FI0001106158

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 110615 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **28.02.2003**

(51) Kv.Ik.7 - Int.kl.7

C12N 15/70, 15/62, 15/44, 15/49, 15/13, 1/21
// (C12N 1/21, C12R 1:19)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **933328**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **23.07.1993**

(24) Alkupäivä - Löpdag **22.01.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **07.09.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/GB92/00124**

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

24.01.1991 GB 9101550 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •British Technology Group Ltd, 101 Newington Causeway, London SE1 6BU, ISO-BRITANNIA, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Mastico,Robert Allan, 200 Pilgrim Road, Braintree, MA 02184, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Stockley,Peter George, 1 Beechwood Grove, Kings Road, Ilkley, West Yorkshire LS29 9AX, ISO-BRITANNIA, (GB)
3 •Talbot,Simon John, 36 Green Lane Street, Somerset BA16 0QN, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

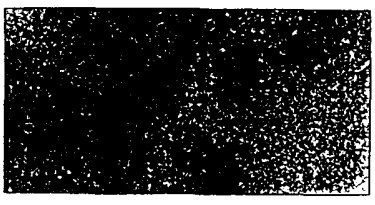
Menetelmä modifioidun kapsidin muodostavan proteiinin valmistamiseksi
Förfarande för tillverkning av protein som bildar en modifierad kapsid

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 0398332 (C 12N 15/62), EP A 353814 (C 07K 7/10), WO A 9002187 (C 12N 15/62), WO A 8910967 (C 12N 15/00), Thrombosis and Haemostasis vol. 58 (1987), p. 353 tiivistelmä 1281, J.Biol.Chem. vol. 265 (1990) p. 5684-5689, Chemical Abstracts vol. 72 (1970) 107087x

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Kimeerinen proteiini, joka sopii liitetäväksi rokotteeseen ja joka kykenee muodostamaan kapsidikokonaisuuden osat, käsittää faagin MS-2 kuoriproteiinin aminohapposekvenssin tai sen konservatiivisesti modifioidun variantin tai riittävästi mainittua sekvenssiä tai varianttia, jotta kapsidia muodostava kyky säilyy, joka aminohapposekvenssi on modifioitu insertoimalla vieras epitooppi alueelle, joka vastaa ulkonevaa proteiinin hiusneularakennetta kapsidikokonaisuudessa kuten vodaan nähdä koskemattoman faagin kiderakenteessa.



Ett chimeriskt protein som är lämplig för inkorporering till ett vaccin och som är kapabelt att bilda delar av kapsidenhet, omfattar aminosyrasekvenssen av skalproteinet av fagen MS-2 eller dess konservativiskt modifierade variant eller tillräckligt av den nämnda sekvenssen eller varianten för att den kapsidbildande förmågan bevaras, vilken aminosyrasekvenssen modifierats med insertion av en främmande epitop vid regionen som motsvarar det utstående proteinhårsnålstrukturen i kapsidenheten liksom man kan se i kristallstrukturen av den intakta fagen.

Menetelmä modifioidun kapsidin muodostavan proteiinin valmistamiseksi - Förfarande för tillverkning av protein som bildar en modifierad kapsid

Tämä hakemus koskee antigeenia tuottavaa kimeeristä proteiinia ja kohdistuu erityisesti virusproteiineihin, jotka sisältävät vieraita epitooppeja, sellaisten proteiinien valmistukseen ja niiden käyttöön rokotteina.

Rekombinantti-DNA-tekniikan kasvu viimeisinä vuosina on johtanut sellaisten rokotteiden esittelyyn, joissa rokotteissa immunogeeninen proteiini on tunnistettu, kloonattu ja ilmennetty sopivassa bakteeri-isännässä, jolloin saadaan riittävät määrät proteiinia, jotta saadaan tehokas suojaava immunisaatio sekä eläimissä että ihmisissä. Sellaisten tekniikoiden jatkona on ehdotettu, että liitetään vain immunogeeniset epitoopit kantajaproteiineihin, jotka kykenevät ilmentymään sopivassa isännässä samalla kun ne säilyttävät epitoopin immunisointiominaisuudet. Siten kirjallisuusviitteessä Beesley et al., Biotechnology, **8**, 1990, 644-649, kuvataan kimeeristen proteiinien valmistus, joissa suu- ja sorkkatautiviruksen tai ihmisen koriongonadotropiinin epitoopit fuusioidaan kantajana toimivan hepatiitti B ydinproteiinin N-päähän. Kimeerisen proteiinin ilmentäminen suoritettiin hiivassa, koska ilmentämisen E. colissa ei havaittu olevan täysin tyydyttävää.

Kirjallisuusviitteessä Pushko et al., Abstracts of VIIIth International Congress of Virology, Berliini, elokuun 26.-31. 1990, s. 38-006, on ehdotettu myös, että tietyt RNA-faagi frkuoriproteiininkapsidin tunnistamattomat alueet voivat olla kykeneviä hyväksymään vieraita aminohapposekvenssejä ilman kapsidia muodostavan kyvyn häviämistä. Kuitenkaan tässä viitteessä ei esitetä mitään muuta indikaatiota kuin että minkä muun kuin sellaisten aminohapposekvenssien satunnaisinsertiota kautta koko kuoriproteiinin, jolloin saadaan tiettyjä tunnistamattomia kimeerisiä rakenteita.

On selvästi olemassa tarve rokotetekniikan eteenpäin viemi-

seen sellaisten kimeeristen proteiinien tuottamiseksi, jotka kykenevät riittävästi ja toisinnettavasti tuottamaan vieraita immunogeenisia epitooppeja, jotka proteiinit voidaan tehdä rekombinanttimenetelmillä, joihin kuuluu ilmentäminen hyvin ymmärretyssä ja säädeltävässä bakteeri-isännässä kuten E. colissa. Luonnon virusepitoopeja tuotetaan tietysti tavalliset virusten vaippojen tai kalvojen pintahilat. Systeemin, joka matkii tätä antigeenin tuottamisen luonnollista muotoa, pitäsi teoriassa osoittautua erityisen tehokkaaksi tuotaessa esiin immuunivastetta. Kuitenkin sellaisen tuloksen saavuttamiseksi on tarpeellista identifioida bakteeri-viruskuoriproteiinit, jotka voidaan koloonata ja sitten ilmentää kapsidien muodostamiseksi viruksen geneettisestä materiaalista riippumattomasti. Lisäksi on tarpeellsta tunnistaa kuoriproteiinin tietty alue, joka ei ole oleellinen kapsidin muodostumisessa ja jota voidaan manipuloida ylijäämäproteiinista riippumattomasti, jotta saadaan vieras epitooppi.

Nyt on keksitty, että epitooppi-insertiota virusproteiinien kantajien identifioituun luokkaan voidaan spesifisesti ohjata siten, että vieraat epitoopit ovat luotettavasti proteiinikapsidikokoonpanon pinnalla kimeerisen proteiinin bakteeri-isännässä ilmentämisen jälkeen.

Ei ollut millään tavalla ennustettavissa, että sellainen tulos voitaisiin saavuttaa. Kaikilla viruksilla ei ole kuoriproteiineja, jotka voivat kokoontua itse: lisäksi ei ole mahdollista ennustaa sellaista itsekokoontumista. Vielä lisäksi päinvastoin kuin eläinten virukset, bakteerien virusten ei voi odottaa luonnollisesti omaavan immunodominoivia alueita eikä siten ole mitään ohjausta mitä tulee siihen, mikä bakteeriviruksen kuoriproteiinin alue (jos mikään) voitaisiin modifioida, jotta voitaisiin kohtuudella odottaa immuunivasteen indusoimista.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti saadaan kimeerinen proteiini, joka kykenee muodostamaan osan kapsidikokoonpanosta

ja joka käsittää faagin MS-2 kuoriproteiinin aminohapposekvenssin, tai sen konservatiivisesti modifioidun variantin, tai riittävästi sellaista sekvenssiä tai varianttia, joka säilyttää kapsidia muodostavan kykynsä, joka aminohapposekvenssi on modifioitu vieraan epitoopin insertiolla proteiinin alueelle, joka vastaa N-pään β-hiusneulaa, kuten on määritetty koko faagipartikkelin Röntgen-sädekristallografialla.

Yllättävästi keksittiin, että sellainen kimeerinen proteiini voidaan ilmentää sopivassa bakteeri-isännässä, jolloin saadaan kapsidit, jotka ovat tyhjiä faagi-RNA:sta ja suurelta osin vapaita muista nukleiinihappokontaminanteista. Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Kimeerinen kuoriproteiini on edullisesti sellainen, joka on johdettu faagista MS-2, mutta se voi olla myös johdettu läheisistä RNA-faageista, jotka kykenevät replikoitumaan E. colissa, kuten faagit R17, fr, GA, QB ja SP. Sellaiset RNA-faagit, joiden fyysinen rakenne on samanlainen kuin MS-2:n, sisältävät hieman kemiallista variaatiota kuoriproteiinin aminohappotähteissä ja ovat siten MS-2-kuoriproteiinin konservatiivisesti modifioituja variantteja. Samalla kun tällä hetkellä uskotaan, että oleellisesti koko kuoriproteiini voidaan tarvita kapsidikokoonpanoon, suhteellisen pienimuotoiset deleetiot ja /tai insertiot voivat olla myös mahdollisia samalla kun yhä säilytetään kapsidin muodostava kyky. Proteiinit, joilla on sellaiset modifioidut sekvenssit, sisällytetään keksinnön piiriin.

Kuten edellä on esitetty, vieras epitooppi insertoidaan proteiinin alueelle, joka kokoonpannussa kapsidissa vastaa N-pään β-hiusneulaa. MS-2-faagihiukkasen kolmiulotteinen rakenne on julkaistu viitteessä Valegård et al., (Nature, 1990, **345**, 36-41). Julkaistut arvot osoittavat, että ensinnäkin kuoriproteiinin rakenne ei liity kahdeksansäikeiseen ß-sylinterimotiiviin, joka löytyy kaikista muista pallomai-

sista RNA-virusalayksiköistä, joiden rakenteet tunnetaan tällä hetkellä. Toiseksi vaikka kuoriproteiinin osoittaa kvasiekvivalenttisia alayksiköiden välisiä kontakteja, ei ole muita mekanismeja, kuten polypeptidien pidennettyjä varsia, jotka auttaisivat varmistamaan kunkin proteiinin yhdenmukaisuuden. Kuoriproteiinin rakennetta voidaan tarkastella kolmen erillisen alueen suhteen. Nämä eivät ole domeeneja tavallisessa mielessä, mutta ne voisivat esittää itsenäisesti laskostuvia yksiköitä. Nämä alueet ovat tähteet 1-29, jotka muodostavat ß-hiusneularakenteen, joka työntyy esille faagin pinnasta muodostaen etäisimmän radiaalisen piirteen. Tätä aluetta seuraavat tähteet 21-94, jotka muodostavat viisi ß-säiettä, joihin kuuluu "FG-looppi", joka on aina suuren konformationaalisen muutoksen kohta kvasi-ekvivalnettisten konformeerien välillä. Näitä ß-säikeitä seuraa sitten kaksi α-heliksiä, tähteet 95-125, jotka lomittavat varmistamaan kuoriproteiinien alayksiköiden dimeerejä. Valegård et al. ovat perehtyneet ainoastaan MS-2-viruksen fysikaliseen rakanteeseen eivätkä he yritä arvioida viruksen toiminnan muotoa.

Kuten edellä on selitetty, esillä oleva keksintö käsittää kuoriproteiiniaminohapposekvenssin modifikaation, jossa vieras epitooppi liitetään alueelle, joka vastaa ulkonevaa hiusneulaa. Keksinnön mukainen kimeerinen proteiini on siten modifioitu aminohappotähteiden 1-20 alueella, edellä olevan numeroinnin viitatessa koko MS-2 kuoriproteiinin sekvenssiin, kuten se on julkaistu viitteessä Fiers, Nature, 1976, 260, 500-507. Edullisesti modifikaatio vieraan epitoopin insertoimiseksi on hiusneula-alueseen päin tai sen keskellä. On erityisen edullista liittää vieras epitooppi kuoriproteiinin glysiinitähteen 14 ja treoniinitähteen 15 alueelle. Aikomatta millään tavoin sitoutua mihinkään teoriaan, on oletettu, että yhden tai useamman glysiinitähteen läsnäolo välittömästi insertoidun epitoopin kyljessä on edullista konformationaalisen joustavuuden liittämisessä epitooppiin sen sitä seuraavissa tuottamisissa.

Vieras insertoitu epitooppi voi vaihdella laajasti riippuen kimeerisen proteiinin halutuista immunogeenisistä ominaisuuksista. Siten keksinnön yhden muodon mukaisesti 9-meerinen peptidisekvenssi, joka on johdettu ihmisen patogeenisen inluenssaviruksen haemagglutiniinista (tai haemagglutiniinirakenne, joka sisältää epitoopin) rakennetaan MS-2-kuoriproteiiniin. Vaihtoehtoisesti voidaan liittää dekapeptidi IgE:n raskaasta ketjusta, joka on käyttökelpoinen rokotuksessa IgE-välitteisiä allergisia reaktioita vastaaan, tai dekapeptidi, joka on sille sukua. Sellainen dekapeptidi on kuvattu ja se on patenttivaatimusten kohteena kansainvälisessä patenttihakemusjulkaisussa WO 90/15878. Kun suhteellisen lyhyitä sekvenssejä, joissa on vain muutamia aminohappotähteitä, voidaan insertoida, on myös esitetty, että pitempiä epitooppeja, esimerkiksi 30 tähdettä tai enemmän, voidaan insertoida, esimerkiksi noin 24 tähteen epitooppi, joka sisältää tunnistetun gp120:n 8-meerisen immunodominantin sekvenssin ihmisen HIV 1 -viruksesta. On ymmärrettävä, että epitoopin maksimipituus ja epitoopin luonne riippuvat syntyneestä kimeerisestä proteiinista, joka säilyttää kykynsä muodostaa kapsidikokonaisuus. Monia epitoopin kopioita tai epitooppien seos, erityisesti lyhyiden epitooppien, voidaan liittää niin kauan kuin kapsidia muodostava kyky säilyy, ja keksinnön tarkoitetaan sisältävän vieraan epitoopin monien kopioiden liittämisen tai useiden epitooppien liittämisen kuoriproteiinin N-pään ß-hiusneulan alueelle. Epitoopit muista tärkeistä patogeeneista ihmis- ja eläinlääketieteessä kuuluvat myös insertioon, esimerkiksi FMDV VPI -proteiinista tai HIVp24:stä johdetut . On ymmärrettävä, että insertoitu epitooppi voi sitoutua yhteen tai molempiin päihin lisäaminohapoilla, jotka eivät ole oleellisia insertin epitooppiselle toiminnalle. Lisäksi termin "epitooppi" tarkoitetaan sisältävän prekursori-inserit, joilla voi olla epitooppifunktionsa tranlationaalisten jälkeisten modifikaatioiden jälkeen.

Keksintö ulottuu myös keksinnön mukaistten kimeeristen proteiinien kapsidikokoonpanoihin. On keksitty, että sel-

laiset kapsidit voidaan ilmentää E. colissa "faagityhjöissä" ilman elävän viruksen RNA:ta. Sekakapsidikokonaisuuksien sukupolvi on suunniteltu, esimerkiksi ennen in vivo asennettujen homogeenisten näytteiden hajottamista, mitä seuraa seoksen uudelleenkokoonpano. Sellaisten kapsidikokoonpanojen tarkoitetaan esimerkiksi kykenevän nostamaan sekaimmuunivastetta ja siten kykenevän löytämään sovellutusta rokotteina luonnollisen virusepitooppien spektrin immunisoimiseen populaatiossa. Keksintö ulottuu siten myös rokotteisiin, jotka käsittävät yhtä tai useampaa kimeeristä proteiinia, jotka on määritelty edellä.

Keksinnön mukaiset kimeeriset proteiinit voidaan tuottaa liittämällä cDNA-sekvenssi, joka vastaa MS-2:n kuoriproteiinia (tai cDNA-sekvenssi, joka vastaa sellaisen kuoriproteiinin konservatiivisesti modifioitua varianttia tai riittävästi sellaista proteiinia tai varianttia, että se säilyttää kapsidin muodostavan kykynsä) sekvensointivektoriin, joka sopii paikkaohjattuun mutageneesiin, jolloin luodaan ainutlaatuinen restriktioentsyymitunnistuskohta cDNA:n alueelle, joka koodaa ulkonevaa hiusneulaa, liitetään oligonukletotidit, jotka kattavat vieraat epitoopit restriktiokohdassa (tavanomaisilla geenitekniikan menetelmillä) ja alakloonataan siten modifioitu geeni sopivaan ilmentymisvektoriin, mitä seuraa ilmentämisvektorin induktio modifioidusta ilmentymisvektorista, jossa on vieras geeni sopivassa isännässä. Sopiva isäntä MS-2:lle on E. coli, joka on edullinen siinä, että fermentoinnit ovat suhteellisen helppoja ja halpoja suorittaa ja systeemi ymmärretään hyvin. Vaihtoehtoisesti ilmentäminen voidaan suorittaa heterologisessa isännässä kuten hiivasssa, mikä voi sallia insertoitujen sekvenssien transition jälkeisen prosessoinnin.

Edullisesti restriktioentsyymin tunnistuskohta luodaan cDNA-kodoneihin, jotka vastaavat glysiiniä 14 ja treoniinia 15, viitaten MS-2-kuoriproteiinin aminohapposekvenssiin. Sopivasti luodaan Kpn 1 -tunnistuskohta. Sellaisen kohdan on keksitty olevan erityisen sopiva siinä pilkkomisessa Kpn

1:n kanssa ja sitä seuraavassa ligaatiossa vieraan oligonukleotidin läsnäollessa, jolloin tuloksena on epitoopin "in-frame"-insertio, jolloin molemmissa päissä on glysiini- ja treoniinitähde, joka, niin uskotaan, kasvattaa epitoopin konformationaalista joustavuutta, kun valmistetaan in vivo, jolloin tämän pitäisi auttaa immuunitunnistamista.

Sekvensointivektori voi olla mikä tahansa niistä, jotka tunnetaan paikkaohjatussa mutageneesissä, kuten M13 mp 18. cDNA saadaan MS-2:n RNA:sta standardilla käänteistranskriptiotekniikalla. MS-2:n lähtö-RNA voidaan saada kasvattamalla organismia tai kaupallisesta näytteestä (saatavilla firmalta Boehringer Mannhein, Saksa). E. colissa ilmentämiseen käytetty ilmentymisvektori on sopivasti pGW11 yhdessä tarpeellisen promoottori/indusoijan kanssa kuten tac-promoottori, jota indusoi IPTG.

E. colissa ilmentämisen jälkeen yli-ilmennetyt soluproteiinit altistetaan puhdistusmenetelmille, jolloin saadaan MS-2-johdetty kuoriproteiini. Sopivaan puhdistusmenettelyyn kuuluu sonikoiminen liukoisten soluproteiinien vapauttamiseksi, sentrifugoiminen, syntyneen supernatantin käsittely DNaasi I:llä, ammoniumsulfaattisaostus, dialyysi ja kokofraktiointi, jolloin saadaan kokoonpannnut kapsidit ja sellaiset tekniikat kuten immunoaffiniteettikromatografia. Puhdistusmenettely voi vaatia muutoksia riippuen liitetyn vieraan epitoopin kemiallisesta ja fysikaalisesta luonteesta. Syntyneet kapsidit voidaan tunnistaa geelisuodattamalla ja/tai sakkaroositiheysgradienttitekniikoilla ja insertin identiteetti vahvista sekvensoimalla. On keksitty, että on mahdollista saada oleellisesti homogeenista kuoriproteiinia tyhjinä kapsideina, kuten elektronimikroskopia ja proteiinisekvensointi osoittavat, ja näitä kapsideja on myös kiteytetty.

Ne kapsidit, joihin vieras epitooppi on liitetty, on osoitettu Western blott -tekniikalla, jolloin ne reagoitetaan sekä monoklonaalisen vasta-aineen kanssa vieraaseen epi-

tooppiin ja polyklonaalisen seerumin kanssa, joka sisältää vasta-aineita villin tyypin kuoriproteiinille, samalla kun villin tyypin kapsidit reagoivat vain polyklonaaliseen seerumiin.

Esillä olevan keksinnön mukaisia kimeerisiä proteiineja ja koottuja kapsideja voidaan käyttää rokotteina millä tahansa tekniikan tason tavallisella tavalla.

Siten esimerkiksi on suunniteltu, että kapsidia voidaan käyttää vesipitoisessa suspensiossa apuaineen ja/tai lisätehostusfraktioiden kanssa tai ilman niitä, annettavaksi injektiolla tai suojattuna oraalisena annosteluna. Sopivia apuaineita ovat ne, joita tavanomaisesti käytetään ihmis- ja eläinrokotteissa, kuten epätäydellinen Freunds-apuaine, alumiinihydroksidigeeliapuaine "Alhydrogel" (rekisteröity tavaramerkki) tai Saponin. Vaihtoehtoisesti rokote voidaan formuloida hitaasti vapauttavaksi kapseliksi. Lisäaineita voidaan sisällyttää immuunitunnistuksen suurentamiseksi, kuten muramyylidipeptidiä.

Samalla kun on ymmärrettävä, että immunisointiannosten koko ja taajuus vaihtelevat huomattavasti riippuen käytön alasta (ihmis tai eläin) ja patogeenista, jota vastaan suojaa halutaan, tyypillistä rokotetta voidaan käyttää 0,2 - 5 mg kapsidia, sopivasti noin 0,5 mg, tarkoituksen ollessa esimerkiksi annostella rokote 1-3 annoksena 2-4 viikon välein. Sellaisten annosten tarkoitetaan valaisevan keksintöä eikä niiden tarkoiteta millään tavoin rajoittavan keksinnön suojapiiriä.

Ottamalla 9-meerinen, joka on johdettu edellä esimerkkinä kuvatusta influenssaviruksesta, on suunniteltu, että tyypillinen potilas immunoitaisiin annostelemalla 0,2-5 mg proteiinia, joko vesipitoisessa suspensiossa tai apuaineen kuten alumiinihydroksidisuspensio kanssa sekoittamisen jälkeen, joko yhtenä annoksena tai useana annoksena esimerkiksi 2 viikon välein. Mitä tahansa rokotusreittiä voidaan

käyttää, esimerkiksi ihonalaista (s.c.), lihaksensisäistä tai ihonsisäistä. Vaihtoehtoisesti sopivalla aineella päällystetty tabletti (suojaamaan mahalaukussa sulamiselta) voisaan antaa stimuloimaan immuniteettia suolen limakalvon pinnalla.

On ilmeistä, että on useita etuja käytettäessä MS-2:ta ja läheisiä faageja antigeenia tuottavissa systeemissä. Siten tyhjäkuoriproteiinikapsidit ilmennetään helposti suhteellisen korkein saannoin E. colissa, tuote puhdistetaan helposti ja on keksitty, että kokoonpannut kapsidit osoittavat suhteellista stabiilisuutta suhteessa lämpötila-alueeseen, pH:hon ja ionivahvuuteen. Vaikka ei haluta sitoutua tiettyyn teoriaan, on teoretisoitu, että keksintö sallii myös nykyiset epitoopit tavallisessa ryhmässä kantajakapsidien pinnalla, edeltämääritellyissä paikoissa, mikä maksimoi immuunitunnistuksen, joka perusutuu vasta-ainemolekyylien monihammastusluonteeseen.

Uskotaan, että MS-2-systeemillä on suhteellisen voimakas käyttökelpoisuus vieraiden peptidisekvenssien valmistamisessa pallomaisten bakteerifagien pinnalla. Systeemillä on lukuisia etuja säikeisten bakteriofagien vaihtoehtoihin nähden. MS-2-kuoriproteiini kykenee sujuvaan itsekokoonpanoon nukleiinihappojen poissaollessa päinvastoin kuin säiemäiset faagit, joka kokoonpano liittyy nukeliinihapon koteloon sulkeutuminen. Lisäksi säikeisen kuoriproteiinin täytyy käydä läpi translaation jälkeinen prosessi ja kalvon insertio ennen kuin kokoonpamo tapahtuu, kun taas MS-2-proteiini säilyy muuttumattomana. MS-2-systeemillä on myös se etu, että kuoriproteiinin yksityiskohtainen molekyylimalli sallii vieraiden peptidi-insertioiden vaikutuksen mallittamisen. MS2-kimeerien ilmeinen kyky tuottaa spesifisiä tiittereitä epitooppien määrättyjä konformaatioita vastaan ehdottaa, että ne tarjoavat halvan ja elegantin menetelmän jalostettujen rokotteiden valmistamiseksi.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä.

Esimerkki 1. Influenssaviruksesta johdetun epitoopin tuottaminen

a) Ilmentymisvektorin, joka sisältää MS-2:sta olevan kuoriproteiinin cDNA:n, valmistaminen

MS-2:n kuoriproteiini saatiin kasvattamalla faagia MS-2, puhdistamalla RNA, mitä seurasi oligonukletodiprimeeriohjattu käänteistranskriptio, jolloin tuotettiin yksisäikeistä cDNA:ta, joka muutettiin kaksoissäikeiseksi cDNA:ksi käyttämällä oligoprimeerejä ja Klenow-polymeraasia. Sitten cDNA alakloonattiin ilmentymisvektoriin (pGW11), jolloin asetettiin kuoriproteiini indusoitavan tac-promoottorin kontrollin alla.

b) Vieraan epitoopin sisältävän modifioidun ilmentymisvektorin valmistaminen

MS-2 kuoriproteiinin cDNA (saatu kuten kohdassa a) edellä) alakloonattiin ilmentymisvektorista pGW11 standardisekvensointivektoriin M13mp18, jolloin tuotettiin yksisäikeinen substraatti paikkaohjattuun mutageneesiin. Kpn 1 -restriktiokohta liitettiin modifioimalla DNA-kodonit, jotka vastaavat MS-2 kuoriproteiinin glysiiniä 14 ja treoniinia 15. Nukleotidisekvenssi, joka vastaa 9-meeristä peptidisekvenssiä, joka on johdettu ihmisen patogenisen influenssaviruksen haemagglutiniinista, liitettiin pilkkomalla Kpn 1:llä ja sitten ligatoimalla. Siten modifioitu geeni alakloonattiin sopivaan ilmentymisvektoriin (pGW11). Oligonuleotidin, joka koodaa 9-meeristä aminohapposekvenssiä YPYDVPDYA, tunnistettiin sisältävän yhden antigeenideterminanteista, joka on esitetty viitejulkaisussa Wilson et al., (Molecular and Cell Biology, toukokuu 1988, 2159-2165 ja Cell, Vol. 37, 1984, 767-778). Edellä kuvattu oligonukleotidin paikkaohjattu mutageneesi Kpn 1 -kohdan rakentamiseksi suoritettiin käyttämällä standardeja kaupallisesti saatavissa olevia pakkauksia. Lisä-DNA-manipulaatioita suoritettiin käyttämällä standardeja tekniikoita (Maniatis et al., "Molecular Cloning. A laboratory manual", 2. painos, (1989), Cold Spring Harbor Press, CSH, New York).

Syntynyt vektori sekvensoitiin 9-meerin kodonien insertoinnin osoittamiseksi. Kpn 1 kohdan käytön seuraksena kaksi lisäkodonia, glysiinin ja treoniinin, luotiin insertin alavirtaan, so. yhteensä 11 kodonin insertio.

c) Vektoreiden ilmentäminen E. colissa

pGW11-ilmentymisvektorit vierasepitooppikodonien kanssa ja ilman niitä ilmennettiin E. colissa ja saatiin soluproteiineja, puhdistettiin ja tunnistettiin kuten seuraavassa on esitetty:

E. colin standardilaboratoriokantoja transformoitiin (ampisilliiniresistenteiksi) ilmentymisplasmidin kanssa, jossa oli rekombinantti-MS-2-kuoriproteiinigeeni. Näiden transformanttien nopeasti kasvavat kasvustot rikkaassa elatusaineessa indusoitiin lisäämällä IPTG:tä 1 mM:n lopulliseen konsentraatioon, kun kasvuston OD_{600} oli välillä 0,4-0,6. Solujen kasvattamista jatkettiin yön yli ennen kuin solut kerättiin sentrifugoimalla, uudelleensuspendoimalla neutraalissa puskurissa, sonikoimalla solujen hajottamiseksi, mitä seurasi sentrifugoiminen supernatantin erottamiseksi (joka sisälsi ilmennetyt rekombinanttituotteet) ja solujätteet. Supernatnatti fraktioitiin ammoniumsulfaattisaostamisella, tuotepelletti uudelleensuspendoitiin puskuriin ennen kuin se puhdistettiin koon mukaan joko sakkaroositiheysgradienteilla tai geelisuodatuskromatografialla tai immunoaffiniteettikromatografialla. Modifioituun kuoriproteiiniin viitataan tämän jälkeen lyhenteellä MS2-HA. Sen sekvenssi vahvistettiin N-pään aminohapposekvensoimalla ensimmäiset 30 tähdettä.

Esimerkki 2. Ihmisen IgE:n sukuisen epitoopin tuottaminen

Käyttämällä esimerkissä 1 kohdissa a), b) ja c) kuvattuja tekniikoita dekapeptidi, joka on sukua sekvenssille ihmisen IgE:stä, joka on vastuullinen sauvasolujen degranuloimisen laukaisemiseen kuten on kuvattu kansainvälisessä patenttihakemusjulkaisussa nro WO 90/15878, insertoitiin MS-2-kuoriproteiiniin ja ilmennettiin ja puhdistettiin. Oligo-

nukleotidi insertoitiin Kpn I restriktiokohtaan, joka koodaa 10-meeristä aminohapposekvenssiä F G F F G S G K T K, modifioitua kuoriproteiinia, johon viitataan tämän jälkeen MS2-IgE':nä, johtuen sen sukulaisuudesta IgE-dekapeptidin kanssa. Kuten esimerkissä 1 on kuvattu Kpn I kohdan käytön seuraksena kaksi lisäkodonia, glysiinille ja treoniinille, luotiin, joka johti yhteensä 12 aminohapon insertioon. IgE'-modifioitu MS-2-kuoriproteiini tunnistettiin ja sen aktiivisuus testattiin kuten alla on kuvattu. N-pään aminohapposekvensointi ensimmäisten 30 tähteen yli vahvisti sekvenssin olevan insertin.

Esimerkki 3. HIVgp120:stä johdetun epitoopin tuottaminen

Käyttämällä esimerkissä 1 kuvattuja tekniikoita, alla kuvatuin muutoksin, 24-meerinen johdettuna ihmisen immuunipuutosviruksen (HIV-1) gp 120 V3-silmukastaliitettiin MS-2 kuoriproteiiniin ja ilmennettiin ja puhdistettiin. gp 20 -insertti luotiin ensin lämpökäsittelemällä oligonukleotidit, jotka koodaavat aminohapposekvenssejä N N T R K S I R I Q R G P G ja G P G R A F V T I G K I G, käsittelemällä Klenow-polymeraasilla kaksoissäikeisen, T_4-polynukleotidikinaasin ja DNA-ligaasin tekemiseksi, jotta tuotetaan kaksoisligatoidut fragmentit, jotka sitten pilkottiin Kpn I:llä ennen geelipuhdistusta ja kloonausta sopivasti valmistettuihin ilmentymisvektoreiden osiin. Insertoitu 24-meerinen aminohapposekvenssi oli N N T R K S I R I Q R G P G R A F V T I G K I G ja syntyneeseen modifioituun kuoriproteiiniin viitataan tämän jälkeen lyhentellä MS2-gp 120. Jälleen on huomattava, että Kpn I -kohdan käytön seuraksena luotiin kaksi lisäkodonia, mikä johti yhteensä 26 aminohapon insertioon. gp 120 -modifioitu kuoriproteiini tunnistettiin kuten alla on kuvattu.

Esimerkki 4. MS2-HA:n immuunivaste

Esimerkin 1 mukaisesti saadun ja sakkaroositiheysgeradienttien läpi sentrifugimalla puhdistetun modifioidun kuoriproteiinin immuunivaste tutkittiin seuraavasti:

Kuoriproteiininäytteet vieraan epitoopin insertion kanssa ja ilman sitä altistettiin Western-blottaukselle ja koetettiin seuraavilla vasta-aineilla:

i) polyklonaalinen seerumi, joka sisältää vasta-aineita villin tyypin MS2-proteiinille, joka saatiin New Zealand -valkoisista kaniineista, jotka immunisoitiin täydellisen Freundin apuaineen läsnöollessa puhdistetun monomeerisen MS-2 kuoriproteiinin kanssa, joka puhdistettiin koskematomasta faagista.

ii) hiiren antipeptidi monoklonaalinen vasta-aine 9-meerille (12CA5 - saatavilla firmasta the Reasearch Institute of Scripps Clinic, Kalifornia, USA).

Käytetty menettely on kuten seuraavaksi on kuvattu:

Kuoriproteiininäytteet 9-meerisen insertin kanssa ja ilman sitä altistettiin SDS-PAGE:lle ja sitten siirrettiin nitroselluloosapaperille. Western-täplä koetettiin sitten joko i):llä tai ii):lla ja tehtiin näkyväksi piparjuuriperoksidaasilla, konjugoidulla vuohi-anti-kaniini- tai rotta-anti-hiiri-IgG:llä vastaavasti, käyttämällä viitteen Harlow ja Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, menetelmää.

Polyklonaalinen seerumi i) reagoitettiin kummankin kuoriproteiininäytteen kanssa, vain vähäisiä määriä ristireaktioita muiden proteiinikomponenttien kanssa ja puhdistetun inluenssan haemagglutiniinin näytteeseen. Kuitenkin monoklolaaninen vasta-aine ii) reagoi oleellisesti vain kuoriproteiininauhan kanssa, joka sisälsi 9-meerisen peptidiepitoopin. Tämä vahvistaa epitoopin läsnäolon kuoriproteiinimateriaalissa, joka kykenee itse kokoontumaan in vivo ja on kokonaan yhtä proteiininäytteiden mobiliteetin kanssa SDS-PAGE:lla, jossa villin tyypin proteiini kulkee hieman nopeammin kuin kimeerinen 9-meerinen proteiini.

Esimerkki 5. Kimeeristen MS-2 -proteiinien tunnistaminen

A) SDS-PAGE ja Western blottaus -analyysi

500 ml E. coli -kasvustoa (TG 1), jossa oli sopivat pGW11 ilmentymisvektorit, vieraan epitoopin kodonien liittämisellä ja ilman, kasvatettiin OD_{600}-arvoon arviolta 0,4 - 0,6, 37 °C:ssa, indusoitiin lisäämällä kiinteää IPTG:tä 1 mM:iin ja inkubointia jatkettiin yön yli. Solut kerättiin talteen sentrifugoimalla ja pelletit uudelleensuspendoitiin 2-3 kertaisella tilavuudella 50 mM tris-HCl + 0,5 % w/v Sarkosyl pH 6,5, sitten solut rikottiin sonikoimalla. Kokonaissonikaatti ladattiin SDS-PAGE (16,5 %T:6%C) akryyliamidigeeleille viitteessä Shägger ja Jagow (Anal. Biochem. **166** 368-379) kuvattujen menetelmien mukaisesti. Elektroforeesi suoritettiin 95 V:ssa 8-10 tuntia ja sitten akryyliamidigeelit värjättiin 0,5 % w/v Coomassie Blue R250 -liuoksella metanoli:etikka:vedessä (2:0,2:3) 8 tuntia, sitten tehtiin värittömäksi samassa liuoksessa, mutta ilman värin lisäämistä.

Tulokset vahvistivat, että kussakin tapauksessa suurin osa indusoi polypeptidinauhan, joka vastasi odotettua molekyylipainoa MS2-kuoriproteiinille ja valmistettuja kimeerejä.

Geelit, jotka ovat samanlaisia kuin ne, jotka valmistettiin kuten edellä on kuvattu, blotattiin 0,2 µm nitroselluloosamembraaniin viitteessä Harlow ja Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, New York) menetelmien mukaisesti ja proteiinit visualisoitiin käsittelemällä anti-MS2-kuoriproteiinikaniinipolyklonaalisen vasta-aineen kansa, mitä seurasi piparjuuriperoksidaasikonjugoitu vuohi-anti-kaniini-IgG. Tulokset on esitetty kuviossa 1, jossa viiva a) esittää villin tyypin MS-2-kuoriproteiinia, viiva b) esittää MS2-HA:ta, viiva c) esittää MS2-IgE':n ja viiva d) osoittaa MS2-gp 120:n. Viiva e) on liitetty molekyylipainomerkiksi (saatavilla firmalta BRL Ltd.) erottuvin nauhoin esittäen 43, 29, 18, 14, 6,2 ja 3,4 kDa:n molekyypipainoja.

Valmistettiin Western-täplät kuten edellä ja MS2-HA ja MS2-IgE'-siirtymäkoettimet joko hiiren tai rotan monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, joka on kohdistettu HA 9-meeriin tai IgE 10-meeriin (liittyvät insertoituun IgE' 10-meeriin) vastaavasti. Nämä monoklonaaliset vasta-aineet saatiin tohtori I. A. Wilsonilta, Scripps Research Institute, La Jolla, Kalifornia tai tohtori D. R. Stanworthilta, University of Birmingham, UK, vastavasti. MS2-gp 120 siirtymä koetettiin vuohen polyklonaalisella anti gp 120:llä (saatu firmalta Repligen Corp., Boston, USA). Visualisoimiseksi piparjuuriperoksidaasikonjugoituna kaniini anti-hiiri IgG:hen, anti-rotta- tai anti-vuohi-IgG:hen, käytettiin vastaavasti. Tulokset osoittivat spesifistä immunoreaktiivisuutta odotettua kimeeriä vastaan. On huomattava, että anti-IgE-monoklonaalinen vasta-aine ristireagoi MS2-IgE'-kimeerin kanssa.

B) Elektronimikroskopia

Solut valmistettiin kuten kohdassa A) edellä seuraavin muutoksin:

Soluja kasvatettiin 30 °C:ssa. Alkuperäinen supernatantti dialysoitiin suoraan 20 mM natriumfosfaattia vasten, pH 7,4 4 °C:ssa ennen kuin se lisättiin immuno-affiniteettikolonniin, jota siten huuhdettiin perusteellisesti dialyysipuskurilla ja sitten samalla puskurilla + 100 mM NaCl ennen kuin MS2-proteiinit eluoitiin 20 mM etikkahappo, 200 mM NaCl:llä. Eluoidut proteiinit säädettiin välittömästi pH 7,0:aan 1 M Tris-HCl:llä, pH 9,0, konsentroitiin ammoniumsulfaattisaostamisella, uudelleensuspendoitiin 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl:ään, pH 7,0 ja sitten dialysoitiin samaa puskuria vasten ennen kuin valmistettiin elektronimikroskopiaa varten käyttämällä negatiivisesti värjäävää protokolla, joka on kuvattu viitteessä Sugiyama et al., (J. Mol. Biol., **166**, 1967, 368-379). Mikrografit tuotettiin käyttämällä JEM-1200-laitetta 75 kV:n kiihdytysjännitteellä.

Immunoaffiniteettikolonni koostui affiniteettipuhdistetusta kaniinin anti-MS2-CP-polyklonaaleista IgG:istä, jotka olivat kovalenttisesti kytkeytyneet Affigel-HZ™:iin (BioRad) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Tulokset on esitetty kuvioissa 2-5, jossa kuvio 2 esittää villin tyypin MS2-kapsideja, kuvio 3 esittää MS2-HA-kapsideja, kuvio 4 esittää MS2-IgE'-kapsideja ja kuvio 5 esittää MS2-gp 120 -kapsideja.

Esimerkki 6. MS2-HA:n antigeenisyys in vivo

MS2-HA-rakenteen immunogeenisyyden testaamiseksi hiirissä MS2-HA saatiin kuten on kuvattu esimerkissä 1 ja puhdistettiin sakkaroositiheysgradienttien yli, so. alkuperäisen solufraktioinnin liukoisesta supernatantista.

Yhteen pannut fraktiot, jotka sisältävät kokoonpantua MS2-HA:ta, saostettiin ammoniumsulfaatilla, saostuma kerättiin sentrifugoimalla ja sitten uudelleensuspendoitiin valittuun puskuriin (tai säilytettiin -20 °C:ssa). Hiirten ryhmä (TUXCS numero yksi) immunisoitiin s.c. erilaisilla annoksilla 5 ng:sta 500 µg:aan kokonaisrakennetta (insertoitu HA9-meeri on 9/140 tämän annoksen painosta). Annokset sisälsivät apuainetta (Alhydrogel) 1:1 seoksena. Tehostusannokset annettiin 7 tai 14 päivän välein, sen jälkeen kun oli otettu verinäytteet analysointia varten. Jopa pienemmällä annoksella oli immunoreaktiivisuutta kuten mmitattiin ELISA-analyysillä MS2-HA:ta vastaan (so. "itse") antigeenina. Kuitenkin merkittäviä vasteita havaittiin vain suuremmilla annoksilla ja olivat silti kasvussa 42 päivän jälkeen. Annosvastekäyrä 42 päivän tiittereistä on esitetty kuviossa 6.

42 päivän näyte hiiristä, jotka immunisoitiin 500 µg:lla MS2-HA:ta, analysoitiin suhteessa spesifisyyteen insertoidun peptidin funktiona. Tämä tehtiin jälleen ELISA-analyysillä käyttämällä joko itseä tai kantajaa, so. villin tyypi MS-2-kapsidikuoria antigeenina. Tulokset on esitetty ku-

viossa 7. Titraussarjojen läpi on suuremmat arvot mittauksille itseä vastaan. Tiitterit 50 % kylläisyydessä ovat 1:7 500 itselle, versus 1:3200 MS-2-kantajalle, indikaationa siitä, että suuremmat spesifiset tiitterit inserttiä vastaan on tuotettu. Tuotetut seerumit ristireagoivat myös HA9-meerisen peptidin kanssa, joka oli kytketty Keyhole Limpet Hemocyanin'iin (KLH), vaikka paljon vähemmän hyvin, luultavasti koska tässä tapauksessa peptidi valmistuu yksin lineaarisena fragmenttina.

Lisäimmunogeenisyysmittauksia suoritettiin ELISAlla, 54 päivän verinäytteillä Balb C-hiiristä, jotka oli immunisoitu MS2-HA:lla, joka valmistettiin kuten edellä on kuvattu Alhydrogel-apuaineen ja villin tyypin MS-2:n kanssa ja ilman niitä ja apuaineen kanssa ja ilman sitä. Vertailutarkoituksiin mittaukset suoritettiin myös 54 päivän verinäytteillä Balb C-hiiristä, jotka oli immunisoitu HA9-meerisellä peptidillä kytkettynä KLH:hon, Alhydrogel-apuaineen ja synteettisen peptidin, joka kattaa HA9-meerinsekvenssin yksin, kanssa ja ilman niitä ja apuaineen kanssa ja ilman sitä. Käytettiin 500 µg:n annosasysteemiä. Kun Alhydrogeliä käytettiin, sitä käytettiin 1:1-seoksena. Tulokset on esitetty alla olevassa taulukossa 1. Annetut tiitterit ovat "itseä" ja "kantajaa" vastaan. MS2-HA:lla ja villin tyypin MS-2:lla injektiota varten "itse" oli MS2-HA-rakenne, kun taas "kantaja" on villin tyypin MS-2. Injektioille KLH-rakenteen kanssa "itse" on KLH-HA9-meerinen rakenne ja "kantaja" on KLH. Yksin HA9-meerisen peptidin kanssa injektiota varten "itse" on HA9-meerinen peoptidi yksin, siinä ei ole ollenkaan "kantajaa".

Taulukko 1

Injektoitu aine	Tiitterin käänteisarvo vastaan	
	a) "itse"	b) "kantaja"
MS-2-HA + Alhydrogel	1500	600
MS-2-HA	4500	2500
MS-2 + Alhydrogel	ei lukemaa	2500
MS-2	1800	5300
KLH-HA9-meeri + Alhydrogel	4900	1800
KLH-HA9-meeri	900	5500
HA9-meeri + Alhydrogel	33	-
HA9-meeri	45	-

Taulukossa 1 esitetyt tulokset osoittavat selvästi vasta-ainevasteen spesifisyyden HA9-meerille olennaisesti ilmennettynä MS2-HA-rakenteessa. Lisäksi se osoittaa myös sen, että ei ole aina tarpeellista käyttää apuainetta tai kantajaa kuten KLH hyvin spesifisen vasta-ainevasteen saavuttamiseksi olenaisesti ilmennettyä vierasta peptidiä vastaan kuten HA9-meeri.

Esimerkki 7. MS2-IgE':n antigeenisuus in vivo

MS2-IgE'-rakenteen immunogeenisyyden testaamiseksi rotissa valmistettiin MS2-IgE':n näyte seuraavalla tavalla:

Rakenteen lysaatit valmistettiin kuten esimerkissä 5A on kuvattu paitsi, että soluja kasvatettiin 30 °C:ssa ja käytetty uudelleensuspendointipuskuri oli 50 mM Hepes + 100 mM NaCl + 10 mM DTT + 5 mM EDTA pH 7,4. Lysaatit selvitettiin sentrifugoimalla.

Sentrifugoinnin jälkeen pelletit uudelleensuspendoitiin samassa eristyspuskurissa ja kehitettiin seuraava uuttomenetelmä. Uudelleensuspendoidut pelletit käsiteltiin DNaasi I:llä (10 µg/µl) magnesiumaseteaatin lisäyksellä 6 mM:iin. 30 minuutin 37 °C:ssa jälkeen suoritettiin suolauutto lisäämällä NaCl:ää 50 mM:iin 20 minuutiksi 37 °C:ssa. Seuravaksi näyte sentrifugoitiin 10 000 rpm:ssä 20 minuuttia 4 °C:ssa ja pelletit uudelleensuspendoitiin samaan

uudelleensuspendointipuskuriin (RS), mutta lisäämällä siihen 1 % v/v Triton X-100 + 0,05 % w/v natriumdeoksikolaattia. Käyttämällä magneettista sekoitinta, seosta sekoitettiin jatkuvasti 60 minuuttia jäässä. Sitten seos sentrifugoitiin ja uudelleensuspendoitiin RS:ään kuten edellä. Fluoritrikloorimetaania lisättiin suspensioon (1:1) ja seosta sekoitettiin jatkuvasti käyttämällä magneettista sekoitinta 15 minuuttia 4 °C:ssa. Seos sentrifugoitiin 3000 rpm:ssä 30 minuuttia 4 °C:ssa ja ylin liukoistunut kerros (SL) aspiroitiin ja säilytettiin jäässä, samalla kun välifaasi uudelleensuspendoitiin ja menettely toistettiin viisi kertaa. Yhteen kerätty SL ammoniumsulfaattikonsentroitiin, sentrifugoitiin ja säilytettiin 4 °C:ssa lisäanalyysiä varten.

Edellä valmistettua ainetta käytettiin immunisoimaan kahta urospuolista Wistar-rottaa (200 g) seuraavien kahden suunnitelman mukaisesti:

1. suunnitelma: 0,25 ml MS2-IgE'-rakenteen suspensiota injektoitiin s.c. päivinä 0 ja 14. Päivänä 36 0,75 ml 2:1 rakennesuspension ja Alhydrogelin seosta (inkuboitu huoneenlämpötilassa 20 minuuttia) injektoitiin s.c. Seerumia saatiin ELISA-analyysiä varten päivinä 21, 48 ja 70 hännistä otetuista verinäytteistä.

2. suunnitelma: 0,35 ml 2:1 rakennussuspension ja Alhydrogelin seosta (inkuboitu huoneenlämpötilassa 20 minuuttia) injektoitiin s.c. päivinä 0 ja 14. Päivänä 36 0,75 ml rakennesuspensiota ja Alhydrogel-seosta injektoitiin ihonalaisesti. Seerumia saatiin ELISA-analyysiä varten päivinä 21, 48 ja 70 hännistä otetuista verinäytteistä.

Seerumit, jotka saatiin kuten edellä, tarkistettiin ELISAlla injektoitua immunogeenia MS2-IgE' vastaan määrittämällä vaste "itseä" vastaan (tässä tapauksessa MS2-IgE') ja kantajaa MS-2 vastaan. Suurimmat tiitterit olivat itseä vastaan (1. suunnitelma, 70 päivän verinäyte ja 2. suunnitelma

70 päivän verinäyte vastaavasti) 1:50 000 ja 1:70 000 ja kantajaa vastaan (1. suunnitelma, 70. päivän verinäyte ja 2. suunnitelma 70. päivän verinäyte vastaavasti) 1:10 000 ja 1:20 000

Tulokset osoittavat sellaisen vasta-ainevasteen spesifisen luonteen, joka saavutettiin IgE'-peptidiä vastaan, joka ilmentyy olennaisesti MS2-IgE'-rakenteessa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä modifioidun kapsidin muodostavan proteiinin valmistamiseksi, joka proteiini käsittää kalvoproteiinimateriaalia bakteerifaagista, joka on valittu ryhmästä käsittäen MS-2:n ja samansukuiset E. coli -faagit mukaan lukien R17, fr, GA, QB ja SP, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää vieraan peptidiepitoopin insertoimisen kohtaan, jossa mainittu epitooppi esiintyy koostuneen kapsidin N-terminaalisessa ulkonevassa β-hiusneulassa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että insertiokohta on sellaisten aminohappotähteiden välissä, joiden vieressä on toisella tai molemmilla puolilla glysiinitähde.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kalvoproteiinia MS-2, R17, fr tai GA modifioidaan insertoimalla mainittu vieras peptidiepitooppi tähteiden 14 (glysiini) ja 15 (treoniini) väliin.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kapsidit koostetaan modifioidusta proteiinista.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että modifioidaan DNA:ta, joka koodaa esitetyn kalvoproteiinin ilmentymistä insertoimalla DNA, joka koodaa vierasta epitooppia esitettyyn insertiokohtaan, ja ilmennetään modifioitua DNA:ta sopivassa isäntäsolussa.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että viedään valitun bakteerifaagin kalvoproteiinia vastaava cDNA-sekvenssi sekvensoivaan vektoriin, joka soveltuu paikkasuunnattuun mutageneesiin, luodaan ainutkertainen restriktioentsyymin tunnistuskohta ulkonevaa hiusneulaa koodaavan cDNA:n alueelle, insertoidaan mainittu DNA mainittuun restriktiokohtaan ja alakloonataan täten modifi-

oitu vektori sopivaan ekspressiovektoriin, minkä jälkeen indusoidaan modifioidun vektorin ilmentyminen sopivassa isäntäsolussa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että isäntäsolu on *E. coli*.

8. Ekspressiovektori, joka käsittää missä tahansa edellisessä patenttivaatimuksessa esitettyä modifioitua proteiinia koodaavan DNA:n.

9. Isäntäsolu, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 8 mukaisella ekspressiovektorilla.

10. Menetelmä rokotteen tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-7 mukaisella menetelmällä valmistetun modifioidun proteiinin viemisen sopivaan kantajaan.

Patentkrav

1. Förfarande för tillverkning av protein som bildar en modifierad kapsid, varvid proteinet innefattar täckproteinmaterial från en bakteriefag, vilken är vald i gruppen som innefattar MS-2 och besläktade E. coli-fager inklusive R17, fr, GA, QB och SP, **kännetecknat** av att förfarandet innefattar insertion av en främmande peptidepitop på ett ställe, där nämnda epitop förekommer i den utstående β-hårnålstrukturen hos N-terminalen av sammansatt kapsid.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att insertionspunkten är mellan sådana aminosyrarester, som på ena eller vardera sidan har en glycinrest.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att täckproteinet MS-2, R17, fr eller GA modifieras genom att nämnda främmande peptidepitop inserteras mellan resterna 14 (glycin) och 15 (treonin).

4. Förfarande enligt patentkrav 1, 2 eller 3, **kännetecknat** av att kapsiderna sammansätts av modifierat protein.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, **kännetecknat** av att man modifierar DNA, som kodar uttrycket av föreliggande täckprotein genom att insertera DNA, som kodar en främmande epitop på detta insertionsställe, och modifierat DNA uttrycks i en lämplig värdcell.

6. Förfarande enligt patentkrav 5, **kännetecknat** av att en cDNA-sekvens motsvarande täckprotein av den valda bakteriefagen förs till en sekvenserande vektor, som passar för lokalriktad mutagenes, en unik identifieringspunkt av restriktionsenzym skapas inom cDNA-området som kodar den utstående hårnålen, nämnda DNA inserteras på nämnda restriktionspunkt och den sålunda modifierade vektorn underklonas till lämplig expressionsvektor, och därefter induceras den modifierade vektorns uttryck i en lämplig värdcell.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, **kännetecknat** av att värdcellen är *E. coli*.

8. Expressionsvektor, som innefattar DNA som kodar modifierat protein enligt vilket som helst av de föregående patentkraven.

9. Värdcell, som transformerats med expressionsvektorn enligt patenkrav 8.

10. Förfarande för tillverkning av vaccin, **kännetecknat** av att det innefattar införsel av modifierat protein framställt enligt vilket som helst av patentkraven 1-7 i en lämplig bärare.

Fig. 1

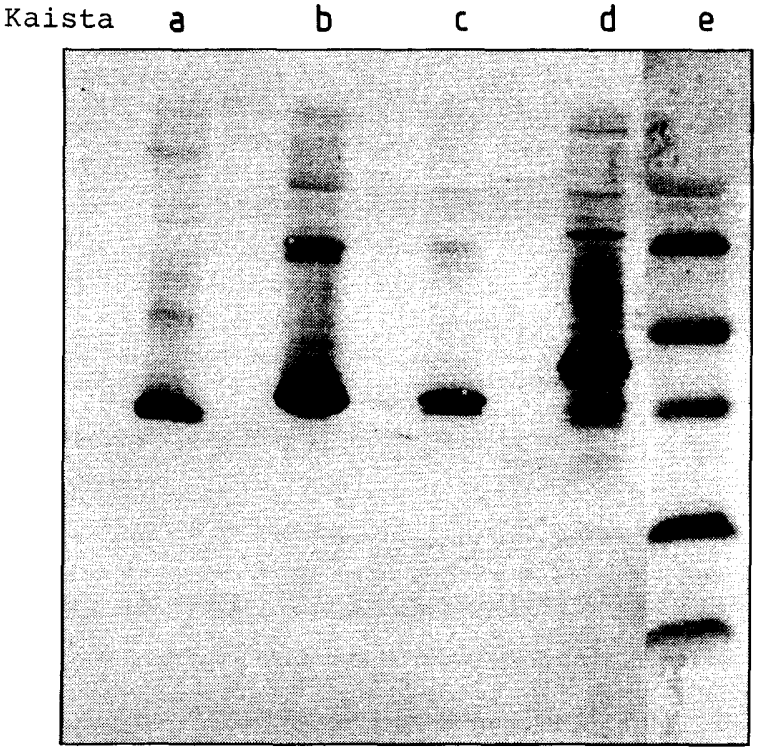


Fig. 2



Fig. 3

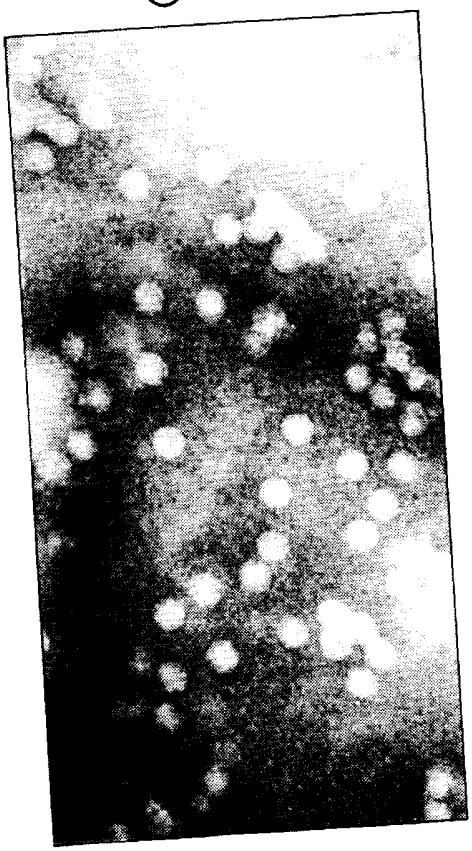


Fig. 4

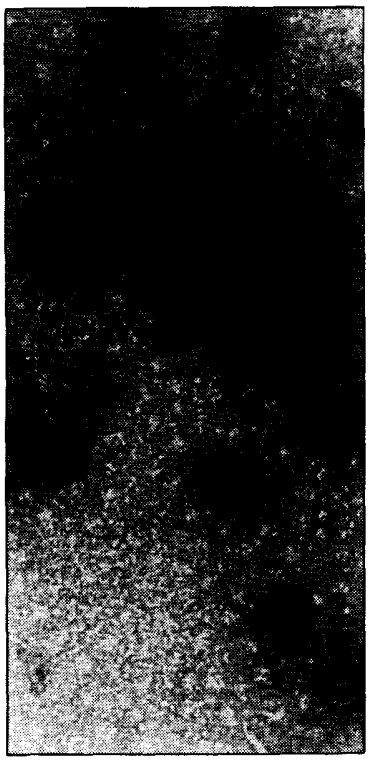
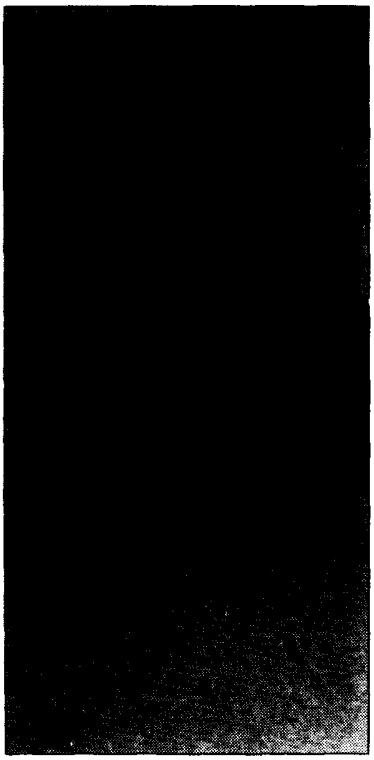


Fig. 5



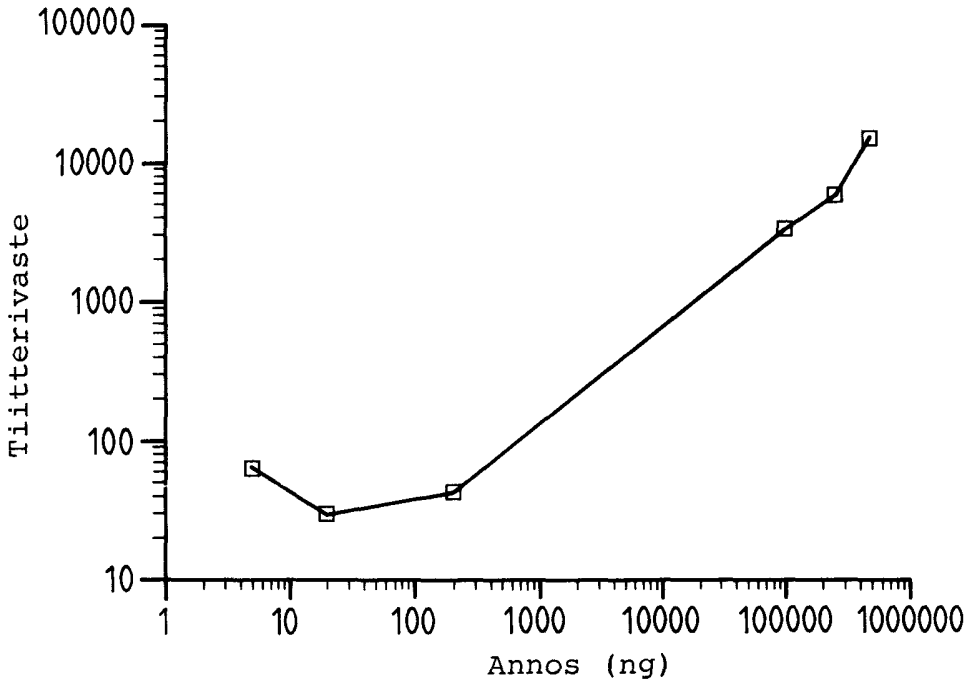

100000
10000
1000
100
10
Tiitterivaste
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
Annos (ng)

Fig. 6

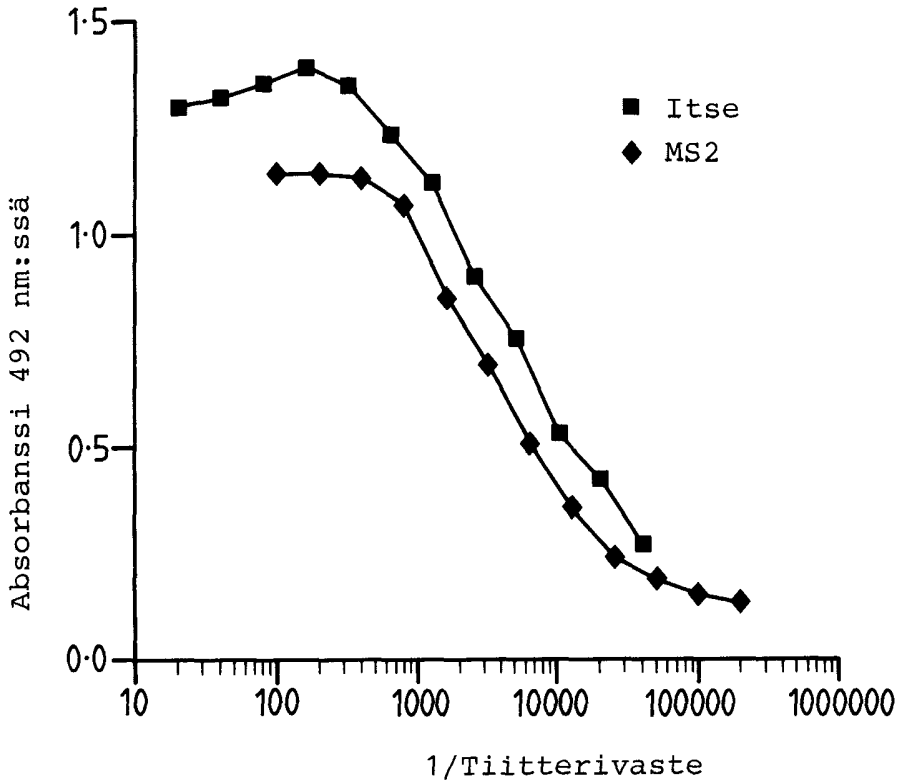

1·5
1·0
0·5
0·0
Absorbanssi 492 nm:ssä
Itse
MS2
10
100
1000
10000
100000
1000000
1/Tiitterivaste

Fig. 7