ja sen jälkeen ligoidaan XbaI/NotI-pilkottuun pKSSINBV-SgrAI:een. Tämä rakenne tunnetaan pKSSINBV-Fcator VIII:na. pKSSINBV-Factor VIII-rakenne pilkotaan Age I:llä, joka katkaisee Sindbis ei-rakenneproteiinit nukleotideistä 3172 ja 6922, jotka on puhdistettu käyttämällä Geneclean:ä ja ligoitu uudestaan itseensä. Rakenteella on nyt 3759 bp:n deleetio Sindbis ei-rakenneproteiineissa, mikä toiminnallisesti inaktivoi ne. Tämä rakenne tunnetaan pKSSINBVd1NSP-Fcator VIII:na.

pKSSINBVd1NSP-Factor VIII:n ja pKSSINBV:n SP6-transkriptit valmistetaan kuten edellä on kuvattu. Nämä RNA-transkriptit transferoidaan yhdessä pakkaussoluihin, jotka ekspressoivat Sindbis rakenneproteiineja yhdellä edellä kuvatuista menetelmistä. Jokaisessa RNA-transkriptissä on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan Sindbis RNA:n transkription, sekvenssit, jotka vaaditaan pakkaamiseen, Sindbis liitosalue, Sindbis 3'-sekvenssit, joita vaaditaan miinusjuosteen synteesiin. Lisäksi pKSSINBV-transkripteissä on myös Sindbis ei-rakenneproteiinigeenejä ja pKSSINBV-Factor VIII rakenne, jossa on Factor VIII-geeni, mutta ei Sindbis ei-rakenneproteiinigeenejä. Yhdessä transfektoiduissa soluissa molemmat RNA-transkriptit replikoidaan ja joissakin viruspartikkeleissa on molemmat RNA-transkriptit pakattu yhdessä samaan

vektoripartikkeliin. Tuoreiden BKH-21-solujen infektio yhdessä pakattujen RNA-partikkeleiden kanssa johtaa factor VIII-ekspressioon, vain jos molemmat RNA-molekyylit ovat läsnä samassa solussa.

E. Aura-viruksen yhdessäpakkausvektorin rakentaminen

Jotta kehitetään Aura-virusekspressiosysteemi, joka on analoginen niiden kanssa, jotka on kuvattu Sindbis:lle, alalla tunnettuja standarditestejä, samoin kuin spesifisiä lähestymistapaoja, jotka on kuvattu tässä patentissa, käytetään rakentamiseen. Virusta saa ATCC:stä, lisättyjä viljeltyjä soluja, sen virioni RNA uutettuna ja cDNA, joka ylettyy koko genomin yli, syntetisoituna ja kloonattuna käyttämällä tavanomaisia tekniikoita. Tätä cDNA:ta käytetään sitten rakentamaan geeninsiirtovektorisysteemejä, jotka ovat periaatteessa samanlaisia kuin Sindbis-patentissa on kuvattu, mukaanluettuna, mutta ei rajoittuen, replokoni joka kykenee kantamaan heterologista (heterologisia) geeniä (geenejä), pakaamaan solulinjat, jotka ekspressoivat rakenneproteiinigeenejä, erillinen pakkauskompetentti subgenominen vektori, joka kykenee kantamaan lisäksi tulevia (tulevaa) hetrologista (heterologisia) geeniä (geenejä). Koska Aura-viruksen subgenomisessa RNA:ssa on pakkaussignaali, täytyy suorittaa esikokeet tunnistamaan tämä sekvenssi, jotta estetään inaktivaatio sinä aikana, kun on korvaukset heterologisen (heterologisten) geenin (geenien) kanssa. Sen jälkeen kun tunnistettu pakkaussekvenssi tämän Aura-perusteisen systeemin yksilölliset elementit synnytetään.

Rakennetaan perusreplikonivektori, jolla on seuraavat minimivaatimukset: Aura 5′-sekvenssit, joita tarvitaan replikaatioon, ei-rakenneproteiinia koodaavat alueet, modifioitu tai ei-modifioitu liitosalue subgenomiseen mRNA-synteesiin, moninkertainen kloonauskohta heterologisen (heterologisten) geenin (geenien) insertiota varten, yksi tai useampi kopio pakkaussignaalista ja 3′-Aura-sekvenssit, jotka ovat tarpeelliset replikaatioon, polyadenylaattisekvenssi mukaanot-

taen. Replikon RNA:n in vitro transkriptioon käytetään vastavirran bakteriofaagi RNA polymeraasipromoottoria; vaihtoehtoisesti, käytetään eukaryoottista RNA-polymeraasipromottoria transkriptoimaan suoraan cDNA:sta.

Rakennetaan pakkauskompetentti subgenominen vektori, jolla on seuraavat minimivaatimukset: modifioitu tai ei-modifioitu liitosalue, moninkertainen kloonauskohta heterologisen (heterologisten) geenin (geenien) insertiota varten, yksi tai useampi kopio pakkaussignaalista ja 3'-Aura-sekvenssit, jotka ovat tarpeelliset replikaatioon/miinusjuosteen synteesiin, polyadenylaattisekvenssi mukaanlukien. Subgenominen vektori voidaan joissakin tapauksissa rakentaa Aura 5'-replikaatiosekvensseillä, jotka on asetettu liitosalueesta vastavirtaan, siten että vektori toimii kuten amplikoni. Subgenomisen vektori RNA:n transkriptio saadaan aikaan in vitro käyttämällä bakteriofaagi RNA-polymeraasipromoottoria tai cDNA:ta in vivo käyttämällä eukaryoottista RNA polymeraasipromoottoria. Lisäksi alkuperäinen transkripti voi olla sense-konfiguraatiota tai antisense-konfiguraatiota.

Solulinjojen pakkaus tehdään kuten edellä on kuvattu Sindbis-vektoreille, siten että mRNA yhdelle tai useammalle rakenneproteiinille transkriptoidaan liitosalueesta ja indusoituu Aura-replikonista. Muissa tapauksissa yhtä tai useampaa rakenneproteiineista ekspressoidaan indusoituvan tai konstitutiivisen eukaryoottisen promoottorin kontrollin alaisena. Jokaisessa tapauksessa spesifiset inaktivoivat mutaatiot tehdään missä tahansa pakkaavissa sekvensseissä, joita on rakenneproteiinigeeneissä, jotta estetään näiden sekvenssien kapseloituminen replikonin kanssa. Nämä mutaatiot ovat hiljaisia muutoksia, tavallisesti kodonin kolmannessa asemassa, mikä ei vaikuta koodattuun aminohappoon.

Kykyä pakata monenlaisia heterologisia geenejä käytetään hyväksi monissa terapeuttisissa sovellutuksissa, joihin sisältyvät, mutta ei rajoitu, moninaisten sytokiniinien, moni-

naisten CTL-epitooppien, sytokiniinien ekspressio ja CTL-epitooppien yhdistelmä lisäämään immuunin esittämistä, terapeuttisen proteiinin moninaisten alayksiköiden, terapeuttisten proteiinien ja antisense RNA:n kombinaatioiden, jne. ekspressio. Sen hyödyllisyyden lisäksi ekspressoimaan monenlaisia heterologisia geenejä, subgenomisten mRNA:n pakkaaminen virioneihin auttaa myös tätä vektorisysteemiä siirtämään äärettömän pitkiä heterologisia sekvenssejä, mikä saattaisi olla mahdotonta muissa alfa-virussysteemeissä. Lisäksi tämä moniosainen lähestymistapa saattaa olla hyödyllinen tuottajasolulinjojen kehittämisessä, jolloin replikaasiproteiineja ja rakenneproteiineja ekspressoidaan stabiilisti ja mikä tahansa heterologinen geeni, joka on subgenomisessa vektorissa, voitaisiin sitten viedä stabiilina integraattina.

Esimerkki 7

Sindbis-virus pakkaussolulinjojen rakentaminen

Eräs lisäsuoritusmuoto Sindbis-geeninsiirtosysteemistä koskee Sindbis pakkaussolulinjojen kehittämistä. Koska normaali Sindbis replikaatiosykli tapahtuu kokonaan sytoplasmassa, eräs lähestymitapa luoda Sindbis pakkaussolulinjasysteemi on modelloida systeemi sen luonnollisen replikaatiosyklin jälkeen. Käyttämällä tätä lähestymistapaa Sindbis on suunniteltu pakkaussolulinjasysteemi, jolloin viruksen rakenneproteiinit, toimitettu in trans yhdeltä tai useammalta stabiililta integroidulta ekspressiovektorilta, kykenevät kapseloimaan transfektoidut tai transdusoidut vektori RNA-transkriptit sytoplasmassa ja vapauttamaan infektiiviset pakatut vektoripartikkelit solumembraanin läpi, täten luoden Sindbis-vektorin tuottajasolulinjan. Sindbis RNA vektorimolekyylit, jotka kykenevät replikoitumaan solun sytoplasmassa, tuottaa alunperin T7 RNA polymeraasisysteemi, jota on käytetty transkriptoimaan in vitro cDNA-vektoriklooni, joka koodaa kiinnostusken kohteena olevaa geeniä ja Sindbis ei-rakenneproteiineja (kuvattu edellä). Vektori RNA-transkriptit transfektoidaan Sindbis pakkaussolulinjaan siten, että vektori RNA replikoi runsaasti ja viruksen rakenneproteiinit

pakkaavat sen jälkeen tuottaen infektiivisiä vektoripartikkeleita. Sindbis cDNA-molekyylin jatketun pituuden takia in vitro transkriptioprosessi on tehoton. Lisäksi vain fraktio soluista, joita on yksinkertaisessa kerroksessa, transfektoidaan tyypillisesti useimmilla menetelmillä. Yrityksenä optimoida vektorin tuottosolulinjan tehokkuutta ja tiitteriä, suoritetaan kaksi peräkkäistä geenisiirron sykliä. Mieluummin kuin transfektoidaan suoraan Sindbis RNA-vektorimolekyylit tuottajasolulinjaan, vektori transfektoidaan ensin primääriseen Sindbis pakkaussolulinjaan. Transfektoitu solulinja erittää infektiivisiä vektoripartikkeleita viljelmäsupernatantteihin ja nämä infektiiviset supernatantit käyteteään sitten transdusoimaan tuore Sindbis pakkausolujen yksinkertaisen kerros. Sindbis-vektorin transduktio pakkausolulinjaan on edullisempi kuin transfektio sen korkeamman RNA: soluihin siirtotehokkuuden takia ja optimoidun vektorin biologisen asettamisen takia solussa. Tämä johtaa pakatun infektiivisen Sindbis-vektorin korkeampaan ekspressioon ja korkeampaan tiitteriin.

Tapauksessa, että tuotetut Sindbis-vektoripartikkelit epäonnistuvat transdusoimaan samaa pakkaussolulinjaa, koska solulinja tuottaa solunulkopuolisia kuoriproteiineja, jotka blokkaavat Sindbis-vektorin kiinnitymisen solureseptorit, täytyy luoda toisen tyyppinen Sindbis-viruspartikkeli, joka kykenee transdusoimaan Sindbis pakkaussolut. Pakkaussolulinjan, joka tunnetaan "hyppivänä solulinajan", täytyy tuottaa tämän toisen tyyppinen viruspartikkeli, joka tuottaa transient vektoripartikkeleita seurauksena siitä, että on transfektoitu in vitro transkriptoidulla Sindbis RNA-vektoritranskripteillä. Hyppivä solulinja manipuloidaan ohjaamaan uudestaan transient tuotettujen vektoripartikkeleiden reseptorihakuisuutta antamalla vaihtoehtoisia viruksen kuoriproteiineja, jotka ohjaavat uudestaan Sindbis-vektorit erilaisille solureseptoreille prosessissa, jota nimitetään pseudotyypitys. Tällä hetkellä on keksitty kaksi lähestymistapaa Sindbis-vektoripartikkelin pseudotyypitykselle. Ensimmäinen lähestymistapa koostuu Sindbis pakkaussolulinjan rakkulaisen

suutulehduksen virus G-proteiinin (VSV-G) ekspressoimisesta. Meillä VSV-G pseudotyypitys on aikaisemmin toiminut hyvin ohjaaman uudestaan retrovirusvektoreiden reseptorihakuisuutta ja on osoitettu infektoivan suurta määrää solutyyppejä. Toinen lähestymistapa tuottaa pseudotyypitetty Sindbis-vektoripartikkeli, on käyttää tällä hetkellä saatavilla olevia retroviruspakkaussolulinjoja, joissa on retrovirus gal-/pol- ja env-sekvenssit, jotka kykenesivät pakkaamaan Sindbis RNA-vektorin, jossa on retrovirus pakkaussekvenssi.

Sindbis pakkaussolulinjan suunnittelu luonnollisen Sindbis-virussyklin mukaan, pitäisi johtaa solulinjaan, joka tuottaa suuret määrät geenieksprессiota, joka perustuu lukuisiin RNA-molekyyleihin, joita on saatavilla translaatioon, joita luodaan replikoivasta RNA-molekyylistä. Toisaalta positiivijuosteiset RNA-virukset ovat taipuvaisia tuottamaan vialliisesti vuorovakuittavia RNA:ta, jotka saattavat olla taipuvaisia muuttamaan RNA-vektoria, täten vähentäen vektoripartikkeleiden kokonaistehokkuutta ja mikä voi myös laskea ekspression korkeita tasoja pidennettyjen viljelmäjaksojen aikana. Siksi toinen lähestymistapa on keksitty, missä stabiilisti integroitua DNA-ekspressiovektoria käytetään tuottamaan Sindbis-vektori RNA-molekyyli, joka kuten ensimmäisessä lähestymistavassa, ylläpitää kykyä replikoitua itse. Tämä lähestymistapa sallii jatkuvan vektoriekspression pitkien viljelyaikojen yli, koska integroitu DNA-vektoriekspressiosysteemi ylläpidetään lääkkeen selektiomarkkerin läpi ja DNA-systeemi ekspressoi jatkuvasti muuttumattomia RNA-vektoreita, joita vialliset RNA-kopiot eivät voi laimentaa. Tässä tuottajasolukonfiguraatiossa DNA-perusteinen Sindbis-vektori tuodaan alunperin pakkaussolulinjaan transfektiolla, koska kokorajoitukset voisivat estää ekspressiovektorin pakkaamisen viruksen vektoripartikkeliin transdusiota varten. Myös tätä konfiguraatiota varten plasmidin T7 RNA polymeraasin tunnistuskohta, aikaisemmin käytetty transkriboimaan vektori-RNA, korvataan toisella sopivalla promoottorisekvenssillä, jonka käytetty kantasolulinja määrää. Tässä plasmidisekvenssissä olisi myös selektiomarkkeri, joka olisi

erilainen kuin ne, joita käytetään luomaan pakkaussolulinja.

Sindbis-proteiinien ja/tai replikoni RNA:n ekspressio tietyillä tasoilla saattaa johtaa sytotoksiin vaikutuksiin pakkaussolulinjoissa. Siksi joissakin tapauksissa voi olla toivottavaa näille elementeille ekspressoitua vasta sen jälkeen kun solut on lisätty tiettyyn kriittiseen tiheyteen. Tätä tarkoitusta varten tehdään lisämodifikaatioita, jolloin rakenneproteiinit, jotka ovat tarpeellisia pakkamiseen, syntetisoidaan vasta RNA-vektorin itsensä induktion tai jonkun toisen ärsykkeen jälkeen. Myös jotkut modifikaatiot sallivat näiden proteiinien yksilöllisen ekspression erillisten indusoituvien elementtien kontrollin alaisena käyttämällä ekspressiovektoreita, jotka irroittavat geenit, jotka koodaavat näitä proteiineja. Lisäksi integroidun vektorimolekyylin itsensä ekspressiota voidaan kontrolloida vielä eräällä toisella indusoituvalla systeemillä. Tämä konfiguraatio johtaa induktion jälkeisten tapahtumien ryöppyyn, mikä äärimmäisesti johtaa pakattujen vektorimolekyylien tuottoon.

A. Kantasolulinjan valitseminen Sindbis pakkaussolulinjan kehittämiseen

1. Toistuvasti tai kroonisesti infektoituvat solut

Eräs tärkeä kriteeri valita mahdollisia kantasolulinjoja luomaan Sindbis pakkaussolulinjat, on solulinjojen, jotka eivät lyysaa Sindbis-vektoria replikaation tai tuoton aikana, valinta. Tämä kriteeri on olennaista Sindbis-vektorin tuottosolulinjan kehittämiselle, jota voidaan lisätä pitkät aikajaksot ja käyttää stabiilina vektorilähteenä. Tiedetään, että useimpien nisäkässolujen Sindbis-infektio johtaa solun lyysaukseen; kuitenkin erilaisten hyönteissolulinjojen käytön pitäisi kiertää tämä ongelma. Esimerkkinä sääsken Aedes albopictus-solujen infektio Sindbis-viruksella johtaa pysyvään tai krooniseen ei-sytopaattiseen viruskasvuun, jossa infektoidut solut jäävät eläviksi ja jatkuvasti levittävät virusta. Muut hyönteissolulinjat, kuten Aedes aegypti, Spodoptera frugiperda ja Drosophila melanogaster solulinjojen

pitäisi myös esittää samaa pysyvää infektiota. Siksi Sindbis pakkaussolulinjakonfiguraatio käyttää hyönteiskantasolulinjaa, kuten Aedes albopictus tai Drophila solulinja, joissa on stabiilisti transfektoitu ekspressiovektori, joka ekspressoi Sindbis rakenneproteiineja indusoituvien tai ei-indusoituvien promoottorien, jotka ovat aktiivisia näissä solutyypeissä, kontrollin alaisena, ja ekspressoi yhtä aikaa selektoitavaa markkeria.

Äskettäin Sindbis-virusinfektoitu proteiini, joka oli solusta lähtöisin, joka on liitetty yhteen Sindbis-virustuoton alassäätelyn kanssa, on tunnistettu ja puhdistettu (Virology 194:44). Proteiini on pieni hydrofobinen peptidi, noin 3200 Da, joka voi indusoida antivirus-tilan ja inhiboida sekä 49 S:ää että 26S virus RNA-synteesiä. Solut, joita on käsitelty antiviruspeptidillä, osoittavat tavallisesti solujakaantumisen lepotilassa olevan keskeyttämisen 96 h ei-infektoidussa soluissa ja sitten normaalit kasvunopeudet palautetaan. Solut, jotka ovat olleet alttiita tälle peptidille ennen infektiota, eivät kykene replikoimaan Sindbis-virusta ja näyttävät ylläpitävän tämän fenotyypin jatkuvasti tuottamalla antivirusproteiinia 10 kk jatkuvan pasaasin läpi.

On huomattu, että tämä solun vaste Sindbis-infektiota vastaan Aedes albopictus-soluissa saattaisi vähentää optimaalista rekombinantti Sindbis-vektorin tuottosysteemin tehokkuutta. Jotta parannetaan Sindbis-vektorin tuottosysteemin tehokkuutta, on keksitty kaksi menetelmää inaktivoimaan virus-indusoitu solun antivirusproteiini, täten estäen vektoripartikkelitiitterien minkä tahansa alenemisen. Ensimmäinen menetelmä tuo mukanaan tämän edellä kuvatun solun proteiinin puhdistuksen ja primäärisen aminohapposekvenssin annoksen määrittämisen sen karboksipäästä käyttämällä alalla olevia tunnettuja tekniikoita. Saatu aminohapposekvenssi käytetään sitten johtamaan mahdollisia vastaavia genomisia sekvenssejä, tehden mahdolliseksi suunnitella degeneroitunut PCR-alukepari, jota voidaan käyttää amplifioimaan spesifistä solusekvenssiä. Tämä amplifioitu sekvenssi kloonataan sitten

käyttämällä alalla tunnettuja standarditekniikoita, jotta saadaan tätä inhibitoorista proteiinia koodaavan geenin erillinen alue. Tämän kloonin nukleotidisekvenssin määrittäminen tekee sitten mahdolliseksi suunnitella vektori, joka integroituu nimenomaan tämän Sindbis inhibitooriseen geeniin homologisella rekombinaatiolla ja "tyrmätä" sen kyky ekspressoida toiminnallista proteiinia. Kloonit, joissa on tyrmäys-sekvenssi, voidaan valita insertoimalla selektoitava markkeri inhibitooriseen proteiinin erilliseen kloonattuun alueeseen ennen solujen transfektiota tämän vektorin kanssa.

Toinen menetelmä vaurioittaa tämä Sindbis-viruksen inhibitoorinen proteiini, sisältää Aedes albopictus-solujen mutageneesin, esimerkiksi BUDR:n (5-bromodesoksiuridiini) kanssa. Tämä mutagenisoitu pakkaussolulinjapopulaatio infektoidaan sitten Sindbis-vektorilla, joka kykenee ekspressoimaan neomysiiniresistenssimarkkeria. Korkeilla G418-lääkkeen konsentraatioilla vain ne solut, jotka tuottavat suuria määriä Sindbis-vektoria ja ovat täten kykenemättömiä ekspressoimaan Sindbis inhibitoorista geeniä, kykenevät selviytymään. Selektion jälkeen resistentit pesäkkeet kerätään, laimennuskloonataan ja Sindbis-tuoton korkea tiitteri testataan.

2. Solujen modifikaatio vähentämään alttiutta Sindbis-ekspressiolle: apotosis supressio

Vaikka useimmat nisäkässolulinjat lyysautuvat Sindbis-virusinfektion aikana, äskettäiset kokeet ovat osoittaneet lyyttisen Sindbis-infektion muuntumisen jatkuvaksi rotan eturauhasen syöpä- (AT-3) solulinjassa. Tämä muuttuminen suoritettiin ekspressoimalla jatkuvasti bcl-2 oncogeenin tuottoa solulinjassa ennen Sindbis-infektiota. AT-3-solujen, jotka ekspressoivat bcl-2 oncogeeniä, Sindbis-infektio johtaa viruksen, jolla ei ole selvää sytopatologiaa (Nature 361:739), tuottoon. Tämä solulinjan modifikaatio voisi osoittautua hyödylliseksi muuttamaan solulinjoja, kuten koiran solulinjat D-17 ja Cf2; ihmisen solulinjat HT1080 ja 293; viiriäisen solulinja QT-6; hamsterin poikasen munuais-

solulinja BHK-21; hiiren neuroblastomasolulinja N18; ja rotan eturauhasen syöpä AT-3, jatkuvasti infektoitavaan tilaan käytettäväksi mahdollisina Sindbis pakkaus- ja tuottajasolulinjoina, samalla lailla kuin retroviruksen tuottajalinjat.

bcl-2 oncogeenin retroviruseksprессiovektori on kuvattu aikaisemmin (Nature 361:739). Uusi bcl-2 ekspressiovektori on rakennettu käyttämällä standardeja, alalla tunnettuja rekombinantti DNA-tekniikoita insertoimaan 910 emäsparin EcoRI cDNA-fragmentti, joka on johdettu plasmidista p84 (Nature 336:259) mihin tahansa kaupallisesti saatavilla olevaan ekspressiovektoriin, jossa on jatkuva promoottori, ja joka koodaa selektoitavaa markkeria. Huomioon täytyy ottaa varovainen harkinta, jotta vältetään kaikenlainen homologia Sindbis nukleiinihapposekvenssien ja muiden transdusoitujen vektoreiden välillä. Tämä varokeino pitäisi ottaa huomioon, jotta estetään rekombinaatiotapahtumat, jotka saattavat johtaa ei-toivottuun selektoitavien markkereiden tai rekombinantti Sindbis-partikkeleissa olevan bcl-2 oncogeenin ei-toivottuun pakkaukseen. Tämä on tärkeä kohta tehdä, koska Sindbis-vektorisysteemi, joka tässä on kuvattu, on suunniteltu käytettäväksi biologisena terapeuttisena aineena. Kun bcl-2 ekspressiovektori kerran on suunniteltu, kantanisäkässolulinja (so. BHK-21 solut) transfektoidaan käyttämällä mitä tahansa standarditekniikkaa ja selektoidaan sopivaa markkeria. Resistenssit pesäkkeet kerätään sitten, jonka jälkeen laimennuskloonataan. Yksittäisiä klooneja lisätään sitten ja seulotaan bcl-2-ekspressiota. Kun ekspressio kerran on varmistettu, pysyvä Sindbis-infektio testataan, jonka jälkeen sitä käytetään kantasolulinjana Sindbis pakkaussolulinjan kehittämiselle.

BHK-21-solujen Sindbis-infektio johtaa morfologisiin muutoksiin ja DNA-fragmentaatio on mallina apoptosis-diagnoosille ja lyyttisen muuttuminen jatkuvaksi infektioksi bcl-2 oncogeenillä voidaan välittää tämän ohjelmoidun solukuoleman supressiolla (Nature 361:739). Lisäksi nisäkässolujen infektio muilla viruksilla, mukaanluettuna adenovirus, Polyomavi-

rus, SV40 ja HIV ovat johtaneet sytotoksisuuteen johtuen apoptosiksesta. Siksi muut geenituotteet, bcl-2 oncogeenin lisäksi, jotka supressoivat apoptosista, olisivat toivottavaia ekspressioon Sindbis pakkaus- tai tuottajasolulinjassa. Alunperin kolme virusgeeniä, osoitettu supressoivan apoptosista, ekspressoituu Sindbis pakkaussolulinjoissa: adenovirus E1B-geeni, joka koodaa 19 kD proteiinia (Rao et al., PNAS 89:7742-7746, 1992), herpes simplex virustyyppi I g_1 34,5 geeni (Chou ja Roizman, PNAS 89:3266-3270, 1992) ja AcMNPV baculovirus p35 geeni (Clem et al., Science 254:1388-1390, 1991). Yksittäiset geenit insertoidaan plasmidi-ekspressiovektoreihin konstitutiivisten eukaryoottisten transkriptionaalisten promoottorien kontrollin alaisena ja sisältäen selektoitavan markkerin käyttämällä alalla tunnettuja standarditekniikoita. Nämä ekspressiovektorit transfektoidaan sen jälkeen solulinjoihin, kuten edellä on kuvattu, ja käytetään sopivaa selektiota. Näiden geenien stabiilin integraation selektio ja niiden tuotteiden konstitutiivisen ekspression pitäisi sallia pidennettyä vektorituottoa solulinjoissa, joiden tiedetään olevan alttiita Sindbis-indusoidulle apoptosisille tapahtumille. Lisäksi on toteutettavissa olevaa, että jokainen geenituote voi inhiboida apoptosista omalla ainutlaatuisella mekanismillaan. Siksi geenit viedään myös pakkaussolulinjoihin erilaisina yhdistelminä, jotta saadaan voimakkaampi supressiivinen vaikutus. Lopuksi muita geenituotteita, joilla on samanlaiset vaikutukset apoptosikseen voidaan helposti liittää pakkaussolulinjoihin, kuten ne on keksitty.

Sindbis-vektorin tuottajasolulinjojen johtamisessa on ehdotettu monia lähestymistapoja kontrolloimaan virusgeenien ekspressiota siten, että tuottajasolulinjat, jotka on stabiilisti transformoitu sekä vektorilla että vektoripakkauskaseteilla, voidaan johtaa. Näihin lähestymistapoihin kuuluvat indusoituvat ja/tai solun erilaistumisen sensitiiviset promoottorit, antisense rakennegeenit, heterologiset kontrollisysteemit ja sääski ja muut solut, joissa viruksen pysyvät infektiot saadaan aikaan. Mikä tahansa Sindbis-vekto-

rin tuottajasolulinja, näyttää selvältä että pysyvän infektion perustaminen tai ainakin viivytys solukuolemassa virusgeeniekspression tuloksena, lisääntyisi inhiboimalla apoptosista. DNA tuumorivirukset, adenovirus, HPV, SV40 ja hiiren polyomavirus (Py) mukaanluettuna, transformoivat soluja osittain sitoutumalla ja inaktivoimalla retinoblastoma (Rb) geenituotteen p105 ja sen kanssa läheisesti yhteenkuuluvan geenituottene p107 ja muut geenituotteet, jotka liittyvät solukierron kontrolliin, sykliini A, $p33^{cdk2}$ ja $p34^{cdc2}$ mukaanluettuina. Kaikki nämä virukset, paitsi Py, kodaavat geenituotteita, jotka sitoutuvat ja inaktivoivat p53:n. Erikoisesti, Py koodaa keski T-antigeeniä (mT), joka sitoutuu ja inaktivoi membraanityrosiinikinaasin, src:n ja myös fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasin, jota tarvitaan tämän viruksen täyteen transformaatiopotentiaaliin (Talmage et al., Cell 59:55-65, 1989). Resessiivisiin oncogeenisiin tuotteisiin Rb:hen ja p53:een sitoutuminen ja inaktivointi estää solua, joka on transformoitu näillä DNA tuumoriviruksilla, menemästä apoptotiselle reitille. Tiedetään, että p53 kykenee pysäyttämään solujen jakaantumisen, osittain inhiboimalla proteiinien, jotka liittyvät solun lisääntymiseen, ekspression, c-fos, hsc70 ja bcl-2 mukaanluettuina (Miyashita et al., Cancer Research 54:3131-3135, 1994).

Jotta pidennetään Sindbis-viruksen tuoton kestoa tai mahdollisesti edistetään pysyvää Sindbis-infektiota, transformoidaan pakkaussolut viruksen genomisella DNA:lla Py:ltä tai SV40:ltä. Tiedetään hyvin, että hiiren ja kädellisten DNA tuumorivirukset Py ja SV40, vastaavasti, saavat aikaan helposti stabiilin transformaation soluissa lajeista, jotka ovat muita kuin luonnollinen isäntä. Sellaisissa ei-permissiivisissä soluissa, esimerkiksi ne jotka on johdettu hamsterista, nämä virukset eivät kykene replikoimaan johtaen viruksen aikaisen alueen ekspressioriippuvaan (esim. T-antigeeni) integraatioon (katso kappale 19, Benjamin ja Vogt, Fields Virology, teos 1). SV40 ja Py T-antigeenejä ekspressoidaan konstitutiivisesti näissä transformoiduissa hamsterisoluissa.

Perustetaan SV40- ja Py-transformoidut solulinjat ja määritetään Sindbis-tuoton ja sytopatologian kinetiikka ja taso virusinfektion jälkeen. Jos apoptiset tapaukset, jotka ovat luonteenominaisia Sindbis-lisääntymiselle hamsterin soluissa, vähenevät, jokainen prototyyppi Sindbis pakkaussolulinja transformoidaan sen jälkeen Py:llä tai SV40:llä, jotta lisätään pakatun vektorin saantoa näistä soluista.

3. Solujen modifikaatio vähentämään alttiutta Sindbis-ekspressiolle: aktivaatioriippuvaisten vektoripartikkeleiden tuotto

Sindbis E2 glykoproteiini syntetisoidaan prekursorina PE2. Tämä prekursori PE2 ja toinen virusglykoproteiini E1 liittyvät solulimakalvostoon ja prosessoidaan ja kuljetetaan infektoituun solumembraaniin heterodimeerinä virionin mukaanliittymisestä. Jossakin kohtaa tätä prosessointia PE2 pilkotaan E3:ksi ja valmiiksi E2:ksi. E3 on PE2:n 64-aminoterminaalinen jäännös ja kadotetaan solunulkopuoliseen tilaan valmistumisen aikana. Suurempi pilkkomistuote E2 on liittynyt yhteen E1:n kanssa ja ankkuroitunut siihen, mistä tulee viruksen kuori. Isäntäsolun proteaasi on vastuussa prekursorina PE2:n prosessoinnista pilkkomalla kohdasta, joka on välittömästi erittäin säilyneen kanonisen neljän aminohapon (aa) jäännöksen aihelman jälkeen, perus-X-perus-perus aa:t. Mutanttisolulinja, joka on johdettu CHO-K1-kannasta, jota merkitään RPE.40 (Watson et al., (1991) J. Virol. 65:2332-2339), on viallinen Sindbis-viruskannan AR339 tuotossa olemalla kykenemätön prosessoimaan PE2-prekursoria E3- ja valmiiseen E2-muotoihin. Sindbis-virionien kuoret, jotka tuotettiin RPE.40-solulinjassa, sisältävät sen vuoksi PE2/E1 heterodimeerin. RPE.40-solut ovat ainakin 100-kertaa resistentimpiä Sindbis-virusinfektiolle kuin CHO-K1-solut, antaen olettaa että PE2:lla, jossa on virioneja, on tehottomuus solujen infektiokyvyssä. Nämä vialliset virionit, joita RPE.40-solulinja tuottaa, voidaan muuntaa täysin infektiiviseksi muodoksi käsittelemällä trypsiinillä.

Pakkaus- tai tuottajasolulinjoissa mikä tahansa villityypin virus, joka tuotetaan rekombinaatiolla, infektoi solut uudestaan ja amplifioidaan nopeasti; täten merkittävästi kontaminoiden pakkausvektorivalmisteita. Tuottajasolut, jotka ovat kehittyneet RPE.40-linjasta, olisivat merkittävä parannus verrattuna muihin linjoihin, jotka ovat permissiivisiä Sindbis-virusinfektiolle johtuen niiden minkä tahansa villityypin viruksen, joka on tuotettu vektorin tuoton ja pakkauksen aikana, tehottomasta amplifikaatiosta. Täten vektorivalmisteet eivät ole merkittävästi kontaminoituneet villityypin viruksesta. Lisäksi tätä systeemiä voidaan laajentaa muihin solulinjoihin kehittämällä "tyrmäys"-mutantteja analogisessa solun proteaasissa.

4. Hyppivän solulinjan kehittäminen

Sindbis hyppiviä solulinjoja, kuten edellä keskusteltu, käytetään väliaikaisesti tuottamaan infektiivisiä RNA-vektoripartikkeleita, jotka on pseudotyypitetty erilaiseen solureseptorihakuisuuteen. Kun hyppivä solulinja kerran tuottaa vektoripartikkeleita, sitä ei enää tarvita koska tarvitaan vain infektiivisiä viljelmäsupernatantteja transdusoimaan alkuperäiset edellä keskustellut Sindbis pakkaussolulinjat. Siksi hyppivällä solulinjalla ei tarvitse olla pysyvää infektiota Sindbis:ssä, jotta väliaikaisesti tuotetaan vektoripartikkeleita. Tässä tapauksessa kantasolulinja voi olla joko hyönteissolulinja, jolla on pysyvä infektio, tai nisäkässolulinja, joka todennäköisesti lysaa 72 h tuottavan Sindbis-infektion jälkeen. Ainoa kriteeri on, että solulinjat kykenevät ekspressoimaan ja prosessoimaan Sindbis rakenneproteiineja samalla ekspressoiden yhtä aikaa joko VSV-G-proteiinia tai retrovirus gag-pol- tai env-proteiinia ilman että vaikutetaan solun kasvuun ennen Sindbis RNA-vektoritransfektiota. Siksi Sindbis hyppivä solulinja voi olla mikä tahansa edellä mainittu kantasolulinjoista, joka kykenee kannattamaan joko Sindbis- tai retrovirusreplikaatiota ilman solun lisämodifikaatioita, kuten edellä on keskusteltu, kuten bcl-2 oncogeenieksPressio.

VSV-G-pseudotyypitetyn Sindbis-vektorin luominen vaatii Sindbis-vektori-RNA:n, joka on transkriptoitu in vitro, tai DNA:n samanaikaisen transfektion, yhdessä vektori pMLP-G:n kanssa, mikä ekspressoi VSV-G-kuoren proteiinia, Sindbis pakkaussolulinjaan. Solukasvuolosuhteet ja transfektiomenetelmät on kuvattu otsikossa "komponenttien kokoaminen" ja mitä tahansa kuvattua pakkaussolukonfiguraatiota käytetään. Supernatantit, joissa on VSV-G pseudotyypitetty Sindbis-vektori, kerätään 24 h transfektion jälkeen ja käytetään sitten transdusoimaan identtisen Sindbis pakkaussolulinjan tuoretta yksinkertaista kerrosta voittamaan vähenemisen transduktiotehokkuudessa.

Sindbis-vektorien pseudotyypittämistä varten retrovirus pakkaussolulinjoissa, mitä tahansa solulinjaa, johon kirjallisuudessa on viitattu, joka ekspressoi retrovirus gag-pol- ja env-sekvenssejä, voidaan käyttää pakkaamaan Sindbis RNA-vektori, joka on tehty sisältämään retroviruspakkaussekvenssi. Retrovirus psi pakkaussekvenssi insertoidaan inaktivoidun liitosalueen ja synteettisen liitosalueen peräkkäisen pätkän väliin siten, että retroviruskuoriproteiinit pakkaavat vain genomisen pituuden vektoria, eikä subgenomista RNA:ta. Retroviruspartikkelit, joita on Sindbis-vektori RNA:ssa, tuotetaan transfektoimalla in vitro transfektoitu Sindbis-vektori RNA käyttämällä menetelmiä, jotka on aiemmin kuvattu. Supernatantit, joissa on pseudotyypitetyt retroviruspartikkelit, joissa on Sindbis RNA-vektori, kerätään 24 h transfektion jälkeen ja näitä supernatantteja käytetään sitten transdusoimaan identtistä Sindbis pakkaussolulinjaa.

B. Rakenneproteiiniekspressiorakenteet

1. Indusoituvat ja konstitutiiviset rakenneproteiinivektorirakenteet

Sindbis pakkaussolulinjojen kehittäminen riippuu kyvystä syntetisoida tarpeellisia rakenneproteiineja korkeat solunsisäiset tasot: kapsidi, E2 ja E1. Valitettavasti näiden proteiinien, erityisesti kuoriglykoproteiinien E2 ja E1,

korkean tason ekspressio saattaa johtaa samanaikaiseen sytopatologiaan ja todennäköisesti solukuolemaan. Siksi rakenneproteiinieksressiokasetteja on suunniteltu, joissa on indusoituvat säätelyelementit, jotka kontrolloivat geenieksspression tasoja, muiden lisäksi, jotka ylläpitävät ekspression konstitutiiviset tasot.

Ensimmäisessä konfiguraatiossa Sindbis rakenneproteiinieksspressio on RSV LTR:n kontrollin alaisena, yhdessä indusoituvan lac-operonisekvenssien kanssa. Tämä saavutetaan insertoimalla Sindbis cDNA, joka vastaa viruksen rakenneproteiinigeeniä, pOP13- ja pOPRSV1-vektoreihin (Stratagene). Nämä vektorit, joita käytetään erikseen, transfektoidaan yhdessä p3'SS-vektorin kanssa (Stratagene), joka ekspressoi lac-repressorin "i"-proteiinia. Indusorin puuttuessa, esimerkiksi isopropyyli-B-D-tiogalaktopyranosidi (IPTG), perus- tai konstitutiivinen taso luciferaasiraporttigeenin ekspressiota on raportoitu olevan 10-20 kopiota/solu. IPTG:n lisäksi repressoriproteiinin konformationaalisen muutoksen tulokset, joka johtaa vähentyneeseen lac i-proteiinin affiniteettiin lac-operonisekvensseissä sallien heterologisen geenin korkean tason ekspression. IPTG:n läsnäollessa on raportoitu induktiotasot, jotka ovat 95-kertaiset heterologisille geeneille, joita on pOP13-vektorissa.

Nimenomaan Sindbis rakenneproteiinigeeni (SP) cDNA insertoidaan pOP13- ja pOPRSV1-vektoreihin seuraavasti. SP koodausalue amplifioidaan in toto alukeparin kanssa, jonka 5'-päät kartoittuvat, vastaavasti, autenttiseen AUG translaation aloitus- ja UGA translaation lopetuskohtiin, mukaanluettuna ympärillä olevat nukleotidit, jotka vastaavat Kozak konsensussekvenssiä tehokasta translaation aloitusta varten Sindbis nt:ssä 7638. Eteenpäin oleva aluke on komplementaarinen Sindbis nt:n 11 384-11 364 kanssa. Sindbis cDNS:n PCR-amplifikaatio vastaten rakenneproteiinigeenejä, saadaan aikaan standardilla kaksilämpötilakierrosprotokollalla käyttämällä seuraavaa oligonukleotidiparia:

Eteenpäin oleva aluke (7638F):
5'-TATATGCGGCCGCACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGC-3'
(SEQ.ID.Nro 38)

Käänteisaluke (11 384R):
5'-TATATGCGGCCGCTCATCTTCGTGTGCTAGTCAG-3'
(SEQ.ID.Nro 39)

Niiden vastaavien, osoitettuihin Sindbis nt:hin olevien komplementaarisuuksien lisäksi kiinnittyy 5 nukleotidin "puskurisekvenssi", jonka jälkeen on Not I tunnistussekvenssi, jokaisen alukkeen 5'-päihin. PCR-amplifikaation jälkeen 3 763 bp fragmentti puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä, sitten sen jälkeen pilkotaan Not I-entsyymillä. Tuloksena oleva 3 749 bp fragmentti ligoidaan sitten erikseen pOP13- ja pOPRSV1-vektoreihin, jotka pilkotaan Not I:llä ja käsitellään vasikan suolen alkaalisella fosfataasilla. Nämä ekspressiokasettivektorit, joissa on koko Sindbis rakenneproteiinien koodauskyky, tunnetaan pOP13-SINSP:nä ja pOPRSV1-SINSP:nä.

Muunnelmia lac-operoni Sindbis rakenneproteiinien ekspressiokaseteista voidaan myös rakentaa käyttämällä muita virus-, solu- tai hyönteisperusteisia promoottoreita. Käyttämällä tavanomaisia, alalla tunnettuja molekyylibiologian tekniikoita, lac-operoni ja RSV LTR-promoottori tai vain RSV LTR-promoottori, sekvenssit voidaan kytkeä pois Stratagene pOP13- ja pOPRSV1-vektoreista ja korvata muilla promoottorisekvensseillä, kuten sytomegaloviruksen valmis välitön promoottori (pOPCMV-SINSP); adenoviruksen valmis myöhäinen promoottori (pOPAMLP-SINSP); tai hyönteisen promoottorisekvenssit, joihin sisältyy Drosophila metallotioniini-indusoituva promoottori (pMET-SINSP), Drosophila aktiini 5C distaali promoottori (pOPA5C-SINSP), kuumashokkipromoottorit HSP65 tai HSP70 (pHSP-SINSP) tai baculovirus polyhedriinipromoottori (pPHED-SINSP).

2. Kasettien modifikaatio lisäämään proteiinieksprессion tasoja

Sindbis rakenneproteiinin ekspressiota voidaan lisätä, jos mRNA-transkriptien taso nousee. mRNA-transkriptien tason nostaminen voidaan saada aikaan modifioimalla ekspressiokasettia, siten että Sindbis ei-rakenneproteiinit tunnistavat nämä transkriptit ja puolestaan replikoivat lähetin korkeammille tasoille. Tämä modifikaatio suoritetaan lisäämällä villityypin liitosalueen ydin (nukleotidit 7579-7602) Sindbis rakenneproteiinin koodausalueen äärimmäiseen 5'-päähän, ensimmäisen autenttisen translaation AUG aloituskohdan ja ekspressiokasetin promoottorisekvenssien väliin. Tämä voidaan saada aikaan seuraamalla samaa edellä kuvattua PCR-amplifikaatiotekniikkaa asettamaan Sindbis rakenneproteiini cDNA pOP13- ja pOPRSV1-ekspressiovektoreihin. Ainoa modifikaatio tähän menetelmään on 7638F eteenpäin olevan alukkeen korvaaminen samanlaisella alukkeella, jossa on liitosalueen ydinnukleotidit 7579-7602, Not I restriktioentsyymikohdan ja koodausalueen ensimmäisen ATG:n väliin seuraavasti:

Eteenpäin oleva aluke (JUN7638F):
5'-TATATGCGGCCGCATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTACCACCACCATGAATAGAGGATTC-3' (SEQ.ID.Nro 40)

PCR-amplifikaation jälkeen 3 787 bp fragmentti puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä, sitten sen jälkeen pilkotaan Not I-entsyymillä. Tuloksena oleva 3 773 bp fragmentti ligoidaan sitten erikseen pOP13- ja pOPRSV1-vektoreihin, jotka pilkotaan Not I:llä ja käsitellään vasikan suolen alkaalisella fosfataasilla. Nämä tuloksena olevat ekspressiokasettivektorit, tunnetaan pOP13-JUNSINSP:nä ja pOPRSV1-JUNSINSP:nä. On kuitenkin tähdennettävä, että liitosalueen sekvenssien vieminen rakenneproteiiniekspressiokasetteihin, tuo mukanaan sekvenssejä, jotka voivat mahdollisesti johtaa ei-toivottuihin rekombinaatiotapahtumiin johtaen villitypin Sindbis-viruksen luomiseen.

3. Rakenneproteiinien indusoitava ekspressio Sindbis-vektorin kautta

Mahdollisten rakenneproteiinien ekspression sytotoksisten vaikutusten takia indusoitavien pakkaussolulinjojen, jotka ekspressoivat aivan vaatimattomia perustasoja näitä proteiineja, perustaminen ei saata olla paras menetelmä. Siksi rakennetaan pakkaussolulinjan ekspressiokasetit, joissa on säätelylelementit rakenneproteiinin synteesin korkeita tasoja varten ei-rakenneproteiinien kautta, joita Sindbis-vektori toimittaa in trans, mutta ei synteesin perustasoa kunnes sopivasti stimuloitu.

Tässä konfiguraatiossa rakennetaan rakenneproteiinigeenikasetti, jolloin rakenneproteiinigeenien transkriptio tapahtuu viereiseltä Sindbis liitosaluesekvenssiltä. Tämän kasetin primääriset piirteet ovat: RNA-polymeraasi II promoottori, joka sijaitsee välittömästi Sindbis nukleotidi 1:n vieressä, siten että transkription aloitus alkaa autenttisella Sindbis nukleotidi 1:llä, 5'-pää Sindbis-sekvenssejä vaaditaan transkriptaasin tunnistukseen, Sindbis liitosaluesekvenssi rakenneproteiinigeenin mRMA:n ekspressioon, Sindbis rakenneproteiinigeenisekvenssit, 3'-pää Sindbis-sekvenssit, joita tarvitaan replikaatioon ja transkription lopetus/polyadenylaatiosekvenssi. Myötävirran avoimen lukuraamin, joka päättyy translaation lopetuskodoneihin ennen rakenneproteiinigeenien AUG aloituskohtaa, takia Sindbis rakenneproteiinien ekspressio voi tapahtua vektorin toimittamien ei-rakenneproteiinien miinusjuosteisen RNA:n synteesin jälkeen, ja sen jälkeinen rakenneproteiinigeenin mRNA:n transkriptio liitosalueesta. Siksi tämän systeemin indusoituvuus on riippuvainen kokonaan ei-rakenneproteiinien läsnäolosta, joita Sindbis-vektori itse toimittaa, tuotuna joko RNA transkriptoituna in vitro tai cDNA asetettuna myötävirtaan sopivasta promoottorielementistä. Lisäksi 5'- ja 3'-pää Sindbis-sekvenssit sallivat rakenneproteiinigeenikasetin RNA-transkriptin amplifioitua samoilla vektorin toimittamilla ei-rakenneproteiineilla (katso kuvio 8).

Nimenomaan, positiivi-sense, vektori-indusoituvan pakkauskasetin rakentaminen saadaan aikaan seuraavasti. pVGELVIS-vektori, joka on aiemmin kuvattu, pilkotaan entsyymillä BspE1, jotta poistetaan nukleotidit 422-7054, mukaanluettuna suurin osa ei-rakennegeeniä koodaavista sekvensseistä ja jäljelle jäävä 9925 bp fragmentti puhdistetaan 0,8 % agaroosigeelissä ja sen jälkeen ligoidaan itseensä tuottamaan rakenne, joka tunnetaan pLTR/SindIBspE:nä. Tämä deleetio jättää 5'-pään autenttisen translaation aloituskodonin nt: ssa 60-62 koskemattomaksi ja luo oikean lukuraamin myötävirtaan UAA ja UGA stop-kodonit nt 7130-7132 (alkuperäinen numerointi), vastaavasti, täten estäen myötävirtaan rakenneproteiinigeenin avoimen raamin translaation. pLTR/SindIBspE pakkauskasettirakenne transfektoidaan sen jälkeen BHK-soluihin (ATCC #CCL 10) ja positiiviset transfektantit valitaan käyttämällä G418 lääkettä 400 µg/ml, kuten edellä on kuvattu. Kuviossa 4 nähdyt tiedot osoittavat, että Sin-luc vektori RNA:n transfektio näihin pLTR/SindIBspE pakkaussoluihin johtaa infektiivisten Sindbis-partikkeleiden tuottoon, joissa on Sin-luc RNA, kun kerättyjen supernatanttien on osoitettu siirtävän Sin-luc vektori RNA:n BHK-solujen tuoreille yksinkertaisille kerroksille.

Samanlainen pakkausrakenne tehdään myös käyttämällä pVG-ELVISd-kloonia (kuvattu edellä) alkumateriaalina luomaan BspEI-deleetio. Tässä kloonissa Sindbis 3'-pääsekvenssin jälkeen on katalyyttinen ribozyymisekvenssi sallimaan tarkemman primäärisen transkriptin, joka on Sindbis 3'-pääsekvenssien vieressä, prosessoinnin. Lisäksi näiden pakkauskasettirakenteiden muunnelmia voidaan tehdä käyttämällä alalla tunnettuja standarditekniikoita, joihin sisältyy: muiden RNA-polymeraasipromoottorien substituutio yleisesti käytössä olevalla MuLV LTR:llä, 1 tai useamman nukleotidin lisääminen RNA-polymeraasipromoottorin ja ensimmäisen Sindbis-nukleotidin väliin, tai ei-Sindbis-koodatun avoimen lukuraamin myötävirtaan rakenneproteiinigeenisekvenssejä korvaami-

nen, mikä voi tai ei pitää 5'-pään Sindbis-sekvenssit, joita tarvitaan transkriptaasin tunnistamiseen.

Eräässä toisessa vektori-indusoituvassa pakkauskonfiguraatiossa kasettien, joissa on cDNA Sindbis rakenneproteiinigeenisekvenssien, joita reunustaa niiden luonnollinen liitos ja 3'-ei-transloidut alueet, kopio, ja insertoidaan ekspressiovektoriin sellaiseen suuntaan, että primäärinen transkriptio promoottorista tuottaa antisense rakenneproteiinigeeni RNA-molekyylejä. Lisäksi näissä rakenteissa on myös, liitosalueen vieressä, Sindbis 5'-pään sekvenssit, joita tarvitaan virustranskriptaasin tunnistamiseen ja katalyyttinen ribozyymisekvenssi, joka sijaitsee välittömästi 5'-pään sekvenssin Sindbis-nukleotidi 1:n vieressä. Sellaisena tämä ribozyymi pilkkoo primääristä RNA-transkriptiä täsmällisesti ensimmäisen Sindbis-nukleotidin jälkeen. Tässä anti-sense-suuntauksessa, rakenneproteiinigeenejä ei voida transloida ja ne riippuvat kokonaan Sindbis-virus ei-rakenneproteiinien läsnäolosta transkriptiota varten positiivi-juoste mRNA:han, ennen niiden ekspressiota. Nämä ei-rakenneproteiinit saadaan Sindbis-vektorista itsestään. Lisäksi koska tässä konfiguraatiossa on täsmälleen Sindbis-genomin 5'- ja 3'-pääsekvenssit, rakenneproteiinigeenitranskriptit amplifioidaan käyttämällä samoja ei-rakenneproteiineja, joita saadaan Sinddbis-vektorista.

Nimenomaan, Sindbis rakenneproteiinigeeni cDNA poistetaan genomisesta klonista pVGSP6GEN:stä ja insertoidaan pcDNA3-(Invitrogen Corp., San Diego, CA) ekspressiovektoriin seuraavasti. Ensimmäiseksi plasmidi pVGSP6GEN pilkotaan entsyymeillä ApaI ja BamHI poistamaan kaikki Sindbis-sekvenssit läpi nukleotidin 7335, mukaanluettuna geenit, jotka koodaavat ei-rakenneproteiineja 1, 2, 3 ja suurinta osaa 4. Jäljelle jäävä 7285 bp vektorifragmentti, jossa on Sindbis rakenneproteiinigeenit, puhdistetaan 0,8 % agaroosigeelissä ja sen jälkeen ligoidaan polylinkkerisekvenssillä, jota kutsutaan SinMCS, jota saadaan hybridisoimalla kaksi synteettistä oligonukleotidiä. Oligonukleotideissä, SinMCSI ja SinMCSII,

on tunnistuskohdat CalI:lle, BglII:lle ja SpeI:lle ja niillä on ApaI- ja BamHI-päät hybridisaation jälkeen. Niiden sekvenssit ovat seuraavat:

SinMCSI:
5'-CTCATCGATCAGATCGACTAGTTG-3' (SEQ.ID.Nro 31)

SinMCSII:
5'-GATCCAACTAGTCAGATCTGATCGATGAGGGCC-3' (SEQ.ID.Nro 32)

Saatu rakennelma, joka tunnetaan pMCS-26s:nä, modifioidaan sitten sisältämään 5'-pää Sindbis:n 299 nukleotidistä, fuusioidaan 84 nukleotidin ribozyymisekvenssiin hepatitis deltaviruksen (HDV) (Nature 350:434) antigenomiseen juosteeseen käyttämällä päällekkäinmenevää PCR-amplifikaatiota. Alunperin käytetään kahta alukeparia erillisissä reaktioissa, jonka jälkeen on niiden päällekkäinmenevä synteesi PCR:n toisella kierroksella. Reaktiossa #1 eteenpäin oleva aluke (HDV49-XC) on komplementaarinen HDV-genomin nukleotidien 823-859 kanssa, ja käänteisaluke (HDV17-68) on komplementaarinen HDV-genomin nukleotidien 839-887 kanssa, seuraavien sekvenssien kanssa:

Eteenpäin oleva aluke (HDV49-XC):
5'-ACTTATCGATGGTTCTAGACTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTGCGTCCTCCT-TC-3' (SEQ.ID.Nro 33)

Käänteisaluke (HDV17-68):
5'-TCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCACGTCCACT-3' (SEQ.ID.Nro 33)

Sen lisäksi että niillä on vastaavat komplementaarisuudet, aluke HDV49-XC:ssä on reunustavat XbaI- ja ClaI tunnistussekvenssit 5'-päässä. HDV-sekvenssien PCR-amplifikaatio saadaan aikaan standardi kaksi-lämpötilakierrätysprotokollalla näiden alukkeiden ja Vent-polymeraasin kanssa. Reaktiossa #2 eteenpäin oleva aluke (SIN-HDV), joka liittää täsmälleen HDV- ja Sindbis-sekvenssit, on komplementaarinen Sindbis

nukleotidien 1-21 kanssa ja HDV:n genomisten nukleotidien 871-903 kanssa, ja menee päällekkäin alukkeen HDV17-68 (e-deltä) sekvenssien kanssa 20 nukleotidillä ja käänteisaluke (SIN276-SPE) on komplementaarinen Sindbis nukleotidien 299-276 kanssa seuraavilla sekvensseillä:

Eteenpäin oleva aluke (SIN-HDV):
5'-TCGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCAATGCGACCCATTGACGGCGTAGTACA-CACT-3' (SEQ.ID.Nro 35)
Käänteisaluke (SIN276-SPE):
5'-CTGGACTAGTTAATACTGGTGCTCGGAAAACATTCT-3' (SEQ.ID.Nro 36)

Sen lisäksi että niillä on vastaavat komplementaarisuudet, aluke SIN276-SPE:ssä on reunustava UAA translaation terminaatiokodoni ja SpeI-tunnistussekvenssi sen 5'-päässä. Fragmentin, jossa on Sindbis-5'-sekvenssit fuusioituneena HCV-ribozyymisekvensseihin, PCR-amplifikaatio saadaan aikaan standardi kaksi-lämpötilakierrätysprotokollalla, käyttämällä Vent-polymeraasia, näitä alukkeita ja VGSP6GEN-plasmidia mallisäikeenä. Ensimmäisen PCR-amplifikaatiokierroksen jälkeen, 1/20 koko määrästä kummastakin reaktiosta #1 ja reaktiosta #2 yhdistetään ja käytetään mallisäikeenä toisessa PCR-amplifikaatiokierroksessa, johon vielä lisätään alukkeet HDV49-XC ja SIN276-SPE ja standardi kaksi-lämpötilakierrätysprotokolla. Toisen PCR-kierroksen jälkeen 414 bp amplikoni puhdistetaan Mermaid kitillä (Bio 101, laJolla, CA) ja pilkotaan entsyymeillä ClaI ja Spe I. Pilkottu amplikoni puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä ja sen jälkeen ligoidaan plasmidiin pMCS-26s, joka myös pilkotaan ClaI:llä SpeI:llä ja puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä. Saatu rakenne, jossa on ekspressiokasettielementit HDV antigenominen ribozyymi/Sindbis 5'-pää 299 nt/Sindbis liitosalue/Sindbis rakenneproteiinigeenit/Sindbis 3'-pää ei-transloitu alue, tunnetaan pδ5'26s:nä.

Rakenneproteiinigeenikasetin insertio pδ5'26s:sta pcDNA3-vektoriin suoritetaan seuraavasti. Plasmidi pδ5'26s pilkotaam entsyymillä XbaI ja 3'-syvennetyt päät tehdään tylpiksi

lisäämällä Klenowin entsyymiä ja dNTP:tä. Koko 4798 bp rakenneproteiinigeenikasetti puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä. pcDNA3-plasmidi pilkotaan entsyymeillä HindIII ja ApaI ja päät tehdään tylpiksi lisäämällä T4 DNA-polymeraasientsyymiä ja dNTP:tä ja 5342 bp vektori puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeeleissä. Kaksi puhdistettua, tylppäpäistä DNA-fragmenttia ligoidaan sen jälkeen ja saatu rakenneproteiinigeenieksprssiokasettivektori tunnetaan pCMV-δ5'26s:nä (katso kuvio 8). Tämän DNA:n transfektio soluihin ja G418-resistenssin selektio suoritetaan kuten edellä on kuvattu.

CMV promoottori/antisense-Sidbis rakenneproteiinivektorin modifikaatioita voidaan rakentaa käyttämällä muita virus-, solu- tai hyönteispohjaisia promoottoreita. Käyttämällä tavallisia, alalla tunnettuja molekyylibiologian tekniikoita, CMV-promoottori voidaan katkaista pois Invitrogen pcDNA3-vektorista ja korvata sellaisilla promoottoreilla kuin aikaisemmin on luetteloitu. Antisense pakkauskasetin muita muunnelmia voi olla mukana, mutta ei rajoitu niihin: 1 tai useamman nukleotidin lisääminen ensimmäisen Sindbis-nukleotidin ja katalyyttisen ribozyymin väliin, toisen katalyyttisen ribozyymisekvenssien käyttö transkriptioprosessointiin, tarkan transkription terminaatiosignaalin substituutio katalyyttiseen ribozyymisekvenssiin tai rakenneproteiinigeenikasettien antisense-ekspressio käyttämällä mitä tahansa myötävirtaan olevaa sekvenssiä, jonka RNA-polymeraasi tunnistaa, mikä johtaa rakenneproteiinigeenin mRNA transkriptioon.

Lisäksi olisi huomattava, että jokaisessa kuvatussa vektoriindusoituvassa rakenteessa on sekvenssit, jotka ovat homologisia Sindbis-vektorin itsensä kanssa. Siksi on mahdollisuus villityypin viruksen luomiselle rekombinaatiolla kahden RNA-molekyylin välillä. Lisämodifikaatiota tehdään eliminoimaan tämä mahdollisuus, kuten alla on kuvattu.

4.Rakenneproteiinigeenien erottaminen estämään rekombinaatio

Sen jälkeen, kun on osoitettu tässä kuvattujen lähestymistapojen hyödyllisyys, luodaan lisäksi tulevia pakkaussolulinjoja perustuen näihin periaatteisiin. Nämä lisälinjat erottelevat rakenneproteiinigeenien integraation ja ekspression sallien niiden transkription ei-päällekkäinmenevinä, itsenäisinä RNA-molekyyleinä. Kapsidiproteiinin ekspressio riippumatta glykoproteiineista E2 ja E1 tai jokainen kolme proteiinia riippumattomina jokaisesta toisesta, eliminoi rekombinaation mahdollisuuden vektori RNA:n kanssa ja sen jälkeisen kontaminoivan villityypin viruksen synnyttämisen.

Nimenomaan kapsidiproteiinia ekspressoidaan riippumatta indusoituvasta ekspressiovektorista siten, että sekvenssit, jotka saattaisivat johtaa rekombinaatioon vektori RNA:n kanssa, eliminoidaan. Esimerkkinä kapsidiproteiinigeeniä amplifioidaan plasmidista pVGSP6GEN alukeparilla, joka on komplementaarinen nukleotidien 7632-7655 (eteenpäin oleva aluke) ja 8415-8439 (käänteisaluke) kanssa, seuraavien sekvenssien kanssa:

Eteenpäin oleva aluke:
5'-GTCAAGCTTGCTAGCTACAACACCACCACCATGAATAGAG-3'
(SEQ.ID.Nro 37)

Käänteisaluke:
5'-CAGTCTCGAGTTACTACCACTCTTCTGTCCCTTCCGGGGT-3'
(SEQ.ID.Nro 41)

Sen lisäksi että niillä on vastaavat komplementaarisuudet, eteenpäin olevassa alukkeessa on NheI- ja HindIII-tunnistussekvenssi sen 5'-päässä ja käänteisalukkeessa on sekä UAG että UAA translaation stopkodonit ja XhoI-tunnistussekvenssi sen 5'-päässä. Amplifikaatio saadaan aikaan käyttämällä

standardia kaksi-lämpötilakierrätysprotokollaa, ja saatu amplikoni pilkotaan entsyymeillä NheI ja XhoI ja puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä. Ekspressioplasmidi pMAM (Clontech), jossa on deksametatsonia-indusoiva MMTV LTR promoottorisekvenssi, pilkotaan entsyymeillä NheI ja XhoI ja plasmidi DNA puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä. Kapsidiproteiinigeenifragmentti ligoidaan pMAM-vektoriin ja saatu rakenne tunnetaan pMAM-SinC:nä. Plasmidi pMAM-SinC transfektoidaan sopivaan solulinjaan, kuten edellä on kuvattu ja suoritetaan valinta stabiileista transfektanteista käyttämällä HAT-(hypoksantiini, aminopteriini, tymidiini) alustaa, kuten valmistaja on kuvannut.

Glykoproteiinigeenit E1 ja E2 ekspressoidaan yhdessä käyttämällä yhtä aikaisemmin kuvattua indusoituvaa systeemiä. Esimerkiksi E1- ja E2-geenit amplifioidaan plasmidilta pVGS-P6GEN käyttämällä alukeparia, joka on komplementaarinen Sindbis-nukleotidien 8440-8459 kanssa (eteenpäin oleva aluke) ja Sindbis nt:n kanssa 11 384-11 364 (käänteisaluke). PCR-amplifikaatio suoritetaan käyttämällä standardia kaksilämpötilakierrätysprotokollaa ja seuraavaa oligonukleotidiparia:

Käänteisaluke (11 384R):
5'-TATATGCGGCCGCTCATCTTCGTGTGCTAGTCAG-3' (SEQ.ID.Nro 39)

Eteenpäin oleva aluke (8440F):
5'-TATATGCGGCCGCACCACCATGTCCGCAGCACCACTGGTCACG-3'
(SEQ.ID.Nro 42)

Sen lisäksi että niillä on vastaavat komplementaarisuudet, eteenpäin olevassa alukkeessa on "oikea lukuraami" AUG translaation aloituskodoni ja molemmissa alukkeissa on NotI-tunnistussekvenssi sen 5'-päässä. PCR-amplifikaation jälkeen amplikoni pilkotaan NotI-entsyymillä, puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä. Saatu fragmentti ligoidaan sitten erikseen pOP13- ja pOPRSV1-vektoreihin (Stratagene), pilkotaan NotI:llä ja käsitellään vasikan suolen alkaalifosfataasilla, ku-

ten aikaisemmin on kuvattu. Näitä glykoproteiinivektoreita on käytetty transfektoimaan soluja, jotka aikaisemmin on transfekoitu kapsidiproteiinieksressiorakenteella.

5. Komponenttien kokoaminen luomaan Sindbis pakkaussolulinja

Esimerkkitapauksiin käytetään Aedes albopictus solulinjaa osoittamaan komponenttien kokoamista. Kuitenkin muita mahdollisia kantasolulinjoja voidaan käyttää luomaan Sindbis pakkaussolulinjat ja on keskusteltu aiemmin. Aedes albopictus sääskisolut (ATCC Nro CRL 1660) kasvatetaan 28°C:ssa 5 % CO_2:ssa minimaali essentieli alustalla (Eagle) ei-olennaisten aminohappojen kanssa, 2 mM L-glutamiinia, Earle's tasapainotettu suolaliuos, 0,11 % natriumbikarbonaatti ja 10 % vasikan sikiön seerumi (optimaaliset alustat). Noin $5x10^5$ sääskisolua, kasvatettu 35 mM petrimaljalla, transfektoidaan 5 µg:lla p3'SS:ää käyttämällä 5 µl Transfectami (Promega) kationista lipidireagenssia, alustaolosuhteissa, joissa ei ole seerumia, kuten toimittaja ehdottaa. Kuitenkin mitä tahansa transfektiomenetelmä voidaan suorittaa, so. elektroporaatio, kalsiumfosfaattisaostus tai käyttämällä mitä tahansa helposti saatavilla olevia kationisia liposomiformulaatioita ja menetelmiä, jotka alalla tunnetaan yleisesti. 24 h transfektion jälkeen solut peitetään 4 ml:lla optimialustaa, kuten edellä on kuvattu, johon on lisätty 200 µg antibioottia hygromysiini ja selektoidaan 10-14 d aikajakso. Laajentuneet pesäkkeet eristetään sitten ja testataan niiden Lac-repressorin ekspressio Northern blot-hybridisaatiolla. Yksittäinen klooni, joka ekspressoi tyydyttävät tasot Lac-repressori mRNA:ta, transfektoidaan sitten lac-operonivektorirakenteella, joka ekspressoi Sindbis rakenneproteiineja (so. pOP13-SINSP tai pOPRSV1-SINSP), jonka jälkeen lääkeselektio 200-800 µg/ml genetisiiniä ja jatkettu hygromysiiniselektio. Pesäkkeet, jotka osoittavat resistenssin molemmille antibiooteille, kerätään sitten, laimennuskloonataan ja lisätään. Yksittäisiä klooneja indusoidaan sitten 5 mM IPTG:llä 12 h ja seulotaan korkeat tasot Sindbis rakenneproteiinieksressiota. Ekspressio voidaan testata western-blotanalyysillä

käyttämällä spesifisiä vasta-aineita (saatavilla kirjallisuudessa) tai määrittämällä Sindbis-spesifinen RNA RNAaasisuojausmäärityksissä käyttämällä ^{32}P-loppuleimattuja RNA-koettimia, jotka ovat komplementaarisia Sindbis rakenneproteiinigeenialueen RNA:n kanssa. Nämä määritysmenetelmät paljastavat kloonit, joilla on korkeimmat rakenneproteiinien ekspression tasot vasteena IPTG-induktiolle. Testataan sitten useista korkeimmin ekspressoivista sääskisolukloneista (viitattu Albopictus SINpak-soluihin) toiminnallinen aktiivisuus. Toiminnallinen aktiivisuus testataan osoittamalla solulinjan kyky pakata lucoferaasia ekspressoiva vektori ja sen jälkeinen alustasupernatantin kyky infektoida uudestaan BHK-21-soluja ja siirtää lusiferaasiaktiivisuutta.

Nimenomaan Albopictus SINpak-solut, jotka ovat kasvaneet 35 mm petrimaljoilla edellä kuvatun selektioalustan kanssa, joissa on hygromysiiniä ja genetisiiniä, transfektoidaan RNA:lla, joka on syntetisoitu edellä kuvatun pSKSINBV-luc cDNA:n in vitro transkriptiolla (Promega). 1 h transfektion jälkeen alustoihin lisätään 5 mM IPTG:tä. Supernatantti kerätään 24 h transfektion jälkeen ja käytetään infektoimaan BHK-21-soluja suoraan ja Albopictus SINpak-solujen, jotka on indusoitu, kuten edellä on kuvattu, tuoretta yksinkertaista kerrosta, 5 mM IPTG:llä ainakin 12 h. Supernatantit kerätään 24 h transfektion jälkeen ja käytetään sitten infektoimaan BHK-21-solujen toista yksinkertaista kerrosta, jotka ovat kasvaneet 35 mm petrimaljoilla. 16 h infektion jälkeen BHK-21-solut lyysataan ja niistä testataan luciferaasiaktiivisuus, kuten edellä on kuvattu (Promega). Luciferaasiaktiivisuuksien vertailu, jotka on saatu BHK-21-soluista, jotka on infektoitu ensimmäisen vektorituoton kierron jälkeen vastaan BHK-21-soluja, jotka on infektoitu toisen vektorituoton kierron jälkeen, pitäisi osoittaa ainakin 10-kertainen ero ekspressiotasoissa. Jos erot tasoissa ovat alemmat kuin 10-kertaiset, voi transduktion tehokkuuden väheneminen siirron jälkeen johtua varatuista solureseptoreista identtisessä Sindbis pakkaussolulinjassa, josta transient vektori tuotettiin. Tämä voi merkitä tarvetta pseudotyypitettyjen Sindbis-

vektoreiden luomiselle parantamaan transduktiotehokkuutta kuoren kaltaisiin pakkaussolulinjoihin.

C. Indusoituva vektori ja rakenneproteiiniekspressio Sindbis tuottosolulinjoille

1. Viruspromoottorien käyttö

Haaste kehittää Sindbis-vektorituottajasolulinja on kysymyksessä, voidaanko virus, jonka nisäkässolujen infektio johtaa melkein aina pelkästään tuottavaan lyyttiseen solukuolemaan, muuntaa jotenkin saamaan aikaan pysyvä infektio näissä samoissa soluissa. Yksi mahdollisuus on luoda Sindbis-vektorituottajalinjat sääskisoluista, missä viruspysyvyys on seuraus infektion jälkeen. Kuitenkin infektiivisen viruksen tiitteri tuotetuissa, pysyvästi infektoiduissa sääskisoluissa on vain noin $1x10^4$ PFU/ml, ainakin 5 suuruusluokkaa vähemmän kuin havaittiin Sindbis:n BHK-solujen lyyttisen infektion jälkeen. Täten ei voi olla kaupallisesti mahdollista kehittää sääskestä johdettuja Sindbis-vektorituottajasolulinjoja.

On kuvattu monia strategioita indusoituville Sindbis-vektorituottajasolulinjoille, joissa on sekä vektori että virusrakennegeenikasetit, siten että tuottava sytolyyttinen infektio tapahtuu vain oikean ärsykkeen jälkeen. Koska nämä lähestymistavat toimivat "syötä eteenpäin"-tasolla, mikä tahansa kinaasi systeemissä johtaa Sindbis elinkierron ja solukuoleman aloitukseen.

Kehityksen hyvää laatua ilmaiseva tavaramerkki on erilaistumistilasta riippuva geeniekspression malli. Geeniekspression mallit eroavat suuresti ei-erikoistuneiden ja terminaalisesti erilaistuneiden tilojen välillä. Täten on mahdollista, että solu, jonka erilaistumistilaa voidaan kontrolloida, on ideaalinen isäntä, johon Sindbis-vektorituottajasolulinja johdetaan. Sellaisessa konfiguraatiossa vektori- ja rakennekomponentit kytketään terminaaliseen erilaistumistilaan indusoiviin promoottoreihin kuvatun ELVIS-strategian mukaan ja

käytetään transformoimaan stabiilisti erilaistumatonta isäntäsolua. Isäntätuottajasolun terminaalinen erilaistuminen sopivien ärsykkeiden induktion jälkeen johtaa samanaikaisesti Sindbis-replikaatiosyklin induktioon ja pakatun vektorin tuottoon. Muita tässä kuvattuja strategioita, antisense rakennegeenit ja heterologiset virusekspressiosysteemit, olisi solun erilaistumistilasta riippuvaisten promoottorien kanssa kytketyt, kuten alla on kuvattu.

Tässä lähestymistavassa on kuvattu 3 esimerkkiä käyttämällä joko virus- tai solupromoottoria, jotka ovat aktiivisia vain terminaalisesti erilaistuneissa soluissa.

On osoitettu, että hiiren Polyomavirus (Py), SV40 ja Moloney hiiren leukemiavirus (M-MuLV), kaikki kykenevät infektoimaan ja menemään erilaistumattoman hiiren alkionkarsinoomasoluihin (EC), mutta niiden geenien ekspressio (ja heterologisten geenien) ja tuottavan infektion perustaminen on blokattu (Swartzendruber ja Lehman, J. Cell. Physiol. 85:179-188, 1975; Peries et al., J. Natl. Cancer Inst. 59:463-465, 1977). Näitä viruksen kasvuominaisuuksia on osoitettu kahdessa solulinjassa, PCC4 ja F9, jotka on johdettu hiiren teratokarsinooman pahanlaatuisista kantasoluista. Viruslisääntymisen blokki tapahtuu transkription ja replikaation tasolla ja kartoittuu vahvistajiin, joita on viruksen eikoodaavilla kontrollialueilla (Linney et al., Nature 308: 470-472, 1984; Fujimura et al., Cell 23:809-814, 1981; Katinka ja Yaniv, Cell 20:393-399, 1980).

Kun M-MuLV infektoi erilaistumattomia EC-soluja, virus DNA integroituu genomiin. Kuitenkin kuten edellä esitettiin, virusgeenien tai heterologisten geenien ekspressio on blokattu. Tämä virusekspression blokki vapautetaan EC-solujen terminaalisen erilaistumisen jälkeen lisäämällä retinohappoa kasvualustaan.

Jotta testataan pVGELVIS-rakenteen RNA-ekspression ominaisuuksia EC-soluissa, plasmidi-DNA kompleksoidaan Lipofekta-

miinin kanssa (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) toimittajan ehdottamien olosuhteiden mukaisesti (noin 5 µg DNA/8 mg lipidireagenssia) ja lisätään 35 mm kaivohin, joissa on erilaistumattomia PCC4- tai F9-soluja (Fujimura et al. 1981. Cell 23:809-814) noin 75 % konfluenssiin. Sytopaattisten vaikutusten kehittäminen (CE) ja Sindbis tuottavan infektion taso, joka on kvantitioitu alustasupernatantin plakkimäärityksellä, määritetään säännöllisin välein 5 d ajan erilaistumattomissa ja erilaistuneissa transfektoiduissa PCC4- tai F9-soluissa. F9- tai PCC4-solujen erilaistuminen saadaan aikaan lisäämällä retinohappoa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) lopullisena 1 µM konsentraationa.

On ehdotettu, että heterologisten geenien suhteellisen ekspression hierarkia, joka on havaittu erilaistumattomissa EC-soluissa, jotka on infektoitu M-MuLV-vektoreilla, voi osittain olla insertionaalisesti riippuvainen (Linney et al. 1987 J. Virol. 61:3248-3253). Täten erilaistumattomat EC-solut, jotka on transfektoitu pVGELVIS:llä, tuottavat todennäköisesti erilaisia tuloksia, Sindbis genomisen cDNA:n transkription huomioon ottaen ja puolestaan viruselinkierron aloituksen. Tässä tapauksessa pVGELVIS:llä transfektoitujen erilaistumattomattomien EC-solujen G418-selektion jälkeen jäljelle jäävät solut kloonataan ja levitetään. Sitten solukloneista testataan Sindbis-viruksen tuotto erilaistumisen jälkeen lisäämällä retinohappoa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) lopullisena 1 µM konsentraationa.

Jotta eristetään vektoripakkaussolulinjat, joiden rakenneproteiinien tuotto Sindbis NSP:n läsnäollessa on solueri-laistumistilasta riippuvainen, erilaistumattomat F9- ja PCC4-solut transfektoidaan pLTR/SINd1BspE:llä ja selektoidaan G418:lla, kuten edellä kuvattiin. Erilaistumistila-sensitiiviset kloonit selektoidaan sitten infektoimalla suurella moninkertaisuudella pakatulla SIN-luc-vektorilla. Kloonit, jotka ovat resitenssejä solulyysaukselle tai eivät tuota pakatuttuja SIN-luc-vektoripartikkeleita, ovat ehdokasvektoripakkausklooneja. Näistä ehdokasklooneista testataan

SIN-luc-vektoripartikkelituotto, jonka jälkeen terminaalinen erilaistuminen retinohapon kanssa, kuten kuvattiin.

Hiiren villityypin polyomavirus (Py) ei kykene replikoimaan teratokarsinoomasolulinjoissa PCC4 tai F9. Tämä replikaation blokki erilaistumattomissa soluissa tapahtuu aikaisen alueen geenien transkription tasolla (esim. T-antigeeni) ja vapautetaan induktoimalla terminaalinen erilaistuminen vitamiini A:lla. Py-mutantit, jotka kykenevät perustamaan tuottavan infektion erilaistumattomissa PCC4- ja F9-soluissa kartoittuvat, virusvahvistaja-alueelle. Alkiokudos-spesifisen transkriptionaalisen vahvistajaelementin geneesis on johtanut näihin mutantteihin. Jotta käytetään hyväksi tätä Py-replikaation inhibiition ominaisuutta erilaistumattomissa teratokarsinoomasolulinjoissa, virussäätelyn ei-koodaava alue, mukaanluettuna vahvistaja, kytketään Sindbis-viruksen genomiseen cDNA:han ELVIS-strategian mukaan. Py aikaisen alueen transkriptionaalinen tarkka aloituskohta on määritetty (katso Tooze, DNA, Tumor Viruses). PCC4- ja F9-solulinjat transformoidaan stabiilisti Py-Sindbis-vektoreilla. Tässä mallissa Sindbis tuottava infektio tapahtuu retinohapon viljelyalustaan lisäämisen ja terminaalisen erilaistumisen induktion jälkeen.

Py ei-koodaava alue emäksistä 5021-152, joihin kuuluvat sekvenssit, jotka vastaavat virusvahvistajia, 21 bp toistot, replikaation aloituskohta, CAAT- ja - TAT-laatikot ja aikainen mRNA transkription 5′ aukkokohta, sijaitsevat 5′ viruspäässä siten, että in vivo vain yksittäinen aukotettu C-jäännös lisätään Sindbis 5′-päähän. Py ei-koodaavan alueen ja Sindbis 5′-pään rinnakkain asettaminen saadaan aikaan päällekkäinmenevällä PCR:llä, kuten seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisesti. Py ei-koodaavan alueen amplifikaatio ensimmäisessä primäärisessä reaktiossa saadaan aikaan reaktiossa, jossa on pBR322/Py, kanta A2-plasmidi (ATCC numero 45017-p53.A6.6 (pPy-1)) ja seuraava alukepari.

Eteenpäin oleva aluke: Pybg15021F (puskurisekvenssi/Bgl II tunnistussekvenssi/Py nt 5021-5043):

5'-TATATAGATCTCTTGATCAGCTTCAGAAGATGGC (SEQ.ID.Nro 43)

Käänteisaluke: SINPy152R (SIN nt 5-1/Py nt 152-134):

5'-TCAATGGCGGGAAGAGGCGGTTGG (SEQ.ID.Nro 44)

Py ei-koodaavan alueen PCR-amplifikaatio edellä nähdyn alukeparin kanssa suoritetaan käyttämällä Thermalase lämpöstabiilia DNA-polymeraasia (Ameresco Inc., Solon, Ohio) ja puskuria, jossa on 1,5 mM $MgCl_2$, toimittajan antama. Lisäksi reaktiossa on 5 % DMSO ja Hot Start Wax-helmet (Perkin-Elmer) käyttämällä seuraavaa, alla nähtyä PCR-amplifikaatio protokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	0,5	
72	10	1

Sindbis 5'-pään amplifikaatio toisessa primäärisessä PCR-reaktiossa saadaan aikaan reaktiossa, jossa on pVGSP6GEN-klooni ja seuraava alukepari:

Eteenpäin oleva aluke: Py nt 138-152/SIN nt 1-6):

5'-CCGCCTCTTCCCGCCATTGACGGCGTAGTAC (SEQ.ID.Nro 45)

Käänteisaluke: (SIN nt 3182-3160):

5'-CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC (SEQ.ID.Nro 46)

Sindbis 5'-pääalueen PCR-amplifikaatio edellä nähdyn alukeparin kanssa on edellä kuvatuissa reaktio-olosuhteissa käyttämällä seuraavaa, alla nähtyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

442 bp ja 3202 bp tuotteet primäärisessä PCR-reaktiosta puhdistetaan Gene Clean:llä (BIO 101) ja käytetään yhdessä PCR-reaktiossa seuraavan alukeparin kanssa:

Eteenpäin oleva aluke: Pybg15021F (puskurisekvenssi/Bgl II tunnistussekvenssi/Py nt 5021-5043):

5'-TATATAGATCTCTTGATCAGCTTCAGAAGATGGC (SEQ.ID.Nro 47)

Käänteisaluke: (SIN nt 2300-2278):

5'-GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG (SEQ.ID.Nro 48)

Aluke PCR-amplikonituotteiden PCR-amplifikaatio edellä nähdyn alukeparin kanssa on edellä kuvatuissa reaktio-olosuhteissa käyttämällä seuraavaa, alla nähtyä PCR-amplifikaatioprotokollaa:

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Kierrosten nro
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

Ensimmäisen primäärisen PCR-amplikonituotteen 20 3'-terminaalista emästä menee päällekkäin toisen primäärisen PCR-amplikonituotteen 20 5'-terminaalisen emäksen kanssa; tuloksena oleva 2742 bp päällekkäin menevä sekundäärinen PCR-amplikonituote puhdistetaan 0,8 % agaroosi/TBE elektroforeesillä, pilkotaan Bgl II:lla ja 2734 bp tuote ligoidaan pcDNA-SINbgl/xba (katso esimerkki 3), joka on käsitelty Bgl II:lla ja CIAP:lla. Saatu rakenne on 16 641 bp ja tunnetaan ELVIS-PySIN:nä. Jotta rakennetaan rakenneproteiiniekspersiovektori, joka on samanlainen pLTR/Sin1Bsp:n kanssa, vektoripakkaussolulinjojen johtamiseen, ELVIS-PySIN-rakenne pilkotaan täydellisesti Bsp EI:llä ja ligoidaan uudestaan laimeissa olosuhteissa, jotta saadaan aikaan ei-rakenneproteiinien deleetio emästen 422-7054 välistä. Tämä rakenne tunnetaan ELVIS-PySINd1BspE:nä.

ELVIS-PySIN-plasmidi DNA kompleksoidaan Lipofectamiinin (Gibco-BRL, Gaithersbery, MD) kanssa toimittajan ehdottamien olosuhteiden mukaan (*n.* 5 µg DNA/8 mg lipidireagenssiä) ja lisätään 35 mm kaivoihin, joissa on erilaistumattomia PCC4- ja F9-soluja noin 75 % konfluenssissa. Sytopaattisten vaikutusten (CPE) ja Sindbis tuottavan infektion taso, määritetty alustasupernatantin plakkimäärityksellä, määritetään säännöllisin 5 d välein erilaistumattomissa ja erilaistuneissa PCC4- ja F9-soluissa. F9- ja PCC4-solujen erilaistuminen saadaan aikaan lisäämällä retinohappoa (Sigma Co., St. Louis, Mo) lopulliseen 1 µM konsentraatioon.

Jos erilaistumattomilla EC-soluilla on heterologinen vaste transfektioon ELVIS-PySIN:n kanssa, Sindbis-viruslisääntyminen ei lyysaa jäljelle jääviä solut, jonka jälkeen tapahtuu pVGELVIS:llä transfektoitujen erilaistumattomien EC-solujen G418-selektio ja ne kloonataan ja levitetään. Sitten soluklooneista testataan Sindbis-virustuotto erilaistumisen jälkeen lisäämällä retinohappoa (Sigma Co., St. Louis, Mo) lopulliseen 1 µM konsentraatioon.

Vektoripakkaussolulinjojen, jotka on stabiilisti transfektoitu ELVIS-PySINd1BspE:llä, joilla on soluerilaistumistilasta riippuvainen rakenneproteiinien ekspression malli, eristys saadaan aikaan kuten edellä on kuvattu pLTR/Sind1BspE-plasmidille.

2. Solupromoottorien käyttö

Kolmas tämän strategian esimerkki käyttää ß-globiinilokuskontrollialuetta. ß-globiinimultigeenirypäs sisältää 5 kehityksellisesti säädeltyä geeniä. Ihmisen kehityksen aikaisissa tiloissa alkion keltuaispussi on verenmuodostukseen liittyvää kudosta ja ekspressoi ε-globiinigeeniä. Tätä seuraa siirtyminen γ-globiinigeeniin sikiön maksassa ja δ- ja b-globiinigeenit aikuisen luuytimessä (Collins ja Weisman, 1984, Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. 31:315).

Ainakin kaksi hiiren erythroleukemialinjaa, MEL ja Friend toimivat malleina ß-globiinin terminaalisesta erilaistumisesta riippuvasta ekspressiosta. ß-globiinin ekspressiota on havaittu näissä linjoissa vain terminaalisen erilaistumisen induktion jälkeen, kun on lisätty 2 % DMSO:ta kasvualustaan.

Koko ß-globiinilokusta säätelee lokuskontrollialue (LCR). LCR:ssä on dominantti kontrollialue (DCR) ollen DNaasi I hypersensitiivisellä alueella, joka on koodausalueen 5'. DCR:ssä on 5 DNaasi I hypersensitiivistä (HS1-HS5) kohtaa. DCR ohjaa runsasta siteof integraatiosta riippumatonta, kopiolukuriippuvaista ekspressiota yhdistettyyn ihmisen ß-globiinigeeniin transgeenisissä hiirissä ja stabiilisti transfektoiduissa hiiren erythroleukemia (MEL) soluissa (Grosveld et al., 1993, CSHSQB 58:7-12). Äskettäisessä tutkimuksessa (Ellis et al., 1993 EMBO 12:127-134) synteettisen ytimen concatameerit, jotka sattuvat samanaikaisesti sekvensseihin HS2:ssa, missä osoitettiin toimivan lokuskontrollialueena.

Jotta saadaan aikaan erilaistumistilasta riippuva Sindbisvektoreiden ekspressio, viruksen genominen cDNA asetetaan

vierekkäin promoottorin kanssa, jossa on peräkkäin synteettinen ydin vastaten LCR HS2 kohtaa. Vaihtoehtoisesti, toivottu Sindbis-vektorirakenne voidaan insertoida LCR:ää myötävirtaan endogeenisessä ß-globiinigeenissä homologisella rekombinaatiolla. Sellaisessa strategiassa ß-globiinin transkription aloituskohta terminaalisen erilaistumisen jälkeen määritettäisiin ensin, jotta Sindbis-vektori voitaisiin laittaa täsmällisesti aloituskohtaan.

Strategialla, jota tässä on ehdotettu, jossa lyyttisen viruselinkierron aloitusta kontrolloidaan isäntäsolun erilaistumistilalla, pitäisi olla sovellutusta muissa systeemeissä, missä virus-indusoidun kontrollin sytopatologia on toivottua.

3. Vektorirakenteiden insertio erilaistumistilan kontrolloimiin indusoituviin promoottoreihin

Kloonien, joiden heterologisten geenien ekspressio Sindbis-vektoreista, jotka on asetettu ELVIS-konfiguraatioon kuten esimerkissä 3 on kuvattu, luominen on erilaistumistilasta riippuvainen, saadaan aikaan kuten edellä kuvattiin pVGEL-VIS:lle, pLTR/SindlBspE-plasmidit. Kloonien luominen, joiden vektoripartikkeleiden tuotto on erilaistumistilasta riippuvainen, saadaan aikaan transfektoimalla eristetyt erilaistumisesta riippuvaiset vektoripakkauskloonit, joita on kuvattun edellä, ELVIS heterologisilla geeniekspressiovektoreilla. Kloonit, joilla on toivottu fenotyyppi tai vektorin tuotto retinohapon indusoiman erilaistumisen jälkeen, eristetään kuten edellä on kuvattu.

D. Rakenneproteiinin ekspressio heterologisesta Astrovirus-liitosalueesta

Vektoripakkaussysteemin kriittisiin ominaisuuksiin kuuluu solulinja, joka ekspressoi rakennekomponentteja, jotka ovat tarpeellisia luomaan infektiivisen partikkelin ilman että luodaan villityypin virusta rekombinaatiolla vektorin ja

rakennegeenikomponenttien välillä. Pakkaussolulinjan nämä kaksi toivottua ominaisuutta saadaan aikaan retrovirus-perusteisissa systeemeissä gag/pol- ja env-geenien jatkuvan ekspression kautta yksittäisissä heterologissa RNA polymeraasi II ekspressiokaseteissa.

Vektoripakkaussolulinjojen eräs toinen tärkeä näkökohta on johtaa systeemi, joka matkii niin kiinteästi kuin mahdollista villityypin viruksen normaalia replikaatiostrategiaa. Tämä asia on tärkeä ottaen huomioon pakatun rekombinanttivektorin havaittu tiitteritaso. Viruksen rakenneproteiinien synteesi Sindbis-infektion aikana saadaan aikaan sen jälkeen kun transkriptoidaan suuret määrät subgenomista mRNA:ta liitosalueen promoottorista, jonka jälkeen on tehokas translaatio rakenneproteiineihin. Liitosalueen promoottori on toiminnallinen vain antisense-suunnassa ja antigenomisen RNA:n synteesi tapahtuu ei-rakenneproteiinien translaation jälkeen täten viivyttäen rakenneproteiinien ekspressiota. Siitä seuraa että, mitä tulee Sindbis:een, olisi toivottavaa rakentaa pakkaussolulinja, jossa rakenneproteiinien synteesi aloitetaan liitosalueen promoottorista, joka puolestaan aktivoidaan ei-rakenneproetiineilla, joita rekombinanttivektorimolekyyli ekspressoi.

Tiedetään, että suhteellisen suuri frekvenssi rekombinaatiota tapahtuu RNA genomisten molekyylien välillä, tapahtuu Sindbis-virusinfektion aikana kopiovalintamekanismilla (PNAS 1991 88:3253-3257). Rekombinaatio vektori- ja liitosalue/rakennegeenikasettien välillä johtaisi villityypin Sindbis-viruksen luomiseen, ehkä 1 villityyppi/ miljoona pakattua vektoripartikkelia tasolla (Liljestrom Bio/Tecknology 1991 9:1356-1361). Eräs tapa vähentää villityypin viruksen luomista on erottaa rakennegeenit erillisille ekspressiokaseteille, lähestymistapa jota on käytetty melko onnistuneesti retroviruspakkaussolulinjojen kanssa ja siitä on keskusteltu aikaisemmin esimerkissä 7.

Lisälähestymistapa vähentää villityypin virustuoton tasoa Sindbis-vektoripakkaussolulinjoissa, olisi ekspressoida rakenneproteiineja Astroviruksen geneettisten elementtien kontrollin alaisena. Kaavakuva tälle konfiguraatiolle on piirretty kuvioon 10. Samalla lailla kuin Sindbis-virus, Astrovirus rakenneproteiinien ekspressio liittää liitosalueen strategian, missä rakenneproteiinia syntetisoidaan subgenomisesta lähetistä. Astrovirus ekspressiokasetti voisi koostua toisesta kahdesta peräkkäin järjestetystä elementistä: (1) indusoituva promottori/Astrovirus 5'-pää/Astrovirus liitosalue/Sindbis rakennegeeni/Astrovirus 3'-pää tai (2) antisense Astrovirus 3'-pää/antisense Sindbis rakennegeeni/antisense Astrovirus liitosalue/antisense Astrovirus 5'-pää/Hepatitis Delta-virus ribozyymi tai muita esimerkissä 7 kuvattuja konfiguraatioita. Molemmissa konfiguraatioissa ekspressioyksikkö amplifioidaan Astroviruksen ei-rakenneproteiineilla samalla mekanismilla, jota tapahtuu virusreplikaation aikana. Koska subgenomisen mRNA-synteesin lukuisat kierrot, jotka alkavat liitosalueesta, tapahtuu jokaisesta ekspressioyksiköstä, Astrovirus ei-rakenneproteiinien ekspressioyksikön amplifikaatio johtaa hyvin suurten Sindbis rakenneproteiinien tason tuottoon. Sindbis rakenneproteiinien ekspressiokasetin, joka on kuvattu edellä, toinen konfiguraatio voi toimia paremmin kuin ensimmäinen, koska toksisen Sindbis rakennegeenin primäärinen transkripti on antisense. Vaikka rakennegeenien ekspressiota ensimmäisessä konfiguraatiossa ei pitäisi tapahtua ennen kuin negatiivisen juosteen synteesi, jonka jälkeen positiivinen subgenomisen RNA:n synteesi liitosalueesta, primäärisen transkriptin antisense-luonne toisessa konfiguraatiossa edustaa lisätason kontrollia estämään sytotoksista proteiinin ekspressiota.

On todennäköistä, ettei mitään villityypin virusta luoda pakkaussolulinjassa, missä Sindbis-virusrakenneproteiinit syntetisoidaan yksilöllisesti Astrovirus liitosalueen ekspressiokaseteista. Rekombinaatio vektorin ei-rakenneproteiinialueen ja Astrovirus rakenneproteiinien ekspressiokasetin välillä johtaisi molekyyliin, jossa Astrovirus cis-elementit

olisivat kytketty Sindbis-virusgeenien kanssa, ei-elävä kombinaatio. Sindbis cis- ja trans-elementtien oikea kytkentä vaatisi tarkat rekombinaatiotapahtumat vektorin ja Astrovirus ekspressiokasetin välillä, Astrovirus liitosalueen ja rakennegeenin ATG välillä ja rakennegeeniterminaatiokodonin ja Astrovirus 3'-pään välillä. Jotta luodaan uusi villityypin virus, tämä kaksoisrekombinaatiotapahtuma täytyisi tapahtua 3 kertaa samassa molekyylissä (6 täydellistä tapahtumaa), liittämään 3 erotettua Sindbis rakenengeeniä.

Jotta vähennetään Astrovirus-proteiinien mahdollista toksisuutta, indusoituvat promoottorit kontrolloivat Astrovirus ekspressiokasettien synteesiä. Yksi mahdollisuus on käyttää lac-operonia, "lac-kytke"-systeemin mukaisesti, joka on aikaisemmin kuvattu esimerkissä 7 (Stratagene). Lac-operonin kontrolloiman geenin ekspression konstitutiivinen taso, mielivaltaisen indusorin IPTG puuttuessa on noin 10 RNA-kopiota/solu. Indusoituva promoottori, joka vastaa Astrovirus/Sindbis rakennegeenieksprессiokasettia, voi olla lac-operoni tai muu sopiva promoottori, jolla on hyvin alhainen taso konstitutiivistä ekspressiota. Näiden konfiguraatioiden pakkaussolulinjojen rakentaminen, missä Sindbis-proteiinien kontrollia ohjaa heterologinen virus, pitäisi johtaa korkeampaan pakattujen vektoripartikkeleiden, joissa ei ole villityypin virusta, tiitteriin.

Esimerkki 8
Vaihtoehtoiset virusvektoripakkaustekniikat

Erilaisia systeemejä voidaan käyttää tuottamaan rekombinanttia Sindbis-viruksia, joissa on vektorirakenne. Jokainen näistä systeemeistä hyötyy tosiasiasta, että baculovirus ja nisäkäsvirukset, vaccinia ja adenovirus on sopeutettu äskettäin tekemään suuret määrät mitä tahansa proteiinia, jota varten geeni on kloonattu (Smith et al., Mol. Cell. Biol. 3:12, 1983; Piccini et al., Meth. Enzymology 153:545, 1987; ja Mansour et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:1359, 1985).

Näitä virusvektoreita voidaan käyttää tuottamaan proteiineja kudosviljelmäsoluissa sopivien geenien insertiolla virusvektoriin ja voidaan soveltaa tekemään Sindbis-vektoripartikkeleita.

Adenovirusvektorit on johdettu tuman replikoivista viruksista ja voivat olla viallisia. Geenit voidaan insertoida vektoreihin ja käyttää ekspressoimaan proteiineja nisäkässoluissa joko in vitro rakenteella (Ballay et al., EMBO J. 4:3861, 1985) tai rekombinaatiolla soluihin (Thummel et al., J. Mol. Appl. Genetics 1:435, 1982).

Eräs edullinen menetelmä on rakentaa plasmideja käyttämällä adenoviruksen valmista myöhäistä promoottoria (MLP) ohjaamaan: (1) Sindbis ei-rakenenproteiineja ja (2) modifioitua Sindbis-vektorirakennetta. Modifioitu Sindbis-vektori tässä konfiguraatiossa sisältäisi yhä modifioidun liitosalueen, joka voisi auttaa RNA-vektoria transkripoitumaan, olemaan itse-replikoiva siten että se olisi luonnollisessa säädössä.

Näitä plasmideja vidaan sitten käyttää tekemään adenovirusgenomit in vitro (Ballay et al., EMBO J. 4:3861, 1985). Nämä adenovirusgenomit, joiden replikaatio on viallinen, transfektoidaan 293:een soluun (ihmisen solulinja tehden adenovirus E1A-proteiinin) tuottamaan Sindbis rakenneproteiinien puhtaat kannat ja Sindbis-vektori kuljetetaan erikseen vialliseen adenovirusvektoriin. Koska sellaisten vektorien tiitterit ovat tyypillisesti 10^7-10^{11}/ml, nämä varastot voidaan käyttää infektoimaan kudosviljelmäsoluja samanaikaisesti erittäin moninkertaisella infektiolla. Sitten solut tuottavat Sindbis-proteiineja ja Sindbis-vektorigenomeja runsaasti. Koska adenovirusvektorit ovat viallisia, ei tapahdu suuria määriä suoraa solulyysausta ja Sindbis-vektorit voidaan kerätä solusupernatanteista.

Muita virusvektoreita, kuten ne jotka johdettiin ei-läheisistä Sindbis-vektoreista (esim. RSV, MMTV tai HIV) voidaan myös käyttää samalla lailla luomaan vektoreita primäärisistä

soluista. Eräässä suoritusmuodossa nämä adenovirusvektorit käytetään primäärisien solujen yhteydessä synnyttämään Sindbis-vektorivalmisteita.

Vaihtoehtoista ekspressiosysteemiä on myös kuvattu, missä kimeeriset HIV/poliovirusgenomit johtavat kimeeristen minireplikonien syntymiseen (J. Virol. 65:2875, 1991), joka kykenee ekspressoimaan fuusioproteiineja. Näiden kimeeristen poliovirusminireplikonien osoitettiin myöhemmin kapseloituvan ja tuottavan infektiivisiä partikkeleita käyttämällä rekombinantti vaccinia-virusta (VV-P1), joka ekspressoi substituoitua polioviruskapsidin prekursori-P1-proteiinia, joka on viallinen kimeerisessä minireplikonissa (J. Virol. 67:37-12, 1993). Tutkimuksessa HIV-1 gag-pol-sekvenssit substituoitiin polioviruksen P1-kapsidin VP2- ja VP3-kapsidigeeneihin. Samalla lailla Sindbis-vektorigenomi voidaan substituoida P1-kapsidisekvensseihin ja käyttää tässä systeemissä keinona antaa poliopseudotyypitetyt Sindbis-vektorit, sen jälkeen kun on transfektoitu in vitro transkriptoidut Sindbis RNA transkriptit solulinjaan. Käänteisesti, Sindbis-rakenneproteiinit voidaan myös susbtituoida VP2- ja VP3-sekvensseihin, sen jälkeen annetaan vaihtoehtoinen pakkaussolulinjasysteemi Sindbis-perusteisille vektoreille.

Vaihtoehtoisessa systeemissä käytetään seuraavia komponentteja:

1. Sindbis-rakenneproteiinit tehtynä baculovirussysteemiin samalla lailla kuin kuvattiin, Smith et al (supra) (tai muissa proteiinin tuottosysteemeissä, kuten hiiva tai E. coli):
2. virusvektori RNA tehtynä tunnetussa T7:ssä tai SP6:ssa tai muussa in vitro RNA:ta tuottavassa systeemissä (Flamant et al., J. Virol. 62:1827, 1988);
3. tRNA tehtynä kuten (2):ssa tai puhdistettu hiivasta tai nisäkäskudosviljelmäsoluista;
4. liposomit (upotettu env-proteiini); ja
5. solu-uute tai puhdistetut tarpeelliset komponentit, kun tunnistettu (tyypillisesti hiiren soluista) antamaan RNA-

prosessointi ja mitkä tahansa tai muut tarpeelliset solusta johdetut toiminnat.

Tässä tuottajassa (1) ja (2) sekoitetaan ja sitten lisätään env-yhteenliittyneet Sindbis-proteiinit, solu-uute ja preliposomisekoitus (lipidi sopivassa liuottimessa). Voi olla tarpeellista upottaa Sindbis env-proteiinit liposomeihin ennen kuin lisätään tuloksena olevaa liposomiin upotettua env:ä (1) ja (2) seokseen. Seosta käsitellään (esim. sonikoimalla, lämpötilamanipulaatiolla tai pyörödialyysillä) sallimaan syntyneiden viruspartikkeleiden kapseloituminen lipidin plus upotetun Sindbis env-proteiinin kanssa samalla lailla kuin lääkkeiden lisomikapseloituminen (Gould-Fogerite et al., Anal. Biochem. 148:15, 1985). Tämä menetelmä tuottaa korkeat tiitterit replikoni inkompetentteja Sindbis-virusvektoreita ilman vaatimusta, että perustetaan välituotepakkausolulinjoja.

Esimerkki 9

Solulinja- tai kudosspesifiset Sindbis-vektoreiden "hybridikuoret"

Sindbis-viruksen kudos- ja solutyyppispesifisyys voidaan määrittää pääasiassa viruksen koodaamilla kuoriproteiineilla, E1 ja E2. Nämä virionirakenneproteiinit ovat membraanin läpi kulkevia glykoproteiineja, jotka on upotettu isäntäsolusta johdettuun lipidikuoreen, jota saadaan kun viruspartikkeli silmikoi infektoidun solun pinnasta. Kuori ympäröi ikosahedristä nukleokapsidia, joka koostuu genomisesta RNA:sta, joka on kompleksoitunut yksittäisen kapsidiproteiinin moninkertaisen, erittäin järjestyneiden kopioiden kanssa. E1- ja E2-kuoriglykoproteiinit ovat kompleksoituneet heterodimeereinä, joka näyttää kokoavan trimeerisiksi rakenteiksi muodostaen luonteenominaiset "piikit" virionin pinnalle. Lisäksi näiden proteiinien sytoplasmiset hännät ovat vuorovaikutuksessa nukleokapisiden kanssa aloittaen uusien viruspartikkeleiden kokoamisen (Virology 193:424, 1993). Ominaisuuksia, joita pidetään yksittäisten Sindbis glykopro-

teiinien seurauksena, kuuluvat glykoproteiinin E2 reseptorisitoutuminen (Virology 181:694, 1991) ja glykoproteiini E1:n välittämä virionkuoren ja endosomaalisen membraanin fuusio, johtaen nukleokapsidipartikkelin jakamiseen sytoplasmaan (New Aspects of Positive-Stranded RNA Virus, ss. 166-172, 1990).

Tämä keksintö toteaa, että hajottamalla glykoproteiiniaktiivisuus (erityisesti, mutta ei rajoittuen E2:een) ja ekspressoimalla yhdessä koskematonta heterologista glykoproteiinia tai luomalla hybridikuorigeenituotteita (so. nimenomaan Sindbis kuoriglykoproteiini, jonka luonnollista sytoplasmista ja membraanin ylittäviä alueita ja eksogeenisiä sitomisdomeeneja ei löydy luonnollisesti samasta proteiinimolekyylistä) tai korvaamalla E2- ja/tai E1-glykoproteiinit alfa-virusten glykoproteiineilla tai niiden johdannaisilla, jotka eroavat Sindbis:stä niiden kudoshakuisuudessa, isännän laajuuden spesifisyyttä voidaan muuntaa ilman, että hajotetaan sytoplasmisia toimintoja, joita vaaditaan virionin kokoamiseen. Täten voidaan tuottaa rekombinantti Sindbis-vektoripartikkeleita, jotka sitoutuvat spesifisesti esi-valittuihin kohdesoluihin riippuen sisääntuodun proteiinimolekyylin tai domeenin hakuisuudesta.

Ensimmäisessä konfiguraatiossa analogisten kuoriglykoproteiinien E1 ja/tai E2 substituutiota muista alfa-viruksista tai niiden muunnelmista käytetään muuntamaan kudoshakuisuutta. Esimerkiksi Venezuelan equine encephalitis-virus (VEE) on alfavirus, jolla on hakuisuutta soluille, joilla on imuneste-alkuperä, erilainen kuin Sindbis-virusvastine. Siksi Sindbis-vektoreilla, jotka on pakattu solulinjaan, joka ekspressoi VEE rakenneproteiineja, on samat lymfotrooppiset ominaisuudet kuin kanta-VEE-viruksella, josta pakkaussolurakenneproteiinigeenikasetti saatiin.

Nimenomaan VEE-viruksen Trinidad-aasikanta (ATCC # VR-69) lisätään BHK-soluissa ja virion RNA uutetaan käyttämällä menetelmiä, jotka ovat samanlaiset kuin Sindbis-kloonaami-

selle kuvatut. Koko rakenneproteiinia koodaava alue amplifioidaan alukeparilla, jonka 5'-päät kartoittuvat vastaavasti autenttiseen AUG translaation aloituskohtaan, mukaanlukien ympäröivä Kozak konsensussekvenssi ja UGA translaation lopetuskohta. Eteenpäin oleva aluke on komplementaarinen VEE-nukleotidien 7552-7579 kanssa ja käänteisaluke on komplementaarinen VEE-nukleotidien 11 206-11 186 kanssa (sekvenssi Virology 170:19). VEE cDNA:n vastaten rakenenproteiinigeenejä, PCR-amplifikaatio saadaan aikaan käyttämällä kaksivaihe käänteistranskriptaasia-PCR-protokollaa, kuten kuvattiin Sindbis:lle, VEE-genomi RNA-mallisäikeenä ja seuraava oligonukleotidipari:

Eteenpäin oleva aluke (VEE 7553F):
5'- TATATGCGGCCGCACCGCCAAGATGTTCCCGTTCCAGCCA-3'
(SEQ.ID.Nro 49)

Käänteisaluke (VEE 11206R):
5'-TATATGCGGCCGCTCAATTATGTTTCTGGTTGGT-3'
(SEQ.ID.Nro 50)

Niiden vastaavien, osoitettuihin VEE-nukleotideihin olevien komplementaarisuuksien lisäksi jokainen aluke sisältää NotI tunnistussekvenssin niiden 5'-päässä. PCR-amplifikaation jälkeen 3800 bp fragmentti puhdistetaan 1 %:ssa agaroosigeelissä, sitten pilkotaan sen jälkeen NotI-entsyymillä. Sitten saatu fragmentti ligoidaan erikseen pOP13- ja pOPRSV1-vektoreihin (Strategene), jotka on kuvattu aikaisemmin, jotka pilkotaan NotI:la ja käsitellään vasikan suolen alkaalisella fosfataasilla. Nämä tuloksena olevat vektorit, joissa on koko VEE rakenneproteiinia koodaava sekvenssi, tunnetaan pOP13-VEESP:nä ja pOPRSV1-VEESP:nä. Näiden kloonien käyttö pakkaussolulinjojen kehityksessä seuraa Sindbis-pakkaussolulinjoille kuvattua. Lisäksi rakennetaan lac-operoni-VEE rakenneproteiinigeenien ekspressiovektoreiden muunnelmia käyttämällä systeemejä, joita jäsenneltiin Sindbis:lle tässä patentissa, ja alalla tunnettuja standarditekniikoita. Lisäksi VEE:n muunnelmat ja muut alfa-virukset ja niiden muunnelmat,

jotka eroavat kudoshakuisuudessa, ovat hyödyllisiä tätä lähestymitapaa seuratessa.

Toisessa konfiguraatiossa heterologista glykoproteiinia tai soluligandia ekspressoidaan pakkaussolulinjan, joka kykene tuottamaan kuorellisia Sindbis-vektoripartikkeleita, lipidikaksikerroksisessa kerroksessa. Tämä konfiguraatio on samanlainen kuin esimerkissä 6 kuvattu, VSV-G-pseudotyypitetylle Sindbis-vektorien tuotolle; paitsi että tässä konfiguraatiossa E2 reseptorin sitova toiminta inaktivoidaan insertoimalla, deletoimalla tai emäs-spesifisellä sekvenssimutageneesillä. E2:n reseptorin sitova toiminta inaktivoidaan estämään vektoripartikkelin hakuisuus siihen, mitä heterologinen glykoiporteiini tai soluligandi toimittaa. VSV-G-pseudotyypitysesimerkin lisäksi käytetään muita virusglykoproteiineja, jotka kohdistavat spesifisiä solureseptoreita (kuten retrovirus HIV gp 120-proteiini CD4-solukohdistukselle), kun ekspressoidaan standardivektoreilta, jotka on stabiilisti transfektoitu Sindbis-pakkaussolulinjoihin.

Kolmannessa konfiguraatiossa valmistetaan myös kimeerisiä glykoproteiineja, jotka sallivat Sindbis-virusvektoreiden kohdentamisen tiettyihin solulinjoihin in vitro tai kudostyyppeihin in vivo. Jotta rakennetaan sellainen kimeerinen glykoproteiini, käytetään spesifisiä oligoalukkeita sisältävää ligandia sitovaa domeenia, jolla on toivottu domeeni, plus homologisia Sindbis-sekvenssejä (joihin sisältyy ainutlaatuinen spesifinen restriktioendonukleaasikohta), amplifioimaan inserttisekevenssi, joka voidaan substituoida Sindbis rakenneproteiinieksprессiovektoriin. Vaihtoehtoisesti suoritetaan rajoitetut Bal-21-pilkkomiset sopivasta restriktioentsyymikohdasta, jotta pilkotaan takaisin permissiiviseen insertiokohtaan, jonka jälkeen pientä reseptorin sitomisdomeenia koodaavan fragmentin, tai koko virusglykoproteiinin tai solupinnan ligandin tylppäpääligaatio. Esimerkkinä peptidit, jotka vastaavat HIV gp120-kuoriproteiinin pääasiallisesta neutraloivasta domeenista (Virology 185:820, 1991),

voidaan käyttää rikkomaan normaali E2-hakuisuus ja antamaan CD4-solukohdennus.

Vaikka HIV gp120 esimerkki valaisee yhden hybridiproteiinin, mahdollisuudet eivät rajoitu virusglykoproteiineihin. Esimerkiksi ihmisen interleukiini-2:n reseptorin sitomisosa yhdistetään Sindbis kuoriproteiini(e)n kanssa kohdentamaan vektoreita soluihin IL-2-reseptorien kanssa. Lisäksi edellä ollutta tekniikkaa käytetään luomaan rekombinantti Sindbis-vektoripartikkeli, jossa on kuoriproteiinit, jotka tunnistavat vasta-aineiden Fc-osan. Monokloonaaliset vasta-aineet, jotka tunnistavat vain esivalitut kohdesolut, sidotaan siten sellaisiin Fc-reseptorin kantaviin Sindbis-vektoripartikkeleihin siten, että vektoripartikkelit sitoutuvat ja infektoivat vain edeltä valittuja kohdesoluja (esimerkiksi, tuumorisolut). Vaihtoehtoisesti, hybridikuori, jossa on avidiinisitomisdomeeni, käytetään kohdentamaan soluja, jotka on peitetty biotinyloiduilla vasta-aineilla tai muilla ligandeilla. Potilaan annetaan ensin tulvia vasta-aineiden kanssa ja sitten annetaan aikaa puhdistaa sitoutumaton ja ei-spesifisesti sidottu vasta-aine enenn kuin annetaan vektori. Avidiinisitomiskohdan korkea affiniteetti (10-15) biotiinille sallii tarkan ja tehokkaan kohdentamisen monoklonaalisella "kuvalla" tunnistettuun alkuperäiseen kudokseen.

Esimerkki 10

Vektoriyksiköiden määrittäminen valmisteessa infektoimalla ß-galaktosidaasia ekspressoiva solulinja Sindbis liitosalueen kontrollin alaisena

Vektoriyksiköiden määrittäminen valmisteessa infektoimalla ß-galaktosidaasia ekspressoiva raportisolulinja

Jotta annetaan oikea terapeuttinen annos vektoria yksilöille, on toivottavaa johtaa menetelmä, jolla valmisteessa olevat vektori-infektiiviset yksiköt voidaan määrittää helposti. Tämä saadaan aikaan luomalla solulinja, joka ekspressoi ß-galaktosidaasia tai toista raporttigeeniä vain kun toimin-

nallisia Sindbis ei-rakenneproteiineja läsnä solussa. Solulinja voidaan infektoida Sindbis-vektorivalmisteen kasvavilla laimennuksilla siten, että yksittäisiä soluja ei infektoida enemmällä kuin yhdellä vektoripartikkelilla sallien tiitterin tai vektoriyksiköiden määrittämisen. Täten solulinja on vektorivalmisteessa olevien toiminnallisten partikkelien määritys.

A. Solulinjan, joka ekspressoi toiminnallista β-galaktosidaasiproteiinia Sindbis ei-rakenneproteiinien kontrollin alaisena

Eräässä konfiguraatiossa eukaryoottinen ekspressiokasetti rakennetaan, jossa on 5-pääsekvenssi, joka kykenee aloittamaan Sindbis RNA:n transkription, Sindbis liitosalue, raporttigeeni ja Sindbis RNA polymeraasin tunnistusseksvenssin 3'-pää miinusjuosteen synteesiä varten. Tämä kasetti sijoitetaan mihin tahansa antisensesuuntaukseen, eukaryoottisen transkriptionaalisen promoottorin viereen. Lisäksi näissä rakenteissa voi olla myös katalyyttinen ribozyymisekvenssi välittömästi yhden Sindbis-nukleotidin 5'-pääsekvenssistä, joka johtaa primäärisen RNA-transkriptin pilkkomiseen tarkkaan Sindbis-nukleotidin jälkeen. Tässä antisensesuuntauksessa raporttigeniä ei voida transloida ja se on riippuvainen kokonaan Sindbis ei-rakenneproteiinien läsnäolosta transkriptoitavaksi positiivijuosteiseen mRNA:han ennen raporttigeenin ekspressiota. Sindbis-vektorivalmiste, jota titrataan, antaa näitä ei-rakenneproteiineja. Lisäksi tämä konfiguraatio, jos suunniteltu sisältävän tarkan Sindbis-genomin 5'- ja 3'-pään sekvenssit, sallii raporttigeenitranskriptien amplifioituvan käyttämällä samoja, Sindbis-vektorin antamia ei-rakenneproteiineja.

Esimerkki tästä antisense-titrausrakenteesta on seuraava. Plasmidi pSKSINBV-lacZ pilkotaan SacI-entsyymillä, joka pilkkoo välittömästi Sindbis-3'-pään ja poly A-sekvenssin jälkeen. Esilletyöntyvä 3'-pää tehdään tylpäksi lisäämällä T4 DNA-polymeraasientsyymiä ja dNTP:tä, jonka jälkeen inku-

boidaan 10 min 16°C:ssa. T4 DNA-polymeraasi lämpöinaktivoidaan inkuboimalla 75°C:ssa 15 min. Linearisoitu plasmidi pilkotaan sen jälkeen BamHI-entsyymillä, joka katkaisee nukleotidin 7335, Sindbis liitosalueesta myötävirtaan. Tuloksena oleva fragmentti puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä ja ligoidaan pMCS-26s:llä (kuvattu esimerkissä 7), joka on pilkottu Xba I-entsyymillä, tehty tylppäpäiseksi kuten edellä on kuvattu, pilkottu Bam HI:llä, puhdistettu 1 % agaroosigeelissä ja defosforyloitu vasikan suolen alkaalisella fosfataasilla.

Tuloksena oleva rakenne, joka tunnetaan pMCS-LacZ:na, modifioidaan sitten sisältämään Sindbis 5'-pään 299 nukleotidiä, fuusioidaan 84 nukleotidiribozyymisekvenssiin hepatitis deltaviruksen (HDV) antigenomisesta juosteesta käyttämällä päällekkäinmenevää PCR-amplifikaatiota (kuvattu yksityiskohtaisesti esimerkissä 7). Kaksi alukeparia käytetään alunperin erillisissä PCR-reaktioissa, jonka jälkeen niiden päällekkäinmenevä synteesi PCR:n toisella kierroksella. Reaktio #1 sisältää alukkeet HDV17-68 (SEQ.ID.Nro) ja HDV49-XC (SEQ.ID.Nro) ja reaktio #2 sisältää alukkeet SIN-HDV (SEQ.ID.Nro) ja SIN276-SPE (SEQ.ID.Nro) ja plasmidin pVGSP6GEN mallisäikeenä. PCR-amplifikaatio saadaan aikaan standardilla kaksi-lämpötilakierrätysprotokollalla. Ensimmäisen PCR-amplifikaatiosyklin jälkeen 1/20 koko määristä kummastakin reaktiosta #1 ja reaktiosta #2 yhdistetään ja käytetään mallisäikeenä PCR-amplifikaation toisessa syklissä alukkeiden HDV49-XC ja SIN276-SPE kanssa ja standardia kaksi-lämpötilakierrätysprotokollaa. Toisen PCR-kierroksen jälkeen 414 bp amplikoni puhdistetaan Mermaid:lla (Bio191, La Jolla, CA) ja pilkotaan entsyymeillä ClaI ja SpeI. Pilkottu amplikoni puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä ja sen jälkeen ligoidaan plasmidiin pMCS-LacZ, joka myös on pilkottu ClaI:-lla ja Spe I:llä ja puhdistettu 1 % agaroosigeelissä. Tuloksena oleva rakenne, jossa on ekspressiokasettielementit HDV antigenominen ribozyymi/Sindbis 5'-pää 299nt/liitosalue/lacZ-geeni/3'-pää ei-transloitu alue, tunnetaan pd5'LacZ:na.

LacZ ekspressiokasetti plasmidista pd5'LacZ insertoidaan sen jälkeen pcDNA3:een (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Plasmidi pd5'LacZ pilkotaan entsyymillä Not I, tehdään tylppäpäiseksi, kuten edellä on kuvattu ja sitten pilkotaan entsyymillä Xba I. Fragmentti puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä ja ligoidaan pcDNA3:n kanssa, joka on pilkottu entsyymillä Hind III, tehdään tylppäpäiseksi, sitten pilkotaan entsyymillä Xba I. Tuloksena oleva rakenne, jossa on CMV-promoottori, joka transkriboi konfiguraation 3'-pääsekvenssin/LacZ-geeni/liitosalue/Sindbis 5'-pääsekvenssi/HDV ribozyymi, antisense raporttikasetti RNA:n, tunnetaan pSINjraß-gal:na.

BHKSINjraß-gal-solut johdetaan transfektoimalla 5 x 10^5 BHK-21-solua, kasvatettuna 60 mm petrimaljalla 5 µg SINjraß-gal-vektoria kompleksoituna polykationisen reagenssin Transfectam (Promega, Madison WI) kanssa. 24 h transfektion jälkeen alustoihin laitetaan 400 µg/ml G418:aa (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). Sen jälkeen kun kaikki ei-transfektoidut solut ovat kuolleet ja G418 resistenssit pesäkkeet alkavat jakaantua, solut poistetaan maljalta trypsinoimlla, kerätään, sitten klonataan rajoittavalla laimennuksella. Useista klooneista testataan toiminnallisen ß-galaktosidaasin tuotto infektoimalla tietyllä Sindbis-viruksen villityypin varaston tiitterillä. Toiminnallisen b-galaktosidaasin tuotto ehdokas-BHKSINjraß-gal-klooneissa määritetään 6 h infektion jälkeen kiinnittämällä ensin PBS-huuhdellut solut liuoksella, jossa on 2 % formaldehydiä (37 % kantaliuosta)/0,2 % glutaraldehydiä, sitten värjäämällä solut liuoksella, jossa on 0,5 mM kaliumferrisyanidia/0,5 mM kaliumferrosyanidia/2 mM $MgCl_2$ mg/ml X.gal. Siniset solut ovat selvästi näkyviä 3 tunnissa. Edellyttäen että Sindbis-virusvarasto ei sisällä korkeita tasoja häiritseviä parikkeleita (DI), pitäisi virustiitterin olla samanlainen määritettynä plakkimäärityksenä BHK-21-soluihin tiitterin kanssa, joka havaittiin X-gal-värjäyksellä BHKSINjraß-gal-soluissa.

Erilaisten Sindbis-vektorivalmisteiden tiitteri, vektoriyksikköinä, tuotettuna pakkaussolulinjoista, kuten ne joita on

kuvattu esimerkissä 7, määritetään infektoimalla BHKSINjraß-gal-solujen konfluentit yksinkertaiset kerrokset useilla vektorilaimennuksilla. Vektorivalmisteen tiitteri määritetään 6 h infektion jälkeen tekemällä solut, jotka tuottavat ß-galaktosidaasiproteiinia, näkyviksi kuten edellä on kuvattu. Koska Sindbis-vektoreissa ei ole virusaluetta, joka vastaa rakennegeenejä, ei ole mahdollista määrittää vektorivalmisteen tiitteriä plakkimäärityksellä BHK-21-soluissa.

Vaihtoehtoisesti tiitterisolulinja tuotetaan käyttämällä erilaista raporttikasettikonfiguraatiota, mikä koostuu eukaryoottisesta promoottorista/5'-pää Sindbis-sekvenssi, jonka virustranskriptaasi tunnistaa/Sindbis liitosalue/raporttigeeni/Sindbis RNA polymeraasin tunnistussekvenssin miinusjuosteen synteesiä varten ja ekspressoidaan sense-suunnassa. Tämä raporttiekspressiokasetti vaatii vektorin toimittamien Sindbis ei-rakenneproteiinien synteesiä, antisense RNA-molekyyliin ennen subgenomista lähettiä koodaavan raporttigeenin transkriptiota.

Nimenomaan sense-suuntautunut pakkausrakenne luodaan seuraavasti. Plasmidi pVGELVIS pilkotaan entsyymillä Apa I, joka pilkkoo nukleotidistä 11 373, juuri myötävirtaan Sindbis 3'-päästä. Apa I-pilkottu DNA on tehty tylppäpäiseksi lisäämällä T4 DNA-polymeraasia ja dNTP:tä ja inkuboitu 16°C:ssa 10 min. Polymeraasin lämpöinaktivaation jälkeen DNA-fragmentti pilkotaan entsyymillä Sfi I ja 10041 bp fragmentti puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä. Plasmidi pSKSINBV-lacZ pilkotaan entsyymillä Sac I ja tehdään tylppäpäiseksi kuten edellä on kuvattu. Sitten fragmentti pilkotaan Sfi I:llä ja 7 kbp fragmentti puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä ja ligoidaan puhdistettuun pGELVIS-fragmenttiin luomaan plasmdi pELVIS-bgal. Tässä plasmidissa on täydelliset Sindbis ei-rakenneproteiinit, Sindbis liitosalue, LacZ-geeni ja Sindbis 3'-pää replikaasin tunnistussekvenssi MuLV LTR-promoottorin kontrollin alaisena. Plasmidi pELVIS-bgal pilkotaan Bsp I:llä, puhdistetaan Geneclean:llä (Bio 101 corp., San Diego, CA) ja ligoidaan uudestaan itsensä kanssa. BspE I poistaa Sindbis

ei-rakenneproteiinigeenisekvenssit nt:ien 422-7054 välistä. Uudelleen ligoidussa rakenteessa on 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan Sindbis RNA:n transkription, Sindbis liitosalueen, sekvenssit jotka koodaavat LacZ-geeniä ja Sindbis 3'-pääsekvenssit, joita tarvitaan miinusjuosteisen RNA:n synteesiin, kaikki myötävirtaan ja MuLV-LTR-promoottorin transkriptionaalisen kontrollin alaisena. Tämä rakenne tunnetaan pELVISd1NSP-bgal:na.

pELVISd1NSP-bgal-plasmidi transfektoidaan BHK-soluihin ja testataan kuten edellä on kuvattu. BHK pELVISd1NSP-bgal solut tuottavat RNA-transkriptin, jossa on 5'-pääsekvenssi, jonka Sindbis transkriptaasi tunnistaa, Sindbis liitosalue, sekvenssit jotka koodaavat LacZ-geeniä ja Sindbis 3'-pääsekvenssit, joita vaaditaan miinus-juosteisen RNA:n synteesiin. ß-galaktosidaasin ekspressio primäärisestä transkriptistä estetään vastavirtaan olevan avoimen lukuraamin ja stop-kodonien, jotka BspE1-deleetio on tehnyt, takia. Sindbis ei-rakenneproteiinien, joita titrattava Sindbis-vektori toimittaa, lisääminen johtaa aktiivisen LacZ-transkriptien transkriptioon Sindbis liitosalueelta, antisense-välituotteen aluperäisen synteesin jälkeen. Lisäksi tämä konfiguraatio, jos suunniteltu sisältämään tarkan Sindbis-genomin 5'- ja 3'-pään sekvenssit, sallii raporttigeeni-transkriptien suorittaa amplifikaation käyttämällä samoja ei-rakenneproteiineja, joita Sindbis-vektori toimittaa.

Eräässä toisessa konfiguraatiossa titrattava solulinja tuotetaan käyttämällä ekspressiokasettia, jossa on antisense-raporttigeeni, jonka jälkeen on Sindbis 3'-pääreplikaasin tunnistussekvenssit, sijainniltaan sense-suuntauksessa. Tämä rakenne, eukaryoottisen promoottorin kontrollin alaisena, tuottaa RNA-transkriptin, jonka Sindbis ei-rakenneproteiinit, jotka titrattava vektori on toimittanut, tunnistaa ja transkriptoi.

Sindbis ei-rakenneproteiinit tunnistavat sekvenssit primäärisessä raporttitranskriptissä ja puolestaan syntetisoivat

sense-raporttitranskriptin. Tämä rakenne ei hyödy raporttigeenitranskriptin amplifikaatiosta, mutta pitäisi silti antaa riittävästi transkriptejä sallimaan vektorin titraamisen.

Tämän tyyppisen titrauskasetin rakentaminen on seuraava. pSV-B-galaktosidaasivektori (Promega Corp., madison, WI) pilkotaan entsyymillä Hind III ja tehdään tylppäpäiseksi kuten edellä kuvattu. Plasmidia pilkotaan edelleen entsyymeillä BamHI ja Xmn I poistamaan LacZ-geeni ja vähentämään jäljelle jäävän fragmentin kokoa. 3737 nt fragmentti, jossa on LacZ-geeni, puhdistetaan 1 % agaroosigeelissä ja ligoidaan pcDNA3:een (Invitrogen, San Diego, CA), joka on pilkottu entsyymeillä Bam HI ja Eco RI. Uusi plasmidirakenne tunnetaan pcDNAaLacZ:na. Tämä plasmidi pilkotaan entsyymillä Apa I, tehdään tylppäpäiseksi kuten edellä ja pilkotaan edelleen entsyymillä Xho I. Plasmidi pSKSINBV (kuvattu aikaisemmin) pilkotaan Sac I:llä, tehdään tylppäpäiseksi kuten ennen ja sitten pilkotaan entsyymillä Xho I. Tuloksena oleva 146 nt fragmentti, jossa on Sindbis 3' replikaasin tunnistussekvenssi, puhdistetaan 1,2 % agaroosigeelissä, ligoidaan pilkottuun pcDNAALacZ-vektoriin. Uudellen ligoidussa rakenteessa on anti-sense LacZ-geeni ja 3'-Sindbis replikaasi proteiinin tunnistussekvenssi CMV-promoottorista alaspäin. Tuloksena oleva rakenne tunnetaan pcDNSaLacZ-3'sin:nä. Rakenne transfektoidaan BHK-soluihin ja käytetään kuten edellä on kuvattu.

Esimerkki 11

Vektorirakenteiden, jotka ekspressoivat HBV-antigeenejä immuunivasteen induktiota varten, luominen

A. HBV E/ydinsekvenssin eristäminen

1,8 kb Bam HI fragmentti, jossa on koko hepatitis B:n esiydin/ydin koodausalue, saadaan plasmidista pAM6 (ATCC Nro 45020) ja ligoidaan KS II$^+$:n Bam HI-kohtaan (Stratagene, La Jolla, CA). Tätä plasmidia merkitään KS II$^+$ HBpc/c. Xho I linkkerit lisätään Stu I kohtaan esiydin/ydin KS II$^+$ HBpc/c:

ssä (nukleotidisekvenssiin 1704), jonka jälkeen pilkotaan Hinc II:lla (nukleotidisekvenssissä 2592). Saatu 877 emäsparin Xho I-Hinc II esiydin/ydin fragmentti kloonataan SK II$^+$:n Xho I/Hinc II kohtaan. Tätä plasmidia merkitään SK$^+$HBe.

B. Sekvenssien, jotka käyttävät PCR:ää, valmistaminen

1. HBV e/ydinsekvenssi, joka käyttää PCR:ää kohdennettu mutageneesi

Esiydin/ydin-geeni plasmidissa KS II$^+$ HB pc/c sekvenssoidaan, jotta määritetään, onko esiydin/ydin-alue oikein. Tässä sekvenssissä havaittiin olevan yksittäinen emäsparideleetio, joka aiheuttaa raamin siirtymisen kodonissa 79, joka johtaa kahteen peräkkäiseen raamissa TAG stopkodoniin kodoneissa 84 ja 85. Tämä deleetio korjataan esiydin/ydin koodausalueen PCR päällekkäin menevällä pidennyksellä (Ho et al., Gene 77:51, 1989) plasmidissa SK$^+$ HBe. Neljää oligonukleotidialuketta käytetään 3 PCR-reaktioon, jotka suoritetaan korjaamaan deleetio.

Ensimmäinen reaktio käyttää kahta aluketta. Sensealukesekvenssi vastaa nukleotidisekvenssiä 1 805-1 827 adw-kannassa ja sisältää kaksi Xho I restriktiokohtaa 5'-päässä. Nukleotidinumerointi on saatu Genbankilta (Intelligenics, Inc., Mountain View, CA).

5'-CTC GAG CTC GAG GCA CCA GCA CCA TGC AAC TTT TT-3'
(SEQ.ID.Nro 51)

Toinen alukesekvenssi vastaa antisensenukleotidisekvenssiä 2 158-2 130 Hepatitis B viruksen adw-kannassa ja sisältää kodonit 79, 84 ja 85.

5'-CTA CTA GAT CCC TAG ATG CTG GAT CTT CC-3'
(SEQ.ID.Nro 52)

Toinen reaktio käyttää kahta aluketta. Sensealuke vastaa nukleotidisekvenssejä 2 130- 2158 adw-kannassa ja sisältää kodonit 79, 84 ja 85.

5'-GGA AGA TCC AGC ATC TAG GGA TCT AGT AG-3'
(SEQ.ID.Nro 53)

Toinen aluke vastaa antisensenukleotidisekvenssiä SK+-plasmidipolylinkkeristä ja sisältää Cla I kohdan 135 bp myötävirtaan HBV esiydin/ydinalueen stopkodonista.

5'-GGG CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CG-3'
(SEQ.ID.Nro 54)

Kolmas reaktio käyttää myös kahta aluketta. Sensealuke vastaa nukleotidisekvenssiä 5-27 adw-kannassa ja sisältää kaksi Xho I restriktiokohtaa 5'-päässä.

5'-CTC GAG CTC GAG GCA CCA GCA CCA TGC AAC TTT TT
(SEQ.ID.Nro 55)

Toinen alukesekvenssi vastaa antisensenukleotidisekvenssiä SK+-plasmidipolylinkkeristä ja sisältää Cla I kohdan 135 bp myötävirtaan HBV esiydin/ydinalueen stopkodonista.

5'-GGG CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CG-3'
(SEQ.ID.Nro 56)

Ensimmäinen PCR-reaktio korjaa deleetion antisensejuosteessa ja toinen reaktio korjaa deleetion sensejuosteessa. PCR-reaktiot 1 ja 2 korjaavat mutaation CC-CCA, mikä tapahtuu kodonissa 79 ja emäsparisubstituution TCA-TCT kodinissa 81. Alukkeessa 1 on kaksi toistaan seuraavaa Xho I kohtaa 10 bp vastavirtaan HBV e koodausalueessa ATG-kodonista ja aluke 4:ssä on Cla I kohta HBV esiydin/ydin koodausalueessa 135 bp myötävirtaan stopkodonista. Ensimmäisen ja toisen PCR-reaktion tuotteet ulotetaan kolmanteen PCR-reaktioon luomaan

yksi täydellinen HBV esiydin/ydin koodausalue, jossa on oikea sekvenssi.

PCR-reaktiot suoritetaan käytämällä seuraavia kierrätysolosuhteita: näyte kuumennetaan alunperin 94°C:een. Tämä vaihe, kutsutaan sulamispisteeksi, erottaa kaksijuosteisen DNA:n yksijuosteiseksi synteesiä varten. Sitten näytettä kuumennetaan 56°C:een 30 s. Tätä vaihetta kutsutaan hybridisoitumisvaiheeksi, sallii alukkeiden hybridisoitua yksijuosteiseen DNA:han, joka on tuotettu ensimmäisessä vaiheessa. Sitten näytettä kuumennetaan 72°C:een 30 s. Tämä vaihe, jota kutsutaan pidennysvaiheeksi, syntetisoi yksijuosteisen DNA:n, joka on tuotettu ensimmäisessä vaiheessa, komplementaarisen juosteen. Toinen sulamisvaihe suoritetaan 94°C:ssa 30 s,
jonka jälkeen on hybridisoitumisvaihe 56°C:ssa 30 s, jonka jälkeen on pidennysvaihe 72°C:een 30 s. Tätä menetelmää toistetaan 35 kierrosta johtaen toivotun DNA-tuotteen amplifikaatioon.

PCR-reaktiotuote puhdistetaan 1,5 % agaroosigeelielektroforeesilla ja transferoidaan NA 45 paperille (Schleicher ja Schuell, Keene, New Hampshire). Toivottu 787 bp DNA-fragmentti eluoidaan NA 45 paperista inkuboimlla 30 min 65°C:ssa 400 µl:ssa korkeassa suolapuskurissa (1,5 M NaCl, 20 mM Tris, pH 8,0 ja 0,1 mM EDTA). Eluaation jälkeen lisätään liuokseen 500 µl fenoli:kloroformi:isoamyylialkoholi (25:24:1). Seosta sekoitetaan voimakkaasti ja sitten sentrifugoidaan 14 000 rpm 5 min Brinkmann Eppendorf sentrifuugissa (5415L). Vesipitoinen faasi, jossa on toivottu DNA-fragmentti, siirretään tuoreeseen 1,5 ml mikrofuugiputkeen ja lisätään 1, 0 ml 100 % EtOH:ta. Tätä liuosta inkuboidaan kuivassa jäässä 5 min ja sitten sentrifugoidaan 20 min 10 000 rpm. Supernatantti heitetään pois ja pelletti huuhdellaan 500 µl:lla 70 % EtOH:ta. Pelletti kuivataan sentrifugoimalla 10 000 rpm tyhjössä Savant Speed-Vac konsertaatorissa ja sitten suspensdoidaan uudestaan 10 µl:aan deionisoitua H_2O:

ta. 1 µl PCR-tuotetta analysoidaan 1,5 % agaroosigeelielektroforeesissa. 787 Xho I-Cla I esiydin/ydin PCR-amplifioitu fragmentti kloonataan SK+-plasmidin Xho I-Cla I kohtaan. Tätä plasmidia merkitään SK+ HBe-c. E. coli (DH5 alfa, Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD) transformoidaan SK+ HBe-c-plasmidilla ja lisätään luomaan plasmidi-DNA:ta. Sitten plasmidi eritetään ja puhdistetaan, olennaisesti kuten Birnboim et al. ovat kuvanneet (Nuc. Aicd. Res. 7:1513, 1979; katso myös Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (toim), Cold Spring Harbor Press, 1989). SK+ HBe-c-plasmidi analysoidaan varmistamaan esiydin-/ydin-geenin sekvenssi (kuvio 4).

2. HBV-ydinsekvenssin eristäminen

Yksittäinen emäsparideleetio SK+ HBe-plasmidissa korjataan PCR päällekkäin menevällä laajennuksella, kuten kuvattiin esimerkissä 9B. 4 oligonukleotidialuketta käytetään PCR-reaktioihin, jotka suoritetaan korjaamaan mutaatio.

Ensimmäinen reaktio käyttää kahta aluketta. Sensealuke vastaa nukleotidisekvenssejä SK+ HBe-plasmidin T-7-promoottorille.

5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'
(SEQ.ID.Nro 57)

Toinen aluke vastaa antisensenukleotidisekvenssiä 2 158-2 130 adw-kannassa ja sisältää kodonit 79, 84 ja 85.

5'-CTA CTA GAT CCC TAG ATG CTG GAT CTT CC-3'
(SEQ.ID.Nro 58)

Toinen reaktio käyttää kahta aluketta. Antisensealuke vastaa nukleotidisekvenssejä SK+ HBe-plasmidin T-3-promoottorille.

5'-3': ATT AAC CCT CAC TAA AG
(SEQ.ID.Nro 59)

Toinen aluke vastaa sensenukleotidisekvenssiä 2 130-2 158 adw-kannassa ja sisältää kodonit 79, 84 ja 85.

5'-GGA AGA TCC AGC ATC TAG GGA TCT AGT AG-3'
(SEQ.ID.Nro 60)

Kolmas reaktio käyttää kahta aluketta. Antisensealuke vastaa nukleotidisekvenssejä SK+ HBe-plasmidin T-3-promoottorille.

5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'
(SEQ.ID.Nro 61)

Toinen aluke vastaa sensesekvenssiä SK+ HBe-plasmidin T-7-promoottorille.

5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'
(SEQ.ID.Nro 62)

Kolmannen reaktion PCR-tuote tuottaa oikean sekvenssin HBV esiydin-/ydin-koodausalueelle.

Jotta eristetään HBV-ydinkoodausalue, suunnitellaan aluke viemään Xho I-restriktiokohta ydinkoodausalueen ATG aloituskodonista vastavirtaan ja eliminoidaan 29 aminohapon johtosekvenssi HBV esiydinkoodausalueelta. Neljännessä reaktiossa HBV esiydinkoodausalue tuotetaan käyttämällä OCR-tuotetta kolmannesta reaktiosta ja kahta seuraavaa aluketta.

Sensealuke vastaa nukleotidisekvenssiä 1885-1905 adw-kannassa ja sisältää Xho I-kohdat 5'-päässä.

5'-CCT CGA GCT CGA GCT TGG GTG GCT TTG GGG CAT G-3'
(SEQ.ID.Nro 63)

Toinen aluke vastaa antisensenukleotidisekvenssiä SK+ HBe-plasmidin T-3-promoottorille. Noin 600 bp PCR-tuote neljännestä PCR-reaktiosta sisältää HBV-ydinkoodausalueen ja uusia

Xho I restriktiokohtia 5'-päässä ja Cla I restriktiokohtia 3'-päässä, joka oli läsnä SK+ HBe-plasmidin multikloonauskohdassa.

5'-ATT ACC CCT CAC TAA AG-3'
(SEQ.ID.Nro 64)

Neljännen PCR-reaktion jälkeen liuos siirretään tuoreeseen 1,5 ml mikrofuugiputkeen. 50 µl 3 M natriumasetaattia lisätään tähän liuokseen, jonka jälkeen 500 µl kloroformi:isoamyylialkoholia (24:1). Seosta sekoitetaan voimakkaasti (Vortex) ja sitten sentrifugoidaan 14 000 rpm 5 min. Vesipitoinen faasi siirretään tuoreeseen mikrofuugiputkeen ja lisätään 1,0 ml 100 % EtOH:ta. Tätä liuosta inkuboidaan -20°C:ssa 4,5 h ja sitten sentrifugoidaan 10 000 rpm 20 min. Supernatantti heitetään pois ja pelletti huuhdeltiin 500 µl:lla 70 % EtOH:ta. Pelletti kuivataan sentrifugoimalla 10 000 rpm tyhjössä ja sitten suspensdoidaan uudestaan 10 µl:aan deionisoitua H_2O:ta. 1 µl PCR-tuotetta analysoidaan 1,5 % agaroosigeelielektroforeesissa.

3.HBV X-antigeenin eristys

642 bp NCO I -Taq I-fragmentti, jossa on hepatitis B-virus X avoin lukuraami, saadaan pAM6-plasmidista (adw) (ATCC 45020), tylpennetään Klenow-fragmentilla ja ligoidaan SK+:n Hinc II-kohtaan (Stratagene, la Jolla, Kalifornia).

E. coli (DH5 alfa, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) transformoidaan ligaatioreaktiolla ja lisätään. Miniprep DNA eristetään ja puhdistetaan, olennaisesti kuten Birnboim et al. ovat kuvanneet (Nuc. Aicd. Res. 7:15134, 1979; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (toim), Cold Spring Harbor Press, 1989).

Koska tämä fragmentti voidaan insertoida kumpaankin suuntaan, selektoidaan kloonit, joilla on sense-suuntaus suhteessa Xho I- ja Cla I-kohtiin SK+-multikloonikohdassa. Eri-

tyisesti miniprep DNA:t pilkotaan diagnostisella restriktioentsyymillä Bam HI. Insertit oikeassa suuntauksessa tuottavat kaksi, kooltaan 3,0 Kb ka 0,6 Kb fragmenttia. Insertit oikeassa suuntauksessa tuottavat kaksi 3,6 Kb ja 0,74 Kb fragmenttia. Valitaan klooni, joka on oikeassa suuntauksessa ja merkitään SK-X Ag.

4. Sindbis-vektoreiden, jotka ekspressoivat HBVe-c:tä, HBV ydintä ja HBV X:ää, rakentaminen

Sindbis-vektorin, joka ekspressoi HBVe-c-sekvenssiä, rakentaminen saadaan aikaan pilkkomalla SK$^+$ HBe-c-plasmidi Xho I- ja Cla I-restriktioentsyymillä vapauttamaan cDNA-fragmentti, joka koodaa HBVe-c-sekvenssejä. Sitten fragmentti eristetään agaroosigeelielektroforeesilla, puhdistetaan Gene Clean™:llä (BIO101, San Diego, CA) ja insertoidaan toivottuun Sindbis-vektorirunkoon, joka on valmistettu pilkkomalla Xho I:llä ja Cla I:llä ja käsitellään CIAP:lla. Esimerkissä 2 kuvatut Sindbis-vektorit ovat sopivia insertoitavaksi HBV-antigeenisekvensseihin. Sellaisiin Sindbis-vektoreihin kuuluvat pKSSINBV, pKSSINd1JRsjrc, pKSSINd1JRsjrPC, pKSSINd1JRsjrNP-(7582-7601) ja pKSSINd1JRsexjr.

Sindbis-vektorin, joka ekspressoi HBV-ydin-sekvenssiä, rakentaminen saadaan aikaan edellä kuvatun PCR-tuotteen Gene Clean™-käsittelyllä. Amplifioitu tuote pilkotaan sitten Xho I- ja Cla I-restriktioentsyymikohdilla, eristetään agaroosigeelielektroforeesilla, puhdistetaan Gene Clean™:llä ja ligoidaan samoihin edellä kuvattuihin ja Xho I- ja Cla I-entsyymeillä esikästeltyihin Sindbis-vektoreihin.

Sindbis-vektorin, joka ekspressoi HBV-X-antigeenisekvenssiä, rakentaminen saadaan aikaan pilkkomalla plasmidi SK-X Ag Xho I- ja Cla I-restriktioentsyymikohdilla vapauttamaan cDNA-fragmentti, joka koodaa HBV-X-sekvenssejä. Fragmentti eristetään agaroosigeelielektroforeesilla, puhdistetaan käyttämällä Gene Clean™:ää ja insertoidaan toivottuihin, edellä

kuvattuihin Sindbis-vektorirunkoihin, jotka on esikäsitelty Xho I- ja Cla I-entsyymeillä.

Edellä olleita Sindbis HBV ekspressoivia vektoreita voidaan myös modifioida ekspressoimaan samanaikaisesti selektoitavaa lääkeresistenssimarkkeria, joka on riippuvainen vektorilla infektoitujen solujen käsittelyn tai kokeen vaatimuksista. Mitä tahansa edellä kuvattuja Sindbis HBV ekspressiovektoreita voidaan myös suunnitella ekspressoimaan samanaikaisesti G418-resistenssiä. Tämä saadaan aikaan liittämällä sisäinen ribozyymin sisääntulokohta (esimerkkki 5), jonka jälkeen on bakteerin neomysiini fosfotransferaasigeeni laitettuna 3' HBV-koodaussekvenssiin ja vektorin terminaalisen 3'-pään 5':een käyttämällä vektorin moninkertaista kloonauskohtaa. Näitä G418-resistenssejä vektorirakenteita voidaan käyttää vektori-infektoitujen solujen selektioon HBV-spesifisten CTL-kohteiden selektoimiseen seuraavissa kappaleissa.

D. Sindbis-vektoreilal infektoitujen solujen ekspressio

1. ELISA

Solulysaatit soluista, jotka on infektoitu millä tahansa HBV ekspressoivalla vektorilla tehdään pesemällä 1,0 x 10^7 viljeltyä solua PBS:llä, suspendoimalla solut 600 µl kokonaistilavuuteen PBS:ssä ja sonikoidaan kaksi 5 s jaksoa asetuksella 30 Branson sonikaattorissa, malli 350 (Fisher, Pittsburgh, PA) tai jäädyttämällä-sulattamalla 3 kertaa. Lysaatit kirkastetaan sentrifugoimalla 10 000 rpm 5 min.

Ydinantigeeni ja esiydinantigeeni solulysaateissa ja eritetty e-antigeeni viljelmäsupernatantissa määritetään käyttämällä Abbott HBe, rDNA EIA kittiä (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Chicago, IL). Eräs toinen sensitiivinen, esiydinantigeenin EIA-määritys solulysaateissa ja eritetyn e-antigeenin viljelmäsupernatantissa suoritetaan käyttämällä Incstar ETI-EB-kittiä (Incstar Corporation, Stillwater, MN). Luodaan standardikäyrä rekombinantti hepatitis B ydin- ja e-

antigeenin, joita saadaan Biogen:ltä (Geneve, Sveitsi), laimennuksilla.

2. Immunosaostus/Western Blot

Vektorilla infektoitujen solujen ekspressoimien esiydin/ydin- ja e-antigeenien karakterisointi suoritetaan immunosaostuksella, jonka jälkeen Western blot-analyysi. Nimenomaan 0,5-1,0 ml solulysaattia PBS:ssä tai viljelmäsupernatanttia sekoitetaan polyklonaalisen kani-anti-hepatitis B-ydinantigeenin (DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornia) kanssa, joka on sitoutunut G-Sepharoseen (Pharmacia LKB, Uppsala, Ruotsi) ja inkuboidaan yön yli 4°C:ssa. Näytteet pestään kaksi kertaa 20 mM Tris-HCl:ssä, pH 8,0, 100 mM NaCl:ssä, 10 mM EDTA:ssa ja keitetään latauspuskurissa 0,5 % ß-2-merkaptoetanolin kanssa. Proteiinit hajotetaan ensin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla ja sitten siirretään Immobilon:iin (Millipore Corp., Bedford, ME) ja koetetaan DAKO-polyklonaalisen kani-anti-hapatitis-ydinantigeenin kanssa, jonka jälkeen ^{125}I-ptoteiini A.

E. Immuunivasteen testaus

1. Sytotoksisuusmääritykset

(a) Umpisiitoshiiret

6-8-viikon vanhoja naaras Balb/C-, C57B1/6- ja C3H-hiiriä (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) injektoitiin kahdesti vatsaontelonsisäisesti (i.p.) 1 viikon välein 1 x 10^7 säteilytetyllä (10 000 rad huoneenlämpötilassa) Sindbis-vektori-infektoidulla L-M(TK$^-$)-soluilla (ATCC CLL 1.3). Eläimet uhrataan 7 d myöhemmin ja pernasoluja (3 x 10^6/ml) viljellään in vitro niiden vastaavien säteilytettyjen Sindbis-vektori-infektoitujen solujen (6 x 10^4/ml) kanssa T-25-pulloissa (Corning, Corning, NY). Viljelyalusta koostuu RPMI 1640:sta, 5 % lämpöinaktivoiduista nautavasikan seerumista, 1 mM natriumpyruvaatista, 50 µg/ml gentamysiinistä ja 10^{-5} M ß-2-merkaptoetanolista (Sigman, St. Louis, MO). Tehostajasolut kerätään 4-7 d myöhemmin ja testataan käyttämällä erilaisia

tehostaja:kohdesolusuhdesuhteita 96 kaivon mikrotiitterimaljoilla (Corning, Corning, NY) standardissa kromin vapautusmäärityksessä. Kohteet ovat vektori-infektoituja ja ei-infektoituja L-M(TK$^-$)-solut, kun taas ei-transdusoituja solulinjoja käytetään negatiivisinä kontrolleina. Nimenomaan $Na_2{}^{51}CrO_4$-leimatut (Amersham, Arlington Heights, IL) (100 uCi, 1 h 37°C) kohdesolut (1 x 10^4 solua/kaivo) sekoitetaan tehostajasolujen kanssa erilaisina tehostaja-kohdesolu-suhteina lopullisena 200 µl tilavuutena. Inkubaation jälkeen 100 µl viljelyalustaa poistettiin ja analysoitiin Beckman gamma-spektrometrillä (Beckman, Dallas, TX). Spontaani vapautuminen (SR) määritetään CPM:nä kohteista plus alustasta ja maksimaalinen vapautuminen (MR) määritetään CPM:nä kohteista plus 1 M HCl:stä. Kohdesolulyysauksen prosentti lasketaan : [(Tehostajasolu + kohdeCPM) - (SR)/(MR) - (SR)] x 100. Kohteiden spontaanin vapautumisen arvot ovat tyypillisesti 10 % - 20 % MR:stä.

Tiettyjä CTL-analyysejä varten tehostajat voivat olla in vitro stimuloituja monet kerrat, esimerkiksi d 8-12 primäärisen in vitro stimulaation jälkeen. Erityisemmin, 10^7 tehostajasolua sekoitetaan 6 x 10^5 säteilytetyn (10 000 rad) stimulaattorisolun kanssa ja 2 x 10^7 säteilytetyn (3 000 rad) "täyttäjä"-solun kanssa (valmistettu kuten alla on kuvattu) 10 ml:aan "täydellistä" RPMI-alustaa. (RPMI:n sisältäessä: 5 % lämpöinaktivoitua naudan vasikan seerumia. 2 mM L-glutamiinia, 1 mM natriumpyruvaattia, 1X ei-olennaisia aminohappoja ja 5 x 10^5 M ß-2-merkaptoetanolia). Stimulaattorisolut in vitro tehostajasolujen stimulaatiota varten luodaan infektoivista L-M- (TK-) soluista Sindbis HBV-vektorin ekspressoidessa samanaikaisesti G418-resistenssiä. Vektori-infektoidut solut selektoidaan markkeriselektiota varten käyttämällä 800 µg/ml G418:aa 2 viikkoa. G418-resistenssejä soluja säteilytetään sitten 10 000 rad ja käytetään sitten stimuloimaan uudestaan tehostajasoluja in vitro, kuten on kuvattu. "Täyttäjä"-solut valmistetaan luonnollisista syngeenisistä hiiren pernasoluista, jotka oli suspendoitu RPMI:

hen, säteilytetty 3000 rad:lla huoneenlämpötilassa. Pernasolut pestään RPMI:llä, sentrifugoidaan 3000 rpm:llä 5 min huoneenlämpötilassa ja pelletti suspendoidaan uudestaan RPMI:hen. Uudelleen suspendoituja soluja käsitellään 1,0 ml:lla tris-ammoniumkloridia (100 ml 0,17 M tris-emästä, pH 7,65, plus 900 ml 0,155 M NH_4Cl; lopullinen liuos säädetään pH 7,2:ksi) 37°C:ssa 3-5 min. Sekundääristä in vitro uudelleen stimulointia viljellään sitten 5-7 d ennen kuin testataan CTL-määrityksessä. Kaikki sen jälkeiset uudelleen stimuloinnit viljellään kuten edellä on kuvattu lisäämällä 2-10 U rekombinantti ihmisen IL-2:ta (200 U/ml, luettelo # 799068, Boehringer Mannheim, Saksa).

Käyttämällä näitä menetelmiä voidaan osoittaa, että CTL:t HBV-e-antigeeniin voidaan indusoida.

(b) HLA A2.1 transgeeniset hiiret

6-8-viikon vanhoja naaras HLA A2.1 transgeenistä hiirtä (V. Engelhard, Charlottesville, VA) injektoitiin kahdesti vatsaontelonsisäisesti (i.p.) 1 viikon välein 1 x 10^7 säteilytetyllä (10 000 rad huoneenlämpötilassa) vektori-transdusoidulla EL4 A2/K^b-soluilla (ATCC Nro TIB-39). Eläimet uhrataan 7 d myöhemmin ja pernasoluja (3 x 10^6/ml) viljellään in vitro niiden vastaavien säteilytettyjen (10 000 rad) transdusoitujen Jurkat A2/K^b solujen kanssa (6 x 10^4/ml) kanssa pulloissa (T-25, Corning, Corning, NY). Loppu kromin vapautusmäärityksestä suoritetaan kuten esimerkissä 9E 1.a on kuvattu, missä kohteet transdusoidaan ja ei-transdusoidut EL4 A2/K^b- ja Jurkat A2/K^b-solujen kanssa. Ei-transdusoituja solulinjoja käytetään negatiivisinä kontrolleina. Kohteet voivat olla myös peptidin peittämiä EL4 A2/K^b-soluja.

(c) Ihmisen solujen transduktio vektorirakenteella

Lymfoblastisolulinjat (LCL) perustetaan jokaiselle potilaalle infektoimalla (transformaatio) niiden B-solut tuoreella Epstein-Barr-viruksella (EBV), joka on otettu 3 viikkoa van-

han B95-8-viljelmän supernatantista, EBV transformoidut murmelin leukosyytit (ATCC CRL 1612). 3 viikkoa EBV-transformaation jälkeen LCL:t infektoidaan Sindbis-vektorilla, joka ekspressoi HBV-ydin tai e-antigeeniä ja G418-resistenssiä. LCL:n vektori-infektio saadaan aikaan viljelemällä samanaikaisesti 1,0 x 10^6 LCL-solua 1,0 x 10^6 säteilytetyn (10 000 rad) Sindbis-vektorituottajasolun kanssa 6 cm maljalla, jossa oli 4,0 ml alustaa tai lisäämällä fectious vektorisupernatanttia. Viljelyalusta koostuu RPMI 1640:sta, 20 % lämpöinaktivoidusta naudan vasikan seerumista (Hyclone, Logan, UT), 5,0 mM natriumpuryvaatista ja 5,0 mM ei-olennaisista aminohapoista. Yön yli tapahtuneen samanaikaisen kasvatuksen jälkeen 37°C:ssa ja 5 % CO_2:ssa LCL suspension solut poistetaan säteilytetyistä (10 000 rad) Sindbis-vektorituottajasoluista. Infektoidut LCL-solut selektoidaan lisäämällä 800 µg/ml G418:aa. Jurkat A2/K^b-solut (L.Sherman, Scripps Institute, San Diego, CA) infektoidaan olennaisesti kuten on kuvattu LCL-solujen infektiolle.

(d) Ihmisen CTL-määritykset

Ihmisen PBMC erotetaan Ficoll (Sigma, St. Louis, MO) gradienttisentrifuugauksella. Nimenomaan solut sentrifugoidaan 3000 rpm:llä 5 min huoneenlämpötilassa. PBMC:t stimuloidaan uudestaan in vitro niiden autologisen transdusoidun LCL:n kanssa, esimerkki 9E 1.c, tehostaja:kohde-suhde 10:1 10 d. Viljelyalusta koostuu RPMI 1640:sta, esivalituista 5 % määristä lämpöinaktivoitua naudan vasikan seerumia, 1,0 mM natriumpuryvaatista ja 50 µg/ml gentamysiinistä. Tuloksena olevista stimuloiduista CTL-tehostajista testataan CTL-aktiivisuus käyttämällä infektoitua autologista LCL:n tai HALK:n kanssa yhteensopivia soluja kohteina standardissa kromin vapautusmäärityskessä, esimerkki 9E 1.a. Koska useimmilla potilailla on immuniteetti EBV:tä vastaan, ei-transdusoidut EBV-transformoidut B-solut (LCL), joita käytetään negatiivisinä kontrolleina, tunnistaa EBV-spesifinen CTL yhdessä transdusoidun LCL:n kanssa myös kohteeksi. Jotta vähennetään suurta taustaa, joka johtuu leimattujen kohdesolujen kuole-

misesta EBV-spesifisen CTL:n toimesta, on tarpeellista lisätä ei-leimattua ei-transdusoitua LCL:ää leimattuihin kohdesoluihin suhteessa 50:1.

2. Nestemäisen immuunivasteen määrittäminen

Nestemäiset immuunivasteet hiirissä, jotka ovat spesifisiä HBV-ydin- ja e-antigeeneille, määritetään ELISA:lla. ELISA-protokolla käyttää 100 µg/kaivo rekombinantti HBV-ydin- ja rekombinantti HBV-e-antigeeniä (Biogen, Geneve, Sveitsi) peittämään 96-kaivon maljan. Hiirten, jotka oli immunisoitu soluilla tai suoraan vektoria ekspressoivalla HBV-ydin- tai HBV-e-antigeenillä, laimennetaan sitten sarjassa antigeenin peittämiin kaivoihin ja inkuboidaan 1-2 h huoneenlämpötilassa. Inkubaation jälkeen kaivoihin lisätään seos kani-anti-hiiri IgG1, IgG2a, IgG2b ja IgG3 yhtä suurilla tiittereillä. Piparminttuperoksidaasi- ("HRP") konjugoitua vuohi-anti-kani-antiseerumia lisätään jokaiseen kaivoon ja näytteitä inkuboidaan 1-2 h huoneenlämpötilassa. Inkubaation jälkeen reaktiivisyys tehdään näkyväksi lisäämällä sopivaa substraattia. Väri kehittyy kaivoissa, joissa oli IgG-vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä HBV-ydin- tai HBV-e-antigeenille.

3. T-solulisääntyminen

Antigeenin indusoima T-auttaja-aktiivisuus, joka johtuu kahdesta tai kolmesta injektiosta suoraa vektorivalmisteita, jotka ekspressoivat HBV-ydin- tai e-antigeeniä, mitataan in vitro.

Nimenomaan pernasolut immunisoiduista hiiristä stimuloidaan uudestaan in vitro edeltä määritetyssä suhteessa solujen kanssa, jotka ekpsressoivat HBV-ydin- tai e-antigeeniä, tai solujen kanssa, jotka eivät ekpsressoi HBV-ydin- tai e-antigeeniä negatiivisenä kontrollina. 5 d kuluttua 37°C:ssa ja 5 % CO_2:ssa RPMI 1640 viljelyalustassa, jossa on 5 % FBS:

ää, 1,0 mM natriumpyruvaattia ja 10^{-5} ß-2-merkaptoetanolia, supernatantista testataan IL-2-aktiivisuus. Nimenomaan T-auttajasolut, jotka ovat HBV-ydin- tai e-antigeenin stimuloimia, erittävät IL-2:ta ja sen aktiivisuus mitataan käyttämällä CTL-kloonia, CTLL-2 (ATCC TIB 214). Lyhyesti, CTLL-2-klooni on riippuvainen IL-2:sta kasvua varten eikä lisäänny IL-2:n puuttuessa. CTLL-2-soluja lisätään supernatanttitestinäytteiden sarjalaimennuksiin 96 kaivon maljalle ja inkuboidaan 37°C:ssa ja 5 % CO_2:ssa 3 d. Sen jälkeen CTLL-2-soluihin lisätään 0,5 μ Ci ^{3}H-tymidiiniä. 0,5 μCi ^{3}H-tymidiini liitetään vain jos CTLL-2-solut lisääntyvät. Yön yli tapahtuneen inkubaation jälkeen solut kerätään käyttämällä PHD-solun kerääjää (Cambridge Tachnology Inc., Watertown, MA) ja lasketaan Beckman beta-laskijassa. IL_2-määrä näytteessä määritetään standardikäyrästä, joka on luotu rekombinantti IL-2-standardista, joka on saatu Boehringer Mannheim:lta (Indianapolis, IN).

F. Antamisprotokollat

1. Hiiret

(a) Suora vektorin antaminen

Hiirisysteemiä voidaan myös käyttää arvioimaan nesteen tai solun välittämiä immuunivasteita suoralla vektorin, joka koodaa HBV-ydin- tai e-antigeeniä, antamisella. Lyhyesti, 6-8 viikon vanhoja naaras Balb/C-, C57B16- tai C3H-hiiriä injektoitiin lihaksensisäisesti (i.m.) 0,1 ml:lla uudelleen rakennettua (steriilillä, deionisoidulla, tislatulla vedellä) lyofilisoitua HBV-ydin- tai HBV e-ekspressoivaa Sindbis-vektoria. Annetaan 2 injektiota 1 viikon välein. Eläimet uhrataan 7 d toisen injektion jälkeen. Kromin vapautus-CTL-määritykset suoritetaan sitten olennaisesti kuten esimerkissä 9E 1.a on kuvattu.

2. Simpansseille antamisen protokolla

Edellä kuvattuja hiirisysteemissä tuotettuja tietoja käytetään määrittämään vektorin antamisprotokollaa simpansseille,

joita on injektoitu kroonisesti hepatitis B-viruksella. Perustuen HBV-spesifisten CTL:n induktioon hiirissä saavat kohteet simpanssikokeissa 3 annosta vektoria, joka koodaa ydintai e-antigeeniä 28 d jaksoissa annettuna kahtena peräkkäisenä asteittain kehittyvänä annosryhmänä. Kontrollikohteet saavat placebon, joka koostuu HBV-IT (V) formulaatioalustoista. Annos on joko 10^6 tai 10^7 HBV-IT (V) cfu annettuna neljässä 0,5 ml injektiossa i.m. jokaisena injektiopäivänä. Verinäytteet otetaan päivinä 4, 12, 24, 36, 52, 70 ja 84 ja kuukausina 6, 12, 18, 24, 30 ja 36, jotta mitataan seerumin alaniiniaminotransferaasi- (ALT) tasot, hepatitis B e-antigeenin läsnäolo, vasta-aineiden, jotka on kohdistettu hepatitis B e-antigeeniä vastaan ja määrätään käsittelyn turvallisuus ja siedettävyys. Hepatitis B e-antigeenin ja HB e-antigeeniä vastaan olevat vasta-aineet määritetään Abbott e rDNA EIA kitillä (Abbott laboratories Diagnostic Division, Chicago, IL). CTL-induktion tehokkuus hepatitis B ydin- tai e-antigeeniä vastaan voidaan määrittää kuten esimerkissä 9E 1.c.

Perustuen turvallisuus- ja tehokkuustuloksiin simpanssitutkimuksista, määritetään annos- ja ymppikaavio vektorin antamiseksi kohteille ihmiskokeissa. Näistä kohteista tarkkaillaan seerumi ALT-tasoja, HBV e-antigeenin läsnäoloa ja HBV e-antigeeniä vastaan olevien vasta-aineiden läsnäolo, olennaisesti kuten edellä on kuvattu. Ihmisen CTL:n induktio hepatitis B ydin- tai e-antigeeniä vastaan voidaan määrittää kuten esimerkissä 9E 1.c.

Esimerkki 12

Sindbis-vektorit, jotka ekspressoivat virusproteiineja immuunivasteen induktiota varten tai blokkaamaan virus-isäntäsolu-vuorovaikutuksia

Seuraava esimerkki kuvailee menetelmiä rakentaa Sindbis-vektoreita, jotka kykenevät luomaan immuunivasteen ekspressoimalla HIV virusantigeeniä. Annetaan myös menetelmiä testata immuunivasteen ekspressiota ja induktiota.

Sindbis-vektorit, joita on käytetty tuomaan esille immuunivastetta

A. HIV IIIB ENV ekspressiovektori

2,7 Kb Kpn I-Xho I DNA-fragmentti eristettiin HIV provirus-kloonista BH10-R3 (sekvenssiä varten katso Ratner et al., Nature 313:277, 1985) ja n. 400 bp Sal I-Kpn I DNA-fragmentti IIIexE7deltaenv:stä (Bal31 deleetio nt:iin 5496) ligoitiin Sal I-kohtaan palsmidissa SK$^+$. Tästä kloonista puhdistettiin 3,1 kb env DNA-fragmentti (Xho I-Cla I) ja ligoitiin aikaisemmin kuvattuihin Sinbis-vektoreihin, jotka oli esipilkottu Xho I:llä ja Cla I:llä.

B. Tuottajasolulinjan, joka ekspressoi HIV-spesifisiä antigeenejä, luominen

Jotta rakennetaan vektori, joka tuottaa solulinjan, joka ekspressoi HIV IIIB env:ä, joka on johdettu edellä kuvatusta vektorista, in vitro transkriptoidut RNA-transkriptit transfektoidaan Sindbis pakkaussolulinjaan (esimerkki 7). Nimenomaan, Sindbis RNA-vektorimolekyylit tuotetaan aluksi käyttämällä SP6 in vitro transkriptoitua RNA-polymeraasisysteemiä, jota on käytetty transkriptoimaan cDNA Sindbis-vektorikloonista, joka koodaa HIV-spesifisiä sekvenssejä. Luodut in vitro RNA-vektorituotteet transfektoidaan sitten Sindbis pakkaus- tai hyppivään solulinjaan, joka johtaa transient infektiivisten vektoripartikkelien tuottoon 24 h:ssa. Nämä vektoripartikkelit kerätään sitten solulinjaviljelmien supernatanteista ja sitten suodatetaan 0,45 mikronin suodattimen läpi, jotta vältetään solukosketusta. Suodatetut supernatantit käytetään sitten infektoimaan Sindbis pakkaussolujen tuoretta yksinkertaista kerrosta. 24 h sisällä infektiosta tuotetaan Sindbis-vektoripartikkelit, joissa on positiivijuosteinen Sindbis-rekombinantti-RNA, joka koodaa Sindbis ei-rakenteellisia proteiineja ja HIV-spesifisiä sekvenssejä.

Sindbis HIV IIIB env-vektorin vaihtoehtoinen konfiguraatio on promoottorin ajama cDNA Sindbis-rakenne, jossa on selektoitava markkeri. Tässä konfiguraatiossa edellä kuvattu Xho I-Cla I-fragmentti, jossa on spesifinen HIV IIIB env-sekvenssi, laitetaan samanlaiseen cDNA Sindbis-vektoriin, jota konstitutiivinen promoottori ajaa bakteriofaagipolymeraasin tunnistussekvenssin paikalla. Käyttämällä tätä konfiguraatiota transfektoidaan ekspressiovektoriplasmidit pakkaussolulinjaan ja selektoidaan lääkeresistenssigeeniä 24-48 h transfektion jälkeen. Resistenssit pesäkkeet kerätään sitten 14 d myöhemmin (riippuvaisia käytetystä selektiomarkkerista) ja laimennuskloonataan. Useita laimennusklooneja lisätään sitten ja määritetään korkein vektoritiitteri. Korkeimmat tiitterikloonit levitetään sitten ja varastoidaan jäädytettyinä. Varastoiduista klooneista testataan HIV-spesifinen proteiinin tuotto ja immuunivasteen induktio.

C. HIV-positiivisen proteiinin tuoton ja immuunivasteen testaus

Solulysaateista Sindbis HIV tuottajasolulinjasta testataan HIV-spesifinen proteiinin tuotto Western blot analyysillä. Jotta testataan vektorin kyky siirtää ekspressiota in vitro, BHK-21-solut infektoidaan suodatetulla supernatantilla, jossa on virusvektori ja määritetään Western blot analyysillä 24 h infektion jälkeen. Kun ekspressio kerran on varmistettu in vivo hiiri- ja kädellisten tutkimuksissa voidaan suorittaa osoittamaan syngeneeisten solujen kykyä ekspressoida vierasta antigeeniä vektorikäsittelyn jälkeen: (a) tuodaan esiin CTL-vaste hiirissä injektoimalla kumpikin infektoitu syngeneeinen solu tai infektiivisen vektorin valmisteet; (b) tuodaan esiin CTL-vaste ihmisen in vitro viljelysysteemissä; (c) infektoidaan ihmisen, simpanssin ja makakisolut, primääriset solut mukaanluettuina siten, että näitä voidaan käyttää tuomaan esiin CTL-vasteet ja voi toimia kohteina CTL-määrityksissä; (d) kartoitetaan immuunivaste-epitoopit; ja (e) tuodaan esiin ja mitataan CTL-vasteet muihin ei-HIV-antigeeneihin, kuten hiiren CMV(MCMV).

1. Immuunivaste Sindbis virusvektorin koodaamia antigeenejä vastaan

Jotta testataan immuunivaste, joka on tuotu esiin solulinjasta, joka on transdusoitu Sindbis HIV IIIB env-vektorilla, hiiren tuumorisolulinja (B/C10ME)(H-2^d)(Patek et al., Cell. Immunol. 72:113, 1982) infektoidaan rekombinantti Sindbis-viruksella, jossa on HIV IIIB env-vektori. HIV IIIB env ekspressoivaa solulinjaa (B/C10ME-IIIB) käytettiin sitten stimuloimaan HIV env-spesifistä CTL:ää syngeneeisissä (s.o. MHC identtinen) Balb/c- (H-2^d) hiirissä. Hiiret immunisoidaan vatsaontelon sisäisellä B/C10ME-IIIB-solu- (1 x 10^{76} solua) injektiolla ja vahvistettiin päivänä 7-14. (Vahvistamista ei saateta tarvita.) Vastaavat pernasolususpensiot valmistetaan näistä immunisoiduista hiiristä ja soluja viljellään in vitro 4 d joko B/C10ME-IIIB (BCenv) tai B/C10ME (BC) mitomysiini-C:llä käsiteltyjen solujen läsnäollessa stimulaattori: vastesolusuhteella 1:50. Vaikuttajasolut kerätään viljelmistä, lasketaan ja sekoitetaan radioleimattujen (^{51}Cr) kohdesolujen (so. B/C10MEenv-29 tai B/C10ME) kanssa erilaisina vaikuttaja:kohdesolu- (E:T) suhteina standardissa 4-5 h ^{51}Cr-vapautumistestissä. Inkubaation jälkeen mikrotiiitterilevyt sentrifugoidaan, poistetaan 100 µl viljelysupernatanttia ja lyysatuista soluista vapautuneen radioleiman määrä määritetään Beckman gamma-spektrometrillä. Kohdesolulyysi laskettiin: % kohdelyysi = Exp CPM - SR CPM/MR CPM- SR CPM x 100, missä kokeelliset laskut/min (Exp CPM) edustavat vaikuttajia plus kohteita; spontaani vapautuminen (SR) CPM edustaa kohteita yksin; ja maksimaalinen vapautuminen (MR) CPM edustaa kohteita 1 M HCl:n läsnäollessa.

2. Immuunivasteen stimulointi hiirissä suoralla rekombinantti Sindbis-vektorin injektiolla

Kokeet suoritetaan arvioimaan rekombinantti Sindbis-virusvektoreiden kykyä indusoida HIV-kuoriproteiinien ekspressio suoran hiiriin olevan injektion jälkeen. Noin 10^4-10^5 (pfu) rekombinantti Sindbis-virusta, joissa on HIV IIIB env vekto-

rirakenne, injektoidaan kahdesti (2x) 3 viikon välein joko vatsaontelonsisäisesti (i.p.) tai lihaksensisäisesti (i.m.). Tämän määrän Sindbis-virusta määritetään olevan vähemmän kuin määrä, jonka katsotaan stimuloivan immuunivasteen. Pernasolut valmistetaan CTL:ään noin 7-14 d toisen vektori-injektion jälkeen.

D. Blokkausaineet, jotka on johdettu virusproteiinianalogeista, joita rekombinantti Sindbis-vektorit ekspressoivat

Monet infektiiviset sairaudet, syövät, autoimmuunisairaudet ja muut sairaudet sisältävät viruspartikkelien vuorovaikutuksen solujen kanssa, solut solujen kanssa tai solut tekijöiden kanssa. Virusinfektioissa virukset yleensä menevät soluihin alttiiden solujen pinnalla olevien reseptorien kautta. Syövissä solut saattavat vastata epäasianmukaisesti tai eivät lainkaan signaaleihin muista soluista tai tekijöistä. Autoimmuunisairauksissa on epäasianmukainen "itse"-markkereiden tunnistus. Nämä vuorovaikutukset voidaan blokata tuottamalla analogi jommallekummalle partnereista vuorovaikutuksessa in vivo.

Tämä blokkaustoiminta saattaa tapahtua solunsisäisesti tai solumembraanilla tai solun ulkoisesti. Viruksen, erityisesti Sindbis-vektorin, jossa on geeni blokkausaineelle, blokkaustoimintaa voidaan välittää joko alttiin solun sisäpuolelta tai erittämällä blokkaavan proteiinin versio paikallisesti blokkaamaan patogeeninen vuorovaikutus.

HIV:n tapauksessa vuorovaikutuksen kaksi agenttia ovat gp 120/gp 41 kuoriproteiini ja CD4 reseptorimolekyyli. Täten sopiva blokkaaja olisi vektorirakenne, joka ekspressoi joko HIV env-analogia, joka blokkaa HIV:n sisääntulon aiheuttamalla patogeenisiä vaikutuksia, tai CD4-reseptorianalogi. CD4-analogi eritettäisiin ja toimisi suojaamaan naapurisoluja, kun taas gp 120/gp 41 eritetään tai tuotetaan vain solunsisäisesti suojaamaan vain vektoria sisältävää solua. Voi olla edullista lisätä ihmisen immunoglobuliiniketjuun ras-

kaita ketjuja tai muita komponentteja CD4:ään, jotta vahvistetaan stabiilisuutta tai komplementtia lyysiä. Retrovirusvektorin, joka koodaa sellaista hybridiliukoista CD4:ää, jakaminen isännälle, johtaa stabiilin hybridimolekyylin jatkuvaan toimittamiseen.

Vektoripartikkeleita, jotka johtavat HIV env-analogien ekspressioon, voidaan myös rakentaa, kuten edellä on kuvattu. On ilmeistä ammattimiehelle, mitkä osat kykenevät blookkaamaan virusadsorptiota ilman avoimia patogeenisiä sivuvaikutuksia (Willey et al., J. Virol. 62:139, 1988; Fiesher et al., Science 233:655, 1986).

Esimerkki 13

Korvausgeeniterapia, jossa käytetään rekombinantti Sindbis-vektoreita systeemiseen proteiinin tuottoon. Gauchersairauden hoito

A. Glukocerebrosidaasi Sindbis-vektorin luominen

Glukocerebrosidaasi (GC) cDNA-klooni, jossa on Xho I restriktioentsyymikohta 5' cDNA koodaavaan sekvenssiin ja Cla I restriktioentsyymikohta 3' cDNA koodaavaan sekvenssiin, luodaan ensin. Klooni voidaan luoda pilkkomalla pMFG-GC (Ohashi et al., PNAS 89:11332, 1992) Nco I:llä, tylpistetään Vent DNA-polymeraasilla (New England Biolabs, Beverly, MA), sitten ligoidaan Xho I-linkkereihin. Plasmidi pilkotaan sitten Bam HI:llä, tylpistetään Vent DNA-polymeraasilla, sitten ligoidaan Cla I-linkkereihin. Fragmentti pilkotaan Xho I:llä ja Cla I:llä ja ligoidaan Xho I-Cla I-kohtaan toivotussa Sindbis-vektorissa.

B. Sindbis GC-vektoria tuottavan solulinjan rakentaminen

On esitetty kaksi lähestymistapaa luoda tuottajasolulinja riippuen käytetystä Sindbis cDNA-vektorista. Eräs tyyppi Sindbis-vektoria käyttää SP6 RNA-polymeraasin tunnistussekvenssiä tuottamaan replikonia, joka on kompetentti in vitro RNA-transkriptien kanssa. Tämän tyyppistä vektoria käytetään

luomaan vektorituottajasolulinja, joka perustuu ei-integroituvaan vektoriin, joka replikoisi jatkuvasti pakkaussolulinjassa. Vektorien toinen tyyppi käyttää heterologista promoottoria (esimerkki 7) plasmidirakenteessa, joiden sallitaan stabiilisti integroitua pakkaussolulinjaan. Replikaatiokompetentit vektoritranskriptit transkriptoidaan sitten transfektoituun pakkaussolulinjaan.

Jos Sindbis GC virusvektori käyttää SP6 RNA tunnistussekvenssiä, cDNA täytyy ensin transkripoida in vitro käyttämällä mitä tahansa in vitro transkriptiosysteemejä, joita on kaupallsesti saatavilla (Megascript™ transkriptiokitti; Ambion Inc., Austin, TX), jonka jälkeen transfektoidaan täysi pitkä RNA-transkripti liposomi- tai kalkkifosfaattisaostuksella Sindbis-pakkaussolulinjaan. Kuten edellä kuvattiin, suodatettuja supernatantteja, joissa on infektiivisiä vektoripartikkeleita transfektoidusta pakkaussolulinjasta, käytetään sitten infektoimaan uudestaan tuore Sindbis-pakkaussolujen yksikerroksisen kerros, mikä sitten toimii virusvektorilähteenä. Noin 10 ml infektiivistä supernatanttia pitäisi käyttää infektoimaan 5 x 10^6 solua 10 cm maljalla.

Jos Sindbis GC virusvektori käyttää heterologista promoottoria ekspressioplasmidikonfiguraatiossa selektoitavan markkerin kanssa (neomysiiniresistenssigeeni), täytyy sitten cDNA-vektori transfektoida pakkaussolulinjaan, jonka jälkeen on lääkeresistenssiselektio. Resistenssit pesäkkeet kerätään jalaimennuskloonataan. Yksittäiset kloonit lisätään sitten ja jäädytetään. Klooneista seulotaan yksittäisesti korkea tiitteri, GC-ekspressio Western blot-analyysillä ja proteiinitoiminnallinen aktiivisuus.

Niille vektoreille, joilla ei ole selektoitavaa markkeria, stabiilisti tai jatkuvasti transfektoitavien kloonien selektio täytyy suorittaa laimennuskloonaamalla DA-transdusoidut solut 1-2 d sen jälkeen kun solut on transfektoitu Sindbis-vektorilla. Laimennusklooneista seulotaan sitten GC-läsnäolo käyttämällä lähetti-RNA:n käänteistranskriptaasia, jonka

jälkeen cDNA lähetti amplifioidaan polymeraasiketjureaktiotekniikalla. Tämä menetelmä tunnetaan RT-PCR-tekniikkana ja kaupallinen kitti on saatavilla suorittamaan tämä määritys (Invitrogen Corp., San Diego, CA). RT-PCR suoritetaan klooneihin, joita on lisätty ainakin 10 d. Noin 50-100 kloonia seulotaan, jotta löydetään järkevä stabiilien, jatkuvasti infektoitujen kloonien määrä. Jotta suoritetaan RT-PCR, tarvitaan spsifisiä alukkeita toivotulle lähetille, jotta seulotaan RNA-tuote amplifikaatiolla. Alukkeet, jotka on suunniteltu amplifioimaan 521 emäsparin tuote GC-seulontaan, ovat:

Alukkeet GC-seulontaan:
GC PCR-aluke #1: 5'-TTT CTG GCT CCA GCC AAA GCC ACC CTA GGG GAG-3'
(SEQ.ID.Nro 69)

GC PCR-aluke #2: 5'-AAT GGA GTA GCC AGG TGA GAT TGT CTC CAG GAA-3'

(SEQ.ID.Nro 70)

Niistä klooneista, joilla on korkein ekspressio ja tiitteri, testataan ekspression siirto BHK-2-soluihin, jonka jälkeen Western blot-analyysi ja toiminnallinen GC-aktiivisuuden määritys. Käytetään spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta (8E4) ihmisen GC:tä vastaan Western blot analyysissä määrittämään proteiinin läsnäolo (Ohashi et al., PNAS 89:11332, 1992; Barneveld et al., Eur. J. Biochem. 134:310, 1983). GC-entsymaattinen aktiivisuus testataan, kuten Correll et al. (Blood 80:331, 1992) ovat kuvanneet. Eläinkokeet suoritetaan heti kun sopiva klooni on tunnistettu.

Esimerkki 14

Rekombinantti Sindbis-partikkeleiden antaminen

Terapeuttista Sindbis-vektoria, jota käytetään Gaucherin sairauden käsittelyyn (esimerkki 13) voidaan antaa transdu-

soimalla autologisia CD34⁺-soluja ex vivo protokollassa tai suoralla vektorin injektiolla potilaan luuytimeen. Jotta saavutetaan pisin terapeuttinen GC-ekspressio rekombinantti monenarvoiselta vektorilta, paras tapa antaa on transdusoida kliinisesti vahingoittunutta solutyypin pitkään eläneitä, solun prekursoreita, esimerkiksi monosyytit tai makrofaagit. Transdusoimalla vahingoittuneen solutyypin aikaisimmat prekursorit, soluprekursorit kykenevät itse uusiutumaan ja uudelleen kansoittamaan ääreisveren kypsyvillä GC-positiivisilla soluilla. Varhaisin tähän päivään mennessä tutkittu monipotentti verisolun muodostumisen kantasolu on CD34⁺-solut, jotka tekevät 1 % - 4 % terveistä luuydinpopulaatiosta tai 0,1 % ääreisveren polulaatiosta. Jotta kyetään transdusoimaan CD34⁺-solut, on tärkeätä pitää yllä pitkän jakson ekspressiota ei vain monosyytti/makrofaagi-sukuperälle, vaan mille tahansa verisolun muodostumisen solulle, joka on kohdennettu terapeuttiseen proteiiniin. Kaksi lähestymistapaa transdusoida CD34⁺-solut sisältää ex vivo ja in vivo protokollat. In vivo protokolla tarkentaa luuydinsolujen mielivaltaisen populaation transdusointiin suoralla vektorin injektiolla potilaiden luuytimeen. ex vivo protokolla tarkentaa CD34⁺-positiivisten kantasolujen eristämiseen potilaan luuytimestä tai imeväispotilaan napaverestä, solujen transdusoimiseen vektorilla, sitten sen jälkeiseen autologisten solujen injektioon takaisin potilaaseen. Molemmat lähestymistavat ovat toteutettavissa olevia, mutta ex vivo protokolla auttaa vektoria olemaan tehokkaimmin käytetty transdusoimalla CD34⁺-solujen spesifisesti viljelty populaatio. Yksityiskohdat ex vivo menetelmästä annetaan seuraavassa kappaleessa.

Multivalentin GC-Sindbis-vektorin ex vivo antaminen

CD34⁺-solut kerätään potilaan luuytimestä ruiskun tyhjentämisellä, jonka suorittaa tekniikan tunteva lääkäri. Vaihtoehtoisesti, CD34⁺-soluja voidaan saada myös imeväisen napaverestä, jos potilas on diagnosoitu ennen syntymää. Yleisesti, jos luuytimen lähde on CD34⁺-solut, 20 luuydinimua saadaan

tekemällä reikä teräväkärkisellä välineellä reisivarteen tai taemmasta suoliluun harjanteesta paikallis- tai yleispuudutuksessa. Luuydinimut kerätään, suspendoidaan Herpes-puskuroituun Hanks' tasapainotettuun suolaliuokseen, jossa on hepariinia 100 yksikköä/ml ja desoksiribinukleaasi I:tä 100 µg/ml ja sitten altistetaan Ficoll-gradienttierotukselle. Puskurin peittämät luuydinsolut kerätään sitten ja pestään CellPro Separationsysteemin mukaisesti, CEPRATE™ LC (CellPro, Bothell, WA)(CD34). Pestyt puskurin peittämät solut värjätään sitten peräkkäin anti-CD34 monoklonaalisella vasta-aineella, pestään, sitten värjätään biotinyloidulla sekundäärisellä vasta-aineella, jota CEPRATE™ systeemi toimittaa. Soluseos laitetaan sitten CEPRATE™-avidiinipylvääseen. Biotiinileimatut solut adsorboituvat pylvääseen, kun taas leimaamattomat solut kulkevat läpi. Sitten pylväs huuhdellaan CEPRATE™ systeemin ohjeiden mukaisesti ja $CD34^+$-solut eluoidaan täristämällä pylvästä käsin puristamalla geelialustaa. Kun $CD34^+$-solut on kerran puhdistettu, puhdistetut kantasolut lasketaan ja maljataan 1 x 10^5 solua/ml konsentraationa Iscove's muokatulle Dulbecco's alustalle (JMDM; Irvine Scientific, Santa Ana, CA), jossa on 20 % kerättyä, ei-lämpöinaktivoitua ihmisen AB-seerumia (hAB-seerumi).

Puhdistuksen jälkeen voidaan suorittaa [?] lukuisia menetelmiä transdusoida puhdistetut kantasolut. Erääseen lähestymistapaan sisältyy välitön puhdistetun kantasolupopulaation transdusointi vektorilla, jossa on supernatanttiviljelmiä, jotka on johdettu vektoria tuottavista soluista. Toiseen lähestymistapaan sisältyy vektoria tuottavien solujen leimatun yksikerroksisen kerroksen yhdessä kasvattaminen ei-tarttuvien $CD34^+$-solujen puhdistetun populaation kanssa. Kolmanteen ja edulliseen lähestymistapaan sisältyy samanlainen yhdessä kasvattamislähestymistapa, kuitenkin puhdistetut $CD34^+$-solut esistimuloidaan erilaisten sytokiniinien kanssa ja viljellään 48 h ennen yhdessä viljelyä leimattujen vektoria tuottavien solujen kanssa. Äskettäiset julkaisut ovat osoittaneet, että esistimuloimalla kantasolut ennen soluihin transdusointia retrovirusvektoreiden kanssa lisää geenisiirron

tasoa näihin solutyyppeihin (Nolta et al., Exp. Hematol. 20:1065, 1992). Transduktion lisääntynyt taso luetaan kantasolujen, jotka ovat tarpeellisia tehokkaalle retrovirustransduktiolle, kasvaneen lisääntymisen ansioksi. Koska Sindbis-vektorit kykenevät infektoimaan ei-replikoivia soluja, näiden solujen esistimulointia ei saateta tarvita, kuitenkin näiden viljelmien, jotka aiheuttavat lisääntymistä, esistimulaatio antaa kasvaneet solupopulaatiot palautettavaksi potilaaseen.

$CD34^+$-solujen esistimulaatio suoritetaan inkuboimalla soluja sytokiniinien ja kasvutekijöiden, joihin kuuluu IL-1, IL-3, IL-6 ja syöttösolukasvutekijä (MGF), yhdistelmän kanssa. Esistimulaatio suoritetaan kasvattamalla 1-2 x 10^5 $CD34^+$-solua/ml alustaa T25-kudosviljelmäpulloissa, joissa on luuydinstimulaatioalustaa, 48 h. Luuydinstimulaatioalusta koostuu IMDM:stä, jossa on 30 % ei-lämpöinaktivoitua hAB-seerumia, 2 mM L-glutamiinia, 0,1 mM ß-2-merkaptoetanolia, 1 µM hydrokortisonia ja 1 % deionisoitua naudan seerumialbumiinia. Kaikista reagensseista luuydinviljelmissä pitäisi seuloa niiden kyky kannattaa maksimaaliset määrät granulosyyttejä, erytrosyyttejä, makrofaageja, megakaryosyyttejä, pesäkkeen muodostavat yksiköt normaalista ytimestä. Puhdistettuja rekombinantti sytokiniinejä ja kasvutekijöitä (Immunex Corp., Seattle, WA) pitäisi käyttää esistimulointiin seuraavina konsentraatioina: E. coli-johdettu IL-1α (100 U/ml), hiiva-johdettu IL-3 (5 ng/ml), IL-6 (50 U/ml) ja MGF (50 ng/ml) (Anderson et al., Cell Growth Differ. 2:373, 1991).

Sen jälkeen kun $CD34^+$-solut on esistimuloitu, ne infektoidaan viljelemällä yhdessä säteilytetyn Sindbis-tuottajasolulinjan kanssa (ekspressoiden GC terapeuttista vektoria) stimuloivan alustan jatkuvana läsnäolona. DA-vektoria tuottava solulinja trypsinoidaan ensin, säteilytetään (10 000 rad) ja maljataan 1-2 x 10^5 solua/ml luuydinstimulointialustaa. Seuraavana päivänä 1-2 x 10^5 esistimuloitua $CD34^+$-solua/ml lisätään Sindbis-vektorin tuottavaan solulinjan yksikerroksisen kerrokseen. Solujen yhdessä viljelyä suoritetaan 48 h. Yhdessä

kasvattamisen jälkeen $CD34^+$-solut kerätään tarttuvasta Sindbis-vektorin tuottavan solun yksikerroksisesta kerroksesta pesemällä voimakkaasti alusta ja maljaamlla 2 h sallimaan minkä tahansa paikaltaan siirretyn vektoria tuottavien solujen tarttua. Sitten solut kerätään ja levitetään vielä 72 h. Sitten solut kerätään ja jäädytetään nestetyppeen käyttämällä cryo-suojaajaa 1 x 10^7 solua/ampulli erinä. Kun transformoiduista $CD34^+$-soluista kerran on testattu satunnaisten tekijöiden puuttuminen, jäädytetyt, transformoidut $CD34^+$-solut voidaan sulattaa, maljata 1 x 10^5 solua/ml konsentraatioon ja viljellään lisää 48 h luuydinstimulaatioalustassa. Sitten transformoidut solut kerätään, pestään kahdesti ja suspendoidaan normaaliin suolaliuokseen. Transdusoitujen solujen lukumäärä, jota käytettiin infusoimaan takaisin potilaaseen/infuusio on suunniteltu olevan minimissään 1-10 x 10^7 solua/potilas/ruiskutuskohta, joka vaatii jopa neljä ruiskutuskohtaa. Infuusio voidaan suorittaa suoraan takaisin potilaan luuytimeen tai suoraan ääreisverenkiertoon. Potilaat, jotka saavat autologisesti transdusoituja luuydinsoluja, saattavat joko osittain tai kokonaan olla säteilytettyjä hävittämään olemassa olevat luuydinpopulaatiot. Käsittelyä voidaan arvioida eri aikapisteinä infuusion jälkeen määrittämään GC-aktiivisuus ja ekspression pituus erilaisissa solutyypeissä. Jos jossain kohtaa menetelmien seurannan kulun aikana ekspressio laskee tai sitä ei ole, transdusoidut autologiset solut voidaan injektoida uudestaan potilaasen.

Esimerkki 15

Kudosspesifinen ekspressio aktivoimalla vialliset Sindbis-vektorit käyttämällä kudosspesifistä solun RNA:ta

Sindbis-tuumorispesifisten ekspressionvektoreiden rakentaminen paksusuoli-peräsuolisyövän hoitoon

A. Rekombinantti Sindbis-vektorin (SIN-CEA), joka on riippuvainen CEA-tuumorimarkkereden ekspressiosta, rakentaminen

Jotta tuotetaan kykenemätön Sindbis-vektoripartikkeli Sindbis-pakkaussolulinjassa, DNA-polymeraasipromoottorin täytyy ohjata Sindbis-vektoria. Optiota käyttää in vitro vektori-

RNA:n transkriptiota, jonka jälkeen RNA transfixataan Sindbis-pakkaussolulinjaan, ei suositella koska tertiäärinen rakenne, joka luotiin kykenemättömällä RNA-transkriptillä, voi estää täydet genomiset transkriptit, rajoittaa vektori-
5 replikaatiota ja tiittereitä pakkaussolulinjassa. Tätä syytä varten käytetään lähtö Sindbis-vektoria, jossa on CMV MIEP-promoottori (pCMV-SIN) tai Drosophila metallotioniinipromoottori (pMET-CMV), pakkaussolulinjaan (so. hyönteis tai nisäkäs).

10

Kuten edellä kuvattiin, kykenemätön liitos silmukka-ulosmalli rakennetaan vektorin liitosalueen kanssa, ja jota reunustaa käänteiset toistuvat sekvenssit, jotka ovat homologisia valinnan mukaisen RNA:n kanssa. Tässä esimerkissä CEA tuu-
15 moriantigeeni cDNA:sta olevia sekvenssejä (Beauchemin et al., Molec. and Cell. Biol. 7:3221, 1987) käytetään käänteisissä toistoissa. Jotta rakennetaan CEA RNA-vasteinen Sindbis-vektori, liitosalueen edellä on kaksi CEA anti-sensesekvenssidomeenia (A^1 ja B^1), joita erottaa 6 emäsparin ratkai-
20 seva domeeni. Yksittäinen 20 emäsparin CEA-sensesekvenssi (A2), joka on komplementaarinen A1:n kanssa, laitetaan liitosalueen 3'-päähän. Valittaessa oikea A1 ja B1 antisense-sekvenssit, ainoat kaksi vaatimusta ovat että ne ovat spesifiset kohdennetulle RNA-sekvenssille ja että antisense-se-
25 kvenssit hybridoituvat kahteen RNA-sekvenssidomeeniin, joita 3 nukleotidiä erottaa. Tämä kolmen nukleotidin aukko toimii ratkaisevana domeenina polymeraasin hypätä ja kytkeä lukujuosteet, jotka ovat siltana vektorin ei-rakenneproteiinidomeenista vektorin liitosalueeseen (kuvio 5). Jotta rakenne-
30 taan sellainen konfiguraatioa, kaksi oligonukleotidiä syntetisoidaan täydentäen toisiaan luomaan fragmentti-insertion, jossa on sopivat restriktioentsyymikohdat äärimmäisissä 5'- ja 3'-päissä. Insertoitu oligonukleotidifragmentti ligoidaan sitten Sindbis-vektoriin kyvyttömän liitosalueen ja Sindbis-
35 vektorin moninkertaisen kloonauskohdan väliin. Sense-oligonukleotidijuosteen, 5'-3', pitäisi sisältää Apa I restriktiokohta, jonka jälkeen A1 antisensedomeeni, kuuden bp ratkaiseva domeeni, B1 antisensedomeeni, synteettinen liitos-

aluedomeeni ja A2 sensedomeeni, jonka jälkeen Xho I restriktioentsyymikohta. Seuraavaa oligonukleotidisekvenssiä käytetään merkitsemään CEA RNA-vasteista Sindbis-vektoria. Nukleotidinumerosekvenssi saadan, Beauchemin et al., Molec. and Cell Biol. 7:3221, 1987.

5'-3' CEA-sensejuoste:

CEA 618 CEA 589

Apa I *----------*

CGC GC G GGC CCT GT G ACA T TG AAT AGA GT G AGG G TC CTG TTG GG (SEQ. ID NO. 71)

synteettinen

CEA 651 CEA 622

---------- * Synthetic

A AAG G TT TCA CAT TT G TAG C TT GCT GTG TC A TTG C GA TCT CTA CG (SEQ. ID NO. 72)

Liitosalue

CEA 599 CEA 618

Junction Core * *----------* Xho I

G TGG T CC TAA ATA GT T CAC T CT ATT CAA TG T CAC A CT CGA GCC GG (SEQ. ID NO. 73)

5'-3' CEA antisensejuoste on komplementaarinen edellä olevan oligonukleotidin kanssa. Sen jälkeen kun molemmat oligonukleotidit on syntetisoitu, oligonukleotidit sekoitetaan yhteen 10 mM Mg:n läsnäollessa, kuumennetaan 1000°C 5 min ja jäähdytetään hitaasti huoneenlämpötilaan. Sitten oligonukleotidipari pilkotaan Apa I- ja Xho I restriktioentsyymeillä, sekoitetaan ja ligoidaan 25:1 moolisessa suhteessa inserttiplasmidia pCMV-SIN tai pMET-SIN, joka on esipilkottu samoilla entsyymeillä. Näitä rakenteita merkitään pCMV/SIN-CEA ja pMET/SIN-CEA, vastaavasti.

<u>SIN-CEA-vektori ja tuottajasolulinjan, joka ekspressoi gamma-interferonia, rakentaminen (SIN-CEA/gIFN)</u>

Ihmisen g-IFN cDNA johdetaan RNA:sta, joka on eristetty PHA-stimuloidusta Jurkat T-soluista, guanidiniumtiosyaanaattiuutolla, jonka jälkeen ultrasentrifugaatio CsCl-gradientissa. RNA (Sigma, St. Louis, MO) käänteistranskriboidaan in vitro ja geeni-spesifistä oligonukleotidiparia käytetään amplifioimaan g-IFN cDNA polymeraasiketjureaktiolla käyttämällä Tac-polymeraasia. PCR DNA korjattiin T4 DNA-polymeraasilla ja Klenow:lla ja kloonattiin SK^+-plasmidin Hinc II-kohtaan (Stratagene, San Diego, CA), jota oli käsitelty CIAP:lla. Sense-suuntauksessa cDNA:n 5'-pää on SK^+-polyklinkkerin Xho I-kohdan vieressä ja 3'-pää Cla I-kohdan vieressä. 512 emäsparin fragmentti, joka koodaa ihmisen γ-IFN-molekyyliä, laitetaan joko pCMV/SIN-CEA- tai pMET/SIN-CEA-vektoreiden Xho I/Cla I-kohtaan. Näitä uusia plasmideja merkitään pCMV/SIN-EA/γIFN tai pMET/SIN-CEA/γIFN, vastaavasti.

B. SIN-CEA-vektorin a tuottajasolulinjan, joka ekspressoi idiinikinaasia (SIN-CEA/TK), rakentaminen

PCR-amplifioitu tuote, jossa on herpes simplex tymidiinikinaasin ("HSVTK") cDNA-klooni, jota reunustaa 5'Xho I ja 3' Cla I restriktioentsyymikohdat, saadaan käyttämällä pHS1TK3-KB- (Mcknight et al., Nuc. Acids Res. 8:5949, 1980) kloonia kohde-DNA:na. Alukkeen sekvenssit, joita käytetään PCR-amplifikaatioon, saadaan julkaistuista sekvensseistä (Wagner et al., PNAS 78:1442, 1981). 1260 emäsparin amplifioitu tuote pilkotaan sitten Xho I:llä ja Cla I:llä, ligoidaan joko pCMV/SIN-CEA- tai pMET/SIN-CEA-vektoreiden Xho I/Cla I-kohtaan. Näitä uusia plasmideja merkitään pCMV/SIN-CEA/HSVTK tai pMET/SIN-CEA/HSVT, vastaavasti.

C. CEA RNA-riippuvaisen Sindbis-vektorituottajasolulinjojen luominen

Päinvastoin kuin edelliset esimerkit luoda tuottajasolulinjat (esimerkki 7), voi olla että vain yksi geenisiirron kierros pakkaussolulinjaan on mahdollista vektorin transfektiolla. Koska nämä vektorit ovat kykenemättömiä ja estetty

täysien genomisten vektoreiden synteesissä, Sindbis pakkaussolulinjojen tuoreen kerroksen uudelleen infektio päättyy epäonnistuneeseen infektioon, koska nämä vektorit ovat nyt riippuvaisia CEA RNA:n läsnäolosta tullakseen aktiivisiksi. Korkeampia tiittereitä voidaan saavuttaa laimennuskloonaamalla transfektoidut tuottajasolulinjat käyttämällä RT-PCR-tekniikkaa, jota on kuvattu aikaisemmin esimerkissä 11.

Esimerkki 16

Korvausgeeniterapia käyttämällä rekombinantti Sindbis-vektoreita systeemiseen proteiinin tuottoon. Käsittely Faktor VIII vajavaiseen hemofilia A-sairauteen

Hemofilia A-sairaudelle on luonteenominaista Faktor VIII:n puuttuminen, veriplasmaa koaguloiva tekijä. Noin 1:llä 20 000 miehestä on hemofilia A, joissa sairaustilaa edustaa verenvuodon häiriö johtuen taudin kohdanneiden yksilöiden kyvyttömyydestä suorittaa loppuun verihyytymäryöppyä.

Yksilöiden, joilla on hemofilia A, hoito on faktor VIII-proteiinin korvaaminen. Ainoa lähde ihmisen faktor VIII:lle on ihmisen plasma. Jotta prosessoidaan ihmisen plasma faktor VIII-puhdistukseen, ihmisluovuttajan näytteet kerätään yli 1000 luovuttajan erästä. Johtuen faktor VIII-proteiinin epästabiilisuudesta, tuloksena olevat farmaseuttiset tuotteet ovat erittäin epäpuhtaita ja arvoitu painopuhtaus noin 0,04 %. Lisäksi on vakava uhka sellaisille infektiivisille sairauksille kuin hepatitis B-virus ja ihmisen immuunipuutosvirus, muun muassa, jotka kontaminoivat veritoimituksen ja voidaan täten mahdollisesti puhdistaa yhdessä faktor VIII-proteiinin kanssa.

Edellä esitetyistä syistä faktor VIII:n rekombinanttituoton lähde merkitsisi kehityskelpoista edistystä hemofilia A:n hoitamiseksi.

Hemofilia A:n ideaali hoito olisi geenikorvausterapia; se tarkoittaa sairauden kohtaamissa yksilöissä korvausta norma-

leilla faktor VIII-geenillä, mikä sallisi normaalin verenhytymäryöpyn olevan seurausta.

Edellä esitetty keskustelu on ammattimiehelle tuttua hemofilia A-häiriön mahdolliseksi hoidoksi. Retrovirukset ovat yksi mahdollinen geeniterapiavektori, joka on kehitetty faktori VIII:n ekspressioon. Kuitenkin syistä, joita ei ymmärretä hyvin, rekombinantti faktor VIII ekspression taso tällä ja muilla menetelmillä on suhteellisen alhainen.

Eräs mahdollisuus rekombinantti faktor VIII:n alhaiseen ekspressioon soluissa, jotka on transdusoitu retroviruksella ja muilla vektoreilla, on suhteellisen alhainen prosessointi ja valmiin faktor VIII RNA:n kuljetustehokkuus tumasta sytoplasmaan. Alalla oleville tuttua, faktor VIII:n B-domeenin deleetio vähentää tasoa, jolla hyytymistekijä tuotetaan ja eritetään.

Jotta vältetään ongelmia, jotka liittyvät faktor VIII-proteiinin tuoton alhaisiin tasoihin, jotka johtuvat alhaisista RNA-ekspressiotasoista ja tehottomasta prosessoinnista, faktor VIII cDNA:n insertio Sindbis-vektoriin kuvataan. Koska Sindbis:n elinkierto tapahtuu kokonaan infektoidun solun sytoplasmassa, nämä ongelmat, jotka liittyvät faktor VIII:aan, jota ekspressoidaan tumasta, kierretään. Lisäksi, annettuna tehokkuus, jolla Sindbis itse-replikoituu teoriassa, faktor VIII tuoton taso Sindbis/faktor VIII-infektoiduissa soluissa olisi niin korkea kuin 1 x 10^8 faktor VIII-proteiinimolekyyliä/solu.

Yksi mahdollinen ongelma liittyen insertoimaan faktor VIII Sindbis-vektoreihin, on vektori/heterologisen geenirakenteen fysikaalinen koko ja mahdollinen pakko pakata faktor VIII-vektorirakenne toiminnalliseen infektiiviseen Sindbis-partikkeliin. Villityypin Sindbis:n genominen koko on 11 703 nukleotidiä, plus polyA-häntä. Sindbis perusvektorin koko (pKSSINBV, katso esimerkki 2) on 7 830 nukleotidiä, 25-meeri polyA-häntä mukaanluettuna. Täten heterologisen geneettisen

materiaalin salliva koko insertoitavaksi pKSSINBV:hen, mikä johtaa genomiseen täydennykseen, sama fysikaalinen koko kuin villityypin viruksella, on 3898 nukleotidiä.

Kuitenkin yksi avainosa todistetta ehdottaa, että heterologisen geneettisen materiaalin kapasiteetti, mikä voidaan insertoida pKSSINBV:hen ja pakata toiminnalliseen, infektiiviseen Sindbis-partikkeliin, on melkoisesti suurempi kuin 3 898 bp. Työssä, joka on julkaistu kirjallisuudessa (Geigenmuller-Gnirke et al., PNAS 88:3253-3257, 1991) kahden molekyylin pakkaus, kummankin sisältäessä cis-vaaditun pakkaussignaalin, yksittäisiin toiminnallisiin Sindbis-partikkeleihin, on kuvattu. Kahden pakatun genomin fysikaalinen kokonaiskoko tässä tutkimuksessa on 14 600 bp. Tämä tulos osoittaa vahvasti, että Sindbis-vektoreiden kapasiteetti heterologiselle geneettiselle materiaalille on paljon suurempi kuin aikaisemmin kuviteltiin mielessään. Suurien solugeenien mahdollinen insertio Sindbis-vektoreihin laajentaa olennaisesti tämän systeemin hyödyllisyyttä.

Faktor VIII cDNA-klooni on noin 8 000 bp. Faktor VIII cDNA:n insertio pSKSINBV:hen tuottaa noin 15 830 bp vektori/heterologinen genomisen koon. Jos tämän partikkelin pakkaus on tehotonta, voidaan insertin kokoa vähentää eliminoimalla faktor VIII-insertin "B-domeeni". On osoitettu että faktor VIII B-domeenialue voidaan poistaa cDNA:sta ilman että vaikutetaan sen jälkeen ekspressoitavan proteiinin toiminnallisuuteen.

Faktor VIII cDNA:n lähde on klooni pSP64-VIII, ATCC-klooni tallennusnumerolla 39 812, jolla on cDNA, joka koodaa täysipitkää ihmisen proteiinia. pSP64-VIII pilkotaan Sal I:llä, päät tylpennetään T4 DNA-polymeraasilla ja 50 μM kutakin dNTP:tä ja noin 7700 bp fragmentti elektroforesoidaan 1 % agaroosi/TBE-geelissä ja puhdistetaan Gene Clean™:llä. Faktor VIII cDNA, jossa on tylpät päät, ligoidaan sitten pKSII-3'SIN:iin (esimerkki 2), joka on valmistettu pilkkomalla Hinc II:lla, käsitelty CIAP:lla ja puhdistettu Gene Clean™:

llä. Tämä plasmidi tunnetaan pF83'SIN:nä.

Faktor VIII:n insertoimiseksi erilaisiin Sindbis-vektoreihin, joita on kuvattu esimerkissä 2, plasmidi pF83'SIN pilkotaan Xho I:llä ja Sac II:lla ja tuloksena oleva 7850 bp fragmentti eristetään 1 % agaroosi/TBE-geelissä ja puhdistetaan Gene Clean™:llä. Tämä faktor VIII-3'SIN-fragmentti insertoidaan jokaiseen alla luetteloituun vektoriin. Ennen tämän fragmentin insertiota plasmidit valmistetaan pilkkomalla Xho I:llä ja Sac II:lla, käsittelemällä CIAP:lla, eristämällä 1 % agaroosi/TBE-geelielektroforeesissa ja puhdistamalla Gene Clean™:llä.

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1RJsjrc	+
pKSSINd1RJsjrPC	+
pKSSINd1RJsjrNP(7582-7601)	+
pKSSINd1RJsexjr	+

Faktor VIII cDNA:n insertion jälkeen näitä plasmideja merkitään:
pKSSINBVF8
pKSSINd1RJsjrcF8
pKSSINd1RJsjrPCF8
pKSSINd1RJsjrNP(7582-7601)F8
pKSSINd1RJsexjrF8
vastaavasti.

Faktor VIII cDNA:n sisältävien vektoreiden pakkaus saadaan aikaan joko infektoimalla solut, jotka on transfektoitu vektori/faktor VIII in vivo transkriboidulla RNA:lla, villityypin viruksen kanssa tai vaihtoehtoisesti esimerkissä 7 kuvatut pakkaussolulinjat transfektoimalla in vitro transkriboidulla vektori/faktor VIII RNA:lla. Pakkaamisen tehokkuus määritetään mittaamalla faktor VIII ekspression taso infektoiduissa soluissa ja vertaamalla ekspression tasoihin, jot-

ka havaitaan samoissa kokeissa, jotka suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla pKSSIN-luc-vektorilla.

Esimerkki 17

A. Glukocerebrosidaasi Sindbis-vektorin luominen

Glukocerebrosidaasi (GC) cDNA-klooni, jossa on Xho I restriktioentsyymikohta 5' cDNA koodaavaan sekvenssiin ja Cla I restriktioentsyymikohta 3' cDNA koodaavaan sekvenssiin, luodaan ensin. Klooni voidaan luoda pilkkomalla pMFG-GC (PNAS 89:11332, 1992) Nco I:llä, tylpistetään Vent DNA-polymeraasilla, sitten ligoidaan Xho I-linkkereihin. Plasmidi pilkotaan sitten Bam HI:llä, tylpistetään Vent DNA-polymeraasilla, sitten ligoidaan Cla I-linkkereihin. Jotta faktor VIII insertoidaan esimerkissä 2 kuvattuihin erilaisiin Sindbis-vektoreihin, fragmentti pilkotaan Xho I:llä ja Cla I:llä ja geelieristetään 1 % agaroosi/TBE-geelissä ja puhdistetaan Gene Clean™:llä. GC-fragmentti insertoidaan jokaiseen alla olevaan vektoriin, jotka on valmistettu pilkkomalla Xho I:llä ja Cla I:llä, käsittelemällä CIAP:lla, eristetään 1 % agaroosi/TBE-geelielektroforeesissa ja puhdistetaan Gene Clean™:llä.

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1FRsjrc	+
pKSSINd1FRsjrPC	+
pKSSINd1FRsjrNP(7582-7601)	+
pKSSINd1FRJsexjr	+

Faktor VIII cDNA:n insertion jälkeen nämä plasmidit tunnetaan kuten alla nähtynä:

pKSSINBV-GC

pKSSINd1RJsjrc-GC

pKSSINd1RJsjrPC-GC

pKSSINd1RJsjrNP(7582-7601)-GC

pKSSINd1RJsexjr-GC

Glukocerebrosidaasi (GC) Sindbis-vektoria käytetään ekspressoimaan GC cDNA:ta eläinkokeissa ja mahdollisesti käytetään hoitamaan ihmisiä suoralla injektiolla. Jos vaaditaan lukuisia injektioita ylläpitämään GC-ekspressiota käsitellyssä yksilössä, olisi ideaalia jos Sindbis-vektori olisi suunniteltu olevan minimaalisesti antigeeninen tai suunniteltu sellaisella tavalla, ettei se indusoi immuunivastetta vektoriin. Esimerkkejä Sindbis-vektoreista, jotka on suunniteltu sellaisella tavalla ja ovat kykeneviä ekspressoimaan moninaisia proteiineja, on kuvattu esimerkeissä 3 (Adenovirus Early Region E3); esimerkissä 4 (HCMV H310); esimerkissä 5 (moninkertaisten geenien ekspressio) ja esimerkissä 17 (interferoni A:n ribozyymiekspressio). Käyttämällä edellä olleita esimerkkejä voidaan suunnitella Sindbis-vektori, joka ekspressoi GC cDNA:ta, sellaisella konfiguraatiolla olivat interferoni A hiusneularibozyymi, jonka jälkeen AD E3 tai CMV H301-geeni, jonka jälkeen sisäinen ribozyymin sisääntulokohta, jonka jälkeen GC cDNA tai muu terapeuttinen lievittävä aine käyttämällä samoja Xho I- ja Cla I-kloonauskohtia vektorin moninkertaisessa kloonauskohdassa.

B. Sindbis glukocerebrosidaasi-vektoria tuottavan solulinjan rakentaminen

On esitetty kaksi lähestymistapaa luoda tuottajasolulinja riippuen käytetystä Sindbis cDNA-vektorikloonin tyypistä, kuvattu esimerkissä 7. Eräs tyyppi Sindbis-vektoria käyttää SP6 RNA-polymeraasin tunnistussekvenssiä in vitro RNA-transkriptien synteesiin. Tämän tyyppistä vektoria käytetään luomaan vektorituottajasolulinja, joka perustuu ei-integroituvaan vektoriin, joka replikoisi jatkuvasti pakkaussolulinjassa. Vektorien toinen tyyppi käyttää heterologista promoottoria plasmidirakenteessa SP6-sekvenssin sijasta, joiden sallitaan stabiilisti integroitua pakkaussolulinjaan (katso esimerkki 7 katsausta varten). Replikaatiokompetentit vektoritranskriptit ekspressoidaan sitten DNA-tasolta ja transfektoitaisiin Sindbis pakkaussolulinjaan.

Jos Sindbis GC virusvektori käyttää T7 RNA tunnistussekvenssiä, cDNA täytyy ensin transkriptoida in vitro käyttämällä mitä tahansa in vitro transkriptiosysteemejä, joita on kaupallisesti saatavilla (Megascript™ transkriptiokitti; Ambion Inc., Austin, TX), jonka jälkeen transfektoidaan täysi pitkä RNA-transkripti liposomi- tai kalkkifosfaattisaostuksella Sindbis-pakkaussolulinjaan. Kuten edellä kuvattiin (esimerkki 7), suodatettuja supernatantteja, joissa on infektiivisiä vektoripartikkeleita transfektoidusta pakkaussolulinjasta, käytetään sitten infektoimaan uudestaan tuore Sindbis-pakkaussolujen yksikerroksisen kerros, mikä sitten toimii virusvektorilähteenä. Noin 10 ml infektiivistä supernatanttia pitäisi käyttää infektoimaan 5 x 10^6 solua 10 cm maljalla.

Jos Sindbis GC virusvektori käyttää heterologista promoottoria ekspressioplasmidikonfiguraatiossa selektoitavan markkerin kanssa (neomysiiniresistenssigeeni), täytyy sitten cDNA-vektori transfektoida pakkaussolulinjaan, jonka jälkeen on lääkeresistenssiselektio. Resistenssit pesäkkeet kerätään ja laimennuskloonataan. Yksittäiset kloonit lisätään sitten ja jäädytetään. Yksittäisistä klooneista seulotaan korkea tiitteri, kuten esimerkissä 9 kuvattiin, glukocerebrosidaasin ekspressio Western blot-analyysillä ja sitten proteiinin toiminnallinen aktiivisuus testattiin (Correll et al., Blood 80:331, 1992).

Niille vektoreille, joilla ei ole selektoitavaa markkeria, stabiilisti tai jatkuvasti transfektoitavien kloonien selektio täytyy suorittaa laimennuskloonaamalla pakkaussolulinja 1-2 d sen jälkeen kun solut on transfektoitu Sindbis-vektorilla. Laimennusklooneista seulotaan sitten glukocerebrosidaasin läsnäolo käyttämällä lähetti-RNA:n käänteistranskriptaasia, jonka jälkeen cDNA lähetti amplifioidaan polymeraasiketjureaktiotekniikalla. Tämä menetelmä tunnetaan RT-PCR-tekniikkana ja kaupallinen kitti on saatavilla suorittamaan tämä määritys (Invitrogen Corp., San Diego, CA). RT-PCR suoritetaan klooneihin, joita on lisätty ainakin 10 d. Noin 50-100 kloonia seulotaan, jotta löydetään järkevä stabiili-

en, jatkuvasti infektoitujen kloonien määrä. Jotta suoritetaan RT-PCR, tarvitaan spesifisiä alukkeita toivotulle lähetille, jotta seulotaan RNA-tuote amplifikaatiolla. Alukkeet, jotka on suunniteltu amplifioimaan 521 emäsparin tuote glukocerebrosidaasin seulontaan, ovat:

Alukkeet glukocerebrosidaasi-seulontaan:
GC PCR-aluke #1: 5'-TTT CTG GCT CCA GCC AAA GCC ACC CTA GGG GAG-3'
(SEQ.ID.Nro 74)

GC PCR-aluke #2: 5'-AAT GGA GTA GCC AGG TGA GAT TGT CTC CAG GAA-3'

(SEQ.ID.Nro 75)

Niistä klooneista, joilla on korkein ekspressio ja tiitteri, testataan ekspression siirto BHK-2-soluihin, jonka jälkeen Western blot-analyysi ja toiminnallinen glukocerebrosidaasin (GC) aktiivisuuden määritys BHK-2-soluissa. Käytetään spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta (8E4) ihmisen GC:tä vastaan Western blot analyysissä määrittämään proteiinin läsnäolo (PNAS 89:11332, 1992) ja kuvattu Barneveld R.A. et al., (Eur. J. Biochem. 134:310, 1983). Kun sopiva klooni kerran on tunnistettu, supernatantit kasvualustoista käytetään, jotta saadaan vektori, suodatetaan 0,45μC suodattimen läpi eläinkokeiden aloittamiseksi suoralla injektiolla eläimiin. Sen jälkeen kun eläinkokeet on suoritettu, voidaan käyttää asteikossa korotettua suoria protokollia, jotka on johdettu eläinkokeista hoitamaan ihmispotilaita Gaucherin taudissa. Vaihtoehtoisia antamisprotokollia tälle vektorille on annettu seuraavassa esimerkissä.

Esimerkki 18

Ihmisen papilloma-viruspatogeenisyyden inhibiitio sekvenssispesifisillä antisense- tai ribozyymimolekyyleillä, joita Sindbis-virusvektorit ekspressoi

Tähän mennessä on eristetty ja karakterisoitu enemmän kuin 60 tyyppiä ihmisen papilloma-virusta (HPV), joilla on selvä hakuisuus epiteelialkuperää oleville soluille. HPV-ryhmässä on melkoinen lukumäärä tyyppejä, jotka infektoivat ihmisen anogenitaalisella alueella. Tämä HPV:n ryhmä voidaan jakaa edelleen tyyppeihin, jotka liittyvät anogenitaalisen alueen hyvänlaatuiseen tai pahanlaatuisen lisääntymiseen.

USA:ssa on 13 000 - 20 000 kohdunkaulaan liittyvän syövän kuolemia vuosittain. Kehitysmaissa kohdunkaulaan liittyvä syöpä on yleisin pahanlaatuisuus ja kehittyneissä maissa kohdunkaulaan liittyvä syöpä jää rinta-, keuhko-, kohtu- ja munasarjasyöpien jälkeen. Eräs tilasto, joka erityisesti kannattaa huomioida, että anogenitaalinen lisääntyminen on kasvava terveysongelma, ja että lääketieteelliset neuvojen pyytämiset koskien sukuelimien syyliä ovat kasvaneet 169 000 1966 yli 2 miljoonaan 1988.

On useita todisteita, jotka liittävät HPV:n kohdunkaulan lisääntyvän sairauden patogeenisyyteen. Erillinen tyyppien alasarja, niin kutsutut "alhaisen riskin HPV:t" liittyy kohdunkaulan hyvänlaatuisiin lisääntyviin tiloihin (esim. HPV 6, 11, 43, 44), kun taas toinen tyyppien sarja "korkean riskin HPV:t" liittyvät vammoihin, jotka voivat edetä pahanlaatuiseen tilaan (esim. HPV 16, 18, 31, 33, 35 jne). Noin 95 % kohdunkaulan tuumoreista sisältää HPV:n, HPV tyypin 16 tai 18 DNA:n löytyessä noin 70 %:ssa niistä.

HPV-frekvenssi nuorissa seksuaalisesti aktiivisessa naispuolisessa populaatiossa näyttää oleva melko korkea. Todellakin, äskettäisessä tutkimuksessa 454 kollegenaisesta, 213 tai 46 % oli HPV-positiivisia. HPV-positiivisessa ryhmässä 3

% oli HPV 6/11 positiivisia ja 14 % oli HPV 16/18 positiivisia. Näistä 454 naisesta 33:lla (7,3 %) oli normaali kohdunkaulan lisääntyminen, määritettynä sytologialla.

Mitä tulee antisense ja ribozyymi terapeuttisten aineiden, jotka on kohdennettu HPV:hen, suunnitteluun, on tärkeitä parametrejä otettavana huomioon yhdistäen HPV-tyypit kohteeseen (so. tyypit, jotka liittyvät visvasyylään tai tyyppeihin, jotka liittyvät pahanlaatuiseen kohdunkaulan lisääntymiseen) ja HPV:n ekspressoimat geenit kohteeseen, mukaanluettuna mutta ei rajoittuen HPV-geeneihin E2, E6 tai E7.

Yleensä HPV-geenien ekspressio kuvataan ajallisesti kahteen faasiin, aikaiset (E) geenit, joita ekspressoidaan ennen virus-DNA-replikaatiota ja myöhäiset (L) geenit, joita ekspressoidaan virus-DNA-replikaation jälkeen. On 7 aikaista entsymaattista geeniä ja 2 myöhäistä rakenne-HPV-geeniä.

Perustuen edellä esitettyyn keskusteluun antisense/ribozyymi terapeuttiset aineet, jotka on ohjattu HPV 6/11-ryhmiä vastaan, voidaan rakentaa, ja jotka kohdentuvat virus E2-geeniin. Näyttää mahdolliselta, että E2-geenikohde voi olla epävarmaa mitä tulee HPV 16/18-ryhmään, viruksen ohjaavalla integraatiomekanismilla E2-proteiiniekspression inhibiitiolla. Täten näyttää siltä että E6/E7-geenit HPV-tyypeissä 16/18 pitäisi kohdentaa suoraan.

Alla on kuvattu antisense- ja ribozyymi terapeuttisten aineiden rakentaminen Sindbis-virusvektoreihin (kuvattu esimerkissä 2), jotka ovat spesifisiä HPV-tyypille 16 E6 ja E7 RNA:lle. HPV-antisense- ja ribozyymi-osien insertio on Cla I- ja Xba I-kohtien väliin Sindbis-vektorissa.

A. HPV 16 E6/E7 antisense terapeuttisen aineen rakentaminen

HPV 16 virusgenomista kloonia, pHPV-16 (ATCC numero 45 113) käytetään mallisäikeenä PCR-reaktiossa amplifioimaan spesifiset sekvenssit virus E6/E7-geeneistä. HPV 16 antisenseosa

insertoidaan ensin plasmidivektoriin pKSII$^+$; antisense terapeuttisen aineen poistaminen plasmidivektorista ja insertio erilaisiin Sindbis-vektorirunkoihin saadaan aikaan ainutlaatuisella antisenseosan terminaalisilla Cla I- ja Xba I-restriktioendonukleaasikohdilla. Osan HPV 16 E6/E7-geenien amplifikaatio saadaan aikaan alla nähdyllä alukeparilla:

Eteenpäin oleva aluke (puskurisekvenssi/Xba I kohta/HPV 16 nukleotidit 201-222):

TATATTCTAGAGCAAGCAACAGTTACTGCGACG (SEQ.ID.Nro 76)

Käänteisaluke (puskurisekevenssi/Cla I kohta/HPV 16 nukleotidit 759-738):

TATATATCGATCCGAAGCGTAGAGTCACACTTG (SEQ.ID.Nro 77)

Komplementaarisien HPV 16 E6/E7-sekvenssien lisäksi molemmissa alukkeissa on viisi nukleotidi "puskurisekvenssiä" niiden 5'-päissä tehokasta PCR-amplikonituotteiden entsyymipilkkomista varten. HPV 16-amplikonin luominen edellä nähtyjen alukkeiden kanssa saadaan aikaan PCR-protokollalla, joka on kuvattu esimerkissä 4. Aikaisemmin on osoitettu, että E6/E7 mRNA, jota on infektoidussa kohdunkaulan epiteelissä, on kolmessa muodossa, pilkkomaton ja kaksi pilkottua vaihtoehtoa (E6* ja E6**), yksi jossa E6:n nukleotidit 226-525 eivät ole valmiissa lähetissä (Smotkin et al., J. Virol. 63:1441-1447, 1989). Komplementaarialue tässä kuvatun antisenseosan ja HPV 16 genomin välillä on virusnukleotidit 201-759. Täten antisense-osa kykenee sitoutumaan ja inhiboimaan E6/E7 pilkkomattoman lähetin ja pilkottujen E6* ja E6** pilkottujen lähettien translaation.

HPV 16 E6/E7 580 bp amplikonituote puhdistetaan ensin Gene Clean:llä (Bio 191, San Diego, CA), pilkotaan restriktioentsyymeillä Cla I ja Xba I ja elektroforesoidaan 1 % agaroosi/TBE-geelissä. 568 bp juova leikataan sitten geeelistä,

DNA puhdistetaan Gene Clean:llä ja ligoidaan pKSII$^+$-plasmidiin, joka on valmistettu pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä, käsitellään CIAP:lla ja käsitellään Gene Clean:llä. Tämä plasmidi tunnetaan pKSaHPV16E6/E7:nä.

B. HPV 16 E6/E7 hiusneula ribozyymiterapeuttisten aineiden rakentaminen

Jotta inhiboidaan tehokkaasti HPV 16 E6- ja E7-proteiinien ekspressio, hiusneularibozyymi (HRBZ), jolla on kohdespesifisyydet E6 mRNA:han, rakennetaan. HPV 16 ribozyymiosa insertoidaan ensin plasmidivektoriin pKSII$^+$; ribozyymi terapeuttisen poisto plasmidivektorilta ja insertio erilaisiin Sindbis-vektorirunkoihin saadaan aikaan ainutlaatuisilla ribozyymiosan terminaalisilla Cla I- ja Xba I-restriktiokohdilla.

HRBZ on homologinen alla nähdyn HPV 16 E6 RNA:n kanssa (nt. 414-431):

TTAACT'GTCAAAAGCCAC (SEQ.ID.Nro 78)

HRBZ on suunniteltu pilkkomaan T-jäännöksen jälkeen TCTC-hiusneularibozyymisilmukan 5 substraatin aiheessa, nähdään alleviivattuna edellä. Pilkkomisen jälkeen HRBZ kierrätetään ja on kykenevä hybridisoitumaan ja pilkkomaan toisen pilkkomattoman E6/E7 mRNA- tai E6* pilkotun mRNA-molekyylin.

Kaksijuosteinen HRBZ kuten kuvattu aikaisemmin (Hampel et al., Nucleic Acid Research 18:299-304, 1990), jossa on 4 emäksen "tetrasilmukka" 3 ja jatkettu heliksi 4, jolla on spesifisyys edellä nähdylle HPV 16 E6 RNA:lle, syntetisoidaan kemiallisesti ja siinä on sekä 5'- ett' 3'-päät, vastaavasti, Cla I- ja Xba I-kohdat. Kemiallisesti syntetisoitujen HPV 16 E6 HRBZ-juosteiden sekvenssi nähdään alla:

HPV 16 E6 HRBZ, yläjuoste (5'->3'):

CGATGTGGTTTTTAGATGTTAAACCAGAGAAACACACGGACTTCGGTCCGTGGTATAT-
TAGCTGGTAT (SEQ.ID.Nro 79)

HPV 16 E6 HRBZ, alajuoste (5'->3'):

CTAGATACCAGCTAATATACCACGGACCGAAGTCCGTGTGTTTCTCTGGTTTAACATCT-
AAAAGCCACAT (SEQ.ID.Nro 80)

Jotta muodostetaan kaksijuosteinen HPV 16 E6-spesifinen HRBZ, jossa on Cla I ja Xba I kohesiiviset päät, sekoitetaan yhtä suuret määrät yhteen 10 mM Mg^{2+}:ssa, kuumennetaan 95°C:een 5 min, sitten jäähdytetään huoneenlämpötilaan sallimaan juosteiden hybridisoitua.

Kaksijuosteinen HPV 16 E6 HRBZ, jossa on Cla I ja Xba I kohesiiviset päät, ligoidaan ensin $pKSII^{+}$-plasmidivektoriin, joka on valmistettu Cla I ja Xba I-pilkkomisella, käsitelty CIAP:lla ja käsitellään Gene Clean:llä. Tämä plasmidi tunnetaan pKSHPV16E6HRBZ:na.

HPV 16 antisense ja hiusneulaosat vapautetaan niiden plasmidivektoreista, pKSaHPV16E6/E7 ja pKSHPV16E6HRBZ, vastaavasti, pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä, puhdistetaan agaroosigeelielektroforeesilla ja Gene Clean:llä ja insertoidaan toivottuun vektorirunkoon, joka on valmistettu pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä ja käsittely CIAP:lla. Useita mahdollisia Sindbis-vektoreita, joista joitakin nähdään alla, ja joiden yksityiskohtainen rakenne on kuvattu esimerkissä 2, ovat sopivia insertoitavaksi HPV 16 antisense- ja ribozyymi terapeuttiosiin:

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1JR	+
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP(7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+

Koska antisense ja ribozyymi terapeutti toimivat RNA-tasolla, ei ole tarpeellista että vektorit, joissa on näitä osia, sisältävät toiminnallisen liitosalueen. Tämä tarkoittaa, että alueen, joka vastaa Sindbis rakenneproteiineja, translaatio, tapahtuu vain subgenomisesta RNA:sta. Kuitenkin koska antisense ja hiusneula ribozyymiterapeutin translaatio ei ole asian ydin, nämä osat käyttävät vaikutustansa positiivijuosteisen Sindbis genomisen vektori RNA:n tasolta.

Toisaalta voi olla toivottua antaa toistettavia annoksia yksilölle; täten antisense ja hiusneula lievittävä insertoitaisiin adnovirus E3:sta tai ihmisen sytomegalovirus H301-geeneistä myötävirtaan, mikä säätelee MHC luokka I molekyylien ekspressiota alas infektoiduissa soluissa. Antisense ja hiusneula lievittävien insertio saadaan aikaan alla nähtyjen esimerkkien 3 ja 4 vektoreissa, Cla I- ja Xba I-kohtien väliin:

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINd1JRsjrcAdE3	+
pKSSINd1JRsjrH301	+

Subgenominen mRNA syntetisoidaan näissä vektoreissa, joka toimii translationaalisena mallisäikeenä Ad E3- ja CMV H301-geeneille. Täten näissä rakenteissa toiminnallinen HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymilievittävät ovat läsnä sekä subgenomisen että positiivijuosteisen genomisen Sindbis-vektori RNA:n tasolla.

Lisäksi HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymilievittävät voidaan insertoida heterologisesta geenistä, joka on insertoitu kuvattuihin Sindbis-vektoreihin, myötävirtaan. Esimerkiksi, voitaisiin insertoida HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymilievittävät heterologisesta geenistä, joka koodaa immunogeenista HPV 16 epitooppia, myötävirtaan, esimerkiksi E6/E7 tai L1-proteiinit. Näihin vektoreihin ei toivottaisi liitettävän immunosäätelygeenejä Ad E3 tai CMV H301.

E6/E7-geenien ekspressiota sekä suuri- että pieniriskisten HPV-ryhmien infektion aikana tarvitaan kohdunkaulan epiteelin lisääntymisen. HPV E7-proteiini kaikista testatuista HPV-tyypeistä muodostaa kompleksin verkkokalvon varhaissolukasvaimen proteiinin kanssa ja E6-proteiini HPV-tyypeistä 16 ja 18 liittyy yhteen ja hajottaa soluproteiinia p53. p53- ja verkkokalvon varhaissolukasvaimen solugeenituotteet liittyvät solun kasvun kontrolliin ja näiden proteiinien ekspression tai toiminnan muuttaminen voi vapauttaa kasvun kontrollin kohdanneissa soluissa. Täten antisense tai ribozyymi terapeuttinen aine molemmille HPV-ryhmille pitäisi joko suoraan tai äärimmäisesti vähentää yhden tai molempien näiden geenien ekspressiota. E6/E7-geenien ekspressio transaktivoi viruksen E2-proteiini. Kuitenkin käyttämällä vaihtoehtoista pilkkomisstrategiaa, E2-proteiini voi myös toimia trans-repressorina. Oncogeenisten HPV-tyyppien integraatio tapahtuu viruksen E2-alueella ja ehkäisee E2-proteiinin ekspression. Integraatio onkogeenisillä HPV-tyypeillä näyttää olevan keskeinen tapahtuma suorassa induktiossa ja/tai kohdunkaulan karsinooman ylläpitämisessä. Tämä tapahtuma johtaa E6/E7-geenien jatkuvaan ekspressioon. Integroidussa tilassa E6/E7-geenien ekspressiota transaktivoivat tekijät, joita on infektoiduissa keratinosyyteissä. Virus E2 kontrollimekanismin inaktivaatio reaktiona E6/E7 ekspression solun keratinosyyttitekijän aktivaatioon saattaisi olla kriittinen tapahtuma viruksen integraatiossa.

Alla on kuvattu antisense ja ribozyymiterapeuttien rakentaminen Sindbis-virusvektoreihin (kuvattu esimerkissä 2), mikä on spesifistä HPV-tyyppi 16 E6 ja E7 RNA:lle. HPV antisense ja ribozyymiosien insertio on Sindbis-vektorin Cla I- ja Xba I-kohtien väliin.

C. HPV 16 E6/E7 antisenseterapeuttien rakentaminen

HPV 16 viruksen genomista kloonia, pHPV-16 (ATCC numero 45 113) käytetään mallisäikeenä PCR-reaktiossa amplifioimaan virus E6/E7-geenien spesifiset sekvenssit. HPV 16 antisense-

osa insertoidaan ensin plasmidivektoriin pKSII$^+$; antisense terapeuttisen poisto plasmidivektorilta ja insertio erilaisiin Sindbis-vektorirunkoihin saadaan aikaan ainutlaatuisilla antisenseosan terminaalisilla Cla I- ja Xba I-restriktiokohdilla.

Eteenpäin oleva aluke (puskurisekvenssi/Xba I kohta/HPV 16 nukleotidit 201-222):

TATATTCTAGAGCAAGCAACAGTTACTGCGACG (SEQ.ID.Nro 76)

Käänteisaluke (puskurisekevenssi/Cla I kohta/HPV 16 nukleotidit 759-738):

TATATATCGATCCGAAGCGTAGAGTCACACTTG (SEQ.ID.Nro 77)

Komplementaarisien HPV 16 E6/E7-sekvenssien lisäksi molemmissa alukkeissa on viisi nukleotidi "puskurisekvenssiä" niiden 5'-päissä tehokasta PCR-amplikonituotteiden entsyymipilkkomista varten. HPV 16-amplikonin luominen edellä nähtyjen alukkeiden kanssa saadaan aikaan PCR-protokollalla, joka on kuvattu esimerkissä 4. Aikaisemmin on osoitettu, että E6/E7 mRNA, jota on infektoidussa kohdunkaulan epiteelissä, on kolmessa muodossa, pilkkomaton ja kaksi pilkottua vaihtoehtoa (E6* ja E6**), yksi jossa E6:n nukleotidit 226-525 eivät ole valmiissa lähetissä (Smotkin et al., J. Virol. 63:1441-1447, 1989). Komplementaarialue tässä kuvatun antisenseosan ja HPV 16 genomin välillä on virusnukleotidit 201-759. Täten antisense-osa kykenee sitoutumaan ja inhiboimaan E6/E7 pilkkomattoman lähetin ja pilkottujen E6* ja E6** pilkottujen lähettien translaation.

HPV 16 E6/E7 580 bp amplikonituote puhdistetaan ensin Gene Clean:llä (Bio 191, San Diego, CA), pilkotaan restriktioentsyymeillä Cla I ja Xba I ja elektroforesoidaan 1 % agaroosi/TBE-geelissä. 568 bp juova leikataan sitten geeelistä, DNA puhdistetaan Gene Clean:llä ja ligoidaan pKSII$^+$-plasmidiin, joka on valmistettu pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:

llä, käsitellään CIAP:lla ja käsitellään Gene Clean:llä. Tämä plasmidi tunnetaan pKSαHPV16E6/E7:nä.

D. HPV 16E6/E7 hiusneularibozyymiterapeuttien rakentaminen

Jotta inhiboidaan tehokkaasti HPV 16 E6- ja E7-proteiinien ekspressiota, rakennetaan hiusneularibozyymi (HRBZ), jolla on kohdespesifisyydet E6 mRNA:han. HPV 16 ribozyymiosa insertoidaan ensin plasmidivektoriin pKSII$^+$; ribozyymiterapeuttien poistaminen plasmidivektorista ja insertio erilaisiin Sindbis-vektorirunkoihin saadaan aikaan ainutlaatuisilla ribozyymiosan terminaalisilla Cla I ja Xba I restriktioendonukleaasikohdilla.

HRBZ on homologinen alla nähdyn HPV 16 E6 RNA nukleotidisekvenssin 414-431 kanssa:

5'-TTA ACT GTC AAA AGC CAC-3' (SEQ.ID.Nro 83)

HRBZ on suunniteltu pilkkomaan T-jäännöksen jälkeen TCTC-hiusneularibozyymisilmukan 5 substraatin aiheessa, nähdään alleviivattuna edellä. Pilkkomisen jälkeen HRBZ kierrätetään ja on kykenevä hybridisoitumaan ja pilkkomaan toisen pilkkomattoman E6/E7 mRNA- tai E6* pilkotun mRNA-molekyylin.

Kaksijuosteinen HRBZ (Hampel et al., Nucleic Acid Research 18:299-304, 1990), jossa on 4 emäksen "tetrasilmukka" 3 ja jatkettu heliksi 4, jolla on spesifisyys edellä nähdylle HPV 16 E6 RNA:lle, syntetisoidaan kemiallisesti ja siinä on sekä 5'- että 3'-päät, vastaavasti. Kemiallisesti syntetisoitujen HPV 16 E6 HRBZ-juosteiden sekvenssi nähdään alla:

HPV 16 E6 HRBZ, sensejuoste:

5'-CGA TGT GGT TTT TAG ATG TTA AAC CAG AGA AAC ACA CGG ACT TCG GTC CGT GGT ATA TTA GCT GGT AT-3' (SEQ.ID.Nro 84)

HPV 16 E6 HRBZ, antisensejuoste:

5'-CTA GAT ACC AGC TAA TAT ACC ACG GAC CGA AGT CCG TGT GTT TCT CTG GTT TAA CAT CTA AAA GCC ACA T-3' (SEQ.ID.Nro 85)

Jotta muodostetaan kaksijuosteinen HPV 16 E6-spesifinen HRBZ, jossa on Cla I ja Xba I kohesiiviset päät, sekoitetaan yhtä suuret määrät yhteen 10 mM $MgCl_2$:ssa, kuumennetaan 95°C:een 5 min, sitten jäähdytetään huoneenlämpötilaan sallimaan juosteiden hybridisoitua.

Kaksijuosteinen HPV 16 E6 HRBZ, jossa on Cla I ja Xba I kohesiiviset päät, ligoidaan ensin pKSII$^+$-plasmidivektoriin. pKSII$^+$-vektori pilkotaan ensin Cla I:llä ja Xba I:llä, käsitelty CIAP:lla ja käsitellään Gene Clean:llä ennen ligaatiota. Tätä plasmidia merkitään pKSHPV16E6HRBZ.

HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymiosat vapautetaan niiden plasmidivektoreista, pKSaHPV16E6/E7 ja pKSHPV16E6HRBZ, vastaavasti, pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä, eristetään agaroosigeelielektroforeesilla ja puhdistetaan käyttämällä Gene Clean™:ä. Sitten ne ligoidaan toivottuun vektorirunkoon. Vektorirunko on valmistettu pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä ja käsittelemällä CIAP:lla. Useat mahdolliset Sindbis-vektorit ovat sopivia insertoitavaksi HPV 16 antisense- ja ribozyymi terapeuttiosiin. Joitakin näistä vektoreista esimerkistä 2 nähdään alla:

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1JR	+
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP(7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+

Koska antisense- ja ribozyymiterapeutti toimivat RNA-tasolla, ei ole tarpeellista että vektorit, joissa on näitä osia, sisältävät toiminnallisen liitosalueen. Nimenomaan, alueen, joka vastaa Sindbis rakenneproteiineja, translaatio, tapah-

tuu vain subgenomisesta RNA:sta. Kuitenkin koska antisense ja hiusneularibozyymiterapeutin translaatio ei ole asian ydin, nämä osat käyttävät vaikutustansa positiivijuosteisen Sindbis genomisen vektori RNA:n tasolta.

Toisaalta voi olla toivottua antaa toistettavia annoksia yksilölle; täten antisense ja hiusneula lievittävä insertoitaisiin adnovirus E3:sta tai ihmisen sytomegalovirus H301-geeneistä myötävirtaan. (E3 ja H301 säätelevät MHC luokka I molekyylien ekspressiota alas infektoiduissa soluissa.) Antisense ja hiusneula lievittävien insertio saadaan aikaan alla nähtyjen esimerkkien 3 ja 4 vektoreissa, Cla I- ja Xba I-restriktiokohtien väliin:

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINd1JRsjrcAdE3	+
pKSSINd1JRsjrH301	+

Subgenominen mRNA syntetisoidaan näissä vektoreissa, joka toimii translationaalisena mallisäikeenä Ad E3- ja CMV H301-geeneille. Täten näissä rakenteissa toiminnallinen HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymilievittävät ovat läsnä sekä subgenomisen että positiivijuosteisen genomisen Sindbis-vektori RNA:n tasolla.

Lisäksi HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymilievittävät voidaan insertoida heterologisesta geenistä, joka on kuvatussa Sindbis-vektorissa, myötävirtaan. Esimerkiksi, HPV 16 antisense ja hiusneularibozyymilievittävät voitaisiin insertoida heterologisesta geenistä, joka koodaa immunogeenisiä HPV 16 E6/E7- tai L1-proteiineja, myötävirtaan. Näihin vektoreihin ei toivottaisi liitettävän immunosäätelygeenejä Ad E3 tai CMV H301.

Esimerkki 19

Ihmisen interferoni A:n ekspression inhibiitio, jonka aiheuttaa sekvenssispesifiset ribozyymimolekyylit, jotka ekspressoituvat Sindbis-virusvektoreista, infektoiduissa soluissa

Interferonit (IFN) koostuvat pienten proteiinien perheestä, mikä vaikuttaa laajasti nisäkässolujen biologisiin aktiivisuuksiin, MHC-antigeenien ekspressio, useiden geenien, jotka moduloivat solukasvukontrollia, ekspressio ja resistenssi virusinfektioihin, mukaanluettuna (Petska et al., Ann. Rev. Bioceh. 56:727-777, 1987). Kolmesta IFN-luokasta, a, b ja g, IFN-a tai leukosyytti-interferoni on vastuussa aktiivisuudesta, joka rajoittaa virusreplikaatiota infektoidussa solussa.

IFN-a:n antivirusvaikutukset liittyvät kahden solun entsyymin induktioon, mitkä inhiboivat viruksen elinkiertoa infektoidussa solussa. Yksi entsyymi on kaksijuosteinen RNA-riippuvainen 68 kDa proteiinikinaasi, joka katalysoi proteiinisynteesin aloitustekijän eIF-2 alayksikön fosforylaatiota. Toinen IFN-a:n indusoima entsyymi on 2',5'-oligoadenylaattisyntetaasi (2',5'-OAS), mikä aktivoi kaksijuosteisen RNA:n läsnäollessa latenttia endonukleaasia, RNaseL, mikä on vastuussa viruksen ja solun RNA:n hajoamisesta (Johnston ja Torrence, Interferons 3:189-298, Friedman (toim.), Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, 1984).

Koska niiden replikaatiostrategiaan sisältyy kaksijuosteinen RNA välituote, RNA-virukset erityisesti ovat voimakkaita interferonin indusoijia. Mitä tulee Sindbis-virukseen, kaksijuosteisia RNA-molekyylejä on läsnä sekä positiivi- että negatiivi-juosteisten genomin pituisten molekyylien replikaatiossa ja subgenomisen mRNA:n transkription aikana. On osoitettu että solujen infektio Sindbis-viruksella johtaa interferonin induktioon (Saito, J. Interferon Res. 9:23-24, 1989).

Sovellutuksissa, joissa toivotaan terapeuttisen lievittävän pidennyttyä ekspressiota, IFN:n ekspressio infektoidussa solussa inkuboidaan hiusneularibozyymin, jolla on spesifisyys IFN-a mRNA:han Sindbis-vektorissa, inkluusiolla. IFN-a:n ekspression inhibiitio täten lievittää solun proteiinien induktion ryöppyä, eIF-2-proteiinikinaasi ja 2',5'-OAS mukaanluettuna, mikä inhiboi laajuutta, millä virus voi replikoida infektoidussa solussa. Terapeuttisen lievittävän pidennetty ekspressio ilman immuunivasteen, joka on kohdennettu vektorilla infektoituun soluun, induktiota toivotaan kaikissa muissa sovellutuksissa kuin antigeenin esittämisessä ja siihen sisältyy esimerkiksi systeeminen proteiinin tuotto, antisense ja ribozyymi ja lisämolekyylit.

A. Hiusneularibozyymin, jolla on kohdennettu spesifisyys interferoni A mRNA:han, rakentaminen

Jotta tehokkaasti inhiboidaan interferoni A proteiinin ekspressio soluissa, jotka on infektoitu Sindbis-vektoreilla, rakennetaan hiusneularibozyymi (HRBZ), jolla on kohdennettu spesifisyys interferoni A mRNA:han. IFN-a ribozyymiosa insertoidaan ensin plasmidivektoriin pKSII$^+$ (Stratagene, La Jolla, CA); ribozyymiterapeuttien poisto plasmidivektorilta ja insertio erilaisiin Sindbis-vektorirunkoihin saadaan aikaan ainutlaatuisilla antisenseosan terminaalisilla Cla I- ja Xba I-restriktiokohdilla.

HRBZ on homologinen, alla nähtyjen ihmisen interferoni alfa-geenin IFN-alfa 4b:n nukleotidien 1026-1041 kanssa ja kaikkien IFN-a-geenien kanssa, jotka on sekvenssoitu, mukaanlukien 5, 6, 7, 8 ja 14, mutta ei geeni 16 (Henco et al., J. Mol. Biol. 185:227-260, 1985):

TCT CTG TCC TCC ATG A (SEQ.ID.Nro 86)

HRBZ on suunniteltu pilkkomaan T-jäännöksen jälkeen TCTC-hiusneularibozyymisilmukan 5 substraatin aiheessa, nähdään alleviivattuna edellä. Pilkkomisen jälkeen HRBZ kierrätetään

ja on kykenevä hybridisoitumaan ja pilkkomaan toisen IFN-a mRNA-molekyylin.

Kaksijuosteinen HRBZ, kuten edellä on kuvattu (Hampel et al., Nucleic Acid Research 18:299-304, 1990), jossa on 4 emäksen "tetrasilmukka" 3 ja jatkettu heliksi 4, jolla on spesifisyys edellä nähdylle IFN-a mRNA:lle, syntetisoidaan kemiallisesti ja siinä on sekä 5'- että 3'-päät, vastaavasti, Cla I- ja Xba I-kohdat. Kemiallisesti syntetisoitujen IFN-a HRBZ-juosteiden sekvenssi nähdään alla:

IFN-a HRBZ, sensejuoste (5'-3'):

TCG AGT CAT GGA GAG AGG AGA ACC AGA GAA ACA CAC GGA CTT CGG TCC GTG GTA TAT TAC CTG GAT (SEQ.ID.Nro 87)

IFN-a HRBZ, antisensejuoste (5'-3'):
CGA TCC AGG TAA TAT ACC ACG GAC CGA AGT CCG TGT GTT TCT CTG GTT CTC CTC TCT CCA TGA (SEQ.ID.Nro 88)

Jotta muodostetaan kaksijuosteinen IFN-a-spesifinen HRBZ, jossa on Cla I ja Xba I kohesiiviset päät, sekoitetaan yhtä suuret määrät yhteen 10 mM Mg^{2+}:ssa, kuumennetaan 95°C:een 5 min, sitten jäähdytetään huoneenlämpötilaan sallimaan juosteiden hybridisoitua.

Kaksijuosteinen IFN-a HRBZ, jossa on Cla I ja Xba I kohesiiviset päät, ligoidaan ensin pKSII$^+$-plasmidivektoriin, joka on valmistettu pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä, käsittelemällä CIAP:lla ja käsittely Gene Clean:llä. Tämä plasmidi tunnetaan pKSIFNaHRBZ:na.

IFNa hiusneularibozyymiosa vapautetaan plasmidista pKSIFNa-HRBZ, pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä, puhdistamalla 2 % Nu-Sieve/1 % agaroosigeelielektroforeesilla ja Gene Clean:llä ja insertoidaan toivottuun vektorirunkoon, joka on valmistettu pilkkomalla Cla I:llä ja Xba I:llä ja käsittelemällä CIAP:lla. Useat mahdolliset Sindbis-vektorit, joista joi-

takin nähdään alla, ja joiden yksityiskohtainen rakenne on kuvattu esimerkeissä 2, 3ja 4, ovat sopivia insertoitavaksi IFN-a hiusneularibozyymi osaan.

Vektori	Toiminnallinen liitosalue (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1JR	-
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP(7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+
pKSSINd1JRsjrcAdE3	+
pKSSINd1JRsjrcH301	+

Koska ribozyymiaktiivisuus toimii RNA-tasolla, ei ole tarpeellista että tätä aluetta ekspressoidaan osana subgenomista mRNA:ta. Kuitenkin kun laitetaan toiminnallisesta liitosalueesta myötävirtaan, syntetisoidun ribozyymin taso on paljon korkeampi ja ehkä tehokkaampi pilkkomaan IFN-a RNA-kohdetta.

Lisäksi joissakin sovellutuksissa esimerkiksi systeemistä proteiinin ekspressiota varten vaaditaan moninkertainen annoksen antaminen yksilölle. Näissä sovellutuksissa terapeuttisen lievittävän pidentynyt ekspressio ilman immuunivasteen, joka on kohdennettu vektori-infektoitua solua vastaan, induktiota toivotaan. Tässä konfiguraatiossa IFN-aHRBZ-osa voitaisiin insertoida adenovirus E3:sta tai ihmisen sytomegalovirus H301-geeneistä myötävirtaan, mikä säätää MHC luokka I molekyylien ekspressiota alas infektoiduissa soluissa. Geenin, joka moduloi MHC luokka I ekspressiota, jälkeen on peräkkäin IRES-elementti, joka on valittu esimerkissä 5 kuvatun ryhmän joukosta, ja terapeuttinen lievittävä. Hiusneularibozyymin järjestetty insertio, Ad E3 tai CMV H301, IRES ja kiinnostavien komponenttien heterologinen geeni yhdessä moninkertaisen kloonaussekvenssin kanssa, joka sijaitsee vektorissa vektoriliitosalueen ja 3'-pään välissä, saadaan aikaan modifioimalla sopiva, komponentti 5'- ja 3'-päi-

den restriktioentsyymin tunnistuskohta. Näissä rakenteissa toiminnalliset INF-a hiusneularibozyymilievittävät ovat läsnä sekä subgenomisen ja positiivijuosteisen genomisen Sindbis-vektori RNA:n tasolla.

Esimerkki 20
Rekombinantti alfa-virusvektorin laktoosiformulaatio

Raaka rekombinantti alfa-virusvektori saadaan Celligan bioreaktorista (New Brunswick, NJ), jossa on pakkaussolut transfektoituna tai transdusoituna rekombinantti alfa-virusvektorin kanssa ja sidottuna bioreaktorimatriisin helmiin. Solut vapauttavat rekombinantti alfa-virusvektoria kasvualustaan, joka kulkee solujen yli jatkuvana virtausprosessina. Bioreaktorista poistuva alusta kerätään ja annetaan kulkea ensin 0,8 mikronin suodattimen läpi, sitten 0,65 mikronin suodattimen kirkastamaan raakaa rekombinantti alfa-virusvektoria. Suodos konsentroidaan käyttämällä ristiinvirtaussysteemiä (Filtron, Boston, MA). Noin 50 yksikköä DNase (Intergen, New York, NY)/ml konsentraatti lisätään pilkkomaan ulkopuolinen DNA. Pilkottu diasuodatetaan käyttämällä samaa ristiinvirtaussysteemiä 150 mM NaCl, 25 mM trometamiini, pH 7,2. Diasuodos laitetaan Sephadex S-500-geelipylvääseen (Pharmacia, Piscataway, NJ), tasapainotettu 50 mM NaCl:ssä, 25 mM trometamiinissa, pH 7,4. Puhdistettu alfa-virusvektori eluoidaan Sephadex S-500-geelipylväästä 50 mM NaCl:ssä, 25 mM trometamiinissa, pH 7,4.

Formulaatiopuskuri, jossa on laktoosia, valmistettiin 2x konsentroituna kantaliuoksena. Formulaatiopuskurissa on 25 mM trometamiini, 70 mM NaCl, 2 mg/ml arginiinia, 10 mg/ml ihmisen seerumialbumiinia (HSA) ja 100 mg/ml laktoosia lopullisena 100 ml:n tilavuutena pH 7,4:ssä.

Puhdistettu rekombinantti alfa-virusvektori formuloidaan lisäämällä yksi osa 2X laktoosiformulaatiopuskuria yhteen osaan S-500-puhdistettu rekombinantti alfa-virusvektoria.

Formuloitua rekombinantti alfa-virusvektoria voidaan säilyttää -70°C - 80°C tai kuivata.

Formuloitu rekombinantti alfa-virusvektori lyofilisoidaan Edwards Refrigerated Chamber (3 Shelf RC3S yksikkö) kiinnitettynä Supermodulyo 12 K kylmäkuivaajaan (Edwards High Vacuum, Tonawanda, NY). Kun kylmäkuivauskierros on valmis, ampullit lukitaan tyhjössä, jonka jälkeen hieman typpikaasun johtamista. Poistamisen jälkeen ampulleihin puristetaan alumiikorkit. Lyofilisoitu rekombinantti retro-virus saadaan uudellen käyttöön 1,0 ml:ssa vettä.

Edellä olevasta on ymmärrettävää, että vaikka keksinnön spesifisiä suoritusmuotoja on kuvattu tässä valaisutarkoituksissa, voidaan tehdä erilaisia muunnoksia irtoamatta keksinnön hengestä ja ulottuvuudesta. Sen mukaisesti keksintöä ei rajoiteta paitsi liitetyillä patenttivaatimuksilla.

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA: Viagene, Incorporated

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: REKOMBINANTTI ALPA-VIRUSVEKTORIT

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 118

(iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
(A) VASTAANOTTAJA: Seed and Berry
(B) KATU: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
(C) KAUPUNKI: Seattle
(D) OSAVALTIO: Washington
(E) MAA: US
(F) POSTINUMERO: 98104-7092

(v) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Floppy disk
(B) TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: PCT/US94/10469
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 15.9.1994
(C) LUOKITUS:

(viii) ASIAMIEHEN TIEDOT:
(A) NIMI: McMasters, David D.
(B) REKISTERINUMERO: 33,963
(C) VIITE/LUETTELONUMERO: 930049.423PC

(ix) TIETOLIIKENNEYHTEYSTIEDOT:
(A) PUHELIN: (206) 622-4900
(B) TELEFAX: (206) 682-6031

(C) TELEX TAI SÄHKÖPOSTI: 3723836 SEEDANBERRY

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:1:

ATCTCTACGG TGGTCCTAAA TAGT 24

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 42 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:2:

TATATTCTAG ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTGAAA TG 42

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 48 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:3:

TATATGGGCC CGATTTAGGT GACACTATAG ATTGACGGCG TAGTACAC 48

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 23 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:4:

CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC 23

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:5:

ATACTAGCCA CGGCCGGTAT C 21

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:6:

TCCTCTTTCG ACGTGTCGAG C 21

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:7:

ACCTTGGAGC GCAATGTCCT G 21

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIREET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:8:

CCTTTTCAGG GGATCCGCCA C 21

(2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUSS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:9:

GTGGCGGATC CCCTGAAAAG G 21

(2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 19 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:10:

TGGGCCGTGT GGTCGCATG 19

(2) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:11:

5TGGGTCTTCA ACTCACCGGA C 21

(2) SEKVENSSIN ID NO:12 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 22 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:12:

CAATTCGACG TACGCCTCAC TC 22

(2) SEKVENSSIN ID NO:13 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 22 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:13:

GAGTGAGGCG TACGTCGAAT TG 22

(2) SEKVENSSIN ID NO:14 TIEDOT:

(i) SEKVUENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 35 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:14:

TATATCTCCA GATGAGGTAC ATGATTTTAG GCTTG 35

(2) SEKVENSSIN ID NO:15 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:15:

TATATATCGA TTCAAGGCAT TTTCTTTTCA TCAATAAAAC 40

(2) SEKVENSSIN ID NO:16 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 35 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:16:

TATATCTCCA GATGATGACA ATGTGGTGTC TGACG 35

(2) SEKVENSSIN ID NO:17 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUS:
(A) PITUUS: 32 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:17:

TATATATCGA TTCATGACGA CCGGACCTTG CG 32

(2) SEKVENSSIN ID NO:18 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 28 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:18:

TATATGGGCC CCCCCCCCCC CCCCAACG 28

(2) SEKVENSSIN ID NO:19 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:19:

5TATATATCGA TCCCCCCCCC CCCCCCAACG 30

(2) SEKVENSSIN ID NO:20 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:20:

TATATCCATG GCTTACAATC GTGGTTTTCA AAGG 34

(2) SEKVENSSIN ID NO:21 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:21:

TATATGGGCC CTCGATGAGT CTGGACGTTC CTC 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:22 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:22:

TATATATCGA TTCGATGAGT CTGGACGTTC CTC 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:23 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 37 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:23:

TATATCCATG GATCCAATTT GCTTTATGAT AACAATC 37

(2) SEKVENSSIN ID NO:24 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:24:

TATATGGGCC CGGTCGACGC CGGCCAAGAC 30

(2) SEKVENSSIN ID NO:25 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:25:

TATATATCGA TGGTCGACGC CGGCCAAGAC 30

(2) SEKVENSSIN ID NO:26 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 32 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:26:

TATATCCATG GTGCCAGCCA GTTGGGCAGC AG 32

(2) SEKVENSSIN ID NO:27 TOEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 23 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:27:

5TTAATTAACG GCCGCCACCA TGG 23

(2) SEKVENSSIN ID NO:28 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 13 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:28:

TAACGGCCGC CAC 13

(2) SEKVENSSIN ID NO:29 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 20 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:29:

CCATGGTGGC GGCCGTTAAT 20

(2) SEKVENSSIN ID NO:30 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 12 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:30:

GTCACCGGTG AC 12

(2) SEKVENSSIN ID NO:31 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 25 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:31:

CTCATCGATC AGATCTGACT AGTTG 25

(2) SEKVENSSIN ID NO:32 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:32:

GATCCAACTA GTCAGATCTG ATCGATGAGG GCC 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:33 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 56 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:33:

ACTTATCGAT GGTTCTAGAC TCCCTTAGCC ATCCGAGTGG ACGTGCGTCC TCCTTC 56

(2) SEKVENSSIN ID NO:34 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 52 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:34:

TCCACCTCCT CGCGGTCCGA CCTGGGCATC CGAAGGAGGA CGCACGTCCA CT 52

(2) SEKVENSSIN ID NO:35 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 57 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:35:

5TCGGACCGCG AGGAGGTGGA GATGCCATGC CGACCCATTG ACGGCGTAGT ACACACT 57

(2) SEKVENSSIN ID NO:36 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:36:

CTGGACTAGT TAATACTGGT GCTCGGAAAA CATTCT 36

(2) SEKVENSSIN ID NO:37 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:37:

GTCAAGCTTG CTAGCTACAA CACCACCACC ATGAATAGAG 40

(2) SEKVENSSIN ID NO:38 TIEDOT:

(i) SEKVENSSSIN OMINAISUUDET:

(A) PITUUS: 47 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:38:

TATATGCGGC CGCACCACCA CCATGAATAG AGGATTCTTT AACATGC 47

(2) SEKVENSSIN ID NO:39 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:39:

TATATGCGGC CGCTCATCTT CGTGTGCTAG TCAG 34

(2) SEKVENSSIN ID NO:40 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 61 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:40:

TATATGCGGC CGCATCTCTA CGGTGGTCCT AAATAGTACC ACCACCATGA ATAGAGGATT 60

C 61

(2) SEKVENSSIN ID NO:41 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:41:

CAGTCTCGAG TTACTACCAC TCTTCTGTCC CTTCCGGGGT 40

(2) SEKVENSSIN ID NO:42 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 43 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:42:

TATATGCGGC CGCACCACCA TGTCCGCAGC ACCACTGGTC ACG 43

(2) SEKVENSSIN ID NO:43 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:43:

TATATAGATC TCTTGATCAG CTTCAGAAGA TGGC 34

(2) SEKVENSSIN ID NO:44 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:44:

TCAATGGCGG GAAGAGGCGG TTGG 24

(2) SEKVENSSIN ID NO:45 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 31 emäsparia
(B) TYY PPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:45:

CCGCCTCTTC CCGCCATTGA CGGCGTAGTA C 31

(2) SEKVENSSIN ID NO:46 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 23 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:46:

CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC 23

(2) SEKVENSSIN ID NO:47 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:47:

TATATAGATC TCTTGATCAG CTTCAGAAGA TGGC 34

(2) SEKVENSSIN ID NO:48 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 22 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:48:

GGTAACAAGA TCTCGTGCCG TG 22

(2) SEKVENSSIN ID NO:49 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:49:

TATATGCGGC CGCACCGCCA AGATGTTCCC GTTCCAGCCA 40

(2) SEKVENSSIN ID NO:50 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:50:

TATATGCGGC CGCTCAATTA TGTTTCTGGT TGGT 34

(2) SEKVENSSIN ID NO:51 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 35 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:51:

CTCGAGCTCG AGGCACCAGC ACCATGCAAC TTTTT 35

(2) SEKVENSSIN ID NO:52 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:52:

CTACTAGATC CCTAGATGCT GGATCTTCC 29

(2) SEKVENSSIN ID NO:53 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:53:

GGAAGATCCA GCATCTAGGG ATCTAGTAG 29

(2) SEKVENSSIN ID NO:54 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 26 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:54:

GGGCGATATC AAGCTTATCG ATACCG 26

(2) SEKVENSSIN ID NO:55 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 35 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:55:

CTCGAGCTCG AGGCACCAGC ACCATGCAAC TTTTT 35

(2) SEKVENSSIN ID NO:56 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 26 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:56:

GGGCGATATC AAGCTTATCG ATACCG 26

(2) SEKVENSSIN ID NO:57 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 19 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:57:

AATACGACTC ACTATAGGG 19

(2) SEKVENSSIN ID NO:58 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:58:

CTACTAGATC CCTAGATGCT GGATCTTCC 29

(2) SEKVENSSIN ID NO:59 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 17 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:59:

ATTAACCCTC ACTAAAG 17

(2) SEKVENSSIN ID NO:60 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:60:

GGAAGATCCA GCATCTAGGG ATCTAGTAG 29

(2) SEKVENSSIN ID NO:61 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 17 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:61:

ATTAACCCTC ACTAAAG 17

(2) SEKVENSSIN ID NO:62 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 19 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:62:

AATACGACTC ACTATAGGG 19

(2) SEKVENSSIN ID NO:63 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:63:

CCTCGAGCTC GAGCTTGGGT GGCTTTGGGG CATG 34

(2) SEKVENSSIN ID NO:64 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 17 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:64:

ATTACCCCTC ACTAAAG 17

5) SEKVENSSIN ID NO:65 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 52 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:65:

TCCACCTCCT CGCGGTCCGA CCTGGGCATC CGAAGGAGGA CGCACGTCCA CT 52

(2) SEKVENSSIN ID NO:66 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 56 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:66:

ACTTATCGAT GGTTCTAGAC TCCCTTAGCC ATCCGAGTGG ACGTGCGTCC TCCTTC 56

(2) SEKVENSSIN ID NO:67 TIDEOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 57 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:67:

TCGGACCGCG AGGAGGTGGA GATGCCATGC CGACCCATTG ACGGCGTAGT ACACACT 57

(2) SEKVENSSIN ID NO:68 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:68:

CTGGACTAGT TAATACTGGT GCTCGGAAAA CATTCT 36

(2) SEKVENSSIN ID NO:69 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:69:

TTTCTGGCTC CAGCCAAAGC CACCCTAGGG GAG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:70 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:70:

AATGGAGTAG CCAGGTGAGA TTGTCTCCAG GAA 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:71 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 44 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:71:

CGCGCGGGCC CTGTGACATT GAATAGAGTG AGGGTCCTGT TGGG 44

(2) SEKVENSSIN ID NO:72 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 45 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:72:

AAAGGTTTCA CATTTGTAGC TTGCTGTGTC ATTGCGATCT CTACG 45

(2) SEKVENSSIN ID NO:73 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 45 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:73:

GTGGTCCTAA ATAGTTCACT CTATTCAATG TCACACTCGA GCCGG 45

(2) SEKVENSSIN ID NO:74 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENCSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:74:

TTTCTGGCTC CAGCCAAAGC CACCCTAGGG GAG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:75 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:75:

AATGGAGTAG CCAGGTGAGA TTGTCTCCAG GAA 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:76 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:76:

TATATTCTAG AGCAAGCAAC AGTTACTGCG ACG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:77 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:77:

TATATATCGA TCCGAAGCGT AGAGTCACAC TTG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:78 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 18 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:78:

TTAACTGTCA AAAGCCAC 18

(2) SEKVENSSIN ID NO:79 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 68 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:79:

CGATGTGGCT TTTAGATGTT AAACCAGAGA AACACACGGA CTTCGGTCCG TGGTATATTA 60

GCTGGTAT 68

(2) SEKVENSSIN ID NO:80 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 70 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:80:

CTAGATACCA GCTAATATAC CACGGACCGA AGTCCGTGTG TTTCTCTGGT TTAACATCTA 60

AAAGCCACAT 70

(2) SEKVENSSIN ID NO:81 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGia: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:81:

TATATTCTAG AGCAAGCAAC AGTTACTGCG ACG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:82 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:82:

TATATATCGA TCCGAAGCGT AGAGTCACAC TTG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:83 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 18 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:83:

TTAACTGTCA AAAGCCAC 18

(2) SEKVENSSIN ID NO:84 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 68 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:84:

CGATGTGGCT TTTAGATGTT AAACCAGAGA AACACACGGA CTTCGGTCCG TGGTATATTA 60

GCTGGTAT 68

(2) SEKVENSSIN ID NO:85 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 70 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:85:

CTAGATACCA GCTAATATAC CACGGACCGA AGTCCGTGTG TTTCTCTGGT TTAACATCTA 60

5AAAGCCACAT 70

(2) SEKVENSSIN ID NO:86 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

10 (A) PITUUS: 16 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

15

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:86:

TCTCTGTCCT CCATGA 16

20

(2) SEKVENSSIN ID NO:87 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN KUVAUS:

(A) PITUUS: 66 emäsparia
25 (B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

30

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:87:

TCGAGTCATG GAGAGAGGAG AACCAGAGAA ACACACGGAC TTCGGTCCGT GGTATATTAC 60

35CTGGAT 66

(2) SEKVENSSIN ID NO:88 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 64 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:88:

CGATCCAGGT AATATACCAC GGACCGAAGT CCGTGTGTTT CTCTGGTTCT CCTCTCTCCA 60

TGAC 64

(2) SEKVENSSIN ID NO:89 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
(A) PITUUS: 16656 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:89:

ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATCGCACT ACCATCACAA 60

TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG TCCGTTTGTC GTGCAACTGC 120

AAAAAAGCTT CCCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA 180

ATGCCAGAGC ATTTTCGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG 240

CGACGATCTT GGACATAGGC AGCGCACCGG CTCGTAGAAT GTTTTCCGAG CACCAGTATC 300

ATTGTGTCTG CCCCATGCGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA TATGCCAGTA 360

AACTGGCGGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAAG ATTAAGGATC 420

TCCGGACCGT ACTTGATACG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAACGATG 480

TTACCTGCAA CATGCGTGCC GAATATTCCG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG 540

GAACTATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TGCGGACCCT GTACTGGATT GGCTTCGACA 600

CCACCCAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTCGTACCC TGCGTACAAC ACCAACTGGG 660

CCGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGCGTAACA TCGGACTTTG CAGCACAAAG CTGAGTGAAG 720

GTAGGACAGG AAAATTGTCG ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TCGCGGGTTT 780

ATTTCTCCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGCAG AGCTGGCATC 840

TTCCATCGGT GTTCCACTTG AATGGAAAGC AGTCGTACAC TTGCCGCTGT GATACAGTGG 900

TGAGTTGCGA AGGCTACGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGGATC ACGGGAGAAA 960

CCGTGGGATA CGCGGTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAAA GTTACTGACA 1020

CAGTAAAAGG AGAACGGGTA TCGTTCCCTG TGTGCACGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG 1080

ATCAGATGAC TGGTCTAATG GCCACGGATA TATCACCTGA CGATGCACAA AAACTTCTGG 1140

TTGGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGC 1200

AAAATTACCT TCTGCCGATC ATAGCACAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG 1260

ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAACG CAAGCTTACG TATGGCTGCT 1320

TGTGGGCGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCACCTGGA ACGCAGACCT 1380

GCGTAAAAGT CCCAGCCTCT TTTAGCGCTT TCCCCATGTC GTCCGTATGG ACGACCTCTT 1440

TGCCCATGTC GCTGAGGCAG AAATTGAAAC TGGCATTGCA ACCAAAGAAG GAGGAAAAAC 1500

TGCTGCAGGT CTCGGAGGAA TTAGTCATGG AGGCCAAGGC TGCTTTTGAG GATGCTCAGG 1560

AGGAAGCCAG AGCGGAGAAG CTCCGAGAAG CACTTCCACC ATTAGTGGCA GACAAAGGCA 1620

TCGAGGCAGC CGCAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CCAGGCGGAC ATCGGAGCAG 1680

CATTAGTTGA AACCCCGCGC GGTCACGTAA GGATAATACC TCAAGCAAAT GACCGTATGA 1740

TCGGACAGTA TATCGTTGTC TCGCCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTCGCACCAG 1800

CGCACCCGCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGGTACG 1860

CGGTCGAACC ATACGACGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCCGTA CCATGGCCAG 1920

AATTCCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGTACAA CGAAAGAGAG TTTGTGAACC 1980

GCAAACTATA CCACATTGCC ATGCATGGCC CCGCCAAGAA TACAGAAGAG GGGCAGTACA 2040

AGGTTACAAA GGCAGAGCTT GCAGAAACAG AGTACGTGTT TGACGTGGAC AAGAAGCGTT 2100

GCGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTCGGG AGAACTGACC AACCCTCCCT 2160

ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGACTGAAGA CCCGACCTGC GGTCCCGTAC AAGGTCGAAA 2220

CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGGTCGG GCAAGTCCGC TATTATCAAG TCAACTGTCA 2280

CGGCACGAGA TCTTGTTACC AGCGGAAAGA AAGAAAATTG TCGCGAAATT GAGGCCGACG 2340

TGCTAAGACT GAGGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTCGGTT ATGCTCAACG 2400

GATGCCACAA AGCCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAAGC GTTCGCGTGC CACGCAGGAG 2460

CACTACTTGC CTTGATTGCT ATCGTCAGGC CCCGCAAGAA GGTAGTACTA TGCGGAGACC 2520

CCATGCAATG CGGATTCTTC AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAAT CACCCTGAAA 2580

AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTTA 2640

CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAAC CCGTGCAAGA 2700

AGAACATTGA AATCGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCCGAA GCCAGGGGAT ATCATCCTGA 2760

CATGTTTCCG CGGGTGGGTT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA 2820

CAGCCGCGGC CTCACAAGGG CTAACCAGAA AAGGAGTGTA TGCCGTCCGG CAGAAAGTCA 2880

ATGAAAACCC ACTGTACGCG ATCACATCAG AGCATGTGAA CGTGTTGCTC ACCCGCACTG 2940

AGGACAGGCT AGTGTGGAAA ACCTTGCAGG GCGACCCATG GATTAAGCAG CTCACTAACA 3000

TACCTAAAGG AAACTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGGAATAA 3060

TTGCTGCAAT AAACAGCCCC ACTCCCCGTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACGTTT 3120

GCTGGGCGAA AGCATTGGAA CCGATACTAG CCACGGCCGG TATCGTACTT ACCGGTTGCC 3180

AGTGGAGCGA ACTGTTCCCA CAGTTTGCGG ATGACAAACC ACATTCGGCC ATTTACGCCT 3240

TAGACGTAAT TTGCATTAAG TTTTTCGGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC 3300

AGAGCATCCC ACTAACGTAC CATCCCGCCG ATTCAGCGAG GCCGGTAGCT CATTGGGACA 3360

ACAGCCCAGG AACCCGCAAG TATGGGTACG ATCACGCCAT TGCCGCCGAA CTCTCCCGTA 3420

GATTTCCGGT GTTCCAGCTA GCTGGGAAGG GCACACAACT TGATTTGCAG ACGGGGAGAA 3480

CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCACGCCT 3540

TAGCCCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCCG GCCCGGTCGA AAAATTCTTG AACCAGTTCA 3600

AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCCGT AAGAGAATCG 3660

AATGGATCGC CCCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GCTTTCGGGT 3720

TTCCGCCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACTAAA TACAGAAACC 3780

ACCACTTTCA GCAGTGCGAA GACCATGCGG CGACCTTAAA AGCCCTTTCG CGTTCGGCCC 3840

TGAATTGCCT CAACCCAGGA GGCACCCTCG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCCGACCGCA 3900

ACAGTGAGGA CGTAGTCACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC 3960

CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAACTA GACAACAGCC 4020

GTACACGGCA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCGTGAT TTCGTCCGTG TATGAGGGTA 4080

CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCCGTCAT ACCGCACCAA AAGGGAGAAT ATTGCTGACT 4140

GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACGCAGCCA ATCCGCTGGG TAGACCAGGC GAAGGAGTCT 4200

GCCGTGCCAT CTATAAACGT TGGCCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCACG GAGACAGGCA 4260

CCGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGCGGTCGGC CCTGATTTCC 4320

GGAAGCACCC AGAAGCAGAA GCCTTGAAAT TGCTACAAAA CGCCTACCAT GCAGTGGCAG 4380

ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TCGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT 4440

ACGCAGCCGG AAAAGACCGC CTTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGCTAGACA 4500

GAACTGACGC GGACGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG 4560

CGGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG 4620

ATGAGTTAGT ATGGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCAGTACTA 4680

CAAAAGGAAA ATTGTATTCG TACTTCGAAG GCACCAAATT CCATCAAGCA GCAAAAGACA 4740

TGGCGGAGAT AAAGGTCCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCCT 4800

ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCCGGTCGAC CATAACCCGT 4860

CGTCTAGCCC GCCCAAAACG TTGCCGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG 4920

TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCTTC 4980

CTAAGCACAA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGCAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC 5040

CGCACACTCC CGCATTCGTT CCCGCCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG 5100

CTCCTCCTGC ACAGGCCGAG GAGGCCCCCG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG 5160

CTGATAACAC CTCGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG 5220

GCTCACTTTT TTCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT 5280

CGTCAGGACC TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGACGTTC 5340

ATGCCGTCCA TGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCCTGG 5400

CAGCGGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT 5460

CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCCCTCGGAT CAATTTTCGA CGGAGAGACG GCCCGCCAGG 5520

CAGCGGTACA ACCCCCTGGCA ACAGGCCCCA CGGATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT 5580

CCGACGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGCAACTGA GTCCGAACCC GTCCTGTTTG 5640

GATCATTTGA ACCGGGCGAA GTGAACTCAA TTATATCGTC CCGATCAGCC GTATCTTTTC 5700

CACTACGCAA GCAGAGACGT AGACGCAGGA GCAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG 5760

TAGGTGGGTA CATATTTTCG ACGGACACAG GCCCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCCGTTC 5820

TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCGCAATGT CCTGGAAAGA ATTCATGCCC 5880

CGGTGCTCGA CACGTCGAAA GAGGAACAAC TCAAACTCAG GTACCAGATG ATGCCCACCG 5940

AAGCCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG 6000

AGCGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA 6060

AGATCACCTA TCCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGCGTACC GGCGAACTAC TCCGATCCAC 6120

AGTTCGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCCGACA GTAGCATCTT 6180

ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTCGCCTGCC 6240

TGGATACTGC AACCTTCTGC CCCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCCGAAAAAA CATGAGTATA 6300

GAGCCCCGAA TATCCGCAGT GCGGTTCCAT CAGCGATGCA GAACACGCTA CAAAATGTGC 6360

TCATTGCCGC AACTAAAAGA AATTGCAACG TCACGCAGAT GCGTGAACTG CCAACACTGG 6420

ACTCAGCGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG 6480

AGGAGTTCGC TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTCACCGCA TATGTAGCTA 6540

GACTGAAAGG CCCTAAGGCC GCCACACTAT TTGCAAAGAC GTATAATTTG GTCCCATTGC 6600

AAGAAGTGCC TATGGATAGA TTCGTCATGG ACATGAAAAG AGACGTGAAA GTTACACCAG 6660

GCACGAAACA CACAGAAGAA AGACCGAAAG TACAAGTGAT ACAAGCCGCA GAACCCCTGG 6720

CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACCGGG AATTAGTGCG TAGGCTTACG GCCGTCTTGC 6780

TTCCAAACAT TCACACGCTT TTTGACATGT CGGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG 6840

AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC 6900

AAGACGACGC TATGGCGTTA ACCGGTCTGA TGATCTTGGA GGACCTGGGT GTGGATCAAC 6960

CACTACTCGA CTTGATCGAG TGCGCCTTTG GAGAAATATC ATCCACCCAT CTACCTACGG 7020

GTACTCGTTT TAAATTCGGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCCTCACA CTTTTTGTCA 7080

ACACAGTTTT GAATGTCGTT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGTCCA 7140

GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA 7200

TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTTAA GATCATCGAC GCAGTCATCG 7260

GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGCGGCGGAT TTATCTTGCA AGATTCGGTT ACTTCCACAG 7320

CGTGCCGCGT GGCGGATCCC CTGAAAAGGC TGTTTAAGTT GGGTAAACCG CTCCCAGCCG 7380

ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAAACAAAG GCGTGGTTTA 7440

GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA 7500

TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA 7560

TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTCAT 7620

CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC 7680

GCCCCTTCCC GGCCCCCACT GCCATGTGGA GGCCGCGGAG AAGGAGGCAG GCGGCCCCGA 7740

TGCCTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC 7800

TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCCACGTCC ACGCCCGCCA CCGCGCCAGA 7860

AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAAACGCAG GAGAAGAAGA 7920

AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG 7980

CCGACAGATT GTTCGACGTC AAGAACGAGG ACGGAGATGT CATCGGGCAC GCACTGGCCA 8040

TGGAAGGAAA GGTAATGAAA CCTCTGCACG TGAAAGGAAC CATCGACCAC CCTGTGCTAT 8100

CAAAGCTCAA ATTTACCAAG TCGTCAGCAT ACGACATGGA GTTCGCACAG TTGCCAGTCA 8160

ACATGAGAAG TGAGGCATTC ACCTACACCA GTGAACACCC CGAAGGATTC TATAACTGGC 8220

ACCACGGAGC GGTGCAGTAT AGTGGAGGTA GATTTACCAT CCCTCGCGGA GTAGGAGGCA 8280

GAGGAGACAG CGGTCGTCCG ATCATGGATA ACTCCGGTCG GGTTGTCGCG ATAGTCCTCG 8340

GTGGCGCTGA TGAAGGAACA CGAACTGCCC TTTCGGTCGT CACCTGGAAT AGTAAAGGGA 8400

AGACAATTAA GACGACCCCG GAAGGGACAG AAGAGTGGTC CGCAGCACCA CTGGTCACGG 8460

CAATGTGTTT GCTCGGAAAT GTGAGCTTCC CATGCGACCG CCCGCCCACA TGCTATACCC 8520

GCGAACCTTC CAGAGCCCTC GACATCCTTG AAGAGAACGT GAACCATGAG GCCTACGATA 8580

CCCTGCTCAA TGCCATATTG CGGTGCGGAT CGTCTGGCAG AAGCAAAAGA AGCGTCGTTG 8640

ACGACTTTAC CCTGACCAGC CCCTACTTGG GCACATGCTC GTACTGCCAC CATACTGAAC 8700

CGTGCTTCAG CCCTGTTAAG ATCGAGCAGG TCTGGGACGA AGCGGACGAT AACACCATAC 8760

GCATACAGAC TTCCGCCCAG TTTGGATACG ACCAAAGCGG AGCAGCAAGC GCAAACAAGT 8820

ACCGCTACAT GTCGCTTAAG CAGGATCACA CCGTTAAAGA AGGCACCATG GATGACATCA 8880

AGATTAGCAC CTCAGGACCG TGTAGAAGGC TTAGCTACAA AGGATACTTT CTCCTCGCAA 8940

AATGCCCTCC AGGGGACAGC GTAACGGTTA GCATAGTGAG TAGCAACTCA GCAACGTCAT 9000

GTACACTGGC CCGCAAGATA AAACCAAAAT TCGTGGGACG GGAAAAATAT GATCTACCTC 9060

CCGTTCACGG TAAAAGAATT CCTTGCACAG TGTACGACCG TCTGAAAACA ACTGCAGGCT 9120

ACATCACTAT GCACAGGCCG GGACCGCACG CTTATACATC CTACCTGGAA GAATCATCAG 9180

GGAAAGTTTA CGCAAAGCCG CCATCTGGGA AGAACATTAC GTATGAGTGC AAGTGCGGCG 9240

ACTACAAGAC CGGAACCGTT TCGACCCGCA CCGAAATCAC TGGTTGCACC GCCATCAAGC 9300

AGTGCGTCGC CTATAAGAGC GACCAAACGA AGTGGGTCTT CAACTCACCG GACTTGATCA 9360

GACATGACGA CCACACGGCC CAAGGGAAAT TGCATTTGCC TTTCAAGTTG ATCCCGGGTG 9420

CCTGCATGGT CCCTGTTGCC CACGCGCCGA ATGTAATACA TGGCTTTAAA CACATCAGCC 9480

TCCAATTAGA TACAGACCAC TTGACATTGC TCACCACCAG GAGACTAGGG GCAAACCCGG 9540

AACCAACCAC TGAATGGATC GTCGGAAAGA CGGTCAGAAA CTTCACCGTC GACCGAGATG 9600

GCCTGGAATA CATATGGGGA AATCATGAGC CAGTGAGGGT CTATGCCCAA GAGTCAGCAC 9660

CAGGAGACCC TCACGGATGG CCACACGAAA TAGTACAGCA TTACTACCAT CGCCATCCTG 9720

TGTACACCAT CTTAGCCGTC GCATCAGCTA CCGTGGCGAT GATGATTGGC GTAACTGTTG 9780

CAGTGTTATG TGCCTGTAAA GCGCGCCGTG AGTGCCTGAC GCCATACGCC CTGGCCCCAA 9840

ACGCCGTAAT CCCAACTTCG CTGGCACTCT TGTGCTGCGT TAGGTCGGCC AATGCTGAAA 9900

CGTTCACCGA GACCATGAGT TACTTGTGGT CGAACAGTCA GCCGTTCTTC TGGGTCCAGT 9960

TGTGCATACC TTTGGCCGCG TTCATCGTTC TAATGCGCTA CTGCTCCTGC TGCCTGCCTT 10020

TTTTAGTGGT TGCCGGCGCC TACCTGGCGA AGGTAGACGC CTACGAACAT GCGACCACTG 10080

TTCCAAATGT GCCACAGATA CCGTATAAGG CACTTGTTGA AAGGGCAGGG TATGCCCCGC 10140

TCAATTTGGA GATCACTGTC ATGTCCTCGG AGGTTTTGCC TTCCACCAAC CAAGAGTACA 10200

TTACCTGCAA ATTCACCACT GTGGTCCCCT CCCCAAAAAT CAAATGCTGC GGCTCCTTGG 10260

AATGTCAGCC GGCCGCTCAT GCAGACTATA CCTGCAAGGT CTTCGGAGGG GTCTACCCCT 10320

TTATGTGGGG AGGAGCGCAA TGTTTTTGCG ACAGTGAGAA CAGCCAGATG AGTGAGGCGT 10380

ACGTCGAATT GTCAGCAGAT TGCGCGTCTG ACCACGCGCA GGCGATTAAG GTGCACACTG 10440

CCGCGATGAA AGTAGGACTG CGTATAGTGT ACGGGAACAC TACCAGTTTC CTAGATGTGT 10500

ACGTGAACGG AGTCACACCA GGAACGTCTA AAGACTTGAA AGTCATAGCT GGACCAATTT 10560

CAGCATCGTT TACGCCATTC GATCATAAGG TCGTTATCCA TCGCGGCCTG GTGTACAACT 10620

ATGACTTCCC GGAATATGGA GCGATGAAAC CAGGAGCGTT CGGAGACATT CAAGCTACCT 10680

CCTTGACTAG CAAGGATCTC ATCGCCAGCA CAGACATTAG GCTACTCAAG CCTTCCGCCA 10740

AGAACGTGCA TGTCCCGTAC ACGCAGGCCG CATCAGGATT TGAGATGTGG AAAAACAACT 10800

CAGGCCGCCC ACTGCAGGAA ACCGCACCTT TCGGGTGTAA GATTGCAGTA AATCCGCTCC 10860

GAGCGGTGGA CTGTTCATAC GGGAACATTC CCATTTCTAT TGACATCCCG AACGCTGCCT 10920

TTATCAGGAC ATCAGATGCA CCACTGGTCT CAACAGTCAA ATGTGAAGTC AGTGAGTGCA 10980

CTTATTCAGC AGACTTCGGC GGGATGGCCA CCCTGCAGTA TGTATCCGAC CGCGAAGGTC 11040

AATGCCCCGT ACATTCGCAT TCGAGCACAG CAACTCTCCA AGAGTCGACA GTACATGTCC 11100

TGGAGAAAGG AGCGGTGACA GTACACTTTA GCACCGCGAG TCCACAGGCG AACTTTATCG 11160

TATCGCTGTG TGGGAAGAAG ACAACATGCA ATGCAGAATG TAAACCACCA GCTGACCATA 11220

TCGTGAGCAC CCCGCACAAA AATGACCAAG AATTTCAAGC CGCCATCTCA AAAACATCAT 11280

GGAGTTGGCT GTTTGCCCTT TTCGGCGGCG CCTCGTCGCT ATTAATTATA GGACTTATGA 11340

TTTTTGCTTG CAGCATGATG CTGACTAGCA CACGAAGATG ACCGCTACGC CCCAATGATC 11400

CGACCAGCAA AACTCGATGT ACTTCCGAGG AACTGATGTG CATAATGCAT CAGGCTGGTA 11460

CATTAGATCC CCGCTTACCG CGGGCAATAT AGCAACACTA AAAACTCGAT GTACTTCCGA 11520

GGAAGCGCAG TGCATAATGC TGCGCAGTGT TGCCACATAA CCACTATATT AACCATTTAT 11580

CTAGCGGACG CCAAAAACTC AATGTATTTC TGAGGAAGCG TGGTGCATAA TGCCACGCAG 11640

CGTCTGCATA ACTTTTATTA TTTCTTTTAT TAATCAACAA AATTTTGTTT TTAACATTTC 11700

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAATCTAG AGGGCCCTAT TCTATAGTGT CACCTAAATG 11760

CTAGAGCTCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC 11820

CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA 11880

ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG 11940

GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG 12000

GCTCTATGGC TTCTGAGGCG GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT CCCCACGCGC 12060

CCTGTAGCGG CGCATTAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC 12120

TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC GCCACGTTCG 12180

CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GCATCCCTTT AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT 12240

TACGGCACCT CGACCCCAAA AAACTTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC 12300

CCTGATAGAC GGTTTTTCGC CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT 12360

TGTTCCAAAC TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA 12420

TTTTGGGGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA 12480

ATTAATTCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGGCAG 12540

GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG 12600

GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC 12660

CGCCCCTAAC TCCGCCCATC CCGCCCCTAA CTCCGCCCAG TTCCGCCCAT TCTCCGCCCC 12720

ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCTGCC TCTGAGCTAT 12780

TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTCCCGGGAG 12840

CTTGTATATC CATTTTCGGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTTT CGCATGATTG 12900

AACAAGATGG ATTGCACGCA GGTTCTCCGG CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG 12960

ACTGGGCACA ACAGACAATC GGCTGCTCTG ATGCCGCCGT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG 13020

GGCGCCCGGT TCTTTTTGTC AAGACCGACC TGTCCGGTGC CCTGAATGAA CTGCAGGACG 13080

AGGCAGCGCG GCTATCGTGG CTGGCCACGA CGGGCGTTCC TTGCGCAGCT GTGCTCGACG 13140

TTGTCACTGA AGCGGGAAGG GACTGGCTGC TATTGGGCGA AGTGCCGGGG CAGGATCTCC 13200

TGTCATCTCA CCTTGCTCCT GCCGAGAAAG TATCCATCAT GGCTGATGCA ATGCGGCGGC 13260

TGCATACGCT TGATCCGGCT ACCTGCCCAT TCGACCACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC 13320

GAGCACGTAC TCGGATGGAA GCCGGTCTTG TCGATCAGGA TGATCTGGAC GAAGAGCATC 13380

AGGGGCTCGC GCCAGCCGAA CTGTTCGCCA GGCTCAAGGC GCGCATGCCC GACGGCGAGG 13440

ATCTCGTCGT GACCCATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT 13500

TTTCTGGATT CATCGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT 13560

TGGCTACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GCGGCGAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC 13620

TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTCGCAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT 13680

TCTTCTGAGC GGGACTCTGG GGTTCGAAAT GACCGACCAA GCGACGCCCA ACCTGCCATC 13740

ACGAGATTTC GATTCCACCG CCGCCTTCTA TGAAAGGTTG GGCTTCGGAA TCGTTTTCCG 13800

GGACGCCGGC TGGATGATCC TCCAGCGCGG GGATCTCATG CTGGAGTTCT TGCGCCACCC 13860

CAACTTGTTT ATTGCAGCTT ATAATGGTTA CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTCAC 13920

AAATAAAGCA TTTTTTTCAC TGCATTCTAG TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC 13980

TTATCATGTC TGTATACCGT CGACCTCTAG CTAGAGCTTG CGGTAATCAT GGTCATAGCT 14040

GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT 14100

AAAGTGTAAA GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC ACATTAATTG CGTTGCGCTC 14160

ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG 14220

CGCGGGGAGA GGCGGTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT 14280

GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT 14340

ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC 14400

CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA 14460

GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA 14520

CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC 14580

CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCACGCTG 14640

TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC 14700

CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG 14760

ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT 14820

AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT 14880

ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG 14940

ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC 15000

GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA 15060

GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC 15120

CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC 15180

TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT 15240

TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT 15300

ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT 15360

ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC 15420

CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA 15480

TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG 15540

TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT 15600

GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC 15660

AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT 15720

AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG 15780

GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC 15840

TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTC TTCGGGGCGA AAACTCTCAA GGATCTTACC 15900

GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT 15960

TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAAGGG 16020

AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG 16080

CATTTATCAG GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA 16140

ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCG ACGGATCGGG 16200

AGATCTAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA GCTTAAGTAA CGCCATTTTG 16260

CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAAT AGAGAAGTTC AGATCAAGGT CAGGAACAGA 16320

TGGAACAGCT GAATATGGGC CAAACAGGAT ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC 16380

AGGGCCAAGA ACAGATGGAA CAGCTGAATA TGGGCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG 16440

TTCCTGCCCC GGCTCAGGGC CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATGCGGTCCA GCCCTCAGCA 16500

GTTTCTAGAG AACCATCAGA TGTTTCCAGG GTGCCCCAAG GACCTGAAAT GACCCTGTGC 16560

CTTATTTGAA CTAACCAATC AGTTCGCTTC TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT CTGCTCCCCG 16620

AGCTCAATAA AAGAGCCCAC AACCCCTCAC TCGGGG 16656

Patenttivaatimukset

1. Alfa-virusvektorirakenne, jossa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA-synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekevnssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virus liitosalue, joak on inaktivoitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio estetään, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi .

2. Alfa-virusvektorirakenne, jossa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA-synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekevnssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virus liitosalue, joka on mofioitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio vähenee, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi .

3. Alfa-virusvektorirakenne, jossa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA-synteesin in vitro cDNA:sta, 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekvenssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virus liitosalue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio estetään, toinen virus liitosalue, joka on mofioitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio vähenee, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi.

4. Alfa-virusvektorirakenne, jossa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA-synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekevnssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virus liitosalue, joka on joko aktiivinen tai on inaktivoitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio estetään, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription terminaatiota.

5. Alfa-virusvektorirakenne, jossa on 5'-promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA-synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekevnssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, virus liitosalue, joka on modifioitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio vähenee, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription terminaatiota.

6. Alfa-virusvektorirakenne, jossa on promoottori, joka kykenee aloittamaan virus-RNA-synteesin cDNA:sta, jonka jälkeen 5'-sekvenssi, joka kykenee aloittamaan alfa-viruksen transkription, nukleotidisekevnssi, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja, ensimmäinen virus liitosalue, joka on inaktivoitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio estetään, jonka jälkeen toinen virus liitosalue, joka on modifioitu siten, että subgenomisen fagmentin virus-transkriptio vähenee, ja alfa-virus RNA-polymeraasin tunnistussekvenssi ja 3'-sekvenssi, joka kontrolloi transkription terminaatiota.

7. Patenttivaatimusten 1-6 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu alfa-virus valitaan ryhmästä, joka koostuu Aura:sta, Venezuelan Equine Encephalitis:sta, Ross River:stä, Semliki Forest viruksesta ja Mayaro:sta.

8. Patenttivaatimusten 1-6 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu alfa-virus on Sindbis-virus.

9. Patenttivaatimusten 1-6 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu vektorirakenne sisältää heterologisen sekvenssin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainitussa vektorirakenteessa on heterologinen nukleotidisekvenssi, joka on suurempi kuin 100 emästä.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainitussa vektorirakenteessa on heterologinen nukleotidisekvenssi, joka on suurempi kuin 3 kb.

12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainitussa vektorirakenteessa on heterologinen nukleotidisekvenssi, joka on suurempi kuin 5 kb.

13. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainitussa vektorirakenteessa on heterologinen nukleotidisekvenssi, joka on suurempi kuin 8 kb.

14. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu valittu heterologinen sekvenssi on sekvenssi, joka koodaa proteiinia, joka valitaan ryhmästä, jossa on IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, γ-IFN, G-CSF ja GM-CSF.

15. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu valittu heterologinen sekvenssi saadaan viruksesta, joka on valittu ryhmästä, jossa on influenssavirus, HPV, HBV, HCV, EBV, HIV, HSVja CMV.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että heterologinen sekvenssi, joka on saatu HPV:stä, valitaan ryhmästä, jossa on E5, E6, E7 ja L1.

17. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu valittu heterologinen sekvenssi koodaa HIV-proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu HIV gp 120:stä ja gag:stä.

18. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu valittu heterologinen sekvenssi on antisense- tai ribozyymisekvenssi.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu antisensesekvenssi on valittu ryhmästä, joka koostuu sekvenssesitä, jotka koodaavat influenssavirusta, HPV:tä, HBV:tä, HCV:tä, EBV:tä, HIV:ä, HSV:tä ja CMV:tä.

20. Patenttivaatimusten 1-6 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainitussa vektorirakenteessa ei ole alfa-viruksen rakenneproteiineja.

21. Patenttivaatimuksen 1, 2, 4 tai 5 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että valittu heterologinen sijaitsee mainitusta virusliitosalueesta myötävirtaan.

22. Patenttivaatimuksen 3 tai 6 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että valittu heterologinen sekvenssi sijaitsee mainitusta virusliitosalueesta myötävirtaan.

23. Patenttivaatimuksen 21 mukainen vektorirakenne, jossa on lisäksi polykinkkeri, joka sijaitsee seuraavana mainitusta virusliitosalueesta.

24. Patenttivaatimuksen 21 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainitussa polykinkkerissä ei ole vilityypin alfa-viruksen restriktioendonukleaasin tunnistussekvenssiä.

25. Patenttivaatimuksen 9 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu valittu heterologinen sekvenssi sijaitsee mainitussa nukleotidisekvenssissä, joka koodaa alfa-viruksen ei-rakenneproteiineja.

26. Patenttivaatimuksen 1 tai 4 mukainen vektorirakenne, t u n n e t t u siitä, että mainittu virusliitosalue, kostuu nukleotidisekvenssistä kuten kuviossa 1 nähdään, nukleotidinumero 7570 - nukleotidi 7597.

27. Patenttivaatimuksen 3 tai 6 mukainen vektorirakenne, jossa on lisäksi E3 adenovirusgeeni, joka sijaitsee mainitusta toisesta virusliitosalueesta myötävirtaan.

28. Patenttivaatimuksen 3 tai 6 mukainen vektorirakenne, jossa on lisäksi retroviruspakkaussekvenssi, joka sijaitsee mainitun enismmäisen virusliitosalueee ja mainitun toisen virusliitosalueen välissä.

29. Eristetty rekombinantti alfa-virusvektori, jossa ei ole toimivaa virusliitosaluetta.

30. Eristetty rekombinantti alfa-virusvektori, joka tuottaa alentuneen subgenomisen fragmentin virustranskription.

31. Ekspressiokasetti, jossa on promoottori ja yksi tai useampi alfa-viruksen rakenneproteiini, mainitun proteiinin ollessa kykenevä ohjaamaan manitun alfa-viruksen rakenneproteiinien ekspressiota.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen ekspressiokasetti, t u n n e t t u siitä, että mainittu alfa-viruksen rakenneproteiini on alfa-virus kapsidiproteiini.

33. Patenttivaatimuksen 31 mukainen ekspressiokasetti, t u n n e t t u siitä, että mainittu alfa-viruksen rakenneproteiini valitaan ryhmästä, jossa on Sindbis rakenneproteiinit 6K, E3, E2 ja E1.

34. Ekspressiokasetti, jossa on promoottori ja yksi tai useampi alfa-viruksen rakenneproteiini, ja heterologinen ligandisekvenssi, mainitun proteiinin ollessa kykenevä ohjaamaan mainitun alfa-viruksen rakenneproteiinien ja mainitun heterologisen sekvenssin ekspressiota.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen ekspressiokasetti,

t u n n e t t u siitä, että mainittu heterologinen ligandisekvenssi valitaan ryhmästä, jossa on VDVG, HIV gp120 ja CD4.

36. Patenttivaatimuksen 31-35 mukainen ekspressiokasetti, t u n n e t t u siitä, että mainittu promoottori valitaan ryhmästä, jossa on MuLV, MMTV, alfa-virusliitosalue, CMV ja VA1RNA.

37. Alfa-viruspartikkeli, joka sen jälkeen kun se on viety kohdesoluun, tuotta infektoidun solun, joka on elävä ainakin 72 h infektion jälkeen.

38. Kohdesolu, joka alfa-viruspartikkeli-infektion jälkeen on elävä ainakin 72 h infektion jälkeen.

39. Patenttivaatimuksen 1-3 mukainen vektorirakenne, jossa lisäksi on poly-A-häntä.

40. Rekombinantti alfa-viruspartikkeli, joka sen jälkeen kun se on viety kohdesoluun, tuotta infektoidun solun, joka on elävä ainakin 72 h infektion jälkeen mainitussa partikelissa ollen vektorirakenne, joka ohjaa ainkain yhden antigeenin tai sen modifioidun muodon ekspressiota kohdesoluissa, jotka on infektoitu alfa-viruspartikkelilla, mainitun antigeenin tai sen modifioidun muodon ollessa kykenevä stimuloimaan immuunivasteen eläimessä.

41. Patenttivaatimuksen 40 mukainen rekombinanttipartikkeli, t u n n e t t u siitä, että ekspressoitu antigeeni tuo esiin solun välittämän immuunivasteen.

42. Patenttivaatimuksen 40 mukainen rekombinanttipartikkeli, t u n n e t t u siitä, että ekspressoitu antigeeni tuo esiin HLA luokka I-restriktoidun immuunivasteen.

43. Patenttivaatimuksen 40 mukainen rekombinanttipartikkeli, t u n n e t t u siitä, että ekspressoitu antigeeni tuo lisäksi esiin HLA luokka II-restriktoidun immuunivasteen.

44. Rekombinantti alfa-viruspartikkeli, jossa on vektorirakenne, joka kykenee ohjaamaan lievittävän ekspressoitumista soluissa, jotka on infektoitu alfa-viruspartikkelilla, mainitun lievittävän ollessa kykenevä inhiboimaan patogeenisen aineen, joka on tarpeellinen potogeenisyyteen, toiminnan.

45. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-virus partikkeli, t u n n e t t u siitä, että patogeeninen aine on virus ja inhiboitu toiminta valitaan ryhmästä, joka koostuu adsorptiosta, replikaatiosta, geenieksprессiosta, kokoamisesta ja viruksen poistumisesta infektoiduista soluista.

46. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-virus partikkeli, t u n n e t t u siitä, että patogeeninen aine on syöpäsolu tai syöpää tuottava kasvutekijä ja inhiboitu toiminat valitaan ryhmästä, joka koostuu elävyydestä, solureplikaatiosta, ulkoisiin signaaleinin muuttuneesta alttiudesta ja anti-oncogeenien mutatoitujen muotojen tuoton puuttumisesta tai tuottamisesta.

47. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-virus partikkeli, joka ohjaa toksisen lievittävän ekspressiota kohdesoluissa vasteena mainitussa soluissa olevaan itsenäiseen kokonaisuuteen, joka liittyy patogeeniseen aineeseen.

48. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, t u n n e t t u siitä, että lievittävä kykenee selektiivisesti inhiboimaan patogeenisen geenin ekspression.

49. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, t u n n e t t u siitä, että lievittävä kykenee inhiboimaan patogeenisen aineen tuottaman proteiinin aktiivisuuden.

50. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, t u n n e t t u siitä, että lievittävä sisältää antisense RNA:n, joka on komplementaarinen RNA-sekvenssien kanssa, jotka tarvitaan patogeenisyyteen.

51. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, t u n n e t t u siitä, että lievittävä sisältää sense RNA:n, joka on komplementaarinen RNA-sekvenssien kanssa, jotka tarvitaan patogeenisyyteen.

52. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, t u n n e t t u siitä, että lievittävä sisältää åatogeenisen aineen viallisen rakenneproteiinin, mainitun proteiinin ollessa kykenevä inhiboimaan patogeenisen aineen kokoonpano.

53. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-virus partikkeli, joka ohjaa geenituotteen, joka kykenee aktivoimaan muuten inaktiivisen prekursorin aktiiviseksi patogeenisen aineen inhibiittoriksi, ekspressiota.

54. Patenttivaatimuksen 44 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, joka ohjaa herpestymidiinikinaasigeenituotteen ekspressiota.

55. Patenttivaatimuksen 43 mukainen rekombinantti alfa-viruspartikkeli, joka ohjaa RNA-molekyylin, joka toimii ribozyymi-spesifisenä patogeeniselle RNA-molekyylille, ekspressiota.

56. Rekombinantti alfa-viruspartikkeli, joka ohjaa geenin, joka kykenee suprssoimaan yhden tai useamman elementin immuunisysteemissä kohdesoluissa, jotka on infektoitu Sindbisviruksella.

57. Menetelmä stimuloida immuunivaste antigeeniä vastaan, mihin sisältyy että infektoidaan alttiit kohdesolut rekom-

binantti alfa-viruspartikkelilla, joka ohjaa ainakin yhden antigeenin tai siitä modifioidun ekspressiota kohdesoluissa, jotka on infektoitu retroviruksella, mainitun antigeenin tai siitä modifioidun ollessa kykenevä stimuloimaan immuunivasteen eläimessä.

58. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdesolut infektoidaan in vivo.

59. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekspressoitu antigeeni tuo esiin HLA luokka I restriktoidun immuunivasteen.

60. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekspressoitu antigeeni tuo esiin lisäksi HLA luokka II restriktoidun immuunivasteen.

61. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekspressoitu antigeeni on HIV-proteiini tai siitä modifioitu.

62. Patenttivaatimuksen 57 mukainen menetelmä, mihin sisältyy, ennen tai jälkeen kohdesolujen infektiovaiheen nukleiinihappomolekyylillä, joka koodaa joko luokka I tai luokka II MHC-proteiinia tai niiden kombinaatioita, tai proteiinia, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu CD3:sta, ICAM-1:stä, LFA-3:sta tai niiden analogeista.

63. Menetelmä inhiboida patogeeninen aine, mihin sisältyy infektoida alttiit kohdesolut rekombinantti alfa-viruspartikkelilla, joka ohjaa lievityksen ekspressiota soluissa, jotka on infektoitu alfa-viruspartikkelilla mainitun lievityksen ollessa kykenevä inhiboimaan patogeenisen aineen, joka on tarpeellinen patogeenisyydessä, toimintaa.

64. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t-

t u siitä, että patogeeninen aine on syöpäsolu tai syöpää tuottava kasvutekijä ja inhiboitu toiminat valitaan ryhmästä, joka koostuu elävyydestä, solureplikaatiosta, ulkoisiin signaaleinin muuttuneesta alttiudesta ja anti-oncogeenien tuoton puuttumisesta.

65. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Sindbis-partikkeli ohjaa toksisen lievittävän ekspressiota infektoiduissa kohdesoluissa vasteena mainituissa soluissa olevaan itsenäiseen kokonaisuuteen, joka liittyy patogeeniseen aineeseen.

66. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lievittävä koostuu antisense RNA:sta, joka on komplementaarinen RNA-sekvenssien kanssa, jotka tarvitaan patogeenisyyteen.

67. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lievittävä koostuu sense RNA:sta, joka on komplementaarinen RNA-sekvenssien kanssa, jotka tarvitaan patogeenisyyteen.

68. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lievittävä koostuu patogeenisen aineen viallisesta rakenneproteiinista, mainitun proteiinin kyetessä inhiboimaan patogeenisen aineen kokoamista.

69. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Sindbis-partikkeli ohjaa geenituotteen, joka kykenee aktivoimaan muuten inaktiivisen prekursorin aktiiviseksi patogeenisen aineen inhibiittoriksi, ekspressiota.

70. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Sindbis-partikkeli ohjaa herpestymidiinikinaasigeenituotteen ekspressiota.

71. Patenttivaatimuksen 63 mukainen menetelmä, t u n n e t-

t u siitä, että Sindbis-partikkeli ekspressoi raporttituotetta kohdesolujen, jotka on infektoitu Sindbis-partikkelilla, pinnalla, ja joissa on patogeenista ainetta.

72. Menetelmä inhiboida aineen sitoutumista reseptoriin, joka liittyy soluun, mihin sisältyy infektoida alttiit kohdesolut rekombinantti alfa-viruspartikkelilla, joka ohjaa blokkaavan elementin ekspressiota soluissa, jotka on infektoitu mainitulla alfa-viruspartikkelilla, mainitun blokkaavan elementin ollessa kykenevä sitoutumaan joko reseptoriin tai aineeseen, siten että reseptori/aine-vuorovaikutus blokataan.

73. Ex vivo solut, jotka on infektoitu minkä tahansa patenttivaatimuksen 41-57 mukaisella alfa-viruspartikkelilla.

74. Ex vivo solut, jotka on infektoitu alfa-viruspartikkelilla, jossa on retrovirusrakenne.

75. Farmaseuttinen koostumus, missä on minkä tahansa patenttivaatimuksen 41-57 mukainen alfa-viruspartikkeli yhdistelmänä fysiologisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen kanssa.

76. Pakkaussolulinja, joka tuottaa alfa-viruspartikkelin.

77. Nisäkäspakkaussolulinja, joka tuottaa alfa-viruspartikkelin.

78. Ei-nisäkäspakkaussolulinja, joka tuottaa alfa-viruspartikkelin.

79. Hyönteispakkaussolulinja, joka tuottaa alfa-viruspartikkelin.

80. Patenttivaatimuksen 79 mukainen pakkaussolulinja, t u n n e t t u siitä, että mainittu hyönteispakkaussolu on sääskipakkaussolu.

81. Patenttivaatimuksen 80 mukainen pakkaussolulinja, t u n n e t t u siitä, että pakkaussolulinja vektorirakenteen tuomisen jälkeen tuottaa Sindbis-partikekleita, jotka kykenevät infektoimaan ihmissoluja.

82. Retroviruspakkaussolulinja, joka on sopiva pakkaamaan ja tuottamaan alfa-virusvektoria.

83. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 76-82 mukainen pakkaussolulinja, mainitun pakkaussolulinjan koostuessa edelleen ekspressiovektorista, joka kykenee ekspressoimaan Sindbis inhibitorista geeniä.

84. Alfa-virus tuottajasolulinja, joka kykenee tuottamaan rekombinantti alfa-viruspartikkeleita.

85. Eukaryoottinen kerrostettu vektorin aloitussysteemi, jossa on 5'-promoottori, rakenne, joka kykenee ekspressoimaan heterologisen nukleotidisysteemin, joka kykenee replikoimaan solussa joko autonomisesti tai vasteena yhdelle tai useammalle tekijälle, ja transkription lopetussekvenssi.

86. Eukaryoottinen DNA kerrostettu vektorin aloitussysteemi, jossa on 5'-promoottori, rakenne, joka kykenee ekspressoimaan heterologisen RNA-sekvenssin, joka kykenee replikoimaan solussa joko autonomisesti tai vasteena yhdelle tai useammalle tekijälle, ja transkription lopetussekvenssi.

87. Patenttivaatimuksen 85 ja 86 mukainen eukaryoottinen kerrostettu vektorin aloitussysteemi, t u n n e t t u siitä, että mainittu rakenne kykenee ekspressoimaan yhtä tai useampaa heterologista nukleotidisekvenssiä Sindbis cDNA-vektorirakenteessa.

88. Patenttivaatimuksen 85 ja 86 mukainen eukaryoottinen kerrostettu vektorin aloitussysteemi, t u n n e t t u siitä, että mainittu rakenne on virusvektorirakenne, joka on valittu

ryhmästä, jossa on poliovirus, rinovirus, rokkovirus, retrovirus, influenzavirus, adenovirus, adeno-liittynyt virus, herpes virus, SV40-virus, HIV, tuhkarokko, astrovirus, Semliki Forest virus ja coronavirus.

89. Patenttivaatimuksen 85 ja 86 mukainen eukaryoottinen kerrostettu vektorin aloitussysteemi, jossa lisäksi on polyadenylaatiosekvenssi.

90. Menetelmä jakaa heterologista nukleotidisekvenssiä lämminveriselle eläimelle, mihin sisältyy, että annetaan mainitulle lämminveriselle eläimelle minkä tahansa patenttivaatimuksen 85-89 mukainen eukaryoottinen kerrostettu vektorin aloitussysteemi.

FIGURE 1

SINDBIS VIRUS-

GENOMIN JÄRJESTÄYTYMINEN

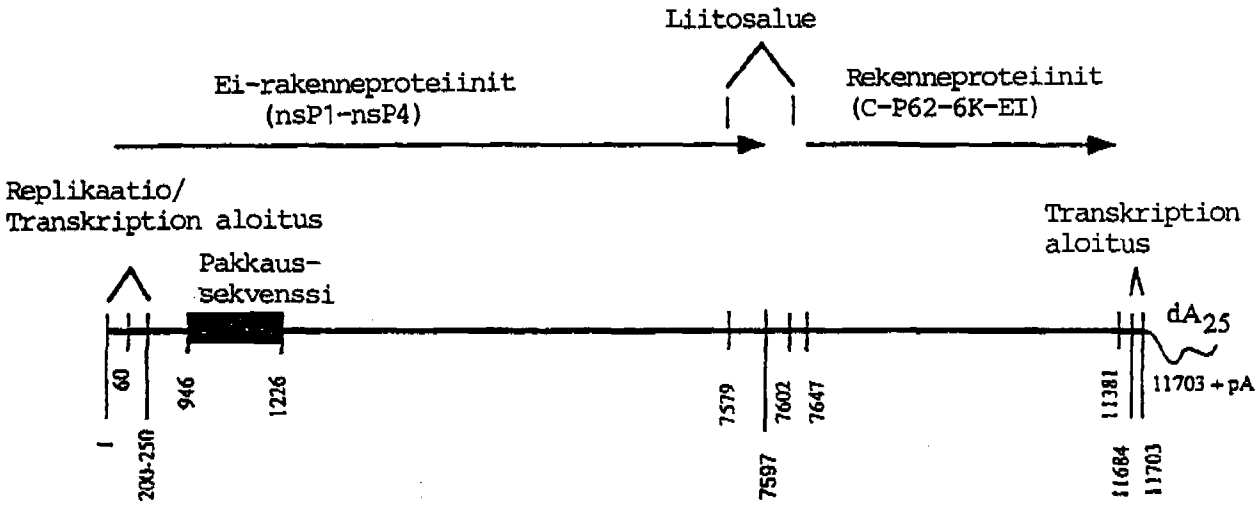


FIGURE 2

SINDBIS-GENOMIN AMPLIFIKAATIO

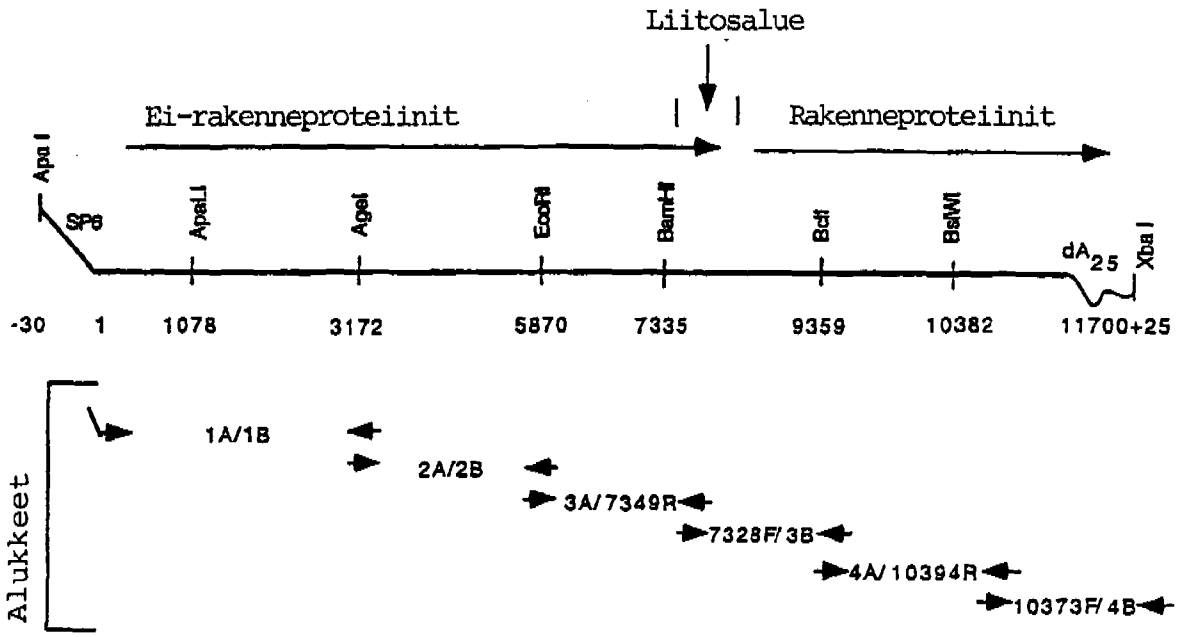


FIGURE 3 A

```
ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATCGCACT ACCATCACAA      60
TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG TCCGTTTGTC GTGCAACTGC     120
AAAAAAGCTT CCCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA     180
ATGCCAGAGC ATTTTCGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG     240
CGACGATCTT GGACATAGGC AGCGCACCGG CTCGTAGAAT GTTTTCCGAG CACCAGTATC     300
ATTGTGTCTG CCCCATGCGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA TATGCCAGTA     360
AACTGGCGGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAAG ATTAAGGATC     420
TCCGGACCGT ACTTGATACG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAACGATG     480
TTACCTGCAA CATGCGTGCC GAATATTCCG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG     540
GAACTATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TGCGGACCCT GTACTGGATT GGCTTCGACA     600
CCACCCAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTCGTACCC TGCGTACAAC ACCAACTGGG     660
CCGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGCGTAACA TCGGACTTTG CAGCACAAAG CTGAGTGAAG     720
GTAGGACAGG AAAATTGTCG ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TCGCGGGTTT     780
ATTTCTCCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGCAG AGCTGGCATC     840
TTCCATCGGT GTTCCACTTG AATGGAAAGC AGTCGTACAC TTGCCGCTGT GATACAGTGG     900
TGAGTTGCGA AGGCTACGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGGATC ACGGGAGAAA     960
CCGTGGGATA CGCGGTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAAA GTTACTGACA    1020
CAGTAAAAGG AGAACGGGTA TCGTTCCCTG TGTGCACGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG    1080
ATCAGATGAC TGGTCTAATG GCCACGGATA TATCACCTGA CGATGCACAA AAACTTCTGG    1140
TTGGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGC    1200
AAAATTACCT TCTGCCGATC ATAGCACAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG    1260
ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAACG CAAGCTTACG TATGGCTGCT    1320
TGTGGGCGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCACCTGGA ACGCAGACCT    1380
GCGTAAAAGT CCCAGCCTCT TTTAGCGCTT TCCCCATGTC GTCCGTATGG ACGACCTCTT    1440
TGCCCATGTC GCTGAGGCAG AAATTGAAAC TGGCATTGCA ACCAAAGAAG GAGGAAAAAC    1500
TGCTGCAGGT CTCGGAGGAA TTAGTCATGG AGGCCAAGGC TGCTTTTGAG GATGCTCAGG    1560
AGGAAGCCAG AGCGGAGAAG CTCCGAGAAG CACTTCCACC ATTAGTGGCA GACAAAGGCA    1620
TCGAGGCAGC CGCAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CCAGGCGGAC ATCGGAGCAG    1680
CATTAGTTGA AACCCCGCGC GGTCACGTAA GGATAATACC TCAAGCAAAT GACCGTATGA    1740
TCGGACAGTA TATCGTTGTC TCGCCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTCGCACCAG    1800
CGCACCCGCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGGTACG    1860
CGGTCGAACC ATACGACGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCCGTA CCATGGCCAG    1920
AATTCCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGTACAA CGAAAGAGAG TTTGTGAACC    1980
GCAAACTATA CCACATTGCC ATGCATGGCC CCGCCAAGAA TACAGAAGAG GGGCAGTACA    2040
AGGTTACAAA GGCAGAGCTT GCAGAAACAG AGTACGTGTT TGACGTGGAC AAGAAGCGTT    2100
GCGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTCGGG AGAACTGACC AACCCTCCCT    2160
ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGACTGAAGA CCCGACCTGC GGTCCCGTAC AAGGTCGAAA    2220
CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGGTCGG GCAAGTCCGC TATTATCAAG TCAACTGTCA    2280
```

FIGURE 3 B

CGGCACGAGA TCTTGTTACC AGCGGAAAGA AAGAAAATTG TCGCGAAATT GAGGCCGACG 2340
TGCTAAGACT GAGGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTCGGTT ATGCTCAACG 2400
GATGCCACAA AGCCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAAGC GTTCGCGTGC CACGCAGGAG 2460
CACTACTTGC CTTGATTGCT ATCGTCAGGC CCCGCAAGAA GGTAGTACTA TGCGGAGACC 2520
CCATGCAATG CGGATTCTTC AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAAT CACCCTGAAA 2580
AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTTA 2640
CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAAC CCGTGCAAGA 2700
AGAACATTGA AATCGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCCGAA GCCAGGGGAT ATCATCCTGA 2760
CATGTTTCCG CGGGTGGGTT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA 2820
CAGCCGCGGC CTCACAAGGG CTAACCAGAA AAGGAGTGTA TGCCGTCCGG CAGAAAGTCA 2880
ATGAAAACCC ACTGTACGCG ATCACATCAG AGCATGTGAA CGTGTTGCTC ACCCGCACTG 2940
AGGACAGGCT AGTGTGGAAA ACCTTGCAGG GCGACCCATG GATTAAGCAG CTCACTAACA 3000
TACCTAAAGG AAACTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGGAATAA 3060
TTGCTGCAAT AAACAGCCCC ACTCCCCGTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACGTTT 3120
GCTGGGCGAA AGCATTGGAA CCGATACTAG CCACGGCCGG TATCGTACTT ACCGGTTGCC 3180
AGTGGAGCGA ACTGTTCCCA CAGTTTGCGG ATGACAAACC ACATTCGGCC ATTTACGCCT 3240
TAGACGTAAT TTGCATTAAG TTTTTCGGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC 3300
AGAGCATCCC ACTAACGTAC CATCCCGCCG ATTCAGCGAG GCCGGTAGCT CATTGGGACA 3360
ACAGCCCAGG AACCCGCAAG TATGGGTACG ATCACGCCAT TGCCGCCGAA CTCTCCCGTA 3420
GATTTCCGGT GTTCCAGCTA GCTGGGAAGG GCACACAACT TGATTTGCAG ACGGGGAGAA 3480
CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCACGCCT 3540
TAGCCCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCCG GCCCGGTCGA AAAATTCTTG AACCAGTTCA 3600
AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCCGT AAGAGAATCG 3660
AATGGATCGC CCCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GCTTTCGGGT 3720
TTCCGCCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACTAAA TACAGAAACC 3780
ACCACTTTCA GCAGTGCGAA GACCATGCGG CGACCTTAAA AGCCCTTTCG CGTTCGGCCC 3840
TGAATTGCCT CAACCCAGGA GGCACCCTCG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCCGACCGCA 3900
ACAGTGAGGA CGTAGTCACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC 3960
CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAACTA GACAACAGCC 4020
GTACACGGCA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCGTGAT TTCGTCCGTG TATGAGGGTA 4080
CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCCGTCAT ACCGCACCAA AAGGGAGAAT ATTGCTGACT 4140
GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACGCAGCCA ATCCGCTGGG TAGACCAGGC GAAGGAGTCT 4200
GCCGTGCCAT CTATAAACGT TGGCCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCACG GAGACAGGCA 4260
CCGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGCGGTCGGC CCTGATTTCC 4320
GGAAGCACCC AGAAGCAGAA GCCTTGAAAT TGCTACAAAA CGCCTACCAT GCAGTGGCAG 4380
ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TCGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT 4440
ACGCAGCCGG AAAAGACCGC CTTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGCTAGACA 4500
GAACTGACGC GGACGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG 4560

FIGURE 3 C

```
CGGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG  4620
ATGAGTTAGT ATGGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCAGTACTA  4680
CAAAAGGAAA ATTGTATTCG TACTTCGAAG GCACCAAATT CCATCAAGCA GCAAAAGACA  4740
TGGCGGAGAT AAAGGTCCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCCT  4800
ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCCGGTCGAC CATAACCCGT  4860
CGTCTAGCCC GCCCAAAACG TTGCCGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG  4920
TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCTTC  4980
CTAAGCACAA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGCAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC  5040
CGCACACTCC CGCATTCGTT CCCGCCCGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG  5100
CTCCTCCTGC ACAGGCCGAG GAGGCCCCCG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG  5160
CTGATAACAC CTCGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG  5220
GCTCACTTTT TTCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT  5280
CGTCAGGACC TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGACGTTC  5340
ATGCCGTCCA TGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCCTGG  5400
CAGCGGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT  5460
CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCCCTCGGAT CAATTTTCGA CGGAGAGACG GCCCGCCAGG  5520
CAGCGGTACA ACCCCTGGCA ACAGGCCCCA CGGATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT  5580
CCGACGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGCAACTGA GTCCGAACCC GTCCTGTTTG  5640
GATCATTTGA ACCGGGCGAA GTGAACTCAA TTATATCGTC CCGATCAGCC GTATCTTTTC  5700
CACTACGCAA GCAGAGACGT AGACGCAGGA GCAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG  5760
TAGGTGGGTA CATATTTTCG ACGGACACAG GCCCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCCGTTC  5820
TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCGCAATGT CCTGGAAAGA ATTCATGCCC  5880
CGGTGCTCGA CACGTCGAAA GAGGAACAAC TCAAACTCAG GTACCAGATG ATGCCCACCG  5940
AAGCCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG  6000
AGCGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA  6060
AGATCACCTA TCCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGCGTACC GGCGAACTAC TCCGATCCAC  6120
AGTTCGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCCGACA GTAGCATCTT  6180
ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTCGCCTGCC  6240
TGGATACTGC AACCTTCTGC CCCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCCGAAAAAA CATGAGTATA  6300
GAGCCCCGAA TATCCGCAGT GCGGTTCCAT CAGCGATGCA GAACACGCTA CAAAATGTGC  6360
TCATTGCCGC AACTAAAAGA AATTGCAACG TCACGCAGAT GCGTGAACTG CCAACACTGG  6420
ACTCAGCGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG  6480
AGGAGTTCGC TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTCACCGCA TATGTAGCTA  6540
GACTGAAAGG CCCTAAGGCC GCCACACTAT TTGCAAAGAC GTATAATTTG GTCCCATTGC  6600
AAGAAGTGCC TATGGATAGA TTCGTCATGG ACATGAAAAG AGACGTGAAA GTTACACCAG  6660
GCACGAAACA CACAGAAGAA AGACCGAAAG TACAAGTGAT ACAAGCCGCA GAACCCCTGG  6720
CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACCGGG AATTAGTGCG TAGGCTTACG GCCGTCTTGC  6780
TTCCAAACAT TCACACGCTT TTTGACATGT CGGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG  6840
```

FIGURE 3 D

```
AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC   6900
AAGACGACGC TATGGCGTTA ACCGGTCTGA TGATCTTGGA GGACCTGGGT GTGGATCAAC   6960
CACTACTCGA CTTGATCGAG TGCGCCTTTG GAGAAATATC ATCCACCCAT CTACCTACGG   7020
GTACTCGTTT TAAATTCGGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCCTCACA CTTTTTGTCA   7080
ACACAGTTTT GAATGTCGTT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGTCCA   7140
GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA   7200
TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTTAA GATCATCGAC GCAGTCATCG   7260
GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGCGGCGGAT TTATCTTGCA AGATTCGGTT ACTTCCACAG   7320
CGTGCCGCGT GGCGGATCCC CTGAAAAGGC TGTTTAAGTT GGGTAAACCG CTCCCAGCCG   7380
ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAAACAAAG GCGTGGTTTA   7440
GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA   7500
TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA   7560
TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTCAT   7620
CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC   7680
GCCCCTTCCC GGCCCCCACT GCCATGTGGA GGCCGCGGAG AAGGAGGCAG GCGGCCCCGA   7740
TGCCTGCCCG CAACGGGCTG GCTTCTCAAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC   7800
TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCCACGTCC ACGCCCGCCA CCGCGCCAGA   7860
AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAAACGCAG GAGAAGAAGA   7920
AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG   7980
CCGACAGATT GTTCGACGTC AAGAACGAGG ACGGAGATGT CATCGGGCAC GCACTGGCCA   8040
TGGAAGGAAA GGTAATGAAA CCTCTGCACG TGAAAGGAAC CATCGACCAC CCTGTGCTAT   8100
CAAAGCTCAA ATTTACCAAG TCGTCAGCAT ACGACATGGA GTTCGCACAG TTGCCAGTCA   8160
ACATGAGAAG TGAGGCATTC ACCTACACCA GTGAACACCC CGAAGGATTC TATAACTGGC   8220
ACCACGGAGC GGTGCAGTAT AGTGGAGGTA GATTTACCAT CCCTCGCGGA GTAGGAGGCA   8280
GAGGAGACAG CGGTCGTCCG ATCATGGATA ACTCCGGTCG GGTTGTCGCG ATAGTCCTCG   8340
GTGGCGCTGA TGAAGGAACA CGAACTGCCC TTTCGGTCGT CACCTGGAAT AGTAAAGGGA   8400
AGACAATTAA GACGACCCCG GAAGGGACAG AAGAGTGGTC CGCAGCACCA CTGGTCACGG   8460
CAATGTGTTT GCTCGGAAAT GTGAGCTTCC CATGCGACCG CCCGCCCACA TGCTATACCC   8520
GCGAACCTTC CAGAGCCCTC GACATCCTTG AAGAGAACGT GAACCATGAG GCCTACGATA   8580
CCCTGCTCAA TGCCATATTG CGGTGCGGAT CGTCTGGCAG AAGCAAAAGA AGCGTCGTTG   8640
ACGACTTTAC CCTGACCAGC CCCTACTTGG GCACATGCTC GTACTGCCAC CATACTGAAC   8700
CGTGCTTCAG CCCTGTTAAG ATCGAGCAGG TCTGGGACGA AGCGGACGAT AACACCATAC   8760
GCATACAGAC TTCCGCCCAG TTTGGATACG ACCAAAGCGG AGCAGCAAGC GCAAACAAGT   8820
ACCGCTACAT GTCGCTTAAG CAGGATCACA CCGTTAAAGA AGGCACCATG GATGACATCA   8880
AGATTAGCAC CTCAGGACCG TGTAGAAGGC TTAGCTACAA AGGATACTTT CTCCTCGCAA   8940
AATGCCCTCC AGGGGACAGC GTAACGGTTA GCATAGTGAG TAGCAACTCA GCAACGTCAT   9000
GTACACTGGC CCGCAAGATA AAACCAAAAT TCGTGGGACG GGAAAAATAT GATCTACCTC   9060
CCGTTCACGG TAAAAGAATT CCTTGCACAG TGTACGACCG TCTGAAAACA ACTGCAGGCT   9120
```

FIGURE 3 E

```
ACATCACTAT GCACAGGCCG GGACCGCACG CTTATACATC CTACCTGGAA GAATCATCAG      9180
GGAAAGTTTA CGCAAAGCCG CCATCTGGGA AGAACATTAC GTATGAGTGC AAGTGCGGCG      9240
ACTACAAGAC CGGAACCGTT TCGACCCGCA CCGAAATCAC TGGTTGCACC GCCATCAAGC      9300
AGTGCGTCGC CTATAAGAGC GACCAAACGA AGTGGGTCTT CAACTCACCG GACTTGATCA      9360
GACATGACGA CCACACGGCC CAAGGGAAAT TGCATTTGCC TTTCAAGTTG ATCCCGGGTG      9420
CCTGCATGGT CCCTGTTGCC CACGCGCCGA ATGTAATACA TGGCTTTAAA CACATCAGCC      9480
TCCAATTAGA TACAGACCAC TTGACATTGC TCACCACCAG GAGACTAGGG GCAAACCCGG      9540
AACCAACCAC TGAATGGATC GTCGGAAAGA CGGTCAGAAA CTTCACCGTC GACCGAGATG      9600
GCCTGGAATA CATATGGGGA AATCATGAGC CAGTGAGGGT CTATGCCCAA GAGTCAGCAC      9660
CAGGAGACCC TCACGGATGG CCACACGAAA TAGTACAGCA TTACTACCAT CGCCATCCTG      9720
TGTACACCAT CTTAGCCGTC GCATCAGCTA CCGTGGCGAT GATGATTGGC GTAACTGTTG      9780
CAGTGTTATG TGCCTGTAAA GCGCGCCGTG AGTGCCTGAC GCCATACGCC CTGGCCCCAA      9840
ACGCCGTAAT CCCAACTTCG CTGGCACTCT TGTGCTGCGT TAGGTCGGCC AATGCTGAAA      9900
CGTTCACCGA GACCATGAGT TACTTGTGGT CGAACAGTCA GCCGTTCTTC TGGGTCCAGT      9960
TGTGCATACC TTTGGCCGCG TTCATCGTTC TAATGCGCTA CTGCTCCTGC TGCCTGCCTT     10020
TTTTAGTGGT TGCCGGCGCC TACCTGGCGA AGGTAGACGC CTACGAACAT GCGACCACTG     10080
TTCCAAATGT GCCACAGATA CCGTATAAGG CACTTGTTGA AAGGGCAGGG TATGCCCCGC     10140
TCAATTTGGA GATCACTGTC ATGTCCTCGG AGGTTTTGCC TTCCACCAAC CAAGAGTACA     10200
TTACCTGCAA ATTCACCACT GTGGTCCCCT CCCCAAAAAT CAAATGCTGC GGCTCCTTGG     10260
AATGTCAGCC GGCCGCTCAT GCAGACTATA CCTGCAAGGT CTTCGGAGGG GTCTACCCCT     10320
TTATGTGGGG AGGAGCGCAA TGTTTTTGCG ACAGTGAGAA CAGCCAGATG AGTGAGGCGT     10380
ACGTCGAATT GTCAGCAGAT TGCGCGTCTG ACCACGCGCA GGCGATTAAG GTGCACACTG     10440
CCGCGATGAA AGTAGGACTG CGTATAGTGT ACGGGAACAC TACCAGTTTC CTAGATGTGT     10500
ACGTGAACGG AGTCACACCA GGAACGTCTA AAGACTTGAA AGTCATAGCT GGACCAATTT     10560
CAGCATCGTT TACGCCATTC GATCATAAGG TCGTTATCCA TCGCGGCCTG GTGTACAACT     10620
ATGACTTCCC GGAATATGGA GCGATGAAAC CAGGAGCGTT CGGAGACATT CAAGCTACCT     10680
CCTTGACTAG CAAGGATCTC ATCGCCAGCA CAGACATTAG GCTACTCAAG CCTTCCGCCA     10740
AGAACGTGCA TGTCCCGTAC ACGCAGGCCG CATCAGGATT TGAGATGTGG AAAAACAACT     10800
CAGGCCGCCC ACTGCAGGAA ACCGCACCTT TCGGGTGTAA GATTGCAGTA AATCCGCTCC     10860
GAGCGGTGGA CTGTTCATAC GGGAACATTC CCATTTCTAT TGACATCCCG AACGCTGCCT     10920
TTATCAGGAC ATCAGATGCA CCACTGGTCT CAACAGTCAA ATGTGAAGTC AGTGAGTGCA     10980
CTTATTCAGC AGACTTCGGC GGGATGGCCA CCCTGCAGTA TGTATCCGAC CGCGAAGGTC     11040
AATGCCCCGT ACATTCGCAT TCGAGCACAG CAACTCTCCA AGAGTCGACA GTACATGTCC     11100
TGGAGAAAGG AGCGGTGACA GTACACTTTA GCACCGCGAG TCCACAGGCG AACTTTATCG     11160
TATCGCTGTG TGGGAAGAAG ACAACATGCA ATGCAGAATG TAAACCACCA GCTGACCATA     11220
TCGTGAGCAC CCCGCACAAA AATGACCAAG AATTTCAAGC CGCCATCTCA AAAACATCAT     11280
GGAGTTGGCT GTTTGCCCTT TTCGGCGGCG CCTCGTCGCT ATTAATTATA GGACTTATGA     11340
TTTTTGCTTG CAGCATGATG CTGACTAGCA CACGAAGATG ACCGCTACGC CCCAATGATC     11400
```

FIGURE 3 F

```
CGACCAGCAA AACTCGATGT ACTTCCGAGG AACTGATGTG CATAATGCAT CAGGCTGGTA    11460
CATTAGATCC CCGCTTACCG CGGGCAATAT AGCAACACTA AAAACTCGAT GTACTTCCGA    11520
GGAAGCGCAG TGCATAATGC TGCGCAGTGT TGCCACATAA CCACTATATT AACCATTTAT    11580
CTAGCGGACG CCAAAAACTC AATGTATTTC TGAGGAAGCG TGGTGCATAA TGCCACGCAG    11640
CGTCTGCATA ACTTTTATTA TTTCTTTTAT TAATCAACAA AATTTTGTTT TTAACATTTC    11700
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAATCTAG AGGGCCCTAT TCTATAGTGT CACCTAAATG    11760
CTAGAGCTCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC    11820
CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA    11880
ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG    11940
GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG    12000
GCTCTATGGC TTCTGAGGCG GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT CCCCACGCGC    12060
CCTGTAGCGG CGCATTAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC    12120
TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC GCCACGTTCG    12180
CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GCATCCCTTT AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT    12240
TACGGCACCT CGACCCCAAA AAACTTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC    12300
CCTGATAGAC GGTTTTTCGC CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT    12360
TGTTCCAAAC TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA    12420
TTTTGGGGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA    12480
ATTAATTCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGGCAG    12540
GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG    12600
GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC    12660
CGCCCCTAAC TCCGCCCATC CCGCCCCTAA CTCCGCCCAG TTCCGCCCAT TCTCCGCCCC    12720
ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCTGCC TCTGAGCTAT    12780
TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTCCCGGGAG    12840
CTTGTATATC CATTTTCGGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTTT CGCATGATTG    12900
AACAAGATGG ATTGCACGCA GGTTCTCCGG CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG    12960
ACTGGGCACA ACAGACAATC GGCTGCTCTG ATGCCGCCGT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG    13020
GGCGCCCGGT TCTTTTTGTC AAGACCGACC TGTCCGGTGC CCTGAATGAA CTGCAGGACG    13080
AGGCAGCGCG GCTATCGTGG CTGGCCACGA CGGGCGTTCC TTGCGCAGCT GTGCTCGACG    13140
TTGTCACTGA AGCGGGAAGG GACTGGCTGC TATTGGGCGA AGTGCCGGGG CAGGATCTCC    13200
TGTCATCTCA CCTTGCTCCT GCCGAGAAAG TATCCATCAT GGCTGATGCA ATGCGGCGGC    13260
TGCATACGCT TGATCCGGCT ACCTGCCCAT TCGACCACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC    13320
GAGCACGTAC TCGGATGGAA GCCGGTCTTG TCGATCAGGA TGATCTGGAC GAAGAGCATC    13380
AGGGGCTCGC GCCAGCCGAA CTGTTCGCCA GGCTCAAGGC GCGCATGCCC GACGGCGAGG    13440
ATCTCGTCGT GACCCATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT    13500
TTTCTGGATT CATCGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT    13560
TGGCTACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG CGGGCGAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC    13620
TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTCGCAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT    13680
```

FIGURE 3 G

TCTTCTGAGC GGGACTCTGG GGTTCGAAAT GACCGACCAA GCGACGCCCA ACCTGCCATC 13740
ACGAGATTTC GATTCCACCG CCGCCTTCTA TGAAAGGTTG GGCTTCGGAA TCGTTTTCCG 13800
GGACGCCGGC TGGATGATCC TCCAGCGCGG GGATCTCATG CTGGAGTTCT TCGCCCACCC 13860
CAACTTGTTT ATTGCAGCTT ATAATGGTTA CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTCAC 13920
AAATAAAGCA TTTTTTTCAC TGCATTCTAG TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC 13980
TTATCATGTC TGTATACCGT CGACCTCTAG CTAGAGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT 14040
GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT 14100
AAAGTGTAAA GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC ACATTAATTG CGTTGCGCTC 14160
ACTGCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAACG 14220
CGCGGGGAGA GGCGGTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT 14280
GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT 14340
ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC 14400
CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA 14460
GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA 14520
CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC 14580
CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCACGCTG 14640
TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC 14700
CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG 14760
ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT 14820
AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT 14880
ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG 14940
ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC 15000
GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA 15060
GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC 15120
CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC 15180
TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT 15240
TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT 15300
ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT 15360
ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC 15420
CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA 15480
TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG 15540
TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT 15600
GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC 15660
AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT 15720
AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG 15780
GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC 15840
TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTC TTCGGGGCGA AAACTCTCAA GGATCTTACC 15900
GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT 15960

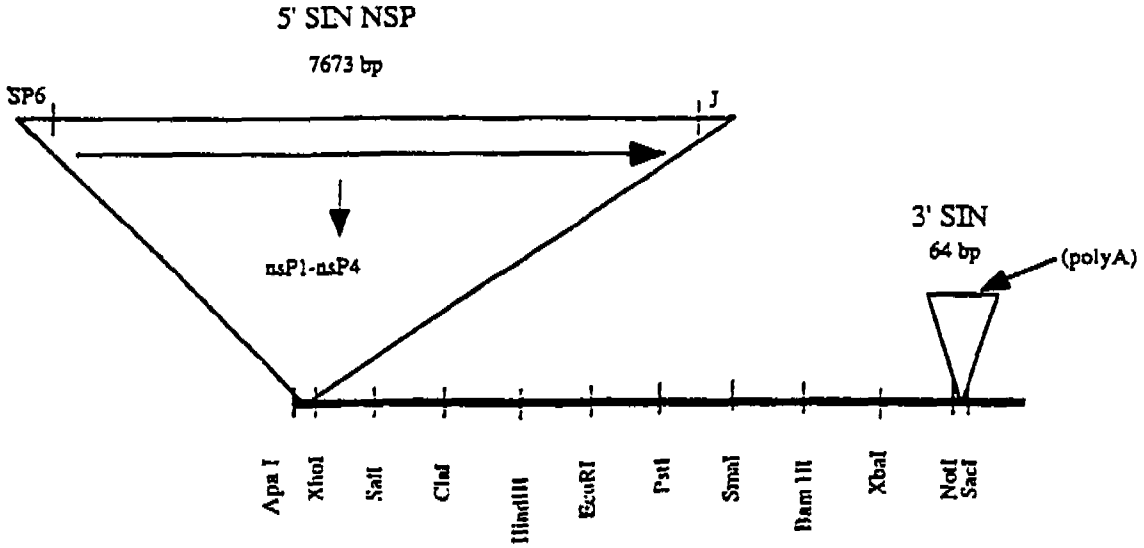
FIGURE 3 H

```
TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAAGGG   16020
AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG   16080
CATTTATCAG GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA   16140
ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCG ACGGATCGGG   16200
AGATCTAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA GCTTAAGTAA CGCCATTTTG   16260
CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAAT AGAGAAGTTC AGATCAAGGT CAGGAACAGA   16320
TGGAACAGCT GAATATGGGC CAAACAGGAT ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC   16380
AGGGCCAAGA ACAGATGGAA CAGCTGAATA TGGGCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG   16440
TTCCTGCCCC GGCTCAGGGC CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATGCGGTCCA GCCCTCAGCA   16500
GTTTCTAGAG AACCATCAGA TGTTTCCAGG GTGCCCCAAG GACCTGAAAT GACCCTGTGC   16560
CTTATTTGAA CTAACCAATC AGTTCGCTTC TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT CTGCTCCCCG   16620
AGCTCAATAA AAGAGCCCAC AACCCCTCAC TCGGGG                              16656
```

FIGURE 4

SINDBIS EKSPRESSIOVEKTORIT

SINDBIS-PERUSVEKTORI



SINDBIS-LUCIFERAASI

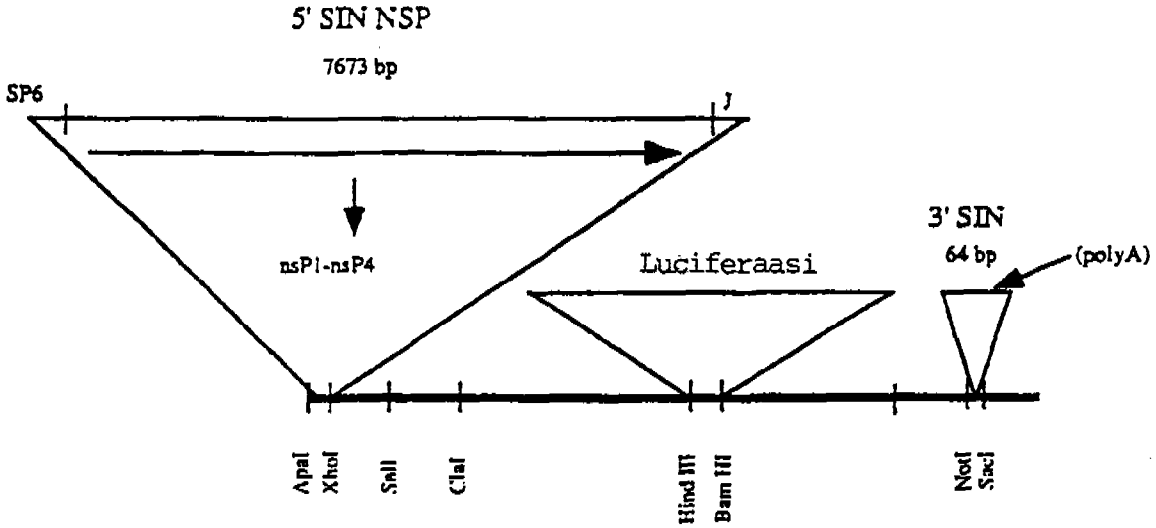
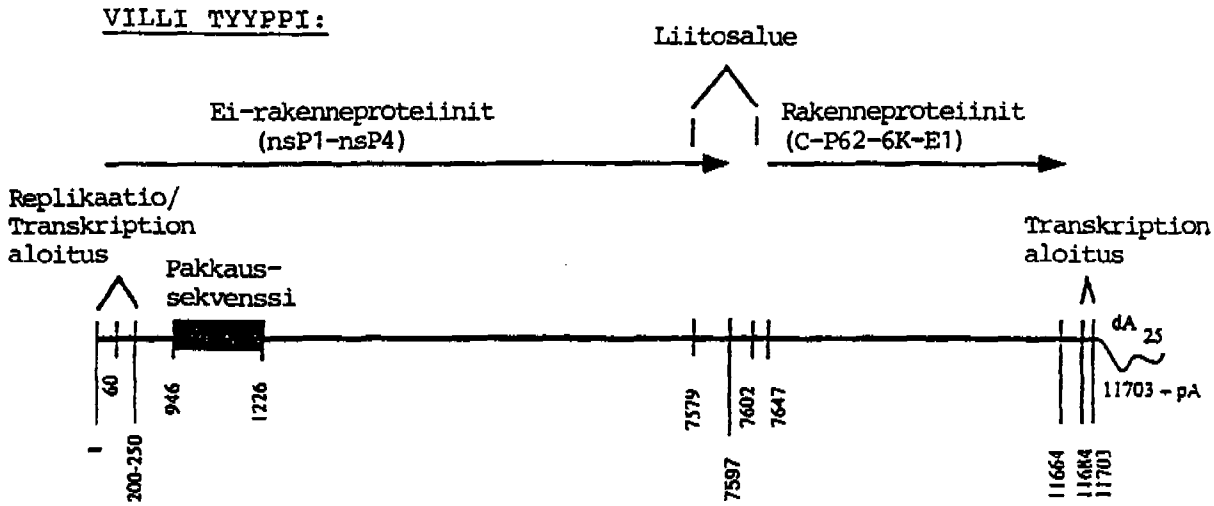


FIGURE 5

SINDBIS AUTTAJA-VEKTORIN RAKENNE



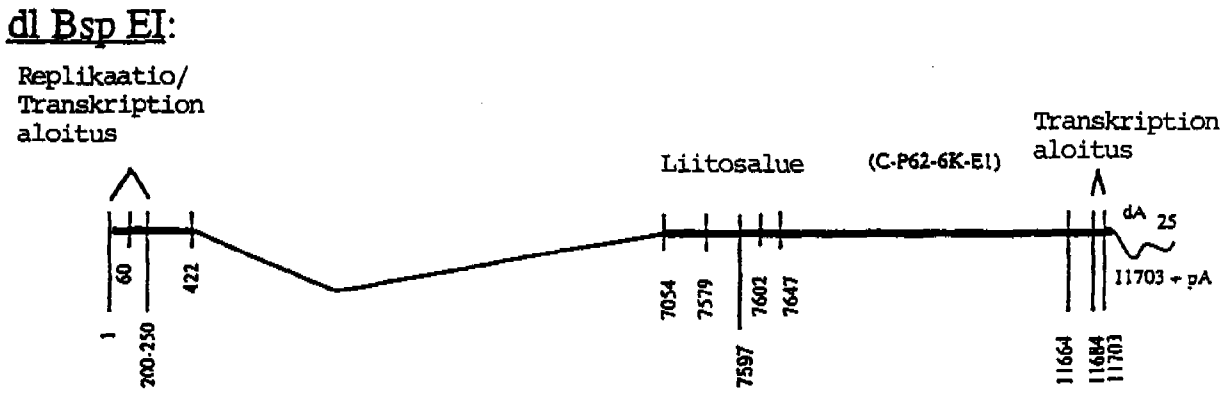


FIGURE 6

SINDBIS-LUCIFERAASI-VEKTORIN EKSPRESSIO
JA VAPAUTUMINEN

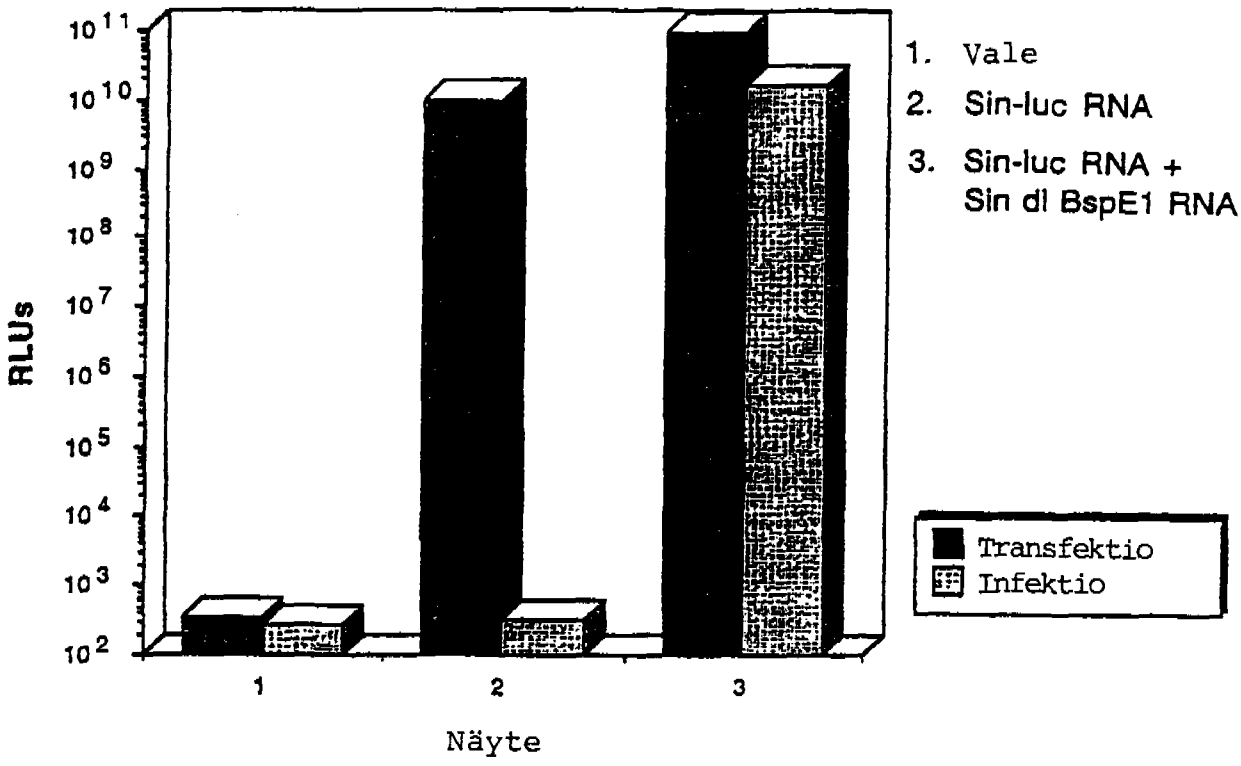
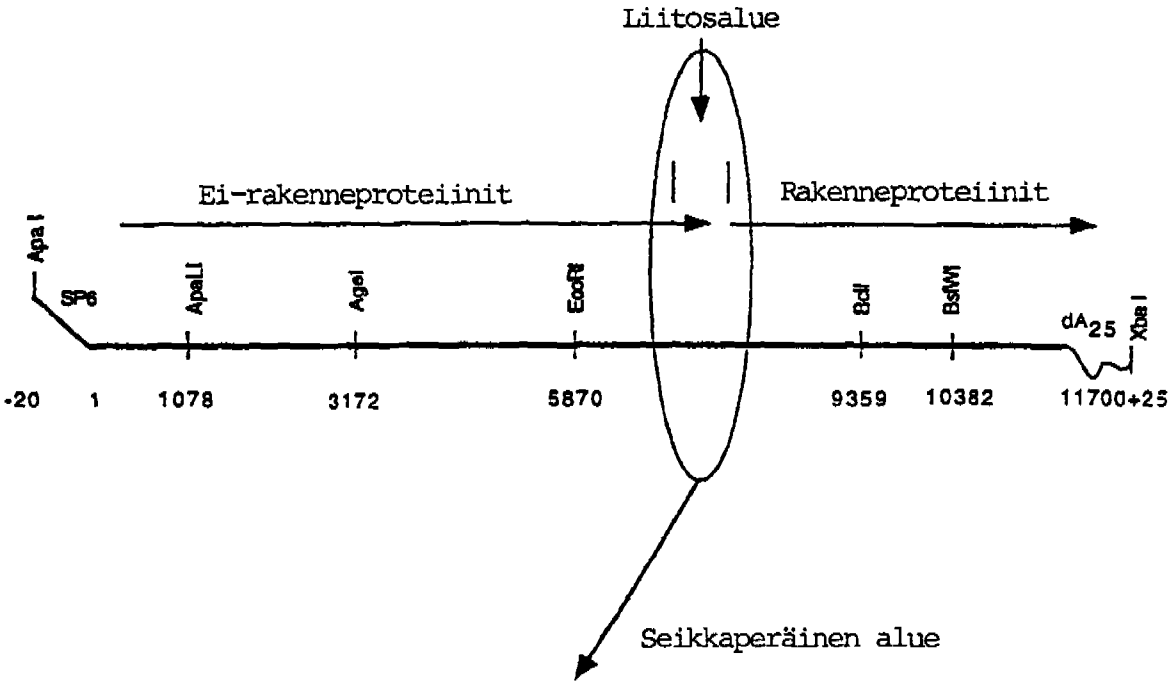


FIGURE 7

SINDBIS LIITOSALUE



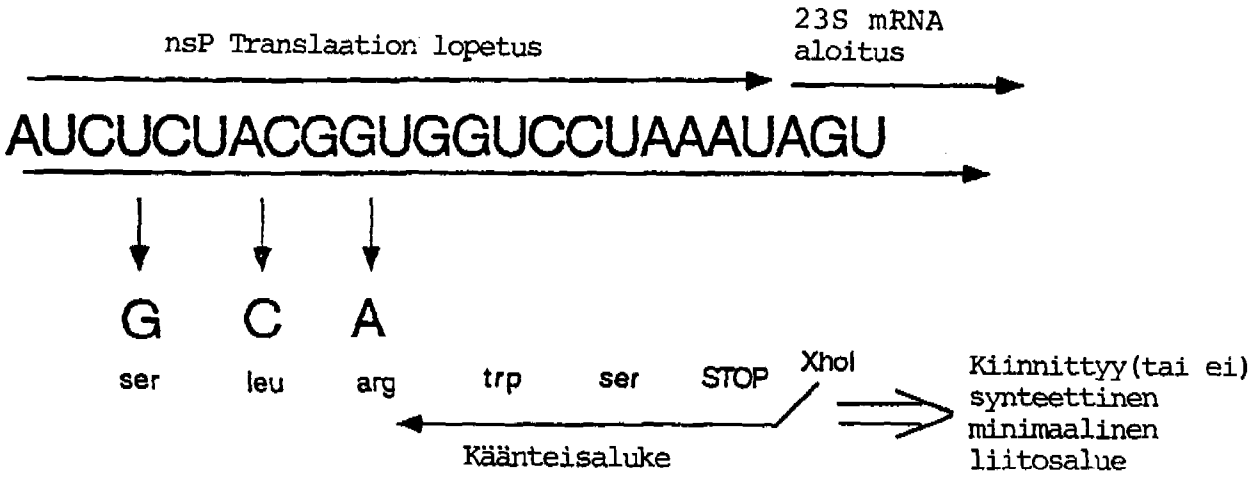


Figure 8

PAKKAUSEKSPRESSIOKASETIT, KAAVAKUVA

pLTR/SIndIBspE (sense)



pCMV/δ5'26S (anti-sense)



Mo-LTR	—	Moloney Mul. VLTR
CMV	—	Sytomegalovirus IE promoottori
BGHpA	—	Transkript.lopetus/poly A signaali
SV40-neo	—	Neomysiiniresistenssi
δ	—	HDV antigenominen ribozyymi
JR	—	liitosalue

FIGURE 9

SINDBIS-LUCIFERAASI-VEKTORIN PAKKAUS
LTR/SINDIBspE-SOLUIHIN

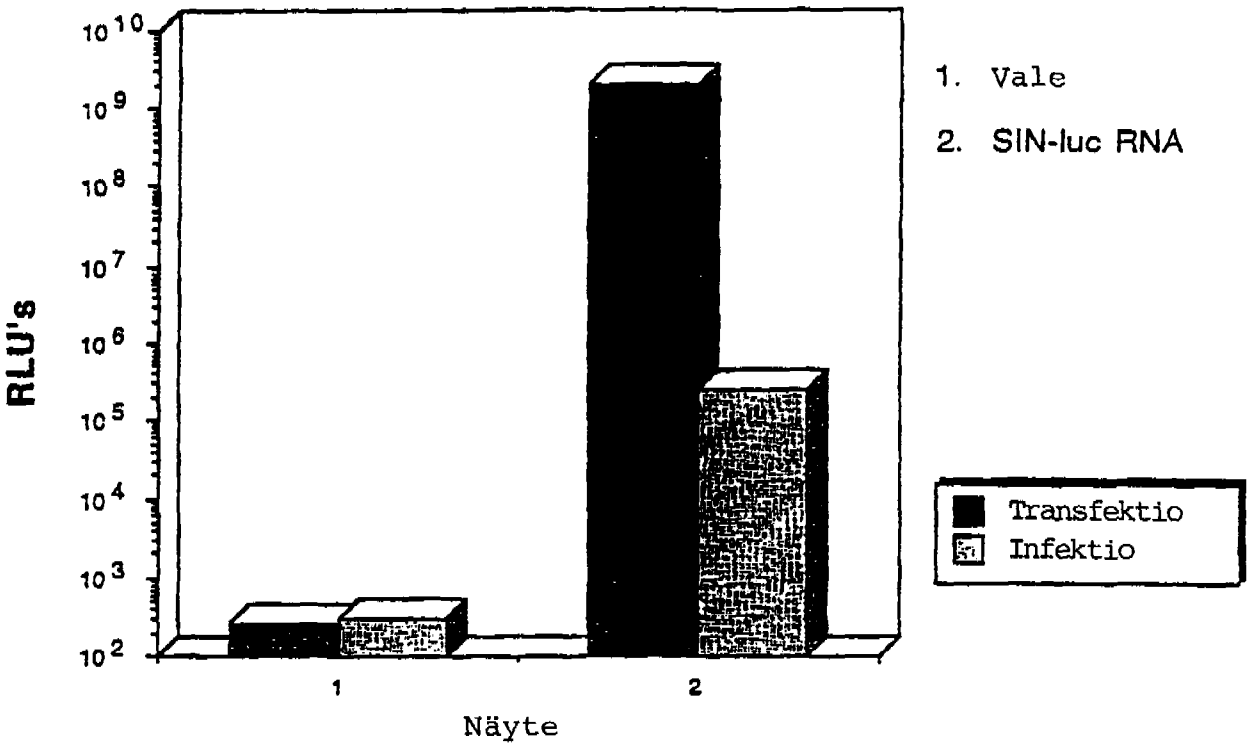


FIGURE 10

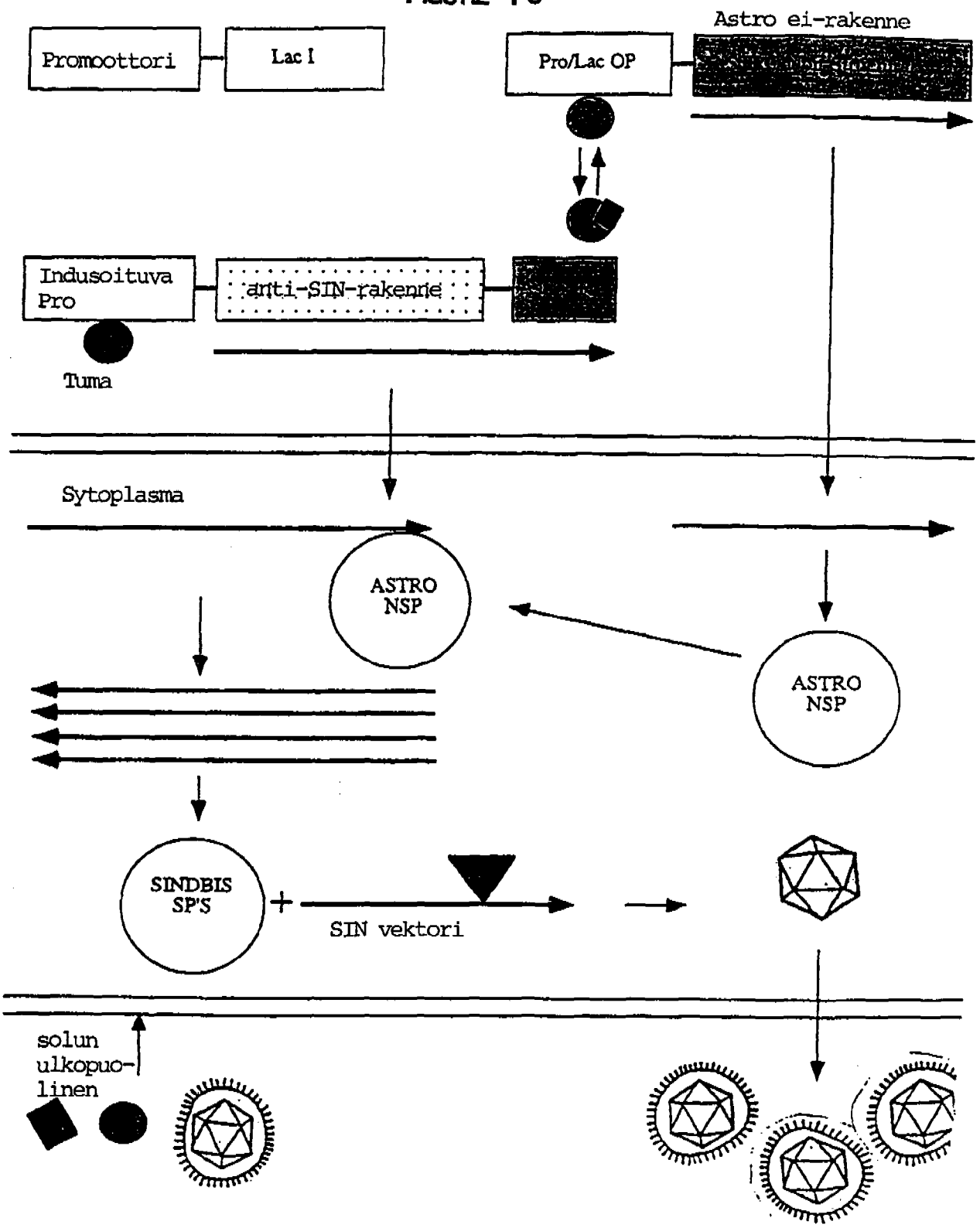

Promoottori
Lac I
Pro/Lac OP
Astro ei-rakenne
Indusoituva Pro
anti-SIN-rakenne
Tuma
Sytoplasma
ASTRO NSP
ASTRO NSP
SINDBIS SP'S
+
SIN vektori
solun ulkopuo-linen

FIGURE 11

KYKENEMÄTÖN LIITOSALUEEN SILMUKOINTI

