(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 963717 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 963717

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
***C12N 7/00*** (2006.01)
***C12N 15/33*** (2006.01)
***C12N 15/50*** (2006.01)
***C12N 1/19*** (2006.01)
***C12N 1/21*** (2006.01)
***C12N 5/10*** (2006.01)
***A61K 39/215*** (2006.01)
***A61K 31/095*** (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **21.03.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.09.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **20.11.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **21.03.1995 PCT/US1995/003605**

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

21.03.1994 US 213860 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 • Research Development Foundation,** 402 North Division Street, Carson City, NV 89703, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 • Brown, Dennis T.,** Austin, TX 78756, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Kolster Oy Ab,** Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
**Uusia mutatoituja viruksia, viruksenvastaisia yhdisteitä ja uusia menetelmiä rokotteiden valmistamiseksi**
**Nya muterade virus, antivirala föreningar och nya förfaranden för framställning av vaccin**

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Esillä oleva keksintö esittää ainekoostumuksen, joka sisältää ei-infektiivisen mutatoidun viruksen, joka on sopiva käytettäväksi rokotteen valmistukseen. Rekombinanttisolussa ekspressoitavaksi sopeutettu plasmidi, joka sisältää DNA:n, joka koodittaa ei-infektiivistä mutatoitua virusproteiinia ja säätelyelementit, jotka ovat tarpeen mainitun DNA:N ekspressoimiseksi mainitussa solussa. On myös esitetty menetelmät virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, jotka sisältävät vaiheen, jossa mainittu virus saatetaan kosketukseen sellaisen yhdisteen kanssa, joka inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa.
Föreliggande uppfinning avser en ämneskomposition, som omfattar ett icke-infekterande, muterat virus, som kan användas för framställning av ett vaccin. En plasmid adapterad för expression i en rekombinantcell och omfattande DNA, som kodar ickeinfekterande, muterat virusprotein, och reglerande element, som är nödvändiga för expression av nämnda DNA i cellen. Uppfinningen avser även sätt för inhibering av spridning av en virusinfektion, som omfattar bringande av nämnda virus i kontakt med en förening, som inhiberar tiolreduktas/proteindisulfidisomerasaktivitet i nämnda virus.

# Uusia mutatoituja viruksia, viruksenvastaisia yhdisteitä ja uusia menetelmiä rokotteiden valmistamiseksi

## Keksinnön tausta

Esillä oleva keksintö koskee yleisesti virologian, immunologian ja proteiinikemian alaa. Spesifisemmin esillä oleva keksintö koskee uusia virusten vastaisia aineita ja uusia menetelmiä rokotteiden valmistamiseksi.

## Keksintöön liittyvän alan kuvaus

Virukset ovat kompleksisia kolmiulotteisia rakenteita, jotka toimivat geenin kuljetussysteemeinä. Ne koostuvat RNA- tai DNA-genomista, joka on pakattu kuoreen, joka sisältää proteiinia tai yhdistelmiä, joissa on proteiineja liittyneinä lipidiä sisältävään membraanikaksoiskerrokseen. Jotta pidettäisiin yllä luonnossa, viruksen genomi replikoituu heikentämällä sopivan isäntäsolun biokemiallista koneistoa. Tämä infektioprosessi johtaa usein isäntäsolun kuolemaan, joka on prosessi, joka suuressa mittakaavassa ilmentyy tautina isäntäkasvissa tai -eläimessä. Infektioprosessin lopputuote on satojen - tuhansien sellaisten virusjälkeläispartikkelien vapautuminen infektoituneesta solusta tai kudoksesta, joilla on kyky infektoida muita soluja, kudoksia tai isäntiä. Viruksen geneettistä materiaalia suojaa ympäristön aineiden aiheuttamalta tuholta ympäröivä kuori. Samalla kun tämän kuoren tulee estää ympäristön tekijöiden toimesta tapahtuva hajoaminen, sen täytyy myös hajota osiin niin, että se vapauttaa geneettisen materiaalinsa, kun virus infektoi isäntäsolun.

Alalla on aiemmin ollut puutetta tehokkaista keinoista, joilla inhiboidaan tiettyjen virusten leviämistä. Alalla on myös aiemmin ollut puutetta tehokkaista keinoista, joilla varmistetaan rokotteina käytettävien virusten ei-infektiivisyys. Esillä oleva keksintö täyttää nämä alalla kauan kaivatut tarpeet ja halut.

**Keksinnön yhteenveto**

Esillä olevan keksinnön yhden suoritustavan mukaisesti esitetään ainekoostumus, joka sisältää ei-infektiivisen, mutatoidun viruksen, joka on sopiva käytettäväksi rokotteen valmistukseen.

Esillä olevan keksinnön toisen suoritustavan mukaisesti esitetään nisäkässoluissa ekspressoitumaan sopeutettu rekombinanttiplasmidi, joka sisältää DNA:n, joka koodittaa ei-infektiivista mutatoitua virusta, ja säätelyelementit, jotka ovat tarpeen mainitun DNA:n ekspressomiseksi solussa.

Esillä olevan keksinnön vielä yhdessä suoritustavassa esitetään virukseen liittyvä tiolireduktaasi/proteiini-isomeraasiaktiivisuus.

Vielä eräässä esillä olevan keksinnön mukaisessa suoritustavassa esitetään menetelmä virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, joka sisältää vaiheen, jossa saatetaan mainittu virus kosketukseen sellaisen yhdisteen kanssa, joka inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa.

Toisessa esillä olevan keksinnön mukaisessa suoritustavassa esitetään sellainen viruksen vastainen aine virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, joka inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa.

Esillä olevan keksinnön muut ja lisänäkökohdat, lisäominaisuudet ja lisäedut tulevat ilmeisiksi seuraavasta tällä hetkellä suositeltavien keksinnön suoritustapojen kuvauksesta, joka on annettu kuvaustarkoituksia varten.

**Kuvioiden lyhyt kuvaus**

Jotta asia, jossa yllä esitetyt keksinnön ominaisuudet, edut ja aiheet kuin myös muut, jotka tulevat selviksi, saavutettaisiin ja jotta ne voitaisiin ymmärtää yksityiskohtaisesti, yksityiskohtaisemmat kuvaukset yllä lyhyesti yhteenvedetystä keksinnöstä voidaan saada tutus-

tumalla sen tiettyihin suoritustapoihin, jotka on kuvattu lisätyissä kuvioissa. Nämä kuviot muodostavat osan patenttihakemusta. On kuitenkin huomattava, että lisätyt kuviot kuvaavat keksinnön suositeltavia suoritustapoja ja sen vuoksi niitä ei tule pitää niiden piiriä rajoittavana.

Kuvio 1 esittää yksivaiheisen ulkopuolelta tapahtuneen fuusion (FFWO) BHK-soluissa pH:ssa 5,3, kun läsnä oli 2-merkaptoetanolia (2-ME). Virus-solukompleksit altistettiin matalan pH:n sisältävälle fuusioalustalle, joka sisälsi erilaisia konsentraatioita pelkistävää 2-ME-yhdistettä, kuten alla on kuvattu. Fuusio pisteytettiin, kuten alla on kuvattu.

Kuviossa 2 esitetään kaksivaiheisen FFWO-tapahtuman monikertariippuvuus (MOI) BHK-soluissa, jotka on altistettu 2-ME-yhdisteelle. Virus-solukompleksit altistettiin matalan pH:n fuusioalustalle, jossa oli 0,05 nM 2-ME-yhdistettä (neliöt) tai sitä ei ollut (kolmiot), viiden minuutin ajaksi, palautettiin neutraaliin pH:hon ja pisteytettiin fuusion suhteen, kuten alla on kuvattu.

Kuviossa 3 esitetään DTNB-yhdisteen suora vaikutus Sindbis-viruksen infektiivisyyteen. Virus altistettiin 1 mM DTNB-yhdisteelle eri ajoiksi ja jäljelle jäänyt infektiivinen virus titrattiin BHK-yksisolukerroksissa. Infektiivinen virus esitetään prosenttina käsittelemättömästä verrokista.

Kuviossa 4 kuvataan konformationaalisia muutoksia E1-proteiinissa Sindbis-viruksen membraaniin tunkeutumisen ja matalan pH:n indusoiman membraanifuusion aikana. Kuviossa 4A esitetään, että kypsän virionin glykoproteiini sisältää sekä toiminnalliset että rakenteelliset domeenit, jotka ottavat osaa membraanifuusioon ja vaipan ehjyyteen, vastaavasti. Kuviossa 4B esitetään, että konformationaaliset muutokset, jotka reseptori-virus-interaktio tai altistus matalalle pH:lle indusoi, paljastavat kriittiset disulfidisidokset suosien sen jälkeistä disulfidisiltojen

uudelleenjärjestelyä. Kuviossa 4C esitetään, että kriittisten disulfidisiltojen, jotka ovat vastuussa proteiini-proteiini-assosiaatioiden ylläpidosta vaipassa, pelkistyminen hajottaa jäykän ikosahedraalisen proteiiniristikkorakenteen sallien sen jälkeisen fuusion solumembraanin kanssa. Suljetut laatikot esittävät E1-E1-assosiaatioita; katkoviivoin esitetyt laatikot esittävät fuusiopeptidiä.

Kuviossa 5 esitetään Sindbis-mutantti E1-ser$^{62}$. Solut leimattiin viisi tuntia infektion jälkeen $^{35}$S-metioniini/kysteiini-leimalla ja kasvatettiin sen jälkeen 0 (kaista 1), 5 (kaista 2), 10 (kaista 3), 20 (kaista 4) minuuttia niin, että läsnä oli sykloheksimidiä. Solujen lysaatit immuunisaostettiin antiseerumilla, joka tuotettiin puhdistettua virusta vastaan. Ser$^{62}$-mutantti tuottaa virusproteiineja PE2, E1, E2 ja C, ja siinä PE2-proteiini muuttuu leimauksen jälkeen E2-proteiiniksi. Elektronimikroskooppikuva esittää virionit, jotka on konsentroitu transfektoitujen solujen alustoista ja puhdistettu tiheysgradienttisentrifugaatiolla. Radioaktiivisen mutanttiviruksen proteiinisisältö esitetään kaistassa 5.

Kuviossa 6 esitetään tiolia blokeeraavan DTNB-yhdisteen vaikutus solujen infektioon corona-malliviruksella, hiiren hepatiittiviruksella (MHV).

**Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus**

Esillä olevassa keksinnössä osoitetaan käyttäen membraania sisältävää Sindbis-virusta (alfa-virusten prototyyppi), että tällä viruksella on toisessa sen kahdesta membraanikuoreen assosioituneesta glykoproteiinista osana proteiinidomeeni, joka on rakenteeltaan ja toiminnaltaan sellaisten proteiinien homologi, joilla on tunnettu tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuus. Esillä oleva keksintö osoittaa myös, että corona-malliviruksella (hiiren hepatiittivirus) on samanlainen infektiomekanismi kuin on kuvattu Sindbis-virukselle, ja että näin

ollen tätä mekanismia käyttää muutkin virukset isäntäsolujen infektoimiseen.

Monien eläinvirusten pintaproteiinit sisältävät kompleksiset disulfidisidokset, jotka voivat stabiloida partikkeleita ja jotka on rikottava infektioprosessin ja virusgenomin vapautumisprosessin tapahtumiseksi. Esillä olevassa keksinnössä on tunnistettu mekanismi, joka selittää sen kriittisen prosessin, joka tapahtuu, kun nämä virukset infektoivat isännät. Tämä uniikki ja aiemmin kuvaamaton aktiivisuus kuvaa uuden strategian virusinfektion säätelemiseksi ja rokotteiden valmistamiseksi.

Esillä olevassa keksinnössä esitetään, että virus itse sisältää kyvyn pelkistää sen disulfidisidokset sen jälkeen, kun se on kiinnittynyt sopivaan isäntäsolureseptoriin. Viruksen rakenneproteiinin interaktio isännän reseptorin kanssa aloittaa konformationaaliset muutokset viruksessa, jotka sallivat pelkistystapahtuman.

Esillä olevassa keksinnössä kuvataan, että tioli-disulfidivaihto on kriittinen solujen infektoitumiselle alfa- ja corona-viruksilla. Alfa-virusten tapauksessa tämä pelkistystapahtuma suoritetaan tiolireduktaasi/disulfidi-isomeraasiaktiivisuudella, joka sijaitsee viruksessa itsessään. Monet virukset (sisältäen HI-viruksen) sisältävät disulfidisidokset, joiden on osoitettu olevan keskeisiä viruksen rakenteelle ja kokoamiselle. Viruksen rakenteellinen ehjyys riippuu näistä disulfidisidoksista, jotka täytyy rikkoa, jotta isännän infektioprosessi voi jatkua. Esillä olevan keksinnön mukainen mutantti edustaa uutta tapaa tuottaa ei-infektiivinen virus rokotekäyttöön. Esillä olevan keksinnön mukaiset mutanttivirukset ovat ylivoimaisia muihin rokotteisiin verrattuna siinä, että ne eivät vaadi inaktivointia kemiallisilla tai fysikaalisilla käsittelyillä. Sen vuoksi ne esittäytyvät immuunisysteemille antigeeneilla, jotka ovat lähemmin samanlaisia niiden kanssa, jotka ovat läsnä infektiivisessä virionissa. Esil-

lä oleva keksintö kuvaa myös tavat tunnistaa kemialliset yhdisteet, jotka voivat häiritä endogeenista tioli-reduktaasiaktiivisuutta näin toimien lääkkeinä, jotka estävät virusinfektion leviämisen. Virukseen assosioitunut tioli-reduktaasi on homologinen muiden vastaavien tunnettujen entsyymien kanssa. Näin ollen yhdisteet, jotka kykenevät blokeeraamaan yhden näistä aktiivisuuksista yhdessä viruk-sessa, blokeeraavat aktiivisuuden muissakin viruksissa.

Esillä oleva keksintö koskee sellaista ainekoostu-musta, joka sisältää ei-infektiivisen mutatoidun viruksen, joka on sopiva käytettäväksi rokotteen valmistukseen. Yleisesti virus mutatoidaan substituoimalla konservoitunut kysteiiniaminohappo muulla aminohapolla. Henkilö, jolla on alan tavanomaiset taidot, tunnistaa helposti, että on ole-massa pieni määrä aminohappoja, joilla kysteiini voidaan substituoida esillä olevan keksinnön mukaisissa menetel-missä ja koostumuksissa. Esillä olevan keksinnön mukaisis-sa menetelmissä ja koostumuksissa korvataan esimerkiksi spesifinen kysteiiniaminohappo seriinillä. Suositeltavasti korvattu aminohappo, jonka avulla muodostetaan esillä ole-van keksinnön mukaiset mutatoidut virukset, on sellainen konservoitunut kysteiini, joka on sellaisessa virusprote-iinin domeenissa, joka on vastuussa tiolireduktaasi/pro-teiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuudesta.

On tarkoitettu, että esillä olevan keksinnön mukai-set menetelmät ja esillä olevassa keksinnössä esitetyt koostumukset v ivat sisältää minkä tahansa viruksen. Suo-siteltavasti mutatoitu virus on sellaisen viruksen mutant-ti, joka valitaan ryhmästä, joka sisältää alfa-virukset ja corona-virukset. Edustava esimerkki alfa-viruksista on Sindbis-virus. Edustava esimerkki corona-viruksista on hiiren hepatiittivirus. Edustava esimerkki mutatoidusta Sindbis-viruksesta on E1-$SER^{62}$-mutantti.

Esillä olevassa keksinnössä esitetään soluissa ekspressoitumaan sopeutetut uudet plasmidit, jotka sisäl-

tävät rekombinantti-DNA:n, joka kykenee koodittamaan ei-infektiivistä mutatoitua virusta, ja säätelyelementit, jotka ovat tarpeen mainitun DNA:n ekspressoimiseksi solussa. Esillä olevan keksinnön mukaiset plasmidit voidaan sopeuttaa ekspressiota varten bakteeri-, hiiva-, hyönteis- tai nisäkässoluissa. Edustavat esimerkit hiivasta ovat Saacharomyces, Pichia ja Kluyveromyces. Edustavat esimerkit bakteerisoluista ovat E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Pseudomonas, Streptomyces ja Staphylococcus. Edustavat esimerkit nisäkässoluista ovat BHK-21-, Vero-, HeLa- ja kiinanhamsterin munasarjasolut (CHO).

Esillä olevan keksinnön mukainen plasmidi sisältää esillä olevan keksinnön mukaisen mutatoidun viruksen. Suositeltavasti virus on alfa-virus ja corona-virus. Edustava esimerkki mutatoidusta alfa-viruksesta on mutatoitu Sindbis-virus. Edustava esimerkki mutatoidusta Sindbis-viruksesta on E1-$SER^{62}$-mutantti.

Esillä oleva keksintö esittää myös uudet transfektoidut solut. Edustavat esimerkit transfektoiduista soluista sisältävät transfektoidun solun, joka sisältää patenttivaatimuksen 7 mukaisen plasmidin, ja transfektoidun solun, joka sisältää patenttivaatimuksen 14 mukaisen plasmidin. Lisäksi esillä oleva keksintö kuvaa myös ei-infektiiviset mutatoidut virukset, joita esillä olevan keksinnön mukaiset transfektoidut solut tuottavat.

Esillä oleva keksintö sisältää myös menetelmän virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, joka sisältää vaiheen, jossa saatetaan mainittu virus kosketukseen yhdisteen kanssa, joka inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa. On myös esitetty viruksen vastainen aine virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, jossa mainittu viruksen vastainen aine inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa. Esillä olevan kek-

sinnön opetuksien mukaisesti alan tavalliset taidot omaava henkilö kykenee helposti keksimään lisäyhdisteitä, jotka inhiboivat tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasi-aktiivisuutta tutkitussa viruksessa.

Seuraavat esimerkit on annettu keksinnön eri suoritustapojen kuvaamista varten eikä niiden ole tarkoitettu rajoittavan esillä olevaa keksintöä millään tavalla.

**Esimerkki 1**

**Solut, virukset ja alustat**

BHK-21-soluja viljeltiin 37 °C:ssa Eagle's Minimal Essential -alustassa (MEM), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (GIBCO), 5 % tryptoosifosfaattilihalientä ja 2 mM L-glutamiinia. Lämpöresistentti Sindbis-virus (SVHR), jonka alunperin toimitti E. Pfefferkorn (Darmouth Medical College), nuorennettiin matalalla infektiomoniker-ta-arvolla ja titrattiin BHK-21-soluissa, kuten ovat kuvanneet Renz ja Brown, J. Virol. 19: 775 - 781 (1976).

**Esimerkki 2**

**Sindbis-viruksen välittämä FFWO-tapahtuma**

Variaatiot Sindbis-viruksen välittämässä FFWO-tapahtumassa olivat 1000 SVHR-PFU-yksikköä per solu BHK-yksisolukerroksissa 4 °C:ssa 60 minuutin aikana. Sitten virusymppi korvattiin 37 °C:n fuusioalustalla, joka sisälsi Eagle's MEM -alustaa ilman bikarbonaattia, sisältäen 10 mM MES-puskuria [2(N-morfolino)etaanisulfonihappo] ja 10 mM HEPES-puskuria (N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo) niin, että pH säädettiin 5,3:een, ja ilman 2-merkaptoetanolin (2-ME) erilaisia konsentraatioita. Fuusio testattiin faasikontrastimikroskoopilla viiden tunnin inkubaation jälkeen 37 °C:ssa ja se pisteytettiin seuraavasti: -, ei fuusiota; +, vähemmän kuin 25 % soluista oli fuusioitunut; ++, 25 % fuusioitui. Lyhyesti, FFWO matalassa pH:ssa indusoitiin adsorboimalla 50 % fuusioituja soluja; +++, 50 - 95 % soluista fuusioitui; ++++, enemmän kuin 95 % soluista fuusioitui. Fuusion aste laskettiin kaavalla

1-(solumäärä/tumien määrä). Kahden pH-vaiheen FFWO indusoitiin, kuten on kuvattu yllä paitsi, että käytettiin erilaisia SVHR-monikertoja, fuusioalusta sisälsi 0,05 M 2-ME-yhdistettä ja virus-solukompleksit palautettiin kasvualustaan viiden minuutin inkubaation jälkeen matalan pH:n fuusioalustassa. Yksisolukerrokset valokuvattiin faasikontrastivalaistuksessa yhden tunnin inkubaation jälkeen 37 °C:ssa ja pisteytettiin, kuten yllä on kuvattu.

**Esimerkki 3**

**Lääkkeet**

DTNB liuotettiin seerumivapaaseen MEM-alustaan. DTNB-konsentraatiot, jotka olivat niinkin korkeita kuin 5 mM, eivät vaikuttaneet solujen elinkykyyn testattuna [$^3$H]uridiinin inkorporaationa trikloorietikkahapolla (TCA) saostuvaan solu-DNA:han, trypaanisinieksluusiolla tai neutraalipunan sisäänotolla. DTNB-yhdisteen suorat vaikutukset Sindbis-viruksen infektiviteettiin määritettiin inkuboimalla reagenssia viruksen kanssa eri aikoja, lopettamalla inkubaatio sarjalaimentamalla fosfaatilla puskuroituun suolaliuokseen, joka sisälsi 3 % naudan sikiön seerumia ja titraamalla BHK-soluissa standardiplakkitestillä, kuten ovat kuvanneet Renz ja Brown, J. Virol. 19: 775 - 781 (1976).

**Esimerkki 4**

**Penetraatiotestit**

Viruksen RNA:n synteesi testattiin määrittämällä [$^3$H]uridiinin inkorporaatio TCA:lla saostuvaan materiaaliin BHK-soluissa, joita käsiteltiin 4 µg:lla daktinomysiiniä per ml 90 minuutin ajan ennen infektiota ja koko inkubaation ajan. Yksisolukerroksia, jotka sisälsivät samat määrät BHK-soluja, käsiteltiin 1 mM DTNB-yhdisteellä 30 minuutin ajan 37 °C:ssa kolme eri kertaa adsorpoiden yksi tunti viidellä SVHR PFU -yksiköllä per solu 4 °C:ssa. Adsorption jälkeen kaikki yksisolukerrokset pestiin seerumivapaalla MEM-alustalla ja niitä inkuboitiin 37 °C:ssa

adsorboituneiden virusten penetraation sallimiseksi. 30 minuutin DTNB-käsittelyt tehtiin joko välittömästi ennen adsorptiota, 37 °C:ssa tapahtuneen penetraation aikana tai välittömästi tämän penetraatioajan jälkeen. DTNB-käsittelyjen jälkeen yksisolukerrokset pestiin. [$^3$H]uridiinia (10 µCi/ml) lisättiin 90 minuuttia penetraatioajan jälkeen, ja viiden tunnin kohdalla yksisolukerrokset lyysattiin natriumdodekyylisulfaatilla ja saostettiin 10 % jääkylmällä TCA:lla ja radioaktiivisuus laskettiin. Penetraatio testattiin myös plakkimuodostuksella BHK-yksisolukerroksissa, jotka oli altistettu 1 mM DTNB-yhdisteelle 60 minuutiksi yllä kuvatuissa käsittelyolosuhteissa. Plakkimuodostus määritettiin, kuten ovat kuvanneet Renz ja Brown, J. Virol. 19: 775 - 781 (1976).

**Esimerkki 5**

**FFWO matalassa pH:ssa**

Sindbis-viruksen välittämän FFWO-tapahtuman nopeus riippuu pH:sta, johon solut palautetaan sen jälkeen, kun ne on altistettu matalalle pH:lle, Edwarsd ja Brown, J. Gen. Virol. 67: 377 - 380 (1986). Fuusio toimii nopeammin korkeissa pH:issa eikä tapahdu malalan pH:n raja-arvossa 5,3, jota tarvitaan fuusio-olosuhteiden palauttamiseksi neutraaleiksi. Tiolidisulfidivaihtoreaktiot ovat samalla tavalla pH:sta riippuvaisia siinä mielessä, että pH vaikuttaa suoraan reaktionopeuksiin, jotka tapahtuvat nopeasti ainoastaan neutraaleissa - alkalisissa ympäristöissä, kuten ovat osoittaneet Feener et al., J. Biol. Chem. 265: 18780 - 18785 (1990). Jos kriittisten viruksen disulfidisidosten pelkistyminen on tarpeen jäykän vaippaproteiiniristikkorakenteen hajottamiseksi ennen membraanifuusiota, se olisi blokeerattu matalassa pH:ssa.

Sellaisen pelkistystapahtuman roolin kuvaamiseksi Sindbis-viruksen välittämässä FFWO-tapahtumassa BHK-soluissa, fuusiota yritettiin matalassa pH:ssa pelkistävän aineen 2-ME:n läsnä ollessa. Toisin kuin DTT ja kysteiini,

2-ME on tehokas pelkistävä aine pH:ssa 5 ja sen yläpuolella (Torchinskii, Sulfhydryl and Disulfide Groups of Proteins, Plenum Publishing, N.Y. 1974). Käsittelyn monilla erilaisilla 2-ME-konsentraatioilla havaittiin indusoivan FFWO-tapahtuman pH:ssa 5,3, vaikka tämä konsentraatioiden väli vaihteli. 2-ME-yhdisteen indusoima fuusio matalassa pH:ssa on erittäin herkkä useille tekijöille sisältäen solujen nuorennusmäärät ja yksisolukerrosten konfluenssitason, jotka eivät ole yhtä kriittisiä fuusioprosessille sen jälkeen, kun on palattu neutraaliin pH:hon. Yksisolukerrosten käsittely 2-ME-yhdisteellä viruksen poissa ollessa ja virus-solukompleksien inkubaatio pH:ssa 5,3 2-ME-yhdisteen poissaollessa ei indusoi fuusiota. Pelkistävän aineen, jota tarvitaan FFWO-tapahtuman indusoimiseksi, erittäin alhaiset konsentraatiot antavat ehdottaa, että pelkistyvät kriittiset disulfidisidokset ovat erittäin venyneitä. Korkeat 2-ME-konsentraatiot eivät edistä fuusiota, mahdollisesti koska viruksen kuori tuhoutuu, ennen kuin fuusiotapahtuma voi tapahtua. Se, että Sindbis-viruksen välittämä FFWO tapahtuu matalassa pH:ssa matalien 2-ME-konsentraatioiden läsnä ollessa on yhdenmukaista sen kanssa, että viruksen kriittisten disulfidisidosten pelkistyminen on tärkeää virus-solufuusiolle. Lisäksi se voi selittää sen, että FFWO-tapahtuma tarvitsee palauttamisen neutraaliin pH-ympäristöön.

**Esimerkki 6**

**2-ME-yhdisteen vaikutus FFWO-tapahtuman vaatimaan infektiomonikerta-arvoon**

Fuusion induktio 2-ME-yhdisteellä matalassa pH:ssa vihjaa, että Sindbis-viruksen tehokkuus indusoida FFWO-tapahtumaa riippuu pelkistävästä tapahtumasta. Kuviossa 2 esitetään 2-ME-yhdisteen vaikutus tyypillisen Sindbis-viruksen välittämän FFWO-tapahtuman vaatimaan infektiomonikerta-arvoon. Tämä pelkistävä aine, kun se oli läsnä virus-solukompleksien lyhyen altistuksen aikana matalalle

pH:lle FFWO-tapahtuman aikana, kohotti fuusion tehokkuutta sen jälkeen, kun palautettiin neutraaleihin olosuhteisiin. 2-ME-käsiteltyjen yksisolukerrosten optimaalinen fuusio saatiin aikaan niinkin alhaisilla monikerroilla kuin 100 PFU/solu, kun taas monikertoja 500 - 1 000 PFU/solu tarvittiin tyypillisesti silloin, kun 2-ME-käsittelyä ei suoritettu. FFWO-tapahtuman vaatima korkea infektiomonikerta-arvo täytyy osittain heijastaa sitä frekvenssiä, jolla kiinnittyvät virionit muodostavat useita solukontakteja, solu-virus-solufuusiotapahtuman steeristä vaatimusta. Jos tämä fuusioilmiö riippuu tiolidisulfidivaihtoreaktiosta, korkean monikerran tarve voi myös heijastaa sitä frekvenssiä, jolla viruksen kriittiset disulfidisidokset assosioituvat sopivien tioliluovuttajien kanssa. Kohoaminen tiolien saatavuudessa johtuen eksogeenisesta pelkistävästä 2-ME-aineesta voi alentaa niiden virioneiden määrää, jotka tarvitaan tuottamaan maksimaalinen solu-solufuusio. Tätä tukee sen monikerta-arvon pieneneminen, jota tarvitaan maksimaalista fuusiota varten sen jälkeen, kun on lyhyesti altistettu 2-ME-yhdisteelle.

**Esimerkki 7**

**Tiolidisulfidivaihtoreaktiot Sindbis-viruksen penetraatiossa BHK-soluihin**

Esillä oleva keksintö esittää, että disulfidisidosten pelkistyminen Sindbis-viruksen vaipan jäykässä proteiiniristikkorakenteessa tarvitaan membraanifuusion sisääntulon aikana. DTNB on membraania läpäisemätön sulfhydryyliä blokeeraava reagenssi, joka modifioi kovalenttisesti sulfhydryylejä tiolidisulfidivaihtoreaktiolla. Koska ei suoraan vaikuta Sindbis-viruksen infektiivisyyteen (kuvio 3) tai BHK-solujen elinkykyyn, DTNB on erinomainen reagenssi kuvaamaan niitä tiolidisulfidivaihtoreaktioita, jotka tapahtuvat plasmamembraanilla Sindbis-viruksen penetraation aikana.

**Esimerkki 8**

**DTNB-yhdisteen vaikutus viruksen penetraatioon**

DTNB-yhdisteen vaikutus viruksen penetraatioon matalissa infektiomonikerroissa testattiin [$^3$H]uridiinin inkorporaatiolla viruksen RNA:han kolmessa käsittelyolosuhteessa, kuten on kuvattu esimerkissä 4 ja taulukossa I. Daktinomysiinin läsnä ollessa BHK-soluja käsiteltiin 30 minuuttia 1 mM DTNB-yhdisteen kanssa ennen viruksen adsorptiota 4 °C:ssa, viruksen penetraation aikana 37 °C:ssa tai välittömästi penetraatioajan jälkeen. Kussakin tapauksessa viruksen RNA testattiin viisi tuntia penetraatioajan jälkeen mittaamalla [$^3$H]uridiinin inkorporaatio TCA:lla saostuvaan materiaaliin. Solujen DTNB-käsittelyllä ennen infektiota oli pieni inhibitorinen vaikutus viruksen RNA-synteesiin, kun taas käsittely viruksen penetraation aikana inhiboi RNA:n tuottoa noin 40 prosenttiin verrokkitasoista. RNA-synteesin lasku, joka havaittiin, kun soluja käsiteltiin ennen infektiota, johtuu todennäköisesti epäonnistumisesta poistaa kaikkea lääkettä ennen infektiota. DTNB-käsittelyllä penetraation alkuvaiheen jälkeen oli rajoitettu inhibitorinen vaikutus. RNA-synteesin aleneminen tämän käsittelyn jälkeen voi kuitenkin johtua siitä tosiseikasta, että Sindbis-virusinfektio kohottaa solujen läpäisevyyttä, joka sallii joidenkin membraania läpäisemättömien reagenssien kulkeutumisen sytoplasmaan, jossa niillä voi olla sekundaarisia vaikutuksia.

DTNB-yhdisteen vaikutus Sindbis-viruksen penetraatioon määritettiin myös testaamalla plakkimuodostus, kuten on esitetty taulukossa I. Taulukossa I esitetyissä tutkimuksissa virus adsorboitiin yhtä suuriin määriin BHK-soluja yhden tunnin ajan 4 °C:ssa, korvattiin lämpimällä MEM-alustalla ja inkuboitiin 37 °C:ssa penetraation sallimiseksi. Soluja käsiteltiin 30 minuutin ajan (A) tai 60 minuutin ajan (B) 1 mM DTNB-yhdisteellä osoitetuissa aika-

pisteissä. Sitten yksisolukerrokset pestiin lääkkeen poistamiseksi ennen lisäinkubaatiota 37 °C:ssa DTNB-vapaassa alustassa. Tulokset ovat viiden toisistaan riippumattoman kokeen keskiarvoja ± keskiarvon keskihajonta. Viruksen kokonais-RNA määritettiin viisi tuntia sen jälkeen, kun solut oli lämmitetty 37 °C:seen penetraation aloittamiseksi. Yksisolukerrosten päälle laitettiin agaroosia ja värjättiin 48 tuntia infektion jälkeen neutraalipunalla.

Solujen esikäsittely DTNB-yhdisteellä johtaa pieneen plakkimuodostuksen inhibitioon, kun taas käsittely infektion aikana inhiboi plakkimuodostusta noin 46 %:iin käsittelemättömien verrokkien tasosta. Jälleen aleneminen, joka havaittiin plakkimuodostuksessa, kun yksisolukerroksia käsiteltiin DTNB-yhdisteellä ennen infektiota, mahdollisesti johtuu kyvyttömyydestä poistaa kaikkea reagenssia ennen infektiota. Käsittelyllä DTNB-yhdisteellä infektion jälkeen ei ole mitään inhibitorista vaikutusta plakkimuodostukseen, joka on yhdenmukaista sen kanssa, että RNA-tasojen lasku DTNB-käsittelyllä infektion jälkeen ei johtunut suorasta vaikutuksesta viruksen penetraatioon. Vaikka onkin paradoksaalista, hiukan korkeampi plakkimäärä, joka löydettiin soluviljelmistä, joita käsiteltiin infektion jälkeen, oli erittäin toistuvaa.

**Taulukko I**

**DTNB-yhdisteen vaikutus solujen penetraatioon Sindbis-viruksella**

| **Määritys** | **Käsittelyaika** | **% verrokista** |
|---|---|---|
| Viruksen RNA-synteesi | ennen peretraatiota | 82 ± 11 |
| | penetraation aikana | 40 ± 10 |
| | penetraation jälkeen | 81 ± 13 |
| Plakkimuodostus | ennen peretraatiota | 80 ± 11 |
| | penetraation aikana | 46 ± 10 |
| | penetraation jälkeen | 110 ± 13 |

Se mielenkiintoinen havainto, että Sindbis-viruksen penetraation inhiboi tehokkaimmin DTNB-yhdiste silloin, kun reagenssi on läsnä infektion aikana antaa ehdottaa, että kohteena olevat tioliryhmät ovat paljaana sisääntulon aikana, joka tapahtuu viruksen ja sen reseptorin välisellä ko-operatiivisella interaktiolla. Tämän interaktion ko-operatiivisuus ja nopea luonne voi muodostaa olosuhteet, joissa DTNB ei kykene tehokkaasti kilpailemaan viruksen disulfidisidoksen kanssa, jossa tapahtuu tiolidisulfidi-vaihtoreaktio. Sellaisilla reaktioilla on nopeat reaktio-nopeudet, noin $10^{-6}$ sekuntia pH:ssa 8,0, ja tehottomuus kriittisten tiolien alkylaatiossa johtaa kyvyttömyyteen täydellisesti blokeerata Sindbis-viruksen penetraatio.

Kuviossa 4 kuvataan E1-proteiinissa Sindbis-viruksen membraanipenetraation ja matalan pH:n indusoiman membraanifuusion aikana tapahtuvat konformationaaliset muutokset. Kuviossa 4A esitetään, että kypsän virionin glykoproteiini sisältää sekä toiminnalliset että rakenteelliset domeenit, jotka ottavat osaa membraanifuusioon ja vaipan ehjyyteen, vastaavasti. Kuviossa 4B esitetään, että ne konformationaaliset muutokset, joita reseptori-virus-interaktio tai altistus matalalle pH:lle indusoi, paljastavat kriittiset disulfidisidokset suosien sen jälkeistä disulfidisidosten uudelleenjärjestelyä. Kuviossa 4C esitetään, että kriittisten disulfidisidosten, jotka ovat vastuussa vaipan proteiini-proteiini-assosiaatioista, pelkistyminen hajottaa jäykän ikosahedraalisen proteiiniristikkorakenteen, joka sallii sen jälkeisen fuusion tapahtumisen solun membraanin kanssa. Suljetut laatikot osoittavat E1-E1-assosiaatioita; katkoviivoin piirretyt laatikot osoittavat fuusiopeptidiä.

Vaipallisten virusten fuusio solun membraanien kanssa penetraation aikana on proteiinivälitteinen, kuten ovat myös solun sisäiset ja solujen väliset fuusiotapahtumat. Vaippaproteiinin E1 fuusiodomeenin paljastuminen

ottaa osaa alfa-virusten fuusioon solun membraanien kanssa. Lisäksi esillä oleva keksintö esittää, että disulfidisidosten stabiloimat E1-E1-assosiaatiot vaipassa täytyy hajottaa, jotta membraanifuusio tapahtuu. Todennäköisin mekanismi Sindbis-viruksen vaipan proteiini-proteiini-interaktioiden hajottamiselle penetraation aikana on näiden stabiloivien disulfidisidosten pelkistys tiolidisulfidivaihtoreaktioilla.

Tiolidisulfidivaihtoreaktiot tapahtuvat disulfidisidoksen ionisoituneen tiolin nukleofiilisellä hyökkäyksellä ja se on erittäin riippuvainen ympäristön pH:sta, tiolin pKa-arvosta ja steerisistä esteistä. Kysteiinin välittämät tiolidisulfidivaihtoreaktiot tarvitsevat näin ollen neutraalin - alkalisen pH:n. Sindbis-viruksen HR-kannan välittämä FFWO-tapahtuma tarvitsee altistuksen pH:lle 5,3 niin, että sen jälkeen palautetaan pH, joka on suurempi kuin 6, fuusion indusoimiseksi. Fuusionopeus kohoaa, kun pH, johon virus-solukompleksit palautetaan kohoaa, ja fuusiota ei tapahdu siinä matalan pH:n raja-arvossa, jota tarvitaan fuusiota varten. Samalla tavalla viruksen vaipan nopea hajoaminen DTT-yhdisteen toimesta tarvitsee myös lyhyen altistuksen pH:lle 5,3, jota seuraa palautus neutraaliin pH:hon. Nämä havainnot vihjaavat neutraalin pH-ympäristön ehdotonta roolia tiolidisulfidivaihtoreaktiossa. Esillä olevan keksinnön opetukset kuvaavat, että virus-solufuusiota varten tiolidisulfidivaihtoreaktiot ovat kriittisiä fuusioprosessille.

Matalan pH:n välittämä FFWO-prosessi eroaa infektioprosessista siinä, että se vaatii viruksen korkeat monikerrat ja että se on proteiinireseptorista riippumaton. Kuitenkin molemmilla prosesseilla täytyy olla mekanismi vaipan proteiiniristikkorakenteen hajottamiseksi ennen fuusiota. Esillä oleva keksintö esittää, että molemmat tapahtumat ovat samalla tavalla riippuvaisia tiolidisulfidivaihtoreaktiosta. Hyvin alhaisten pelkistävän 2-ME-

aineen (joka, toisin kuin DTT ja biologiset tiolit, pelkistää tehokkaasti pH:ssa 5,3) konsentraatioiden lisäys edistää solufuusiota happamassa ympäristössä, joka antaa ehdottaa, että kriittisten disulfidisidosten kemiallinen pelkistys voi indusoida fuusion muutoin epäsuosiollisessa pelkistävässä ympäristössä. Erittäin alhaiset 2-ME-yhdisteen konsentraatiot, jotka tarvitaan tämän fuusion edistämiseksi vihjaavat, että pelkistyvät kriittiset disulfidisidokset ovat hyvin venyneissä konformaatioissa. Matalan pH:n indusoimat konformationaaliset muutokset vaippaproteiineissa voivat olla vastuussa näiden venyneiden kriittisten disulfidisidosten paljastumisesta ja voivat selittää matalan pH-altistuksen jälkeisen DTT-yhdisteen välittämän viruksen hajoamisen hyvin nopean in vitro luonteen.

Sindbis-viruksen penetraatioprosessi isäntäsoluun on reseptorista riippuvainen ja useita mahdollisia reseptoreita on tunnistettu. Viruksen interaktio solun pintareseptorin kanssa neutraalissa pH:ssa indusoi konformationaaliset muutokset viruksen glykoproteiinissa, jotka edeltävät penetraatiota. Esillä oleva keksintö esittää, että ko-operatiivinen interaktio reseptorin ja viruksen välillä indusoi konformationaaliset muutokset, jotka sallivat kriittisten disulfidisidosten pelkistymisen vaipan proteiineissa tiolidisulfidivaihtoreaktioilla. Edistyminen reseptorin indusoimista konformationaalisista muutoksista vaipan proteiiniristikkorakenteen hajoamiseen ja fuusioon edistyy todennäköisesti hyvin nopeasti. Se tosiasia, että stabiloivat disulfidisidokset ja kriittiset tiolit ovat luonnollisessa tilassaan saavuttamattomia sellaisille molekyyleille, kuten DTT ja DTNB, yhdistettynä siihen hyvin suureen nopeuteen, jolla pelkistystapahtuma tapahtuu reseptorin indusoimien konformationaalisten muutosten jälkeen, voivat selittää DTNB-yhdisteen tehottomuuden tämän prosessin blokeerauksessa. Tiolit, jotka välittävät pelkistystapahtumia, voivat sijaita joko reseptoriproteiinis-

sa tai viruksessa itsessään. Jälkimmäisessä tapauksessa disulfidisidosten uudelleenjärjestely, joka tapahtuu kiinnittymisen jälkeen, johtaa tarvittavaan vaipan proteiiniristikkorakenteen hajoamiseen. Sellaisessa mallissa viruksen interaktio sopivan reseptorin kanssa muuttaa E1-proteiinin konformaatiota suosien disulfidisidosten uudelleenjärjestelyä tiolidisulfidivaihtoreaktioilla. Tämä disulfidisidosten uudelleenjärjestely johtaa jäykkien proteiini-proteiini-assosiaatioiden hajoamiseen vaipassa sallien sen jälkeisen viruksen vaipan fuusioitumisen plasmamembraanin kanssa.

**Esimerkki 9**

**E1-SER$^{62}$-mutantin tuottaminen**

Niiden proteiinien rakenteet, joilla on tunnettu tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuus, kerättiin GeneBank-kokoelmasta. Vaikka näiden proteiinien toiminnallisten domeenien välillä ei ollut mitään absoluuttista konservoitunutta aminohapposekvenssiä, "luovuttajakysteiini" sijaitsi aina siinä proteiinidomeenissa, joka sisälsi positiivisesti varatut aminohapot. Todellakin, tiolireduktaasiaktiivisuutta näissä proteiineissa voidaan kohottaa kohottamalla tämän domeenin positiivista nettovarausta. Kaikkien tunnettujen alfa-virusten E1-glykoproteiinien aminohapposekvenssit tutkittiin. Tämä tutkimus paljasti kaksi kysteiiniä (62 ja 79), jotka olivat konservoituneita ja sijaitsivat domeeneissa, jotka olivat tyypillisiä tunnettujen tiolireduktaasiaktiivisuuksien positiivisesti varatuille domeeneille. Näin ollen mutaatio, joka poisti yhden näistä kysteiineistä, muutti viruksen ei-infektiiviseksi poistamalla tiolireduktaasiaktiivisuuden, joka assosioitui tähän domeeniin.

Kysteiinin mutaatio seriiniksi Sindbis-viruksen E1-glykoproteiinisekvenssin kohdassa 62 tuotettiin mega-aluke-PCR-mutageneesillä, kuten ovat kuvanneet Liu ja Brown, J. Cell. Biol. 120: 877 - 883 (1993). Kaksi aluketta, jot-

ka edustivat Sindbis Toto 1101 -kannan nukleotidisekvenssejä 9760 - 9779 (aluke A) ja nukleotideja 10445 -10436 (aluke B), valmistettiin "päiden alukkeiksi".

Aluke A = 5'-CGATGATGATTGGCGTAACT-3'

Aluke B = 5'-CGAAAAATCAAATCCTGCGGCTCC-3'

"Mutanttialuke", jossa oli muutos G-emäksestä C-emäkseksi, sisälsi nukleotidit 10236 - 10259.

5' CCAAAAATCAAATCCTGC 3'

G (villityyppi)

Mega-aluke muodostettiin lisäämällä mutanttialuketta ja aluketta B Toto-templaattiin niin, että tuotettiin ensimmäinen tuote: nukleotidista 10236 nukleotidiin 10445 niin, että siinä oli mutaatio ja SplI-katkaisukohta kohdassa 10381.

Mutanttimega-aluketta pidennettiin toisen restriktioentsyymikohdan sisällyttämiseksi yhdistämällä aluke A ensimmäisen PCR-reaktiotuotteen kanssa. Templaatti oli puhdistettu Toto 1101 -fragmentti, joka sisälsi nukleotidit 8571 - 10381, joka tuotettiin digestoimalla restriktioentsyymeillä StuI ja SplI. Toinen tuote oli nukleotideista 9760 - 10445 niin, että tarvittava mutaatio ja Bsiw- (nukleotidi 9804) ja SplI-katkaisukohdat (nukleotidi 10381) olivat läsnä.

Bsiw- ja ja SplI-entsyymejä käytettiin katkaisemaan nukleotidit 9804 - 10381 Toto 1101 -templaatista ja toisesta PCR-tuotteesta. Yllä kuvattu mutanttituote ligoitiin Toto 1101 -templaattiin villityypin sekvenssin tilalle, joka johti plasmidiin, joka sisälsi Sindbis-virussekvenssin, jossa oli emässusbstituutio kysteiinistä seriiniksi kohdassa 62. Tämä plasmidi amplifioitiin E. coli -bakteerissa ja plasmidista in vitro transkriptiolla tuotettua RNA:ta käytettiin transfektoimaan BHK-21-solut (nisäkäs) niin, että tuotettiin kuviossa 5 esitetty virus.

Tämä esillä olevan keksinnön mukainen klooni käyttää SP6-promoottoria tuottamaan kloonista lähetti-RNA:ta,

joka on identtistä koskemattoman viruksen RNA:n kanssa, kun kloonia käytetään ohjelmoimaan in vitro transkriptioreaktio. Kun tämän reaktion RNA-tuote transfektoitiin viljeltyihin nisäkässoluihin, se johti infektioon, joka edistyi samanlaisella tavalla kuin se, joka saatiin aikaan koskemattomalla viruksella (katso kuvio 5). Tuotettiin kypsiä viruksia, jotka ovat rakenteellisesti ja biokemiallisesti erottamattomia normaaleista viruksista (lukuunottamatta seriinisubstituutiota). Näiden viruspartikkelien havaittiin kuitenkin olevan täysin ei-infektiivisiä standarditestimenetelmissä.

Esillä oleva keksintö esittää, että viruksen membraanin glykoproteiineissa tapahtuu konformationaalisia muutoksia, kun virus interaktoi solun pintareseptorin kanssa. Tämä konformationaalinen muutos on välttämätön membraanipenetraatioprosessille. Konformationaalinen muutos paljastaa tioliryhmän, joka voi kemiallisesti reagoida tiolia blokeeraavan aineen, ditionitrobentseenin, kanssa. Tämän aineen reaktio tämän tiolin kanssa blokeeraa viruksen penetraatioprosessin. Kriittinen kohdetioli on joko solun pintareseptoriproteiinissa tai viruksen membraanin glykoproteiinissa.

Esillä oleva keksintö esittää suoran geneettisen todisteen, että sekä tioliluovuttaja ja disulfidikohde molemmat sijaitsevat viruksen E1-glykoproteiinissa ja että proteiinidomeenissa, joka ympäröi kysteiiniä 62 ja sisältää sen E1-sekvenssissä, on samanlainen aktiivisuus kuin tunnetussa tiolireduktaasi/proteiini-isomeraasissa.

**Esimerkki 10**

**Corona-virus**

Tiolia blokeeraavan DTNB-aineen vaikutus solujen infektioon corona-malliviruksella, hiiren hepatiittiviruksella, on esitetty kuviossa 6. Kudosviljeltyjä soluja käsiteltiin DTNB-yhdisteellä ennen virusinfektiota, sen aikana ja jälkeen, kuten on osoitettu. Viruksen RNA eristet-

tiin ja virus RNA samasta määrästä soluja erotettiin geelielektroforeesilla. Densitometrimittaukset paljastivat, että kuuden virus-RNA-lajin määrä aleni 50 %:lla, kun DTNB-yhdistettä oli läsnä infektion aikana. DTNB ei merkittävästi muuttanut RNA:n määrää, joka tuotettiin käsittelyä ennen ja sen jälkeen suositetuissa kokeissa verrattuna verrokkiin, jossa mitään DTNB-yhdistettä ei lisätty (oikeanpuoleisin kaista). Näin ollen hiiren hepatiittiviruksen tulokset ovat vastaavanlaisia niiden kanssa, jotka havaittiin Sindbis-viruksen kanssa ja osoittavat, että tiolidisulfidivaihtoreaktio on kriittinen solujen infektiolle membraania sisältävillä corona-viruksilla.

Kaikki tässä patenttihakemuksessa mainitut patentit ja julkaisut osoittavat alan asiantuntijoille keksinnön koskeman alan tasoa. Kaikki patentit ja julkaisut on liitetty tähän viitteeksi samassa laajuudessa kuin kukin yksittäinen julkaisu olisi spesifisesti ja yksittäisesti osoitettu liitetyksi viitteeksi.

Alan asiantuntija huomaa helposti, että esillä oleva keksintö soveltuu hyvin suorittamaan ne aiheet ja muodostamaan ne päämäärät ja edut, jotka on mainittu kuin myös ne, jotka kuuluvat siihen sisäisesti. Esillä olevat esimerkit yhdessä menetelmien, prosessien, käsittelyiden, molekyylien ja spesifisten yhdisteiden kanssa, jotka tässä on kuvattu tällä hetkellä suositeltavia suoritustapoja edustavina, ovat kuvaavia eikä niiden ole tarkoitettu olevan keksinnön piiriä rajoittavia. Alan asiantuntijat keksivät siihen muutoksia ja sille muita käyttöjä, joiden on tarkoitettu kuuluvan keksinnön henkeen, kuten on määritelty patenttivaatimusten piirissä.

## Sekvenssiluettelo

**(1) Yleistiedot:**

(i) Hakija: Brown, Dennis

(ii) Keksinnön otsikko: Uudet mutatoidut virukset, virusten vastaiset aineet ja menetelmät rokotteiden valmistamiseksi

(iii) Sekvenssien määrä: 3

(iv) Vastausosoite:

(A) Vastaanottaja: James F. Weiler, asianajaja

(B) Katu: One Riverway, Suite 1560

(C) Kaupunki: Houston

(D) Valtio: Texas

(E) Maa: USA

(F) Postinumero: 77056

(v) Tietokoneella luettava muoto:

(A) Alustatyyppi: levyke

(B) Tietokone: IBM PC -koneen kanssa yhteensopiva

(C) Käyttöjärjestelmä: PC-DOS/MS-DOS

(D) Ohjelma: WordPerfect 6.0

(vi) Nykyiset hakemustiedot:

(A) Hakemusnumero:

(B) Rekisteröintipäivämäärä: 3-21-95

(C) Luokitus:

(viii) Asianajajan/asiamiehen tiedot:

(A) Nimi: Weiler, James F.

(B) Rekisterinumero: 16 040

(C) Viite/luettelonumero: D-5712 PCT

(ix) Tietoliikenneyhteystiedot:

(A) Puhelin: 713-626-8646

(B) Telefax: 713-963-5853

**(2) Tiedot sekvenssille numero 1:**

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 20

(B) Tyyppi: nukleiinihappo

(C) Juosteisuus: kaksijuosteinen

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylityyppi:

(A) Kuvaus: muu nukleiinihappo

(iii) Hypoteettinen: ei

(iv) Antisense: ei

(vi) Alkuperäinen lähde:

(B) Kanta:

(C) Yksittäinen isolaatti:

(D) Kehitysaste:

(F) Kudostyyppi:

(G) Solutyyppi:

(H) Solulinja:

(xi) Sekvenssin kuvaus: Sekvenssi numero 1:

CGATGATGAT TGGCGTAACT 20

**(3) Tiedot sekvenssille numero 2:**

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 34

(B) Tyyppi: nukleiinihappo

(C) Juosteisuus: kaksijuosteinen

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylityyppi:

(A) Kuvaus: muu nukleiinihappo

(iii) Hypoteettinen: ei

(iv) Antisense: ei

(vi) Alkuperäinen lähde:

(B) Kanta:

(C) Yksittäinen isolaatti:

(D) Kehitysaste:

(F) Kudostyyppi:

(G) Solutyyppi:

(H) Solulinja:

(xi) Sekvenssin kuvaus: Sekvenssi numero 2:

CGAAAAATCA AATCCTGCGG CTCC 34

**(4) Tiedot sekvenssille numero 3:**

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 18

(B) Tyyppi: nukleiinihappo

(C) Juosteisuus: kaksijuosteinen

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylityyppi:

(A) Kuvaus: muu nukleiinihappo

(iii) Hypoteettinen: ei

(iv) Antisense: ei

(vi) Alkuperäinen lähde:

(B) Kanta:

(C) Yksittäinen isolaatti:

(D) Kehitysaste:

(F) Kudostyyppi:

(G) Solutyyppi:

(H) Solulinja:

(ix) Ominaisuus:

(A) Muu:

(xi) Sekvenssin kuvaus: Sekvenssi numero 3:

CCAAAAATCA AATCCTGC 18

## Patenttivaatimukset

1. Ei-infektiivinen mutatoitu alfa-virus, joka on sopiva käytettäväksi rokotteen valmistukseen, t u n n e t t u siitä, että mainittu virus on mutatoitu korvaamalla konservoitunut kysteiiniaminohappo erilaisella aminohapolla, ja jossa mainittu konservoitunut kysteiini on virusproteiinin domeenissa, joka on vastuussa tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuudesta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu alfa-virusmutantti on mutatoitu Sindbis-virus.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu mutatoitu Sindbis-virus on E1-$SER^{62}$-mutantti.

4. Ei-infektiivistä virusta koodittava rekombinantti-DNA-plasmidi ja säätelylementit, joita tarvitaan mainitun DNA:n ekspressoimiseksi solussa, t u n n e t t u siitä, että mainittu virus mutatoidaan korvaamalla konservoitunut kysteiiniaminohappo erilaisella aminohapolla, ja jossa mainittu konservoitunut kysteiini on virusproteiinin domeenissa, joka on vastuussa tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuudesta.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu solu on nisäkässolu.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu hiiva valitaan ryhmästä, joka sisältää Saccharomyces-, Pichia- ja Kluyveromyces-hiivat.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu bakteerisolu valitaan ryhmästä, joka sisältää E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, Pseudomonas, Streptomyces ja Staphylococcus-bakteerit.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu nisäkässolu valitaan ryhmästä, joka sisältää BHK-21-, HeLa-, CHO- ja Vero-solut.

9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu mutatoitu virus valitaan ryhmästä, joka sisältää alfa-virukset ja corona-virukset.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu alfa-virusmutantti on mutatoitu Sindbis-virus.

11. Patenttivaatimuksen 5 mukainen plasmidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu mutatoitu Sindbis-virus on E1-$SER^{62}$-mutantti.

12. Transfektoitu solu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 4 mukaisen plasmidin.

13. Transfektoitu solu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 11 mukaisen plasmidin.

14. Ei-infektiivinen mutatoitu virus, t u n n e t t u siitä, että sitä tuottaa patenttivaatimuksen 12 mukainen transfektoitu solu.

15. Ei-infektiivinen mutatoitu virus, t u n n e t t u siitä, että sitä tuottaa patenttivaatimuksen 13 mukainen transfektoitu solu.

16. Menetelmä virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheen, jossa saatetaan mainittu virus kosketukseen sellaisen yhdisteen kanssa, joka inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa.

17. Viruksen vastainen aine virusinfektion leviämisen inhiboimiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu viruksen vastainen aine inhiboi tiolireduktaasi/proteiinidisulfidi-isomeraasiaktiivisuutta mainitussa viruksessa.

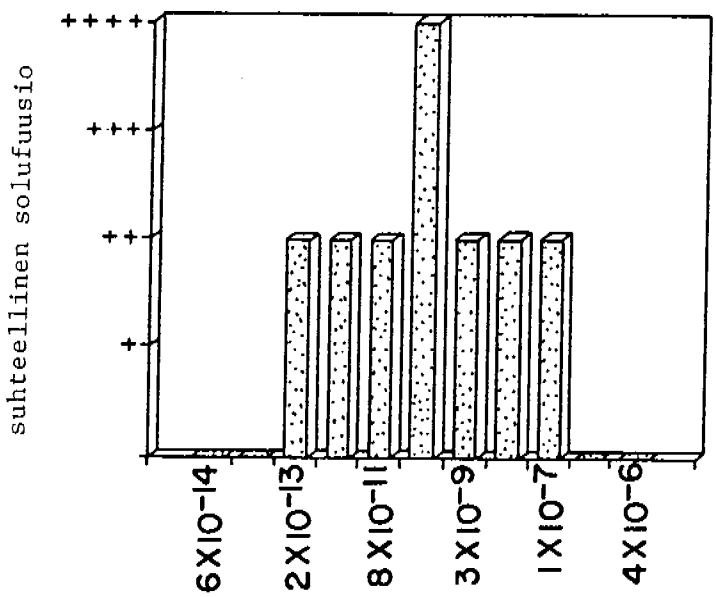


FIG. 1

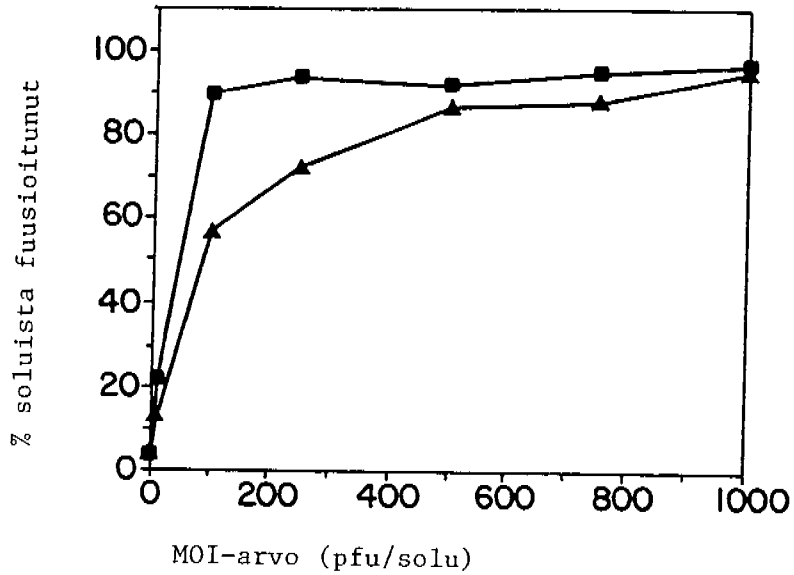


FIG. 2

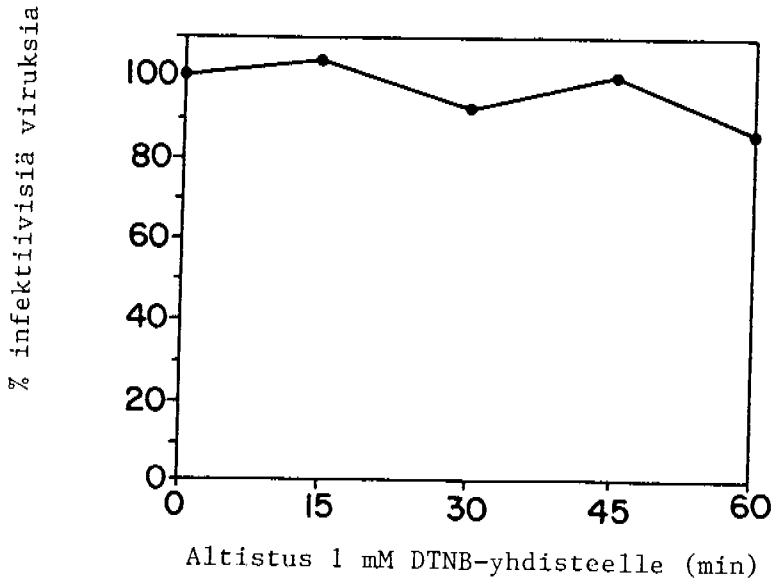


FIG. 3

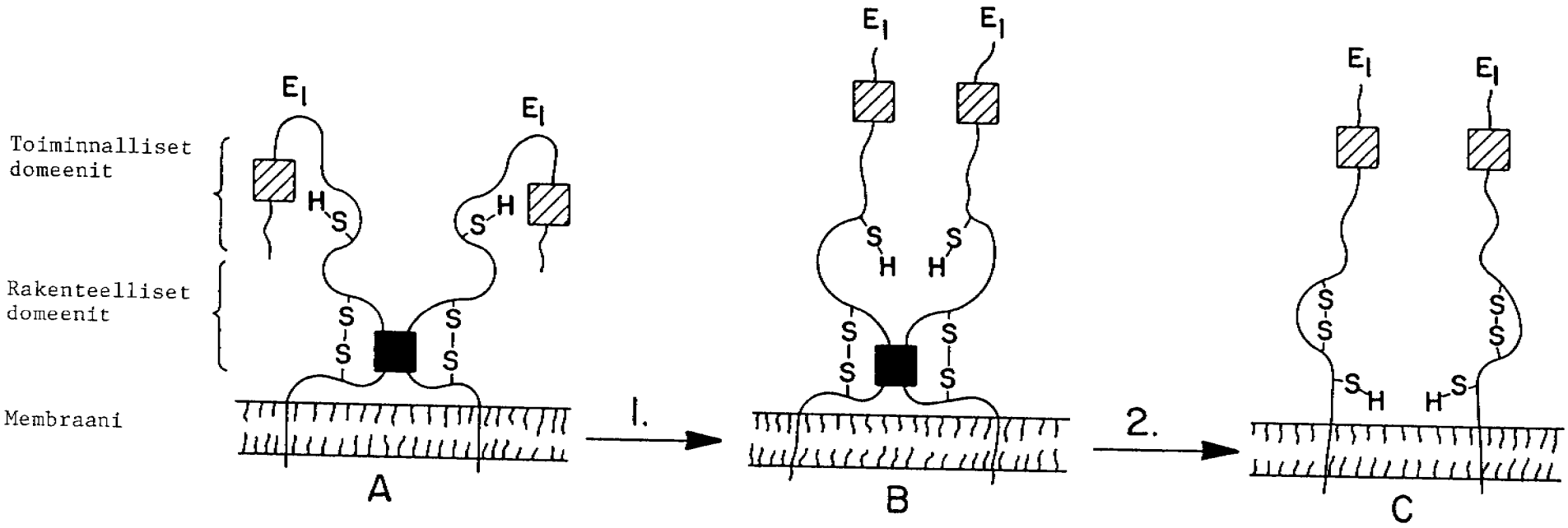
Toiminnalliset domeenit
Rakenteelliset domeenit
Membraani
E1
E1
H
S
S
S
S
S
A
1.
E1
E1
S
H
S
H
S
S
S
S
B
2.
E1
E1
S
S
S
S
S
H
H
S
C

FIG. 4

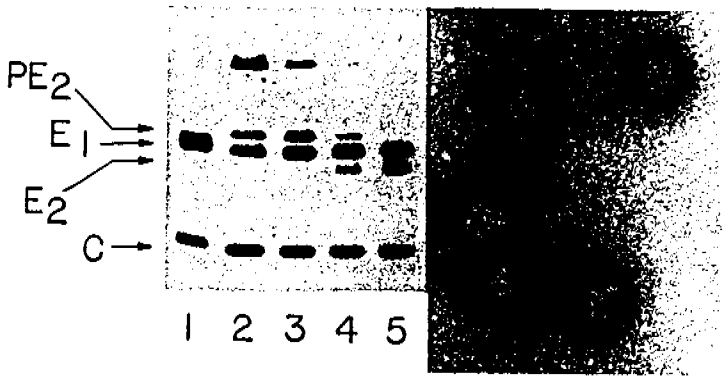


FIG. 5

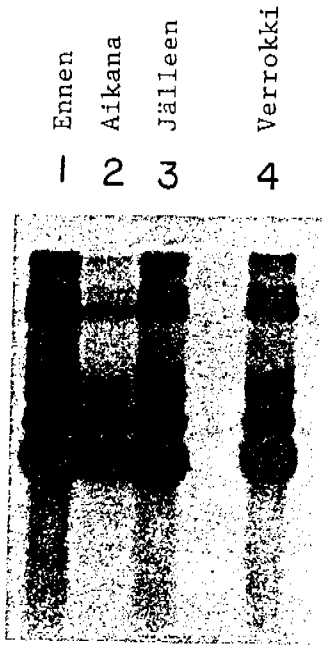


FIG. 6