

ÖZET**YÜKSEK TİTRELİ VİRÜSÜN HIZLI ÜRETİMİ**

- 5 Buluş kuş hücrelerine replikasyondan yetersiz retroviral bir vektörü kodlayan bir nükleotid dizisinin sokulmasını ve kuş hücrelerine kuş hücre dizisinde işlevsel olan bir başlatıcının kontrolü altında replikasyondan yetersiz retrovirüs vektörünün kopyalanması için gerekli olan ürünleri kodlayan nükleotid dizilerinin sokulmasını ve viral parçacıkların toplanmasını içeren viral parçacıkların üretim yöntemlerini içermektedir.

ÖZET**YÜKSEK TİTRELİ VİRÜSÜN HIZLI ÜRETİMİ**

- 5 Buluş kuş hücrelerine replikasyondan yetersiz retroviral bir vektörü kodlayan bir nükleotid dizisinin sokulmasını ve kuş hücrelerine kuş hücre dizisinde işlevsel olan bir başlatıcının kontrolü altında replikasyondan yetersiz retrovirüs vektörünün kopyalanması için gerekli olan ürünleri kodlayan nükleotid dizilerinin sokulmasını ve viral parçacıkların toplanmasını içeren viral parçacıkların üretim yöntemlerini içermektedir.

İSTEMLER

1. Viral parçacıkların üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:

5 geçici olarak bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür;

geçici olarak DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması;

10 ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir, burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizin(ler)i bir plazmid üzerindedir ve VSV-G'yi kodlayan nükleotid dizin(ler)i başka bir plazmid üzerinde bulunmaktadır; ve burada gag, pol ve VSV-G bir CMV promotörün kontrolü altındadır; ve

viral parçacıkların toplanması.
- 15 2. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği kuş retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizininin DNA olmasıdır.
3. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği replikasyondan yetersiz ALV vektörünün bir plazmidde bulunmasıdır.

20
4. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği her sokma işleminin transfeksiyonla desteklenmesidir.
- 25 5. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği kuş retroviral vektörünün uygulanabilir şekilde bir promotöre bağlanan ekzojen bir protein için bir kodlama dizini içermesidir.
6. İstem 5'e göre yöntem olup, özelliği ekzojen proteinin terapötik bir protein olmasıdır.

30
7. İstem 5'e göre yöntem olup, özelliği ekzojen proteinin bir insan proteini olmasıdır.
8. Bir transjenik kuşun üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:

35

İSTEMLER

1. Viral parçacıkların üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:

5 geçici olarak bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür;

geçici olarak DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması;

10 ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir, burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizin(ler)i bir plazmid üzerindedir ve VSV-G'yi kodlayan nükleotid dizin(ler)i başka bir plazmid üzerinde bulunmaktadır; ve burada gag, pol ve VSV-G bir CMV promotörün kontrolü altındadır; ve

viral parçacıkların toplanması.
- 15 2. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği kuş retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizininin DNA olmasıdır.
3. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği replikasyondan yetersiz ALV vektörünün bir plazmidde bulunmasıdır.

20
4. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği her sokma işleminin transfeksiyonla desteklenmesidir.
- 25 5. İstem 1'e göre yöntem olup, özelliği kuş retroviral vektörünün uygulanabilir şekilde bir promotöre bağlanan ekzojen bir protein için bir kodlama dizini içermesidir.
6. İstem 5'e göre yöntem olup, özelliği ekzojen proteinin terapötik bir protein olmasıdır.

30
7. İstem 5'e göre yöntem olup, özelliği ekzojen proteinin bir insan proteini olmasıdır.
8. Bir transjenik kuşun üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:

35

geçici olarak bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür;

- 5 geçici olarak DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir, burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizin(ler)i bir plazmid üzerinde bulunur ve VSV-G'yi kodlayan nükleotid dizin(ler)i başka bir plazmid üzerinde bulunur, ve burada gag, pol ve VSV-G bir CMV promotörün kontrolü altındadır;
- 10 viral parçacıkların toplanması;
- viral parçacıkların bir kuş embriyo hücresine sokulması;
- ve embriyodan transjenik bir kuşun elde edilmesi.

9. Ekzojen proteininin üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:
- 15

- geçici olarak bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulması, burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür, ve burada kuş retroviral vektörü uygulanabilir şekilde
- 20 bir promotöre bağlanan bir ekzojen proteine yönelik bir kodlama dizini içerir;
- geçici olarak DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir, burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizin(ler)i bir plazmid üzerinde bulunur ve VSV-G'yi kodlayan nükleotid
- 25 dizin(ler)i başka bir plazmid üzerinde bulunur, ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörün kontrolü altındadır;
- viral parçacıkların toplanması;
- viral parçacıkların bir kuş embriyo hücresine sokulması;
- ve embriyodan elde edilen transjenik kuş tarafından yumurtlanan bir yumurtadan
- 30 ekzojen proteinin elde edilmesi.

geçici olarak bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür;

- 5 geçici olarak DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir, burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizin(ler)i bir plazmid üzerinde bulunur ve VSV-G'yi kodlayan nükleotid dizin(ler)i başka bir plazmid üzerinde bulunur, ve burada gag, pol ve VSV-G bir CMV promotörün kontrolü altındadır;
- 10 viral parçacıkların toplanması;
- viral parçacıkların bir kuş embriyo hücresine sokulması;
- ve embriyodan transjenik bir kuşun elde edilmesi.

9. Ekzojen proteininin üretilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları ihtiva etmesidir:
- 15

- geçici olarak bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulması, burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür, ve burada kuş retroviral vektörü uygulanabilir şekilde
- 20 bir promotöre bağlanan bir ekzojen proteine yönelik bir kodlama dizini içerir;
- geçici olarak DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir, burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizin(ler)i bir plazmid üzerinde bulunur ve VSV-G'yi kodlayan nükleotid
- 25 dizin(ler)i başka bir plazmid üzerinde bulunur, ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörün kontrolü altındadır;
- viral parçacıkların toplanması;
- viral parçacıkların bir kuş embriyo hücresine sokulması;
- ve embriyodan elde edilen transjenik kuş tarafından yumurtlanan bir yumurtadan
- 30 ekzojen proteinin elde edilmesi.

Tarifname

YÜKSEK TİTRELİ VİRÜSÜN HIZLI ÜRETİMİ

5 İlgili Başvuru Bilgileri

Mevcut başvuru, 5 Ekim 2005 tarihinde dosyalanan US geçici başvuru No. 60/723,659'dan faydalanmaktadır.

10 Arkaplan

Bu tarifname üreme hücreleri dahil olmak üzere örneğin kuş hücreleri gibi hücreleri kalıt aktarabilen retrovirüslerden viral parçacıkların üretilmesiyle ilgilidir. Özellikle, replikasyondan yetersiz retroviral vektör parçacıkları tarifnameye göre
15 üretilmektedir.

Replikasyondan yetersiz retrovirüsler özellikle gen tedavisi yöntemleri gibi rekombinant metodolojilerde ve örneğin gen aktarımlı kuşlar gibi genetik yapısı değiştirilmiş hayvanların üretiminde faydalıdır. Replikasyondan yetersiz retrovirüsler kullanılarak
20 üretilen özellikte faydalı olan genetik yapısı değiştirilmiş bir hayvan transjenik tavuktur.

Bir kuş hücresinin üretimi yumurta kesesinin üzerinde oluşan döllenmemiş yumurtaya sahip tavuğun yumurtalığında büyük bir yumurtanın oluşmasıyla başlamaktadır.
25 Ovülasyondan sonra, sperm bulunuyorsa yumurta sarısı ve yumurta döllendiği yumurta kanalındaki infundibulumda geçmektedir ve daha sonra boru şekilli bez hücreleriyle kaplanan yumurta kanalının büyük deliğine doğru hareket etmektedir. Bu hücreler ovalbumin, ovomükoid, ovoinhibitör, konalbumin, ovomusin ve lizozim dahil olmak üzere yumurta beyazı proteinlerini kuş embriyosu ve yumurta sarısının üzerinde biriktirildikleri
30 yer olan büyük deliğin lümenine salgılamaktadır. Araştırmacılar içerisinde boru şekilli bez hücrelerinin ekzojen proteini ürettiği ve bunu bir yumurtayı paketlemek için yumurta beyazı proteiniyle birlikte yumurta kanalı lümenine salgıladığı transjenik kuşların üretiminde başarılı olmaktadır. Bakınız örneğin Harvey et al., Nature Biotechnology (2002), cilt 20, sayfalar 396-399 ve 4 Mayıs 2004 tarihinde yayınlanan US Patenti No.
35 6,730,822. Bu sistem heterolog gen ekspresyonu için kullanılan diğer hayvan türleriyle

Tarifname

YÜKSEK TİTRELİ VİRÜSÜN HIZLI ÜRETİMİ

5 İlgili Başvuru Bilgileri

Mevcut başvuru, 5 Ekim 2005 tarihinde dosyalanan US geçici başvuru No. 60/723,659'dan faydalanmaktadır.

10 Arkaplan

Bu tarifname üreme hücreleri dahil olmak üzere örneğin kuş hücreleri gibi hücreleri kalıt aktarabilen retrovirüslerden viral parçacıkların üretilmesiyle ilgilidir. Özellikle, replikasyondan yetersiz retroviral vektör parçacıkları tarifnameye göre
15 üretilmektedir.

Replikasyondan yetersiz retrovirüsler özellikle gen tedavisi yöntemleri gibi rekombinant metodolojilerde ve örneğin gen aktarımlı kuşlar gibi genetik yapısı değiştirilmiş hayvanların üretiminde faydalıdır. Replikasyondan yetersiz retrovirüsler kullanılarak
20 üretilen özellikle faydalı olan genetik yapısı değiştirilmiş bir hayvan transjenik tavuktur.

Bir kuş hücresinin üretimi yumurta kesesinin üzerinde oluşan döllenmemiş yumurtaya sahip tavuğun yumurtalığında büyük bir yumurtanın oluşmasıyla başlamaktadır.
25 Ovülasyondan sonra, sperm bulunuyorsa yumurta sarısı ve yumurta döllendiği yumurta kanalındaki infundibulumda geçmektedir ve daha sonra boru şekilli bez hücreleriyle kaplanan yumurta kanalının büyük deliğine doğru hareket etmektedir. Bu hücreler ovalbumin, ovomükoid, ovoinhibitör, konalbumin, ovomusin ve lizozim dahil olmak üzere yumurta beyazı proteinlerini kuş embriyosu ve yumurta sarısının üzerinde biriktirildikleri
30 yer olan büyük deliğin lümenine salgılamaktadır. Araştırmacılar içerisinde boru şekilli bez hücrelerinin ekzojen proteini ürettiği ve bunu bir yumurtayı paketlemek için yumurta beyazı proteiniyle birlikte yumurta kanalı lümenine salgıladığı transjenik kuşların üretiminde başarılı olmaktadır. Bakınız örneğin Harvey et al., Nature Biotechnology (2002), cilt 20, sayfalar 396-399 ve 4 Mayıs 2004 tarihinde yayınlanan US Patenti No.
35 6,730,822. Bu sistem heterolog gen ekspresyonu için kullanılan diğer hayvan türleriyle

karşılaştırıldığında yüksek seviyelerde protein üretimi, hedef proteinin uygun şekilde katlanması ve translasyon sonrası değişimi vaadi, üretim iyileştirilmesi kolaylığı ve tavukların kısa gelişim periyodu sebebiyle bir protein biyoreaktörü olarak üstün potansiyel sunmaktadır. Belirgin olarak, tavuklar gibi transjenik hayvanlarda retroviral üretim retrovirüsün elverdiği ekin boyutuyla sınırlandırılabilir. Tipik olarak, retrovirüslere dahil edilen ekler 2-3 kb ile sınırlıdır. Ek boyutu sınırlamaları aşıldığında, entegrasyon açısından yetkin virüsün üretimi engellenmektedir. Retrovirüsler kullanılarak tavuklar gibi transjenik kuşların üretiminde kullanılan önemli yöntemler replikasyondan yetersiz ancak entegrasyon açısından yetkin retroviral parçacıkların embriyon hücrelerine sokulmasını içermektedir.

Replikasyondan yetersiz retroviral vektörler virüsün başarılı şekilde yeniden üretimi için gereken belirli genlerden yoksundur. Geleneksel olarak, replikasyondan yetersiz retroviral vektörleri üretmek için replikasyondan yetersiz retrovirüsleri kodlayan nükleotid dizinleri sabit olarak replikasyondan yetersiz retrovirüsün kopyalanması için gereken gen ürünlerini üreten hücrelere transfekte edilmektedir. Başka bir deyişle, retrovirüsün kopyalanması için gereken belirli nükleotid dizinleri retrovirüs açısından eksiktir; ancak içerisinde virüs parçacıkların üretildiği hücrenin genomunda bulunmaktadır. Replikasyondan yetersiz ALV retrovirüslerini üretmek için kullanılan bir sistem Senta hücrelerinin ve Isolde hücrelerinin kullanımını içermektedir (Cosset et al. (1993), Virology, cilt 195, sayfalar 385-395). Yöntem öncelikle replikasyondan yetersiz retrovirüsü kodlayan nükleotid dizinlerinin sabit olarak gag, pol ve envE proteinlerini üreten Senta hücrelerine transfekte edilmesini içermektedir. Senta hücrelerinde elde edilen virüs titresi tipik olarak < 1000/ml'dir. Titreyi arttırmak için, Senta hücrelerinde üretilen virüs parçacıkları sabit olarak gag, pol ve envA proteinlerini üreten Isolde hücrelerini kaht aktarmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu şekilde üretilen retrovirüs Isolde klonlarının veya tek kolonilerin seçimini sağlayan neomisin dirençli bir gen içerebilmektedir; bunlardan bazıları > 10,000/ml yüksek titreli parçacıkları üretecektir. Kullanılabilir miktarda virüs parçacıklarının üretimine rağmen, titreler bu yöntemde hali hazırda nispeten düşüktür. Buna ek olarak, yöntem zahmetlidir ve tipik olarak üç ay almasına bağlı olarak zaman alıcıdır.

Soneoka et al. (1995) Nucleic acids research, cilt 23(4), sayfalar 628-633 yüksek titreli retroviral vektörlerin üretimi için geçişli üç plazmidli bir ekspresyon sistemini

karşılaştırıldığında yüksek seviyelerde protein üretimi, hedef proteinin uygun şekilde katlanması ve translasyon sonrası değişimi vaadi, üretim iyileştirilmesi kolaylığı ve tavukların kısa gelişim periyodu sebebiyle bir protein biyoreaktörü olarak üstün potansiyel sunmaktadır. Belirgin olarak, tavuklar gibi transjenik hayvanlarda retroviral üretim retrovirüsün elverdiği ekin boyutuyla sınırlandırılabilir. Tipik olarak, retrovirüslere dahil edilen ekler 2-3 kb ile sınırlıdır. Ek boyutu sınırlamaları aşıldığında, entegrasyon açısından yetkin virüsün üretimi engellenmektedir. Retrovirüsler kullanılarak tavuklar gibi transjenik kuşların üretiminde kullanılan önemli yöntemler replikasyondan yetersiz ancak entegrasyon açısından yetkin retroviral parçacıkların embriyon hücrelerine sokulmasını içermektedir.

Replikasyondan yetersiz retroviral vektörler virüsün başarılı şekilde yeniden üretimi için gereken belirli genlerden yoksundur. Geleneksel olarak, replikasyondan yetersiz retroviral vektörleri üretmek için replikasyondan yetersiz retrovirüsleri kodlayan nükleotid dizinleri sabit olarak replikasyondan yetersiz retrovirüsün kopyalanması için gereken gen ürünlerini üreten hücrelere transfekte edilmektedir. Başka bir deyişle, retrovirüsün kopyalanması için gereken belirli nükleotid dizinleri retrovirüs açısından eksiktir; ancak içerisinde virüs parçacıkların üretildiği hücrenin genomunda bulunmaktadır. Replikasyondan yetersiz ALV retrovirüslerini üretmek için kullanılan bir sistem Senta hücrelerinin ve Isolde hücrelerinin kullanımını içermektedir (Cosset et al. (1993), Virology, cilt 195, sayfalar 385-395). Yöntem öncelikle replikasyondan yetersiz retrovirüsü kodlayan nükleotid dizinlerinin sabit olarak gag, pol ve envE proteinlerini üreten Senta hücrelerine transfekte edilmesini içermektedir. Senta hücrelerinde elde edilen virüs titresi tipik olarak < 1000/ml'dir. Titreyi arttırmak için, Senta hücrelerinde üretilen virüs parçacıkları sabit olarak gag, pol ve envA proteinlerini üreten Isolde hücrelerini kaht aktarmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu şekilde üretilen retrovirüs Isolde klonlarının veya tek kolonilerin seçimini sağlayan neomisin dirençli bir gen içerebilmektedir; bunlardan bazıları > 10,000/ml yüksek titreli parçacıkları üretecektir. Kullanılabilir miktarda virüs parçacıklarının üretimine rağmen, titreler bu yöntemde hali hazırda nispeten düşüktür. Buna ek olarak, yöntem zahmetlidir ve tipik olarak üç ay almasına bağlı olarak zaman alıcıdır.

Soneoka et al. (1995) Nucleic acids research, cilt 23(4), sayfalar 628-633 yüksek titreli retroviral vektörlerin üretimi için geçişli üç plazmidli bir ekspresyon sistemini

açıklamaktadır; burada kopyalamanın SV40 orijinleri paketleme bileşenlerinin ekspresyonunu yönlendirmek üzere SV40 büyük T antijenini ifade eden konakçı hücrelerle birlikte tüm retroviral bileşenlerinde kullanılmaktadır.

- 5 Gereken şey daha az zaman ve daha az zahmet gerektiren ve alıcı genomdaki daha büyük nükleotid dizinlerinin sokulmasını sağlayan ve yüksek titrelerle sonuçlanan viral parçacıkların üretimiyle ilgili yeni yöntemlerdir.

Kısa Açıklama

- 10 Bir retrovirüs üretim sistemi geliştirilmektedir ve burada açıklanmaktadır; içerisinde replikasyondan yetersiz retroviral parçacıklar minimum miktarda iş gücü kullanılarak üretilmektedir, 2 gün kadar az bir sürede üretilmektedir, tipik olarak geleneksel yöntemlerle elde edilenden on kat veya daha fazla titre verebilmektedir ve örneğin gag
15 (tipik olarak yaklaşık 2000 nükleotid), pol (tipik olarak yaklaşık 2300 nükleotid) ve env (tipik olarak yaklaşık 1500 nükleotid) protein geni gibi üç yapısal gen kadar çok genin çıkarılmasıyla retroviral vektöre sokulabilen nükleotid ekinin boyutunda önemli bir artış sağlamaktadır. Kısaca, replikasyondan yetersiz retrovirüsü veya retroviral vektörü kodlayan bir nükleotid dizini replikasyondan yetersiz retrovirüsü veya retroviral vektörü
20 kopyalamak için sağlanan nükleotid diziniyle birlikte fibroblast hücre gibi bir hücreye sokulmaktadır; özellikle iki veya daha fazla gag, pol ve env proteinini kodlayan nükleotid dizinleri hücreye sokulmaktadır. Tarifnamenin özellikle faydalı bir durumunda, gag, pol ve env proteinlerinin üçünü kodlayan nükleotid dizinleri replikasyondan yetersiz viral vektörün kopyalanması için gereklidir ve hücreye sokulmaktadır.

- 25 Mevcut buluş viral parçacıkların üretimiyle ilgili bir yöntem sağlamaktadır; yöntem aşağıdakileri içermektedir: bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin geçici olarak sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür; DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz
30 retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin geçici olarak sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir; burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) bir plazmid üzerinde bulunmaktadır ve VSV-G proteinini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) başka bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörünün kontrolü altındadır; ve
35 viral parçacıkların toplanması.

açıklamaktadır; burada kopyalamanın SV40 orijinleri paketleme bileşenlerinin ekspresyonunu yönlendirmek üzere SV40 büyük T antijenini ifade eden konakçı hücrelerle birlikte tüm retroviral bileşenlerinde kullanılmaktadır.

- 5 Gereken şey daha az zaman ve daha az zahmet gerektiren ve alıcı genomdaki daha büyük nükleotid dizinlerinin sokulmasını sağlayan ve yüksek titrelerle sonuçlanan viral parçacıkların üretimiyle ilgili yeni yöntemlerdir.

Kısa Açıklama

10

Bir retrovirüs üretim sistemi geliştirilmektedir ve burada açıklanmaktadır; içerisinde replikasyondan yetersiz retroviral parçacıklar minimum miktarda iş gücü kullanılarak üretilmektedir, 2 gün kadar az bir sürede üretilmektedir, tipik olarak geleneksel yöntemlerle elde edilenden on kat veya daha fazla titre verebilmektedir ve örneğin gag (tipik olarak yaklaşık 2000 nükleotid), pol (tipik olarak yaklaşık 2300 nükleotid) ve env (tipik olarak yaklaşık 1500 nükleotid) protein geni gibi üç yapısal gen kadar çok genin çıkarılmasıyla retroviral vektöre sokulabilen nükleotid ekinin boyutunda önemli bir artış sağlamaktadır. Kısaca, replikasyondan yetersiz retrovirüsü veya retroviral vektörü kodlayan bir nükleotid dizini replikasyondan yetersiz retrovirüsü veya retroviral vektörü kopyalamak için sağlanan nükleotid diziniyle birlikte fibroblast hücre gibi bir hücreye sokulmaktadır; özellikle iki veya daha fazla gag, pol ve env proteinini kodlayan nükleotid dizinleri hücreye sokulmaktadır. Tarifnamenin özellikle faydalı bir durumunda, gag, pol ve env proteinlerinin üçünü kodlayan nükleotid dizinleri replikasyondan yetersiz viral vektörün kopyalanması için gereklidir ve hücreye sokulmaktadır.

25

Mevcut buluş viral parçacıkların üretimiyle ilgili bir yöntem sağlamaktadır; yöntem aşağıdakileri içermektedir: bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin geçici olarak sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür; DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin geçici olarak sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir; burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) bir plazmid üzerinde bulunmaktadır ve VSV-G proteinini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) başka bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörünün kontrolü altındadır; ve viral parçacıkların toplanması.

35

Mevcut buluş ayrıca transjenik bir kuşun üretim yöntemini sağlamaktadır; yöntem aşağıdakileri içermektedir: bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin geçici olarak sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür; DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin geçici olarak sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir; burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) bir plazmid üzerinde bulunmaktadır ve VSV-G proteinini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) başka bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörünün kontrolü altındadır; viral parçacıkların toplanması; viral parçacıkların bir kuş embriyon hücresine sokulması; ve embriyodan transjenik kuşun elde edilmesi.

Buluş ayrıca ekzojen proteinin üretim yöntemini sağlamaktadır; yöntem aşağıdakileri içermektedir: bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin geçici olarak sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür ve burada kuş retroviral vektörü faal olarak bir promotöre bağlanan ekzojen bir protein için bir kodlama dizini içermektedir; DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir; burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve VSV-G proteinini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) başka bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörünün kontrolü altındadır; viral parçacıkların toplanması; viral parçacıkların bir kuş embriyon hücresine sokulması; ve embriyodan elde edilen transjenik bir kuşun yumurtladığı bir yumurtadan ekzojen proteinin elde edilmesi.

Buluş yöntemleri ve belirli düzenlemeleri ekteki istemlerde belirtilmektedir.

Bir durumda, tarifnamedeki yöntemler örneğin retroviral bir vektörü kodlayan bir nükleotid dizininin bir hücreye transfeke edilmesiyle sokulması (örneğin geçici transfeksiyon); burada retroviral vektör replikasyon açısından yetersizdir (örneğin replikasyondan yetersiz bir retrovirüsü kodlayan bir polinükleotidi içeren tek bir nükleotid dizini); örneğin hücre içinde işlevsel olan promotörlerin kontrolü altındaki iki veya daha fazla nükleotid dizininin hücreye transfeke edilmesiyle sokulması; burada nükleotid dizinleri gag, pol ve env proteinlerini kodlayan nükleotid dizinleri gibi

Mevcut buluş ayrıca transjenik bir kuşun üretim yöntemini sağlamaktadır; yöntem aşağıdakileri içermektedir: bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin geçici olarak sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür; DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin geçici olarak sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir; burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) bir plazmid üzerinde bulunmaktadır ve VSV-G proteinini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) başka bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörünün kontrolü altındadır; viral parçacıkların toplanması; viral parçacıkların bir kuş embriyon hücresine sokulması; ve embriyodan transjenik kuşun elde edilmesi.

Buluş ayrıca ekzojen proteinin üretim yöntemini sağlamaktadır; yöntem aşağıdakileri içermektedir: bir DF-1 hücre hattına bir kuş retroviral vektörünü kodlayan bir nükleotid dizininin geçici olarak sokulması; burada kuş retroviral vektörü replikasyondan yetersiz ALV vektörüdür ve burada kuş retroviral vektörü faal olarak bir promotöre bağlanan ekzojen bir protein için bir kodlama dizini içermektedir; DF-1 hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerinin sokulması; ürünler gag, pol ve VSV-G proteinleridir; burada gag ve pol proteinlerini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve VSV-G proteinini kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) başka bir plazmidin üzerinde bulunmaktadır ve burada gag, pol ve VSV-G CMV promotörünün kontrolü altındadır; viral parçacıkların toplanması; viral parçacıkların bir kuş embriyon hücresine sokulması; ve embriyodan elde edilen transjenik bir kuşun yumurtladığı bir yumurtadan ekzojen proteinin elde edilmesi.

Buluş yöntemleri ve belirli düzenlemeleri ekteki istemlerde belirtilmektedir.

Bir durumda, tarifnamedeki yöntemler örneğin retroviral bir vektörü kodlayan bir nükleotid dizininin bir hücreye transfeke edilmesiyle sokulması (örneğin geçici transfeksiyon); burada retroviral vektör replikasyon açısından yetersizdir (örneğin replikasyondan yetersiz bir retrovirüsü kodlayan bir polinükleotidi içeren tek bir nükleotid dizini); örneğin hücre içinde işlevsel olan promotörlerin kontrolü altındaki iki veya daha fazla nükleotid dizininin hücreye transfeke edilmesiyle sokulması; burada nükleotid dizinleri gag, pol ve env proteinlerini kodlayan nükleotid dizinleri gibi

replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gereken ürünleri kodlamaktadır; ve viral parçacıkların toplanması.

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, hücreye sokulan her nükleotid dizini (başka bir deyişle, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) ve replikasyondan yetersiz virüsü kopyalamak için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizin (dizinler)) geçici şekilde sokulmaktadır. Başka bir deyişle, nükleotid dizinlerinin hücrede kopyalanması beklenmemektedir ve hücrel genomla bütünleşmesi beklenmemektedir. Örneğin, nükleotid dizinleri bir veya daha fazla bakteriyel plazmid vektöründe bulunan hücreye sokulabilmektedir. Tarifname ayrıca geçici şekilde hücreye sokulan replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) ve nükleotid dizininin (dizinlerinin) hücre genomuyla sabit bütünleşmesini sağlayacak şekilde hücreye sokulan retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) tasarlamaktadır. Yöntemler hücre genomlarında, örneğin hücre hatlarındaki hücrelerde istenilen nükleotid dizinlerinin sabit entegrasyonunu sağlaması açısından bu alanda iyi bilinmektedir. Örneğin, replikasyondan yetersiz retroviral vektörler hücrel bir genomda sabit entegrasyon için kullanılabilmektedir.

Replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizin (dizinler) retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizinin (dizinlerin) sokulmasından önce hücreye sokulabilmektedir; replikasyondan yetersiz virüsü kopyalamak için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizin (dizinler) retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizininin (dizinlerinin) sokulmasıyla yaklaşık olarak aynı zamanda hücreye sokulabilmektedir; veya replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizininin (dizinlerinin) sokulmasından sonra hücreye sokulabilmektedir. Tarifnamedeki bir durumda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanmasını sağlayan ürünleri kodlayan nükleotid dizinleri bir veya daha fazla plazmide, örneğin her nükleotid dizini için bir plazmide dahil edilmektedir. Tarifnamedeki belirli faydalı durumlarda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için sağlanan ürünleri kodlayan nükleotid dizinler bir veya daha fazla plazmide, örneğin her nükleotid dizini için bir plazmide dahil edilmektedir. Tarifnamedeki belirli faydalı durumlarda, replikasyondan yetersiz retroviral vektör bir plazmide dahil edilmektedir. Nükleotid dizinler tarifnameye göre bir plazmide dahil edildiğinde, bu dizinler tipik olarak geçici şekilde hücreye sokulacaktır.

replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gereken ürünleri kodlamaktadır; ve viral parçacıkların toplanması.

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, hücreye sokulan her nükleotid dizini (başka bir deyişle, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) ve replikasyondan yetersiz virüsü kopyalamak için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizin (dizinler)) geçici şekilde sokulmaktadır. Başka bir deyişle, nükleotid dizinlerinin hücrede kopyalanması beklenmemektedir ve hücrel genomla bütünleşmesi beklenmemektedir. Örneğin, nükleotid dizinleri bir veya daha fazla bakteriyel plazmid vektöründe bulunan hücreye sokulabilmektedir. Tarifname ayrıca geçici şekilde hücreye sokulan replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) ve nükleotid dizininin (dizinlerinin) hücre genomuyla sabit bütünleşmesini sağlayacak şekilde hücreye sokulan retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) tasarlamaktadır. Yöntemler hücre genomlarında, örneğin hücre hatlarındaki hücrelerde istenilen nükleotid dizinlerinin sabit entegrasyonunu sağlaması açısından bu alanda iyi bilinmektedir. Örneğin, replikasyondan yetersiz retroviral vektörler hücrel bir genomda sabit entegrasyon için kullanılabilmektedir.

Replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizin (dizinler) retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizinin (dizinlerin) sokulmasından önce hücreye sokulabilmektedir; replikasyondan yetersiz virüsü kopyalamak için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizin (dizinler) retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizininin (dizinlerinin) sokulmasıyla yaklaşık olarak aynı zamanda hücreye sokulabilmektedir; veya replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizininin (dizinlerinin) sokulmasından sonra hücreye sokulabilmektedir. Tarifnamedeki bir durumda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanmasını sağlayan ürünleri kodlayan nükleotid dizinleri bir veya daha fazla plazmide, örneğin her nükleotid dizini için bir plazmide dahil edilmektedir. Tarifnamedeki belirli faydalı durumlarda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için sağlanan ürünleri kodlayan nükleotid dizinler bir veya daha fazla plazmide, örneğin her nükleotid dizini için bir plazmide dahil edilmektedir. Tarifnamedeki belirli faydalı durumlarda, replikasyondan yetersiz retroviral vektör bir plazmide dahil edilmektedir. Nükleotid dizinler tarifnameye göre bir plazmide dahil edildiğinde, bu dizinler tipik olarak geçici şekilde hücreye sokulacaktır.

Mevcut tarifnamede oldukça faydalı olabilen belirli hücreler ve hücre hattı kuş hücreleridir (örneğin kuş fibroblast hücreleri) ve örneğin tavuk, hindi, ördek, kaz, bıldırcın, sülün, papağan, saka, şahin, karga gibi kuşlardan ve örneğin tavus kuşu, koşucu devekuşu ve tepeli devekuşu dahil olmak üzere uçamayan kuşlardan elde edilen kuş hücre hatlarıdır (örneğin kuş fibroblast hücre hatları). Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, tavuk fibroblast hücre hattı kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tarifname fibroblast hücrelerinin kullanımıyla sınırlandırılmamaktadır ve spesifik olarak fare hücre hatları, insan hücre hatları, CHO hücreleri gibi hamster hücre hatları ve LMH, LMH2a hücreleri gibi tavuk hücre hatları gibi her türlü faydalı hücre hattını tasarlamaktadır.

10

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, replikasyondan yetersiz retroviral bir vektörü kodlayan nükleotid dizini bir kuş retrovirüsüne dayanan retroviral bir vektörü kodlamaktadır. Kuş retrovirüsleriyle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde Kuş Lösemi/Lökoz Virüsleri (ALV), örneğin sınırlayıcı olmayacak şekilde RAV-0, RAV-1, RAV-2; Kuş Sarkom Virüsleri (ASV); sınırlayıcı olmayacak şekilde Rous Sarkom Virüsü (RSV) dahil olmak üzere Kuş Sarkom/Akut Lösemi Virüsleri (ASLV); Fujinami Sarkom Virüsleri (FSV); Kuş Miyeloblastoz Virüsleri (AMV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde MC29 gibi Kuş Eritroblastoz Virüsleri (AEV); Kuş Miyelositomatoz Virüsleri (MCV); Retikuloendoteliyoz Virüsleri (REV), örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde Dalak Nekroz Virüsünü (SNV) içermektedir. Tarifname ayrıca replikasyondan yetersiz retroviral bir vektörü kodlayan nükleotid dizininin sınırlayıcı olmayacak şekilde Fare Lösemi Virüsleri (MLV); Molony Fare Sarkom Virüsleri (MMSV); Moloney Fare Lösemi Virüsleri (MMLV); ve lentivirüsler (örneğin insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kedi bağışıklık yetmezliği virüsü (FIV), sığır bağışıklık yetmezliği virüsü (BIV) ve maymun bağışıklık yetmezliği virüsüne (SIV) dayanan retroviral vektörler dahil olmak üzere faydalı olan her retroviral vektörü kodlayabilmesini tasarlamaktadır.

20

25

30

35

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gereken ürünleri kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) kuş retrovirüsü genomundan elde edilen veya türetilen nükleotid dizinidir. Bu tür kullanım için tasarlanan kuş retrovirüsleriyle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde RAV-0, RAV-1, RAV-2 gibi Kuş Lösemi/Lökoz Virüsleri (ALV); Kuş Sarkom Virüsleri (ASV); sınırlayıcı olmayacak şekilde Rous Sarkom Virüsü (RSV) dahil olmak üzere Kuş Sarkom/Akut Lösemi Virüsleri (ASLV); Fujinami Sarkom Virüsleri (FSV); Kuş Miyeloblastoz Virüsleri (AMV); Kuş Eritroblastoz Virüsleri (AEV); örneğin ve

Mevcut tarifnamede oldukça faydalı olabilen belirli hücreler ve hücre hattı kuş hücreleridir (örneğin kuş fibroblast hücreleri) ve örneğin tavuk, hindi, ördek, kaz, bıldırcın, sülün, papağan, saka, şahin, karga gibi kuşlardan ve örneğin tavus kuşu, koşucu devekuşu ve tepeli devekuşu dahil olmak üzere uçamayan kuşlardan elde edilen kuş hücre hatlarıdır (örneğin kuş fibroblast hücre hatları). Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, tavuk fibroblast hücre hattı kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tarifname fibroblast hücrelerinin kullanımıyla sınırlandırılmamaktadır ve spesifik olarak fare hücre hatları, insan hücre hatları, CHO hücreleri gibi hamster hücre hatları ve LMH, LMH2a hücreleri gibi tavuk hücre hatları gibi her türlü faydalı hücre hattını tasarlamaktadır.

10

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, replikasyondan yetersiz retroviral bir vektörü kodlayan nükleotid dizini bir kuş retrovirüsüne dayanan retroviral bir vektörü kodlamaktadır. Kuş retrovirüsleriyle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde Kuş Lösemi/Lökoz Virüsleri (ALV), örneğin sınırlayıcı olmayacak şekilde RAV-0, RAV-1, RAV-2; Kuş Sarkom Virüsleri (ASV); sınırlayıcı olmayacak şekilde Rous Sarkom Virüsü (RSV) dahil olmak üzere Kuş Sarkom/Akut Lösemi Virüsleri (ASLV); Fujinami Sarkom Virüsleri (FSV); Kuş Miyeloblastoz Virüsleri (AMV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde MC29 gibi Kuş Eritroblastoz Virüsleri (AEV); Kuş Miyelositomatoz Virüsleri (MCV); Retikuloendoteliyoz Virüsleri (REV), örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde Dalak Nekroz Virüsünü (SNV) içermektedir. Tarifname ayrıca replikasyondan yetersiz retroviral bir vektörü kodlayan nükleotid dizininin sınırlayıcı olmayacak şekilde Fare Lösemi Virüsleri (MLV); Molony Fare Sarkom Virüsleri (MMSV); Moloney Fare Lösemi Virüsleri (MMLV); ve lentivirüsler (örneğin insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kedi bağışıklık yetmezliği virüsü (FIV), sığır bağışıklık yetmezliği virüsü (BIV) ve maymun bağışıklık yetmezliği virüsüne (SIV) dayanan retroviral vektörler dahil olmak üzere faydalı olan her retroviral vektörü kodlayabilmesini tasarlamaktadır.

20

25

30

35

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gereken ürünleri kodlayan nükleotid dizini (dizinleri) kuş retrovirüsü genomundan elde edilen veya türetilen nükleotid dizinidir. Bu tür kullanım için tasarlanan kuş retrovirüsleriyle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde RAV-0, RAV-1, RAV-2 gibi Kuş Lösemi/Lökoz Virüsleri (ALV); Kuş Sarkom Virüsleri (ASV); sınırlayıcı olmayacak şekilde Rous Sarkom Virüsü (RSV) dahil olmak üzere Kuş Sarkom/Akut Lösemi Virüsleri (ASLV); Fujinami Sarkom Virüsleri (FSV); Kuş Miyeloblastoz Virüsleri (AMV); Kuş Eritroblastoz Virüsleri (AEV); örneğin ve

sınırlayıcı olmayacak şekilde MC29 gibi Kuş Miyelositomatoz Virüsleri (MCV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde Dalak Nekroz Virüsü (SNV) gibi Retikuloendoteliyoz Virüslerini (REV) içermektedir. Tarifname ayrıca sınırlayıcı olmayacak şekilde Fare Lösemi Virüsleri (MLV); Molony Fare Sarkom Virüsleri (MMSV); Moloney Fare Lösemi Virüsleri (MMLV); ve sınırlayıcı olmayacak şekilde lentivirüsler (örneğin insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kedi bağışıklık yetmezliği virüsü (FIV), sığır bağışıklık yetmezliği virüsü (BIV) ve maymun bağışıklık yetmezliği virüsü (SIV) dahil olmak üzere her tür faydalı retrovirüs genomundan elde edilen veya türetilen nükleotid dizini olan replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli bir ürünü kodlayan nükleotid dizinini tasarlamaktadır.

Tarifnamenin spesifik bir açısına bir fibroblast hücre hattına örneğin gag, pol ve env proteinlerini kodlayan nükleotid dizinleri gibi replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken nükleotid dizinlerinin sokulmasını (örneğin transfekte edilmesi) içeren viral bir parçacığın üretimiyle ilgili yöntemler dahil edilmektedir; burada gag, pol ve env proteinlerini kodlayan dizinler fibroblast hücre hattında işlevsel olan bir promotörün kontrolü altındadır; ayrıca fibroblast hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulmasını (örneğin transfekte edilmesi); ve viral parçacıkların toplanmasını içermektedir. Tarifnamedeki bir durumda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken gag, pol ve env proteinlerini kodlayan dizinler bir veya daha fazla plazmide dahil edilmektedir. Örneğin, gag, pol ve env proteinlerini kodlayan dizinlerin tümü bir plazmide dahil edilmektedir veya bunların her biri ayrı bir plazmide dahil edilebilmektedir. Başka bir örnekte, gag, pol ve env protein kodlayıcı dizinlerden ikisi (örneğin gag ve pol) bir plazmidin üzerinde bulunabilmektedir ve üçüncüsü başka bir plazmidin (örneğin env) üzerinde bulunabilmektedir. Tarifnamenin bir durumunda, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini bir provirüstür. Başka bir deyişle, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini konakçı bir hücre genomuyla bütünleştirilen bir DNA'dır. Bir düzenlemede, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini bir plazmidte bulunmaktadır.

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, gag, pol ve env proteinini kodlayan nükleotid dizinleri bir kuş retrovirüsüne aittir. Kuş retrovirüsleriyle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde RAV-0, RAV-1, RAV-2 gibi Kuş Lösemi/Lökoz Virüsleri (ALV); Kuş Sarkom Virüsleri (ASV); sınırlayıcı olmayacak şekilde Rous Sarkom Virüsü (RSV) dahil olmak üzere Kuş Sarkom/Akut Lösemi Virüsleri (ASLV);

sınırlayıcı olmayacak şekilde MC29 gibi Kuş Miyelositomatoz Virüsleri (MCV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde Dalak Nekroz Virüsü (SNV) gibi Retikuloendoteliyoz Virüslerini (REV) içermektedir. Tarifname ayrıca sınırlayıcı olmayacak şekilde Fare Lösemi Virüsleri (MLV); Molony Fare Sarkom Virüsleri (MMSV); Moloney Fare Lösemi Virüsleri (MMLV); ve sınırlayıcı olmayacak şekilde lentivirüsler (örneğin insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kedi bağışıklık yetmezliği virüsü (FIV), sığır bağışıklık yetmezliği virüsü (BIV) ve maymun bağışıklık yetmezliği virüsü (SIV) dahil olmak üzere her tür faydalı retrovirüs genomundan elde edilen veya türetilen nükleotid dizini olan replikasyondan yetersiz virüsün kopyalanması için gerekli bir ürünü kodlayan nükleotid dizinini tasarlamaktadır.

Tarifnamenin spesifik bir açısına bir fibroblast hücre hattına örneğin gag, pol ve env proteinlerini kodlayan nükleotid dizinleri gibi replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken nükleotid dizinlerinin sokulmasını (örneğin transfekte edilmesi) içeren viral bir parçacığın üretimiyle ilgili yöntemler dahil edilmektedir; burada gag, pol ve env proteinlerini kodlayan dizinler fibroblast hücre hattında işlevsel olan bir promotörün kontrolü altındadır; ayrıca fibroblast hücre hattına replikasyondan yetersiz retroviral vektörü kodlayan bir nükleotid dizininin sokulmasını (örneğin transfekte edilmesi); ve viral parçacıkların toplanmasını içermektedir. Tarifnamedeki bir durumda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken gag, pol ve env proteinlerini kodlayan dizinler bir veya daha fazla plazmide dahil edilmektedir. Örneğin, gag, pol ve env proteinlerini kodlayan dizinlerin tümü bir plazmide dahil edilmektedir veya bunların her biri ayrı bir plazmide dahil edilebilmektedir. Başka bir örnekte, gag, pol ve env protein kodlayıcı dizinlerden ikisi (örneğin gag ve pol) bir plazmidin üzerinde bulunabilmektedir ve üçüncüsü başka bir plazmidin (örneğin env) üzerinde bulunabilmektedir. Tarifnamenin bir durumunda, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini bir provirüstür. Başka bir deyişle, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini konakçı bir hücre genomuyla bütünleştirilen bir DNA'dır. Bir düzenlemede, retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini bir plazmidte bulunmaktadır.

Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, gag, pol ve env proteinini kodlayan nükleotid dizinleri bir kuş retrovirüsüne aittir. Kuş retrovirüsleriyle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde RAV-0, RAV-1, RAV-2 gibi Kuş Lösemi/Lökoz Virüsleri (ALV); Kuş Sarkom Virüsleri (ASV); sınırlayıcı olmayacak şekilde Rous Sarkom Virüsü (RSV) dahil olmak üzere Kuş Sarkom/Akut Lösemi Virüsleri (ASLV);

Fujinami Sarkom Virüsleri (FSV); Kuş Miyeloblastoz Virüsleri (AMV); Kuş Eritroblastoz Virüsleri (AEV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde MC29 gibi Kuş Miyelositomatoz Virüsleri (AMV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde Dalak Nekroz Virüsü (SNV) gibi Retikuloendotelyoz Virüslerini (REV) içermektedir. Ayrıca replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken gag, pol ve env proteinini kodlayan nükleotid dizinleri sınırlayıcı olmayacak şekilde Fare Lösemi Virüslerine (MLV); Molony Fare Sarkom Virüsleri (MMSV); Moloney Fare Lösemi Virüsleri (MMLV); ve lentivirüslere (örneğin insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kedi bağışıklık yetmezliği virüsü (FIV), sığır bağışıklık yetmezliği virüsü (BIV) ve maymun bağışıklık yetmezliği virüsü (SIV) dayanan retroviral vektörler dahil olmak üzere faydalı olan herhangi bir retroviral vektörden türetilebilecek veya elde edilebilecek şekilde tasarlanmaktadır. Tarifnamedeki belirli durumlarda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken nükleotid dizinlerinin tümünün aynı virüsten olmayabilmektedir. Örneğin, gag proteini Kuş Lökz Virüsünden (ALV) olabilmektedir; pol proteini Molony Fare Sarkom Virüsünden (MMSV) olabilmektedir ve env proteini Kuş Eritroblastoz Virüslerinden (AEV) olabilmektedir. Başka bir örnekte, gag proteini Molony Fare Sarkom Virüsünden (MMSV) olabilmektedir; env proteini Kuş Lökz Virüsünden (ALV) olabilmektedir. Bunlar sadece örnek açıklama amaçlı olarak sağlanan örneklerdir ve tarifname bunlarla sınırlandırılmamaktadır.

20

Tarifnamedeki spesifik durumların örneğin gag, pol ve env proteinleri gibi replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken üç nükleotid dizini gerektirmesine rağmen, tarifname bunlarla sınırlandırılmamaktadır. Örneğin, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri sağlamak için sadece bir veya iki nükleotid dizini gerekebilmektedir.

25

Bir açıda, buluş transjenik kuşların üretim yöntemleriyle ilgilidir. Yöntemler buluşa göre üretilen viral parçacıkların toplanmasını ve toplanan retroviral parçacıkların örneğin aşama I-aşama XII embriyolar gibi erken aşamalı embriyolara benzer kuş embriyo hücrelerine sokulmasını ve ardından embriyo hücrelerinden türetilen yumurtadan çıkan bir tavuğun elde edilmesini içermektedir.

30

Mevcut buluşa bağlantılı olabilen belirli referanslar şunlardır: J.C. Burns, T.Friedmann et al. (1993) "Vesicular stomatitis virüs G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and

35

Fujinami Sarkom Virüsleri (FSV); Kuş Miyeloblastoz Virüsleri (AMV); Kuş Eritroblastoz Virüsleri (AEV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde MC29 gibi Kuş Miyelositomatoz Virüsleri (AMV); örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde Dalak Nekroz Virüsü (SNV) gibi Retikuloendotelyoz Virüslerini (REV) içermektedir. Ayrıca replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken gag, pol ve env proteinini kodlayan nükleotid dizinleri sınırlayıcı olmayacak şekilde Fare Lösemi Virüslerine (MLV); Molony Fare Sarkom Virüsleri (MMSV); Moloney Fare Lösemi Virüsleri (MMLV); ve lentivirüslere (örneğin insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kedi bağışıklık yetmezliği virüsü (FIV), sığır bağışıklık yetmezliği virüsü (BIV) ve maymun bağışıklık yetmezliği virüsü (SIV) dayanan retroviral vektörler dahil olmak üzere faydalı olan herhangi bir retroviral vektörden türetilebilecek veya elde edilebilecek şekilde tasarlanmaktadır. Tarifnamedeki belirli durumlarda, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken nükleotid dizinlerinin tümünün aynı virüsten olmayabilmektedir. Örneğin, gag proteini Kuş Lökoz Virüsünden (ALV) olabilmektedir; pol proteini Molony Fare Sarkom Virüsünden (MMSV) olabilmektedir ve env proteini Kuş Eritroblastoz Virüslerinden (AEV) olabilmektedir. Başka bir örnekte, gag proteini Molony Fare Sarkom Virüsünden (MMSV) olabilmektedir; env proteini Kuş Lökoz Virüsünden (ALV) olabilmektedir. Bunlar sadece örnek açıklama amaçlı olarak sağlanan örneklerdir ve tarifname bunlarla sınırlandırılmamaktadır.

20

Tarifnamedeki spesifik durumların örneğin gag, pol ve env proteinleri gibi replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gereken üç nükleotid dizini gerektirmesine rağmen, tarifname bunlarla sınırlandırılmamaktadır. Örneğin, replikasyondan yetersiz retroviral vektörün kopyalanması için gerekli ürünleri sağlamak için sadece bir veya iki nükleotid dizini gerekebilmektedir.

25

Bir açıda, buluş transjenik kuşların üretim yöntemleriyle ilgilidir. Yöntemler buluşa göre üretilen viral parçacıkların toplanmasını ve toplanan retroviral parçacıkların örneğin aşama I-aşama XII embriyolar gibi erken aşamalı embriyolara benzer kuş embriyo hücrelerine sokulmasını ve ardından embriyo hücrelerinden türetilen yumurtadan çıkan bir tavuğun elde edilmesini içermektedir.

30

Mevcut buluşa bağlantılı olabilen belirli referanslar şunlardır: J.C. Burns, T.Friedmann et al. (1993) "Vesicular stomatitis virüs G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and

35

nonmammalian cell" Proc Natl Acad Sci U S A 90(17): C.M. Chen, D. M. Smith et al. (1999) "Production and design of more effective avian replication-incompetent retroviral vectors." Dev Biol 214(2): 370-84; Cosset et al. (1991) "Improvements of Avian Leukosis Virus (ALV)-Based Retrovirüs Vectors by Using Different cis-Acting Sequences from ALVs" J. of Virology (65(6); 3388-3394; J. Schaefer-Klein, I. Givol et al. (1998) "The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors." Virology 248(2): 305-11; 1 Ağustos 200 tarihinde yayınlanan US Patent No. 6,096,534; 30 Eylül 1997 tarihinde yayınlanan US Patent No. 5,672,485; 16.Kasım.1999 tarihinde yayınlanan US Patent No. 5,985,642; ve 9 Mart 1999 tarihinde yayınlanan US Patent No. 5,879,924.

Burada açıklanan her özellik kombinasyonu bu tür bir kombinasyona dahil edilen özelliklerin karşılıklı olarak tutarsız olmaması şartıyla mevcut tarifnameye dahil edilmektedir. Bu tür kombinasyonlar bu tarifnameye dayanarak ve bu alanda uzman olan bir kişinin bilgisine dayanarak açık hale gelecektir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1 RSV gag proteini ve RSV pol proteini için kodlama dizinlerini içeren pCMV-gagpol haritasını göstermektedir.

Şekil 2 bir CMV promotör ve bir eritropoietin kodlama dizini (EPO 166 amino asitleri) içeren bir ekspresyon kasetine sahip replikasyondan yetersiz pNLB vektörünü içeren pNLB-CMV-EPO haritasını göstermektedir.

Şekil 3 pNLB-CMV-EPO vektöründeki eritropoietin kodlama dizinini 165 amino asit kodlayıcı formuna değiştirmek konusunda faydalı bir nükleotid dizini içeren pDRIVE vektörünü göstermektedir.

Şekil 4 insan eritropoietinin 165 amino asit formu (terminal arginin çıkarılmaktadır) için kodlama dizini içeren pDRIVE-des-Arg166-EPO haritasını göstermektedir.

Şekil 5 ticari olarak elde edilebilen pVSV-G'yi göstermektedir.

Detaylı Açıklama

Buradaki tarifnameyi açıklamak için kullanılan çeşitli terimler ve anlamları kapsamında açıklamak ve tanımlamak üzere belirli tanımlar burada belirtilmektedir.

nonmammalian cell" Proc Natl Acad Sci U S A 90(17): C.M. Chen, D. M. Smith et al. (1999) "Production and design of more effective avian replication-incompetent retroviral vectors." Dev Biol 214(2): 370-84; Cosset et al. (1991) "Improvements of Avian Leukosis Virus (ALV)-Based Retrovirüs Vectors by Using Different cis-Acting Sequences from ALVs" J. of Virology (65(6); 3388-3394; J. Schaefer-Klein, I. Givol et al. (1998) "The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors." Virology 248(2): 305-11; 1 Ağustos 200 tarihinde yayınlanan US Patent No. 6,096,534; 30 Eylül 1997 tarihinde yayınlanan US Patent No. 5,672,485; 16.Kasım.1999 tarihinde yayınlanan US Patent No. 5,985,642; ve 9 Mart 1999 tarihinde yayınlanan US Patent No. 5,879,924.

Burada açıklanan her özellik kombinasyonu bu tür bir kombinasyona dahil edilen özelliklerin karşılıklı olarak tutarsız olmaması şartıyla mevcut tarifnameye dahil edilmektedir. Bu tür kombinasyonlar bu tarifnameye dayanarak ve bu alanda uzman olan bir kişinin bilgisine dayanarak açık hale gelecektir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1 RSV gag proteini ve RSV pol proteini için kodlama dizinlerini içeren pCMV-gagpol haritasını göstermektedir.

Şekil 2 bir CMV promotör ve bir eritropoietin kodlama dizini (EPO 166 amino asitleri) içeren bir ekspresyon kasetine sahip replikasyondan yetersiz pNLB vektörünü içeren pNLB-CMV-EPO haritasını göstermektedir.

Şekil 3 pNLB-CMV-EPO vektöründeki eritropoietin kodlama dizinini 165 amino asit kodlayıcı formuna değiştirmek konusunda faydalı bir nükleotid dizini içeren pDRIVE vektörünü göstermektedir.

Şekil 4 insan eritropoietinin 165 amino asit formu (terminal arginin çıkarılmaktadır) için kodlama dizini içeren pDRIVE-des-Arg166-EPO haritasını göstermektedir.

Şekil 5 ticari olarak elde edilebilen pVSV-G'yi göstermektedir.

Detaylı Açıklama

Buradaki tarifnameyi açıklamak için kullanılan çeşitli terimler ve anlamları kapsamında açıklamak ve tanımlamak üzere belirli tanımlar burada belirtilmektedir.

Burada kullanıldığı şekliyle “kuşa ait” terimi sınırlayıcı olmayacak şekilde tavuk, hindi, ördek, kaz, bıldırcın, sülün, papağan, saka, şahin, karga gibi kuşlardan ve örneğin tavus kuşu, koşucu devekuşu ve tepeli devekuşu dahil olmak üzere uçamayan kuşlar gibi taksonomik kuş sınıfına giren bir organizmaya ait herhangi bir türe, cinse veya alt cinse karşılık gelmektedir. Terim hindiler, sülünler, bıldırcınlar, ördek, devekuşları ve yaygın olarak ticari miktarlarda beslenen diğer kümes hayvanlarının yanı sıra bilinen çeşitli tavuk ve piliç türlerini (örneğin Beyaz Legorn, Kahverengi Legorn, Minorka, Amroks, Kaliforniya Grisi) içermektedir. Bu ayrıca embriyon ve fetüs aşamaları dahil olmak üzere tüm gelişme aşamalarındaki bireysel kuş organizmalarını kapsamaktadır. “Kuşa ait” terimi ayrıca “kuşa ait bir hücre (kuş hücresi)” gibi “bir kuşa ait olan” anlamına gelebilmektedir.

“Nükleik asit veya polinükleotid dizini veya nükleotid dizini” sınırlayıcı olmayacak şekilde mRNA, cDNA, genomik DNA ve doğal nükleosit bazlı adenin, guanin, sitosin, timidin ve urasil içeren sentetik DNA ve RNA dizinlerini içermektedir. Terim ayrıca sınırlayıcı olmayacak şekilde sahte üridin, 2-amino purin, deoksi üridin ve deoksiinosin gibi bir veya daha fazla değiştirilmiş baza sahip dizinleri kapsamaktadır.

“Terapötik proteinler” veya “farmasötik proteinler” bir ilacı kısmen veya tamamen yapılandıran bir amino asit dizinini içermektedir.

20

“Transjen” bir genoma yani ekzojen bir DNA dizinine sokulan DNA dizinidir. Transjen örneğin sokulan retrovirüs artı retrovirüsle taşınan herhangi bir dizin gibi sokulan dizinin tamamına karşılık gelebilmektedir. “Transjen” ayrıca örneğin bir kodlama dizini ve promotör ve örneğin sokulan retrovirüse ait LTR’ler arasındaki nükleotid dizini gibi retrovirüsle taşınan söz konusu dizine karşılık gelebilmektedir.

25

“Dayanmaktadır” veya “dayandırılmaktadır” terimi belirli bir retrovirüse dayanan veya belirli retrovirüsün nükleotid dizinine dayandırılan retroviral vektörde olduğu gibi, retroviral vektöre ait genomun belirli retrovirüs genomuna ait nükleotid dizininin önemli bir kısmını içerdiği anlamına gelmektedir. Temel kısım belirli bir gen veya gag, pol ve/veya env proteinlerini kodlayan nükleotid dizini gibi bir nükleotid dizini veya LTR’leri kodlayan dizinler gibi virüs genomunun diğer yapısal veya işlevsel nükleotid dizini olabilmektedir veya bu alanda uzman kişilerin bilgisi dahilinde tarifnamedeki metinden açık hale geleceği üzere örneğin retrovirüs genomunun büyük bir kısmı (örneğin %60’dan daha fazla veya %70’den daha fazla veya %80’den daha fazla veya %90’dan daha fazla)

35

Burada kullanıldığı şekliyle “kuşa ait” terimi sınırlayıcı olmayacak şekilde tavuk, hindi, ördek, kaz, bıldırcın, sülün, papağan, saka, şahin, karga gibi kuşlardan ve örneğin tavus kuşu, koşucu devekuşu ve tepeli devekuşu dahil olmak üzere uçamayan kuşlar gibi taksonomik kuş sınıfına giren bir organizmaya ait herhangi bir türe, cinse veya alt cinse karşılık gelmektedir. Terim hindiler, sülünler, bıldırcınlar, ördek, devekuşları ve yaygın olarak ticari miktarlarda beslenen diğer kümes hayvanlarının yanı sıra bilinen çeşitli tavuk ve piliç türlerini (örneğin Beyaz Legorn, Kahverengi Legorn, Minorka, Amroks, Kaliforniya Grisi) içermektedir. Bu ayrıca embriyon ve fetüs aşamaları dahil olmak üzere tüm gelişme aşamalarındaki bireysel kuş organizmalarını kapsamaktadır. “Kuşa ait” terimi ayrıca “kuşa ait bir hücre (kuş hücresi)” gibi “bir kuşa ait olan” anlamına gelebilmektedir.

“Nükleik asit veya polinükleotid dizini veya nükleotid dizini” sınırlayıcı olmayacak şekilde mRNA, cDNA, genomik DNA ve doğal nükleosit bazlı adenin, guanin, sitosin, timidin ve urasil içeren sentetik DNA ve RNA dizinlerini içermektedir. Terim ayrıca sınırlayıcı olmayacak şekilde sahte üridin, 2-amino purin, deoksi üridin ve deoksiinosin gibi bir veya daha fazla değiştirilmiş baza sahip dizinleri kapsamaktadır.

“Terapötik proteinler” veya “farmasötik proteinler” bir ilacı kısmen veya tamamen yapılandıran bir amino asit dizinini içermektedir.

20

“Transjen” bir genoma yani ekzojen bir DNA dizinine sokulan DNA dizinidir. Transjen örneğin sokulan retrovirüs artı retrovirüsle taşınan herhangi bir dizin gibi sokulan dizinin tamamına karşılık gelebilmektedir. “Transjen” ayrıca örneğin bir kodlama dizini ve promotör ve örneğin sokulan retrovirüse ait LTR’ler arasındaki nükleotid dizini gibi retrovirüsle taşınan söz konusu dizine karşılık gelebilmektedir.

25

“Dayanmaktadır” veya “dayandırılmaktadır” terimi belirli bir retrovirüse dayanan veya belirli retrovirüsün nükleotid dizinine dayandırılan retroviral vektörde olduğu gibi, retroviral vektöre ait genomun belirli retrovirüs genomuna ait nükleotid dizininin önemli bir kısmını içerdiği anlamına gelmektedir. Temel kısım belirli bir gen veya gag, pol ve/veya env proteinlerini kodlayan nükleotid dizini gibi bir nükleotid dizini veya LTR’leri kodlayan dizinler gibi virüs genomunun diğer yapısal veya işlevsel nükleotid dizini olabilmektedir veya bu alanda uzman kişilerin bilgisi dahilinde tarifnamedeki metinden açık hale geleceği üzere örneğin retrovirüs genomunun büyük bir kısmı (örneğin %60’dan daha fazla veya %70’den daha fazla veya %80’den daha fazla veya %90’dan daha fazla)

35

veya tamamı gibi esasen tam bir retrovirüs genomu olabilmektedir. Retrovirüse dayandırılan retroviral vektörlerle ilgili örnekler Cosset et al. tarafından (Journal of Virology (1991), cilt 65, sayfalar 3388-3394) açıklandığı gibi ALV retrovirüsüne dayandırılan NL retroviral vektörleridir (örneğin NLB). NLB, NLD ve NLA gibi NL vektörleri mevcut buluş yöntemlerinde kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır.

“Kodlama dizini” veya “açık okuma çerçevesi” uygun düzenleyici dizinlerin kontrolü altında yerleştirildiğinde canlı organizmada veya laboratuvar ortamında bir polipeptide kopyalanabilen ve çevrilebilen (DNA durumunda) veya dönüştürülebilen (mRNA durumunda) bir nükleotid dizinine karşılık gelmektedir. Kodlama dizinlerinin sınırları 5’ (amino) ucundaki bir çevrim başlangıç kodonuyla ve 3’ (karboksi) ucundaki çevrim durdurma kodonuyla belirlenmektedir. Çevrim sonlandırma dizini genellikle kodlama dizinine 3’ şeklinde yerleştirilecektir. Kodlama dizini çevrilmemiş bölgelerle 5’ ve/veya 3’ uçlarını yandan destekleyebilmektedir.

Nükleik asit “kontrol dizinleri” veya “düzenleyici dizinler” tanımlanan konakçı hücrede verilen kodlama dizininin kopyalanması ve çevrilmesi için gerekli ve yeterli olduğu üzere promotör dizinlere, çevrim başlangıç ve bitiş kodonlarına, ribozom bağlanma alanlarına, poliadenilasyon sinyallerine, transkripsiyon sonlandırma dizinlerine, üst akış düzenleyici alanlara, güçlendiricilere ve benzerlerine karşılık gelmektedir. Ökaryotik hücreler için uygun olan kontrol dizinleriyle ilgili örnekler promotörler, poliadenilasyon sinyalleri ve güçlendiricilerdir. İstenilen genin kopyalanması ve çevrimi için gerekli ve yeterli bulunduğu sürece, bu kontrol dizinlerinin hepsinin rekombinant vektörde bulunmasına gerek yoktur.

“Faal olarak veya “uygulanabilir şekilde” istenilen fonksiyonu gerçekleştirecek şekilde kodlama ve kontrol dizinlerinin tasarımına karşılık gelmektedir. Buna bağlı olarak, bir kodlama dizinine uygulanabilir şekilde bağlanan kontrol dizinleri kodlama dizininin ekspresyonu gerçekleştirebilmektedir. DNA polimerazı promotör dizine bağlandığında ve kodlama dizinini kodlanan proteine çevrilebilen mRNA’ya kopyalandığında, kodlama dizini uygulanabilir şekilde bir hücredeki transkripsiyonel düzenleyici bölgelere bağlanmaktadır veya bunların kontrolü altındadır. Ekspresyonu yönlendirmek işlevini gördüğü sürece, kontrol dizinlerinin kodlama dizinine bitişik olması gerekmemektedir. Dolayısıyla, örneğin hali hazırda kopyalanan çevrilmemiş dizinlerin araya girmesi durumu promotör dizin ile kodlama dizini arasında bulunmaktadır ve promotör dizinin hali

veya tamamı gibi esasen tam bir retrovirüs genomu olabilmektedir. Retrovirüse dayandırılan retroviral vektörlerle ilgili örnekler Cosset et al. tarafından (Journal of Virology (1991), cilt 65, sayfalar 3388-3394) açıklandığı gibi ALV retrovirüsüne dayandırılan NL retroviral vektörleridir (örneğin NLB). NLB, NLD ve NLA gibi NL vektörleri mevcut buluş yöntemlerinde kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır.

“Kodlama dizini” veya “açık okuma çerçevesi” uygun düzenleyici dizinlerin kontrolü altında yerleştirildiğinde canlı organizmada veya laboratuvar ortamında bir polipeptide kopyalanabilen ve çevrilebilen (DNA durumunda) veya dönüştürülebilen (mRNA durumunda) bir nükleotid dizinine karşılık gelmektedir. Kodlama dizinlerinin sınırları 5’ (amino) ucundaki bir çevrim başlangıç kodonuyla ve 3’ (karboksi) ucundaki çevrim durdurma kodonuyla belirlenmektedir. Çevrim sonlandırma dizini genellikle kodlama dizinine 3’ şeklinde yerleştirilecektir. Kodlama dizini çevrilmemiş bölgelerle 5’ ve/veya 3’ uçlarını yandan destekleyebilmektedir.

Nükleik asit “kontrol dizinleri” veya “düzenleyici dizinler” tanımlanan konakçı hücrede verilen kodlama dizininin kopyalanması ve çevrilmesi için gerekli ve yeterli olduğu üzere promotör dizinlere, çevrim başlangıç ve bitiş kodonlarına, ribozom bağlanma alanlarına, poliadenilasyon sinyallerine, transkripsiyon sonlandırma dizinlerine, üst akış düzenleyici alanlara, güçlendiricilere ve benzerlerine karşılık gelmektedir. Ökaryotik hücreler için uygun olan kontrol dizinleriyle ilgili örnekler promotörler, poliadenilasyon sinyalleri ve güçlendiricilerdir. İstenilen genin kopyalanması ve çevrimi için gerekli ve yeterli bulunduğu sürece, bu kontrol dizinlerinin hepsinin rekombinant vektörde bulunmasına gerek yoktur.

“Faal olarak veya “uygulanabilir şekilde” istenilen fonksiyonu gerçekleştirecek şekilde kodlama ve kontrol dizinlerinin tasarımına karşılık gelmektedir. Buna bağlı olarak, bir kodlama dizinine uygulanabilir şekilde bağlanan kontrol dizinleri kodlama dizininin ekspresyonu gerçekleştirebilmektedir. DNA polimerazı promotör dizine bağlandığında ve kodlama dizinini kodlanan proteine çevrilebilen mRNA’ya kopyalandığında, kodlama dizini uygulanabilir şekilde bir hücredeki transkripsiyonel düzenleyici bölgelere bağlanmaktadır veya bunların kontrolü altındadır. Ekspresyonu yönlendirmek işlevini gördüğü sürece, kontrol dizinlerinin kodlama dizinine bitişik olması gerekmemektedir. Dolayısıyla, örneğin hali hazırda kopyalanan çevrilmemiş dizinlerin araya girmesi durumu promotör dizin ile kodlama dizini arasında bulunmaktadır ve promotör dizinin hali

hazırda kodlama dizinine “uygulanabilir şekilde” bağlandığı düşünülmektedir.

“Heterolog” ve “ekzojen” terimleri kodlama dizinleri ve kontrol dizinleri gibi nükleik asit dizinleriyle ilgili oldukları için, normal olarak bir rekombinant yapı bölgesiyle veya belirli bir kromozom bölgesiyle birleştirilmeyen ve/veya normal olarak belirli bir hücreyle birleştirilmeyen dizinleri belirtmektedir. Buna bağlı olarak, nükleik asit yapısının “ekzojen” bölgesi doğal olarak diğer moleküle birleşik olmayan başka bir nükleik asit molekülünün içinde bulunan veya buna bağlanan tanımlanabilir bir nükleik asit bölümüdür. Örneğin, yapının ekzojen bölgesi doğal olarak kodlama diziniyle birleşik olmayan dizinlerle yandan desteklenen bir kodlama dizinini içerebilmektedir. Ekzojen kodlama diziniyle ilgili başka bir örnek, kodlama dizinin kendisinin doğada bulunmadığı bir yapıdır (örneğin doğal genden farklı kodonlara sahip sentetik dizinler). Benzer şekilde, normal olarak konakçı hücrede bulunmayan bir yapıyla veya nükleik asitle dönüştürülen konakçı hücre bu tarifnamenin amaçları doğrultusunda ekzojen olarak düşünülmektedir.

“Ekzojen protein” veya “heterolog protein” burada kullanıldığı şekliyle doğal olarak belirli bir dokuda veya hücrede bulunmayan bir proteine, ekzojen ekspresyon yapısına veya transjenine ait ekspresyon ürünü olan bir proteine veya doğal olarak belirli dokuda veya hücrede verilen miktarda bulunmayan bir proteine karşılık gelmektedir. Bir yumurtanın dışındaki bir protein yumurtlayan hayvanın transjeninde bulunan bir kodlama dizininin ekspresyonu sonucunda yumurtada bulunan bir protein olabilmektedir.

Burada açıklanan ekspresyon ürünleri tanımlanan kimyasal yapıya sahip proteinli bir maddeden oluşabilmektedir. Bununla birlikte, belli yapı özellikle proteinlerde yaygın olan kimyasal modifikasyonlar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Örneğin bütün proteinler iyonlaşabilir amino ve karboksil grupları içerdiği için, protein asidik veya bazik formda veya nötr formda elde edilebilmektedir. Birincil amino asit dizini şeker moleküller kullanılarak (glikosilasyon) veya çoğunlukla sakaridlerle birleştirildiğinde meydana gelecek şekilde örneğin lipitlere, fosfata, asetil gruplarına ve benzerlerine kovalent veya iyonik bağlanmayı içeren diğer kimyasal türetme yöntemleriyle türetilmektedir. Bu modifikasyonlar canlı organizmada veya laboratuvar ortamında meydana gelebilmektedir; bu ikincisi posttranslasyonel işlem sistemleri sayesinde bir konakçı hücreyle gerçekleştirilmektedir. Bu tür modifikasyonlar molekülün biyolojik aktivitesini arttırabilmektedir veya azaltabilmektedir ve bu şekilde kimyasal olarak değiştirilmiş moleküllerin ayrıca tarifnamenin kapsamına girmesi beklenmektedir.

hazırda kodlama dizinine “uygulanabilir şekilde” bağlandığı düşünülmektedir.

“Heterolog” ve “ekzojen” terimleri kodlama dizinleri ve kontrol dizinleri gibi nükleik asit dizinleriyle ilgili oldukları için, normal olarak bir rekombinant yapı bölgesiyle veya belirli bir kromozom bölgesiyle birleştirilmeyen ve/veya normal olarak belirli bir hücreyle birleştirilmeyen dizinleri belirtmektedir. Buna bağlı olarak, nükleik asit yapısının “ekzojen” bölgesi doğal olarak diğer moleküle birleşik olmayan başka bir nükleik asit molekülünün içinde bulunan veya buna bağlanan tanımlanabilir bir nükleik asit bölümüdür. Örneğin, yapının ekzojen bölgesi doğal olarak kodlama diziniyle birleşik olmayan dizinlerle yandan desteklenen bir kodlama dizinini içerebilmektedir. Ekzojen kodlama diziniyle ilgili başka bir örnek, kodlama dizininin kendisinin doğada bulunmadığı bir yapıdır (örneğin doğal genden farklı kodonlara sahip sentetik dizinler). Benzer şekilde, normal olarak konakçı hücrede bulunmayan bir yapıyla veya nükleik asitle dönüştürülen konakçı hücre bu tarifnamenin amaçları doğrultusunda ekzojen olarak düşünülmektedir.

“Ekzojen protein” veya “heterolog protein” burada kullanıldığı şekliyle doğal olarak belirli bir dokuda veya hücrede bulunmayan bir proteine, ekzojen ekspresyon yapısına veya transjenine ait ekspresyon ürünü olan bir proteine veya doğal olarak belirli dokuda veya hücrede verilen miktarda bulunmayan bir proteine karşılık gelmektedir. Bir yumurtanın dışındaki bir protein yumurtlayan hayvanın transjeninde bulunan bir kodlama dizininin ekspresyonu sonucunda yumurtada bulunan bir protein olabilmektedir.

Burada açıklanan ekspresyon ürünleri tanımlanan kimyasal yapıya sahip proteinli bir maddeden oluşabilmektedir. Bununla birlikte, belli yapı özellikle proteinlerde yaygın olan kimyasal modifikasyonlar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Örneğin bütün proteinler iyonlaşabilir amino ve karboksil grupları içerdiği için, protein asidik veya bazik formda veya nötr formda elde edilebilmektedir. Birincil amino asit dizini şeker moleküller kullanılarak (glikosilasyon) veya çoğunlukla sakaridlerle birleştirildiğinde meydana gelecek şekilde örneğin lipitlere, fosfata, asetil gruplarına ve benzerlerine kovalent veya iyonik bağlanmayı içeren diğer kimyasal türetme yöntemleriyle türetilmektedir. Bu modifikasyonlar canlı organizmada veya laboratuvar ortamında meydana gelebilmektedir; bu ikincisi posttranslasyonel işlem sistemleri sayesinde bir konakçı hücreyle gerçekleştirilmektedir. Bu tür modifikasyonlar molekülün biyolojik aktivitesini arttırabilmektedir veya azaltabilmektedir ve bu şekilde kimyasal olarak değiştirilmiş moleküllerin ayrıca tarifnamenin kapsamına girmesi beklenmektedir.

- “Vektör” tek zincir, çift zincir, dairesel veya aşırı sargılı DNA veya RNA’dan oluşan bir polinükleotid anlamına gelmektedir. Tipik bir vektör işlevsel gen ekspresyonunu sağlamak üzere faal olarak uygun uzaklıklarda bağlanan aşağıdaki elemanları içerebilmektedir: replikasyon kaynağı, promotör, güçlendirici, 5’ mRNA öncü dizini, ribozom bağlanma alanı, nükleik asit kaseti, sonlandırma ve poliadenilasyon alanları ve seçilebilir işaret dizinleri. Bu elemanlardan biri veya daha fazlası spesifik uygulamalarda çıkarılabilmektedir. Nükleik asit kaseti ifade edilecek olan nükleik asit dizininin sokulması için bir veya daha fazla sınırlama bölgesi içerebilmektedir. İşlevsel bir vektörde, nükleik asit kaseti çevrim başlatma ve sonlandırma alanları dahil olmak üzere ifade edilecek olan nükleik asit dizinini içermektedir. Yapıya bir intron isteğe bağlı olarak dahil edilebilmektedir, örneğin kodlama dizinine 5’ dahil edilmektedir. Vektör belirli kodlama dizini uygun düzenleyici dizinlerle birlikte vektöre yerleştirilecek şekilde yapılandırılmaktadır; kontrol dizinlerine göre kodlama dizininin yerleştirilmesi ve yönlendirilmesi, kodlama dizini kontrol edici veya düzenleyici dizinlerin “kontrolü” altında kopyalanacak şekilde gerçekleştirilmektedir. Söz konusu belirli proteini kodlayan dizinlerin modifikasyonu bu uca ulaşması istenebilmektedir. Örneğin, bazı durumlarda dizinin değiştirilmesi gerekli olabilmektedir; böylelikle uygun yönlendirmeye birlikte kontrol dizinlerine bağlanabilmektedir; veya okuma çerçevesini korumak için bağlanabilmektedir. Kontrol dizinleri ve diğer düzenleyici dizinler bir vektöre sokulmadan önce kodlama dizinine bağlanabilmektedir. Alternatif olarak, kodlama dizini hali hazırda kontrol dizinlerini ve kontrol dizinlerinin düzenleyici kontrolüyle birlikte ve bunların kontrolü altında olan uygun bir sınırlama alanını içeren bir ekspresyon vektörüne doğrudan klonlanabilmektedir.
- “Retroviral vektör” nükleotid dizinlerini bir hücreye taşımak için kullanılabilen bir retrovirüstür veya değiştirilmiş bir retrovirüstür. Virüs, viral vektör, retrovirüs ve retroviral vektör terimleri tarifname içerisinde birbiriyle değiştirilerek kullanılabilir.
- “Promotör” RNA polimerazının gen kopyalanmasını başlatmak için bağlandığı DNA üzerindeki bir alandır. Tarifnamedeki bazı durumlarda, promotör dizinlerin eklenmesiyle veya çıkarılmasıyla değiştirilecektir veya bir sentetik ve doğal dizin kombinasyonu olabilen dizinlerin yanı sıra doğal ve sentetik dizinler dahil olmak üzere alternatif dizinlerle değiştirilebilmektedir. Çoğu ökaryotik promotör iki tip doğrulama dizini içermektedir: TATA kutusu ve üst akış promotör elemanları. Kopyalama başlatma alanına

- “Vektör” tek zincir, çift zincir, dairesel veya aşırı sargılı DNA veya RNA’dan oluşan bir polinükleotid anlamına gelmektedir. Tipik bir vektör işlevsel gen ekspresyonunu sağlamak üzere faal olarak uygun uzaklıklarda bağlanan aşağıdaki elemanları içerebilmektedir: replikasyon kaynağı, promotör, güçlendirici, 5’ mRNA öncü dizini, ribozom bağlanma alanı, nükleik asit kaseti, sonlandırma ve poliadenilasyon alanları ve seçilebilir işaret dizinleri. Bu elemanlardan biri veya daha fazlası spesifik uygulamalarda çıkarılabilmektedir. Nükleik asit kaseti ifade edilecek olan nükleik asit dizininin sokulması için bir veya daha fazla sınırlama bölgesi içerebilmektedir. İşlevsel bir vektörde, nükleik asit kaseti çevrim başlatma ve sonlandırma alanları dahil olmak üzere ifade edilecek olan nükleik asit dizinini içermektedir. Yapıya bir intron isteğe bağlı olarak dahil edilebilmektedir, örneğin kodlama dizinine 5’ dahil edilmektedir. Vektör belirli kodlama dizini uygun düzenleyici dizinlerle birlikte vektöre yerleştirilecek şekilde yapılandırılmaktadır; kontrol dizinlerine göre kodlama dizininin yerleştirilmesi ve yönlendirilmesi, kodlama dizini kontrol edici veya düzenleyici dizinlerin “kontrolü” altında kopyalanacak şekilde gerçekleştirilmektedir. Söz konusu belirli proteini kodlayan dizinlerin modifikasyonu bu uca ulaşması istenebilmektedir. Örneğin, bazı durumlarda dizinin değiştirilmesi gerekli olabilmektedir; böylelikle uygun yönlendirmeye birlikte kontrol dizinlerine bağlanabilmektedir; veya okuma çerçevesini korumak için bağlanabilmektedir. Kontrol dizinleri ve diğer düzenleyici dizinler bir vektöre sokulmadan önce kodlama dizinine bağlanabilmektedir. Alternatif olarak, kodlama dizini hali hazırda kontrol dizinlerini ve kontrol dizinlerinin düzenleyici kontrolüyle birlikte ve bunların kontrolü altında olan uygun bir sınırlama alanını içeren bir ekspresyon vektörüne doğrudan klonlanabilmektedir.
- “Retroviral vektör” nükleotid dizinlerini bir hücreye taşımak için kullanılabilen bir retrovirüstür veya değiştirilmiş bir retrovirüstür. Virüs, viral vektör, retrovirüs ve retroviral vektör terimleri tarifname içerisinde birbiriyle değiştirilerek kullanılabilir.
- “Promotör” RNA polimerazının gen kopyalanmasını başlatmak için bağlandığı DNA üzerindeki bir alandır. Tarifnamedeki bazı durumlarda, promotör dizinlerin eklenmesiyle veya çıkarılmasıyla değiştirilecektir veya bir sentetik ve doğal dizin kombinasyonu olabilen dizinlerin yanı sıra doğal ve sentetik dizinler dahil olmak üzere alternatif dizinlerle değiştirilebilmektedir. Çoğu ökaryotik promotör iki tip doğrulama dizini içermektedir: TATA kutusu ve üst akış promotör elemanları. Kopyalama başlatma alanına

ait önceki yerleşik üst akış kopyalamayı doğru alanda başlatmak için RNA polimerazın yönlendirilmesine dahil edilmektedir, buna karşın bu ikincisinin kopyalama hızını belirlediği görülmektedir ve TATA kutusunun üst akışıdır. Güçlendirici elemanlar ayrıca bağlı promotörlerden kopyalamayı tetikleyebilmektedir, ancak birçoğu özellikle belirli bir hücre tipinde işlev görmektedir. Örneğin SV40 promotör, sitomegalovirüs (CMV) promotör, rous-sarkom virüsü (RSV) promotör ve maymun lösemi virüsü (MLV) promotör gibi virüslerden türetilen birçok güçlendirici/promotör elemanın hepsi çok çeşitli hücre tiplerinde aktiftir ve “yapılandırıcı” veya “yaygın” olarak adlandırılmaktadır. Yapılandırıcı olmayan promotörle ilgili bir örnek fare memeli tümör virüsü (MMTV) promotörüdür.

10 Klonlama alanına sokulan nükleik asit dizini söz konusu polipeptidi kodlayan herhangi bir açık okuma çerçevesine sahip olabilmektedir; kodlama dizininin söz konusu polipeptidi kodlaması şartıyla, uygun mRNA moleküllerinin üretimini bloke edebilen kriptik ek alanlardan yoksun olması ve/veya düzensiz şekilde eklenmiş veya anormal mRNA moleküllerini üretmesi gerekmektedir.

15

“İşaret geni” doğru şekilde transfekte edilen hücrelerin tanımlanması ve ayrılması amacıyla sağlanan bir proteini kodlayan bir gendir. Uygun işaret dizinleri sınırlayıcı olmayacak şekilde yeşil, sarı ve mavi floresan protein genlerini (sırasıyla GFP, YFP ve BFP) içermektedir. Uygun olan diğer işaretler timidin kinaz (tk), dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve aminoglikosid fosfotransferaz (APH) genlerini içermektedir. Bu ikincisi kanamisin, neomisin ve genetisin gibi aminoglikosid antibiyotiklerine karşı direnç göstermektedir. Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT), β -laktamaz, β -galaktosidaz (β -gal) gibi bunlar ve diğer işaret genleri istenilen proteini ifade eden genle birlikte birincil nükleik asit kasetiyle birleştirilebilmektedir veya seçici işaretler ayrı vektörlere dahil edilebilmektedir

20 ve birlikte transfekte edilebilmektedir.

25

“Plazmid” terimi burada kullanıldığı şekliyle tipik olarak ökaryotik bir hücrede yeniden üretilmeyen bir vektöre karşılık gelmektedir ve tipik olarak ökaryotik hücrenin genomuyla birleştirilmemektedir. Plazmidler özellikle geçici transfeksiyon üretiminde

30 faydalıdır.

“Raportör gen” kodladığı proteinin varlığıyla hücredeki aktivitesini “bildiren” bir işaret genidir.

35 “Replikasyondan yetersiz” virüs veya viral vektör kopyalama için gereken kendi

ait önceki yerleşik üst akış kopyalamayı doğru alanda başlatmak için RNA polimerazın yönlendirilmesine dahil edilmektedir, buna karşın bu ikincisinin kopyalama hızını belirlediği görülmektedir ve TATA kutusunun üst akışıdır. Güçlendirici elemanlar ayrıca bağlı promotörlerden kopyalamayı tetikleyebilmektedir, ancak birçoğu özellikle belirli bir hücre tipinde işlev görmektedir. Örneğin SV40 promotör, sitomegalovirüs (CMV) promotör, rous-sarkom virüsü (RSV) promotör ve maymun lösemi virüsü (MLV) promotör gibi virüslerden türetilen birçok güçlendirici/promotör elemanın hepsi çok çeşitli hücre tiplerinde aktiftir ve “yapılandırıcı” veya “yaygın” olarak adlandırılmaktadır. Yapılandırıcı olmayan promotörle ilgili bir örnek fare memeli tümör virüsü (MMTV) promotörüdür.

10 Klonlama alanına sokulan nükleik asit dizini söz konusu polipeptidi kodlayan herhangi bir açık okuma çerçevesine sahip olabilmektedir; kodlama dizininin söz konusu polipeptidi kodlaması şartıyla, uygun mRNA moleküllerinin üretimini bloke edebilen kriptik ek alanlardan yoksun olması ve/veya düzensiz şekilde eklenmiş veya anormal mRNA moleküllerini üretmesi gerekmektedir.

15

“İşaret geni” doğru şekilde transfekte edilen hücrelerin tanımlanması ve ayrılması amacıyla sağlanan bir proteini kodlayan bir gendir. Uygun işaret dizinleri sınırlayıcı olmayacak şekilde yeşil, sarı ve mavi floresan protein genlerini (sırasıyla GFP, YFP ve BFP) içermektedir. Uygun olan diğer işaretler timidin kinaz (tk), dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve aminoglikosid fosfotransferaz (APH) genlerini içermektedir. Bu ikincisi kanamisin, neomisin ve genetisin gibi aminoglikosid antibiyotiklerine karşı direnç göstermektedir. Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT), β -laktamaz, β -galaktosidaz (β -gal) gibi bunlar ve diğer işaret genleri istenilen proteini ifade eden genle birlikte birincil nükleik asit kasetiyle birleştirilebilmektedir veya seçici işaretler ayrı vektörlere dahil edilebilmektedir

20 ve birlikte transfekte edilebilmektedir.

25

“Plazmid” terimi burada kullanıldığı şekliyle tipik olarak ökaryotik bir hücrede yeniden üretilmeyen bir vektöre karşılık gelmektedir ve tipik olarak ökaryotik hücrenin genomuyla birleştirilmemektedir. Plazmidler özellikle geçici transfeksiyon üretiminde

30 faydalıdır.

“Raportör gen” kodladığı proteinin varlığıyla hücredeki aktivitesini “bildiren” bir işaret genidir.

35 “Replikasyondan yetersiz” virüs veya viral vektör kopyalama için gereken kendi

genomundan bir eleman eksik olan virüs veya viral vektördür.

“Retroviral parçacık”, “aktarıcı parçacık” veya “transdüksiyon parçacığı” viral olmayan DNA veya RNA’yı bir hücreye aktarabilen replikasyondan yetersiz veya replikasyon
5 açısından yetkin bir virüse veya retrovirüse karşılık gelmektedir.

“Transformasyon”, “transdüksiyon” ve “transfeksiyon” terimlerinin tümü bir polinükleotidin bir hücreye sokulmasını belirtmektedir.

10 “Magnum” infundibulum ile yumurtanın beyazındaki proteinleri sentezleyen ve salgılayan boru şekilli bez hücrelerini içeren istmus arasındaki yumurta kalanının bir parçasıdır.

“Optimize edilmiş” terimi “optimize edilmiş kodlama dizini” kapsamında kullanılmaktadır; burada her belirli amino asit için en sık kullanılan kodonlar yumurta beyazı
15 proteinlerindeki yumurta albüminlerinde, lizozimlerinde, ovomükoidlerinde bulunmaktadır ve mevcut tarifnameye göre üretilen retroviral vektörlere veya parçacıklara sokulabilen ovotransferin optimize edilmiş polinükleotid dizinini kodlayıcı ekzojen proteininin tasarımında kullanılmaktadır. Daha spesifik olarak, optimize edilen DNA dizini tavuk yumurta kanalı optimize edilmiş kodon kullanımına dayandırılmaktadır
20 ve tavuk (*Gallus gallus*) yumurta albümini, lizozimi, ovomükoidi ve ovotransferin proteinlerinden derlenen bir kodon kullanım tablosuna sahip Wisconsin Paketi, Versiyon 9.1 BACKTRANSLATE programı (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wis.) kullanılarak üretilmektedir. Örneğin, dört yumurta beyazı proteinlerindeki amino asit alanine ait dört kodonun kullanım yüzdesi GCU için %34, GCC için %31, GCA için %26 ve
25 GCG için %8’dir. Bu sebeple, GCU optimize edilmiş insan IFN- α 2b kodlama dizininde alaninlerin çoğu için kodon olarak kullanılmaktadır; bu amino asit dizini bu alanda iyi bilinmektedir. Optimize edilmiş insan IFN- α 2b için gen içeren vektörler dokularında ve yumurtadaki transjenik kümes hayvanlarından türetilen IFN- α 2b’yi (TPD IFN- α 2b) ifade eden transjenik kuşları yaratmak için kullanılmaktadır. Benzer şekilde, yukarıdaki yöntem
30 dokularında ve yumurtadaki transjenik kümes hayvanlarından türetilen eritropoietini (TPD EPO) ifade eden transjenik kuşları yaratmak amacıyla optimize edilmiş insan eritropoietin (EPO) polinükleotid dizininin tasarımı için kullanılmaktadır.

Tarifname embriyon hücreleri dahil olmak üzere örneğin kuş hücreleri gibi hücreleri

genomundan bir eleman eksik olan virüs veya viral vektördür.

“Retroviral parçacık”, “aktarıcı parçacık” veya “transdüksiyon parçacığı” viral olmayan DNA veya RNA’yı bir hücreye aktarabilen replikasyondan yetersiz veya replikasyon
5 açısından yetkin bir virüse veya retrovirüse karşılık gelmektedir.

“Transformasyon”, “transdüksiyon” ve “transfeksiyon” terimlerinin tümü bir polinükleotidin bir hücreye sokulmasını belirtmektedir.

10 “Magnum” infundibulum ile yumurtanın beyazındaki proteinleri sentezleyen ve salgılayan boru şekilli bez hücrelerini içeren istmus arasındaki yumurta kalanının bir parçasıdır.

“Optimize edilmiş” terimi “optimize edilmiş kodlama dizini” kapsamında kullanılmaktadır; burada her belirli amino asit için en sık kullanılan kodonlar yumurta beyazı
15 proteinlerindeki yumurta albüminlerinde, lizozimlerinde, ovomükoidlerinde bulunmaktadır ve mevcut tarifnameye göre üretilen retroviral vektörlere veya parçacıklara sokulabilen ovotransferin optimize edilmiş polinükleotid dizinini kodlayıcı ekzojen proteininin tasarımı kullanılmaktadır. Daha spesifik olarak, optimize edilen DNA dizini tavuk yumurta kanalı optimize edilmiş kodon kullanımına dayandırılmaktadır
20 ve tavuk (*Gallus gallus*) yumurta albümini, lizozimi, ovomükoidi ve ovotransferin proteinlerinden derlenen bir kodon kullanım tablosuna sahip Wisconsin Paketi, Versiyon 9.1 BACKTRANSLATE programı (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wis.) kullanılarak üretilmektedir. Örneğin, dört yumurta beyazı proteinlerindeki amino asit alanine ait dört kodonun kullanım yüzdesi GCU için %34, GCC için %31, GCA için %26 ve
25 GCG için %8’dir. Bu sebeple, GCU optimize edilmiş insan IFN- α 2b kodlama dizininde alaninlerin çoğu için kodon olarak kullanılmaktadır; bu amino asit dizini bu alanda iyi bilinmektedir. Optimize edilmiş insan IFN- α 2b için gen içeren vektörler dokularında ve yumurtadaki transjenik kümes hayvanlarından türetilen IFN- α 2b’yi (TPD IFN- α 2b) ifade eden transjenik kuşları yaratmak için kullanılmaktadır. Benzer şekilde, yukarıdaki yöntem
30 dokularında ve yumurtadaki transjenik kümes hayvanlarından türetilen eritropoietini (TPD EPO) ifade eden transjenik kuşları yaratmak amacıyla optimize edilmiş insan eritropoietin (EPO) polinükleotid dizininin tasarımı için kullanılmaktadır.

Tarifname embriyon hücreleri dahil olmak üzere örneğin kuş hücreleri gibi hücreleri

aktarabilen viral parçacıkların üretimiyle ilgilidir. Özellikle, replikasyondan yetersiz retroviral vektörler tarifnameye göre üretilebilmektedir.

5 Tarifname kuş hücreleri gibi mevcut tarifnameye göre kullanılacak olan faydalı olan her hücrenin uygulanmasını tasarlamaktadır. Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, burada kullanılan hücreler ölümsüzdür; başka bir deyişle, hücreler kültürde sürekli olarak büyüyebilmektedir.

10 Tarifnamenin bununla sınırlandırılmamasına rağmen, fibroblast hücrelerin (yani fibroblast hücre hattı) burada açıklandığı gibi özellikle faydalı oldukları gösterilmektedir. Örneğin, tarifname insan fibroblast hücreleri, tavşan fibroblast hücreleri, sığır fibroblast hücreleri, sürüngen fibroblast hücreleri, balıklara ait fibroblast hücreleri veya diğer faydalı fibroblast hücrelerinin kullanımını tasarlamaktadır. Tarifnamenin özellikle faydalı bir
15 açısında, kuş fibroblast hücreleri kullanılmaktadır. Tarifname belirli herhangi bir kuş fibroblast hücresinin kullanımıyla sınırlandırılmamaktadır; bununla birlikte, fibroblast hücrelerinin tarifnameye göre türetilbildiği kuşlarla ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde hindi, ördek, kaz, bıldırcın, sülün, papağan, saka, şahin, karga ve devekuşu, koşucu devekuşu ve tepeli devekuşu dahil olmak üzere uçamayan kuşları içermektedir. Burada
20 açıklandığı şekliyle kullanım için özellikle faydalı olan bir kuş fibroblast hücresi tipi tavuk fibroblast hücresidir. Sınırlayıcı olmayacak şekilde Beyaz Legorn, Kahverengi Legorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox ve Kaliforniya Grisi gibi çok çeşitli tavuk türlerinden (yani Gallus gallus) birine ait fibroblast hücreleri kullanılabilmektedir.

25 Fibroblast hücreleri tipik olarak bağlayıcı dokuda bulunan hücrelerdir veya bağlayıcı dokuyu meydana getiren hücrelerdir. Bir açıda, fibroblast hücreleri kolajen meydana getirmektedir. Fibroblast hücreleri kolajen açısından zengin hücre dışı bir matris salgılayan hücreler olarak tanımlanabilmektedir. Fibroblast hücreleri çok çeşitli kaynaklardan türetilmektedir. Örneğin, tarifname kas dokusu gibi dokulardan veya
30 karaciğer, deri ve akciğer gibi organlardan elde edilen fibroblast hücrelerini tasarlamaktadır. Bir durumda, tarifname örneğin ölümsüz tavuk embriyo fibroblast hücre hatları gibi tavuk embriyo fibroblast hücrelerine benzer embriyo fibroblast hücrelerinin kullanımını tasarlamaktadır. Özellikle faydalı olan fibroblast hücre hattı (DF-1) 30 Eylül 1997 tarihinde yayınlanan US Patenti No. 5,672,485'de açıklanmaktadır.

aktarabilen viral parçacıkların üretimiyle ilgilidir. Özellikle, replikasyondan yetersiz retroviral vektörler tarifnameye göre üretilmektedir.

5 Tarifname kuş hücreleri gibi mevcut tarifnameye göre kullanılacak olan faydalı olan her hücrenin uygulanmasını tasarlamaktadır. Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, burada kullanılan hücreler ölümsüzdür; başka bir deyişle, hücreler kültürde sürekli olarak büyüebilmektedir.

10 Tarifnamenin bununla sınırlandırılmamasına rağmen, fibroblast hücrelerin (yani fibroblast hücre hattı) burada açıklandığı gibi özellikle faydalı oldukları gösterilmektedir. Örneğin, tarifname insan fibroblast hücreleri, tavşan fibroblast hücreleri, sığır fibroblast hücreleri, sürüngen fibroblast hücreleri, balıklara ait fibroblast hücreleri veya diğer faydalı fibroblast hücrelerinin kullanımını tasarlamaktadır. Tarifnamenin özellikle faydalı bir
15 açısında, kuş fibroblast hücreleri kullanılmaktadır. Tarifname belirli herhangi bir kuş fibroblast hücresinin kullanımıyla sınırlandırılmamaktadır; bununla birlikte, fibroblast hücrelerinin tarifnameye göre türetilbildiği kuşlarla ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde hindi, ördek, kaz, bıldırcın, sülün, papağan, saka, şahin, karga ve devekuşu, koşucu devekuşu ve tepeli devekuşu dahil olmak üzere uçamayan kuşları içermektedir. Burada
20 açıklandığı şekliyle kullanım için özellikle faydalı olan bir kuş fibroblast hücresi tipi tavuk fibroblast hücresidir. Sınırlayıcı olmayacak şekilde Beyaz Legorn, Kahverengi Legorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Minorca, Amrox ve Kaliforniya Grisi gibi çok çeşitli tavuk türlerinden (yani Gallus gallus) birine ait fibroblast hücreleri kullanılabilmektedir.

25 Fibroblast hücreleri tipik olarak bağlayıcı dokuda bulunan hücrelerdir veya bağlayıcı dokuyu meydana getiren hücrelerdir. Bir açıda, fibroblast hücreleri kolajen meydana getirmektedir. Fibroblast hücreleri kolajen açısından zengin hücre dışı bir matris salgılayan hücreler olarak tanımlanabilmektedir. Fibroblast hücreleri çok çeşitli kaynaklardan türetilmektedir. Örneğin, tarifname kas dokusu gibi dokulardan veya
30 karaciğer, deri ve akciğer gibi organlardan elde edilen fibroblast hücrelerini tasarlamaktadır. Bir durumda, tarifname örneğin ölümsüz tavuk embriyo fibroblast hücre hatları gibi tavuk embriyo fibroblast hücrelerine benzer embriyo fibroblast hücrelerinin kullanımını tasarlamaktadır. Özellikle faydalı olan fibroblast hücre hattı (DF-1) 30 Eylül 1997 tarihinde yayınlanan US Patenti No. 5,672,485'de açıklanmaktadır.

Tarifname belirli nükleotid dizinlerinin, yani replikasyondan yetersiz retrovirüsleri kodlayan nükleotid dizinlerinin ve örneğin gag, pol ve env proteinlerden ikisi veya daha fazlası gibi replikasyondan yetersiz retrovirüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerin hücrelere sokulmasını tasarlamaktadır. Gerekli ürünler tipik olarak retrovirüsü kopyalamak veya çoğaltmak için gerekli olan biyomoleküllerdir. Örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde retrovirüsü kopyalamak ve çoğaltmak için gerekli olan proteinler viral polimeraz; viral zarfta bulunan bir veya daha fazla protein; kapsitte bulunan bir veya daha fazla protein olabilmektedir.

10 Hücrelere sokulan nükleotid dizinleri herhangi faydalı bir formda olabilmektedir. Örneğin, nükleotid dizinleri DNA veya RNA olabilmektedir. Hücrelere sokulan nükleotid dizinleri lineer formda veya dairesel formda olabilmektedir. Bir durumda, nükleotid dizinleri dairesel bir vektöre dahil edilmektedir. Bir düzenlemede, kuş retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini DNA'dır.

15

Faydalı olan her vektör mevcut tarifnamede kullanılabilmektedir. Tipik olarak, tarifnamedeki vektörler üretim için kullanılan hücrelerin genomuyla birleştirilecek şekilde tasarlanmamaktadır ve ayrıca hücrenin içerisine kopyalanacak şekilde tasarlanmamaktadır. Plazmidler veya fajmidler gibi ticari olarak elde edilebilen çoğu vektör pBluescript®, pBR322, pUC19, pDRIVE ve diğerleri gibi tarifnameye göre kullanılabilecek şekilde sağlanmaktadır.

20

Nükleotid dizinleri faydalı olan herhangi bir yöntemle geçici olarak hücreye sokulmaktadır. Örneğin, nükleotid dizinleri drendrimerler, PEI, polilislin ve poliamin ve diğer tekniklerin yanı sıra her biri bu alanda uzman olan biri tarafından anlaşıldığı üzere örneğin elektroporasyon, kalsiyum fosfat çökeltmesi, mikro enjeksiyon, sonikasyon, mikro parçacık bombardımanı gibi teknikler kullanılarak hücrelere sokulabilmektedir. Özellikle faydalı bir düzenlemede, nükleotid dizinlerinin hücrelere sokulması örneğin lipofeksiyon gibi transfeksiyonla gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin lipofeksiyon yoluyla transfekte edilmesiyle ilgili yöntemler bu alanda iyi bilinmektedir. Buluşa göre kullanılabilen lipofeksiyon reaktif maddelerle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde DMRIE C, FuGENE ve Lipofectamine™ içermektedir.

30

Mevcut buluşun yöntemleriyle, mevcut buluşa göre üretilen viral parçacıklarda bulunan transjenler transjenik tavuk, transjenik hindi, transjenik bıldırcın ve kendi germ hattı

35

Tarifname belirli nükleotid dizinlerinin, yani replikasyondan yetersiz retrovirüsleri kodlayan nükleotid dizinlerinin ve örneğin gag, pol ve env proteinlerden ikisi veya daha fazlası gibi replikasyondan yetersiz retrovirüsün kopyalanması için gerekli ürünleri kodlayan nükleotid dizinlerin hücrelere sokulmasını tasarlamaktadır. Gerekli ürünler tipik olarak retrovirüsü kopyalamak veya çoğaltmak için gerekli olan biyomoleküllerdir. Örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde retrovirüsü kopyalamak ve çoğaltmak için gerekli olan proteinler viral polimeraz; viral zarfta bulunan bir veya daha fazla protein; kapsitte bulunan bir veya daha fazla protein olabilmektedir.

10 Hücrelere sokulan nükleotid dizinleri herhangi faydalı bir formda olabilmektedir. Örneğin, nükleotid dizinleri DNA veya RNA olabilmektedir. Hücrelere sokulan nükleotid dizinleri lineer formda veya dairesel formda olabilmektedir. Bir durumda, nükleotid dizinleri dairesel bir vektöre dahil edilmektedir. Bir düzenlemede, kuş retroviral vektörü kodlayan nükleotid dizini DNA'dır.

15

Faydalı olan her vektör mevcut tarifnamede kullanılabilmektedir. Tipik olarak, tarifnamedeki vektörler üretim için kullanılan hücrelerin genomuyla birleştirilecek şekilde tasarlanmamaktadır ve ayrıca hücrenin içerisine kopyalanacak şekilde tasarlanmamaktadır. Plazmidler veya fajmidler gibi ticari olarak elde edilebilen çoğu vektör pBluescript®, pBR322, pUC19, pDRIVE ve diğerleri gibi tarifnameye göre kullanılabilecek şekilde sağlanmaktadır.

20

Nükleotid dizinleri faydalı olan herhangi bir yöntemle geçici olarak hücreye sokulmaktadır. Örneğin, nükleotid dizinleri drendrimerler, PEI, polilislin ve poliamin ve diğer tekniklerin yanı sıra her biri bu alanda uzman olan biri tarafından anlaşıldığı üzere örneğin elektroporasyon, kalsiyum fosfat çökeltmesi, mikro enjeksiyon, sonikasyon, mikro parçacık bombardımanı gibi teknikler kullanılarak hücrelere sokulabilmektedir. Özellikle faydalı bir düzenlemede, nükleotid dizinlerinin hücrelere sokulması örneğin lipofeksiyon gibi transfeksiyonla gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin lipofeksiyon yoluyla transfekte edilmesiyle ilgili yöntemler bu alanda iyi bilinmektedir. Buluşa göre kullanılabilen lipofeksiyon reaktif maddelerle ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde DMRIE C, FuGENE ve Lipofectamine™ içermektedir.

30

Mevcut buluşun yöntemleriyle, mevcut buluşa göre üretilen viral parçacıklarda bulunan transjenler transjenik tavuk, transjenik hindi, transjenik bıldırcın ve kendi germ hattı

35

dokusundaki genetik maddede transjen taşıyan diğer kuş türlerini üretmek için kuş embriyon blastodermal hücrelerine sokulabilmektedir. Blastodermal hücreler aşama I-XII hücreleri veya eşdeğerleri olabilmektedir ve tipik olarak X aşamasına (örneğin aşama VII-aşama XII) yakındır. Burada açıklandığı gibi üretilen retroviral parçacıklar ayrıca aşama 5 13-aşama 30 arasındaki embriyolar dahil olmak üzere ileri aşamadaki embriyolardan primordiyal germ hücrelerinin transdüksiyonunda kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır. Tipik olarak ancak tek olmayacak şekilde, blastodermal hücreler sert kabuklu yumurtanın içerisinde bulunmaktadır. Transjenik kuşların üretiminde faydalı olan hücreler embriyonik germ (EG) hücreleri, embriyonik kök (ES) hücreleri ve primordiyal germ 10 hücreleri (PGC'ler) olarak adlandırılan hücreleri içermektedir. Embriyonik blastodermal hücreler kültür içerisinde taze şekilde tutularak ayrılabilir ve özellikle faydalı bir düzenlemede bir embriyoda doğal yerinde kalmaktadır.

Buluşa göre üretilen viral parçacıklarla ilgili örnekler örneğin transjenik bir hayvan 15 hücresi gibi konakçı bir hücrede faydalı proteinin ekspresyonunu sağlayan bir promotöre bağlanan faydalı bir protein için bir kodlama dizini içeren replikasyondan yetersiz viral parçacıkları içermektedir. Örneğin, faydalı protein bir insan proteini veya burada açıklananlar gibi başka faydalı bir protein olabilmektedir. Bir düzenlemede, viral parçacıklar örneğin kuşun yumurta kanalı dokusu gibi spesifik kuş dokularında ekzojen 20 proteinleri üretmek için kullanılabilir. Özellikle faydalı bir düzenlemede, viral parçacıklar ekzojen protein içeren yumurtaları yumurtalayan kuşların üretilmesiyle ilgili yöntemlerde kullanılmaktadır.

Tarifnamedeki belirli bir durumda, NLB gibi ALV bazlı bir vektöre benzer bir kuş 25 retroviral vektörü rous sarkom virüsü (RSV) gag-pol ekspresyon vektörüyle ve örneğin veziküler stomatit virüse (VSV-G) veya ALV'ye (envA) ait zarf proteini gibi bir zarf proteinini ifade eden üçüncü bir vektörle birlikte DF-1 hücreleri (örneğin lipofeksiyon yoluyla) gibi bir fibroblast hücre hattına (örneğin tavuk fibroblast hücre hattı) birlikte transfekte edilmektedir. 48 Saat sonra, araç toplanmaktadır ve yüksek titreli ALV bazlı 30 retroviral parçacıklar içermektedir. Virüs parçacıkları çok daha yüksek titrelere ulaşmak için santrifüj yoluyla yoğunlaştırılabilir. Tarifnamedeki belirli durumda, hücreler ayrıca viral titrede artış sağlayan sodyum butiratla işleme tabi tutulmaktadır.

Bir düzenlemede, burada açıklandığı gibi üretilen viral parçacıkların genomunda, ekzojen 35 protein kodlama dizini ve promotörün her ikisi de 5' ile 3' LTR'lerin arasına

dokusundaki genetik maddede transjen taşıyan diğer kuş türlerini üretmek için kuş embriyon blastodermal hücrelerine sokulabilmektedir. Blastodermal hücreler aşama I-XII hücreleri veya eşdeğerleri olabilmektedir ve tipik olarak X aşamasına (örneğin aşama VII-aşama XII) yakındır. Burada açıklandığı gibi üretilen retroviral parçacıklar ayrıca aşama 5 13-aşama 30 arasındaki embriyolar dahil olmak üzere ileri aşamadaki embriyolardan primordiyal germ hücrelerinin transdüksiyonunda kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır. Tipik olarak ancak tek olmayacak şekilde, blastodermal hücreler sert kabuklu yumurtanın içerisinde bulunmaktadır. Transjenik kuşların üretiminde faydalı olan hücreler embriyonik germ (EG) hücreleri, embriyonik kök (ES) hücreleri ve primordiyal germ 10 hücreleri (PGC'ler) olarak adlandırılan hücreleri içermektedir. Embriyonik blastodermal hücreler kültür içerisinde taze şekilde tutularak ayrılabilir ve özellikle faydalı bir düzenlemede bir embriyoda doğal yerinde kalmaktadır.

Buluşa göre üretilen viral parçacıklarla ilgili örnekler örneğin transjenik bir hayvan 15 hücresi gibi konakçı bir hücrede faydalı proteinin ekspresyonunu sağlayan bir promotöre bağlanan faydalı bir protein için bir kodlama dizini içeren replikasyondan yetersiz viral parçacıkları içermektedir. Örneğin, faydalı protein bir insan proteini veya burada açıklananlar gibi başka faydalı bir protein olabilmektedir. Bir düzenlemede, viral parçacıklar örneğin kuşun yumurta kanalı dokusu gibi spesifik kuş dokularında ekzojen 20 proteinleri üretmek için kullanılabilir. Özellikle faydalı bir düzenlemede, viral parçacıklar ekzojen protein içeren yumurtaları yumurtalayan kuşların üretilmesiyle ilgili yöntemlerde kullanılmaktadır.

Tarifnamedeki belirli bir durumda, NLB gibi ALV bazlı bir vektöre benzer bir kuş 25 retroviral vektörü rous sarkom virüsü (RSV) gag-pol ekspresyon vektörüyle ve örneğin veziküler stomatit virüse (VSV-G) veya ALV'ye (envA) ait zarf proteini gibi bir zarf proteinini ifade eden üçüncü bir vektörle birlikte DF-1 hücreleri (örneğin lipofeksiyon yoluyla) gibi bir fibroblast hücre hattına (örneğin tavuk fibroblast hücre hattı) birlikte transfekte edilmektedir. 48 Saat sonra, araç toplanmaktadır ve yüksek titreli ALV bazlı 30 retroviral parçacıklar içermektedir. Virüs parçacıkları çok daha yüksek titrelere ulaşmak için santrifüj yoluyla yoğunlaştırılabilir. Tarifnamedeki belirli durumda, hücreler ayrıca viral titrede artış sağlayan sodyum butiratla işleme tabi tutulmaktadır.

Bir düzenlemede, burada açıklandığı gibi üretilen viral parçacıkların genomunda, ekzojen 35 protein kodlama dizini ve promotörün her ikisi de 5' ile 3' LTR'lerin arasına

yerleştirilmektedir. Vektör bir işaret nükleotid dizini içerebilmektedir; burada işaret nükleotid dizini uygulanabilir şekilde bir promotöre bağlanmaktadır.

5 Bir durumda, tarifnameye göre üretilen viral vektörler uygulanabilir şekilde ekzojen protein kodlama dizinine bağlanan bir sinyal peptid kodlama dizini içermektedir; böylelikle bir hücrede çevrilerek, sinyal peptidi vektörle ifade edilen ekzojen proteinin yumurta beyazına doğrudan salgılanacaktır ve ekzojen protein sert kabuklu bir yumurtanın içinde paketleneyecektir.

10 Belirli durumlarda, mevcut tarifnamedeki vektörün embriyonik blastodermal hücrelerine sokulması taze olarak ayrılan veya kültürde bulunan embriyonik blastodermal hücrelerle gerçekleştirilmektedir. Transjenik hücreler daha sonra tipik olarak bir yumurtadaki alıcı blastodermin altındaki alt germinal oyuğa enjekte edilmektedir. Bazı durumlarda, bununla birlikte vektör doğrudan doğal yerinde blastodermel embriyonun alt germinal oyuğuna
15 dağıtılmaktadır.

Buluşun bir düzenlemesinde, blastodermal hücrelerin transfekte edilmesi ve kuş genomunda sabit entegrasyonun oluşturulması için kullanılan viral parçacıklar kuş yumurta kanalının büyük deliğinde bulunan boru şekilli bez hücrelerindeki kodlama
20 dizinini ifade etmek için işlevsel ve konumsal ilişkide olan bir kodlama dizinini ve bir promotörü içermektedir; burada kodlama dizini sert kabuklu yumurtanın beyazında biriken ekzojen protein için kodlamaktadır. Promotör ovalbumin promotör, ovomükoid promotör veya lizozim promotör gibi boru şekilli bez hücrelerinde özellikle aktif olan (yani çok fazla ifade edilen) promotörün bir parçası olabilmektedir. Bu sebeple, bir
25 düzenlemede promotör yapılandırıcı olmayan bir promotördür. Buluş bu tür promotörlerin kesilmesini ve/veya promotörlere ait kritik düzenleyici elemanların yoğunlaştırılmasını tasarlamaktadır; böylelikle hali hazırda viral parçacıkların genomuyla birleştirilebilecek kadar küçük olmasına karşın, yumurta kanalının büyük deliğinde bulunan boru şekilli bez hücrelerinde ekspresyon için gerekli olan dizinleri tutmaktadır.

30 Buluş ayrıca bir füzyon proteininin kullanımını tasarlamaktadır. Özellikle faydalı olan başka bir düzenlemede, promotör örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde sitomegalovirüs (CMV) promotör, rous-sarkom virüsü (RSV) promotör, maymun lösemi virüsü (MLV) promotör veya beta-aktin promotör veya LTR promotör gibi yapılandırıcı bir promotördür.

yerleştirilmektedir. Vektör bir işaret nükleotid dizini içerebilmektedir; burada işaret nükleotid dizini uygulanabilir şekilde bir promotöre bağlanmaktadır.

5 Bir durumda, tarifnameye göre üretilen viral vektörler uygulanabilir şekilde ekzojen protein kodlama dizinine bağlanan bir sinyal peptid kodlama dizini içermektedir; böylelikle bir hücrede çevrilerek, sinyal peptidi vektörle ifade edilen ekzojen proteinin yumurta beyazına doğrudan salgılanacaktır ve ekzojen protein sert kabuklu bir yumurtanın içinde paketleneyecektir.

10 Belirli durumlarda, mevcut tarifnamedeki vektörün embriyonik blastodermal hücrelerine sokulması taze olarak ayrılan veya kültürde bulunan embriyonik blastodermal hücrelerle gerçekleştirilmektedir. Transjenik hücreler daha sonra tipik olarak bir yumurtadaki alıcı blastodermin altındaki alt germinal oyuğa enjekte edilmektedir. Bazı durumlarda, bununla birlikte vektör doğrudan doğal yerinde blastodermel embriyonun alt germinal oyuğuna
15 dağıtılmaktadır.

Buluşun bir düzenlemesinde, blastodermal hücrelerin transfekte edilmesi ve kuş genomunda sabit entegrasyonun oluşturulması için kullanılan viral parçacıklar kuş yumurta kanalının büyük deliğinde bulunan boru şekilli bez hücrelerindeki kodlama
20 dizinini ifade etmek için işlevsel ve konumsal ilişkide olan bir kodlama dizinini ve bir promotörü içermektedir; burada kodlama dizini sert kabuklu yumurtanın beyazında biriken ekzojen protein için kodlamaktadır. Promotör ovalbumin promotör, ovomükoid promotör veya lizozim promotör gibi boru şekilli bez hücrelerinde özellikle aktif olan (yani çok fazla ifade edilen) promotörün bir parçası olabilmektedir. Bu sebeple, bir
25 düzenlemede promotör yapılandırıcı olmayan bir promotördür. Buluş bu tür promotörlerin kesilmesini ve/veya promotörlere ait kritik düzenleyici elemanların yoğunlaştırılmasını tasarlamaktadır; böylelikle hali hazırda viral parçacıkların genomuyla birleştirilebilecek kadar küçük olmasına karşın, yumurta kanalının büyük deliğinde bulunan boru şekilli bez hücrelerinde ekspresyon için gerekli olan dizinleri tutmaktadır.

30 Buluş ayrıca bir füzyon proteininin kullanımını tasarlamaktadır. Özellikle faydalı olan başka bir düzenlemede, promotör örneğin ve sınırlayıcı olmayacak şekilde sitomegalovirüs (CMV) promotör, rous-sarkom virüsü (RSV) promotör, maymun lösemi virüsü (MLV) promotör veya beta-aktin promotör veya LTR promotör gibi yapılandırıcı bir promotördür.

Tarifnamedeki bir durumda, promotör bir sitomegalovirüs (CMV) promotör, rous-sarkom virüsü (RSV) promotör, maymun lösemi virüsü (MLV) promotör, beta-aktin promotör, fare memeli tümör virüsü (MMTV) promotör, LTR promotör, ovalbümin promotör, lizozim promotör, konalbümin promotör, ovomükoid promotör, ovomusun promotör ve ovotransferin promotör veya bunların kombinasyonlarıdır. Tarifnamedeki bir durumda, promotör bir ovalbümin-, lizozim-, konalbümin-, ovomükoid-, ovomusun- ve ovotransferin promotör parçası gibi bir promotör alana ait parçayı içermektedir. Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, promotör CMV promotörün en az bir parçasını içermektedir.

İstenildiğinde, buluşa göre üretilen dönüştürücü parçaların (yani transdüksiyon parçacıkları) bu alanda uzman biri tarafından anlaşıldığı gibi faydalı olan herhangi bir yöntemle titre edilebilmektedir. Örneğin viral genom neomisin dirençli gen gibi bir işaret içeriyorsa, parçacıklar hücrelerin transdüksiyonuyla ve kolonilerin kaplanması ve sayılması işlemleriyle takip edilen seri seyreltme yoluyla titre edilebilmektedir. Bir düzenlemede, titre canlı genoma melezlemeyle (örneğin bu alanda uzman kişilerce anlaşıldığı gibi viral nükleik aside (RNA veya DNA) ait ölçülen bir lekenin sayısal yoğunluk ölçümü) belirlenmektedir. Sayısal viral kaplama proteiniyle ilgili immüno floresan veya ELISA analizi ve viral genomdan ters transkripsiyon ürününün sayısal PCR'si gibi viral genomla ilgili sayısal PCR ayrıca kullanılabilir.

20

Bir durumda, tarifnamedeki viral parçacıklar örneğin Speksnijder prosedürüne (US Pat. No. 5,897,998) göre yumurta pencereleme yöntemleriyle kuş blastodermal hücrelerine sokulmaktadır. Başka bir deyişle, viral parçacıklar örneğin embriyonun alt germinal oyuğuna sokularak doğal yerinde blastodermal hücrelerine sokulmaktadır. Sokma işleminden sonra (örneğin enjeksiyon), yumurtalar yaklaşık olarak 21 gün sonra çatlamaktadır. Tipik olarak, erkek kuşlar üreme için seçilmektedir. Spermelerinde transjen (örneğin sokulan nükleotid dizini) içeren G0 horozları elemek amacıyla, DNA horoz sperm örneklerinden çıkarılmaktadır. Sperm örneklerinde en yüksek transjen seviyelerine sahip G0 horozları yapay döllemeyle transjenik olmayan tavuklarla üremektedir. Kan DNA örnekleri transjenin varlığı açısından elenmektedir ve ekzojen protein üretimi için üretilen kuşların durumunda, kan ekzojen protein açısından tahlil edilebilmektedir (örneğin ELISA). Ekzojen proteinin varlığı onaylanırsa, G1 transjenik horozların spermi transjenik olmayan tavukların yapay döllemesi için kullanılabilir. G2 yavrularının belirli bir yüzdesi transjen içerecektir (örneğin yaklaşık olarak %50).

35

Tarifnamedeki bir durumda, promotör bir sitomegalovirüs (CMV) promotör, rous-sarkom virüsü (RSV) promotör, maymun lösemi virüsü (MLV) promotör, beta-aktin promotör, fare memeli tümör virüsü (MMTV) promotör, LTR promotör, ovalbümin promotör, lizozim promotör, konalbümin promotör, ovomükoid promotör, ovomusun promotör ve ovotransferin promotör veya bunların kombinasyonlarıdır. Tarifnamedeki bir durumda, promotör bir ovalbümin-, lizozim-, konalbümin-, ovomükoid-, ovomusun- ve ovotransferin promotör parçası gibi bir promotör alana ait parçayı içermektedir. Tarifnamedeki özellikle faydalı bir durumda, promotör CMV promotörün en az bir parçasını içermektedir.

İstenildiğinde, buluşa göre üretilen dönüştürücü parçaların (yani transdüksiyon parçacıkları) bu alanda uzman biri tarafından anlaşıldığı gibi faydalı olan herhangi bir yöntemle titre edilebilmektedir. Örneğin viral genom neomisin dirençli gen gibi bir işaret içeriyorsa, parçacıklar hücrelerin transdüksiyonuyla ve kolonilerin kaplanması ve sayılması işlemleriyle takip edilen seri seyreltme yoluyla titre edilebilmektedir. Bir düzenlemede, titre canlı genoma melezlemeyle (örneğin bu alanda uzman kişilerce anlaşıldığı gibi viral nükleik aside (RNA veya DNA) ait ölçülen bir lekenin sayısal yoğunluk ölçümü) belirlenmektedir. Sayısal viral kaplama proteiniyle ilgili immüno floresan veya ELISA analizi ve viral genomdan ters transkripsiyon ürününün sayısal PCR'si gibi viral genomla ilgili sayısal PCR ayrıca kullanılabilir.

20

Bir durumda, tarifnamedeki viral parçacıklar örneğin Speksnijder prosedürüne (US Pat. No. 5,897,998) göre yumurta pencereleme yöntemleriyle kuş blastodermal hücrelerine sokulmaktadır. Başka bir deyişle, viral parçacıklar örneğin embriyonun alt germinal oyuğuna sokularak doğal yerinde blastodermal hücrelerine sokulmaktadır. Sokma işleminden sonra (örneğin enjeksiyon), yumurtalar yaklaşık olarak 21 gün sonra çatlamaktadır. Tipik olarak, erkek kuşlar üreme için seçilmektedir. Spermelerinde transjen (örneğin sokulan nükleotid dizini) içeren G0 horozları elemek amacıyla, DNA horoz sperm örneklerinden çıkarılmaktadır. Sperm örneklerinde en yüksek transjen seviyelerine sahip G0 horozları yapay döllemeyle transjenik olmayan tavuklarla üremektedir. Kan DNA örnekleri transjenin varlığı açısından elenmektedir ve ekzojen protein üretimi için üretilen kuşların durumunda, kan ekzojen protein açısından tahlil edilebilmektedir (örneğin ELISA). Ekzojen proteinin varlığı onaylanırsa, G1 transjenik horozların spermi transjenik olmayan tavukların yapay döllemesi için kullanılabilir. G2 yavrularının belirli bir yüzdesi transjen içerecektir (örneğin yaklaşık olarak %50).

35

Blastodermal hücrelerden üretilen transjenik kuşlar kurucular olarak bilinmektedir. Bazı kurucular yumurta kanallarına ait büyük delikte bulunan boru şekilli bez hücrelerinde transjen taşıyacaktır. Bu kuşlar kendi yumurta kanallarındaki transjenle kodlanan ekzojen proteini ifade edebilmektedir. Ekzojen protein ayrıca yumurta kanalına ek olarak diğer dokularda (örneğin kan) bulunabilmektedir. Ekzojen protein uygun sinyal dizinini (dizinlerini) içeriyorsa, yumurta kanalının lümenine ve yumurtanın beyazına salgılanabilmektedir. Bazı kurucular germ hattı kurucularıdır. Germ hattı kurucusu kendi germ hattı dokusundaki genetik maddede transjen taşıyan bir kurucudur veya ekzojen proteini ifade eden boru şekilli bez hücrelerinde transjen taşıyabilmektedir veya taşımayabilmektedir. Bu sebeple, tarifnameye göre transjenik kuş ekzojen proteini ifade eden boru şekilli bez hücrelerine sahip olabilmektedir. Kurucunun kendi boru şekilli bez hücrelerinde genetik madde taşımasından bağımsız olarak, kurucunun bir germ hattı kurucusu olması durumunda, yavru örneğin doku belirgin bir promotörün kullanılmasıyla sadece kuşun belirgin dokusunda (dokularında) ekzojen gen ekspresyonuyla belirlenen bir fenotipi ifade edebilmektedir.

Spesifik bir örnekte, burada açıklandığı gibi transjenik tavukların üretimi için bir ALv vektörüne sokulan bir kaset oluşturmak amacıyla bir CMV promotör eritropoietine ait kodlama dizinine bağlanmaktadır (165 amino asit formu; bakınız örneğin Pharmacotherapy (1990) Supplement, cilt 10, No. 2, sayfalar 3S-8S). Retroviral vektör geçici olarak üretilmektedir ve yaklaşık olarak 1×10^7 parçacık/ml oranında yoğunlaştırılmaktadır. Yoğunlaştırılan virüsün 3-7 ul'si pencerelenen Charles River SPF hattı 21 kuluçkalanmamış yumurtanın alt germinal oyuğuna enjekte edilmektedir. Tavuklar yumurtadan çıkmaktadır ve cinsel olgunluğa ulaşmaktadır. Erkekler bu durumda EPO olan söz konusu gen için sayısal PCR yoluyla kendi sperm DNA'sında transjenin varlığı açısından elenmektedir.

Bir düzenlemede, burada açıklandığı gibi üretilen retroviral parçacıklar büyük oranda ve düşük maliyetle insan ve hayvan ilaçları, tanılayıcı ve hayvancılık besin katkı maddeleri olarak kullanılanlar dahil olmak üzere istenilen çok çeşitli proteinleri ifade etmek için kullanılan transjenik kuşları üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, tarifname bu tür proteinleri üreten transjenik kuşları ve örneğin yumurtanın beyazında protein içeren transjenik hayvanlar tarafından yumurtalanan yumurtaları kapsamaktadır. Proteine ait kodlama dizininin mevcut buluşa göre bir yumurta kanalı hücrelerine sokulması şartıyla, mevcut buluş farmasötik proteinler dahil olmak üzere istenilen herhangi bir proteinin

Blastodermal hücrelerden üretilen transjenik kuşlar kurucular olarak bilinmektedir. Bazı kurucular yumurta kanallarına ait büyük delikte bulunan boru şekilli bez hücrelerinde transjen taşıyacaktır. Bu kuşlar kendi yumurta kanallarındaki transjenle kodlanan ekzojen proteini ifade edebilmektedir. Ekzojen protein ayrıca yumurta kanalına ek olarak diğer dokularda (örneğin kan) bulunabilmektedir. Ekzojen protein uygun sinyal dizinini (dizinlerini) içeriyorsa, yumurta kanalının lümenine ve yumurtanın beyazına salgılanabilmektedir. Bazı kurucular germ hattı kurucularıdır. Germ hattı kurucusu kendi germ hattı dokusundaki genetik maddede transjen taşıyan bir kurucudur veya ekzojen proteini ifade eden boru şekilli bez hücrelerinde transjen taşıyabilmektedir veya taşımayabilmektedir. Bu sebeple, tarifnameye göre transjenik kuş ekzojen proteini ifade eden boru şekilli bez hücrelerine sahip olabilmektedir. Kurucunun kendi boru şekilli bez hücrelerinde genetik madde taşımasından bağımsız olarak, kurucunun bir germ hattı kurucusu olması durumunda, yavru örneğin doku belirgin bir promotörün kullanılmasıyla sadece kuşun belirgin dokusunda (dokularında) ekzojen gen ekspresyonuyla belirlenen bir fenotipi ifade edebilmektedir.

Spesifik bir örnekte, burada açıklandığı gibi transjenik tavukların üretimi için bir ALv vektörüne sokulan bir kaset oluşturmak amacıyla bir CMV promotör eritropoietine ait kodlama dizinine bağlanmaktadır (165 amino asit formu; bakınız örneğin Pharmacotherapy (1990) Supplement, cilt 10, No. 2, sayfalar 3S-8S). Retroviral vektör geçici olarak üretilmektedir ve yaklaşık olarak 1×10^7 parçacık/ml oranında yoğunlaştırılmaktadır. Yoğunlaştırılan virüsün 3-7 ul'si pencerelenen Charles River SPF hattı 21 kuluçkalanmamış yumurtanın alt germinal oyuğuna enjekte edilmektedir. Tavuklar yumurtadan çıkmaktadır ve cinsel olgunluğa ulaşmaktadır. Erkekler bu durumda EPO olan söz konusu gen için sayısal PCR yoluyla kendi sperm DNA'sında transjenin varlığı açısından elenmektedir.

Bir düzenlemede, burada açıklandığı gibi üretilen retroviral parçacıklar büyük oranda ve düşük maliyetle insan ve hayvan ilaçları, tanılayıcı ve hayvancılık besin katkı maddeleri olarak kullanılanlar dahil olmak üzere istenilen çok çeşitli proteinleri ifade etmek için kullanılan transjenik kuşları üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, tarifname bu tür proteinleri üreten transjenik kuşları ve örneğin yumurtanın beyazında protein içeren transjenik hayvanlar tarafından yumurtalanan yumurtaları kapsamaktadır. Proteine ait kodlama dizininin mevcut buluşa göre bir yumurta kanalı hücrelerine sokulması şartıyla, mevcut buluş farmasötik proteinler dahil olmak üzere istenilen herhangi bir proteinin

üretiminde kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır. Özellikle faydalı bir düzenlemede, burada açıklandığı gibi üretilen proteinler insan proteinleridir; başka bir deyişle insanlar tarafından üretilen proteinlerdir.

- 5 Buluş, buna bağlı olarak antikorlar gibi immünoglobulinler dahil olmak üzere multimerik proteinlerin ve antijen bağlanma parçalarının üretilimiyle ilgili yöntemleri içermektedir. Dolayısıyla, mevcut buluşun bir düzenlemesinde multimerik protein bir immünoglobulindir; burada birinci ve ikinci heterolog polipeptidler sırasıyla immünoglobulin ağır ve hafif zincirlerdir.

10

Belirli düzenlemelerde, en az bir ekspresyon vektörüne ait transkripsiyonel birim tarafından kodlanan immünoglobulin peptidi değişken bir bölge veya bir değişkenini içeren bir immünoglobulin ağır zincir polipeptidi olabilmektedir ve ayrıca bir D bölgesi, bir J bölgesi, bir C bölgesi veya bunların bir kombinasyonu olabilmektedir. Burada
15 açıklandığı gibi üretilen immünoglobulin polipeptidi ayrıca değişken bir bölge veya bir değişkenini içeren bir immünoglobulin hafif zincir polipeptidi olabilmektedir ve ayrıca bir J bölgesi ve bir C bölgesi içerebilmektedir. Mevcut buluş ayrıca aynı hayvan türlerinden türetilen çoklu immünoglobulin bölgelerini veya tek başına olmayacak şekilde insan, fare, sıçan, tavşan ve tavuk dahil olmak üzere bir tür karışımını tasarlamaktadır. belirli
20 düzenlemelerde, antikorlar insan veya insanlaştırılmamış antikorlardır.

25

Diğer düzenlemelerde, burada açıklandığı gibi üretilen immünoglobulin polipeptid bir immünoglobulin ağır zincir değişken bölgesi, bir immünoglobulin hafif zincir değişken bölgesi ve bir bağlantı peptidi içermektedir; böylelikle bir antijene seçici olarak bağlanabilen tek zincirli bir antikor oluşturulmaktadır.

30

Buluş yöntemlerinde üretilen terapötik antikorlarla ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde metastatik göğüs kanserine sahip hastaların tedavisi için insanlaştırılmış anti-HER2 monoklonal bir antikor olan HERCEPTIN™ (Trastuzumab)
35 (Genentech, CA); pıhtı oluşumunu engellemek için trombositlerin üzerindeki bir anti-glikoprotein IIb/IIIa reseptörü olan REOPRO™ (absiksimab) (Centocor); akut renal doku reddi için bağışıklık baskılayıcı insanlaştırılmış anti-CD25 monoklonal antikor olan ZENAPAX™ (daklizumab) (Roche Pharmaceuticals, İsviçre); bir fare anti-17-1A hücre yüzeyi antijeni IgG2a antikor olan PANOREX™ (Glaxo Wellcome/Centocor); bir fare anti-idiotipi (GD3 epitopu) olan BEC2; IgG antikor (ImClone System); kimerik bir anti-EGFR

üretiminde kullanılacak şekilde tasarlanmaktadır. Özellikle faydalı bir düzenlemede, burada açıklandığı gibi üretilen proteinler insan proteinleridir; başka bir deyişle insanlar tarafından üretilen proteinlerdir.

- 5 Buluş, buna bağlı olarak antikorlar gibi immünoglobulinler dahil olmak üzere multimerik proteinlerin ve antijen bağlanma parçalarının üretilimiyle ilgili yöntemleri içermektedir. Dolayısıyla, mevcut buluşun bir düzenlemesinde multimerik protein bir immünoglobulindir; burada birinci ve ikinci heterolog polipeptidler sırasıyla immünoglobulin ağır ve hafif zincirlerdir.

10

Belirli düzenlemelerde, en az bir ekspresyon vektörüne ait transkripsiyonel birim tarafından kodlanan immünoglobulin peptidi değişken bir bölge veya bir değişkenini içeren bir immünoglobulin ağır zincir polipeptidi olabilmektedir ve ayrıca bir D bölgesi, bir J bölgesi, bir C bölgesi veya bunların bir kombinasyonu olabilmektedir. Burada
15 açıklandığı gibi üretilen immünoglobulin polipeptidi ayrıca değişken bir bölge veya bir değişkenini içeren bir immünoglobulin hafif zincir polipeptidi olabilmektedir ve ayrıca bir J bölgesi ve bir C bölgesi içerebilmektedir. Mevcut buluş ayrıca aynı hayvan türlerinden türetilen çoklu immünoglobulin bölgelerini veya tek başına olmayacak şekilde insan, fare, sıçan, tavşan ve tavuk dahil olmak üzere bir tür karışımını tasarlamaktadır. belirli
20 düzenlemelerde, antikorlar insan veya insanlaştırılmamış antikorlardır.

25

Diğer düzenlemelerde, burada açıklandığı gibi üretilen immünoglobulin polipeptid bir immünoglobulin ağır zincir değişken bölgesi, bir immünoglobulin hafif zincir değişken bölgesi ve bir bağlantı peptidi içermektedir; böylelikle bir antijene seçici olarak bağlanabilen tek zincirli bir antikoru oluşturmaktadır.

30

Buluş yöntemlerinde üretilen terapötik antikorlarla ilgili örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde metastatik göğüs kanserine sahip hastaların tedavisi için insanlaştırılmış anti-HER2 monoklonal bir antikor olan HERCEPTIN™ (Trastuzumab)
30 (Genentech, CA); pıhtı oluşumunu engellemek için trombositlerin üzerindeki bir anti-glikoprotein IIb/IIIa reseptörü olan REOPRO™ (absiksimab) (Centocor); akut renal doku reddi için bağışıklık baskılayıcı insanlaştırılmış anti-CD25 monoklonal antikoru olan ZENAPAX™ (daklizumab) (Roche Pharmaceuticals, İsviçre); bir fare anti-17-1A hücre yüzeyi antijeni IgG2a antikor olan PANOREX™ (Glaxo Wellcome/Centocor); bir fare anti-idiotipi (GD3 epitopu) olan BEC2; IgG antikor (ImClone System); kimerik bir anti-EGFR
35

IgG antikor olan IMC-C225; insanlaştırılmış anti- α V β 3 integrin antikor olan VITAXIN™ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); insanlaştırılmış anti CD52 IgG1 antikor (Lökosit) olan Campath 1H/LDP-03; insanlaştırılmış anti-CD33 IgG antikor olan Smart M195 (Protein Design Lab/Kanebo); kimerik anti-CD20 IgG1 antikor olan RITUXAN™ (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); insanlaştırılmış anti-CD22 IgG antikor olan LYMPHOCIDE™ (Immunomedids); insanlaştırılmış anti-ICAM3 antikor olan ICM3 (ICOS Pharm); radyoaktif olarak etiketlenmiş fare anti-CD20 antikor olan ZEVALIN™ (IDEC/Schering AG); insanlaştırılmış anti-CD40L antikor olan IDEC-131 (IDEC/Eisai); primatlaştırılmış anti-CD4 antikor olan IDEC-151 (IDEC); primatlaştırılmış anti-CD23 antikor olan IDEC-152 (IDEC/Seikagaku); insanlaştırılmış anti-CD3 IgG olan SMART (Protein Design Lab); insanlaştırılmış anti-tamamlama faktörü 5 (CS) antikor olan 5G1.1 (Alexion Pharm); insanlaştırılmış anti-TNF- α antikor olan D2E7 (CATIBASF); insanlaştırılmış anti-TNF- α Fab parçası olan CDP870 (Celltech); primatlaştırılmış anti-CD4 IgG1 antikor olan IDEC-151 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); insan anti-CD4 IgG antikor olan MDX-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); insanlaştırılmış anti-TNF- α IgG4 antikor olan CDP571 (Celltech); insanlaştırılmış anti- α 4 β 7 antikor olan LDP-02 (LeukoSite/Genentech); insanlaştırılmış anti-CD4 IgG antikor olan OrthoClone OKT4A (Ortho Biotech); insanlaştırılmış anti-CD40L IgG antikor olan ANTOVA™ (Biogen); insanlaştırılmış anti-VLA-4 IgG antikor olan ANTEGREN™ (Elan); ve insan anti-TGF- β ₂ antikor olan CAT-152 (Cambridge Ab Tech) içermektedir.

Burada açıklandığı gibi üretim için tasarlanan terapötik proteinlerle ilgili diğer spesifik örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde faktör VIII, b-alanı çıkarılmış faktör VIII, faktör viia, faktör ix, antikoagülanlar, hirudin, alteplaz, tpa, reteplaz, tpa, 3-5 alanları çıkarılmış tpa, insülin, insülin lispro, insülin aspart, insülin glargin, uzun etkili insülin benzerleri, hgh, glukagonlar, tsh, follitropin-beta, fsh, gm-csf, pdgh, ifn alpa2a, inf-alfa, inf-beta 1b, ifn-beta 1a, ifn-gamma1b, il-2, il-11, hbsag, ospa, t-lenfosit antijenine yönlendirilmiş fare mab, tag-72'ye yönlendirilmiş fare mab, tümöre bağlı glikoprotein, kimerik mabdan türetilmiş fab parçaları, tümöre bağlı antijen ca125'e yönlendirilmiş fare mab parçaları, insan karsinoembriyonik antijene yönlendirilmiş fare mab parçası, cea, insan kardiyak miyosine yönlendirilmiş fare mab parçası, tümör yüzeyi antijen psma'ya yönlendirilmiş fare mab parçası, hmw-maa'ya yönlendirilmiş fare mab parçaları (fab/fab2 karışımı), karsinoma bağlı antijene yönlendirilmiş fare mab parçası (fab), nca 90'a yönlendirilmiş mab parçaları (fab), yüzey granülosit spesifik olmayan çapraz reaksiyon antijeni, b lenfositlerinin

IgG antikor olan IMC-C225; insanlaştırılmış anti- α V β 3 integrin antikor olan VITAXIN™ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); insanlaştırılmış anti CD52 IgG1 antikor (Lökosit) olan Campath 1H/LDP-03; insanlaştırılmış anti-CD33 IgG antikor olan Smart M195 (Protein Design Lab/Kanebo); kimerik anti-CD20 IgG1 antikor olan RITUXAN™ (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); insanlaştırılmış anti-CD22 IgG antikor olan LYMPHOCIDE™ (Immunomedids); insanlaştırılmış anti-ICAM3 antikor olan ICM3 (ICOS Pharm); radyoaktif olarak etiketlenmiş fare anti-CD20 antikor olan ZEVALIN™ (IDEC/Schering AG); insanlaştırılmış anti-CD40L antikor olan IDEC-131 (IDEC/Eisai); primatlaştırılmış anti-CD4 antikor olan IDEC-151 (IDEC); primatlaştırılmış anti-CD23 antikor olan IDEC-152 (IDEC/Seikagaku); insanlaştırılmış anti-CD3 IgG olan SMART (Protein Design Lab); insanlaştırılmış anti-tamamlama faktörü 5 (CS) antikor olan 5G1.1 (Alexion Pharm); insanlaştırılmış anti-TNF-a antikor olan D2E7 (CATIBASF); insanlaştırılmış anti-TNF- α Fab parçası olan CDP870 (Celltech); primatlaştırılmış anti-CD4 IgG1 antikor olan IDEC-151 (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); insan anti-CD4 IgG antikor olan MDX-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); insanlaştırılmış anti-TNF- α IgG4 antikor olan CDP571 (Celltech); insanlaştırılmış anti- α 4 β 7 antikor olan LDP-02 (LeukoSite/Genentech); insanlaştırılmış anti-CD4 IgG antikor olan OrthoClone OKT4A (Ortho Biotech); insanlaştırılmış anti-CD40L IgG antikor olan ANTOVA™ (Biogen); insanlaştırılmış anti-VLA-4 IgG antikor olan ANTEGREN™ (Elan); ve insan anti-TGF- β ₂ antikor olan CAT-152 (Cambridge Ab Tech) içermektedir.

Burada açıklandığı gibi üretim için tasarlanan terapötik proteinlerle ilgili diğer spesifik örnekler sınırlayıcı olmayacak şekilde faktör VIII, b-alanı çıkarılmış faktör VIII, faktör viia, faktör ix, antikoagülanlar, hirudin, alteplaz, tpa, reteplaz, tpa, 3-5 alanları çıkarılmış tpa, insülin, insülin lispro, insülin aspart, insülin glargin, uzun etkili insülin benzerleri, hgh, glukagonlar, tsh, follitropin-beta, fsh, gm-csf, pdgh, ifn alpa2a, inf-alfa, inf-beta 1b, ifn-beta 1a, ifn-gamma1b, il-2, il-11, hbsag, ospa, t-lenfosit antijenine yönlendirilmiş fare mab, tag-72'ye yönlendirilmiş fare mab, tümöre bağlı glikoprotein, kimerik mabdan türetilmiş fab parçaları, tümöre bağlı antijen ca125'e yönlendirilmiş fare mab parçaları, insan karsinoembriyonik antijene yönlendirilmiş fare mab parçası, cea, insan kardiyak miyosine yönlendirilmiş fare mab parçası, tümör yüzeyi antijen psma'ya yönlendirilmiş fare mab parçası, hmw-maa'ya yönlendirilmiş fare mab parçaları (fab/fab2 karışımı), karsinoma bağlı antijene yönlendirilmiş fare mab parçası (fab), nca 90'a yönlendirilmiş mab parçaları (fab), yüzey granülosit spesifik olmayan çapraz reaksiyon antijeni, b lenfositlerinin

yüzeyinde bulunan cd20 antijenine yönlendirilmiş kimerik mab, il2 reseptörüne ait alfa zincirine yönlendirilmiş insanlaştırılmış mab, il2 reseptörüne ait alfa zincirine yönlendirilmiş kimerik mab, tnfr-alfaya yönlendirilmiş kimerik mab, respiratuar sinsisyal virüsünün yüzeyinde bulunan bir epitopa yönlendirilmiş insanlaştırılmış mab, her 2 yani
 5 insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'ye yönlendirilmiş insanlaştırılmış mab, sitokeratin tümöre bağlı antijen anti-ctla4'e yönlendirilmiş insan mab, b lenfositleri dornaz-alfa dnaza ait cd 20 yüzey antijenine yönlendirilmiş kimerik mab, beta glukoserebrosidaz, tnfr-alfa, il-2-diferi toksin füzyon proteini, tnfr-Igg parçası füzyon proteini laronidaz, dnaazlar, alefasept, darbepoetin alfa (koloni uyarıcı faktörü),
 10 tositumomab, fare mab, alemtuzumab, rasburikaz, agalsidaz beta, teriparatid, paratiroid hormonu türevleri, adalimumab (IggI), anankinra, biyolojik değiştirici, nesitirid, insan b-tipi natriüretik peptid (hbnp), koloni uyarıcı faktörler, pegvisomant, insan büyüme hormonu reseptör antagonisti, rekombinant aktifleştirilmiş c proteini, omalizumab, immünoglobulin e (Ige) önleyici ve ibritumomab tiueksetan içermektedir.

15

Buluş spesifik olarak farmasötik proteinler olarak uygulamaya sahip olan insan proteinleri gibi faydalı insan proteinlerinin üretimini sağlamaktadır. Örneğin, buluş insan sitokinlerinin (örneğin insan interferon (IFN), insan eritropoietin (EPO), insan büyüme hormonu, insan G-CSF, insan GM-CSF), insan antikorlarının ve diğer faydalı insan
 20 proteinlerinin üretimi için sağlanmaktadır. Burada açıklandığı üzere istenildiği gibi ifade edilen diğer proteinler lizozim, β -kasein, albümin, α -1 antitripsin, antitrombin III, kolajen, faktörler VIII, IX ve X ve benzerleri, fibrinojen, hiyaluronik asit, insülin, laktoferrin, C proteini, doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA), besin katkı maddesi enzimleri, somatotropin ve kimotripsini içermektedir. İnsan tümör hücrelerindeki yüzey
 25 antijenlerine bağlanan ve bunları yok eden immünotoksinler gibi genetik olarak tasarlanmış antikorlar ayrıca farmasötikler veya tanımlayıcılar olarak kullanmak üzere ifade edilebilmektedir.

Aşağıdaki spesifik örneklerin buluşu açıklaması beklenmektedir ve istemlerin kapsamını
 30 sınırlandıracak şekilde yapılandırılmaması gerekmektedir.

Örnek 1

Vektör Yapılanması

35

yüzeyinde bulunan cd20 antijenine yönlendirilmiş kimerik mab, il2 reseptörüne ait alfa zincirine yönlendirilmiş insanlaştırılmış mab, il2 reseptörüne ait alfa zincirine yönlendirilmiş kimerik mab, tnfr-alfaya yönlendirilmiş kimerik mab, respiratuar sinsisyal virüsünün yüzeyinde bulunan bir epitopa yönlendirilmiş insanlaştırılmış mab, her 2 yani
 5 insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'ye yönlendirilmiş insanlaştırılmış mab, sitokeratin tümöre bağlı antijen anti-ctla4'e yönlendirilmiş insan mab, b lenfositleri dornaz-alfa dnaza ait cd 20 yüzey antijenine yönlendirilmiş kimerik mab, beta glukoserebrosidaz, tnfr-alfa, il-2-diferi toksin füzyon proteini, tnfr-Igg parçası füzyon proteini laronidaz, dnaazlar, alefasept, darbepoetin alfa (koloni uyarıcı faktörü),
 10 tositumomab, fare mab, alemtuzumab, rasburikaz, agalsidaz beta, teriparatid, paratiroid hormonu türevleri, adalimumab (IggI), anankinra, biyolojik değiştirici, nesitirid, insan b-tipi natriüretik peptid (hbnp), koloni uyarıcı faktörler, pegvisomant, insan büyüme hormonu reseptör antagonisti, rekombinant aktifleştirilmiş c proteini, omalizumab, immünoglobulin e (Ige) önleyici ve ibritumomab tiueksetan içermektedir.

15

Buluş spesifik olarak farmasötik proteinler olarak uygulamaya sahip olan insan proteinleri gibi faydalı insan proteinlerinin üretimini sağlamaktadır. Örneğin, buluş insan sitokinlerinin (örneğin insan interferon (IFN), insan eritropoietin (EPO), insan büyüme hormonu, insan G-CSF, insan GM-CSF), insan antikorlarının ve diğer faydalı insan
 20 proteinlerinin üretimi için sağlanmaktadır. Burada açıklandığı üzere istenildiği gibi ifade edilen diğer proteinler lizozim, β -kasein, albümin, α -1 antitripsin, antitrombin III, kolajen, faktörler VIII, IX ve X ve benzerleri, fibrinojen, hiyaluronik asit, insülin, laktoferrin, C proteini, doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA), besin katkı maddesi enzimleri, somatotropin ve kimotripsini içermektedir. İnsan tümör hücrelerindeki yüzey
 25 antijenlerine bağlanan ve bunları yok eden immünotoksinler gibi genetik olarak tasarlanmış antikorlar ayrıca farmasötikler veya tanımlayıcılar olarak kullanmak üzere ifade edilebilmektedir.

Aşağıdaki spesifik örneklerin buluşu açıklaması beklenmektedir ve istemlerin kapsamını
 30 sınırlandıracak şekilde yapılandırılmaması gerekmektedir.

Örnek 1

Vektör Yapılanması

35

pCMV-gagpol Yapılanması

pRC/CMV (Invitrogen, Inc.) Not I ve Hind III ile sindirilmektedir ve lineerleştirilmiş 5376 bp vektörü jelle arıtılmaktadır. Rous Sarkom Virüsüne (RSV) ait gag bölgesi Pfu polimeraz ve aşağıdaki primerler kullanılarak RSV'den büyütülmektedir:

RSV-gag-1-2, GGCAAGCTTGGATCAAGCATGGAAGCCGTCATAAAGGT (SEQ ID NO:1) ve RSV-gag-2, TGGAATTCCTCCTCCTATGC (SEQ ID NO:2).

RSV PCR ürünü EcoRI ve Hind III ile sindirilmektedir ve gag bölgesini içeren 1954 bp parçası jelle arıtılmaktadır. Rous Sarkom Virüsüne (RSV) ait pol bölgesi aşağıdaki primerler kullanılarak Elongaz enzim karışımıyla (Invitrogen, Inc.) büyütülmektedir:

RSV-pol1, AACTGGGAGTCACCCGGTCAAACAG (SEQ ID NO:3) ve RSV-pol2, GGGTCGACGCGGCCGCTTAACCTCTCGTTGGCAGCAAG (SEQ ID NO:4).

PCR ürünü EcoRI ve NotI ile sindirilmektedir ve pol bölgesini içeren 2873 bp parçası jelle arıtılmaktadır.

Lineerleştirilmiş pRC/CMV, RSV gag PCR ürünü ve RSV pol PCR ürünü 10,203 bp pCMV-gagpol vektörünü üretmek için birlikte bağlanmaktadır (Şekil 1).

pNLB-CMV-EPO Yapılanması

pNLB-CMV-hIFN alfa-2b (bakınız 4.Mayıs.2004 tarihinde yayınlanan US Patent No. 6,730,822 ve 24.Haziran.2005 tarihinde yayınlanan US patent başvurusu No. 11/167,052) söz konusu hIFN kodlama dizini artı sinyal peptid kodlama dizinini EPO kodlama dizini artı sinyal peptidiyle (SEQ ID NO:11) değiştirmek amacıyla Hind III ve EcoRI ile sindirilmektedir. Çoklu EcoRI ve Hind III bölgeleri vektörde bulunduğu için, RecA-destekli sınırlayıcı endonükleaz (RARE) ayırma yöntemi istenilen alanları kesmek için kullanılmaktadır. Aşağıdaki oligonükleotidler RARE işleminde kullanılmaktadır:

pnlbEcoRI3805rare (5'-GAC TCC TGG AGC CCG TCA GTA TCG GCG GAA TTC CAG CTG AGC GCC GGT CGC TAC CAT TAC-3') (SEQ ID NO:5) ve pnlbHind III3172rare (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CGG AAG CTT TCA CCA TGG CTT TGA CCT TTG CCT TAC-3') (SEQ ID NO:6).

Lineerleştirilmiş bir 8760 bp vektörü elde edilmektedir ve jelle arıtılmaktadır.

EPO eki PCR ile örtüşerek aşağıdaki gibi hazırlanmaktadır.

pCMV-gagpol Yapılanması

pRC/CMV (Invitrogen, Inc.) Not I ve Hind III ile sindirilmektedir ve lineerleştirilmiş 5376 bp vektörü jelle arıtılmaktadır. Rous Sarkom Virüsüne (RSV) ait gag bölgesi Pfu polimeraz ve aşağıdaki primerler kullanılarak RSV'den büyütülmektedir:

RSV-gag-1-2, GGCAAGCTTGGATCAAGCATGGAAGCCGTCATAAAGGT (SEQ ID NO:1) ve RSV-gag-2, TGGAATTCCTCCTCCTATGC (SEQ ID NO:2).

RSV PCR ürünü EcoRI ve Hind III ile sindirilmektedir ve gag bölgesini içeren 1954 bp parçası jelle arıtılmaktadır. Rous Sarkom Virüsüne (RSV) ait pol bölgesi aşağıdaki primerler kullanılarak Elongaz enzim karışımıyla (Invitrogen, Inc.) büyütülmektedir:

RSV-pol1, AACTGGGAGTCACCCGGTCAAACAG (SEQ ID NO:3) ve RSV-pol2, GGGTCGACGCGGCCGCTTAACCTCTCGTTGGCAGCAAG (SEQ ID NO:4).

PCR ürünü EcoRI ve NotI ile sindirilmektedir ve pol bölgesini içeren 2873 bp parçası jelle arıtılmaktadır.

Lineerleştirilmiş pRC/CMV, RSV gag PCR ürünü ve RSV pol PCR ürünü 10,203 bp pCMV-gagpol vektörünü üretmek için birlikte bağlanmaktadır (Şekil 1).

pNLB-CMV-EPO Yapılanması

pNLB-CMV-hIFN alfa-2b (bakınız 4.Mayıs.2004 tarihinde yayınlanan US Patent No. 6,730,822 ve 24.Haziran.2005 tarihinde yayınlanan US patent başvurusu No. 11/167,052) söz konusu hIFN kodlama dizini artı sinyal peptid kodlama dizinini EPO kodlama dizini artı sinyal peptidiyle (SEQ ID NO:11) değiştirmek amacıyla Hind III ve EcoRI ile sindirilmektedir. Çoklu EcoRI ve Hind III bölgeleri vektörde bulunduğu için, RecA-destekli sınırlayıcı endonükleaz (RARE) ayırma yöntemi istenilen alanları kesmek için kullanılmaktadır. Aşağıdaki oligonükleotidler RARE işleminde kullanılmaktadır:

pnlbEcoRI3805rare (5'-GAC TCC TGG AGC CCG TCA GTA TCG GCG GAA TTC CAG CTG AGC GCC GGT CGC TAC CAT TAC-3') (SEQ ID NO:5) ve pnlbHind III3172rare (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CGG AAG CTT TCA CCA TGG CTT TGA CCT TTG CCT TAC-3') (SEQ ID NO:6).

Lineerleştirilmiş bir 8760 bp vektörü elde edilmektedir ve jelle arıtılmaktadır.

EPO eki PCR ile örtüşerek aşağıdaki gibi hazırlanmaktadır.

Birinci PCR ürünü Pfu polimeraz ve aşağıdaki primerlerle standart bir klonlama vektörüne klonlanan sentetik EPO dizininin (EPO 1) büyütülmesiyle üretilmektedir:

5'pNLB/Epo (5'-GGGGGAAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAG-3') (SEQ ID NO:7) ve pNLB/3'Epo (5'-TCCCCATACTAGACTTTTACCTATCGCCGGTC-3') (SEQ ID NO:8). İkinci

5 PCR ürünü Pfu polimeraz ve aşağıdaki primerlerle pNLB-CMV-hIFN alfa-2b bölgesinin büyütülmesiyle üretilmektedir: 3'Epo/pNLB (5'-ACCGGCGATAGGTAAAAAGTCTAGTATGGG-3') (SEQ ID NO:9) ve pNLB/Sapl (5'-GGGGGGGCTCTTCTCAGCTGGAATTCCGCCGATAC-3') (SEQ ID NO:10). İki PCR ürünü karıştırılmaktadır ve aşağıdaki primerlerle yeniden büyütülmektedir:

10 5'pNLB/Epo (5'-GGGGGAAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAG-3') (SEQ ID NO: 7) ve pNLB/Sapl (5'-GGGGGGGCTCTTCTCAGCTGGAATTCCGCCGATAC-3') (SEQ ID NO:10). Füzyon PCR ürünü HindIII ve Eco RI ile sindirilmektedir ve 633 bp parçası jelle arıtılmaktadır. 8740 bp ve 633 bp parçaları pNLB-CMV-EPO'yu yaratmak için bağlanmaktadır (Şekil 2).

15

EPO 1 - Sentetik EPO dizini (610 nt)

AAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAGTGCCCTGCTTGGCTG
TGAGCCTGCTCAGCCTGCCTCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGC
GGCTGATCTGCGATAGCAGGGTGCTGGAGAGGTACCTGCTC
GAGGCTGAGAACATCACCACCGGCTGCGCTGAGCACTGCA
GAACATCACCGTGCCTGATACCAAGGTGAACTTTTACGCTT
TGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAGGTGTGGCAGGGCCT
AGCGAGGCTGTGCTGAGGGGCCAGGCTCTGCTGGTGAACA
TTGGGAGCCTCTGCAGCTGCACGTGGATAAGGCTGTGAGCC
GCCTGACCACCCTGCTGAGGGCTCTGAGGGCTCAGAAGGA

GCTGTACACCGGCGAGGCTTGCAGGACCGGCGATAGGTAA
CGAGCTC (SEQ ID NO:11)

20

pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO Yapılanması

25 Epo kodlama dizini uç kodonla birlikte (166 pozisyonunda arginin için kodlama) EPO formunda 165 amino asitle ilgili kodlar çıkarılacak şekilde üretilmektedir. EPO kodlama dizininde bulunan Eco 47III bölgesinden pNLB-CMV-EPO'daki EPO durdurma kodonunun alt kısmında bulunan EcoRI alanına uzanan dizine karşılık gelen pNLB-CMV-EPO'ya ait 179 bp bölgesi kaldırılan uç arginin kodonuyla (pozisyon 166) sentezlenmektedir, böylelikle aspartik asit (amino asit 165) 176 bp Eco 47III/EcoRI parçasıyla sonuçlanacak şekilde uç

Birinci PCR ürünü Pfu polimeraz ve aşağıdaki primerlerle standart bir klonlama vektörüne klonlanan sentetik EPO dizininin (EPO 1) büyütülmesiyle üretilmektedir:

5'pNLB/Epo (5'-GGGGGAAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAG-3') (SEQ ID NO:7) ve pNLB/3'Epo (5'-TCCCCATACTAGACTTTTACCTATCGCCGGTC-3') (SEQ ID NO:8). İkinci

5 PCR ürünü Pfu polimeraz ve aşağıdaki primerlerle pNLB-CMV-hIFN alfa-2b bölgesinin büyütülmesiyle üretilmektedir: 3'Epo/pNLB (5'-ACCGGCGATAGGTAAAAAGTCTAGTATGGG-3') (SEQ ID NO:9) ve pNLB/Sapl (5'-GGGGGGGCTCTTCTCAGCTGGAATTCCGCCGATAC-3') (SEQ ID NO:10). İki PCR ürünü karıştırılmaktadır ve aşağıdaki primerlerle yeniden büyütülmektedir:

10 5'pNLB/Epo (5'-GGGGGAAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAG-3') (SEQ ID NO: 7) ve pNLB/Sapl (5'-GGGGGGGCTCTTCTCAGCTGGAATTCCGCCGATAC-3') (SEQ ID NO:10). Füzyon PCR ürünü HindIII ve Eco RI ile sindirilmektedir ve 633 bp parçası jelle arıtılmaktadır. 8740 bp ve 633 bp parçaları pNLB-CMV-EPO'yu yaratmak için bağlanmaktadır (Şekil 2).

15

EPO 1 - Sentetik EPO dizini (610 nt)

AAGCTTTCACCATGGGCGTGCACGAGTGCCCTGCTTGGCTG
TGAGCCTGCTCAGCCTGCCTCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGC
GGCTGATCTGCGATAGCAGGGTGCTGGAGAGGTACCTGCTC
GAGGCTGAGAACATCACCACCGGCTGCGCTGAGCACTGCA
GAACATCACCGTGCCTGATACCAAGGTGAACTTTTACGCTT
TGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTGGAGGTGTGGCAGGGCCT
AGCGAGGCTGTGCTGAGGGGCCAGGCTCTGCTGGTGAACA
TTGGGAGCCTCTGCAGCTGCACGTGGATAAGGCTGTGAGCC
GCCTGACCACCTGCTGAGGGCTCTGAGGGCTCAGAAGGA

GCTGTACACCGGCGAGGCTTGCAGGACCGGCGATAGGTAA
CGAGCTC (SEQ ID NO:11)

20

pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO Yapılanması

25 Epo kodlama dizini uç kodonla birlikte (166 pozisyonunda arginin için kodlama) EPO formunda 165 amino asitle ilgili kodlar çıkarılacak şekilde üretilmektedir. EPO kodlama dizininde bulunan Eco 47III bölgesinden pNLB-CMV-EPO'daki EPO durdurma kodonunun alt kısmında bulunan EcoRI alanına uzanan dizine karşılık gelen pNLB-CMV-EPO'ya ait 179 bp bölgesi kaldırılan uç arginin kodonuyla (pozisyon 166) sentezlenmektedir, böylelikle aspartik asit (amino asit 165) 176 bp Eco 47III/EcoRI parçasıyla sonuçlanacak şekilde uç

amino asit kodonu olacaktır. Parça Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa 52241) ile sentezlenmektedir ve pDRIVE-des-Arg 166-EPO'yu oluşturacak şekilde pDRIVE vektörüne (Qiagen, Inc.) klonlanmaktadır (Şekil 3). 176 bp Eco 47III/EcoRI parçası pNLB-CMV-Des-Arg 166-EPO'yu oluşturacak şekilde pNLB-CMV-EPO'nun Eco47III/EcoRI bölgesine alt-klonlanmaktadır.

Örnek 2

DF-1 Hücrelerinin Geçici Transfeksiyonu

Transfeksiyondan bir gün önce, 3.7×10^6 DF-1 hücreleri DF-1 aracındaki (yüksek glukoz, L-glutamin, pridoksin HCl, %10 sığır fetüs serumu, 10 U/ml pensilin G ve 10 ug/ml streptomisin içeren Dulbecco Değiştirilmiş Eagle Aracı) 150 mm doku kültür tabaklarında kaplanmaktadır ve 37°C'de %6 CO₂ ile kültürlenmektedir. Ertesi gün hücreler aşağıdaki gibi transfekte edilmektedir. Her plaka 6 ml OptiMEM (Invitrogen, Inc.) ile yıkanmaktadır ve 5 ml OptiMEM ile yeniden beslenmektedir. 18.4 ug retrovektör, pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO, 18.4 ug pCMV-gagpol ve 0.92 ug pVSV-G 15 ml polistiren tüpünde veya şişesinde 4.6 ml OptiMEM ile karıştırılmaktadır. 110 ul DMRIE-C 4.6 ml OptiMEM ile karıştırılmaktadır. Lipit/OptiMEM DNA/optiMEM'e eklenmektedir. Ters çevrilerek veya türbülansla karıştırıldıktan sonra, transfeksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmektedir ve daha sonra 150 mm bir plakaya eklenmektedir. Plaka 37°C'de %6 CO₂ ile 3-4 saat inkübe edilmektedir. Transfeksiyon karışımı çıkarılmaktadır, plaka bir kez 6 ml DF-1 aracıyla yıkanmaktadır ve 20 ml DF-1 aracıyla yeniden beslenmektedir. Belirli durumlarda sodyum butirat bu aşamada eklenebilmektedir (örneğin yaklaşık olarak 2 mM-40 mM) ve hücreler gece boyunca inkübe edilmektedir. Böyle bir durumda, araç ertesi sabah çıkarılmaktadır ve hücreler tekrar DF-1 aracıyla yıkanmaktadır. Sodyum butiratla yapılan bu tür bir işlem viral parçacığın titresini sodyum butirat kullanılmadan elde edilen titreden yaklaşık olarak 5-10 kat daha arttırabilmektedir. Plaka 37°C'de %6 CO₂ ile 18-60 saat inkübe edilmektedir ve bir Milipore SteriCup Vakum Filtresine (0.45 um PVDF 250 ml) (cat no. SCHV U02 RE) boşaltılarak ve bununla filtre edilerek plakadaki araç toplanmaktadır.

Transfekte edilen iki 150 mm plakadan filtre edilen viral araç Beckman SW28 Ultraclear tüplerine (cat no. 344058) dökülmektedir. Araç 4°C'de 2 saat süreyle 19.4 krpm'de bir SW28 rotorla santrifüje tabi tutulmaktadır. Süperin büyük kısmı çıkarılmaktadır ve 0.2 uM

amino asit kodonu olacaktır. Parça Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa 52241) ile sentezlenmektedir ve pDRIVE-des-Arg 166-EPO'yu oluşturacak şekilde pDRIVE vektörüne (Qiagen, Inc.) klonlanmaktadır (Şekil 3). 176 bp Eco 47III/EcoRI parçası pNLB-CMV-Des-Arg 166-EPO'yu oluşturacak şekilde pNLB-CMV-EPO'nun Eco47III/EcoRI bölgesine alt-klonlanmaktadır.

Örnek 2

DF-1 Hücrelerinin Geçici Transfeksiyonu

Transfeksiyondan bir gün önce, 3.7×10^6 DF-1 hücreleri DF-1 aracındaki (yüksek glukoz, L-glutamin, pridoksin HCl, %10 sığır fetüs serumu, 10 U/ml pensilin G ve 10 ug/ml streptomisin içeren Dulbecco Değiştirilmiş Eagle Aracı) 150 mm doku kültür tabaklarında kaplanmaktadır ve 37°C'de %6 CO₂ ile kültürlenmektedir. Ertesi gün hücreler aşağıdaki gibi transfekte edilmektedir. Her plaka 6 ml OptiMEM (Invitrogen, Inc.) ile yıkanmaktadır ve 5 ml OptiMEM ile yeniden beslenmektedir. 18.4 ug retrovektör, pNLB-CMV-Des-Arg166-EPO, 18.4 ug pCMV-gagpol ve 0.92 ug pVSV-G 15 ml polistiren tüpünde veya şişesinde 4.6 ml OptiMEM ile karıştırılmaktadır. 110 ul DMRIE-C 4.6 ml OptiMEM ile karıştırılmaktadır. Lipit/OptiMEM DNA/optiMEM'e eklenmektedir. Ters çevrilerek veya türbülansla karıştırıldıktan sonra, transfeksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmektedir ve daha sonra 150 mm bir plakaya eklenmektedir. Plaka 37°C'de %6 CO₂ ile 3-4 saat inkübe edilmektedir. Transfeksiyon karışımı çıkarılmaktadır, plaka bir kez 6 ml DF-1 aracıyla yıkanmaktadır ve 20 ml DF-1 aracıyla yeniden beslenmektedir. Belirli durumlarda sodyum butirat bu aşamada eklenebilmektedir (örneğin yaklaşık olarak 2 mM-40 mM) ve hücreler gece boyunca inkübe edilmektedir. Böyle bir durumda, araç ertesi sabah çıkarılmaktadır ve hücreler tekrar DF-1 aracıyla yıkanmaktadır. Sodyum butiratla yapılan bu tür bir işlem viral parçacığın titresini sodyum butirat kullanılmadan elde edilen titreden yaklaşık olarak 5-10 kat daha arttırabilmektedir. Plaka 37°C'de %6 CO₂ ile 18-60 saat inkübe edilmektedir ve bir Milipore SteriCup Vakum Filtresine (0.45 um PVDF 250 ml) (cat no. SCHV U02 RE) boşaltılarak ve bununla filtre edilerek plakadaki araç toplanmaktadır.

Transfekte edilen iki 150 mm plakadan filtre edilen viral araç Beckman SW28 Ultraclear tüplerine (cat no. 344058) dökülmektedir. Araç 4°C'de 2 saat süreyle 19.4 krpm'de bir SW28 rotorla santrifüje tabi tutulmaktadır. Süperin büyük kısmı çıkarılmaktadır ve 0.2 uM

filtreyle filtre edilen DF-1 aracı 100-400 ul son yoğunluğa eklenmektedir. Viral topak 4°C'de 1-4 saat süreyle veya gece boyunca yeniden askıda bırakılmaktadır. Araç ve topak ayrıca 3-4 kez Gilman P200 pipetiyle ezilerek yeniden askıda bırakılmaktadır ve viral süspansiyon Nunc Cyro şişesine aktarılmaktadır ve -70°C'de dondurulmaktadır.

5 Titrelemek için, viral süspansiyona ait parçalar 37°C su banyosunda çözülmemektedir, DF-1 aracıyla seyreltilmektedir ve Senta veya DF-1 hücreleriyle kaplanmaktadır. Bir-iki gün sonra, 200 ug/ml G418 içeren araç Senta veya DF-1 hücrelerine eklenmektedir. Araç her iki-üç günde değiştirilmektedir ve koloniler belli olduğunda sayılmaktadır. Yoğunlaştırılan virüsün titresini yaklaşık olarak 1×10^7 'dir (sodyum butirat işlemi olmadan); bu tipik olarak

10 replikasyondan yetersiz retroviral parçacıkları üretmek için örneğin 4.Mayıs.2004'de yayınlanan US Patenti No. 6,730,822'de açıklanan yöntemler gibi geleneksel yöntemler kullanılarak elde edilen titrenin yaklaşık olarak 10 katıdır; bu patent NLB replikasyondan yetersiz retroviral vektörlerin üretimi için Senta ve Isolde hücrelerinin kullanımını açıklamaktadır.

15

Örnek 3

Transjenik Kuşların Üretimi

20 Örnek 2'ye göre hazırlanan 7 ul virüs süspansiyonu 97 adet doğurgan kuluçkaya inkübe edilmemiş Beyaz Legorn yumurtalarının (Charles River, SPAFAS) alt germinal oyuğuna enjekte edilmektedir. 54 tavuk yumurtadan çıkmaktadır ve cinsel olgunluğa ulaşması beklenmektedir. Sperm toplanmaktadır ve DNA Chelex yöntemiyle çıkarılmaktadır. 100 ng sperm DNA'sı PicoGreen deneyiyle saptandığı gibi (Molecular Probes) Applied Biosystems

25 TaqMan® Fast Universal PCR Ana Karışımı ve Applied Biosystems 7900HT kullanılarak EPO transjeninin varlığı açısından değerlendirilmektedir. Primerler şunlardır: 5'-GCCCTCCAGATGCTGCAA-3' (SEQ ID NO:12) için SJ-EPO ve 5'-CCCTAAACAGCTTCCTAAAGGTATCA-3' için SJ-EPO-rev. Taqman EPO prob dizini 5'-CGCTGCCCCCTCTGAGGACCATC-3' dir (SEQ ID NO:14) ve 5' ucunda FAM (6-karboksifloresin) ile ve 3' ucunda TAMRA (N,N,N',N'-tetrametil-6-karboksirodamid) ile

30 etiketlenmektedir. Bir horozun kendi sperminde belirgin seviyede EPO genine sahip olduğu saptanmaktadır. Bu horoz vahşi tip tavukla yavrulattırılmaktadır. Yaklaşık olarak 144 tavuk yumurtadan çıkmaktadır. Kan DNA'ları çıkarılmaktadır ve EPO Taqman deneyi kullanılarak transjen varlığı açısından test edilmektedir. İki tavuğun transjen açısından

35 pozitif olduğu saptanmaktadır. Transjen miktarı her hücre G1 için beklendiği gibi EPO

filtreyle filtre edilen DF-1 aracı 100-400 ul son yoğunluğa eklenmektedir. Viral topak 4°C'de 1-4 saat süreyle veya gece boyunca yeniden askıda bırakılmaktadır. Araç ve topak ayrıca 3-4 kez Gilman P200 pipetiyle ezilerek yeniden askıda bırakılmaktadır ve viral süspansiyon Nunc Cyro şişesine aktarılmaktadır ve -70°C'de dondurulmaktadır.

- 5 Titrelemek için, viral süspansiyona ait parçalar 37°C su banyosunda çözülmemektedir, DF-1 aracıyla seyreltilmektedir ve Senta veya DF-1 hücreleriyle kaplanmaktadır. Bir-iki gün sonra, 200 ug/ml G418 içeren araç Senta veya DF-1 hücrelerine eklenmektedir. Araç her iki-üç günde değiştirilmektedir ve koloniler belli olduğunda sayılmaktadır. Yoğunlaştırılan virüsün titresini yaklaşık olarak 1×10^7 'dir (sodyum butirat işlemi olmadan); bu tipik olarak replikasyondan yetersiz retroviral parçacıkları üretmek için örneğin 4.Mayıs.2004'de yayınlanan US Patenti No. 6,730,822'de açıklanan yöntemler gibi geleneksel yöntemler kullanılarak elde edilen titrenin yaklaşık olarak 10 katıdır; bu patent NLB replikasyondan yetersiz retroviral vektörlerin üretimi için Senta ve Isolde hücrelerinin kullanımını açıklamaktadır.

15

Örnek 3

Transjenik Kuşların Üretimi

- 20 Örnek 2'ye göre hazırlanan 7 ul virüs süspansiyonu 97 adet doğurgan kuluçkaya inkübe edilmemiş Beyaz Legorn yumurtalarının (Charles River, SPAFAS) alt germinal oyuğuna enjekte edilmektedir. 54 tavuk yumurtadan çıkmaktadır ve cinsel olgunluğa ulaşması beklenmektedir. Sperm toplanmaktadır ve DNA Chelex yöntemiyle çıkarılmaktadır. 100 ng sperm DNA'sı PicoGreen deneyiyle saptandığı gibi (Molecular Probes) Applied Biosystems
- 25 TaqMan® Fast Universal PCR Ana Karışımı ve Applied Biosystems 7900HT kullanılarak EPO transjeninin varlığı açısından değerlendirilmektedir. Primerler şunlardır: 5'-GCCCTCCAGATGCTGCAA-3' (SEQ ID NO:12) için SJ-EPO ve 5'-CCCTAAACAGCTTCCTAAAGGTATCA-3' için SJ-EPO-rev. Taqman EPO prob dizini 5'-CGCTGCCCCCTCTGAGGACCATC-3' dir (SEQ ID NO:14) ve 5' ucunda FAM (6-karboksifloresin) ile ve 3' ucunda TAMRA (N,N,N',N'-tetrametil-6-karboksirodamid) ile
- 30 etiketlenmektedir. Bir horozun kendi sperminde belirgin seviyede EPO genine sahip olduğu saptanmaktadır. Bu horoz vahşi tip tavukla yavrulattırılmaktadır. Yaklaşık olarak 144 tavuk yumurtadan çıkmaktadır. Kan DNA'ları çıkarılmaktadır ve EPO Taqman deneyi kullanılarak transjen varlığı açısından test edilmektedir. İki tavuğun transjen açısından
- 35 pozitif olduğu saptanmaktadır. Transjen miktarı her hücre G1 için beklendiği gibi EPO

transjeninin bir kopyasına sahip olacak şekilde hesaplanmaktadır.

DİZİ LİSTESİ

5	<110> AviGenics, Inc.	
	<120> Yüksek Titreleli Virüsün Hızlı Üretimi	
	<130> AVI-053PCT	
	<160> 14	
	<170> Patentln versiyon 3.3	
10	<210> 1	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Rous sarkom virüsü	
	<400> 1	
15	ggcaagcttg gatcaagcat ggaagccgtc ataaaggt	38
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Rous sarkom virüsü	
20	<400> 2	
	tgggaattcc tcctcctatg c	21
	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> DNA	
25	<213> Rous sarkom virüs	
	<400> 3	
	acactgggag tcacccgggc aaacag	26
	<210> 4	
	<211> 37	
30	<212> DNA	
	<213> Rous sarkom virüsü	
	<400> 4	
	gggtcgacgc ggccgcttaa ctctcgttgg cagcaag	37
	<210> 5	
35	<211> 60	

transjeninin bir kopyasına sahip olacak şekilde hesaplanmaktadır.

DİZİ LİSTESİ

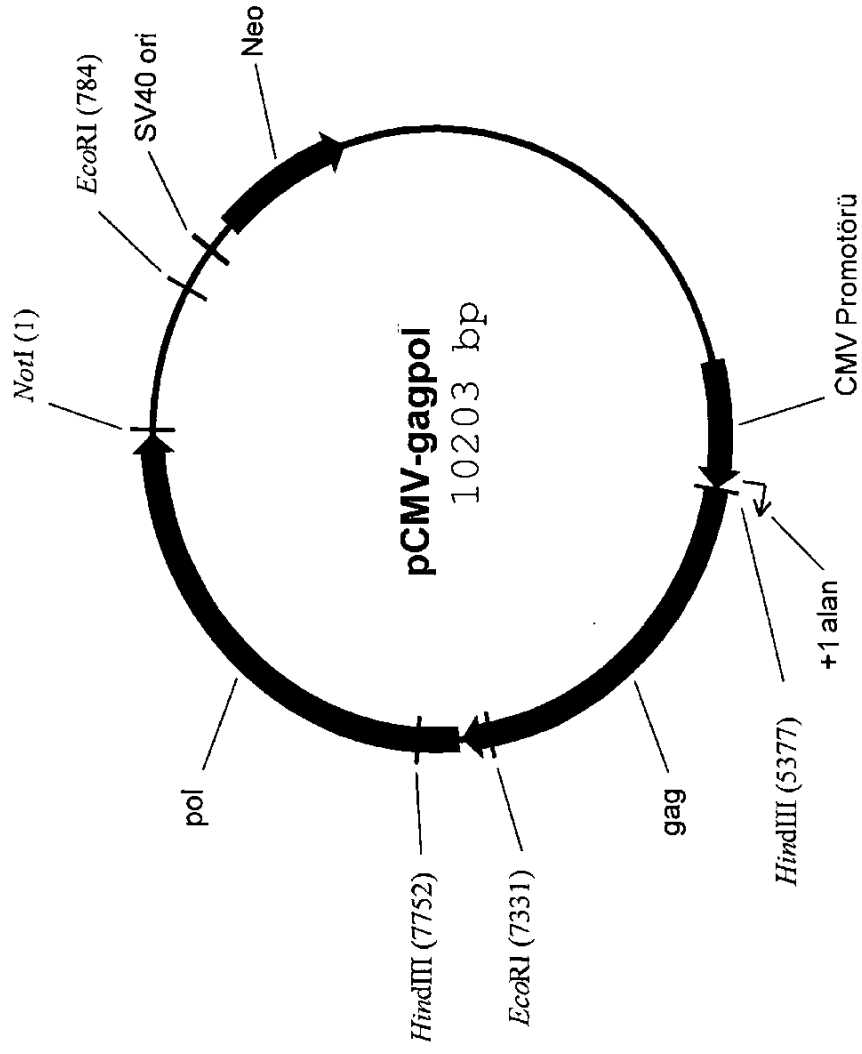
5	<110> AviGenics, Inc.	
	<120> Yüksek Titreleli Virüsün Hızlı Üretimi	
	<130> AVI-053PCT	
	<160> 14	
	<170> Patentln versiyon 3.3	
10	<210> 1	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Rous sarkom virüsü	
	<400> 1	
15	ggcaagcttg gatcaagcat ggaagccgtc ataaaggt	38
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Rous sarkom virüsü	
20	<400> 2	
	tgggaattcc tcctcctatg c	21
	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> DNA	
25	<213> Rous sarkom virüs	
	<400> 3	
	acactgggag tcacccgggc aaacag	26
	<210> 4	
	<211> 37	
30	<212> DNA	
	<213> Rous sarkom virüsü	
	<400> 4	
	gggtcgacgc ggccgcttaa ctctcgttgg cagcaag	37
	<210> 5	
35	<211> 60	

	<212> DNA	
	<213> Kuş lökoz virüsü	
	<400> 5	
5	gactcctgga gcccgtcagt atcgcgga ttccagctga gcgccggtcg ctaccattac	60
	<210> 6	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Kuş lökoz virüsü	
	<400> 6	
10	taatacgact cactataggg agaccggaag cttcaccat ggctttgacc ttgccttac	60
	<210> 7	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 7	
	ggggggaagc ttccaccatg ggcgtgcacg ag	32
	<210> 8	
	<211> 33	
	<212> DNA	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
	tccccatact agacttttta cctatcgccg gtc	33
	<210> 9	
	<211> 30	
25	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 9	
	accggcgata ggtaaaaagt ctagtatggg	30
	<210> 10	
30	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Kuş lökoz virüsü	
	<400> 10	
	gggggggctc ttctcagctg gaattccgcc gatac	35

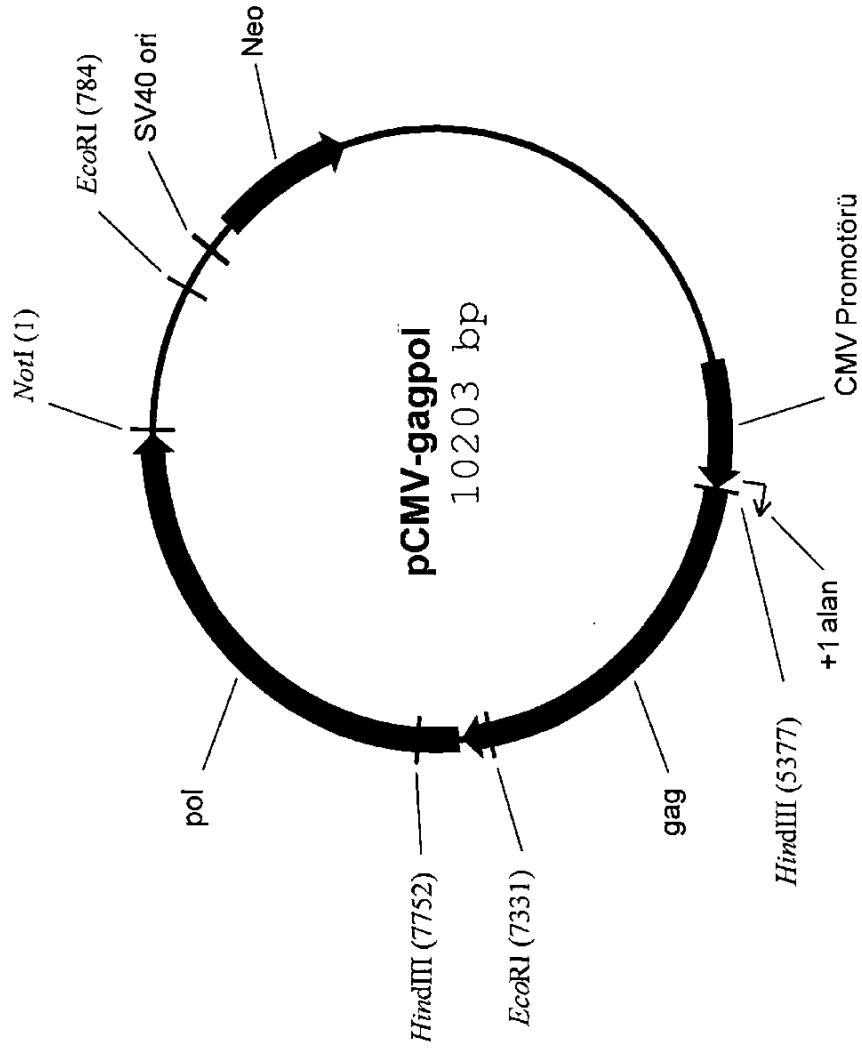
<212> DNA
 <213> Kuş lökoz virüsü
 <400> 5
 gactcctgga gcccgtcagt atcgcgga ttccagctga gcgccggtcg ctaccattac 60
 5 <210> 6
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Kuş lökoz virüsü
 <400> 6
 10 taatacgact cactataggg agaccggaag cttcaccat ggctttgacc ttgccttac 60
 <210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 7
 ggggggaagc ttccaccatg ggcgtgcacg ag 32
 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 tccccatact agacttttta cctatcgccg gtc 33
 <210> 9
 <211> 30
 25 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 accggcgata ggtaaaaagt ctagtatggg 30
 <210> 10
 30 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Kuş lökoz virüsü
 <400> 10
 gggggggctc ttctcagctg gaattccgcc gatac 35

<210> 11
 <211> 610
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 11
 aagctttcac catgggcgtg cacgagtgcc ctgcttggct gtggctgctc ttgag
 tcagcctgcc tctgggcctg cctgtgctgg gcgctcctcc aaggctgac tgcga
 gggtgctgga gaggtacctg ctggaggcta aggaggctga gaacatcacc accgg
 ctgagcactg cagcctgaac gagaacatca ccgtgcctga taccaagggtg aactt
 cttggaagag gatggagggtg ggccagcagg ctgtggaggt gtggcagggc ctggc
 tgagcgaggc tgtgctgagg ggccaggctc tgctggtgaa cagctctcag ccttg
 ctctgcagct gcacgtggat aaggctgtga gcggcctgag aagcctgacc accct
 gggctctgag ggctcagaag gaggctatca gccctccaga tgctgcaagc gctgc
 tqaggacat caccgctgat acctttagga agctgtttag ggtgtacagc aactt
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gccctccaga tgctgcaa 18
 <210> 13
 <211> 26
 15 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ccctaaacag cttcctaaag gtatca 26
 <210> 14
 20 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 cgctgcccct ctgaggacca tc 22
 25

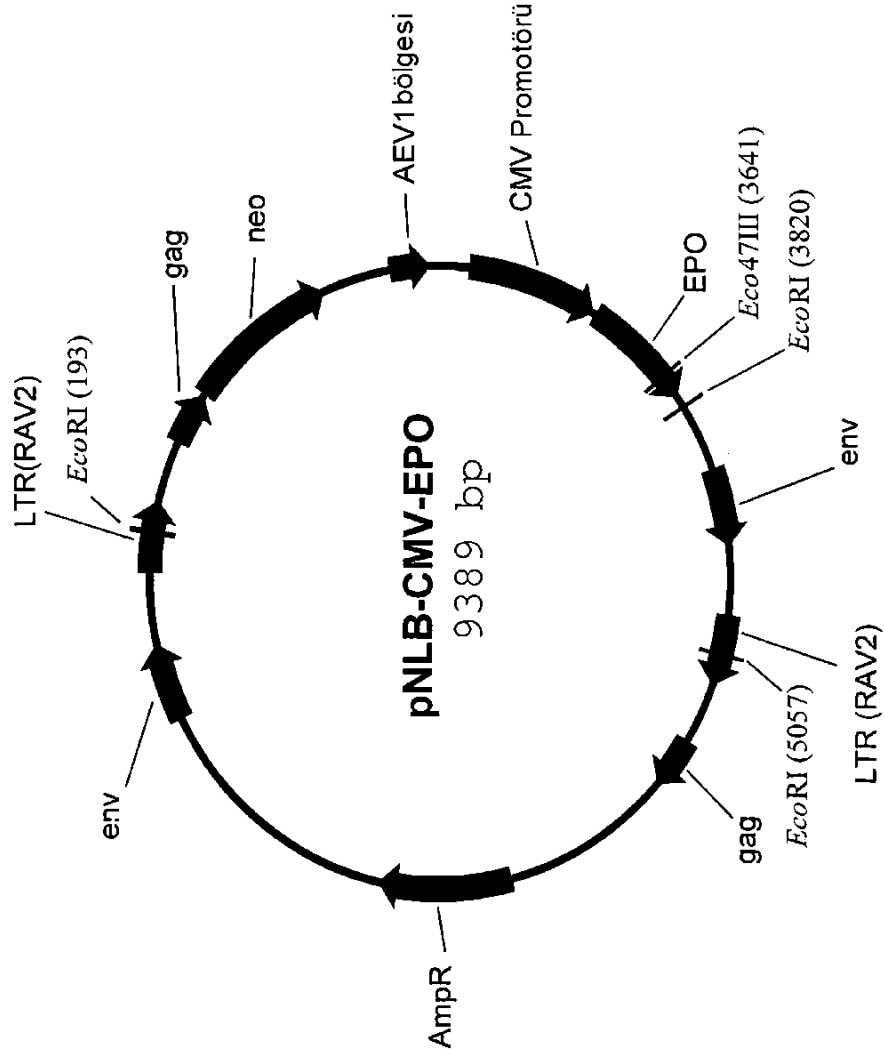
<210> 11
 <211> 610
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 11
 aagctttcac catgggcgtg cacgagtgcc ctgcttggct gtggctgctc ttgag
 tcagcctgcc tctgggcctg cctgtgctgg gcgctcctcc aaggctgac tgcga
 gggtgctgga gaggtacctg ctggaggcta aggaggctga gaacatcacc accgg
 ctgagcactg cagcctgaac gagaacatca ccgtgcctga taccaagggtg aactt
 cttggaagag gatggagggtg ggccagcagg ctgtggaggt gtggcagggc ctggc
 tgagcgaggc tgtgctgagg ggccaggctc tgctggtgaa cagctctcag ccttg
 ctctgcagct gcacgtggat aaggctgtga gcggcctgag aagcctgacc accct
 gggctctgag ggctcagaag gaggctatca gccctccaga tgctgcaagc gctgc
 tqaggacat caccgctgat acctttagga agctgtttag ggtgtacagc aactt
 <210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gccctccaga tgctgcaa 18
 <210> 13
 <211> 26
 15 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ccctaaacag cttcctaaag gtatca 26
 <210> 14
 20 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 cgctgcccct ctgaggacca tc 22
 25



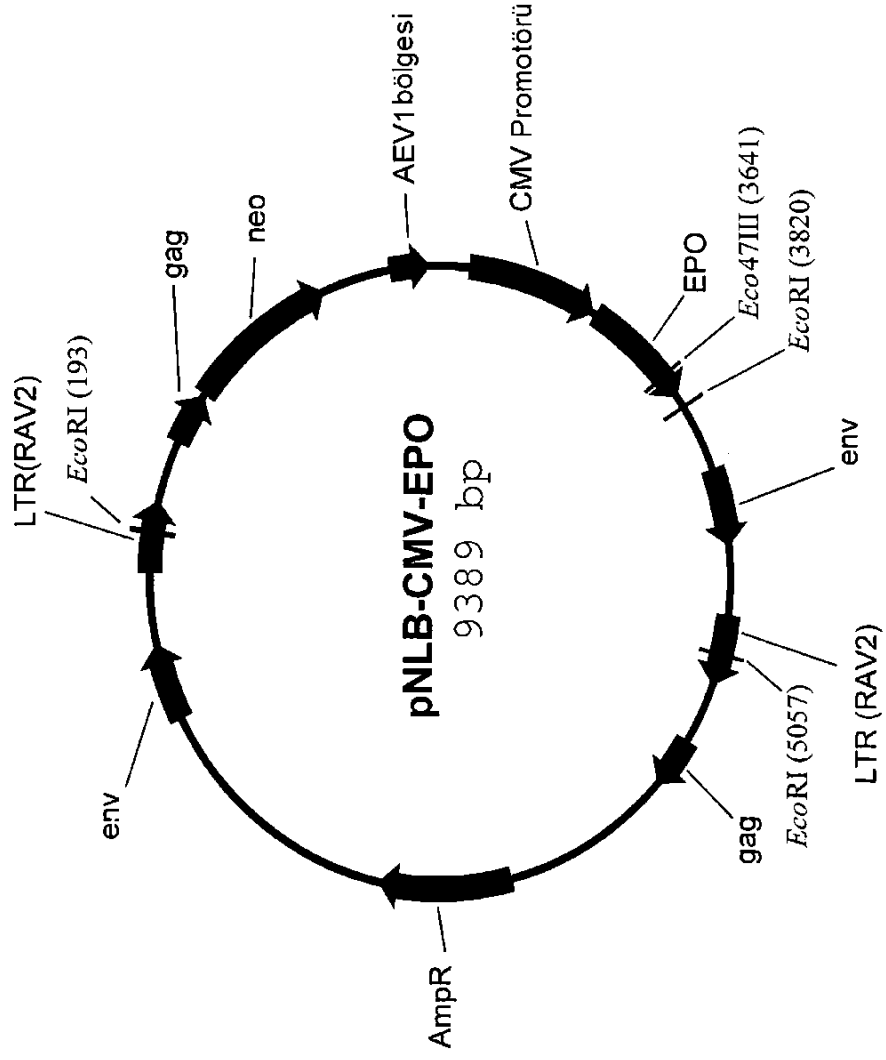
Şekil 1



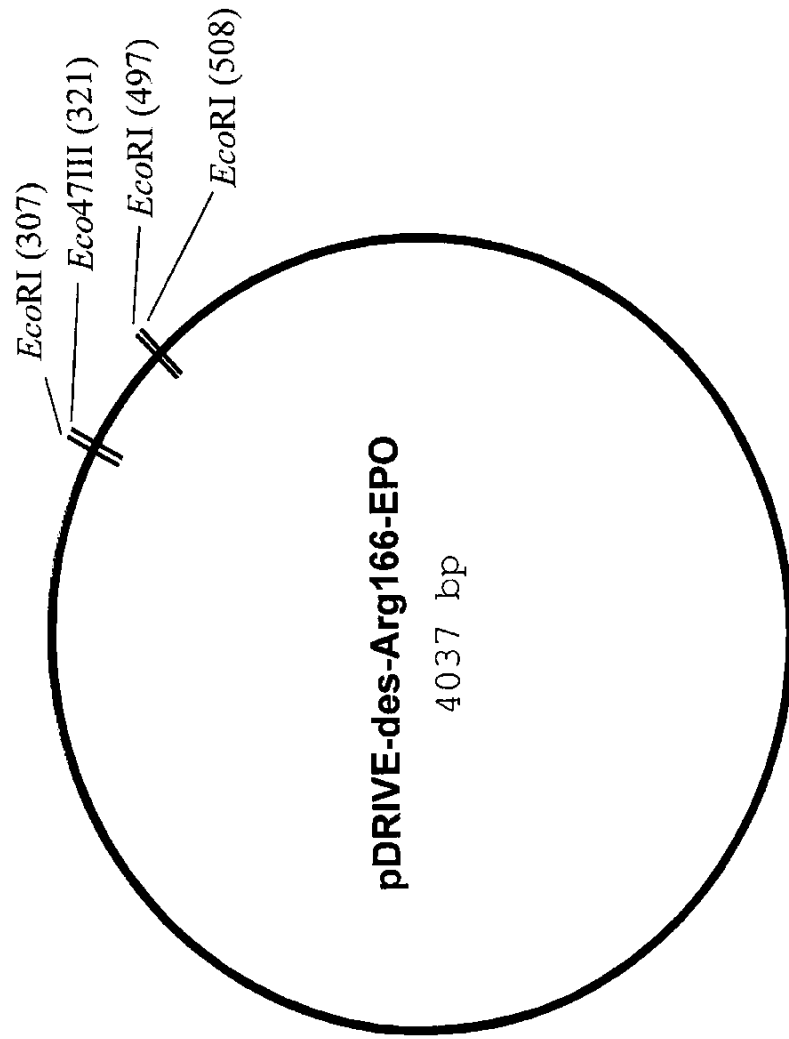
Şekil 1

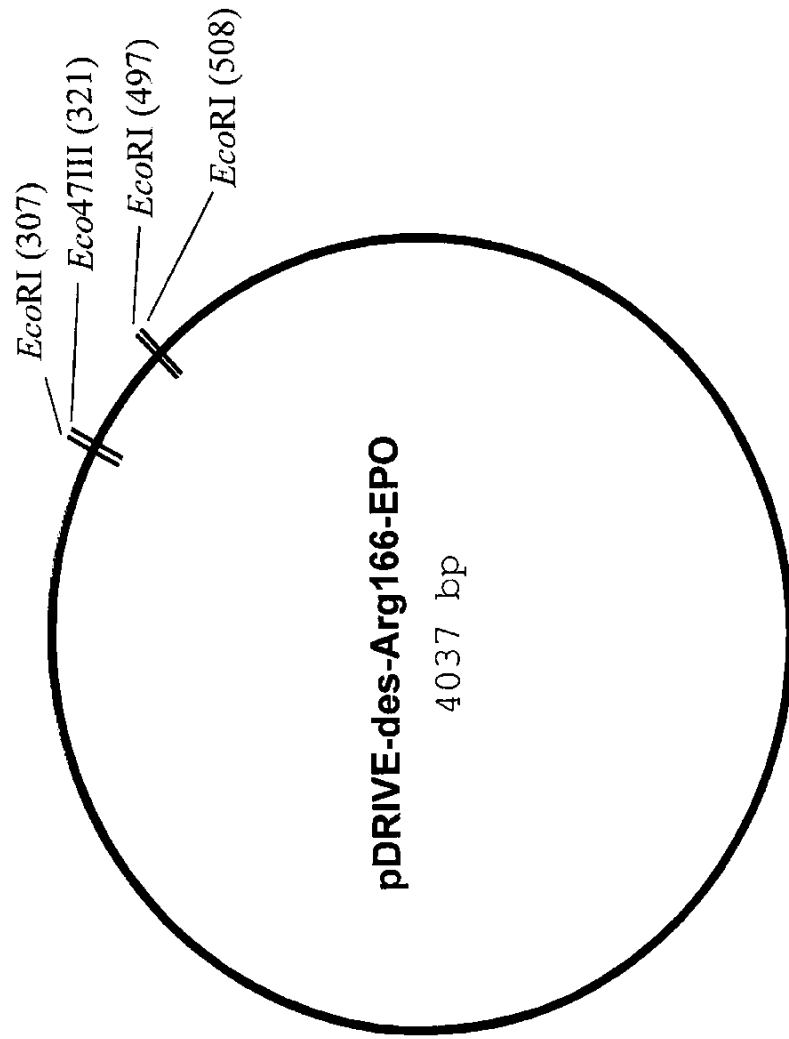


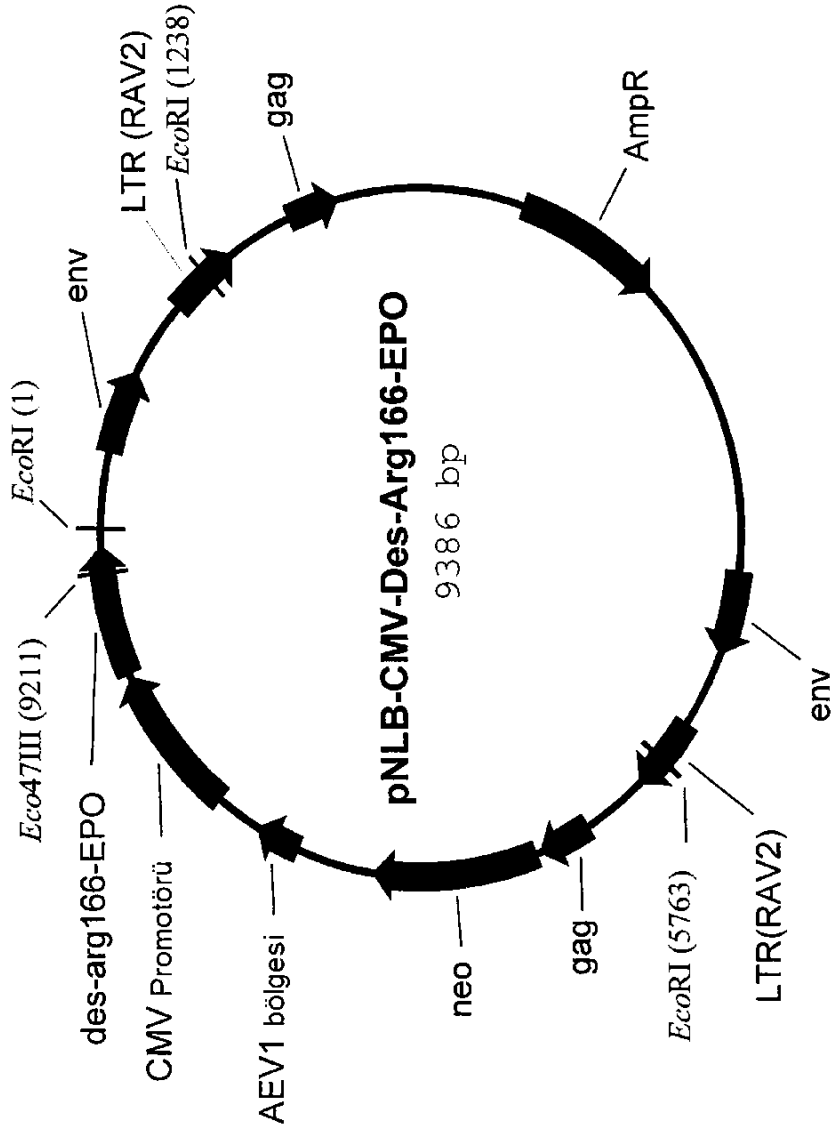
Şekil 2



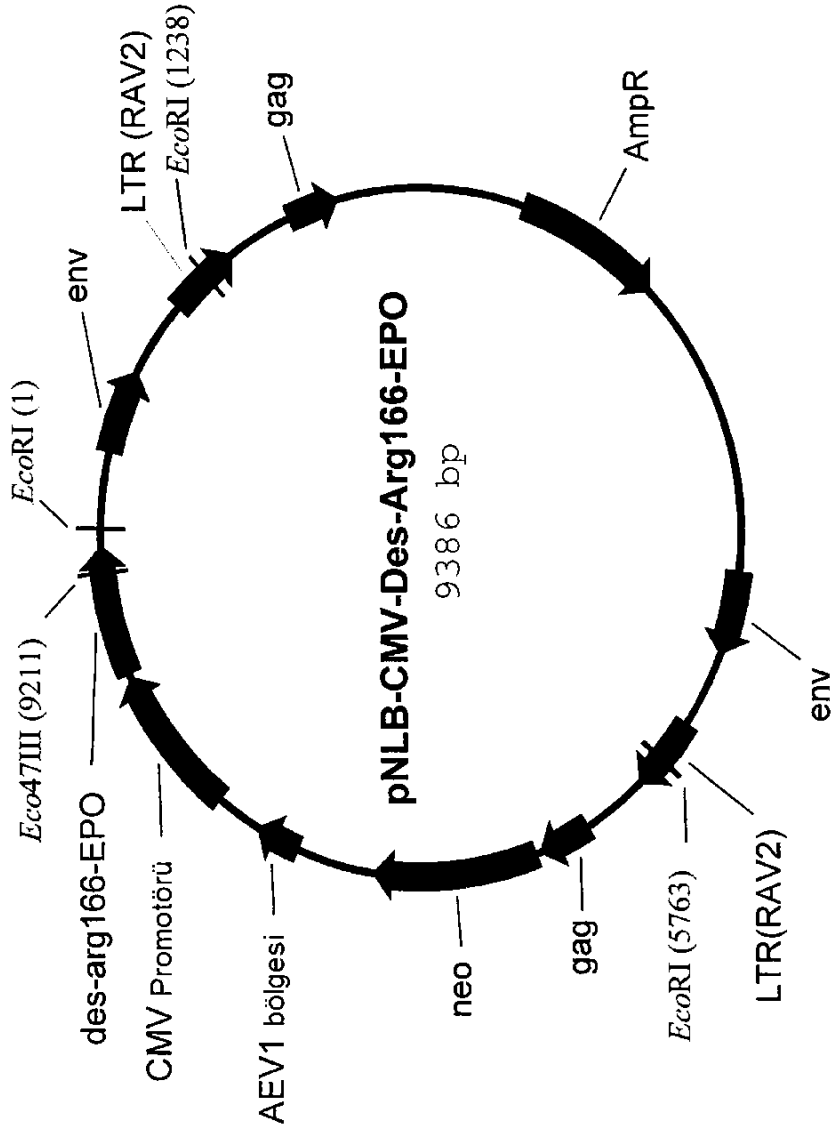
Şekil 2

**Şekil 3**

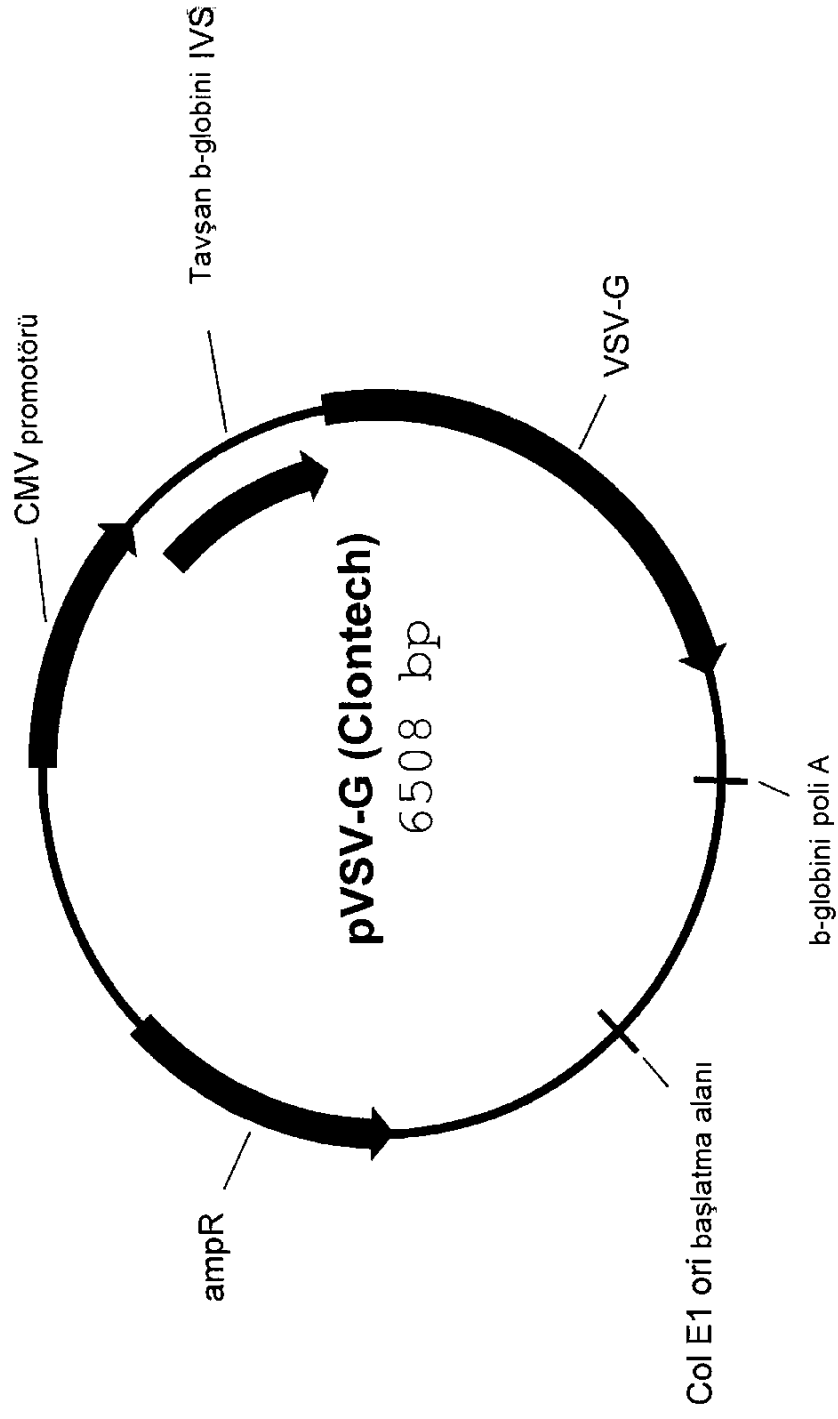
**Şekil 3**

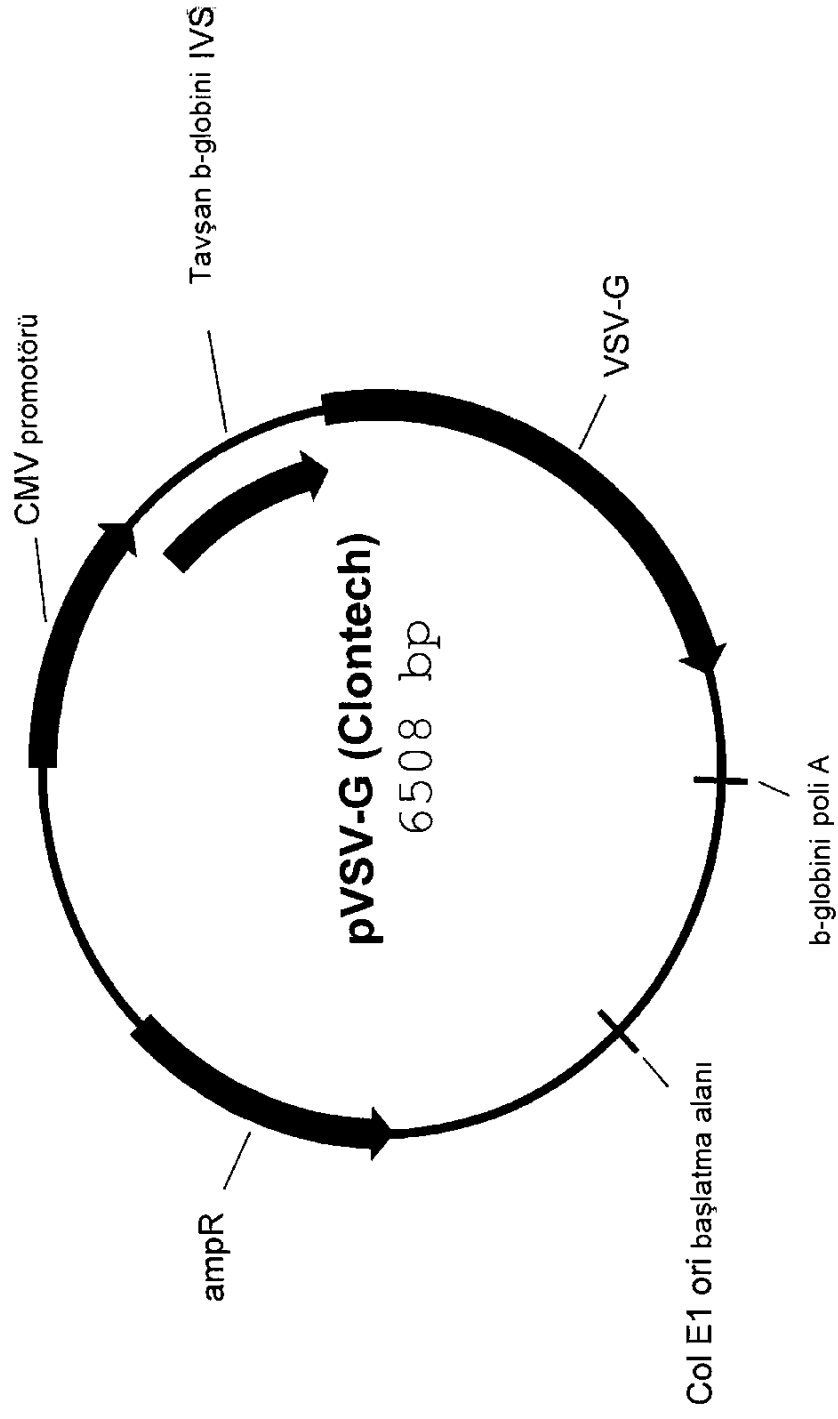


Şekil 4



Şekil 4

**Şekil 5**

**Şekil 5**