

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 901876 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **901876**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/00

A61K 35/76

A61K 39/29

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **16.08.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.04.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.04.1990**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **16.08.1989 PCT/US1989/003521**
Internationell ansökan - International
application

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

16.08.1988 US 232811

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Yale University, Woodbrigde Hall, 105 Wall Street New Haven, Conn. 06520, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Fox Chase Cancer Center, 7701 Burholme Avenue Philadelphia, Pa. 19111, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Horwich, Arthur Louis, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Summers, Jesse William, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Epätäydelliset hepadnavirukset, rokotteita tuottavat solulinjat sekä m aksan sairauksien hoito

Ofullständiga hepadnavirus, vacciner producerande cellinjer samt terapi av leversjukdomar

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

B-18383 NRRL
B-18529 NRRL

B-18384 NRRL
CRL-10190 ATCC

B-18385 NRRL

B-18386 NRRL

Epätäydelliset hepadnavirukset, rokotteita tuottavat solulinjat sekä maksan sairauksien hoito

1. Keksinnön ala

5 Tämä hakemus on jatkohakemus sarjanumerolle 232 811, jätetty 16.8.1988.

Tämä keksintö liittyy lisääntymiskyvyltään vaillinaisiin hepadna-viruksiin. Erityisesti tämä keksintö liittyy vaillinaisiin hepadna-viruksiin, jotka eivät itse
10 kykene lisääntymään, mutta joiden esigenomin RNA voidaan sopivan auttajaviruksen tarjoaman toiminnon avulla pakata ja muuntaa käänteiskopioijaentsyymillä DNA:ksi. Erityisesti sovellutusmuodoissa näiden virusten genomin DNA:ssa voi env-, pol- ja/tai ytimen geeneissä olla deletioita. Tämä
15 keksintö liittyy myös hepadna-virusten pakkaaviin genomeihin, joiden itsensä koodaamaa esigenomin RNA:a ei voida pakata, mutta jotka voivat kuitenkin antaa käyttöön pakauksen tarvitsemia trans-ominaisuuksisia toimintoja. Tämän keksinnön mukaisia immunogeenisiä vaillinaisia hepadna-viruksia voidaan muokata rokotteiksi tai käyttää im-
20 muunijärjestelmää stimuloivina aineina hepatiittivirustigeenejä vastaan suunnatun immuunivasteen tuottamiseksi.

Tämä keksintö kohdistuu myös vaillinaisiin hepadna-viruksiin, jotka sisältävät heterologisia geenijaksoja.
25 Tämän keksinnön mukaisessa yhdessä sovellutusmuodossa näitä yhdistelmäviruksia voidaan käyttää sellaisten periytyvien vajavuuksien geeniterapiassa, jotka koskevat jotakin maksan entsyymiä tai entsyymiä, jonka puute voidaan korvata tuottamalla tätä maksassa. Toisessa tämän keksinnön
30 mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan immunogeenistä epitoppia koodaava heterologinen geenijakso muokata tautia aiheuttavan organismin infektiolta suojaavaksi rokotteeksi tai organismin antigeenin aiheuttamilta tiloilta tai sairauksilta.

Tämä keksintö kohdistuu myös sellaisten pysyvien maksasolulinjojen muodostamiseen ja kasvatukseen, jotka ovat pysyvästi transfektoituneet tämän keksinnön mukaisilla hepadna-viruksilla ja jotka kykenevät tuottamaan infektiokykyisiä vaillinaisia hepadna-viruspartikkeleita.

Tämän keksinnön mukaisia hepadna-virusia voidaan myös muokata terapeuttiseksi estäjäaineiksi, jotka ehkäisevät villityyppisen viruksen lisääntymisen tai infektion jatkumisen.

10 2. Keksinnön tausta

2.1 Hepadna-virukset

2.1.1 Hepadna-virusten rakenne

Hepadna-virukset, joihin kuuluu ihmisen hepatiitti-B-virus (HBV) (Barker et al., (1975) Am. J. Med. Sci. 270, 189 - 196), murmelin hepatiitti-B-virus (WHBV) (Ogston, et al., (1982) Cell 29, 385 - 394), ankan hepatiitti-B-virus (DHBV), (Summers ja Mason, (1982) Cell 29, 403 - 415) ja maaoravan hepatiitti-B-virus (GSHBV) (Marion et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2491 - 2495) ovat hepatotrofisia, johtavat jatkuvaan infektiin ja niillä on yhteiset rakennepiirteet. Infektoituneiden organismien veressä havaitaan suuria hepadna-virusmääriä. Hepadna-virionit ovat läpimitaltaan 42 nm ja niillä on nukleokapsidi ja vaippa (katsaukset on esitetty julkaisuissa Ganem ja Varmus, (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, 651 - 693 ja Tiollais et al., (1985) Nature (London) 317, 489 - 495). Vaippa sisältää hepatiitti-B-pinta-antigeenin (HBsAg) sekä hiilihydraatteja ja lipidejä. Nukleokapsidi sisältää rengasmaisen DNA:n (pituus 3,0 - 3,3 kiloemästä (ke.)), DNA-polymeraasin, polymeraasikinaasiaktiivisuuden ja hepatiitti-B-ydinantigeenin (HBcAg).

Hepadna-virusten genomi on pieni, rengasmainen ja osittain kaksinauhainen DNA-molekyyli (katsaus esitetty julkaisuissa Ganem ja Varmus ja Tiollais et al.). Miinusnauha on lineaarinen ja vakiomittainen, 3 - 3,2 ke. Tätä-

vastoin plus-nauhan pituus vaihtelee, ollen 50 - 100 % miinus-nauhasta.

Hepadna-virusten kloonattujen genomien nukleotidijärjestyksen analysoinneista saadut tulokset ovat osoittaneet, että DHBV:a lukuunottamatta miinus-nauha sisältää neljä pääasiallista avointa lukuvaiheistusjaksoa (ORF) S, C, P ja X (katsaus esitetty julkaisuissa Ganem ja Varmus, ks. yllä ja Tiollais et al., ks. yllä). DHBV sisältää ORF:t S, C ja P (ks. kuvio 1). ORF S, joka koodaa HBsAg:a, jakaantuu S-geeniin, esi-S1-alueeseen ja esi-S2-alueeseen. Samalla tavalla ORF C, joka koodaa HBcAg:a, jakaantuu C-geeniin ja esi-C-alueeseen. ORF P koodaa viruksen polymeeraasia. ORF X voi mahdollisesti koodata 154 aminohapon mittaista polypeptidiä. ORF X:n toiminta on kuitenkin tuntematon.

Hepadna-virusten genomien lisääntymiseen kuuluu neljä päävaihetta (katsaus esitetty julkaisuissa Ganem ja Varmus, ks. yllä; Mason, et al., (1987) Adv. Virus Res. 32, 35 - 96 ja Seeger et al., (1986) Nature (London) 232, 477 - 484). Ensimmäinen vaihe sisältää virioneissa esiintyvän epäsymmetrisen DNA:n muuntaminen infektoitujen solujen tumissa esiintyväksi kovalenttisesti sulkeutuneeksi rengasmaiseksi DNA:ksi. Kovalenttisesti sulkeutuneesta rengasmaisesta DNA:sta tapahtuu transkriptio RNA-polymeraasi II:lla, ja tästä muodostuu kaksi RNA-lajia, genomien RNA ja genomien apu-RNA. Genomin RNA (3,5 ke.) sisältää viruksen geneettisen informaation täydellisenä ja se voi sen vuoksi toimia sekä vastinnauhanauhana kahdentumisessa että mRNA:na. Genomin apu-RNA:t, joiden pituus on 2,1 ja 2,4 ke., ovat todennäköisimmin esi-S1 (2,4 ke.:n transkriptoituva jakso) ja Esi-S2- ja S-proteiinit (2,1 ke.:n transkriptoituva jakso.).

Miinus-nauhan DNA syntetisoituu sitten genomien esi-RNA:n käänteiskopioitumisen avulla viruksen polymeeraasia ja proteiinialuketta käyttäen. Aloituskohdan miinus-nauhan

DNA-synteesiin ajatellaan esiintyvän lyhyessä DR1-jaksossa (suora toistojakso 1).

Viimeinen vaihe, plus-nauhaisen DNA:n synteesi, tapahtuu kopioimalla kopioitava miinus-nauha virukseen liittyvällä polymeraasilla yhdessä oligoribonukleotidi-
 5 alukkeen kanssa. Sekä DR1:lla että DR2:lla on tärkeä osuus tässä vaiheessa (lisäyksityiskohtia on saatavissa julkaisuista Ganem ja Varmus, ks. yllä ja Seeger et al., (1987) Adv. Virus Res. 32, 35 - 96). Käytössä on ilmei-
 10 sestä RNA-aluke, joka on johdettu esigenomin RNA:n 5'-osasta. Tämä aluke sisältää DR1-jakson, joka julkaisussa Madson et al., (1987) Adv. Virus Res. 32, 35 - 96 tehdyn ehdotuksen mukaan liittyisi vastinosistaan miinus-nauhassa olevaan DR2-jaksoon, joka tekisi mahdolliseksi alukkeen
 15 muodostuksen plus-nauhan synteesiä varten. Plus-nauhan synteesi etenee eripituisia matkoja päättyen usein ennen miinus-nauhan täydellistä kopioitumista.

Hepatiitti-B-virusgenomin rakennetta ja ilmentymistä on tutkittu yhdistelmä-DNA-tekniikoilla. GB-patenttijulkaisu n:o 2 034 323A (julkaistu 4.6.1980) kuvaa HBV-DNA:n kloonauksen ja ilmentämisen. Dubois et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4549 - 4553, ovat raportoineet, että HBV:n pinta-antigeeni ilmentyy ja pinta-antigeenipartikkelit erittyvät hiirisolujen rinnakkais-
 20 transformaation jälkeen kloonatulla HBV-DNA:lla ja herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasigeenillä. Moriarty et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2606 - 2610, kuvaavat sellaisen yhdistelmä-simian -viruksen konstrukti-
 25 on ja ilmentämisen, joka sisältää HBsAg:a koodaavan HBV-DNA:n fragmentin; 22 nm pinta-antigeenipartikkelien osoitettiin erittyvän kasvatusliuokseen. EP-patenttijulkaisu n:o 0 020 251 (julkaistu 10.12.1980) kuvaa HBV-proteiineja koodaavan yhdistelmä -ilmentämisvektorin konstruktion ja
 30 ilmentämisen. EP-patenttijulkaisu n:o 0 013 828 (julkaistu 6.8.1980) kuvaa yhdistelmä-DNA-vektorit, jotka sisältä-

vät HBV-antigeenisyyttä koodaavista Dane-partikkeleista eristettyjä HBV-DNA-fragmentteja.

2.1.2 Hepadna-virusten infektion biologia

HBV-infektio on havaittu hyvin monimuotoiseksi, ulottuen ilmenemättömistä muodoista, joissa yksilöissä havaitaan lievä maksavaurio tai ei mitään vauriota, äkilliseen hepatiitti-B:hen, joka on melko vakava sairaus, jolle on luonteenomaista maksasolujen vauriot ja tulehdus, ja vakavaan pitkäaikaiseen maksasairauteen (katsaus on esitetty julkaisussa Ganem ja Varmus, (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, 651 - 693). Näyttää siltä, että virus sinänsä ei ole solumyrkyllinen. Vaihtelu isännän immuunivasteessa viruksen infektoimia soluja vastaan näyttää olevan yksilöiden maksavaurion vaikeusasteen määräävin tekijä. Sekä kiertävien vasta-aineiden että solujen välittämiä immuunivasteita on yleisesti havaittu äkillisen ja kroonisen HBV-infektion aikana (katsaus on esitetty artikkelissa Robinson, (1986), teoksessa Fundamental Virology (Fields, B.N. ja Knipe, D.M, toim.), Raven Press, N.Y. sivut 657 - 679). Muiden hepadna-virusten on havaittu olevan pääasiassa hepatotrooppisia ja ne aiheuttavat jatkuvan virusinfektion. Pitkäaikaisen aktiivisen hepatiitin on havaittu syntyvän HBV- ja WHBV-infektiosta.

Hepatosyyttien infektion lisäksi on HBV-DNA:a havaittu sellaisissa maksakudokseen kuulumattomissa kudoksissa kuten munuaisissa, haimassa ja ihossa (Robinson, ks. yllä). Vapaata virus-DNA:a on myös havaittu infektoituneiden Pekingin ankkojen munuaisissa ja haimassa. HBV-DNA:a on myös havaittu äärisverenkierron leukosyyteissä ja luuytimen soluissa, vaikkakin kopioiden lukumäärä on ollut alhaisempi kuin hepatosyyteissä.

Hepadna-virukset voivat esiintyä hepatosyyteissä joko vapaana DNA:na tai integroituna isäntäsolun kromosomiin (Tiollais et al., (1985) Nature, London 317, 489 - 495). Vapaata HBV-DNA:a on havaittu HBV-infektion

5 äkillisen ja joidenkin pitkäaikaisten vaiheiden aikana ja tämä tavallisesti edustaa lisääntymiseen liittyviä välimuotoja. Integroituja jaksoja tavataan sitävästoin useimmin pitkäaikaisessa virusinfektiossa ja hepatosellulaarisessa karsinoomassa.

Sen lisäksi, että hepadna-virusinfektio aiheuttaa äkillisen ja kroonisen maksasairauden, osoittavat epidemiologiset ja molekyylibiologiset tutkimukset yhteyden virusinfektion ja hepatooman välillä (katsaukset on esitetty julkaisuissa Ganem ja Varmus, ks. yllä, Machowiak, 10 (1987) Am. J. Med. 82, 79 - 97; ja Tiollais *et al.*, (1985) Nature (London) 317, 489 - 495. Tiheästi esiintyvien HBV:n pitkäaikaisinfektioiden ja hepatooman esiintymisen välillä on vahva korrelaatio esimerkiksi Kaakkois-Aasiassa ja päiväntasaajan Afrikassa. Hepatoomapotilaiden hepatosyyttien on havaittu sisältävän HBV-DNA:a ja HBsAg:a. Hepatoomaa on havaittu myös pitkäaikaisesti hepadna-virusien infektoimissa eläimissä. Hepatooma voitiin aiheuttaa kokeellisesti murmeleissa ymppeämällä WHBV vastasyntyneisiin. 20

Ihmisten (Dejean *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5350 - 5354), murmelin (Ogston *et al.*, (1982) Cell 29, 403 - 415), maaoravan (Marion *et al.*, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4543 - 4546) ja ankan (Imazeki *et al.*, (1988) J. Virol. 62, 861 - 862) hepatosellulaarisessa karsinoomassa esiintyvien hepadna-virus-DNA-jaksojen rakennetta on tutkittu Southern -blottaushybridisoinnilla. On yleisesti havaittu, että virus-DNA integroituu 1 - 12 kohtaan isännän kromosomaalisessa DNA:ssa. 25 Virus-isäntäkromosomiliitokset paikallistuvat yleensä koheesiivisen pään alueelle DR1:n ja DR2:n välissä. 30

2.1.3 Rokotus ja HBV-infektioon käytetty hoito

Nykyiset HBV-infektion hoitomenetelmät voidaan jakaa kahteen luokkaan, antiviraalisiin ja immunomoduloivia aineita käytettäviin (katsaus esitetty julkaisussa Hoofna- 35

gle, Ann. Int. Med. 107, 414 - 415). Yksi laajamittaisesti testattu analogi on vidarabiini (adeniini arabinosidi), adeniinianalogi, jolla on voimakasta aktiivisuutta herpesviruksia vastaan. Vaikkakin havaittiin, että viruksen lisääntymisen estyminen oli lähes täydellistä ja pysyvää joissakin potilaissa, viruksen toiminta estyi vain osittain ja väliaikaisesti joissakin potilaissa. Yksi tämän lääkeaineen käytön haittapuolia oli se, että se on hyvin niukkaliukoinen veteen ja sitä oli annosteltava suonensisäisesti jatkuvalla infuusiolla. Vidarabiinin yksifosforiyliryhmäistä johdannaista, vidarabiinifosfaattia, voidaan annostella nopealla suonensisäisellä infuusiolla tai lihaksensisäisesti. Vaikka vidarabiinifosfaattiterapian tuloksena oli seerumin hepatiitti-B-virus-DNA:n häviäminen, ei tämä johtanut siihen liittyvän maksasairauden paranemiseen. Muihin virustenvastaisiin aineisiin, joiden tehokkuutta on testattu HBV-infektion hoidossa, kuuluvat asykloviiri ja suramiini.

On myös tehty tutkimuksia, joissa potilaita käsiteltiin joko lymfoblastoidi- tai yhdistelmä -alfa-interferoneilla 1 - 6 kk ajan. Havaittiin, että vain 25 - 40 % potilaista antoi vasteen tälle hoidolle. Vidarabiinin ja ihmisen leukosyytti-interferonin yhdistelmä osoittautui toksiseksi. Muihin tällä hetkellä tutkittaviin hoitomuotoihin kuuluvat interkeukiini-2-, gamma-interferoni- ja lyhytaikaiset kortikosteroidihoidot.

US-patentti n:o 4 741 901 kuvaa rokotteen, joka käsittää kypsästä hepatiitti-B-pinta-antigeenista valmistetun 22 nm:n polypeptidipartikkelin.

30 2.2 Vaillinaiset virukset

2.2.1 Vaillinaiset RNA-virukset

Useimmissa selllaisten RNA-virusten, kuten vesicular stomatitis -virus (VSV), parainfluenssavirus, influenssavirukset, alfavirukset ja reovirukset, valmisteissa (kat-
saus esitetty artikkelissa Holland (1986) teoksessa

Fields, B.N. ja Knipe, D.M, toim.), Raven Press, N.Y., sivut 77 - 99) on lukuisia partikkeleita, jotka tunnetaan vaillinaisina häiritsevinä (DI, defective interfering) partikkeleina, joiden genomi sisältää vain osan emoviruksen geneettisestä informaatiosta. DI-partikkelit eivät kykene lisääntymään itsenäisesti isäntäsoluissa, mutta lisääntyvät, kun ne infektoivat solun yhdessä homotyyppisen infektoivan viruksen (avustava virus) kanssa, jolta ne saavat puuttuvat geenituotteet. Avustavan viruksen lisääntyminen heikentyy huomattavasti (itseaiheutettu häiriytyminen), koska DI-partikkelit kilpailevat infektoivista partikkeleista saadusta rajoittavasta RNA-polymeraasimäärästä.

DI-partikkeleilla on havaittu olevan osuutta sekä äkillisissä että pitkäaikaisinfektioissa. On osoitettu, että VSV-DI-partikkelit muuntavat virulenssia hiiressä aloittamalla VSV:n syklisellä tavalla etenevän VSV:n kasvun in vivo (Cave et al ., (1985) J. Virol. 55, 366 - 373). Lisäksi baby hamster kidney -soluissa esiintyvän jatkuvan VSV-infektion muodotuminen ja säilyminen vaatii myös DI-partikkeleita (Holland ja Villareal, (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2956 - 2960).

DI-partikkeliin synty voi johtua poikkeavista lisääntymistapahtumista (Lazzarini et al., (1985) Cell 26, 145 - 154). On esitetty väite, että näissä tapahtumissa polymeraasin ja parhaillaan syntyvän nauhan muodostama kompleksin irtoaa vastinnauhasta ja kahdentuminen viedään loppuun toista vastinnauhaa käyttäen tai alkaen uudelleen saman vastinnauhan toisesta kohdasta.

2.2.2 Vaillinaiset retrovirukset

Vaillinaiset retrovirukset eroavat pääasiallisesti muista vaillinaisista RNA-viruksista sen suhteen, että vaillinaiset retrovirukset eivät yleensä muunna täysimitaisten retroviruspartikkeliin infektiota. Vaillinaiset retrovirukset, kuten myös muutkin vaillinaiset RNA-viruk-

5 set, voivat lisääntyä vain avustavan viruksen läsnäollessa. Avustavan viruksen ja vaillinaisen viruksen ei tarvitse olla sama retrovirus, esimerkiksi leukemiavirus voi toimia avustavana viruksena vaillinaiselle sarkoomavirukselle.

10 Ei-vaillinaiset retrovirukset sisältävät genomien 5'- ja 3'-päässä pitkän päätetoistuman (LTR) sekä gag-, pol- ja env-geenit (katsaukset on esitetty teoksessa Watson et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, osa 2, Benjamin/Cummings Publishing Co. Menlo Park, CA ja artikkelissa Hanafusa, (1977) teoksessa Comprehensive Virology, Fraenkel-Conrat, H. ja Wagner, R. R. (toim.), Plenum Publishing Co., N.Y. sivut 401 - 436). Rousin sarkoomavirusta lukuunottamatta ei-vaillinaiset retrovirukset eivät ole
15 kuitenkin sisältäneet kasvaingeenejä. Ei-vaillinaiset retrovirukset aiheuttavat leukemioita melko pitkän latenssijakson päästä (esim. HTLV-1, kissan leukemiavirus).

20 Vaillinaisten retrovirusten luonnonisolaatit, jotka oleellisesti kaikki sisältävät kasvaingeenejä, ovat tuloksena deletioista gag-, pol- ja env-geeneissä (katsaukset on esitetty julkaisuissa Watson (ks. yllä) ja Hanafusa (ks. yllä)). Nämä virukset tunnetaan äkillisesti transformoivina viruksina ja niillä on kyky aiheuttaa kasvaimia in vivo lyhyen latenssijakson jälkeen (esim. sarkoomavirukset).
25 On lisäksi osoitettu, että mikäli LTR:t ovat muuttumattomia, provirus-DNA voi integroitua isännän genomiin, muodostaa RNA:a transkriptiossa ja transformoida tämän jälkeen isäntäsolun, mutta ne eivät voi tuottaa infektiokykyisiä jälkeläisiä. Mutta jos nämä solut infektoidaan ei-vaillinaisilla viruksilla syntyy ei-vaillinaisten ja vaillinaisten virusten seos. Tässä tapauksessa
30 syntyy usein pseudotyyppisiä, joissa ei-vaillinaisen viruksen tekemä vaipan glykoproteiini liittyy vaillinaiseen virukseen tuottaen infektoivia partikkeleita.

Vaillinaisia retroviruksia on käytetty geenitransduktiomenetelmässä, jossa vaillinainen virus kuljettaa vierasta DNA-jaksoa. On esimerkiksi raportoitu aikuisen rotan hepatosyyttien primääriviljelmien transduktio lisääntymiskyvyttömillä retroviruksilla, jotka ilmentävät konstitutiivisesti korkeita β -galaktosidaasitasoja (Wilson et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3014 - 3018).

2.2.3 Vaillinaiset DNA-virukset

DI-partikkeleita on havaittu syntyvän sellaisista DNA-viruksista, kuten papovavirukset, herpesvirukset, adenovirukset ja parvovirukset, viruksen poikkeavien lisääntymistapahtumien tai homologisen rekombinaation seurauksena (katsaus on esitetty julkaisussa Holland, ks. yllä). Samoin kuin oli laita RNA-virusten suhteen, nämä DNA-virusten DI-partikkelit syntyvät villityypisellä viruksella tapahtuneen korkeatiitterisen infektion jälkeen. Samoin kuin oli laita RNA-virusten suhteen, DNA-viruksista syntyy monia rakenteeltaan erilaisia DI-partikkeleita, jotka sisältävät villityypisen genomin deleetioita, substituutioita ja duplikaatioita.

DI-partikkelien on myös osoitettu heikentävän äkillistä virusinfektiota papovaviruksissa (Brochman, 1977, Proc. Med. Virol. 23, 69 - 85) ja adenoviruksissa (Larsen, 1982 Virology 116, 573 - 580). Samoin kuin oli laita RNA-virusten suhteen, DNA-virusten DI-partikkelien ajatellaan kuitenkin liittyvän jatkuvaan infekioon. Esimerkiksi DI-genomit lisääntyvät itsenäisesti BK-viruksella, ihmisen papovaviruksella, transformoiduissa soluissa (Yogo et al., (1980) Virology 103, 241 - 244).

2.3 Rokotteet

2.3.1 Inaktivoidut tai heikennetyt taudinaiheuttajat

Perinteisiin rokotteiden valmistusmenetelmiin kuuluu inaktivoitujen tai heikennettyjen virusten käyttö.

Viruksen inaktivointi tekee tämän vaarattomaksi biologisena agenssina, mutta ei tuhoa sen immunogeenisyyttä. Näiden "tapettujen" virusten injektio isäntään aiheuttaa sitten immuunivasteen, joka kykenee neutraloimaan tulevat infektiot elävällä viruksella. Tapettujen rokotteiden käytössä (inaktivoituja viruksia käyttäen) suurimpana huolenaiheena on epäonnistuminen viruspartikkelien täydellisessä inaktivoinnissa. Vaikka tähänkin päästäisiin, saavutettu immuunisuus on usein lyhytkestoista ja tavallisesti tarvitaan useita immunisointeja, koska tapetut virukset eivät lisäänny isännässä. Lopuksi on mainittava, että inaktivointimenetelmä voi muuntaa virusproteiineja tehden nämä tehottomammiksi immunogeeneiksi.

Heikentäminen tarkoittaa sellaisten viruskantojen muodostamista, joilta taudinaiheuttamiskyky on oleellisesti hävinnyt. Yksi keino tämän aikaansaamiseksi on altistaa virus epätavallisille kasvuolosuhteille ja/tai useaan jatkoviljelyyn soluviljelmässä. Valikoidaan sitten virusmutantteja, joiden virulenssi on hävinnyt, mutta jotka kuitenkin kykenevät herättämään immuunivasteen. Heikennetyt virukset ovat yleensä hyviä immunogeeneja, koska ne tosiasiassa lisääntyvät isäntäsolussa ja synnyttävät pitkäkestoisen immuniteetin. Epätäydellinen heikentäminen voi kuitenkin olla ongelmia aiheuttavaa.

2.3.2 Alayksikkörokotteet

Vaihtoehdon edellisille menetelmille muodostaa alayksikkörokotteiden käyttö (ks. esim. Blumbergin ja Millmanin US-patentti n:o 3 636 191). Tämä sisältää immunisoinnin vain niillä proteiineilla, jotka sisältävän asianomaista immunologista materiaalia. Yksi alayksikkörokotteiden etu on se, että tarpeeton virusmateriaali jää pois. Monien vaipallisten virusten kyseessä ollessa sisältää viruksen koodaama glykoproteiini niitä epitooppeja, jotka kykenevät aiheuttamaan neutraloivien vasta-aineiden muodostuksen. HBV-alayksikkörokote sisältää hepatiitti-B-

pinta-antigeenin (HBsAg), joka on puhdistettu pitkäaikais-
infektiota potevien kantajien verestä (Krugman, 1982
J.A.M.A. 247, 2012 - 2015). Tämän rokotteen on osoitettu
olevan tehokas ja turvallinen korkealle riskille alttiissa
5 aikuisväestöissä, esim. huumeista riippuvien ja homoseksuaalien
ryhmissä ja vastasyntyneillä lapsilla. Rokote on
kuitenkin hyvin kallista seerumin äärellisen saatavuuden,
monimutkaisen puhdistus- ja inaktivointimenetelmän sekä
pitkän simpansseissa suoritettavan turvallisuustestin
10 vuoksi, joka tarvitaan tämän tuotantoon ja myyntilupa.

Alayksikkörokotteet voidaan myös valmistaa pinta-
antigeenien immunologisesti tärkeitä alueita edustavista
synteettisistä peptideistä. Tätä lähestymistapaa on yri-
tetty käyttää useiden virusten yhteydessä, esim. suu- ja
15 sorkkatautiviruksen (Bittle et al., (1982) Nature (London)
298, 30 - 33), influenssa-A-viruksen (Muller et al.,
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 569 - 573), poliovi-
ruksen (Emini et al., (1983) Nature (London) 304, 699 -
703), ja HBV:n (Itoh et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci.
20 USA 83, 9174 - 9178) yhteydessä. Peptidi kytketään kanta-
ja-aineeseen (esim. hemosyaniini, poly-DL-alaniini) ja
annostellaan yhdessä apuaineen kanssa. Tässä lähestymis-
tavassa on joitakin heikkouksia. Nämä peptidit vaativat
yleensä Freundin adjuvantin, jolla on syöpää aiheuttavia
25 ominaisuuksia, käyttöä vahvistamaan immuunivastetta vah-
vaksi, koska nämä ovat yleensä suhteellisen heikkoja anti-
geenejä.

Yhdistelmä-DNA-tekniikan käyttö alayksikkörokottei-
den valmistamiseksi sisältää molekyylien kloonauksen ja
30 isäntäeläimessä syntyvän neutraloivan vasteen aiheuttavia
proteiineja koodaavan geneettisen informaation ilmentämi-
sen sopivassa vektorissa.

HBV:lle ja muille viruksille on kehitetty joukko
menetelmiä viruksen pinta-antigeenin tuottamiseksi aivotu-
35 maisissa soluissa. Yksi esimerkki käsittää hiivan trans-

fektion yhdistelmäolekyyllillä, jossa HBsAg on liitetty
 hiivan ilmentämisvektoriin indusoituvan promoottorin jäl-
 keen (katsaus on esitetty patenttijulkaisussa Valenzuela
et al., (1988), patentti 4 722 841). Hiiva täytyy kuiten-
 5 kin hajoittaa HBsAg:n vapauttamiseksi. Antigeeni puhdis-
 tetaan sitten isopyknisellä ja nopeus-vyöhykesentrifugoin-
 nilla, jotka on yhdistetty immunoaffiniteettikromatografi-
 aan.

Analogisia lähestymistapoja on yritetty soveltaa
 10 nisäkässoluihin yhdistelmäviruksia käyttäen. Yleensä vi-
 rusta käytetään vektorina sen genomiin liitettyjen vierai-
 den geenien ilmentämiseksi. Isäntäeläimiin vietyä yhdis-
 telmävirus ilmentävät liitettyä vierasta geeniä ja voi-
 vat näin aiheuttaa isännän immunivasteen syntymisen tätä
 15 geenituotetta vastaan. HBsAg:a sekä muita pinta-antigee-
 neja on tuotettu yhdistelmä -vacciniaviruksella (Smith et
al., (1983) Nature (London) 302, 490 - 495), SV40 -yhdis-
 telmäviruksella, jolla on vaillinainen kahdentumisen aloi-
 tuskohda (Burnette et al., (1984) teoksessa Modern Appro-
 20 aches to Vaccines, Lerner, R.A., ja Chanok, R.M. (toim.)
 Cold Spring Harbor, NY, sivut 245 - 250), naudan papilloo-
 maviruksella (Statowa et al., ks. edellä, sivut 239 - 243)
 ja adenoviruksilla (Morin et al., (1987) Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA 84, 4626 - 4630). On lisäksi konstruoitu SV40-
 25 yhdistelmävirus, jossa HBsAg korvaa SV-40:n VP1-proteiinia
 koodaavan alueen (Levinson et al., (1988) US-patentti n:o
 4 741 901).

2.4 Geeniterapia

Geeniterapia tarkoittaa uuden geneettisen informaa-
 30 tion siirtoa ja pysyvää liittymistä soluihin sairauksien
 tai häiriöiden hoitamiseksi. Tavallisesti vieras geeni
 siirretään soluun, joka lisääntyy uuden geenin levittämi-
 seksi solupopulaatioon. Siten kantasolut tai moneen suun-
 taan kehittymään pystyvät esiastesolut ovat tavallisesti
 35 geeninsiirron kohteena, koska ne ovat lisääntyviä soluja,

jotka tuottavat monia eri jälkeläissolulinjoja, joiden on mahdollista ilmentää vierasta geeniä.

Useimmat geeniterapiatutkimukset ovat keskittyneet hematopoieettisten kantasolujen käyttöön. Korkean tehokkuuden omaavia geeninsiirtojärjestelmiä hematopoieettisten kantasolujen transformaatiota varten on tutkittu niiden käyttöä silmälläpitäen (Morrow, 1976, Ann. N.Y. Acad. Sci 265, 13; Salzar et al., (1981) teoksessa Organization and Expression of Globin Gene, A.R. Liss, Inc. New York, s. 313; Bernstein, 1985, teoksessa Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, New York, s. 235; Dick et al., (1986) Trends in Genetics 2, 165). Raportit virusvektori-järjestelmien kehittämisestä viittaavat siihen, että näissä saavutetaan parempi tehokkuus kuin DNA-välitteisissä geeninsiirtomenetelmissä (esim. kalsiumfosfaattisaostus ja DEAE-dekstraani) ja osoittavat niissä olevan kyvyn siirrettyjen geenien liittämiseksi pysyvästi laajaan valikoimaan useita eri solutyyppejä. Yhdistelmäretrovirusia on käytetty laajalti kokeellisesti hematopoieettisten kanta- ja esiastesolujen transduktioon. Geeneihin, joita on menestyksellisesti ilmennetty hiirissä retrovirusvektoreilla suoritettun siirron jälkeen, kuuluvat ihmisen hypoksantiinifosforibosyyli transferaasi (Miller et al., (1984) Science 255, 630) ja ihmisen β -globiini (Dzierzak, E.A. et al., (1988) Nature (London) 331, 35 - 41). Bakteerien geenejä on myös siirretty nisäkässoluihin bakteerien lääkeaineresistenssigeenien siirron muodossa kokeellisissa mallijärjestelmissä. Hematopoieettisten esiastesolujen transformatio lääkeaineresistenteiksi aivotumaisten virusvektoreilla on kyetty aikaansaamaan yhdistelmäretrovirukseen perustuvassa vektorijärjestelmässä (Hock ja Miller, 1986 Nature (London) 320, 275 - 277; Joyner et al., (1983) Nature (London) 305, 556 - 558; Williams et al., (1984) Nature (London) 310, 476 - 480; Dick et al., (1985) Cell 42, 71 - 79; Keller et al., (1985)

Nature (London) 318, 149 - 154; Eglitis et al., (1985) Science 230, 1395 - 1398). Adenoviruksiin liittyviä virusvektoreita on käytetty menestyksellisesti nisäkässolulinjojen transduktiossa neomysiiniresistenteiksi (Hermonat ja Muzyczka, 1984, ks. edellä; Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 3251. Muihin virusvektorijärjestelmiin, joita on tutkittu geeninsiirtokäytön suhteen kuuluvat papovavirukset ja vaccinia -virukset (ks. Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29, 69 - 92).

10 Muihin geeninsiirron menetelmiin kuuluvat mikroinjektio, elektroporaatio, liposomit, kromosomin siirto ja transfektiomenetelmät (Cline, ks. edellä). Salser et al. käyttivät kalsiumfosfaattisaostustransfektiomenetelmää metotreksaatile resistentin dihydrofolaattireduktaasi-
15 (DHFR) tai herpes simplex -viruksen tymidiinikinaasigeenien ja ihmisen globiinigeenin siirtämiseksi hiiren hematopoieettisiin kantasoluihin. Osoitettiin DHFR- ja tymidiinikinaasigeenien in vivo -ilmentyminen kantasolujen jälkeläisinä olevissa soluissa (Salser et al., (1981)
20 teoksessa Organization and Expression of Globin Genes, Alan R. Liss, Inc., New York, sivut 313 - 334).

Geeniterapiaa on myös tutkittu hiirimalleissa päämäärän ollessa entsyymien korvaushoito. Luovuttajahiirestä peräisin olevia normaaleja kantasoluja on käytetty palauttamaan ennalleen hematopoieettinen solujärjestelmä
25 hiiriin, joilta puuttui beta-glukuronidaasi (Yatziv et al., (1982) J. Lab. Clin. Med. 90, 792 - 797). Koska tuotiin luontainen geeni, ei tarvittu yhdistelmäkantatasoluja (tai yhdistelmägeenien siirtotekniikoita).

30 3. Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö kohdistuu lisääntymiskyvyltään vaillinaisiin hepadna-viruksiin. Erityisesti tämä keksintö liittyy kahteen vaillinaiseen hepadna-viruksen genomien DNA:n tyyppiin ja näiden nukleiinihappojaksoihin. Ensimmäinen tyyppi (tästä käytetään tässä yhteydessä nimitystä
35

"partikkelien suhteen vaillinaiset" hepadna-virusgenomit) eivät kykene muodostamaan kaikkia hepadna-virusten lisääntymiseen tarvittavia toimintoja, mutta kykenevät tuottamaan esigenomin RNA:a, jossa on tarvittavat asianmukaiset cis-asemasta vaikuttavat signaalit RNA:n sulkemiseen virionien sisään (pakkaus) ja käänteiskopiointiin DNA:ksi. Yhdessä erityisessä sovellutusmuodossa tämän partikkelien suhteen vaillinaisen genomien sisältävillä hepadna-viruksilla voi ydinantigeenin (HBcAg) tuotto, viruksen polymeeraasi ja/tai pinta-antigeeni (HBsAg) olla vaillinaisen. Toinen tämän keksinnön mukainen vaillinaisten hepadna-virusgenomien tyyppi (tästä käytetään tässä yhteydessä nimitystä "pakkauskykyiset genomit") ovat genomit, jotka voidaan muuntaa transkriptiossa esigenomi-RNA-molekyyleiksi, jotka eivät pysty (i) muuntumaan käänteiskopioinnissa kaksinauhaiseksi genomien DNA:ksi ja/tai (ii) pakkautumaan itsenäisesti, mutta ovat sellaisia, että niistä transkriptiossa voi syntyä mRNA-molekyylejä, jotka koodaavat proteiineja, jotka voivat tuottaa trans-asemasta vaikuttavan viruksen toiminnon, joka puolestaan tarvitaan toisen RNA:n pakkaamiseen virioneihin tai toisen RNA:n transkriptioon virionin DNA:ksi. Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa näihin pakkauskykyisiin genomeihin kuuluu, tähän kuitenkin rajoittumatta, genomien DNA, joka sisältää deleetion suoran toistumajakson (DR) alueella, DR1:llä.

Hepadna-viruksen partikkelien suhteen vaillinaisen genomien sisältäviä virionipartikkeleita voidaan tuottaa ilmentämällä rinnakkain partikkelien suhteen vaillinaista genomia ja "avustavaa" hepadna-viruksen pakkauskykyistä (-iä) genomia (-eja). Näitä virioneja voidaan myös tuottaa ilmentämällä rinnakkain partikkelien suhteen vaillinaisia genomia ja nukleiinihappovektoria (-eita) (esim. plasmideja), jotka koodaavat pakkauksessa tarvittavia trans-asemasta vaikuttavia toimintoja (esim. käänteiskopioijaent-

syymi, ydin, vaippatoiminnot). Näin saadut hepadna-viruksia, jotka sisältävät partikkelien suhteen vaillinaisen genomien (pakatun partikkelien suhteen vaillinaisen genomien), voidaan sitten käyttää infektoimaan hepatosyytti, joihin vapautuu partikkelien suhteen vaillinaista DNA:a ja joissa tämä voi ilmentyä, mutta joka DNA ei sen jälkeen voi vaillinaisen luonteensa johdosta aikaansaada toista hepadna-viruksen infektiokykyä. Partikkelien suhteen vaillinaisen hepadna-virusgenomi voi ilmentyä siten hepatosyyteissä ilman, että virus lisääntyisi ja aiheuttaisi tauteja tai sairauksia.

Tämä keksintö liittyy myös sekä pakattujen partikkelien suhteen vaillinaisten genomien että pakkauskykyisten genomien tuotteiden terapeuttiseen käyttöön. Sekä partikkelien suhteen vaillinaiset genomit että hepadna-viruksen pakkauskykyisen genomien immunogeenisiä epitoppeja (esim. HBsAg:a) ilmentävät tuotteet voidaan formuloida rokotteiksi hepadna-virusinfektion ehkäisemiseksi tai käyttää immunoterapeuttisina aineina. Yhdessä sovellutusmuodossa näitä viruksia voidaan käyttää immuunijärjestelmää stimuloivina aineina hepadnavirusinfektion tai sen jälkitilojen hoidossa.

Tämä keksintö kohdistuu myös pakkauksen suhteen vaillinaisiin yhdistelmägenomeihin, jotka käsittävät heterologisen geenijakson, ja tällaisten virusten terapeuttiset käyttömuodot. Yhdessä tämän keksinnön sovellutusmuodossa voidaan useita hepadna-viruksen genomien alueita, joihin kuuluu, näihin kuitenkin rajoittumatta, pakkauskykyisten genomien trans-asemasta komplementoivat viruksen toimintoja koodaavat jaksot, jotka voidaan korvata heterologisilla jaksoilla, jotka tiettyyn organismiin vietyinä ilmentyvät virusten tai muiden säätelyjaksojen ohjaamina. Tällaisia yhdistelmäviruksia voidaan käyttää sellaisten entsyymipuutosten geeniterapiassa, jotka voidaan hoitaa tuottamalla entsyymi maksassa (esim. veren

hyytymistekijät). Vielä yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan heterologisen geenin sisältäviä yhdistelmä-hepadna-viruksia formuloida rokotteiksi suojaamaan tautia aiheuttavan organismin aiheuttamalta infektiolta tai suojaamaan antigeenin läsnäolosta johtuvaa tilaa tai sairautta vastaan.

Vielä yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan pakattuja partikkelien suhteen vaillinainen genomeja käyttää aineina, jotka häiritsevät villityyppisen viruksen infektion etenemistä tai tämän säilymistä ja/tai pääsemään täydellisesti eroon villityyppisen viruksen aiheuttamasta infektiosta tai lieventämään tätä.

Tämän keksinnön mukaiset muut sovellutusmuodot liittyvät pysyviin maksasolulinjoihin, jotka on pysyvästi transformoitu vaillinaisilla hepadna-viruksilla. Yhden tai useamman pysyvästi liittyneen vaillinaisen hepadna-viruksen genomien sisältävät solulinjat kykenevät tuottamaan tarvittavia toimintoja vaillinaisille hepadna-virusgenomeille ja tuottamaan vaillinaisia infektiokykyisiä partikkeleita. Yhdessä erityisessä sovellutusmuodossa pysyvät solulinjat transfektoidaan pysyvästi hepadna-viruksen pakkauskykyisellä genomilla, jonka seurauksena nämä solulinjat saavat kyvyn ilmentää trans-asemasta vaikuttavia, toisen vaillinaisen genomien pakkauksessa ja käänteiskopioinnissa tarvittavia tuotteita (tästä käytetään tässä yhteydessä nimitystä "pakkauskykyinen solulinja"). Partikkelien suhteen vaillinaisen genomien tuominen pakkauskykyiseen solulinjaan mahdollistaa pakattujen partikkelien suhteen vaillinaisten jälkeläisgenomien saamisen talteen.

3.1 Määritelmät

Tässä keksinnössä on seuraavilla käsitteillä mainitut merkitykset:

ep.	=	emäspari
35 DHBV	=	ankan hepatiitti-B-virus

	DR	=	suoran toistuman alue, esim. hepadna-viruksen DR1 tai DR2
	FBS	=	vasikansikiön seerumi
	GSHBV	=	maaoravan hepatiitti-B-virus
5	HBV	=	hepatiitti-B-virus (ihmisen)
	HBcAg	=	DHBV:n, GSHBV:n, HBV:n tai WHBV:n ydinantigeeni
	HBsAg	=	DHBV:n, GSHBV:n, HBV:n tai WHBV:n pintaantigeeni
10	ke.	=	kiloemäs
	kd	=	kilodalton
	NTP	=	nukleosiditrifosfaatti
	WHBV	=	murmelin hepatiitti-B-virus
15	DR1	=	DHBV:n pakkauskykyinen genomi, jossa on kaksinauhaisen virus-DNA:n täydelliseen synteesiin tarvittava DR1-niminen 12 ep.:n suora toistuma
	partikkelien	=	vaillinainen hepadna-viruksen
	teen vaillien	=	genomin DNA, joka ei koodaa kaikkia
20	nen genomi	=	<u>trans</u> -asemasta vaikuttavia pakkaustoimintoja, mutta joka voi transkriptiossa muodostaa esigenomi-RNA:n, jossa on asianmukaiset cis-asemasta vaikuttavat signaalit RNA:n sulkemiseksi virioneihin (pakkaus) ja
25		=	käänteiskopioimiseksi DNA:ksi.
	hepadna-viruksen	=	vaillinainen hepadna-viruksen
	pakkauskykyinen	=	genomigenomin DNA, josta transkriptiossa
	genomi	=	syntyy esigenomi-RNA, jota ei voida (a)
30		=	pakata ja/tai muuntaa käänteiskopioinnilla kaksinauhaiseksi DNA-genomiksi, mutta jonka koodittavat mRNA-moleyyylit koodaavat yhtä tai useampia proteiineja, jotka voivat tuottaa <u>trans</u> -asemasta vaikuttavia sopivan
35		=	toisen esigenomi-RNA:n pakkauksessa tarvit-

- tavia viruksen toimintoja ja toimintoja, joita tarvitaan toisen RNA:n transkriptiossa virionin DNA:ksi.
- 5 pakkauskykyinen solulinja = pysyvä solulinja, joka pysyvästi sisältää ainakin yhden hepadna-viruksen pakkauskykyisen genomien, joka solulinja kykenee ilmentämään viruksen tuotteita, joita tarvitaan trans-asemasta vaikuttavina sopivan toisen esigenomi-RNA:n pakkauksessa virioneihin ja toisen RNA:n käänteiskopiointiin virus-DNA:ksi.
- 10 tuottajasolulinja = pysyvä solulinja, joka sisältää oleellisesti jatkuvaan infektiokykyisten vaillinaisen hepadna-virusgenomien sisältävien hepadna-viruspartikkeleiden tuottamiseen.
- 15

4. Kuvioiden selitykset

- Kuvio 1. Kaavio DHBV-DNA:n rakenteellisista ja toiminnallisista piirteistä sekä huomattavimmista transkriptiotuotteista (a); partikkelien suhteen vaillinaisten DHBV-genomien rakenne (b); DR1:n pakkauskykyisen genomien rakenne (c); ja Δ -DHBV-rekombinanttigenomien rakenne (d).
- 20

- Kuvio 2. Partikkelien suhteen vaillinaisella DHBV-DNA:lla transfektoitujen HuH7-solujen immunofluoresenssi-värjäys. Solut transfektoitiin seuraavilla DNA-molekyy-leillä: RV⁻718 (pol⁻), RV⁻2650 (core⁻), Kpn⁻ (pol⁻env⁻), tai Kpn⁻Sph⁻ (pol⁻env⁻core⁻) ja värjättiin viiden päivän inkubaation jälkeen ydin- (α -c) tai pinta (α -S) antigeenien suhteen. Suurenus: 40 X.
- 25

- Kuvio 3. Southern -blottaushybridisointimääritykset viruksen lisääntymisvaiheen DNA:n ilmaantumisesta näkyviin pol⁻env⁻ ja pol⁻env⁻core⁻ -virusmutanttien ja Δ -DHBV:n DNA:lla transfektoiduissa HuH7-soluissa. HuH7-solumaljat (60 mm) (2 - 3 x 10⁶ solua/malja) transfektoitiin DNA:lla, joka oli villityyppinen DHBV (kanavat 1,3), villityyppi + Kpn⁻Sph⁻ (pol⁻env⁻core⁻) (kanavat 2,4), DR1 (ka-
- 30
- 35

nava 5), Δ DR1 + Kpn⁻ + 1000 (kanava 7), Δ DR1 + Kpn⁻ + 180 (kanava 8), Δ DR1 + Kpn⁻Sph⁻ (pol⁻env⁻core⁻) (kanava 9). Southern-hybridisointianalyysi suoritettiin jäljempänä kuvattavalla tavalla käyttäen positiivisen polariteetin omaavaa DHBV-DNA -koetinta. Kanava 10 sisälsi 1 pikogramman kloonattua DHBV-DNA:a hybridisointistandardina. Kanava 11 sisältää λ -Hind III -molekyylikomarkkerit. Valotusajat olivat 4 tuntia (kanavat 1 ja 2) tai 48 tuntia (kanavat 3 - 11). Relaksoituneen rengasmaisen (RC) ja yksinauhaisen (SS) solunsisäisen virus-DNA-muotojen asemat on osoitettu vasemmalla.

Kuvio 4. Pakkauskkykyisellä genomilla, Δ DR1:lla transfektoitujen HuH7-solujen immunofluoresenssivärjäys. Villityyppisellä DHBV-DNA:lla (WT) tai Δ DR1-DNA:lla (Δ DR1) transfektoidut solut värjättiin ydin- (α -c) tai pinta (α -S) antigeenien suhteen. Suurennus: 40 X.

Kuvio 5. Viruksen lisääntymismuodot HuH7-soluissa pakkauskkykyisillä genomeilla ja partikkelien suhteen villinaisilla DHBV-genomeilla suoritettun transfektion jälkeen. Virus-DNA määritettiin kuviossa 3 esitetyllä tavalla. Solut transfektoitiin DNA:lla, joka oli villityyppinen DHBV (kanava 1), Δ DR1 (kanava 2), Δ DR1 + Kpn⁻ (pol⁻env⁻) (kanava 3), Δ DR1 + RV⁻718 (pol⁻) (kanava 4), Δ DR1 + RV⁻2650 (core⁻) (kanava 5), RV⁻2650 (core⁻) (kanava 6), RV⁻2650 (core⁻) + Kpn⁻ (pol⁻env⁻) (kanava 7), RV⁻718 (pol⁻) (kanava 8), RV⁻2650 (core⁻) + RV⁻718 (pol⁻) (kanava 9). Relaksoituneen rengasmaisen (RC) ja yksinauhaisen (SS) solunsisäisen virus-DNA-muotojen asemat on osoitettu vasemmalla.

Kuvio 6. Infektiokkykyisten virusten määrittäminen transfektoitujen HuH7-soluviljelmien supernatanteista. Supernatanttien neste (2 ml) HuH7-soluista, jotka oli transformoitu 1,5, 3, tai 6 μ g:lla villityyppistä DHBV-DNA:a (kanavat 1, 2 ja 3 vastaavassa järjestyksessä) tai 3 μ g:lla Δ DR1-DNA:a (kanavat 4 ja 5), Kpn⁻ (pol⁻env⁻) (kanavat 6 ja 7) tai Kpn⁻Sph⁻ (pol⁻env⁻core⁻) (kanavat 8 ja 9)

inkuboitiin yön yli primäärysten ankan hepatosyyttien kanssa. Infektoidut hepatosyytit inkuboitiin 12 päivää ja kokonais-DNA uutettiin ja tästä määritettiin viruksen DNA:n lisääntymismuodot Southern -blottaushybridisoinnilla

5 kuviassa 3 esitetyn kuvauksen mukaisesti. Kanava 10 sisälsi Λ -Hind III -molekyylikomarkkerit. Relaksoituneen rengasmaisen (RC) ja yksinauhaisen (SS) solunsisäisen virus-DNA-muotojen asemat on osoitettu vasemmalla.

Kuvio 7. Infektiokykyisen viruksen tuoton estäminen DHBV-mutantti-DNA-molekyyleillä HuH7-solujen rinnakkaistransformaatioissa. Virus-DNA-molekyyleillä transfektoitujen HuH7-solujen supernatanttineistä määritettiin infektointikyky Southern -hybridisoinnilla kuvion 6 mukaisesti. Virus-DNA oli saatu DNA-molekyyleillä, jotka olivat villityypistä DHBV:a (kanavat 1 ja 2), villityyppiä + Kpn⁻ (pol⁻env⁻) (kanavat 3 ja 4), villityyppiä + Kpn⁻Sph⁻ (pol⁻env⁻core⁻) (kanavat 5 ja 6), villityyppiä + DR1 (kanavat 7 ja 8), tai villityyppiä + pSP65 (kanavat 9 ja 10), transfektoiduista, soluviljelmänesteiden kanssa inkubomalla

10

15

20

infektoiduista hepatosyyteistä.

Kuvio 8. (a) Villityyppisen DHBV:n genomien asemien 1326 ja 1350 välinen nukleotidijärjestys ja partikkelien suhteen vaillinaisen, jäljempänä kuvattavan genomien 1S vastaava nukleotidijärjestys.

(b) Viruksen lisääntymismuodot. Kanavissa 1 ja 2, HuH7-solujen Southern -blottaushybridisointimääritys partikkelien suhteen vaillinaisen genomien 1S dimeroituneella muodolla suoritetun transfektion jälkeen. Joko dimeroituneella 1S-genomimutantilla (kanava 5) tai 1S-dimeerillä plus Δ DR1-dimeerillä (kanava 7) transfektoitujen HuH7-solujen supernatantteja käytettiin infektoimaan primäärisiä ankan hepatosyyttejä ja soluista määritettiin sitten virus-DNA. Southern -blottaushybridisointimääritys suoritettiin kuviassa 3 esitetyllä tavalla. Kanavat 3, 4, 6 ja

25

30

35

8 esittävät vastaavia kontroleja: kanava 3 --aktiivista

DHBV-hepatiittia sairastavan ankan seerumilla infektoidut ankan hepatosyytit; kanava 4 -- HuH7-solujen villityypillä suoritetusta transfektiosta saaduilla nesteillä infektoidut ankan hepatosyytit; kanava 6 -- HuH7-solujen villityypin + DR1:n rinnakkaistransfektioista saadulla supernatantinesteellä infektoidut ankan hepatosyytit; ja kanava 8 -- transfektoimattomat ankan hepatosyytit.

Kuvio 9. Villityyppisellä DHBV:lla (sarake 1) ja vaillinaisilla genomeilla Δ DR1 ja 1S suoritetusta HuH7-solujen rinnakkaistransformaatiosta talteenotetuilla supernatantinesteillä (sarake 2) suoritettujen primääristen ankan hepatosyyttien infektoinnin jälkeinen immunofluoresenssivärjäys ja värjäys ydinantigeenin suhteen. Suurennus: 40 X.

Kuvio 10. Plasmidi pHBV Δ DR1 Neo, josta käy ilmi orientaatio ja dimeroituneen Δ DR1-jakson, valikointiin käytettävissä oleva markkeri ja tietyt restriktioentsyymien katkaisukohdat. R = EcoR I, B = BamH I, SV = SV40-säätely-DNA.

Kuvio 11. Vuokaavio konstruktiovaiheista plasmidin pHBV Δ DR1Neo valmistamiseksi. Amp^R = ampisilliiniresistenssigeeni; CAM^R = kloramfenikoliresistenssigeeni, R = EcoR I; restriktioentsyymien katkaisukohdat ovat kuviossa esitetyn mukaiset.

Kuvio 12. Hep B1-2-solujen ohutleike-elektyronimikroskooppikuvat. Suurennus: 125000 X.

Kuvio 13. Esitys Δ DR1-DNA-jaksojen päätelystä järjestyksestä, joka on johdettu HepB1-2-soluissa isäntäsolun DNA:han integroituneena olevasta plasmidista pHBV Δ DR1Neo. R = EcoR I, B = BamH I, pBR = pBR322-jaksot; sahalaitaiset viivat = solujen jaksot

Kuvio 14. Katkostranslaatiolla valmistettua HBV-koetinta käyttäen tehty Southern -blottaushybridisointianalyysi nukleiinihapoista, jotka on eristetty HepB1-2-soluviljelmien supernatanttien eri tiheysgradienttifrakti-

oista. Supernatanttifraktiot erotettiin sentrifugoimalla keesiumkloridissa ja nukleiinihapot eristettiin fraktioista kuten jäljempänä kappaleessa 8.2 on esitetty. Gradienttien alueiden arvot ovat grammaoja/millilitra.

5 Kuvio 15. Southern -blottaushybridisointianalyysi nukleiinihapoista, jotka on eristetty partikkelien suhteen vaillinaisella, X-:llä merkityllä genomilla transfektoidujen Hep1-2 solujen supernatanteista. Transfektiot suoritettiin 5 mikrogrammalla (kanavat 1 - 3) ja 1 mikrogrammalla (kanavat 4 - 6) X- plasmidin DNA:a. Supernatantit fraktioitiin ja nukleiinihapot eristettiin fraktioista kuten myöhemmänä olevassa kappaleessa 8.2 on kuvattu.

5. Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö kohdistuu lisääntymiskyvyltään vaillinaisiin hepadna-viruksiin. Erityisesti tämä keksintö liittyy kahteen vaillinaiseen hepadna-viruksen genomien DNA:n tyyppiin ja näiden nukleiinihappojaksoihin. Ensimmäinen tyyppi (tästä käytetään tässä yhteydessä nimitystä "partikkelien suhteen vaillinaiset" hepadna-virusgenomit) ei kykene muodostamaan kaikkia hepadna-virusten lisääntymiseen tarvittavia toimintoja, mutta kykenevät tuottamaan esigenomin RNA:a, jossa on tarvittavat asianmukaiset cis-toimintaiset signaalit RNA:n sulkemiseen virionien sisään (pakkaus) ja käänteiskopiointiin DNA:ksi. Erityisessä sovellutusmuodoissa tämän partikkelien suhteen vaillinaisen genomien sisältävillä hepadna-viruksilla voi ydinantigeenin (HBcAg) tuotto, viruksen polymeraasi ja/tai pinta-antigeeni (HBsAg) olla vaillinainen. Toinen tämän keksinnön mukainen vaillinaisten hepadna-virusgenomien tyyppi (tästä käytetään tässä yhteydessä nimitystä "pakkauskykyiset genomit") ovat genomit, jotka voidaan muuntaa transkriptiossa esigenomi-RNA-molekyyleiksi, jotka eivät pysty muuntumaan käänteiskopioinnissa kaksinauhaiseksi genomien DNA:ksi ja/tai pakkautumaan itsenäisesti, mutta ovat sellaisia, että niistä transkriptiossa voi syntyä mRNA-molekyylejä,

jotka koodaavat proteiineja, jotka voivat tuottaa trans-
 asemasta vaikuttavan viruksen toiminnon, joka puolestaan
 tarvitaan toisen RNA:n pakkaamiseen virioneihin tai toisen
 RNA:n transkriptioon virionin DNA:ksi. Pakkauskykyiset
 5 genomit voivat siten tarjota "avustustoiminnon" partikke-
 lien suhteen vaillinaisten genomien pakkaamiseksi. Pak-
 kauskykyiset genomit sisältävät, seuraavassa mainittuihin
 kuitenkin rajoittumatta, ne hepadna-virusten genomit,
 jotka sisältävät deletioita suoran toistuman (DR) alueil-
 10 la DR1 ja/tai DR2.

Tämän keksinnön mukaiset partikkeliin suhteen vaillinaiset genomit, jotka yhdessä erityisessä sovellutusmuodossa sisältävät heterologisia geenijaksoja, voidaan pakata ilmentämällä trans-asemasta toimivia pakkaamiseen
 15 (esim. ydin, käänteiskopioijaentsyymi, vaippa), tarvittavia hepadna-virusproteiineja, joita partikkeliin suhteen vaillinaisen genomi itse ei voi tuoda käyttöön toiminnallisessa muodossa. Tämä ilmentäminen johtaa siihen, että syntyy hepadna-viruksen virionipartikkeli, joka sisältää
 20 partikkeliin suhteen vaillinaisen genomia (tätä nimitetään tässä yhteydessä "pakatuksi partikkeliin suhteen vaillinaiseksi genomiksi" tai "partikkeliin suhteen vaillinaiseksi virukseksi"). Yhdessä sovellutusmuodossa tätä (näitä) trans-asemasta vaikuttavaa (-ia) pakkaustoiminto(j)a voidaan saada ilmentämällä yhden tai useamman tällaista (-ia)
 25 toiminto(j)a tuottavaa (-ia) proteiinia (-eja) koodaavan (-ien) nukleiinihappovektorin (-eiden) geenejä. Toisessa sovellutusmuodossa partikkeliin suhteen vaillinaisen genomi voidaan pakata ilmentämällä yhtä tai useampaa hepadna-
 30 viruksen pakkauskykyistä genomia. Kun siten yhdessä nimenomaisessa sovellutusmuodossa pakkauskykyiset genomit ja partikkeliin suhteen vaillinaiset genomit tuodaan yhdessä toiminnan salliviin soluihin in vitro geeninsiirtomenetelmiä käyttäen, pakkauskykyisten genomien ilmentyminen tuottaa
 35 toiminnat, joita tarvitaan siihen, että partikkeliin

suhteen vaillinainen genomi voidaan sisällyttää soluista myöhemmin vapautuviin viruspartikkeleihin. Yhdessä vaihtoehtoisessa sovellutusmuodossa partikkelien suhteen vaillinaisten genomien pakkaus voidaan suorittaa tuomalla partikkelien suhteen vaillinaiset genomit solulinjaan, jossa "avustava(t)" pakkausgenomi(t) on (ovat) jo pysyvästi liittyneenä ja ilmentyvänä.

Tuotettuja partikkelien suhteen vaillinaisia DNA:a sisältäviä virioneja ("partikkelien suhteen vaillinaisia viruksia") voidaan sitten käyttää infektoimaan hepatosyytti tai muu sille herkkä solu in vitro tai in vivo, johon soluun partikkelien suhteen vaillinainen DNA siirtyy ja jossa se voi ilmentyä, mutta joka virus-DNA ei voi aikaansaada toista hepadna-virusinfektiota vajaakykyisen luonteensa vuoksi. Partikkelin suhteen vaillinainen hepadna-virusgenomi voi siten ilmentyä infektoiduissa hepatosyyteissä ilman, että hepatiitti leviäisi ja syntyisi tauteja ja sairauksia.

Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa erityisessä sovellutusmuodossa voidaan vaillinaisia hepadna-viruksia käyttää virustenvastaisina aineina hepadna-virusinfektion hoidossa. Tällaiset virukset voidaan muokata sellaisten häiritsevien aineiden muotoon, jotka estävät villityypin viruksen lisääntymisen tai säilymisen.

Toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa partikkelien suhteen vaillinaiset genomit, jotka ilmentävät immunogeenisiä epitooppeja (esim. HBsAg), voidaan formuloida rokotteiksi hepadna-virusinfektion ehkäisemiseksi tai käyttää immuunijärjestelmän toimintaa kiihdyttävänä aineina.

Tämä keksintö kohdistuu myös partikkelien suhteen vaillinaisiin hepadna-viruksen yhdistelmägenomeihin, jotka käsittävät heterologisia geenijaksoja, tällaisia genomeja sisältäviin viruksiin ja näiden virusten terapeuttisiin käyttömuotoihin. Useita hepadna-viruksen genomien alueita,

joihin kuuluu, näihin kuitenkin rajoittumatta, pakkauskykyisten genomien trans-asemasta komplementoivat viruksen toimintoja koodaavat jaksot voidaan korvata heterologisella geenijaksolla, jotka sopivaan soluun vietyinä ilmentyvät

5 hepadna-viruksen tai heterologisten säätelyjaksojen ohjaamina. Sovellutusmuodossa, jossa heterologinen DNA-jakso koodaa entsyymiä, jonka puute on jonkin taudin tai sairauden perusta, näitä yhdistelmägenomeja sisältäviä viruksia voidaan käyttää sellaisten entsyymipuutosten geeniterapiassa, jotka voidaan hoitaa tuottamalla entsyymi maksassa. Vielä yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan immunogeenistä epitooppia koodaavan heterologisen geenin sisältäviä yhdistelmä-hepadna-viruksia formuloida rokotteiksi suojaamaan heterologisen organismin

10 aiheuttamalta infektiolta tai antamaan suojaa antigeenin esiintymisestä johtuvaa tilaa tai sairautta vastaan.

5.1 Vaillinaisten hepadna-virusgenomien muodostaminen ja niiden käyttö

Tämä keksintö kohdistuu lisääntymisen suhteen vaillinaisiin hepadna-virusgenomeihin, joihin kuuluvat, näihin kuitenkin rajoittumatta, partikkelien suhteen vaillinaiset genomit, jotka voidaan pakata trans-asemasta vaikuttavien toimintojen avulla, ja pakkauskykyiset genomit, jotka kykenevät tuottamaan pakkaustoimintoja trans-asemasta käsin.

20 Tämä keksintö kohdistuu myös nukleiinihappojaksoihin, jotka koodaavat partikkelien suhteen vaillinaisten tai pakkauskykyisten genomien jaksoja.

Pakattuihin partikkelien suhteen vaillinaisiin hepadna-virusgenomeihin kuuluvat, näihin kuitenkin rajoittumatta, hepadna-virusmutantit, joissa ydinantigeeni (HBcAg), viruksen polymeraasi ja/tai pinta-antigeeni (HBsAg) on vaillinainen. Yhdessä erityisessä sovellutusmuodossa ilmentymisvaurio voi johtua deletiosta, joka kohdistuu koko tätä (näitä) proteiinia (-eja) koodaavalle

35 alueelle tai tämän osaan. Tämän keksinnön mukaisissa eri-

tyisissä sovellutusmuodoissa partikkelien suhteen vaillinaiset genomit ovat vaillinaisia yhden, kahden tai kaikkien kolmen hepadna-virusproteiinin suhteen.

Tämän keksinnön mukaisiin hepadna-virusten pakkauskykyisiin genomeihin kuuluvat, näihin kuitenkin rajoittumatta, ne genomit, joissa on mutaatioita tai deletioita alueilla, joita tarvitaan cis-asemasta käsin viruksen DNA:n synteesiin, tai joita tarvitaan cis-asemasta käsin esigenomi-RNA:n tunnistamiseen tai pakkaamiseen. Yhdessä sovellutusmuodossa näissä pakkauskykyisissä genomeissa voi olla deletioita DR1-(suora toistuma)alueella tai DR2-alueella. Toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa pakkauskykyisessä genomissa voi olla deletioita sekä DR1- että DR2-alueilla. DR1- ja DR2-alueiden on osoitettu liittyvän virus-DNA:n synteesin aloitusvaiheeseen.

5.1.1 Vaillinaisten hepadna-virusgenomien muodostaminen

Tämän keksinnön mukaisia hepadna-virusgenomeja voidaan muodostaa yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttämällä. Niihin hepadna-virustyyppeihin, joita voidaan käyttää, kuuluvat, näihin kuitenkin rajoittumatta, hepatiitti-B-virus (HBV), patogeeninen ihmisille ja korkeammille kädellisille, maaoravan hepatiitti-B-virus (GSHBV), ankan hepatiitti-B-virus (DHBV) ja murmelin hepatiitti-B-virus (WHBV). Tämän keksinnön mukaisen vaillinaisen hepatiittigenomi-DNA:n muodostaminen voidaan jakaa yksinomaan kuvaamistarkoituksessa seuraaviin vaiheisiin. Ensimmäiseen vaiheeseen sisältyy villityyppisen hepatiittivirus-DNA:n eristäminen. Hepadna-virus-DNA voidaan saada hepadna-viruksilla infektoiduista hepatosyyteistä tai kloonatusta DNA:sta tunnetuilla menetelmillä (ks. esim. teos Maniatis et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Toisessa vaiheessa eristetty hepadna-virus-DNA

käsitellään sellaisen mutaation aiheuttamiseksi, joka tekee viruksen lisääntymisen suhteen vaillinaiseksi. Virusgenomin tarvittaessa ligaasilla suoritettun yhteenliittämisen ja infektion tai transformaation jälkeen voidaan vaillinaiset virukset tunnistaa (a) nukleiinihappohybridisoinnilla (b) "markkeri"geenitoimintojen läsnä- tai poissaolon perusteella tai (c) vaillinaisten hepadna-virusgeenien ilmentymisen perusteella.

Villityyppinen hepadna-virusgenomi-DNA voidaan saada hepadna-viruksista, kuten HBV, DHBV, GSHBV ja WHBV. Nämä genomin DNA:t on kloonattu ja niiden nukleotidijärjestys on määritetty (Seeger et al., (1984) J. Virol. 51, 367 - 375; Mandart et al., (1984) J. Virol. 49, 782 - 792; Galibert, et al., (1982) 41, 51 - 65; ja Valenzuela, et al., (1980) teoksessa Animal Virus Genetics Field, B.N. Jaenisch, R. ja Fox, C.F., (toim.) Academic Press, NY, sivut 57 - 70).

Jos kloonattua hepadna-virus-DNA:a ei ole helposti saatavilla, hepadna-virus-DNA:a voidaan saada hepadna-viruksilla infektoiduista hepatosyyteistä (ks. esim. Tuttleman, et al., (1986) J. Virol. 58, 17 - 25). Vaihtoehtoisesti HBV-, GSHBV-, DHBV-, tai WHBV-DNA voidaan saada puhdistetuista viruksista sinänsä tunnettuja vakiomenetelmiä käyttäen (ks. esim. Mason et al., (1980) J. Virol. 36, 829 - 836). hepadna-virus-DNA voidaan tämän jälkeen kloonata sinänsä tunnettuja vakiomenetelmiä käyttäen (Maniatis et al., (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Kloonatun geenin nukleotidijärjestyksen analyysi voidaan suorittaa useilla eri sisänsä tunnetuilla menetelmillä, esim. Maxamin ja Gilbertin menetelmä (1980, Meth. Enzymol. 65, 499 - 560), Sangerin dideoksimenetelmä (Sanger, F. et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463) tai automaattisen DNA-sekvenssointilaitteen käyttö (esim. Applied Biosystems, Foster City CA).

Monia sinänsä tunnettuja strategioita voidaan käyttää sekä partikkelien suhteen vaillinaisten genomien että hepadna-viruksen pakkauskkykyisten genomien konstruoimiseksi. Muodostettaessa partikkelien suhteen vaillinainen

5 genomi käsitellään virus-DNA entsymaattisesti tai kemiallisesti sellaisen mutanttiviruksen muodostamiseksi, joka on lisääntymiskyvyltään vaillinainen, mutta jossa cis-asemasta vaikuttavat, pakkaamisessa tarvittavat signaalit säilyvät. Yhdessä edullisessa sovellutusmuodossa viruksen

10 DNA käsitellään yhdellä tai useammalla restriktioentsyymillä DNA:n pilkkomiseksi spesifisistä katkaisukohtista ja liitetään ligaaasilla uudelleen yhteen. Jos restriktioendonukleaasihajotuksesta syntyy sopiva deleetio, jonka tuloksena on kohesiiviset DNA-päätteet, ei tarvittane

15 DNA:n muuta muokkausta ennen ligaasireaktiota. Jos kuitenkin DNA:n kohesiivisiä päitä ei voida saada muodostumaan restriktioentsyymeillä pilkkomalla tai jos halutaan aiheuttaa jonkin muun jakson deleetio, entsymaattista pilkkomista voi seurata DNA-jaksojen osien poistamiseksi

20 pilkkominen nukleaaasilla, kuten Bal 31-nukleaaasilla, eksonukleaaasilla III, λ -eksonukleaaasilla, mung -pavun nukleaaasilla, tai T4-DNA-polymeraasin eksonukleaaasiaktiivisuudella joidenkin mainitsemiseksi. Entsymaattisesti käsitelty DNA-päätteet voidaan muokata virus-DNA:n liittämiseksi

25 ligaasilla millä tahansa alalla sinänsä tunnetulla menetelmällä. Restriktioentsyymihajotusta voi seurata muokkaus tasoitettujen päätteiden muodostamiseksi pilkkomalla yksinauhaisia DNA-päätteitä taaksepäin tai täyttämällä näitä ennen ligaasireaktiota. Oligonukleotidijakso

30 (kytkijä), joka koodaa yhtä tai useampaa restriktioentsyymien katkaisukohtaa, voidaan liittää ligaasilla virus-DNA:n katkaistuihin päihin. Hepadna-virusjaksot liitetään sitten ligaasilla in vitro joko toisiinsa tai sopiviin ilmentämisvektori-jaksoihin.

Yhdessä edullisessa sovellutusmuodossa partikkeli-
 suhteen vaillinaisten hepadna-virusgenomien muodostaminen
 käsittää sellaisen geenin tai sellaisten geenien delee-
 tion, joka tai jotka koodaavat pinta-antigeenia,
 5 ydinantigeenia ja/tai polymeraasi/pinta-antigeenia. Osa
 polymeraasiproteiinia koodaavasta alueesta koodaa myös
 pinta-antigeenia. Deleetio(ide)n muodostamisessa voidaan
 käyttää yhtä tai useampaa restriktioentsyymiä. Yhdessä
 tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa poistetaan
 10 kahta virusproteiinia koodaava hepadna-virus-DNA restriktio-
 entsyymeillä pilkkomalla. Toisessa tämän keksinnön
 mukaisessa sovellutusmuodossa poistetaan kaikkia kolmea
 virusproteiinia koodaava DNA restriktioentsyymeillä pilk-
 komalla. Vaihtoehtoisesti restriktioentsyymihajotus (-
 15 hajotukset) voi(vat) poistaa vain osan HBsAg:a HBcAg:a tai
 polymeraasiproteiinia koodaavasta hepadna-virus-DNA:sta,
 jolloin tulokseksi saatu mutantti ilmentää toiminnallises-
 ti häiriytynyttä tuotetta tai ilmentää vaillinaisesti hei-
 kennetyn geenin koodaamaa proteiinia. Deleetioita voidaan
 20 tässäkin tapauksessa muodostaa yhteen, kahteen tai kolmeen
 hepadna-virusgeeniin.

Tämän keksinnön mukaisessa vaihtoehtoisessa mene-
 telmässä voidaan partikkeli- suhteen vaillinaisia hepad-
 na-virusgenomeja muodostaa mutaatioilla in vitro tai in
 25 vivo. Yhdessä sovellutusmuodossa näissä partikkeli- suh-
 teen vaillinaisissa genomeissa voi virusproteiinin ilmen-
 täminen olla vaillinainen transkription (esim. promootto-
 rin) tai translaation häiriöiden vuoksi. Toisessa sovel-
 lutusmuodossa voidaan hepadna-virusgenomi saattaa partik-
 30 kelien suhteen vaillinaiseksi sellaisen mutaation (esim.
 piste- tai lukuvaiheistusta siirtävän mutaation) vaikutuk-
 sesta, joka ehkäisee proteiinin varsinaisen toiminnan.
 Esimerkiksi voidaan tuottaa ydinproteiini, joka ei pysty
 suorittamaan kokoonpanoa. Mitä tahansa sinänsä tunnettua
 35 mutageneesimenetelmää voidaan käyttää, mukaanlukien, mutta

tähän kuitenkin rajoittumatta, in vitro -kohdemutageneesin (Hutchison, C. et al., (1978), J. Biol. Chem. 253, 6551), TAB[®]-kytkijöiden (Pharmacia) käyttö jne.

5 Hepadna-virusten pakkauskykyisten genomien muodostaminen voidaan suorittaa DR1-alueelle paikantuvalla mutaatiolla (ks. jäljempänä). Voidaan myös katsoa, että tällaisia mutantteja voidaan muodostaa DR2-alueelle paikantuvalla deleetiolla. Näitä edellä käsiteltyjä menetelmiä partikkelien suhteen vaillinaisten genomien muodostamiseksi voidaan käyttää hepadna-viruksen pakkauskykyisten genomien muodostamiseksi. Yhdessä edullisessa sovellutusmuodossa voidaan DR1-alue tai sen osa poistaa restriktioentsyymillä pilkkomalla. Sen vahvistaminen, että asianmukainen geneettinen mutaatio on saatu aikaan, voidaan 10 suorittaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esim. restriktiokartoituksella ja/tai sekvenssianalyysillä.

Partikkelien suhteen vaillinaiset genomit ja pakkauskykyiset geenit voidaan haluttaessa liittää useisiin eri nukleiinihappovektoreihin. Tämän keksinnön mukaisessa 20 edullisessa sovellutusmuodossa partikkelien suhteen vaillinaiset genomit tai hepadna-viruksen pakkauskykyiset genomit liitetään plasmidikloonausvektoriin, jota käytetään sopivien isäntäsolujen transformoimiseksi DNA:n monistamiseksi siten, että halutuista hepadna-virusjaksoista syntyy 25 paljon kopioita. Tämä voidaan suorittaa liittämällä hepadna-virusjakso kloonausvektoriin, jossa on komplementaariset kohesiiviset päät. Jos kuitenkin restriktioendonukleaasikatkaisulla muodostuvia DNA:n kohesiivisiä päitä ei ole tarjolla, tai muut, kuin tarjolla olevat päät ovat 30 edullisempia, voidaan käyttää mitä tahansa lukuisista sinänsä tunnetuista menetelmistä vaillinaisen hepatiittiviruksen DNA:n liittämisen suorittamiseksi ligaasilla haluttuihin kohtiin. Kuten edellä on mainittu, voi esimerkiksi restriktioentsyymihajotusta seurata muokkaus tasoitettujen 35 päätteiden muodostamiseksi pilkkomalla yksinauhaisia DNA-

päätteitä taaksepäin tai täyttämällä näitä ennen ligaasi-reaktiota. Oligonukleotidijakso (kytkijä), joka koodaa yhtä tai useampaa restriktioentsyymien katkaisukohtaa, voidaan liittää ligaasilla hepadna-virus-DNA:n alueelle DNA:n päihin. Kytkijää voidaan myös käyttää sopivien restriktiokohtien muodostamiseen hepadna-virusjaksoissa. Lisäksi hepatiittivirusjaksot voidaan mutatoita in vitro tai in vivo uusien endonukleasikohtien muodostamiseksi tai aikaisempien poistamiseksi helpottamaan in vitro -ligaasireaktiomenetelmiä.

Yhdessä nimenomaisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa vaillinaisten hepatiittivirusten genomit voidaan dimeroida sinänsä tunnettuja vakiomenetelmiä käyttäen (ks. Maniatis et al., (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Esimerkiksi ligaasireaktiossa voidaan käyttää suurta vaillinaisen hepadna-viruksen ylimäärää vektori-DNA:n suhteen.

Hepadna-virus-DNA:a sisältävillä yhdistelmä-DNA-molekyyleillä suoritettulla isäntäsolujen transformaatiolla kyetään muodostamaan useita hepadna-virus-DNA:n kopioita. Hepadna-virus-DNA:a voidaan siten saada suuria määriä kasvattamalla transformantteja, eristämällä yhdistelmä-DNA molekyylit transformanteista ja tarvittaessa ottamaan liitetty geeni pois eristetystä yhdistelmä-DNA:sta.

Kun hepadna-virusten partikkelien suhteen vaillinaisten tai pakkauskykyisten genomien muodostamiseksi tarpeelliset jaksot on eristetty, ne voidaan liittää sopivaan ilmentämisvektoriin, ts. vektoriin, joka sisältää liitetyn proteiinia koodaavan jakson transkriptiossa ja translaatiossa tarpeelliset elementit. Voidaan käyttää useita eri isäntä-vektorijärjestelmiä proteiinia koodaavan jakson ilmentämiseksi. Näihin kuuluu, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, viruksella infektoidut nisäkässolujärjestelmät (esim. vacciniavirus, adenovirus, retrovirus, SV40

jne.); viruksella infektoidut hyönteissolujärjestelmät (esim. bakulovirus); mikro-organismit, kuten hiivavekto-reita sisältävät hiivat tai bakteriofaagi-DNA:lla, plasmidi-DNA:lla tai kosmidi-DNA:lla transformoidut bakteerit.

5 Näiden vektorien ilmentämiselementit vaihtelevat vahvuutensa ja spesifisyytenä puolesta. Käytetyn isäntä-vektorijärjestelmän mukaan voidaan käyttää mitä tahansa monista sopivista transkriptio- ja translaatioelementeistä. Esimerkiksi kloonattaessa nisäkässolujärjestelmissä voidaan

10 käyttää promootoreita, jotka on eristetty nisäkässolujen genomeista (esim. hiiren metallotioneiinipromoottori) tai soluissa kasvavista viruksista (esim. vacciniaviruksen 75 ke. promoottori). Liitettyjen jaksojen transkriptioon voidaan myös käyttää promootoreita, joita on tuotettu

15 yhdistelmä-DNA- tai synteettisillä menetelmillä.

Tarvitaan myös spesifisiä aloitussignaaleja liitettyjen proteiineja koodavien jaksojen tehokasta translaatiota varten. Näihin aloitussignaaleihin kuuluu aloituskodoni ATG ja tämän viereiset jaksot. Aloituskodonin on

20 oltava proteiinia koodaavien jaksojen lukuvaiheistuksen suhteen oikeassa vaiheessa varmistamaan sen, että translaatio tapahtuu koko liitetyn jakson alueelta. Ulkopuoliset translaation ohjaussignaalit ja aloituskodonit voivat olla peräisin useista erilaisista, sekä luonnollisista

25 että synteettisistä lähteistä.

Menetelmiin vaillinaisen hepadna-virus-DNA:n liittämiseksi vektoreihin voivat kuulua in vitro -yhdistelmä-DNA- ja synteettiset menetelmät, joita käytetään liittämises-

30 sä ilmentämisvektoreihin, kuten plasmideihin tai bakteriofaageihin tai in vivo -rekombinaatiot (geneettinen rekombinaatio), joita käytetään liittämises-

35 sä virus -ilmentämisvektoreihin, kuten vacciniavirukseen tai adenovirukseen.

Jos lopullinen päämäärä on liittää hepadna-virus-

35 DNA virus -ilmentämisvektoreihin, kuten vacciniavirus,

adenovirus tai retrovirus, voidaan partikkelien suhteen vaillinainen hepadna-virus- tai hepadna-viruksen pakkaus-
 5 kykyinen genomi muokata siten, että geenin molemmille puolille tulee virusjaksot, jotka mahdollistavat virus -ilmentämisvektorilla infektoiduissa soluissa tapahtuvan rekombinaation siten, että hepadna-virus-DNA voi liittyä muuhun virusgenomiin.

Vektorit, jotka sisältävät partikkelien suhteen vaillinaisia hepadna-virusgenomien tai hepadna-viruksen
 10 pakkauskykyisiä genomeja, voidaan tunnistaa kolmella yleisellä lähestymistavalla: (a) nukleiinihappohybridisoinnilla, (b) "markkeri"geenitoimintojen läsnä- tai poissaololla ja (c) liitettyjen jaksojen ilmentymisellä. Ensimmäisessä lähestymistavassa ilmentämisvektoriin liitetyn
 15 muokatun hepadna-virusgenomin läsnäolo voidaan havaita nukleiinihappohybridisoinnilla käyttäen koettimia, jotka käsittävät hepadna-virus-jaksojen suhteen homologisia jaksoja. Toisessa lähestymistavassa voidaan vektori/isäntäyhdistelmäjärjestelmä tunnistaa ja valikoida tiettyjen
 20 selllaisten "markkeri" -geenitoimintojen läsnä- tai poissaolon perusteella (esim. tymidiinikinaasiaktiivisuus, resistenssi antibiootteja kohtaan, transformaatiofenotyyppi, bakuloviruksessa esiintyvä okklusiokappaleen muodostus jne.), jotka vieraiden geenien liittäminen vektoriin on
 25 aiheuttanut. Jos esimerkiksi muokattu hepatiitti-DNA-jakso liitetään vektorin markkerigeenijaksoon, voidaan muokatun hepadna-virusgenomin sisältävät rekombinantit tunnistaa tämän markkerigeenin toimimattomuuden perusteella. Kolmannessa lähestymistavassa voidaan ilmentämisyhdistelmävektorit tunnistaa määrittämällä rekombinantin ilmentämä
 30 vieraan geenin tuote. Nämä määritykset voivat perustua geenin tuotteen fysikaalisiin, immunologisiin tai toiminnallisiin ominaisuuksiin. Esimerkiksi ELISA:a voidaan käyttää havaitsemaan HBsAg:a, HBcAg:a tai hepadna-viruksen

polymeraasiproteiinia vastaan muodostuneiden vasta-aineiden kanssa reagoivia antigeenisia determinantteja.

Kun hepadna-virusjaksot on tunnistettu, tulisi hepadna-virusjaksot käsittävä ilmentämisvektori siirtää sopivaan isäntään. Tämä voidaan suorittaa millä tahansa monista sinänsä tunnetuista menetelmistä, mukaanlukien, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, transformaatio (esim. silloin, kun vektori on plasmidi), faagitransduktio, kalsiumfosfaattivälitteinen transfektio (esim. nisäkässolujen virusvektorit) tai mikroinjektiot. Voidaan valita isäntäsolu, joka muuntaa liitettyjen jaksojen ilmentymistä tai muuntaa ja prosessoi kimeerisen geenin tuotetta halutulla spesifisellä tavalla. Ilmentymistä tietyistä promootoreista voidaan nostaa tietyjen induktorien läsnäolon seurauksena (esim. sinkki- ja kadmiumionit metallotioneiniipromoottorien kyseessäollessa). Lisäksi proteiinituotteiden muokkaustoiminnot (esim. glykosylointi) ja prosessointi (esim. pilkkominen) voi olla tärkeää koodatun (-tujen) proteiini(e)n toiminnalle. Eri isäntäsoluilla on luonteenomaiset ja spesifiset mekanismit proteiinien translaation jälkeiseen prosessointiin ja muokkaukseen. Voidaan valita sopivat solulinjat tai isäntäjärjestelmät ilmennetyn vieraan proteiinin halutun muokkauksen ja prosessoinnin varmistamiseksi.

5.1.2 Partikkelien suhteen vaillinaisten genomien pakkaus

Partikkelien suhteen vaillinainen hepadna-virusgenomi voidaan pakata hepadna-viruksen virionipartikkeleihin (joista tässä käyteään nimitystä "pakatut partikkelien suhteen vaillinaiset genomit"). Tämä pakkaus voidaan suorittaa tuomalla käytettäväksi hepadna-viruksen geenituotteita, joita tarvitaan pakkaukseen trans-asemasta käsin. Siten näitä hepadna-virusgeenien tuotteita ilmentäviä nukleiinihappovektoreita (ilmentämisvektoreita) voidaan käyttää saattamaan käyttöön trans-asemasta vaikuttavan (-ia)

pakkaustoiminnon (-toja). Vielä yhdessä sovellutusmuodos-
 sa voidaan partikkelien suhteen vaillinaisen genomi pakata
 käyttämällä pakkauskykyisen genomien koodaamia tuotteita.
 Näitä pakkauskykyisen genomien tuotteita voidaan saada
 5 käyttöön esimerkiksi pakkauskykyisten genomien transfek-
 toinnilla rinnakkain partikkelien suhteen vaillinaisen
 genomien kanssa näille herkkiin soluihin (esimerkiksi hepa-
 tosyytteihin tai leukosyytteihin) tai viemällä partikkeli-
 en suhteen vaillinaiset genomit (esim. transfektoimalla)
 10 pakkauskykyiseen solulinjaan, johon pakkauskykyinen genomi
 on sijoittunut pysyvästi ja jossa se ilmentyy. Pakattuja
 partikkelien suhteen vaillinaisia genomeja edustavat vi-
 rionipartikkelit voidaan sitten eristää. Virionipartikke-
 lit voidaan puhdistaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä
 15 (ks. esim. Tuttleman, et al., (1986) J. Virol. 58, 17 -
 25). Vaihtoehtoisesti hepadna-virus-DNA:a voidaan käyttää
 esim. terapeuttisesti vielä tiettyyn vektoriin kloonattuna
 ollessaan.

20 5.1.3 Partikkelien suhteen vaillinaisten genomien ja pakattujen partikkelien suhteen vaillinaisten genomien käyttötavat

Partikkelien suhteen vaillinaisia hepadna-virusge-
 nomeja, hepadna-viruksen pakkauskykyisiä genomeja ja näi-
 den geenituotteita voidaan käyttää hepadna-viruksien aihe-
 25 uttamien tautien tai sairauksien ehkäisyyn ja/tai hoitoon.
 Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voi-
 daan rokotteita formuloida pakkauskykyisistä partikkelien
 suhteen vaillinaisista genomeista (jotka on pakattu esim.
 pakkauskykyistä genomia ilmentämällä) tai sellaista nukle-
 30 iinihappoa vailla olevista hepadna-viruksen virionipartik-
 keleista (jotka ovat tuloksena pakkauskykyisen genomien
 ilmentämisestä), joka ilmentää hepatiittiviruksen immuno-
 geenisiä epitooppeja. Virustyyppeihin, joita voidaan
 käyttää, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, kuuluvat
 35 HBV, DHBV, GHBV, ja WHBV.

Toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa heterologisen geenijakson sisältäviä vaillinaisia hepadna-viruksen virionipartikkeleita voidaan käyttää heterologisia taudinaiheuttajia vastaan suojaa antavien rokotteiden formulointiin tai geeniterapiayrityksissä.

Vielä yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan pakattuja partikkelien suhteen vaillinaisia genomeja käyttää terapeuttisina aineina hepadna-virusinfektiosta aiheutuneiden hepatiitin äkillisten tai pitkäaikaisten ilmenemismuotojen hoitoon. Tässä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa kyseiset vaillinaiset virukset vaikuttavat häiritsemällä villityyppisen hepadna-viruksen lisääntymistä (ks. jäljempänä).

5.1.3.1 Hepadna-virusrokote infektion ehkäisyyn

Hepadna-virusinfektion ehkäisyyn tarkoitettut rokotteet voidaan formuloida tämän keksinnön mukaisesti vaillinaisista hepadna-viruksista, jotka ilmentävät immunogeenista epitooppia, esimerkiksi yhtä tai useampaa ydinantigeenin ja/tai pinta-antigeenin epitooppia, jonka annostelu isäntään johtaa suojaavaan immuniteetin kehittymiseen. Yhdessä edullisessa sovellutusmuodossa ilmennetään pinta-antigeenin yhtä epitooppia.

Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan rokote formuloida hepadna-viruksen pakkauskykyisen genomien ilmentämisen proteiinituotteista. Esimerkiksi "tyhjiä" virionipartikkeleita (ts. niitä, joista puuttuu genomien DNA seurauksena siitä, että pakkaava genomi ei kykene pakkaamaan omaa esigenomi-RNA:a ja/tai syntetisoimaan omaa genomien DNA:a) voidaan käyttää rokotteiden valmistuskaavoissa. Yhden esimerkin tästä tarjoaa se, että näitä tyhjiä virioneita voidaan koota talteen pakkauskykyisten genomien DNA:lla transfektoitujen solujen supernatanteista.

Toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa rokote voidaan formuloida pakatuista partikkelien

suhteen vaillinaisista genomeista. Tässä sovellutusmuodossa syntyy immuunivaste herkkään soluun joutuneen pakatun genomien ilmentymisen tuottamia epitooppeja vastaan. Soluun jouduttuaan partikkelien suhteen vaillinainen genomi ilmentyy, mutta ei aloita toista infektiocykliä vaillinaisen luonteensa vuoksi. Yhdessä sovellutusmuodossa rokoite voidaan formuloida pakatusta partikkelien suhteen vaillinaisesta genomista, jonka DNA:ssa on deletioita ydinantigeenia koodaavassa geenissä. Toisessa sovellutusmuodossa partikkelien suhteen vaillinainen genomi voi sisältää deletioita viruksen polymeraasiproteiinia koodaavan geenin 5'-alueella, jolloin tämän proteiinin, ilmentäminen estyy pinta-antigeenin ilmentämisen estymättä. Hepadna-virusrokote voidaan formuloida vielä yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa pakatusta partikkelien suhteen vaillinaisesta DNA:sta, jossa on deletiot sekä alueella, joka koodaa ydinantigeenia että polymeraasigeenin 5'-päässä.

5.1.3.1.1 Vaillinaisten hepadna-virusten ilmentämän (-ien) epitoopin (-ien) immunologisen tehokkuuden määrittäminen

Pakatun partikkelien suhteen vaillinaisen genomien käsittävän virionin ilmentämän epitoopin tai "tyhjän" (ts. genomien nukleiinihappoa sisältämättömän) (hepadna-viruksen pakkauskykyisen genomien ilmentymisen tuottaman) virionin immunologinen tehokkuus rokoteformulaatiossa voidaan määrittää seuraamalla immuunivastetta koe-eläimissä pakatulla partikkelien suhteen vaillinaisella genomilla tai pakkauskykyisillä hepadna-virusgenomipartikkeleilla suoritettujen immunisoinnin jälkeen. Koe-eläimiin voivat kuulua simpanssit ja muut kädelliset ja lopulta ihmiset (HBV-immunisoitua varten). Immunogeenin antamismenetelmiin voi kuulua antaminen suun kautta, ihonsisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsakalvonsisäisesti, suonensisäisesti, ihon alle,

nenänsisäisesti tai muun tavallisen immunisointireitin käyttö.

Testiin otettujen potilaiden tai koe-eläinten immuunivaste voidaan analysoida erilaisilla lähestymistavoilla, kuten: (a) tulokseksi saadun immuuniseerumin reaktiivisuus hepadna-virusepitoopin sisältävää hepadna-virusantigeenia tai tämän fragmenttia vastaan, tai eristettyä, luonnossa esiintyvää hepadna-virusta vastaan määritettynä tunnetuilla menetelmillä, esim. entsyymivälitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (ELISA), immunobloteilla, radioimmunosäostumilla jne., (b) immunisoiduista potilaista tai koe-eläimistä eristettyjen lymfosyyttien reaktiivisuus hepadna-virusantigeenia tai tämän osaa vastaan tai virusta vastaan määritettynä tunnetuilla menetelmillä, kuten T-lymfosyyttien stimuloitumisen määrityksillä (blastogenic response), immuuniseerumin kyvyllä neutralisoida hepadna-virusta in vitro ja (d) suojan syntymisellä tautia vastaan ja/tai infektion oireiden lievenemisellä immunisoiduissa eläimissä.

20 5.1.3.1.2. Rokoteformulaation valmistaminen

Tämän keksinnön mukaisen tämän sovellutusmuodon tarkoitus on formuloida rokote, jossa immunogeeni käsittää tietyn hepadna-viruksen epitoopin sellaisen tätä hepadna-virusepitooppia vastaan suunnatun immuunivasteen (kiertäviin vasta-aineisiin perustuvan tai soluvälitteisen) herättämiseksi, joka suojaa tietyn hepadna-viruksen aikaansaamaa infektiota vastaan tai hepadna-viruksen aiheuttamia tauteja tai sairauksia vastaan. Tällainen rokote voi olla yksi- tai monitehoinen.

30 Monitehoinen rokote voidaan valmistaa yksittäisestä tai muutamista hepadna-viruksen virionipartikkeleista, jotka ilmentävät yhtä tai useampaa hepadna-viruksen epitooppia. Vaihtoehtoisesti monitehoiset rokotteet voidaan formuloida siten, että ne sisältävät hepadna-viruksen geenituotteita ja/tai yhdistelmäviruksia, kun vaillinainen

hepadna-viruksen genomi on kloonattu nisäkäs- tai hyönteissoluvektoriin.

Kahta immunogeenien päätyyppiä on ajateltavissa käytettäväiksi tämän keksinnön mukaisissa rokoteformulaatioissa: (i) hepadna-viruksen virionipartikkeleita, tai (ii) eristetyt hepadna-virusproteiineja (käytettäväiksi alayksikkörokotteissa). Yhdessä sovellutusmuodossa hepadna-viruksen virionipartikkelit voivat käsittää pakattuja partikkelien suhteen vaillinaisia genomeja, joista lopputulokseksi saadaan virionipartikkeli, joka itsekseen voi käydä läpi vain yhden infektiiosyklin. Tässä sovellutusmuodossa immunogeeniset epitoopit syntyvät pakatun hepadna-viruksen genomien ilmentymisestä tämän päästyä virukselle herkkään soluun. Toisessa sovellutusmuodossa immunogeeninä käytetty hepadna-viruspartikkeli voi käsittää "tyhjän kuoren", jossa ei ole virus-DNA:a (tämä on muodostunut seurauksena siitä, että hepadna-virusta pakkaava genomi on joutunut soluun ja ilmentynyt siellä). Päinvastoin kuin pakatut, partikkelien suhteen vaillinaiset genomit, tällainen tyhjä virioni ei aiheuta hepadna-viruksen proteiinien synteesiä isäntäsoluun jouduttuaan.

Useita menetelmiä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten rokoteformulaatioiden antamiseen, näihin kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, annostelutiet suun kautta, ihon sisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsakalvonsisäisesti, suonensisäisesti, ihon alle, ihon läpi ja nenänsisäisesti, sekä villityyppisen parentaalihepadna-viruksen luonnollinen infektiotie.

5.1.3.1.3 Vaillinaisia hepadna-viruksia vastaan suunnattujen vasta-aineiden käyttö

Tämän keksinnön mukaisilla vasta-aineilla, jotka on muodostettu hepatiittivirusta vastaan vaillinaisilla hepatiittiviruspartikkeleilla tai näiden proteiineilla immunoimalla, on mahdollista käyttöä diagnostisissa immuuni-

määrittelyksissä, passiivisessa immunoterapiassa ja anti-idiotyyppisten vasta-aineiden muodostamisessa.

Muodostetut vasta-aineet voidaan eristää sinänsä tunnetuilla menetelmillä (esim. immunoaffiniteettikromatografi-
 5 grafialla, sentrifugoinnilla, saostuksella jne.) ja käyttää diagnostisissa immunomäärittelyksissä. Vasta-aineita voidaan myös käyttää hoidon ja/tai sairauden edistymisen seuraamiseen. Mitä tahansa sinänsä tunnettua immunomäärittysjärjestelmää, kuten edellä luetellut, voidaan käyttää
 10 tähän tarkoitukseen käyttäen menetelmiä, kuten radioimmunomäärittelykset, ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimäärittely), kerrosimmunomäärittelykset, presipitiinireaktiot, geelidiffuusiopresipitiinireaktiot, immunodiffuusiomäärittelykset, agglutinaatiomäärittelykset, komplementin sitoutumismäärittelykset, proteiini-A-immunomäärittelykset, fluoresenssi-
 15 immunoелектроforeesimäärittelykset joidenkin määrittelysten mainitsemiseksi.

Tämän keksinnön mukaisia rokoteformulaatioita voidaan myös käyttää tuotettaessa vasta-aineita käytettäväksi
 20 passiivisessa immunoterapiassa, jossa isännän lyhytaikainen suojaus tapahtuu heterologista organismia vastaan suunnattua, edeltäkäs in muodostettua vasta-ainetta antamalla. Tämän keksinnön mukaisilla rokoteformulaatioilla muodostuneita vasta-aineita voidaan myös käyttää anti-idiotyyppisen vasta-aineen tuottamiseen. Anti-idiotyyppistä
 25 vasta-ainetta voidaan sitten puolestaan käyttää immuni-soinnissa tuottamaan vasta-aineiden alapopulaatio, joka sitoo patogeenisen mikro-organismin varhaisantigeenin (Jerne, (1974) Ann. Immunol. (Paris) 125c 373; Jerne et al., (1982) EMBO J. 1, 234).
 30

5.1.3.2 Käyttötavat immunoterapeuttisina aineina

Tässä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan tehoavia määriä tämän keksinnön mukaisia hepadnaviruspartikkeleita (kuten kohdassa 5.1.2.1.2 on kuvattu)
 35 tai vaillinaisten hepadna-viruksen genomien koodaamia pro-

teineja, jotka käsittävät immunogeenisen epitoopin, käyttä immunoterapeuttisesti. Yhdessä sovellutusmuodossa immunogeeninen epitooppi voi olla ydinantigeeni. Edullisessa sovellutusmuodossa epitooppi voi olla pinta-antigeenistä.

Hepadna-viruksen virionipartikkeleilla tai hepadna-viruksen proteiineilla, jotka sisältävät immunogeenisen epitoopin, voi olla immunoterapeuttista tehokkuutta hepatooman ehkäisyyn näiden hepadna-virusta vastaan suuntautuvan immuunivasteen stimuloitavuuden johdosta. Kokeelliset todisteet viittaavat siihen, että korrelaatiota esiintyy hepadna-virusinfektion ja hepatooman esiintymisen välillä sekä epidemiologisella että molekyyllitasolla. Immunogeeniä voidaan annostella yksin tai yhtäaikaaisesti muiden terapiamuotojen (esim. kemoterapian, säteilyhoidon jne.) kanssa.

Yhdessä erityisessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan immunogeenisen epitoopin sisältäviä vaillinaisia hepadna-viruksen virionipartikkeleita tai proteiineja käyttää immuunijärjestelmän toimintaa kiihdyttävänä aineina isännän immuunijärjestelmän toiminnan tehostamiseen, soluvälitteisen immunitetin parantamiseen ja helpottamaan tietyn infektion aiheuttajan (esim. hepatiitti-A-virus tai cytomegalovirus) poistamista elimistöstä. Edullisessa sovellutusmuodossa voidaan sen tähden, että hepadna-virukset yleensä esiintyvät suurissa määrissä infektoituneiden henkilöiden hepatosyyteissä, veressä ja luuytimessä, annostella pakattuja, partikkelien suhteen vaillinaisia genomeja yksin tai yhdessä muiden, näihin solutyyppeihin vaikuttavien sairauksien (esim. hepatiitti-A-virus, malariaparasitiitit, cytomegalovirus, Epstein-Barr-virus) hoitoon tarkoitettujen hoitomuotojen kanssa.

5.1.3.3 Hepadna-virusinfektion hoito

Pakattuja partikkelien suhteen vaillinaisia hepadna-viruksen genomeja voidaan käyttää virustenvastaisina

aineina hoidettaessa äkillistä tai pitkäaikaista hepadna-virusinfektiota, koska nämä kykenevät häiritsemään villityyppisten hepadna-virusten lisääntymistä. Yksi tämän keksinnön mukainen sovellutusmuoto sisältää hepadna-virukset, jotka tuottavat vaillinaista pinta-antigeenia, ydin-antigeenia tai viruksen polymeraasiproteiinia. Tämän keksinnön mukaisessa edullisessa sovellutusmuodossa partikkelien suhteen vaillinainen hepadna-virus on vaillinainen viruksen polymeraasiproteiinin synteessin suhteen ja koodaa sekä lyhentynyttä pinta-antigeeniproteiinia että lyhentynyttä ydinantigeeniproteiinia. Partikkelien suhteen vaillinaista hepadna-virusta voidaan annostella yksin tai yhtäaikaaisesti muiden virusten vastaisten aineiden kanssa, joihin kuuluu, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, α -interferoni ja vidarabiinifosfaatti.

5.2 Heterologisen jakson käsittävien pakattujen partikkelien suhteen vaillinaisten yhdistelmägenomien muodostaminen ja näiden käyttö

Tämä keksintö liittyy myös pakattuihin partikkelien suhteen vaillinaisiin genomeihin, jotka käsittävät heterologisen geenijakson. Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa useat hepadna-viruksen genomien alueet, joihin kuuluvat, näihin kuitenkin rajoittumatta, sellaiset alueet, joita pakkauskykyiset genomit voivat komplementoida trans-asemasta käsin, voidaan korvata heterologisella kloonatulla geenillä siten, että tiettyyn organismiin viety heterologinen geeni ilmentyy viruksen tai muiden sääätelyjaksojen ohjaamana. Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa heterologiset DNA-jaksot liitetään hepadna-viruksen pinta-antigeenia koodaavaan alueeseen. Vielä yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa heterologiset DNA-jaksot liitetään hepadna-viruksen pinta-antigeenialueelle. Heterologisia jaksoja voidaan ilmentää hepadna-viruksen promoottoreiden ohjaamina. Vaihtoehtoisessa sovellutusmuodossa voidaan

käyttää heterologisia transkription säätelyalueita konstruoimalla sopiva yhdistelmä-DNA.

Näillä yhdistelmähepadna-viruksilla on joukko terapeuttisia sovellutuksia. Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voidaan näitä yhdistelmähepadnaviruksia käyttää geeniterapiaan maksatautien tai -sairauksien hoidossa tai sellaista tautien hoidossa, joita voidaan hoitaa entsyymien tuotolla maksassa (ks. kohta 5.2.2.1). Tällaisia sairauksia voi esimerkiksi syntyä maksaentsyymi(e)n tai veren hyytymistekijän periytyvästä puutoksesta tai tautia aiheuttava organismin infektiosta. Toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa voi heterologinen geeni koodata maksaentsyymiä (-mejä) tai tuotetta, joka on toksinen tietyille taudinaiheuttajalle, joka on tautia aiheuttava agenssi.

5.2.1 Heterologisia jaksoja sisältävien yhdistelmähepa-dnavirusten genomien muodostaminen

Yhdistelmähepadna-viruksen genomeja voidaan muodostaa käyttämällä sinänsä tunnettuja yhdistelmä-DNA-tekniikoita. Niihin hepadna-viruksen genomeihin, joita voidaan käyttää, kuuluvat, näihin kuitenkin rajoittumatta, hepatiitti-B-virus (HBV), maaoravan hepatiitti-B-virus (GSHBV), ankan hepatiitti-B-virus (DHBV) ja murmelin hepatiitti-B-virus (WHBV).

Yhdistelmähepadna-viruksen genomien muodostaminen voidaan yksinomaan kuvaamistarkoituksessa jakaa seuraaviin kolmeen vaiheeseen: 1) heterologisen jakson eristäminen, 2) yhdistelmähepadna-viruksen DNA:n konstruktio ja 3) yhdistelmähepadna-viruksen genomien ilmentäminen.

5.2.1.1 Heterologisen jakson eristäminen

Mikä tahansa heterologinen proteiinituotetta koodaava DNA-jakso, jonka ilmentyminen hepatosyyteissä on haluttua, voidaan eristää myöhempää käyttöä varten. Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa entsyymipuutosten (ks. kohta 5.2.2.1) hoitoon suunnatussa sovellutusmuodossa voi-

daan käytettäväksi eristää mikä tahansa sellaista toiminnallista entsyymiä koodaava heterologinen DNA-jakso, jonka puute on sairauden perussy (ks. taulukon II ei-rajoittavia esimerkkejä tällaisista entsyymeistä). Toisessa spesifisessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa DNA-jakso voi koodata veren hyytymistekijää, jota käytetään periytyvien hyytymissairauksien geeniterapiassa, koska maksa on näiden tekijöiden normaalin biosynteesin tapahtumapaikka. Eristetty DNA-jakso voi koodata tietyn entsyymin koko proteiinijaksoa tai jakson sitä toiminnallista osaa, joka edustaa aktiivista keskusta.

Heterologinen DNA-jakso voi koodata sairautta parantavaa geenituotetta. Yhdessä sovellutusmuodossa, joka on suunnattu tautia aiheuttavan organismin infektiosta seuraavan maksasairauden hoitoon, voi heterologinen geenijakso koodata tuotetta, joka on toksinen tätä patogeenia kohtaan olematta kuitenkaan haitallinen isännälle, tai joka toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa häiritsee taudinaiheuttajan elinkiertoa jne. Tällaiset DNA-jaksot voivat koodata jonkin tietyn taudinaiheuttajan muutettua geenituotetta tai "anti-sense" -jaksoa (ts. sellaista jaksoa, joka voi hybridisoitua taudinaiheuttajan toiminnalliseen nukleinihappoon).

Vielä yhteen tämän keksinnön mukaiseen rokotekäyttöön suunnattuun sovellutusmuotoon (ks. kohta 5.2.2.2) liittyy sellaisen heterologisen organismin epitooppia koodaavan DNA-jakson eristys, joka sopivaan isäntään vietyä tuottaa suojaavan immunitetin tätä organismia vastaan tai organismin antigeenin aiheuttamaa tilaa tai sairautta vastaan. Tässä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa pakatut, partikkelien suhteen vaillinaiset ja heterologisen geenijakson käsittävät genomit voidaan formuloida rokotteiksi estämään heterologisen geenijakson sisältävän taudinaiheuttajan aiheuttamia sairauksia. Näihin kuulu-

vat, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, taulukossa I luetellut taudinaiheuttajat.

Taulukko I

- 5 Taudinaiheuttajat, joiden epitooppi (-pit) voi(vat) olla yhdistelmähepadna-viruksien koodaama(t).
- Epstein-Barr -virus
- Hepatiitti-A-virus
- Ei-A-ei-B-hepatiittivirus
- 10 cytomegalovirus
- Plasmodium spp (malarialoiset)

Edullisessa sovellutusmuodossa yhdistelmähepadna-viruksen heterologinen jakso koodaa hepatotrooppisen taudinaiheuttajamikro-organismin epitooppia.

20 Erityisessä sovellutusmuodossa voidaan tämän keksinnön mukaista käyttöä varten eristää mikä tahansa DNA-jakso, joka koodaa sukuun Plasmodium kuuluvan malarialoisen epitooppia, joka on immunogeeninen selkärangkaisisännässä. Niihin Plasmodium -lajeihin, jotka voivat toimia DNA-lähteinä, kuuluu, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, ihmisen malarialoiset P. falciparum, P. malariae, P. ovale, P. vivax ja eläinten malarialoiset P. berghei, P. yoelii, P. knowlesi ja P. cynomolgi. Antigeenit tai

25 näiden fragmentit, joita yhdistelmähepadna-virukset voivat ilmentää, ovat epitooppeja, joita malarialoinen ilmentää missä tahansa elinkiertoensa useista eri vaiheista. Erityisessä sovellutusmuodossa on ilmennettävä heterologinen epitooppi Plasmodium -lajin sirkumsporotsoiitti(CS)proteiini. (Ks. esim. Dame et al., (1984) Science 225, 593; Arnot, et al., (1985) Science 230, 815; Weber et al., (1987) Exp. Parasitol. 63, 295).

30 Muihin epitooppeihin, joita yhdistelmähepadna-virukset voivat ilmentää, kuuluvat, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, hepatiitti-A-antigeenilla olevat epitoopit

35

(von der Helm et al., (1981) J. Virol. Methods 3, 37 - 43); CMV:n 64 - 66 vaippaglykoproteiinilla olevat neutra-
loivat epitoopit (Plotkin, (1985) teoksessa: The Herpesvi-
ruses, Roiznman, P. ja Lopez, C. Plenum Press, N.Y. sivut
5 297 - 312); ja EBV:n kalvon antigeeniproteiinilla, gp 340,
olevat neutraloivat epitoopit (North et al., (1982) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 79, 7504 - 8508).

Tämän keksinnön mukaan ilmennettävää heterologista
epitooppia koodaavat geenijaksot voidaan eristää sinänsä
10 tunnetuilla menetelmillä, johon kuuluu, mainittuihin kui-
tenkaan rajoittumatta, puhdistaminen mikro-organismin ge-
nomin DNA:sta, cDNA-synteessillä mikro-organismin RNA:sta,
yhdistelmä-DNA-menetelmillä (Maniatis et al., (1982) Mole-
cular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
15 Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) tai kemiallisel-
la synteessillä.

5.2.1.2 Yhdistelmähepadna-viruksen genomien konst- ruktio

Tämän keksinnön mukainen yhdistelmähepadna-viruksen
20 genomien konstruktio sisältää hepadna-viruksen genomissa
olevien jaksojen korvaamisen jaksolla, joka koodaa yhtä
tai useampaa heterologisen organismin epitooppia. Yhdessä
tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa heterologi-
nen geenijakso korvaa pinta-antigeenia ja viruksen poly-
25 meraasiproteiinia koodaavat geenit. Toisessa tämän kek-
sinnön mukaisessa sovellutusmuodossa heterologinen geeni-
jakso korvaa pinta-antigeenia koodaavan geenin. Tässä
sovellutusmuodossa yhdistelmähepadna-virus-DNA:ssa voivat
pinta-antigeenin ilmentymistä ohjaavat promoottorijaksot
30 sisältävät esi-S-DNA-jaksot säilyä. Vielä yhdessä tämän
keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa heterologinen gee-
ni korvaa ydinantigeenia koodaavan geenin. Tämän sovellu-
tusmuodon mukainen yhdistelmähepadna-virus-DNA voi myös
sisältää esi-C-jaksot, jotka edistävät ydinantigeenin il-
35 mentymistä.

Monia sinänsä tunnettuja strategioita voidaan käyttää hepadna-viruksen yhdistelmägeenin konstruktion. Voidaan esimerkiksi pilkkoa restriktioendonukleaas(e)illa sopivista kohdista asianmukaiset hepadna-viruksen genomien ja heterologisen DNA:n jaksot, eristää ne ja liittää liigaasireaktiolla in vitro. Jos restriktioendonukleaaseilla pilkottaessa syntyy kohesiivisiä päitä, ei saata olla tarpeen muokata DNA:a edelleen ennen ligaasireaktiota. Jos kohesiivisiä päitä ei ole saatavilla restriktioendonukleaaseilla tapahtuvaa pilkkomista varten tai muut kuin saatavilla olevat kohdat ovat edullisempia, voidaan käyttää mitä tahansa lukuisista sinänsä tunnetuista menetelmistä heterologisen DNA:n liittämiseksi haluttuihin kohtiin sen mukaisesti kuin aiemmin on käsitelty (ks. kohta 5.1.1).

Geenifuusioiden konstruointiin käytettävä nimenomainen strategia riippuu korvattavasta tai liitoksen kohteena olevasta erityisestä hepadna-virusjaksosta sekä liitettävästä heterologisesta jaksosta.

5.2.1.3 Yhdistelmähepadna-virusgenomien ilmentäminen

Liitettyjä heterologisia geenejä sisältävät hepadna-virusgenomit voidaan tunnistaa kolmella yleisellä lähestymistavalla: (a) nukleiinihappohybridisoinnilla (b) "markkeri"geenitoimintojen läsnä- tai poissaolosta ja (c) liitettyjen jaksojen ilmentymisestä. Ensimmäisessä lähestymistavassa hepadna-virusvektoriin liitetyn vieraan geenin läsnäolo voidaan havaita nukleiinihappohybridisoinnilla käyttäen koettimia, jotka käsittävät vieraan liitetyn geenin suhteen homologisia jaksoja. Toisessa lähestymistavassa yhdistelmävektori/isäntäjärjestelmä voidaan tunnistaa ja valikoida sillä perusteella, että vieraiden geenien liittämistä hepadna-virusvektoriin aiheutuneet tietyt "markkeri"geenitoiminnot ovat läsnä tai puuttuvat. Jos esimerkiksi heterologinen geeni liitetään hepadna-viruksen polymeraasigeenijakson alueelle, heterologisen

liittymän sisältävät rekombinantit voidaan tunnistaa polymeraasiaktiivisuuden puuttumisesta. Kolmannessa lähestymistavassa yhdistelmähepadna-virukset voidaan tunnistaa määrittämällä rekombinantin ilmentämä vieraan geenin tuote. Nämä määritykset voivat perustua geenituotteen fysikaalisiin, immunologisiin tai toiminnallisiin ominaisuuksiin.

Tässä nimenomaisessa, edellisissä esimerkeissä yksityiskohdittain kuvatussa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa on kuvattu hepatiittiviruksen polymeraasi- ja pinta-antigeenigeenejä korvaavan heterologisen geenijakson sisältävän yhdistelmähepatiittigenomin konstruktio, ilmentäminen ja pakkaus. Tämä pakattu partikkelien suhteen vaillinainen yhdistelmägenomi tarvitsee lisääntyäkseen sen, että samanaikaisesti sen kanssa kyseiseen solulinjaan tuodaan hepatiittiviruksen pakkauskykyinen "avustaja"genomi. Nämä pakkauskykyiset genomit, joiden konstruktiosta on yksityiskohtainen esimerkki kohdassa 6.3, kykenevät antamaan käyttöön trans-asemasta vaikuttavia viruksen toimintoja, jotka ovat tarpeen sopivan esi-genomin RNA:n pakkaamisessa virioneihin ja RNA:n transkriptiossa virionin DNA:ksi.

Kun heterologista geeniä ilmentävä hepadna-virusrekombinantti on tunnistettu, tulisi geenituote analysoida. Tämä voidaan suorittaa tuotteen fysikaalisiin, immunologisiin tai toiminnallisiin ominaisuuksiin perustuvilla sinänsä tunnetuilla määrityksillä. Heterologisen DNA:n koodaama peptidi tai proteiini voidaan eristää ja puhdistaa tavanomaisin menetelmin, joihin kuuluu kromatografia, (ts. ioninvaihto-, affiniteetti-, ja koon mukaan jaotteleva pylväskromatografia), sentrifugointi, liukoisuuserot tai mikä tahansa muu tavanomainen proteiinien puhdistusmenetelmä.

5.2.2 Heterologisen geenijakson sisältävien yhdistelmähepadna-viruksien käyttötavat

Partikkelien suhteen vaillinaiset yhdistelmägenomit ja niiden yhdistelmähepadna-virukset (ts. pakatut partikkelien suhteen vaillinaiset yhdistelmägenomit), jotka sisältävät heterologisen geenijakson, voivat olla terapeuttisesti arvokkaita. Isäntäsoluissa ilmentymään kykenevän heterologisen geenijakson sisältävän yhdistelmähepadna-virusgenomin pysyvä liittyminen isäntäsoluihin (esim. hepatosyytteihin) voi olla hyvin arvokasta tautien ja sairauksien hoidossa.

On olemassa monia sinänsä tunnettuja menetelmiä, joita voidaan käy vaillinaisen hepadna-virus-DNA:n tuomiseksi isäntäsoluun (esim. hepatosyytteihin) käytettäväksi geeniterapiatarkoituksiin. Käytettävän menetelmän pitäisi tarjota käyttöön keinot hepadna-virusjakson pysyvään siirtymiseen isäntäsoluihin, joihin voi kuulua, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, hepatosyytit, lymfosyytit ja leukosyytit, siten, että yhdistelmä-hepadna-virusjakso on mainittujen solujen ilmennettävissä ja siten, että vastaanottajasolujen tarpeelliset kehitys- ja fysiologiset toiminnot eivät vaurioidu. Edullisessa sovellutusmuodossa partikkelien suhteen vaillinaisen hepadna-virusyhdistelmä-DNA pakataan virioneihin (esim. avustavan pakkauskykyisen genomin ilmentämistä käyttäen); tällaiset virionipartikkelit ovat hyödynnettävissä siten, että niihin sisältyvä yhdistelmä-DNA siirtyy isäntäsoluun pysyvästi hepadna-viruksen normaalin infektiotien kautta. Ne virionipartikkelien annostelutiet, joita voidaan käyttää, ovat, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, maksansisäisesti, suun kautta, suonensisäisesti, ihonalaisesti, vatsaontelonsisäisesti, lihaksensisäisesti, ihonsisäisesti, nenään jne tapahtuva annostelu.

Tämän keksinnön mukaisissa sovellutusmuodoissa voidaan yhdistelmä-hepadna-viruksia käyttää maksan ai-

neenvaihdunnan toimintahäiriöistä johtuvien sairauksien hoitamiseen. Yhdessä sovellutusmuodossa näitä yhdistelmä-hepadna-viruksia voidaan käyttää selllaisten maksasairauksien hoidossa, jotka johtuvat maksan entsyymien periytyvistä puutoksista. Näihin geneettisiin sairauksiin kuuluu, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, taulukossa II luetellut puutokset (joitakin näitä sairauksia on yksityiskohtaisemmin käsitelty artikkelissa Sharp, (1985) teoksessa Gastroenterology, Berk, J.E. (toim.), W.B. Saunders Co., Philadelphia, 3236 - 3258).

Taulukko II

Taudit tai sairaudet, joita voidaan hoitaa ilmentämällä heterologisen geenijakson sisältäviä partikkelien suhteen vaillinaisia genomeja

- I. Maksaentsyymien periytyvät puutokset
 - A. Hyperammonemia
 1. Periytyvät ureasyklin entsyymipuutokset
 - a) N-asetyyli-glutamaatti(AGA)syntetaasipuutos
 - b) karbamyyli-fosfaattisyntetaasi(CPS I)puutos
 - c) ornitiinikarbamyyli-transferaasi(OTC)puutos
 - d) sitrullinemia
 - e) arginiinimeripihkahappouria
 2. Periytyvät orgaanisten happojen erityystaudit, jotka liittyvät haaraketjuisten aminohappojen, parittoman hiilimäärän sisältävien hiiliketjujen ja kolesterolin sivuketjun kataboliaan
 - a) propionihappotauti
 - b) metyyli-malonihappotauti
 - c) isovaleriaanahappotauti

- B. Sapenerityksen loppuminen pikkulapsilla
 - 1. galaktosemia
 - 2. α -antitrypsiinipuutos
 - 3. trihydroksikoprostaanihappotauti
- 5 C. Hepatomegalia (laajentunut maksa)
 - 1. glykogeenin varastoitumistauti - 4
 - tyyppiä entsyymipuutoksen mukaan luokitel-
 - tuina
 - 2. fruktoosi-intoleranssi
 - 10 3. tyrosinemia
 - 4. happaman lipaasin puutos
- D. Varhaislapsuuden jälkeiset maksasairaudet
 - 1. hemokromatoosi
 - 2. Wilsonin tauti
- 15 II. Periytyvät veren hyytymissairaudet
 - A. Hemofilia A - tekijän VIII puutos
 - B. Hemofilia B - tekijän IX puutos
 - C. harvinaiset veren hyytymissairaudet (esim. fib-
 - rinogeenipuutokset, tekijän V puutokset, tekijän XI
 - 20 puutokset jne.)

Mainittuihin rajoittumatta kuuluvat muihin proteiini-

neihin, joita yhdistelmähepadna-virusgenomit voivat kooda-

ta, komplementin komponentit, keskipitkän ketjun asyyli-

25 CoA-dehydrogenaasi, LD-lipoproteiinin reseptori, insulii-

ni, ruoansulatusentsyymit jne.

Toisessa tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuo-

dossa voidaan veren hyytymistekijää koodaavien hepadna-

viruksen yhdistelmägenomien ilmentymistä käyttää periyty-

30 vien hyytymissairauksien hoitoon, mukaanlukien taulukossa

II luetellut sairaudet, näihin kuitenkin rajoittumatta.

Näiden sairauksien yksityiskohtainen kuvaus on esitetty

teoksessa Jandl, J.H., (1987) Textbook of Hematology,

Little Brown and Co. Boston, M.A. 1095 - 1140. Nykyisiin

35 hoitomuotoihin kuuluu korvaushoito tietyllä tekijällä,

joka on eristetty tämän tekijän normaalitason omaavien henkilöiden veriplasmasta. Korvaushoitoa saavalla potilaalla on kuitenkin luovuttajalta saatujen, veren välityksellä siirtyvien virusinfektioiden riski. Tämän keksinnön mukaisen sovellutusmuodon käyttö poistaisi tällaisen riskin. Maksa on veren hyytymiseen liittyvien tekijöiden, kuten fibrinogeenin, tekijöiden VIII, IX, X, XI, XII ja XIII ja plasminogeenin, biosynteesin tapahtumapaikka. Yhdessä erityisessä sovellutusmuodossa voidaan yhtä tai useampaa näistä tekijöistä saada ilmentämällä hepadna-viruspartikkelien suhteen vaillinaista yhdistelmägenomia.

Yhdessä erityisessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuodossa, joka on suunnattu alkoholin aiheuttamaan maksasairauden hoitoon, voidaan käyttää alkoholia kohtaan pienemmän K_m :n omaavaa, mutatoitua alkoholidehydrogenaasia ilmentävää hepadna-yhdistelmävirusta, jonka seurauksena alkoholia nauttineen hyvin huonovointiseksi tekevän aineen, asetaldehydin, tuotto nopeutuu ja juomiskäyttäytyminen muuttuu siten hillitymmäksi.

Toiseen tämän keksinnön mukaiseen sovellutusmuotoon liittyy taudinaiheuttajamikro-organismien infektioiden seurauksena olevien sairauksien hoitaminen yhdistelmä -hepadna-viruksilla. Tällaiset yhdistelmä -hepadna-virukset voivat sisältää heterologisen geenin, jota ilmennetään sairautta parantavana tuotteena, joka on toksinen taudinaiheuttajaa kohtaan olematta kuitenkaan merkittävästi isäntää vaurioittava tai joka häiritsee taudinaiheuttajan elinkiertoa jne. Tämän keksinnön mukaisilla yhdistelmä -hepadna-viruksilla hoidettaviksi soveltuviin tauteja aiheuttaviin patogeeneihin kuuluvat, lueteltuihin kuitenkaan rajoittumatta, taulukossa I luetellut patogeenit. Heterologinen geeni voi koodata patogeenisen eliön muunnettua geenituotetta. Vaihtoehtoisesti on mahdollista konstruoida yhdistelmä -hepadna-virus, joka ilmentää hepatosyytti-patogeenin nukleinihappoa kohtaan "anti-sense" -muotoa

olevaa jaksoa. Tämä jakso, joka on komplementäärinen taudinaiheuttajan RNA:a tai DNA:a kohtaan, voi hybridisoitua ja inaktivoida tällaisen RNA:n tai DNA:n estämällä nukleinihapon toiminnan tai ilmentymisen ja vaurioittamalla patogeenin elinkierron.

Tämän keksinnön mukainen partikkelien suhteen vaillinaisen yhdistelmä-DNA voi ilmentää monia muita heterologisia jaksoja, jotka soveltuvat geeniterapiatarkoituksiin. Kun esimerkiksi sairaus johtuu tietyn tuotteen liikaesiintymisestä, voidaan ilmentää tähän tuotteeseen vaikuttavaa estäjää tai sitä hajottavaa entsyymiä tai sen synteesin estäjää. Yhdistelmä -hepadna-virus-DNA voi ilmentää antisense -oligonukleotidia tietyn geenin transkription ehkäisemiseksi.

5.2.2.2 Rokotekäyttö

Tämän keksinnön mukaisen tämän sovellutusmuodon mukaan yhdistelmä -hepadna-viruksen virionit tai proteiinit, jotka käsittävät heterologisen eliön immunogeenisen epitoopin, formuloidaan rokotteissa käytettäväksi. Näitä rokotteita voidaan käyttää antamaan suojaa heterologisen tautia aiheuttavan eliön, joihin kuuluu, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, taulukossa I luetellut eliöt, infektiota vastaan tai suojaamaan eliön antigeenin aiheuttamilta tiloilta tai sairauksilta. Nämä rokoteformulaatiot voivat käsittää eläviä partikkelien suhteen vaillinaisia hepadna-virusrokotteita tai alayksikkörokoteformulaatioita. Hepadna-virusrekombinantit voidaan pakata käyttöä varten käyttämällä sopivaa hepadna-viruksen pakkauskykyistä genomia tai muuta hepadna-viruksen proteiinilähdettä ja saadut virionit formuloida käytettäväksi rokotteina tai heterologisen epitoopin sisältävä ilmennetty proteiini voidaan puhdistaa käytettäväksi alayksikkörokotteena. Tämän keksinnön mukaisilla rokoteformulaatioilla voi olla käyttöä ihmisille ja/tai eläimille.

5.2.2.2.1 Yhdistelmä -hepadna-virusten ilmentämän (-ien) heterologis(t)en epitoop(p)i(e)n immunologisen tehokkuuden määrittäminen

- Elävässä rokoteformulaatiossaan olevan yhdistelmä -
- 5 hepadna-viruksen ilmentämän heterologisen epitoopin immunologinen tehokkuus voidaan määrittää seuraamalla koe-eläinten immuunivastetta yhdistelmä -hepadna-viruksilla suoritettun immunisoinnin jälkeen. Alayksikkörokoteformulaatiossa koe-eläinten immuunivastetta voidaan seurata
- 10 sellaisen immunisoinnin jälkeen, joka on suoritettu yhdistelmä -hepadna-viruksen eristetyllä heterologisella tuotteella, joka puolestaan voidaan formuloida sopivan adjuvantin kanssa immunologisen vasteen tehostamiseksi. Sopiviin adjuvantteihin kuuluvat, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, mineraaligeelit, esim. aluminiumhydroksidi,
- 15 pinta-aktiiviset aineet kuten lysolesitiini, pluroniset polyolit, polyanionit, peptidit, öljyemulsiot, ja potentiaalisesti käyttökelpoiset ihmisille soveltuvat adjuvantit, kuten BCG (Bacille Calmette-Guerin) ja Corynebacterium
- 20 parvum. Muita hepadna-viruksia, kuten DHBV, GSHBV ja WHBV, jotka on konstruoitu sisältämään heterologisen organismin epitoopin, voidaan myös käyttää rokoteformulaatioissa ankkujen, maaoravien tai murmelien immunisointiin heterologisen organismin infektiota vastaan. Immunogeenin antamismenetelmiin voi kuulua antaminen suun kautta, ihon-
- 25 sisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsakalvon sisäisesti, suonensisäisesti, ihonalaisesti, nenänsisäisesti tai mitä tahansa muuta tavanomaista immunisoinnin annostelureittiä käyttäen.
- 30 Kokeen kohteena olevien immuunivaste voidaan analysoida eri lähestymistavoilla, kuten (a) saadun immuuniseerumin reaktiivisuudesta heterologisen epitoopin sisältävää natiivista antigeenia tai tämän fragmenttia vastaan tunnetuilla menetelmillä, kuten ELISA:lla (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys), immunoblottauksella, ra-
- 35

dioimmunosauostuksilla jne., määritettynä, (b) immunisoin-
 nin kohteesta eristettyjen lymfosyyttien reaktiivisuudesta
 natiivista antigeenia tai tämän fragmenttia tai heterolo-
 gista organismia kohtaan määritettynä tunnetuilla menetel-
 millä, kuten T-lymfosyyttien stimuloitumisen määrittäyksillä
 (blastogenic response), sytotoksisuusmäärittäyksillä, vii-
 västyneestä yliherkkyydestä jne, (c) immuuniseerumin ky-
 vystä neutraloida organismin infektiiviteettiä in vitro tai
 natiivin antigeenin biologista aktiivisuutta ja (d) suo-
 jauksesta tautia vastaan ja/tai infektion oireiden lievity-
 misestä immunisoiduissa eläimissä.

5.2.2.2.2 Rokotteen formulointi

Yhdessä tämän keksinnön mukaisessa sovellutusmuo-
 dossa formuloidaan heterologisen organismin epitooppia
 ilmentäviä yhdistelmä-hepadna-viruksia käytettäväksi elä-
 viin rokotteisiin. Toisessa sovellutusmuodossa tämän yh-
 distelmäviruksen proteiinituotteita voidaan formuloida
 käytettäväksi alayksikkörokotteisiin. Elävä rokote tai
 alayksikkörokote voi olla yksi- tai monitehoinen. Tämän
 keksinnön mukaisia rokoteformulaatioita voidaan käyttää
 ihmisillä ja/tai eläimillä.

5.2.2.2.2.1 Elävät rokoteformulaatiot

Tämän keksinnön mukaisen tämän sovellutusmuodon
 tarkoitus on formuloida rokote, jossa immunogeeni on pa-
 kattu partikkelien suhteen vaillinainen yhdistelmägenomi,
 joka käsittää heterologisen organismin epitooppia koodaa-
 van jakson, jota voidaan ilmentää in vivo organismin in-
 fektiolta tai organismin antigeenin aiheuttamilta tiloilta
 tai sairauksilta suojaavan, heterologista epitooppia vas-
 taan suunnatun immuunivasteen (humoraalisen tai soluvälit-
 teisen) synnyttämiseksi. Tällainen elävä rokote sallii
 partikkelien suhteen vaillinaisen genomien pääsyn tälle
 herkkään soluun ja tämän ilmentymisen, mutta myöhempiä in-
 fektiosyklejä ei tapahdu.

Elävä rokoteformulaatio voi olla yksi- tai monitehoinen. Monitehoiset rokotteet voidaan valmistaa yhdestä tai muutamasta pakatusta, partikkelien suhteen vaillinaisesta yhdistelmägenomista, jotka koodaavat yhtä tai useampaa heterologista epitooppia, jotka voivat olla peräisin eri organismeista. Yksi yhdistelmä -hepadna-virusgenomi voi koodata useampaa kuin yhtä saman tai eri antigeenin epitooppia.

Monia menetelmiä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten elävien rokoteformulaatioiden antamiseen, näihin kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, annostelutiet suun kautta, ihonsisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsakalvonsisäisesti, suonensisäisesti, ihon alle, ihon läpi ja nenänsisäisesti, sekä villityyppisen parentaali-hepadna-viruksen luonnollinen infektiotie.

5.2.2.2.2 Alayksikkörokoteformulaatio

Vaihtoehtona eläville rokotteille voidaan heterologista peptidiä tai proteiinia käyttää immunogeeninä alayksikkörokoteformulaatioissa, jotka voivat olla monitehoisia. Kuten aiemmin on selitetty, alayksikkörokotteet käsittävät yksinomaan asiaankuuluvaa immunogeenistä materiaalia, jota tarvitaan isännän immunisoimiseksi. Sen mukaan nämä heterologiset proteiinit, jotka voivat olla fuusioituja yhdistelmäproteiineja, voidaan puhdistaa sinänsä vakiintuneilla menetelmillä yhdistelmä -hepadna-viruksista, jotka ilmentävät näitä heterologisia epitooppeja.

Puhdistettu proteiini tai puhdistetut proteiinit tulee säätää sopivaan pitoisuuteen, formuloida sopivan rokoteadjuvantin kanssa ja pakata käyttöä varten. Sopiviin adjuvantteihin kuuluvat, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, kohdassa 5.2.2.2.1 kuvatut adjuvantit. Immunogeeni voidaan myös sisällyttää liposomeihin tai yhdistää polysakkarideihin ja/tai toisiin polymeereihin käytettäväksi rokoteformulaatiossa.

- Monia menetelmiä voidaan käyttää näiden rokotteiden antamiseen, näihin kuuluvat, lueteltuihin kuitenkin rajoittumatta, annostelutiet suun kautta, ihonsisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsakalvonsisäisesti, suonensisäisesti, ihon alle, ihon läpi ja nenänsisäisesti.

5.3 Yhdistelmä -hepadna-viruksia vastaan suunnattujen vasta-aineiden käyttötavat

- Tämän keksinnön mukaisilla yhdistelmä -hepadna-viruksilla suoritettulla immunisoinnilla muodostetuilla heterologisia organismeja vastaan suunnatuilla vasta-aineilla on myös mahdollista käyttöä diagnostisissa immuunimäärityksissä, passiivisessa immunoterapiassa ja anti-idiotyyppipisten vasta-aineiden muodostamisessa.

- Muodostetut vasta-aineet voidaan eristää sinänsä tunnetuilla vakio menetelmillä (esim. immunoaffiniteettikromatografialla, sentrifugoinnilla, saostuksella jne.) ja käyttää diagnostisissa immunomäärityksissä havaitsemaan lääketieteellisesti tai eläinlääketieteellisesti tärkeitä viruksia, bakteereja tai loisia ihmisten tai eläinten kudoksista, verestä, seerumista jne. Vasta-aineita voidaan myös käyttää hoidon ja/tai sairauden edistymisen seuraamiseen. Mitä tahansa sinänsä tunnettua immunomääritysjärjestelmää voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, ja näihin kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, kompetitiiviset ja ei-kompetitiiviset määritysjärjestelmät, joissa käytetään menetelmiä, kuten radioimmunomääritykset, ELISA (entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys), kerrosimmunomääritykset, presipitiinireaktiot, geelidiffuusiopresipitiinireaktiot, immunodiffuusiomääritykset, agglutinaatiomääritykset, komplementin sitoutumismääritykset, immunoradiometriset määritykset, fluoresenssi-immunomääritykset, proteiini-A-immunomääritykset ja immuno-elektroforeesimääritykset joidenkin määritysten mainitsemiseksi.

Tämän keksinnön mukaisia rokoteformulaatioita voidaan myös käyttää tuotettaessa vasta-aineita passiiviseen immunoterapiaan, jossa isännän lyhytaikainen suojaus saadaan aikaan antamalla heterologista organismia vastaan suunnattua, edeltäkäsien muodostettua vasta-ainetta.

Tämän keksinnön mukaisilla rokoteformulaatioilla muodostuneita vasta-aineita voidaan myös käyttää anti-idiotyyppisen vasta-aineen tuottamiseen. Anti-idiotyyppistä vasta-ainetta voidaan sitten puolestaan käyttää immuunisoinnissa tuottamaan vasta-aineiden alapopulaatio, joka sitoo patogeenisen mikro-organismin varhaisantigeenin (Jerne, (1974) Ann. Immunol. (Paris) 125c 373; Jerne et al., (1982) EMBO J. 1, 234).

6. Vaillinaisten hepadna-virusten muodostaminen

Nämä yksityiskohtaiset esimerkit valaisevat keksintöä käyttäen apuna ankan mallisysteemiä, jossa konstruoidaan kahden tyyppisiä vaillinaista ankan hepadna-virusgenomeja. Ensimmäinen tyyppi, partikkelien suhteen vaillinaiset DHBV-genomit, sisältää deleetioita geeneissä, jotka koodaavat polymeraasiproteiinia, ydinantigeenia ja/tai pinta-antigeenia (ks. kuvio 1). Nämä genomit ovat kykeneväisiä lisääntymään itsestään, mutta kykenevät kummassakin tapauksessa tuottamaan esigenomin RNA:a, jossa on sopivat cis-asemasta vaikuttavat signaalit, joita tarvitaan RNA:n viemisessä virionien sisään ja käänteiskopioinnissa DNA:ksi. Toinen vaillinaisten DHBV-genomien tyyppi, pakkauskykyiset genomit, sisältävät deleetioita DHBV-genomin DR1-alueella. Nämä mutatoituneet genomit kykenevät tarjoamaan käyttöön trans-asemasta käsin kaikkia viruksen toimintoja, joita tarvitaan sopivan esigenomin RNA:n pakkaamiseen virioneihin ja RNA:n transkriptioon virionin DNA:ksi. Mutatoituneet genomit eivät kuitenkaan pysty käänteiskopioitumaan itseksensä genomien DNA:ksi.

6.1 Yleiset menetelmät

6.1.1 Solut

Ihmisen hepatoomasolulinja HuH7 (Nakabayaski et al., (1982) Cancer Res. 42, 3858 - 3863) oli saatu Dr C. Koikilta (Department of Gene Research, CancMer Institute, Tokyo, Japan) ja sitä kasvatettiin ravintoliuoksessa Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM):F12 (GIBCO, Grand Island, NY) plus 10 % naudan sikiön seerumia (FBS).

Hepatosyytit primääristen ankan hepatosyyttiviljelmien perustamiseksi eristettiin kaksiviikkoisten Pekingin ankkojen (saatu Dr. W. Masonilta, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA) maksoista kollagenaasiperfuusiolla (Tuttleman et al., (1986) J. Virol. 58, 17 - 25). Primäärisiä hepatosyyttejä kasvatettiin seerumittomassa L15 - ravintoliuoksessa (GIBCO, Grand Island, NY), johon oli lisätty 10 mM natriumbikarbonaattia, 1,5 tilavuus-% dime-tyylisulfoksidia, 5 % FBS:a ja jota oli täydennetty aiemmin kuvatuilla aineilla (Tuttleman et al., edellä). Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 tilavuus-% CO₂.

6.1.2 Plasmidit

Vaillinaisten DHBV-genomien konstruktiossa käytetyt DHBV-jaksot saatiin pSP65-plasmidivektorin EcoR I -katkaisukohtaan kloonatusta DHBV-genomin DNA:sta, p5.2 Galx1:sta, joka oli johdettu Mandart'in et al. DHBV-DNA:n nukleotidijärjestyksen määrittämiseen (Mandart et al., (1984) J. Virol. 49, 782 - 792) käyttämän virionin DNA-kloonista.

6.1.3 DNA:n valmistus, restriktio ja modifikaatio

Restriktioentsyymit, T4-DNA-ligaasi, T4-DNA-polymeraasi ja E. coli DNA-polymeraasin Klenow -fragmentti hankittiin yhtiöstä New England Biolabs (Beverly, MA). Näillä entsyymeillä suoritettavat reaktiot suoritettiin valmistajan ehdottamissa olosuhteissa, ellei toisin ole mainittu.

Restriktioentsyymikäsittelyn jälkeen DNA-fragmentit erotettiin ja puhdistettiin geelielektroforeesissa 5-%:ssa polyakryyliamidigeelissä TBE-puskurissa (0,01 M Tris-boraatti, pH 8,2 1 mM EDTA) tai 0,8 % tai 1,5 % agarosigeeleissä Tris-asetaatipuskurissa (0,02 M Tris-asetatti, 0,005 M natriumasetatti, 1 mM EDTA, pH 7,4). DNA-fragmentit visualisoitiin ultraviolettivalossa negatiivisella varjostumisella PEI(polyetylenei-imiini)-ohutlevykromatografialevyn päällä tai geelien etidiumbromidivärjäyksellä. DNA-fragmentit otettiin talteen alhaisessa sulamispisteessä sulavista agarosigeeleistä uuttamalla nesteytetty geeli fenolilla.

Oligonukleotidit syntetitoitiin 0,2 mikromoolimit-takaavassa Applied Biosystems Inc. mallin 380B synteesilaitteessa käyttäen beta-syaanietyylifosforiamidiittikemi-aa (Sinha et al., (1984) Nucl. Acids Res. 12, 4539 - 4544). Oligonukleotidit erotettiin ja puhdistettiin geelielektroforeesissa käyttäen polyakryyliamidi/8 M ureageeliä TBE-puskuriliuoksessa ja visualisoitiin sitten ultraviolettivalossa negatiivisella varjostumisella PEI(polyetylenei-imiini)-ohutlevykromatografialevyn päällä. Oligonukleotidit otettiin talteen elektroeluutiolla huoneenlämmössä 2 tunnin ajan 200 V:n jännitteellä TBE-puskuriliuoksessa.

25 6.2 Partikkelien suhteen vaillinaisten DHBV-genomien konstruktio

Partikkelien suhteen vaillinainen DHBV-genomi, joka sisältää deleetioita polymeraasi- ja pinta-antigeenejä (ts. vaippaa) koodaavien geenien (pol⁻, env⁻) alueella, muodostettiin pilkkomalla villityypin genomi Kpn I:lla, käsittelemällä T4-DNA-polymeraasilla kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa ja sulkemalla plasmidi T4-DNA-ligaa-silla (ks. kuvio 1b). Mutatoitu pol⁻env⁻core⁻-DNA (josta käytetään nimitystä Kpn⁻Sph⁻) (kuvio 1b), jossa on deleetioita kaikissa kolmessa viruksen geenissä, tuotettiin pilk-

komalla DHBV-genomi ensin Kpn I:lla, josta oli tuloksena Kpn I -katkaisukohdan häviäminen ja Kpn⁻-genomin muodostuminen. Kpn⁻-genomi pilkottiin tämän jälkeen Sph I:lla, ja sitten, kuten edellä, tämä käsiteltiin T4-DNA-polymeraasilla kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa. Plasmidi suljettiin sitten T4-DNA-ligaasilla.

pol⁻-Mutanttigenomi (josta käytetään merkintää RV⁻ 718) tai core⁻-mutanttigenomi (josta käytetään merkintää RV⁻2650) (kuvio 1b) muodostettiin villityyppisen genomin osittaisella pilkkomisella EcoRV:lla. Tämän suorittamiseksi pilkottiin 5 µg villityyppistä DHBV-DNA:a 2 yksiköllä EcoRV:a 15 minuutin ajan 37 °C:ssa. Osittaisen pilkkomisen jälkeen seurasi inkubointi T4-DNA-polymeraasireaktioseoksessa vain dGTP:n läsnäollessa.

Kaikki partikkelien suhteen vaillinaiset DHBV-genomit dimerisoitiin toisella kahdesta strategiasta. Ensimmäisessä käytettiin osittaista EcoR I -pilkkomista, jossa 5 µg DHBV-DNA:a pilkottiin 2 yksiköllä EcoR I:a 15 minuutin ajan 37 °C:ssa plasmidin linearisoimiseksi toisen genomin molemmissa päissä sijaitsevan kahden EcoR I -katkaisukohdan kohdalta. Linearisoidut DNA:t tunnistettiin 1-%:sissa agarosigeeleissä etidiumbromidin fluoresenssia hyväksikäyttäen ja otettiin talteen elektroeluutiolla TBE-puskuriliuoksessa 2 tunnin ajan 150 V:n jännitteellä. Eristetty linearisoitu plasmidi käsiteltiin sitten bakteeriperäisellä alkaalisella fosfataasilla ja liitettiin vastaaviin EcoR I:lla pilkottuihin monomeerigenomeihin, jotka oli puhdistettu 5-%:sissa denaturoimattomassa polyakryyliamidigeelissä. Toisessa dimerisointistrategiassa käytettiin EcoR I:lla pilkotun, geelissä puhdistetun monomeerin liittämistä 3 - 10-kertaisena ylimääränä pSP65-DNA:han, joka oli käsitelty EcoR I:lla ja bakteeriperäisellä alkaalisella fosfataasilla. Villityyppiset dimeeriset plasmidit voidaan valmistaa jommalla näistä

kahdesta menetelmästä villityyppisestä HBV- tai DHBV-genomin DNA:sta.

Plasmidiin pSP65 kloonattu vaillinainen DHBV-genomi amplifioitiin transformaatiolla E. coli HB101-soluihin. Dimeeriset kloonit tunnistettiin tämän jälkeen plasmidien DNA:n restriktioanalyysillä.

6.3 DHBV:n pakkauskkyisten genomien konstruktio

DR1:n deleetion sisältävä DHBV:n genomi, josta käytetään merkintää Δ DR1-genomi (ks. kuvio 1c), tuotettiin liittämällä ensin BamH I -katkaisukohdan (nukleotidin numero 1658 kohdalla) ja EcoR I -katkaisukohdan (nukleotidin numero 3021 kohdalla) väliin sisältyvän villityyppisen genomin distaalinen osa pBR322-johdannaiseen, josta puuttui Acc I -restriktiokohta. Tämä suoritettiin pilkkomalla Acc I:lla, täyttämällä Klenow -entsyymillä, ja liittämällä yhteen T4-ligaasilla, jonka seurauksena oli pBR322:n nukleotidinumeroiden 651 ja 2246 välisen jakson deleetio. Yhdistelmäplasmidista katkaistiin seuraavaksi pois osa DR1-alueen (nukleotidinumerot 2535 - 2546) sisältävää villityyppistä DHBV-genomia käyttäen entsyymejä Afl II ja Acc I (vastaten katkaisukohtia nukleotidinumeroiden 2526 ja 2577 kohdalla) ja tämä korvattiin kaksinauhaisella synteettisellä DNA-segmentillä, josta täsmälleen puuttuivat ne 12 emäsparia, jotka käsittävät DR1:n. Viimeisenä vaiheena liitettiin DHBV:n genomin proksimaalinen osa (nukleotidinumerot 0 - 1658), johon sisältyivät etupäässä olevat viereiset plasmidijaksot, vain kertaalleen esiintyvään BamH I -katkaisukohtaan BamH I -fragmenttina.

Δ DR1-genomi, samoin kuin heikennetyt DHBV-genomit, dimerisoitiin käyttäen jompaa kumpaa kahdessa kohdassa 6.2 pääpiirteittäin esitetystä strategiasta. Plasmidiin pSP65 kloonattu Δ DR1-genomi amplifioitiin transformoimalla E. coli HB101-soluihin. Dimeeriset kloonit tunnistettiin uuden Hinf I -katkaisukohdan ilmestymisestä DR1-deleetion kohdalle.

6.4 Vaillinaisten DHBV-genomien ilmentäminen

Sekä partikkelien suhteen vaillinaisen että pakkauskykyinen DHBV-genomin DNA (3 µg) transfektoitiin HuH7-soluihin kalsiumsaostusmenetelmällä (Graham ja van der Eb, 1973, Virology 52, 456 - 467). Viiden päivän jälkeen sekä partikkelien suhteen vaillinaisen että pakkauskykyisen genomien HBV-DNA:n ilmentymistä tarkasteltiin HBcAg:n ja/tai HBsAg:n esiintymisen suhteen. Solut kiinnitettiin -20 °C:n lämpötilassa liuoksessa 95 tilavuus-% etanolia:5 tilavuus-% jääetikkaa. HBcAg ja HBsAg havaittiin epäsuoralla immunofluoresenssilla käyttäen kanin antiseerumia HBcAg:a tai HBsAg:a vastaan (saatu Dr. W. Masonilta, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA) ja rodamiinilla konjugoitua vuohen anti-kani IgG:a (Tuttleman *et al.*, 1986) J. Virol. 58, 17 - 25).

6.4.1 Partikkelien suhteen vaillinaisten DHBV-genomien ilmentäminen

Ydinantigeenia koodaavilla alueilla olevia deleetioita (kuvio 2, RV⁻2650) sisältävän partikkelien suhteen vaillinaisen DHBV-DNA:n ydinantigeenien tuoton puuttuminen vahvistettiin immunofluoresenssivärjäyksellä (ks. kuvio 2). Immunofluoresenssivärjäystä käytettiin myös vahvistamaan se, että pinta-antigeenien tuotto puuttui partikkelien suhteen vaillinaiselta DHBV-DNA:lta, jossa oli deleetioita pinta-antigeenia ja polymeraasiproteiinia koodaavilla alueilla (Kpn⁻-DNA) ja sellaisilta, joilla oli deleetioita ydinantigeenia, pinta-antigeenia ja polymeraasiproteiinia koodaavilla alueilla (Kpn⁻Sph⁻-DNA). RV⁻2650 mutatoitu DNA pystyi tuottamaan pinta-antigeenia, kun taas partikkelien suhteen vaillinaisen DHBV, jossa oli deleetioita polymeraasiproteiinia koodaavalla alueella, ja Kpn⁻-genomi kykenivät odotetusti tuottamaan nukleokapsidi-(ydin-) proteiineja. Kpn⁻Sph⁻ koodaa sekä lyhentynyttä pinta-antigeenia että lyhentynyttä ydinantigeenia, jotka eivät ole havaittavissa immunofluoresenssilla.

6.4.2 Pakkauskyykyisten genomien ilmentäminen

Kuten yllä on kuvattu, pakkauskyykyisestä genomista on poistettu spesifinen virusjakso, 12 emäsparin suora toistuma, jota nimitetään DR1:ksi, jota tarvitaan kaksinauhaisen virus-DNA:n täydellistä synteesiä varten. Pakkauskyykyinen genomi transfektoitiin HuH7-soluihin kalsiumfosfaattisaostusmenetelmällä (Graham ja van der Eb, 1973, Virology 52, 456 - 467). Viisi päivää transfektion jälkeen solut pestiin HBS:lla (12 mM Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,45) ja 1 ml hajotuspuskuria (10 mM Tris-hydrokloridia (pH 7,9), 1 mM EDTA, 0,1 paino-% NP-40, 50 mM NaCl ja 8 paino-% sakkaroosia) lisättiin suoraan solujen päälle. 10 minuutin inkuboinnin jälkeen 37 °C:ssa hajotusseos poistettiin ja sentrifugoitiin 13000 kierroksen minuuttinopeudella Beckmanin B-mallisessa mikrosentrifugissa tumien ja muun liukenemattoman aineksen kokoamiseksi napiksi. Viruksen ydinpartikkelit, jotka sisältävät kaikki DHBV-DNA-synteesin välivaiheet, eristettiin sitten seuraavalla menetelmällä. Supernatantti poistettiin ja siihen lisättiin magnesiumasetaattia ($MgAc_2$) siten, että lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 6 mM. Lisättiin deoksiribonukleaasi I:a (DNase I - Sigman tyyppi II) 100 µl:n liuoskoostumukseen, jossa oli 50 mM Tris-hydrokloridia (pH 7,9) 6 mM $MgAc_2$ ja 100 µg/ml DNAasi I:a. Sen jälkeen, kun suspension pilkkoutuminen oli jatkunut 10 minuuttia 37 °C:ssa, virusytimet saostettiin lisäämällä polyetyleeniglykoli-8000:a plus 0,5 M NaCl. Saostuma otettiin talteen sentrifugoimalla 4 °C:ssa mikrosentrifugissa ja liuotettiin 0,3 ml:aan puskuriliuosta, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 M NaCl plus 100 µg DNAasi I:a. Kun reaktio oli jatkunut 30 minuuttia 37 °C:ssa, reaktioseosta säädettiin siten, että se sisälsi 15 mM EDTA, 0,5 % SDS ja 500 µg/ml pronaasia. Kun inkubaatiota oli kestänyt 30 min 37 °C:ssa, uutettiin näyte samalla tilavuudella fenolia. Nukleiinihapot saostettiin vesipitoisesta jakeesta etanolilla, liuotettiin

liuokseen, jossa oli 10 mM Tris-hydrokloridia (pH 7,5) ja 1 mM EDTA ja niille suoritettiin elektroforeesi 1,5-%:ssa agarosigeelissä käyttäen olosuhteita, jotka on kuvattu artikkelissa Tuttleman et al. (1986, J. Virol. 58, 17 - 25). Elektroforeesin jälkeen geeliä liotettiin 30 minuutin ajan liuoksessa, jossa oli 0,2 N NaOH ja 1,5 M NaCl, ja siirrettiin sitten nylonkalvolle (Hybond N, Amersham) liuoksessa, jossa oli 0,2 M Tris-hydrokloridia (pH 4,0) ja 1,5 M NaCl Southern-blottausmenetelmällä (Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98, 503 - 517). Siirron jälkeen suodatin pestiin nopeasti 2 x SSC:ssa ja kuivattiin sitten ilmassa ja valotettiin ultraviolettivalolähteellä (240 - 390 nm) 5 minuutin ajan DNA:n sitomiseksi kovalenttisesti kalvoon. Kalvo hybridisoitiin 50 °C:ssa ³²P-leimatulla DHBV-ribonukleotidikoettimella, jolla oli plus-nauhan polariteetti. Autoradiografia suoritettiin -80 °C:ssa Kodakin XOMAT AR-filmillä ja vahvistusverkolla.

Tulokset, jotka on esitetty kuviossa 3, kanava 5, viittaavat siihen, että tämä mutantti-DNA ei tuota täydellistä relaxoitunutta rengasmaista DNA:a (RC), vaikka muodostuukin jonkin verran yksinauhaista minus -nauhan DNA:a (SS). Vertailun vuoksi esitetään kanavassa 3 samalla vililytyypin virus-DNA:n määrällä transfektoitujen solujen tuottamat lisääntymisvaiheiden välimuodot.

Näistä transfektioista saaduista soluista määritettiin viruksen vaippa- ja nukleokapsidiproteiinien tuotto kiinnitetyille soluille suoritettulla epäsuoralla immunofluoresenssivärjäyksellä (kuvio 4). ΔDR1-transfektoidut solut näyttävät tuottavan yhtä suuria ydin- (c-) ja pinta- (S-)antigeenin määriä, jotka ovat samansuuruisia kuin vililytyypin tuottamat.

6.5 DNA-synteesissä tarvittavien viruksen toimintojen komplementaatio ΔDR1:lla

Testattiin ΔDR1:n kykyä komplementoida rinnakkais-transfektiokokeissa tunnettuja virus-DNA:n synteesissä

tarvittavia viruksen toimintoja. Yhdessä pakkauskykyisen genomien, Δ DR1:n, kanssa transfektoitiin HuH7-soluihin rinnakkain yksinkertaisia lukuvaiheistuksen siirtomutaatioita sisältäviä DNA-molekyylejä, joissa oli vaillinainen ydin-antigeeni (RV⁻2659), viruksen polymeraasi (RV⁻718) ja sekä viruksen DNA-polymeraasi että pinta-antigeenin synteesi (Kpn⁻) sekä mutantti-DNA-molekyylejä, jotka eivät kyenneet syntetisoimaan mitään tunnetuista viruksen proteiineista (Kpn⁻Sph⁻; ks. kuvio 1b). Kaikissa tapauksissa Δ DR1 kykeni komplementoimaan näitä vaillinaisia genomeja täydellisen relaxoituneen rengasmaisen viruksen DNA:n tuottamiseksi (ks. kuviot 3 ja 5).

Osoitettiin lisäksi, että nämä partikkelien suhteen vaillinaiset genomit voivat myös komplementoida toisiaan. Kun esimerkiksi core⁻-mutantti-DNA transfektoitiin rinnakkain joko pol⁻-mutantti- tai Kpn⁻-DNA:n kanssa, se kykeni komplementoimaan näitä DNA-molekyylejä virus-DNA:n tuottamiseksi (kuvio 5, kanavat 7 ja 9).

6.6 Transfektoitujen HuH7-solujen infektoivien virionien tuotto ja DR1:llä, Kpn⁻:llä ja Kpn⁻Sph⁻:lla transfektoitujen solujen supernatanttien infektiivisyyden puute

Viljellyt ihmisen HuH7-hepatoomasolut voivat tuottaa virioneita, jotka voivat infektoida primäärisiä ankan hepatosyyttejä. Kooltaan 100 mm:n suuruiselle maljalle vietiin viljelyn aloittamiseksi noin 5×10^6 HuH7-solua ja nämä transfektoitiin 24 tunnin kuluttua 1,5, 3 ja 6 μ g:lla villityypistä, kloonnattua ja dimeeristä DHBV-DNA:a. Kun transfektioista oli kulunut 48 tuntia, vaihdettiin kasvatusliuos (DMEM:F12 + 10 % FBS) (GIBCO, Grand Island, NY) tuoreeseen liuokseen ja kolmen päivän jatkoinkuboinnin jälkeen kasvatusliuos poistettiin soluista ja jaettiin tasan 48 tuntia etukäteen valmistettuihin, ankan primäärisiä hepatosyyttejä sisältäviin, 3 x 60 mm suuruisiin maljoihin. Hepatosyyttejä infektoitiin 20 tuntia 37 °C:ssa

HuH7-kasvatusliuoksessa. Solut koottiin talteen artikkelissa Tuttleman et al. (1986, J. Virol. 58, 17 - 25) kuvatulla tavalla 12 päivää infektion jälkeen ja solunsisäinen kokonais-DNA analysoitiin DHBV-DNA:n lisääntymisvaiheiden välimuotojen esiintymisen suhteen Southern -blottaushybridisoinnilla (ks. kohta 6.4.2). Kuviosta 6 nähdään, että viljelmissä esiintyy virus-DNA:a, joka viittaa siihen, että infektoivaa virusta on ollut HuH7-viljelmien supernatanteissa. Pelkästään Δ DR1-DNA:lla tai pelkästään Kpn^- - tai Kpn^-Sph^- -mutantti-DNA-molekyyleillä transfektoitujen solujen supernatanteista ei voitu osoittaa lisääntymisvaiheiden välimuotojen esiintymistä (kuvio 6). Näinollen HuH7-solut kykenevät tuottamaan infektiokykyistä DHBV:ä villityyppisestä kloonatusta DHBV-DNA:sta ja odotetusti nämä solut eivät kyenneet tuottamaan infektoivaa virusta Δ DR1, Kpn^- - tai Kpn^-Sph^- -mutantti-DNA-molekyyleistä, koska nämä mutantit ovat lisääntymisensä suhteen vaillinaisia.

6.7 Infektoivien virionien tuotto solujen rinnakkaistransfektion jälkeen Δ DR1-genomilla ja partikkelien suhteen vaillinaisella genomilla

Infektoivien virioneiden tuoton tutkimiseksi soluista, jotka on transformoitu rinnakkain sekä pakkauskykyisellä genomilla että partikkelien suhteen vaillinaisella genomilla, konstruoitiin vielä yksi partikkelien suhteen vaillinainen genomi, jolle annettiin merkintä S1. S1-genomi suunniteltiin erityisesti olemaan vaipan tuoton suhteen vaillinainen, mutta kuitenkin DNA:n synteessin suhteen täysin kompetentti (esim. env⁻pol⁻). Polymeraasitoiminto säilytettiin S1-mutantissa, jotta viruksen DNA:n lisääntyminen paranisi ja viruksen geenituotteiden tuotanto olisi suhteellisesti korkeampaa verrattuna partikkelien suhteen vaillinaiseen genomiin, jossa sekä vaippa- että polymeraasitoiminnot ovat vaillinaisia (esim Kpn^-).

Partikkelien suhteen vaillinainen genomi S1 valmistettiin villityyppisestä DHBV:n genomien DNA:sta (kohta

6.1.2) korvaamalla villityyppisen jakson nukleotidiasemien 1290 ja 1358 välinen Kpn I - Xba I -fragmentti vastaavan-
 kokoisella synteettisellä kytkijällä. Synteettinen kytki-
 jä sisälsi spesifiset nukleotidien substituuotiot asemien
 5 1326 ja 1350 välissä kuten kuviossa 8(a) on esitetty. S1:n muodostamiseksi villityyppiseen jaksoon tehdyt eri-
 tyiset, kuviossa 8(a) esitetyt mutaatiot luovat lopetusko-
 donin vaipan avoimeen lukuvaiheistusjaksoon muuttamatta
 10 limittäin olevan polymeraasin avoimen lukuvaiheistusjakson
 aminohappokoodausta. Partikkelien suhteen vaillinaisen
 1S-genomin plasmidimuoto, jolle on annettu merkintä
 pSPDHV.1S, konstruotoitiin dimerisoimalla 1S-genomi pSP65-
 vektorissa käyttäen kohdassa 6.2 kuvattuja menetelmiä.

Dimeerin sisältävä plasmidi pSPDHBV.1S transfektoi-
 15 tiin HuH7-soluihin (kohta 6.1.1) kalsiumsaostuksella. Transfektoiduista soluista määritettiin viruksen lisäänty-
 misvaiheen välimuodot Southern -blottaushybridisoinnilla
 käyttäen kohdassa 6.4.2 kuvattuja menetelmiä ja tulokset
 on esitetty kuviossa 8(b), kanavat 1 ja 2. Kuten kuvion
 20 8(b) kanavista 1 j 2 näkyy, vaillinaisella 1S-genomilla
 transfektoidut HuH7-solut sisältävät oleellisesti villi-
 tyyppiset tasot sekä relaxoitunutta rengasmaista (RC)
 että yksinauhaista (SS) virus-DNA:n lisääntymisvaiheiden
 välimuotoa. Transfektoitujen HuH7-solujen (esittämätön)
 25 immunovärjäysanalyysissä ilmeni, että ydinantigeeniä akku-
 muloitui ja havaittavaa pinta-antigeenia ei esiintynyt.

Sen johdosta, että havaittavat pinta-antigeenitasot
 puuttuvat 1S:lla transfektoiduista HuH7-soluista, eivät
 transfektantit kykene tuottamaan infektoivia viruspartik-
 30 keleita. Infektoivien partikkelien puuttuminen 1S:lla
 transfektoitujen HuH7-solujen supernatanteista vahvistet-
 tiin ottamalla talteen supernatantit viljellyistä trans-
 fektanteista ja käyttämällä niitä infektoimaan primäärisiä
 ankan hepatosyyttejä (kohta 6.1.1). Kun infektoiduista
 35 ankan hepatosyyttiviljelmistä määritettiin Southern -blot-

taushybridisoinnilla viruksen lisääntymisvaiheiden välimuodot, ei viruksen DNA:a havaittu lainkaan. Kuvio 8(b), kanava 5.

Jotta vahvistettaisiin vaillinaisen 1S-genomin komplementaatio pakkauskykyisellä genomilla Δ DR1:llä, Δ DR1-plasmididimeeri (kohta 6.3) transfektoitiin rinnakkain plasmidin pSPDHBV.1S:n kanssa HuH7-soluihin. Kolmen päivän kuluttua kasvatusliuos otettiin talteen ja sitä käytettiin infektoimaan primäärisiä ankan hepatosyyttiviljelmiä. Infektoidut ankan hepatosyyttiviljelmät kerättiin talteen 12 päivän kuluttua infektiosta ja solunsisäisestä kokonais-DNA:sta määritettiin Southern -blottaushybridisoinnilla (kohta 6.4.2) DHBV:n lisääntymisvaiheiden välimuotojen esiintyminen. Kuten kuvion 8(b) kanavasta 7 näkyy, infektoiduissa ankan hepatosyyteissä voitiin havaita uuden virus-DNA:n synteesiä sekä relaxoituneina rengasmaisina että yksinauhaisina virus-DNA-muotoina. Infektoidujen ankan hepatosyyttien solukerrostien immunovärjäyksessä ydinantigeenin esiintymisen suhteen (kuvio 9) ilmeni, että havaittavan ydinantigeenin esiintymistasot olivat yhtä suuria tai suurempia kuin villityyppisellä DHBV:llä infektoiduissa kontrollisoluissa havaitut tasot. Saman solupopulaation immunovärjäyksessä anti-vaippa-antiseerumilla ei kyetty havaitsemaan yhtään havaittavaa pinta-antigeenia, mikä on yhdenmukaista 1S-genomin env⁻-genotyyppin suhteen. Tulokset osoittavat, että Δ DR1-genomi voi tuottaa trans-asemasta käsin vaikuttaa vaippatoimintoa, joka puuttuu partikkelien suhteen vaillinaisesta 1S-genomista ja että HuH7-solut kykenevät tuottamaan infektoivia partikkeleita sekä partikkelien suhteen vaillinaisen genomien että pakkauskykyisen genomien rinnakkaistransfektion jälkeen. Saadut infektiokykyiset partikkelit kykenevät infektoimaan ankan primäärisiä hepatosyyttejä viruksen lisääntymisvaiheiden välimuotojen tuottamiseksi ankan hepatosyyteissä.

6.8 Villityyppisen viruksen tuoton häiritseminen

Jotta DHBV:n yhdistelmägenomit voisivat toimia vektoreina heterologisten DNA-molekyylien transduktiota varten, täytyy vaillinaisessa transduktiokykyisessä genomissa esiintyä DHBV:n jaksoja, joita tarvitaan transkriptiossa, pakkauksessa ja vektorin esigenomin käänteiskopioinnissa. Koska mutanttigenomeja pol^-env^- (Kpn^-), $pol^-env^-core^-$ (Kpn^-Sph^-), pol^- ja $core^-$ voidaan komplementoida trans-asemasta käsin $\Delta DR1$:n DNA-synteesiä varten, niiden täytyy sisältää nämä tarpeelliset jaksot. Kuitenkin jotkin näistä jaksoista, jotka ovat viruksen avoimissa lukuvaiheistusjaksoissa, näyttävät häiritsevän villityyppisen viruksen DNA:n ja infektoivien partikkelien synteesiä dominoivalla tavalla. Esimerkki tästä häirinnästä on kuviossa 3 (kanavat 1 ja 2 tai 3 ja 4). Kun Kpn^-Sph^- mutantti-DNA transfektoidaan HuH7-soluihin rinnakkain villityyppisen DNA:n kanssa käyttäen kohdassa 6.6 kuvattuja menetelmiä, viruksen DNA-synteesi suppressoituu noin 20-kertaisesti. Havaitsimme myös, että myös immunofluoresenssivärjäyksellä havaittava ydinantigeenin tuotto suppressoituu. Kun näiden rinnakkaistransfektoidien kasvatusliuoksista analysoitiin primääristen ankan hepatosyyttien infektointikyky, havaitsimme Kpn^-Sph^- + villityypin rinnakkaistransfektioissa soluista vapautuneiden infektiokykyisten virusten tiittereiden vahvan alenemisen verrattuna villityypillä transfektoituihin soluihin (kuvio 7, kanavat 1 ja 2 verrattuna kanaviin 5 ja 6). Samanlainen, mutta heikompi vaikutus voitiin nähdä Kpn^- -mutanttigenomilla (kuvio 7, kanavat 1 ja 2 verrattuna kanaviin 3 ja 4). Joidenkin mutantti-DNA-molekyylien aiheuttama häiriö villityyppisen viruksen lisääntymisessä voi olla selityksenä siihen, miksi havaitsimme eroja niissä tehokkuuksissa, joilla eri mutantteja voidaan komplementoida.

7. λ -DHBV-rekombinanttien muodostaminen

Näissä yksityiskohdittain esitetyissä esimerkeissä kuvaamme heterologisia geenijaksoja sisältävien DHBV-yhdistelmägenomien muodostamisen, ilmentämisen ja pakkauksen. Tehtiin deletio DHBV:n genomin sille alueelle, joka koodaa pinta-antigeeni- ja viruksen polymeraasiproteiineja. Erikokoisia bakteriofaagi λ :n genomin DNA-fragmentteja liitettiin sitten tähän alueeseen.

7.1 Yleiset menetelmät

7.1.1 Solut

Ihmisen hepatoomasolulinja HuH7 (Nakabayashi *et al.*, (1982) Cancer Res. 42, 3858 - 3863) oli saatu Dr C. Koikilta (Department of Gene Research, Cancer Institute, Tokyo, Japan) ja sitä kasvatettiin (DMEM):F12-kasvatusliuoksessa (tilavuussuhteessa 1:1) (GIBCO, Grand Island, NY) plus 10 % (FBS).

7.1.2 DNA:n valmistus, restriktio ja modifikaatio

λ -rekombinanttien konstruktion käyttetyt DHBV-jaksot saatiin DHBV:n genomin DNA:sta, joka oli kloonattu pSP65-vektoriplasmidiin EcoR I -katkaisukohtaan. λ :n Genomin DNA hankittiin yhtiöstä New England Biolabs, (Beverly, MA). Restriktioentsyymit, T4-DNA-ligaasi, T4-DNA-polymeraasi ja *E. coli* DNA-polymeraasi I:n Klenow -fragmentti hankittiin yhtiöstä New England Biolabs, (Beverly, MA). Näillä entsyymeillä suoritettut reaktiot suoritettiin valmistajan ehdottamissa olosuhteissa, ellei toisin ole mainittu.

Restriktioentsyymillä suoritettun pilkkomisen jälkeen DNA-fragmentit erotettiin ja puhdistettiin geelielektroforeesilla 5-%:ssa polyakryyliamidigeelissä TBE-puskurissa (0,01 M Tris-boraatti, pH 8,2 1 mM EDTA). DNA-fragmentit visualisoitiin ultraviolettivalossa negatiivisella varjostumisella PEI(polyetylenei-imiini)-ohutlevykromatografialevyn päällä. DNA-fragmentit otettiin tal-

teen elektroeluutiolla 2 tunnin ajan 150 V:n jännitteellä TBE-puskuriliuoksessa.

7.2 λ -DHBV-rekombinanttien konstruktio

λ -DHBV-rekombinantit muodostettiin deletoimalla
 5 polymeraasiproteiinia ja pinta-antigeenia koodaavat jaksot pilkkomalla villityyppinen DHBV-genomi Kpn I:lla. Linea-
 risoitu plasmidi täytettiin E. colin DNA-polymeraasi I:n
 Klenow -fragmentilla. Bakteriofaagi λ :n fragmentit lii-
 tettiin tämän jälkeen plasmidiin (nukleotidinumeron 1290
 10 kohtaan) T4-DNA-ligaasilla. λ -DHBV-rekombinanteille,
 jotka sisälsivät 180 ep.:n Hae III - λ -fragmentin tai
 1000 ep.:n Hae III - λ -fragmentin, annettiin vastaavat
 merkinnät Kpn^-+180 ja Kpn^-+1000 .

λ -DHBV-rekombinantti dimerisoitiin partikkelien
 15 suhteen vaillinaisten DHBV-genomien ja Δ DR1-mutant-
 tain käyttäen jompaa kumpaa kahdesta kohdassa 6.2 pääkoh-
 dittain esitetystä strategiasta. plasmidiin SP65 kloonat-
 tu λ -DHBV-rekombinantti monistettiin transformoimalla se
E. coli HB101-soluihin. Dimeerikloonit tunnistettiin tä-
 20 män jälkeen plasmidi-DNA-molekyylien restriktioanalyysil-
 la.

7.3 Yhdistelmä- λ -DHBV-genomien ilmentäminen

Yhdistelmä- λ -DHBV-genomit ilmennettiin rinnakkais-
 transfektoimalla λ -DHBV-genomit yhdessä pakkauskykyisen
 25 Δ DR1-genomin kanssa HuH7-soluihin kalsiumfosfaattisaostus-
 menetelmällä (Graham ja van der Eb, 1973, Virology 52,
 456 - 467). λ -DHBV-rekombinantin ilmentymistä seurattiin
 Southern-blottaushybridisoinnilla käyttäen kohdassa 6.4.2
 kuvattuja menetelmiä. Kuten kuvion 3 kanavasta 8 voidaan
 30 nähdä, $\lambda(Kpn^-+180)$:n 180 ep.:n fragmentin sisältävä λ -
 DHBV-rekombinantti pakattiin virioneihin, mutta pakkaus
 tapahtui tasolla, joka oli 50-kertaisesti pienempi kuin
 Kpn^- -mutantissa. $\lambda(Kpn^-+1000)$:n 1000 ep.:n Hae III -frag-
 mentin sisältävää λ -DHBV-rekombinanttia ei pakattu (ks.
 35 kuvio 3, kanava 7). Nämä tulokset viittaavat siihen, että

genomin pakkauksessa on kokorajoitus ja että lisäksi tässä järjestelmässä pakattavalla genomilla on nähtävästi tiukkarajainen, noin 3000 ep.:n maksimikoko. Suurempien heterologisten fragmenttien liittämiseksi tulisi deletoida suurempia DHBV-jaksoja ja/tai DHBV-DNA tulisi kloonata muihin vektoreihin, joissa kokorajoitukset olisivat väljempää.

8.0 Vaillinaisen hepadna-viruksen tuottoon kykenevien pysyvien solulinjojen valmistus

Lyhytaikaisia ilmentymisjärjestelmiä rajoittavat niille ominaiset rajoitukset, ensisijaisesti transfektio-
tehokkuus. Tästä syystä on haluttua liittää yksi tai useampia tämän keksinnön mukaisia hepadna-viruksen genomeja pysyviin, kestävästi transfektoituihin solulinjoihin.
Kestävästi transfektoitu pysyvä solulinja, joka sisältää oikean geneettisen informaation, pystyy tuottamaan viruspartikkeleita olennaisesti jatkuvalla tavalla.

Tämän keksinnön piiriin kuuluvat pysyvät solulinjat, jotka on kestävästi transfektoitu hepadna-viruksen pakkauskykyisellä genomilla, jotta saadaan "pakkauskykyinen solulinja". Pakkauskykyinen solulinja on transfektoitu kestävästi geneettisellä informaatiolla, jolla huolehditaan trans-asemasta käsin vaikuttavasta viruksen sellaisten toimintojen komplementaatiosta, joita pakkauskykyiseen solulinjaan transfektoitu toinen vaillinainen hepadna-viruksen genomi tarvitsee. Täsmällisemmin ilmaistuna partikkelien suhteen vaillinaisen genomin transfektios-
ta pakkauskykyiseen solulinjaan seuraa "pakkauskykyisen" genomin tarvitsemien, trans-asemasta vaikuttavien sellaisten avustavien toimintojen ilmaantuminen, jotka tekevät mahdolliseksi soluun tuodun genomin pakkaamisen ja käänteiskopioinnin infektiokykyisten, partikkelien suhteen vaillinaisen genomin sisältävien vaillinaisten viruspartikkelien tuottamiseksi. Pakkauskykyisessä solulinjassa esiintyvä pakkauskykyinen genomi ei pysty palauttamaan

itseään takaisin infektiokykyisten partikkelien muodossa, koska pakkauskykyisistä genomeista puuttuvat cis-asemasta käsin vaikuttavat signaalit, joita tarvitaan sen omaan lisääntymiseen kaksinauhaiseksi DNA:ksi.

5 Partikkelien suhteen vaillinaisia hepadna-virusgenomeja, joissa on heterologinen geenijakso, (kohta 5.2), voidaan samalla tavalla lisätä ja saada talteen infektiokykyisten viruspartikkelien muodossa tämän genomien pakkauskykyiseen solulinjaan viemisen ja partikkelien suhteen
10 vaillinaisen genomien tarvitsemien toimintojen komplementaation jälkeen.

Tämä keksintö liittyy lisäksi yhden tai useamman vaillinaisen hepadna-virusgenomin kestävästi sisältävien pysyvien solulinjojen tuottoon tai käyttöön ja näiden solulinjojen käyttöön vaillinaisten hepadna-viruspartikkelien muodostamiseksi. Tarkemmin ilmaistuna, tuottajasolulinja voi sisältää sekä pakkauskykyisen genomien että partikkelien suhteen vaillinaisen genomien, jotka ovat liittyneet tähän kestävästi. Tuottajasolulinja kykenee pakkaamaan ja tuottamaan pakattuja partikkelien suhteen vaillinaisia genomeja oleellisen jatkuvasti ja poistaa toistuvien transfektioiden tarpeen.

Kaikkien infektiokykyisiä vaillinaisten genomien partikkeleita pakkaamaan ja tuottamaan kykenevien solulinjojen tapauksessa ovat partikkelit otettavissa talteen viljeltyjen transfektoitujen solujen supernatantista tunnettuja menetelmiä käyttäen.

8.1 Menetelmät

8.1.1 Solut

30 HepG2 on ihmisen hepatoomasolulinja, joka on saatavilla monissa laboratorioissa. HepG2-soluissa ovat säilyneet monet morfologiset piirteet, jotka ovat luonteenomaisia primäärisille hepatosyyteille. HepG2-linjan on aiemmin osoitettu kykenevän tuottamaan villityyppistä virusta
35 villityyppisen HBV-DNA:n dimeerisellä muodolla. Ks. esim.

Sells et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1005. Tähän mennessä tehtyjen määritysten perusteella HepG2-solulinja ei sisällä endogeenisiä HBV-DNA-jaksoja.

5 8.1.2 Pakkauskykyisen genomien dimeerin ja valikoi-
 tavan markkerin käsittävän plasmidivektorin valmis-
 tus

HepG2-solulinjan transfektiota varten pakkauskykyisellä Δ DR1-genomilla konstruoitiin plasmidivektori, jolle annettiin merkintä pHBV Δ DR1Neo (kuvio 10). Vektori
 10 pHBV Δ DR1Neo käsittää ihmisen pakkauskykyisen HBV Δ DR1-genomin ja käsittää lisäksi antibiootti- (neomysiini-) resistenssigeenin SV40-promoottorin ohjaamana.

Kuviossa 11 on kaavamaisesti esitetty toistettava menetelmä pHBVDR1Neo:n konstruoimiseksi käyttäen vakiintuneita laboratoriomenetelmiä. E. coliin plasmidista pSP65
 15 katkaistaan ampisilliiniresistenssin sisältävä 479 ep.:n Xmn I - Bgl I -fragmentti ja plasmidin runko täytetään DNA-polymeraasi I:n Klenow -fragmentilla ja tasatut päät liitetään ligaasireaktiolla 2057 ep.:n Cla I - Xmn I -fragmenttiin, joka sisältää pBR328:sta peräisin oleva kloram-
 20 femikoliresistenssin. Näin konstruoidulla pSPCAM:lla ei ole restriktioentsyymin Fsp I -katkaisukohtaa ja se sisältää pSP65:stä peräisin olevan usean liitoskohdan alueen.

pSPCAM:n usean liitoskohdan alueella oleva Hinc -
 25 Xba I -fragmentti korvattiin 266 ep.:n fragmentilla, joka vastaa villityyppisen HBV-genomin asemia 1726 - 1992, joka fragmentti oli saatu Dra I - Xba I -fragmenttina villityyppisestä HBV:n dimeeriplasmidista. Tulokseksi saatua CAM^R-konstruktiota käytettiin transformoimaan E. coli:n
 30 HB101-kanta kloramfenikoliresistentiksi. Osa CAM^R-konstruktion 266-HBV-jaksosta, joka jakso sisältää DR1-jakson asemassa 1826 - 1837, nämä asemat mukaanlukien, irrotettiin Fsp I - Sty I -fragmenttina, joka fragmentti käsittää nukleotidiasemat 1804 - 1884. Irroitettu fragmentti kor-
 35 vattiin homologisella synteettisellä fragmentilla, jossa

nukleotidit 1826 - 1837 oli täsmällisesti deletoitu ja jossa Fsp I- ja Sty I -katkaisukohdat oli palautettu täsmällisesti synteettisen fragmentin liittämiseksi plasmidi-konstruktion oikein orientoituneena. Nukleotidien 1826 -
 5 1837 poistaminen deletoi konstruktiossa esiintyvän DR1-jakson. Synteettinen Fsp I - Sty I -fragmentti valmistettiin syntetisoidulla komplementaariset nauhat Applied Biosystems 280A -synteesilaitteessa. Nauhojen suojaus poistettiin, ne puhdistettiin geelissä, fosforyloitiin ja annettiin liittyä vastinnauhoihinsa tavanomaisilla menetel-
 10 millä. Oikeiden deletiofragmenttien tunnistamiseksi saaduista klooneista rekombinantit tutkittiin koettimilla in situ ³²P-leimatulla fragmentilla, joka sisälsi 10 emästä DR1-delektion molemmilta puolilta yhteenliitettynä. Hybridisointi suoritettiin alennetussa lämpötilassa (10 °C
 15 T_{sulaminen} alapuolella), jossa lämpötilassa koetin ei pysty hybridisoitumaan villityyppiseen HBV-DNA:han. Oikean delektion sisältävät positiiviset kloonit analysoitiin sitten sekvenssointigeelissä DR1-jakson täsmällisen delektion vahvistamiseksi, jolloin ΔDR1-mutantit tulivat tunnistetuiksi.

Synteettisen fragmentin sisältävien yhdistelmä-CAM^R-konstruktioiden annettiin sitten reagoida Xba I- ja Hind II -entsyymien kanssa, jotta saataisiin irrotetuksi
 25 suuri, lisätyn HBV-jakson ja tähän liittyvän ΔDR1-alueen sisältävä fragmentti sekä muita konstruktion Hind III -restriktiokohdan viereisiä jaksoja fragmentin loppuosassa. Fragmenttia käytettiin korvaamaan pSP65:ssä oleva Hind III - Xba I -fragmentti. Yhdistelmä-pSP65-vektoriin liitettiin nukleotidiasemat 2143 - 3182 sisältävä Xba I - EcoR I
 30 -fragmentti villityyppisestä HBV-dimeeristä ja nukleotidiasemat 1992 - 2143 sisältävä Xba I -fragmentti villityyppisestä HBV-dimeeristä. Fragmentit liitettiin ligaasilla kuviossa 11 esitetyssä orientaatioissa. Kaikki fragmentit
 35 sisältävät positiiviset rekombinantit tunnistettiin hybri-

disoinnilla vastaavia villityyppisiä HBV-koettimia käyttäen ja näiden orientaatio vahvistettiin sekvenssoinnilla.

Yhdistelmäkonstruktiosta poistettiin Fsp I - EcoR I -fragmentti, joka sisälsi asemien 1804 - 3182 väliset nukleotidit. Fragmentti liitettiin ensin ligaasilla HBV:n 5'-fragmenttiin, joka oli saatu villityyppisestä HBV:n dimeerisestä plasmidista Hind III:lla ja Fsp I:lla pilkkomalla, ja sitten pBR322-runkoon kolmen molekyylin yhteisreaktiossa, kuten kuviosta 11 käy ilmi. pBR322-runko valmistettiin poistamalla EcoR I - Hind III -fragmentti pBR322:sta kohesiivisten päiden muodostamiseksi runkoon. Ne kolmen molekyylin reaktiosta saadut rekombinantit, jotka sisälsivät HBV:n oikeat 3-' ja 5'-jaksot, tunnistettiin molempia näitä jaksoja vastaavilla koettimilla.

ΔDR1-genomi dimerisoitiin sitten pilkkomalla monomeeri osittain EcoR I:lla ja liittämällä toinen EcoR I - EcoR I -fragmentti, joka vastasi toista, toisesta monomeerista johdettua ΔDR1-genomia. Dimeeriset plasmidit tunnistettiin valmistamalla miniplasmidi-DNA-valmiste ja analysoimalla näiden koko agarosigeeleissä, ja oikea rakenteellinen orientaatio vahvistettiin restriktioanalyysillä.

Täydellisestä dimeeristä irrotettiin Cla I - Sal I -fragmentti, joka fragmentti on ulkopuolinen eikä häiritse ΔDR1-tandemgenomeja dimeerissä. Fragmentti korvataan Cla I - Sal I -fragmentilla, joka sisältää SV40-promoottorin ohjaaman bakteeriperäisen neomysiiniresistenssigeenin. Tämän lähtömateriaalina olevia plasmideja on saatavilla ja ne ovat tunnettuja. Ks. esim. Southern ja Berg, (1982) J. Mol. Appld Genet. 1, 327. Saadulle vektorille annettiin merkintä pHBVΔDR1Neo.

Käytettävissä olevilla menetelmillä voidaan tietysti valmistaa muita vektoreita, jotka käsittävät vaillinaisen virusgenomin dimeerin ja valikoitavan markkerin. Vektori pHBVΔDR1Neo kuvataan tässä esimerkkinä sopivasta vektorista.

8.2 Pakkauskyykyisen ihmisen solulinjan tuottaminen ja analyysi

Tämän keksinnön mukaisen pakkauskyykyisen solulinjan valmistuksen kuvaamiseksi transfektoitiin ihmisen hepatoomasolulinja HepG2 plasmidilla pHBV Δ DR1Neo.

Ennen transfektiota ympätettiin 2×10^6 kasvatettua HepG2-solua 10 cm maljoihin ravintoliuokseen, joka oli Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM):F12 (GIBCO, Grand Island, NY) plus 10 % naudan sikiön seerumia (FBS). Tätä kasvatusliuosta käytetään HepG2-solujen normaaliin jatkoviljelyyn. Ravintoliuos vaihdettiin transfektiota edeltävänä aamuna ja transfektio suoritettiin kalsiumfosfaattisaostusmenetelmällä. Kahdeksan (8) mikrogrammaa plasmidi-DNA:a transfektoitiin jokaiseen kolmeen 10 cm:n maljaan ja ravintoliuos vaihdettiin 8 tunnin kuluttua. Kahden päivän kuluttua transfektiosta solut trypsinisoi-
 tiin konfluenteilta maljoilta ja niitä käytettiin uusien kasvatuserien ymppeinä solutiheyksissä 350000 solua/malja, 175000 solua/malja ja 75000 solua/malja kasvatusliuokseen, joka sisälsi G418:a (Gibco, Grand Island, NY) 750 μ g/ml väkevyyisenä. Solujen ravinto uudistettiin tuoreella, lääkeainetta sisältävällä ravintoliuoksella joka 3. - 4. päivä kolmen viikon ajan, jonka ajan kuluttua ainoat eloonjääneet solut olivat erillisten pesäkkeiden muodossa. Tämän jälkeen G418 jätettiin lisäämättä liuokseen ja soluille annettiin ravintoa vielä yhden viikon ajan, jonka jälkeen pesäkkeet poimittiin kloonausrenkaita käyttäen ja inkuboitiin useita minuutteja 37 °C:ssa 5 mM EDTA:a sisältävässä PBS:ssa. Solut siirrettiin sitten 24-kuoppaisiin mikrotiitterilevyihin, jotka sisälsivät DMEM:F12 plus 10 % naudan sikiön seerumia, ja soluille annettiin ravintoliuosta joka 3. - 4. päivä.

Niiden transfektoitujen solujen seulomiseksi esiin, jotka tuottavat hepatiitti-B-pinta-antigeenia jatkettiin solujen kasvatusta mikrotiitterikuopissa, kunnes kasvu oli

kyllin vahvaa tekemään kasvuliuoksen happamalta vaikuttavaksi, joka viittaa oikeaan solutiheyteen. Solujen kasvatusliuos koottiin sitten talteen hepatiitti-B-pinta-antigeenin määrittämiseksi liuoksesta ja sen tilalle lisättiin tuoretta kasvatusliuosta. Liuoksen hepatiitti-B-pinta-antigeenimääritys suoritettiin käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa kiinteän faasin radioimmunomäärityspakkausta (Connaught Laboratories) oleellisilta osiltaan valmistajan ohjeiden mukaan. Noin 200 transfektantteja sisältävää eri mikrotiitterikuoppaa analysoitiin radioimmunomäärityksellä ja näistä tunnistettiin viisi positiivista kloonia, joista rekisteröitiin kaksi kertaa taustan ylittäviä iskumääriä. Näistä positiivisista klooneista määritettiin lisäksi hepatiitti-B-"e"-antigeeni (ytimen esiproteiini; "HBeAg").

Positiivisen hepatiitti-B-pinta-antigeenitestin antaneiden kuoppien kasvatusliuoksista määritettiin HBeAg käyttäen anti-eAg-vasta-aine-kerrosmääritystä (Abbott Laboratories Diagnostic Kit - Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.). Yksi viidestä kloonista, jotka olivat rekisteröityneet HBsAg-positiivisiksi, rekisteröityi yksi klooniksi vahvasti positiiviseksi HBeAg:n tuoton suhteen. Tämä klooniksi, HepB1-2:a, ekspandoitiin jatkokloonauksella. HepB1-2:n testaus uusittiin HBsAg:n ja HBeAg:n tuoton osalta vahvasti positiivisin tuloksin.

HepB1-2-solulinjalle suoritettiin analyysi solulinjan tarkemmaksi luonnehtimiseksi, mukaanlukien immunofluoresenssianalyysi, elektronimikroskopia ja nukleiinihappo-analyysi kasvatusliuoksen supernatantista.

HBsAg:n suhteen suoritettu immunofluoresenssivärijäys suoritettiin kiinnitettyjä HepB1-2-soluja käyttäen. Kontrollina tutkittiin HepG2-solut tutkittiin samalla menetelmällä. Molemmissa tapauksissa solut kiinnitettiin peitinlaseille käyttäen kylmää 95 % etanoli/5 % jääetikka-seosta. Levyt jätettiin -20 °C:ssa olevaan kiinnitysli-

uokseen 2 päivän ajaksi, pestiin sitten fosfaatilla puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (PBS) ja kuivatettiin ilmassa. Peitinlasit inkuboitiin sitten vuohen polyklonaalisen anti-HB-pinta-antigeeniliuoksen (DAKO, Santa Barbara, Cal.) kanssa 2 tunnin ajan 37 °C:ssa, pestiin PBS:lla ja inkuboitiin sitten fluoreskeiinillä konjugoidun kanin anti-vuohi-antiseerumin (DAKO) kanssa 37 °C:ssa. Solut tutkittiin sitten epifluoresenssioptiikkaa käyttäen. HepB1-2-soluissa esiintyi yhdenmukainen sytoplasman immu-

10 nofluoresenssivärjäytyminen kaikissa tutkituissa soluissa, joka viittaa siihen, että kaikki HepB1-2-kloonin ekspansioista saadut solut olivat peräisin samasta alkuperäisestä kloonista. Kontrollina käytetyissä HepG2-soluissa ei esiintynyt havaittavaa fluoresenssia.

15 Koska sekä HBsAg että HBeAg esiintyvät HepB1-2-soluissa, tutkittiin soluista Dane -partikkelien tuotto elektronimikroskopiaalla. Kuten kuviosta 12 nähdään, HepB1-2-solujen ohutleikkeen elektronimikroskopiassa ilmenee solujen pinnasta kuroutuvia vaipan ympäröimiä partik-

20 keleita. Partikkelit ovat läpimitaltaan oikeita (noin 40 nm), jotta ne voitaisiin tunnistaa Dane -partikkeleiksi. Samanlaisia kuroutuvia partikkeleita ei havaittu tutkittaessa samalla tavalla HepG2-parentaalisoluja.

Partikkelien esiintymistä HepB1-2-soluviljelmien supernatanttinesteissä tutkittiin tiheysgradienttisentrifugoinnilla. HepB1-2-solujen kasvatusliuoksen valmistamiseksi analysointia varten yhdistettiin 40 ml:n kasvatusliuosnäytteet konfluenteista viljelmistä keesiumkloridiin (1 g/3 ml) ja vietiin yläpäistään suljettuihin gradienttiputkiin, jonka jälkeen suoritettiin sentrifugointi Ti50.2-roottorissa (Beckman Instruments) 60 tunnin ajan 49000 kierroksen minuuttinopeudella. Fraktiot (1,4 ml) kerättiin peräkkäin putken yläpäästä ja kunkin fraktion taitekertoimen perusteella määritetty tiheys mitattiin 20 mikrolitran näytteistä refraktometrillä (Bausch ja Lomb).

35

Kustakin fraktiosta otetuista näytteistä analysoitiin sitten HBsAg radioimmunomäärityksellä. Antigeenin määrän huippu havaittiin tiheydessä, joka oli n. 1,20 g/ml CsCl-tiheysgradientissa, joka vastaa Dane -partikkeleilta odotettua sedimentaatiotiheyttä. Tiheydeltään 1,20 olevan fraktion analyysistä elektronimikroskopiaalla, joka suoritettiin julkaisun Sells *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1005, ilmeni se, että tässä fraktiossa oli vaipan ympäröimiä partikkeleita, jotka muistuttivat olen-
 5 naisesti kuviossa 12 esitettyjä, HepB1-2-soluista kuroutuvia partikkeleita. Partikkeleita ei havaittu muista viereisistä tiheysfraktioista.

Restriktioentsyymeillä EcoR I, Sac I, Hind III ja Pst I suoritettun käsittelyn jälkeen tehty HepB1-2:n genomin DNA:n Southern -blottaushybridisointi viittaa siihen,
 15 että solut sisältävät yhden kopion yhtenäistä Δ DR1-HBV-dimeerijaksoa, joka on liittynyt kromosomin DNA:han. Solun DNA-jaksoihin liittyneen plasmidin konfiguraatio on esitetty kuviossa 13.

HepB1-2-solulinjan tuottamat partikkelit analysoitiin useilla eri menetelmillä sen määrittämiseksi, sisälsivätkö partikkelit infektiokykyistä HBV-DNA:a. Oli en-
 20 nustettavissa, että partikkelit eivät sisältäisi infektiokykyistä DNA:a, koska HepB1-2-solulinja sisältää vain pakkauskykyisen genomin (Δ DR1:n), josta puuttuu välttämätön cis-asemasta vaikuttava lisääntymiseen liittyvä alue. Kuten kohdassa 6.4 jo on viitattu, pakkauskykyisen DR1-genomin transfektio HuH7-soluihin ei johtanut relaxoituneen rengasmaisen DNA:n tuottoon, vaan ilmeisesti tuotti
 25 pieniä, vaikkakin havaittavia määriä yksinauhaista (-)-nauhan DNA:a, kuten kuvion 3 kanavassa 5 on nähtävissä. Pieni havaittavan yksinauhaisen DNA:n määrä voi johtua ensimmäisen nauhan DNA-synteesin epänormaalista aloituksesta. Odotettiin, että pakkauskykyisen solulinjan tuot-
 30 tamat partikkelit koostuisivat etupäässä kaksinauhaisen
 35

DNA:n replikaation loppuunsaattamiseen kykenemättömistä esigenomin RNA-molekyyleistä, koska samanlainen mutaatio esiintyi pakkauskykyisen solulinjan HepB1-2 valmistamiseen käytetyn plasmidin DR1-toistuman alueella.

5 Pakkauskykyisen solulinjan supernatantissa esiinty-
vien partikkeleiden nukleiinihapposisällön analysoimiseksi
fraktioitiin supernatantti keesiumkloridigradientissa.
Nukleiinihapot eristettiin sitten eri fraktioista käsitte-
lemällä ne liuoksessa, jossa oli 15 mM EDTA:a, 0,5 % nat-
10 riumdodekyyli-sulfaattia ja 200 µg/ml proteinaasi-K:a
(Boehringer-Mannheim), 51 °C:ssa 90 minuutin ajan. Frak-
tiot uutettiin sitten fenolilla ja saostettiin etanolilla.
Eri fraktiot analysoitiin blottaushybridisointimäärityk-
sillä käyttäen katkos -translaation avulla saatua villi-
15 tyypistä HBV-koetinta. Kuten kuvioista 14 ilmenee, mis-
sään testatussa fraktiossa ei havaittu HBV-genomin kokoa
vastaavaa 3.0 ke.:n molekyylilajia. Heikosti hybridisoi-
tuvia 3,5 ja 5 ke.:n kokoisia molekyylilajeja havaittiin
fraktioissa 1,18 - 1,25 g/ml ja 1,26 - 1,32 g/ml ja suu-
20 relle alueelle 3,5 ke.:stä alaspäin jakautuva molekyyli-
joukko havaittiin tiheysfraktiossa 1,33 - 1,42 g/ml. Näi-
den molekyylilajien tarkempaa luonnetta ei ole vielä vah-
vistettu ja niiden analyysia mutkistaa niiden alhainen
määrä. Ne edustavat todennäköisimmin ΔDR1-RNA:n käänteis-
25 kopiointituotteita, joiden transkriptio on tapahtunut
HepB1-2-soluissa ja sellaisina sisältäisivät epätavallisia
käänteiskopioinnin aloituskohtia. Ne ovat melko suurella
varmuudella vaillinaisia.

30 8.3 Pakkauskykyisestä solulinjasta on saatavissa
trans-asemasta vaikuttavia toimintoja pakkauskykyi-
seen solulinjaan transfektoidun partikkelien suh-
teen vaillinainen genomien komplementoimiseksi

Perustuen ΔDR1-mutaation luonteeseen ja HepB1-2-so-
lulinjan kykyyn tuottaa havaittavia sytoplasmassa esiin-
35 tyviä virusantigeenejä (kohta 8.2) odotettiin, että solu-

linja kykenisi tarjoamaan käytettäväksi trans-asemasta vaikuttavia pakkaustoimintoja sekä pakkausta että käänteiskopiointia varten RNA-molekyyllille, joka on peräisin soluun tuodusta toisesta vaillinaisesta HBV-genomista.

5 Pakkauskykyisen solulinjan tulisi esimerkiksi komplementoida täysin kaikkia niitä trans-asemasta vaikuttavia viruksen toimintoja, joita partikkelien suhteen vaillinainen HBV-genomi tarvitsee. Partikkelien suhteen vaillinaisen genomien transfektiosta pakkauskykyiseen solulinjaan tulisi

10 olla tuloksena pakattu partikkelien suhteen vaillinainen genomi, joka on otettavissa talteen solujen supernatantista.

Pakkauskykyisen solulinjan HepB1-2 transfektiotarkoituksiin muodostettiin uusi partikkelien suhteen vaillinainen dimeerinen genomi. Tämä vaillinainen genomi, jolle

15 annettiin merkintä X-, tuotettiin villityyppisestä HBV-genomista Xho I -restriktioentsyymikäsittelyllä genomien katkaisemiseksi nukleotidiasemasta 129. Xho I -katkaisusta syntyneet kohesiiviset päät täytettiin Klenow -fragmentilla ja Sal I -restriktiokohdan sisältävä synteettinen 10

20 ep.:n kytkijä liitettiin ligaasilla tasoitetuista päistä Xho I -katkaisukohtaan. Saatu vaillinainen X--genomi dimeerisoitiin plasmidin pSP65 runkoon kuten edellä on esitetty.

25 HepG2-solut transfektoitiin sitten dimeerisellä X-plasmidilla käyttäen kahta eri menetelmää. Ensimmäisessä, kalsiumfosfaattisaostusta käyttävässä menetelmässä, solut ympätettiin transfektiota edeltävänä yönä ja transfektoitiin käyttäen 20 µg plasmidi-DNA:a. Transfektoiduista

30 soluista saatu kasvatusliuos koottiin talteen analyysiä varten 3., 4. ja 5. päivänä transfektiosta.

Toista, lipofektiota käyttävää menetelmää varten solut ympätettiin pienellä solutiheydellä ja niiden annettiin kasvaa usean päivän ajan, kunnes viljelmät olivat

35 lähes konfluentteja. Käytettiin lipofektiiniä (Bethesda

Research Laboratories, Gaithersburg, MD) viemään soluihin keskimäärin 5 µg plasmidi-DNA:a ja toisella yrityskerralla 1 µg plasmidi-DNA:a seuraavasti. Plasmidi-DNA sekoitettiin 150 µl:aan vettä polystyreeniputkessa. Tämän jälkeen
 5 lisättiin 150 µl lipofektiiniä ja putkea ravistettiin varovasti DNA:n sekoittamiseksi. Vastaanottajasolut pestiin kahdesti (seerumittomalla) DMEM-liuoksella. Kuhunkin maljaan lisättiin 9 ml merkaptoetanolia sisältävää Optimem-liuosta (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg,
 10 MD). Kun käsittelyä oli kestänyt 15 minuuttia huoneenlämmössä, lisättiin DNA-seos, joka oli silloin lievästi hah-
 tuvainen, tipoittain soluihin. DNA-seos jätettiin solujen päälle 24 tunnin ajaksi, jonka jälkeen solut pestiin viidesti PBS:lla ja viljeltiin sitten kasvatusliuoksessa,
 15 joka oli DMEM plus 10 % naudan sikiön seerumia. Solut pestiin jälleen viidesti PBS:lla seuraavana päivänä ja pestiin vielä yhden päivän jälkeen kolmasti PBS:lla. Kasvatusliuos otettiin talteen 4., 5. ja 6. päivänä transfektiosta ja talteenotettu kasvatusliuos yhdistettiin 4
 20 °C:ssa.

Transfektoitujen HepB1-2 solujen supernatanteista talteenotettu kasvatusliuos fraktioitiin keesiumkloridigradientissa ja nukleiinihapot eristettiin edellä kuvatun mukaisesti. Nukleiinihapot analysoitiin Southern -blottaushybridisoinnilla käyttäen HBV:n satunnaiskatkostranslaatiokoetinta.
 25

Kuviossa 15 on esitetty kahdesta HepB1-2-solujen dimeerisellä X--plasmidilla suoritetusta transfektiosta saatujen supernatanttien Southern -blottaushybridisoinnin tulokset. Toisessa transfektiossa käytettiin 5 µg plasmidi-DNA:a ja toisessa transfektiossa käytettiin 1 µg plasmidi-DNA:a. Transfektanttiviljelmien supernatantit fraktioitiin keesiumkloridissa ja kukin fraktio käsiteltiin nukleiinihappojen erottamiseksi kohdassa 8.2 kuvatulla tavalla. Kuvioista 15 ilmenee, että molempien transfek-
 30
 35

tiosupernatanttien tiheysfraktiossa 1,20 g/ml esiintyy 3,0 ke.:n hybridisoituva molekyyllilaji, joka vastaa Dane -partikkelien sisällään kuljettaman HBV-genomin odotettua kokoa. Havaittu, hieman 3,0 ke.:n fragmenttia hieman nope-
 5 ammin kulkeutuva molekyyllilaji voi edustaa HBV-genomin sulkeutuneita rengasmuotoja. Muut, 9 ke.:n ja tätä suurempaa kokoa vastaavilla kohdilla havaitut molekyyllilajit edustavat lisätyn plasmidi-DNA:n jäämiä. Näitä suurempia molekyyllilajeja havaitaan kaikkialla tiheysgradientissa ja
 10 restriktioanalyysi vahvistaa niiden identiteetin.

Kooltaan 3,0 ke.:n molekyyllilajin identiteetin varmistamiseksi irrotettiin 3.0 ke.:n molekyyllilaji alhaisen sulamispisteen omaavasta agarosigeelistä (Seakem, FMC) ja sen jälkeen, kun geelileikettä oli sulatettu 65 °C:ssa 4
 15 minuuttia, suoritettiin pilkkominen Sal I- ja Nco I -entsyymeillä 37 °C:ssa 2 tunnin ajan 1 µg:n erän hiiren DNA:a toimiessa kantajana. Pilkkoutumistuotteet analysoitiin sitten Southern -blottaushybridisoinnilla käyttäen HBV:n katkostranslaatiokoetinta. Täsmälleen niin, kuin pakatun
 20 X--mutanttigenomin suhteen oli odotettua, tässä havaittiin hybridisoituvat 1900 ep.:n ja 1200 ep.:n fragmentit.

Tämän keksinnön mukaisesti tuottajasolulinjoja voidaan valmistaa transfektoimalla pysyviä solulinjoja, kuten HepG2, useammalla kuin yhdellä vaillinaisella hepadna-virusgenomilla. Jos esimerkiksi pakkauskakykyinen solulinja
 25 HepB1-2 transfektoidaan kestävästi partikkelien suhteen vaillinaisella genomilla, kuten X-, tästä saatu solulinja voi muodostaa vaillinaisten genomien pakattujen muotojen pysyvän tuottajalinjan. Täten transfektoituneen populaa-
 30 tion jokaisesta solusta tulee partikkelien suhteen vaillinaisen genomin tuottaja, kun taas lyhytaikaisen ilmentämisjärjestelmän yhteydessä on saatavilla vain pieni prosentuaalinen osuus rinnakkaistransfektantteja. Näin voidaan saada talteen suurempia vaillinaisten hepadna-virus-

partikkelien tiittereitä ilman uusittavia transfektiovaihteita.

9. Mikro-organismien talletus

Seuraavat luetellut plasmidit sisältävät E. coli -
5 kannat talletettiin 12.6.1988 laitokseen Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL ja niille on annettu seuraavat talletusnumerot:

	E. coli	plasmidi	talletusnumero
10	HB101	pSP65 DHBV 5.2 Galx2 (villityyppinen DHBV)	B-18383
	HB101	pSP65 DHBV RV ⁻ 265x2 (core DHBV)	B-18384
	HB101	pSP65 DHBV Kpn ⁻ Sph ⁻ x2 15 (pol ⁻ env ⁻ core ⁻ DHBV)	B-18385
	HB101	pSP65 DHBV DR1x2 (DR1 ⁻ DHBV)	B-18386
	HB101	pHBVΔDR1Neo	NRRL B-18529

20 Tuottajasolulinja, jolle on annettu merkintä HepB1-2, on talletettu laitokseen American Type Culture Collection, ja sille on annettu talletusnumero ATCC CRL 10190.

Talletettujen mikro-organismien ei ole tarkoitus rajoittaa tämän keksinnön suojapiiriä, koska talletettujen
25 sovellutusmuotojen tarkoituksena on olla vain yksittäisiä kuvauksia tämän keksinnön yhdestä kohteesta ja mitkä tahansa näitä toiminnallisesti vastaavat mikro-organismit tai virukset kuuluvat tämän keksinnön piiriin. Alan ammattimiehelle on esitetyn kuvauksen ja mukaan liitettyjen
30 piirrosten perusteella selvää, että tässä keksinnössä esitettyjen ja kuvattujen muunnelmien lisäksi on olemassa useita muita muunnelmia. Nämä muunnelmat on tarkoitettu kuulumaan esitettyjen patenttivaatimusten piiriin.

On myös selvää, että kaikki nukleotidien emäspari-
35 koot ovat likiarvoja ja niitä on käytetty vain kuvaamistarkoituksessa.

Patenttivaatimukset:

1. DNA-jakso, josta ei kykene tuottamaan kaikkia hepadna-viruksen toimintoja, joita tarvitaan hepadna-viruksen lisääntymisessä, ja joka DNA-jakso on muunnettavissa transkriptiossa RNA:ksi, joka voidaan (a) pakata hepadna-viruksen virioniin ja (b) muuntaa käänteiskopioinnissa DNA:ksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää mutaation hepadna-viruksen geeneissä pol, env tai core.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää mutaatiot hepadna-viruksen geeneissä pol, env ja core.
4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää mutaatiot hepadna-viruksen geeneissä pol ja env.
5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että mutaatio käsittää deletion.
6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se koodaa lyhentynyttä hepadna-viruksen pinta-antigeenia.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää heterologisen geenijakson.
8. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää heterologisen geenijakson.
9. Patenttivaatimuksen 5 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää heterologisen geenijakson.
10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää immunogeenista epitooppia koodaavan jakson.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää immunogeenista epitooppia koodaavan jakson.

5 12. Patenttivaatimuksen 9 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää immunogeenista epitooppia koodaavan jakson.

10 13. Patenttivaatimusten 7, 8 tai 9 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää entsyymiä koodaavan jakson.

14. Nukleiinihappovektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-jakson.

15 15. Nukleiinihappovektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 2 mukaisen DNA-jakson.

20 16. Nukleiinihappovektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 7 mukaisen DNA-jakson.

17. Nukleiinihappovektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 10 mukaisen DNA-jakson.

25 18. Solu, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimusten 14, 15 16 tai 17 mukaisen nukleiinihappovektorin.

30 19. DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se (a) voidaan transkriptiossa muuntaa RNA:ksi, joka RNA ei kykene (i) tulemaan pakatuksi virioniin tai (ii) muuntu-
maan käänteiskopioinnissa kaksinauhaiseksi hepadna-viruksen genomien DNA:ksi; ja (b) voidaan transkriptiossa muuntaa lähetti-RNA:ksi, joka koodaa yhtä tai useampaa (i) toisen RNA:n pakkaamisessa hepadna-viruksen virioniin tai (ii) toisen RNA:n käänteiskopioinnissa DNA:ksi tarvittavaa
35 trans-asemasta vaikuttavaa toimintoa tuottavaa proteiinia.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää mutaation suoran toistuman alueella, joka on DR1 tai DR2.

5 21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että se käsittää mutaation DR1:ssa ja DR2:ssa.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että mutaatio käsittää delettion.

10 23. Patenttivaatimuksen 21 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että mutaatio käsittää delettion.

24. Nukleiinihappovektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 19 mukaisen DNA-jakson.

15 25. Nukleiinihappovektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 20 mukaisen DNA-jakson.

26. Solu, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimusten 24 tai 25 mukaisen nukleiinihappovektorin.

20 27. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää hepadna-viruksen, joka kykenee lisääntymään vain muun hepadna-virusproteiinin kuin sen oman genomien ilmentymisen tuottaman proteiinin läsnäollessa, joka genomien DNA voidaan transkriptiossa muuntaa RNA:ksi, joka kykenee tulemaan (a) pakatuksi virioneihin ja (b) käänteiskopioiduksi DNA:ksi.

25 28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva genomien DNA käsittää mutaation pol, env tai core -geeneissä.

30 29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva genomien DNA käsittää mutaatiot pol, env ja core -geeneissä.

35 30. Patenttivaatimuksen 28 mukainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että siinä oleva genomien DNA käsittää mutaatiot pol ja env -geeneissä.

31. Patenttivaatimuksen 28 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että mutaatio käsittää deletion.

32. Patenttivaatimuksen 28 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että se tuottaa lyhentynyttä pinta-antigeenia.

33. Patenttivaatimuksen 28 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että se tuottaa lyhentynyttä ydin-antigeenia.

34. Patenttivaatimuksen 27 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva genomien DNA käsittää heterologisen geenijakson.

35. Patenttivaatimuksen 28 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva genomien DNA lisäksi käsittää heterologisen geenijakson.

36. Patenttivaatimuksen 31 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva genomien DNA lisäksi käsittää heterologisen geenijakson.

37. Patenttivaatimuksen 34 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää immunogeenistä epitooppia koodaavan jakson.

38. Patenttivaatimuksen 35 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää immunogeenistä epitooppia koodaavan jakson.

39. Patenttivaatimuksen 36 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää immunogeenistä epitooppia koodaavan jakson.

40. Patenttivaatimusten 34, 35 tai 36 mukainen hepadna-virus, tunnettu siitä, että siinä oleva heterologinen geenijakso käsittää entsyymiä koodaavan jakson.

41. Genomien DNA, tunnettu siitä, että se on patenttivaatimusten 27, 28 tai 31 mukainen.

42. Genomin DNA, t u n n e t t u siitä, että se on patenttivaatimuksen 34 mukainen.

43. Genomin DNA, t u n n e t t u siitä, että se on patenttivaatimuksen 36 mukainen.

5 44. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu solussa ilmentämällä rinnakkain patenttivaatimuksen 1 mukaista DNA-jaksoa ja patenttivaatimuksen 19 mukaista DNA-jaksoa.

10 45. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu solussa ilmentämällä rinnakkain patenttivaatimuksen 2 mukaista DNA-jaksoa ja patenttivaatimuksen 19 mukaista DNA-jaksoa.

15 46. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu solussa ilmentämällä rinnakkain patenttivaatimuksen 1 mukaista DNA-jaksoa ja patenttivaatimuksen 20 mukaista DNA-jaksoa.

20 47. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu solussa ilmentämällä rinnakkain patenttivaatimuksen 2 mukaista DNA-jaksoa ja patenttivaatimuksen 20 mukaista DNA-jaksoa.

 48. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu solussa ilmentämällä rinnakkain patenttivaatimuksen 7 mukaista DNA-jaksoa ja patenttivaatimuksen 19 mukaista DNA-jaksoa.

25 49. Lisääntymiskyvyltään vaillinainen hepadna-virus, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu solussa ilmentämällä rinnakkain patenttivaatimuksen 8 mukaista DNA-jaksoa ja patenttivaatimuksen 19 mukaista DNA-jaksoa.

30 50. Solu, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 19 mukaisen DNA-jakson.

 51. Hepadna-virusinfektion saaneen potilaan hoito-
menetelmä, joka käsittää patenttivaatimuksen 27 mukaisen
hepadna-viruksen antamisen potilaalle.

52. Hepadna-virusinfektion saaneen potilaan hoito-
menetelmä, joka käsittää patenttivaatimuksen 28 mukaisen
hepadna-viruksen antamisen potilaalle.

53. Hepadna-virusinfektion saaneen potilaan hoito-
5 menetelmä, joka käsittää patenttivaatimuksen 30 mukaisen
hepadna-viruksen antamisen potilaalle.

54. Hepadna-virusinfektion saaneen potilaan hoito-
menetelmä, joka käsittää patenttivaatimuksen 32 mukaisen
hepadna-viruksen antamisen potilaalle.

10 55. Hepadna-virusinfektion saaneen potilaan hoito-
menetelmä, joka käsittää patenttivaatimuksen 33 mukaisen
hepadna-viruksen antamisen potilaalle.

56. Pysyvä hepatoomasolulinja, t u n n e t t u
siitä, että sen ominaisuuksiin kuuluu olennaisesti jatkuva
15 vaillinaisten hepadna-viruspartikkelien tuotto.

57. Patenttivaatimuksen 56 mukainen solulinja,
t u n n e t t u siitä, että mainittu hepatoomasolulinja
on ihmissolulinja.

58. Patenttivaatimuksen 56 mukainen solulinja,
20 t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu viemällä
pysyvästi ainakin yksi vaillinainen hepadna-virusgenomi
mainittuun pysyvään hepatoomasolulinjaan.

59. Patenttivaatimuksen 58 mukainen solulinja,
t u n n e t t u siitä, että siinä oleva vaillinainen he-
25 padna-virusgenomi sisältyy vektoriin ja vektoria käytetään
transfektoimaan mainittu pysyvä solulinja.

60. DNA-vektori, t u n n e t t u siitä, että se
käsittää hepadna-virusgenomin ja valikoitavan markkerin.

61. DNA-vektori, t u n n e t t u siitä, että se
30 käsittää patenttivaatimusten 1, 19 tai 27 mukaisen DNA-
jakson ja valikoitavan markkerin.

62. DNA-vektori, t u n n e t t u siitä, että se on
pHBV DR1Neo

63. Pysyvä hepatoomasolulinja, t u n n e t t u
35 siitä, että sille on luonteenomaista se, että patenttivaa-

timuksen 19 mukainen DNA-jakso esiintyy pysyvästi solunsäisenä.

5 64. Patenttivaatimuksen 63 mukainen pysyvä hepatoomasolulinja, t u n n e t t u siitä, että sen luonteenomaisiin piirteisiin lisäksi kuuluu solujen kyky muuntaa mainittu DNA-jakso RNA:ksi ja ilmentää trans-asemasta vaikuttavaa toimintoa, joka on tarpeen (i) toisen RNA:n pakkaamiseen hepadna-viruksen virioniin tai (ii) toisen RNA:n käänteiskopiointiin DNA:ksi.

10 65. Ihmisen hepatoomasolulinja HepB1-2

 66. Patenttivaatimusten 64 tai 65 mukainen solulinja, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää toisen vaillinaisen hepadna-virusgenomin.

15 67. Patenttivaatimuksen 66 mukainen solulinja, t u n n e t t u siitä, että mainittu toinen vaillinainen hepadna-virusgenomi on partikkelien suhteen vaillinainen genomi.

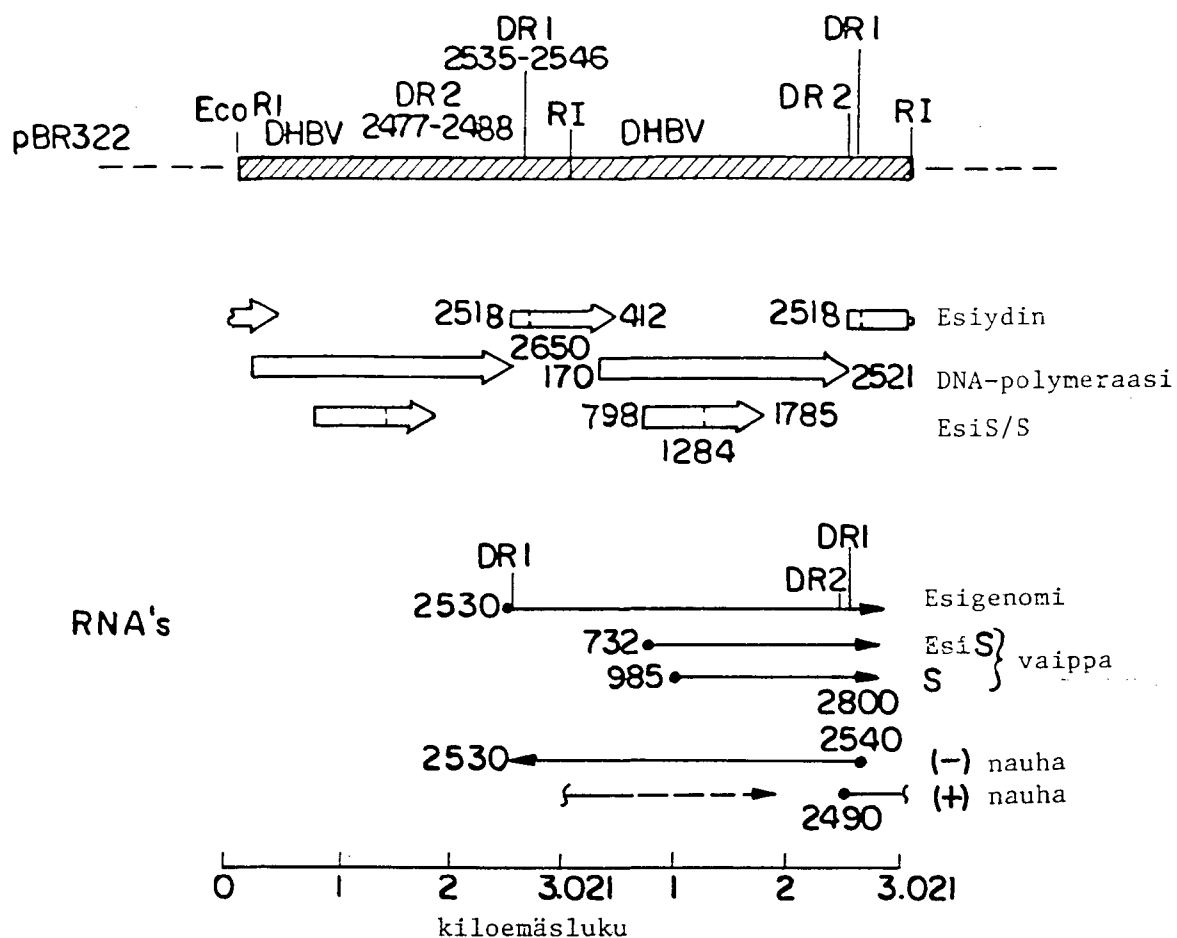


FIG. 1a

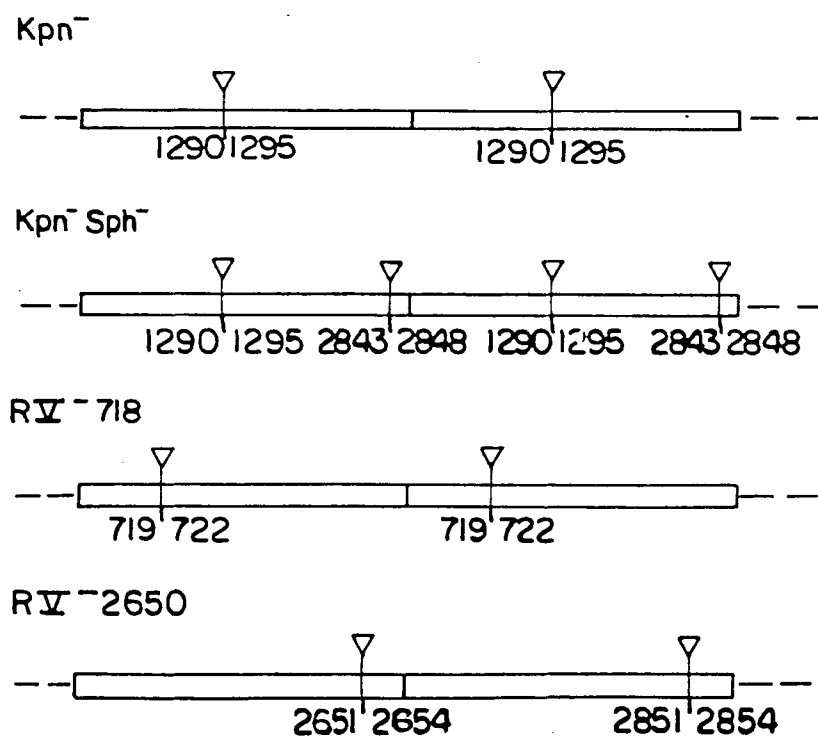


FIG. 1b

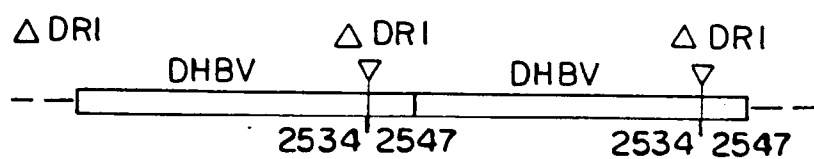


FIG. 1c

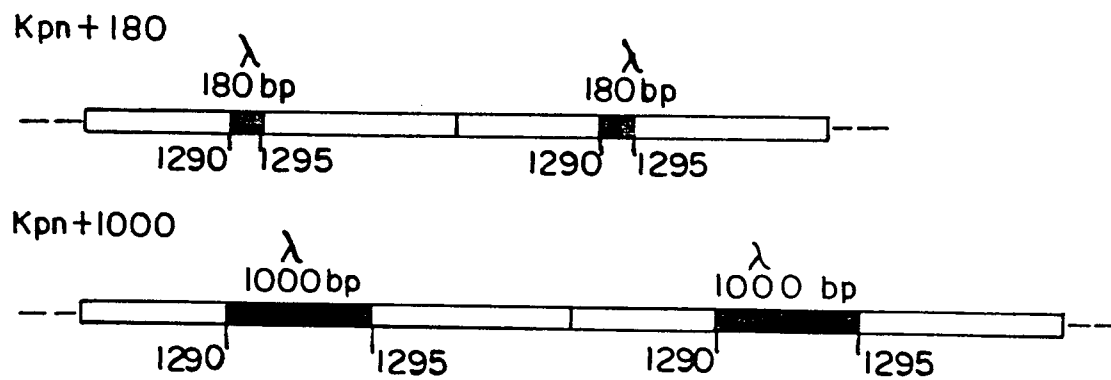


FIG. 1d

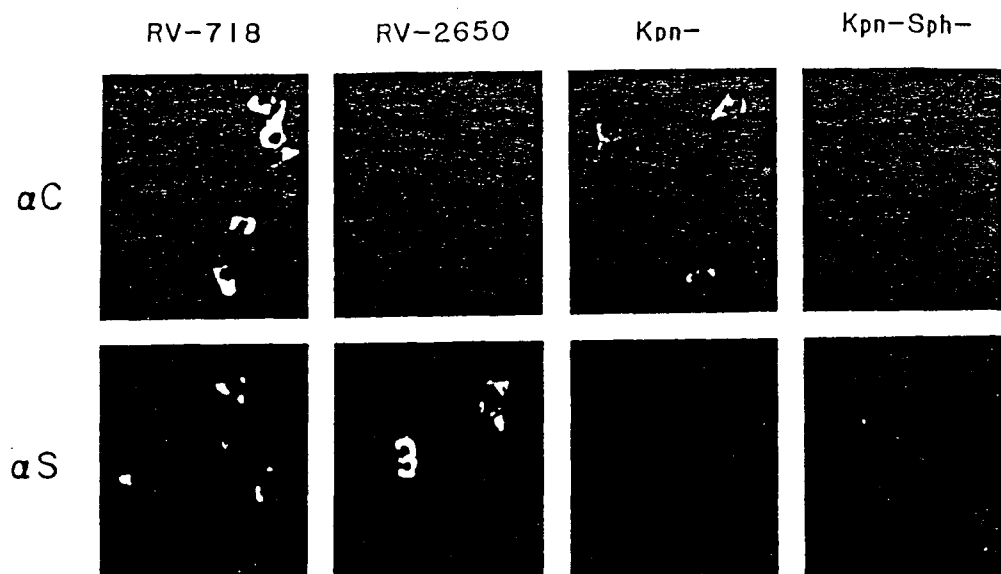


FIG. 2

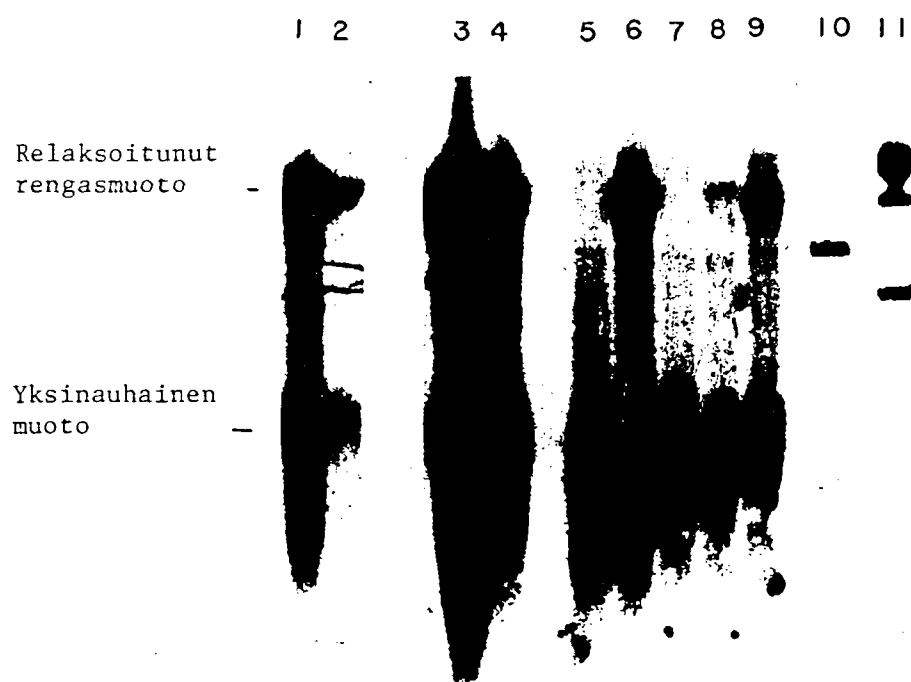


FIG. 3

Villityyppi Villityyppi
 ΔDR

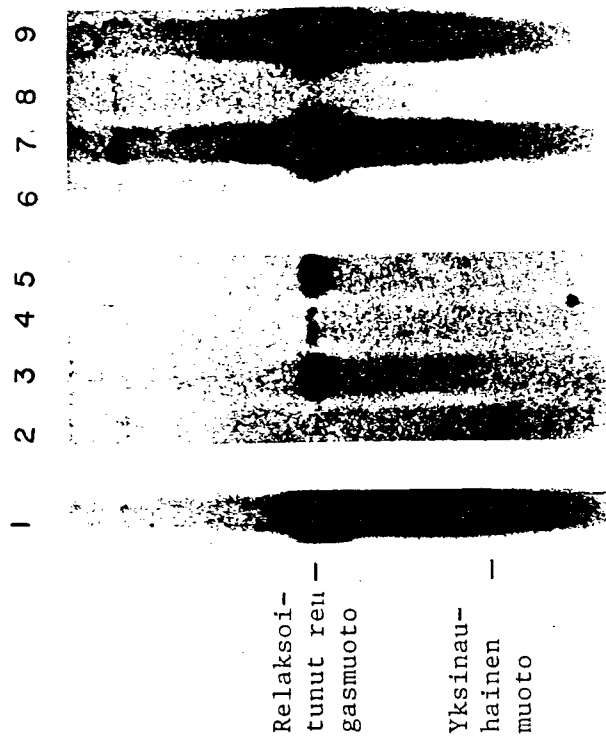
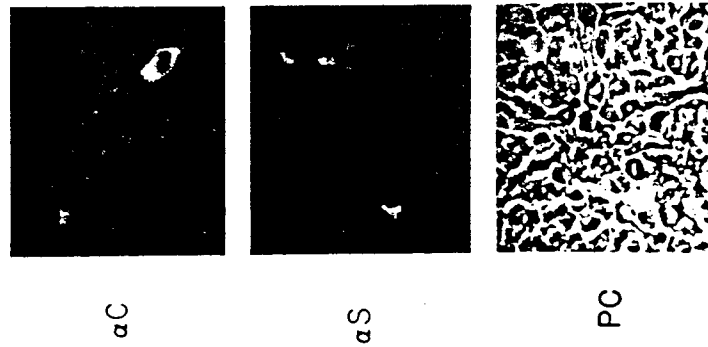


FIG. 4

FIG. 5

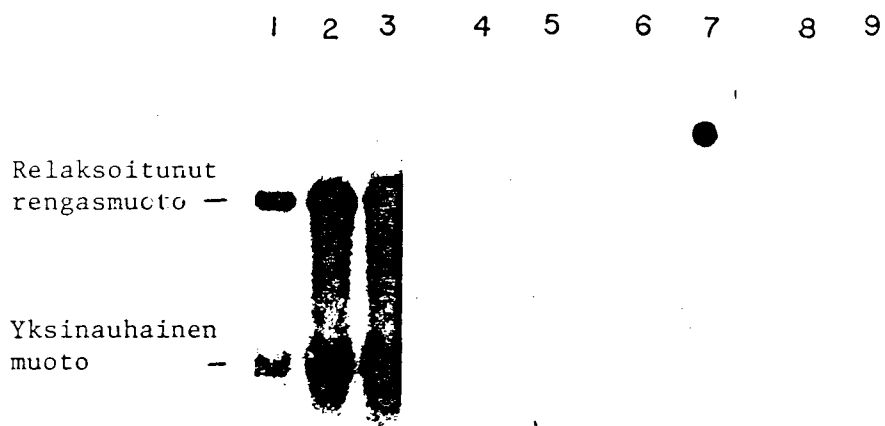


FIG. 6

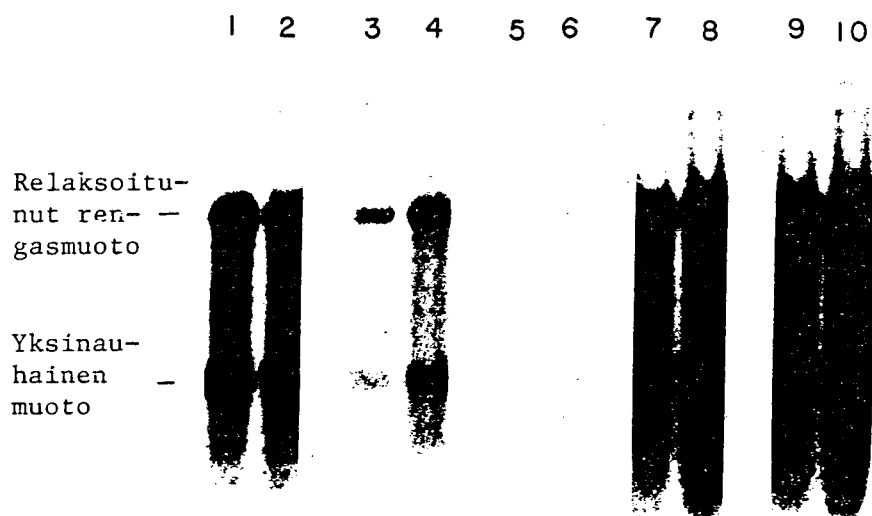


FIG. 7

FIG. 8A

1326 TTA CTG GTA AGC TTT TTC TTG TTG 1350 WT
TAA CTG GTA AGC TTT TTC TAG TAG IS



FIG. 8B

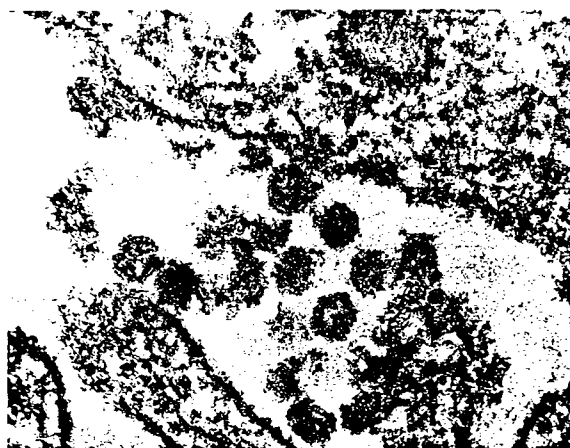


FIG. 12

Villityyppi

1S

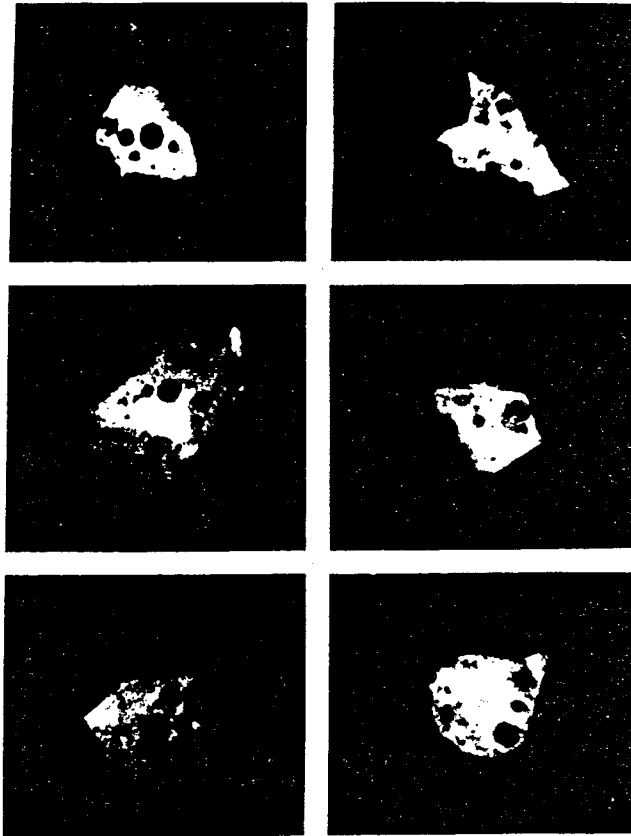


FIG. 9

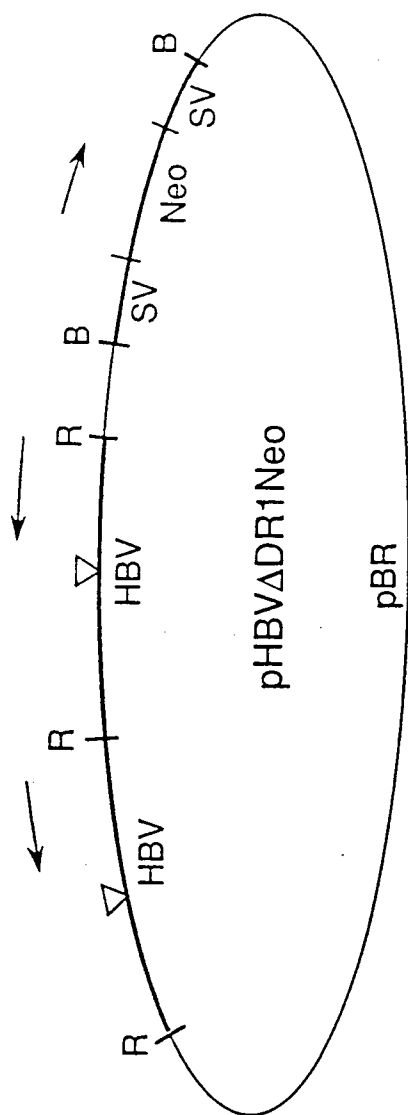


FIG. 10

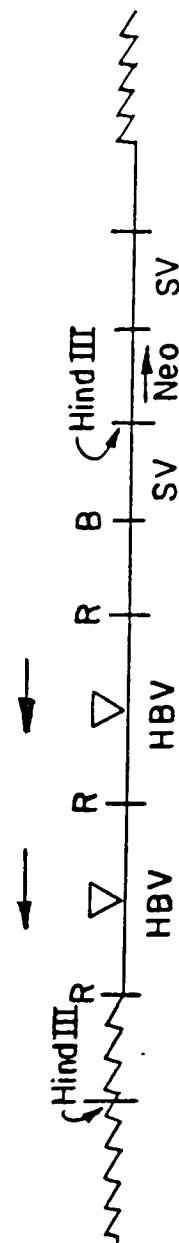


FIG. 13

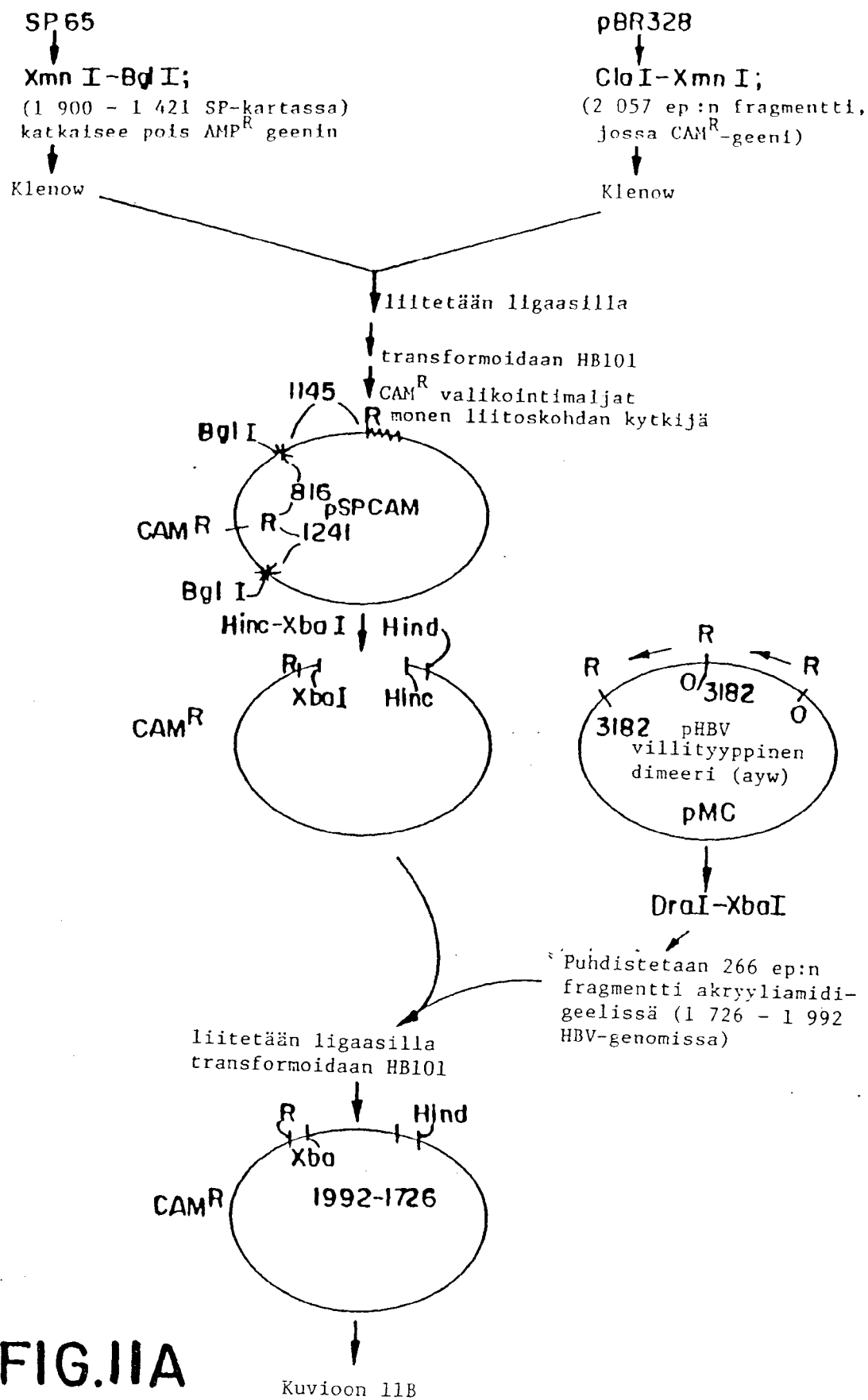
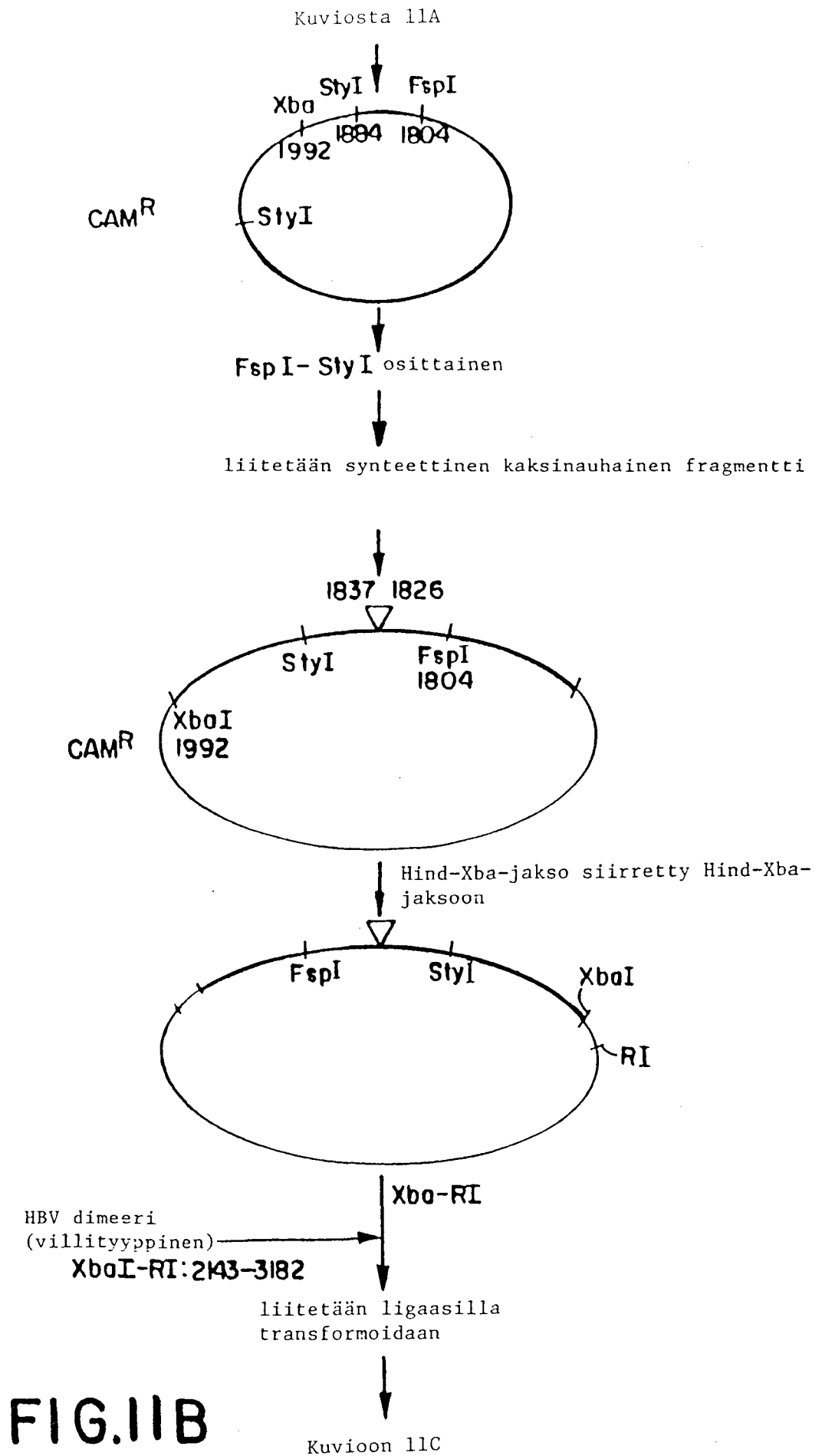
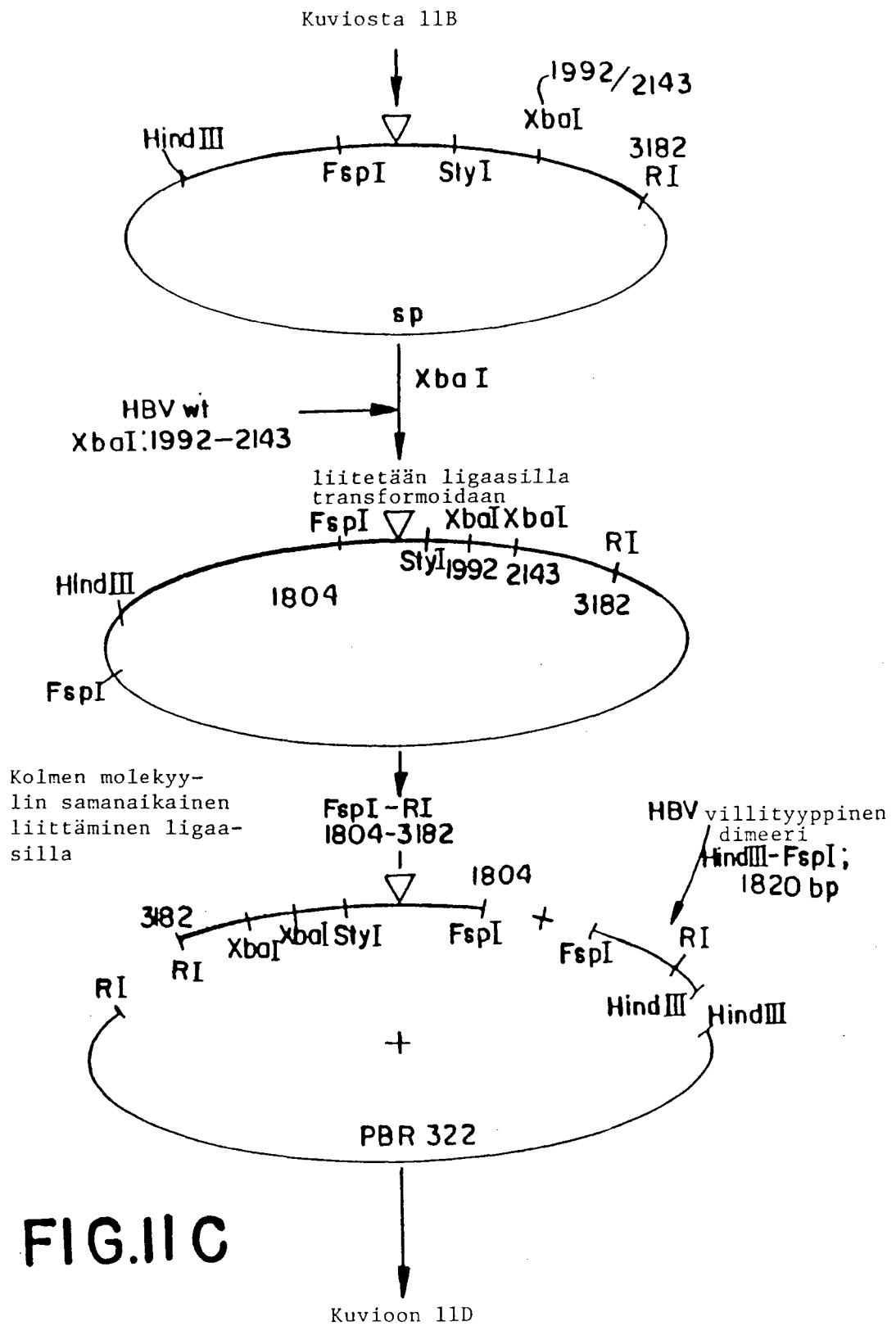


FIG.IIA





Kuviosta 11C

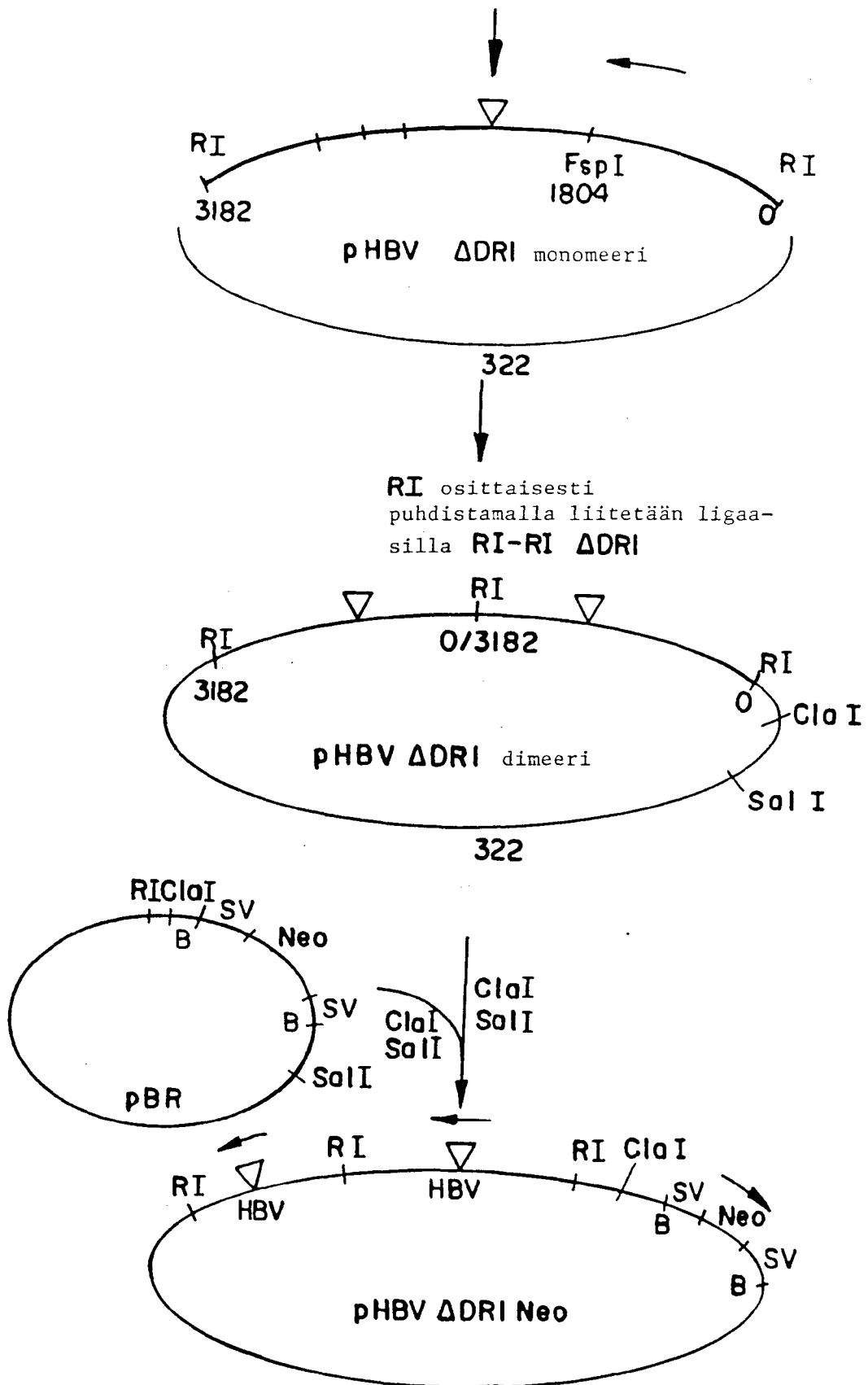


FIG.IID

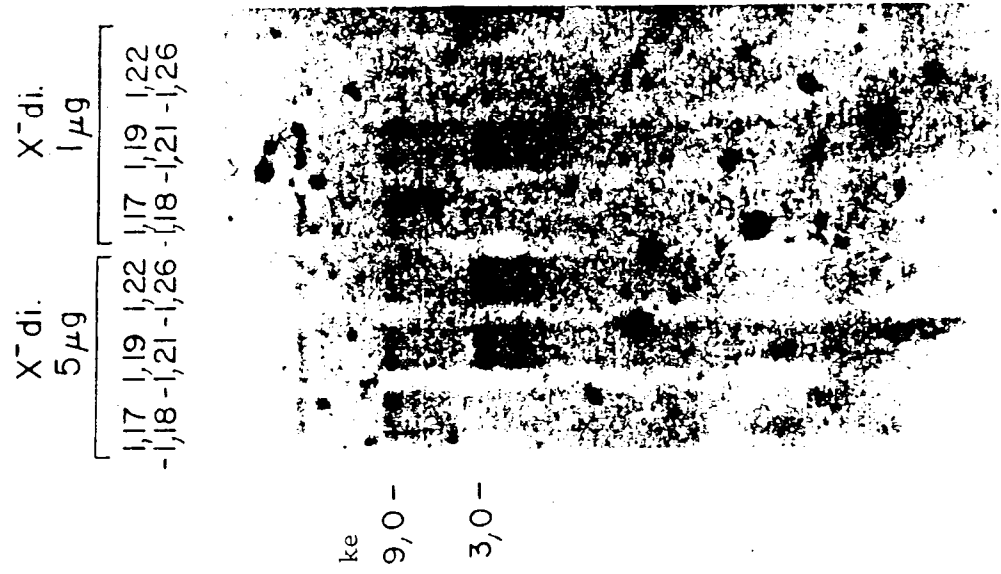


FIG. 15

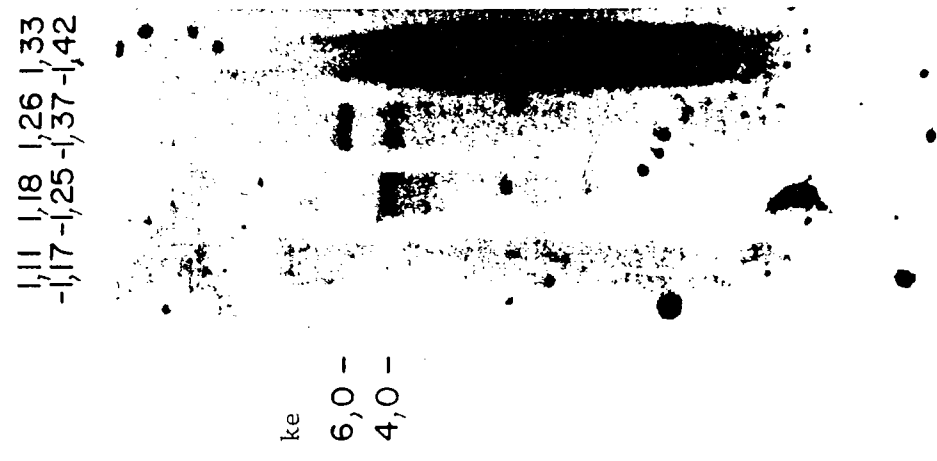


FIG. 14

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

ei antinutiek.

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun kesim. saksal. Offenlegungsschrift, numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

11. 3. 92

Sanna Nieminen

Allekirjoitus