

ÖZET
MODİFİYE SENDAI VİRÜS AŞISI VE GÖRÜNTÜLEME VEKTÖRÜ

- 5 Mevcut buluş bir Sendai virüsü veya rekombinant Sendai virüsü vektörü ile ilgilidir. Özellikle mevcut buluş, modifiye edilmiş bir Enders suşu Sendai viral vektörü için yöntemler, vektörler, formülasyonlar, bileşimler ve kitler sağlar. Bir immünojenik vektör, herhangi bir in vitro veya in vivo sistemde kullanılabilir. Ayrıca, bazı uygulamalar, virüs büyümesini, konumunu ve bulaşmasını görüntülemek için vektörleri içerir.

İSTEMLER

1. Modifiye bir Sendai viral vektörünü içeren bir rekombinant Sendai viral vektörü olup, modifiye Sendai vektörü aşağıdakileri içerir:

5

Sendai virüsü NP polipeptid dizisi SEQ. ID. NO: 5,
 Sendai virüsü P polipeptid dizisi SEQ. ID. NO: 7,
 Sendai virüsü M polipeptid dizisi SEQ. ID. NO: 11,
 Sendai virüsü F polipeptid dizisi SEQ. ID. NO: 13,
 10 Sendai virüsü HN polipeptid dizisi SEQ. ID. NO: 15 ve
 Sendai virüsü L polipeptid dizisi SEQ. ID.NO: 17.
2. İstem 1'e göre rekombinant Sendai viral vektörü olup, burada bahsedilen vektör immünojeniktir.

15
3. İstem 1 veya 2'ye göre rekombinant Sendai viral vektörü olup, bir N-P, bir P-M, bir M-F, bir F-HN, bir HN-L ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen bir veya birden fazla intergenik bağlantıya eklenen yabancı bir gen(ler)e sahiptir.

20
4. İstem 4'e göre rekombinant Sendai viral vektörü olup, burada bahsedilen yabancı gen bir lusiferaz, bir yeşil flüoresan protein ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilir.

25
5. İstemler 1, 2, 3, 4 veya 5'e göre rekombinant Sendai viral vektörü olup, burada en az bir gen başlatma/durdurma bölgesi, gen transkripsiyonunu değiştirmek için manipüle edilir.

30
6. İstemler 1, 2, 3, 4, 5 veya 6'ya göre rekombinant Sendai viral vektörü olup, burada bahsedilen yabancı gen, bir respiratuar sinsityal virüs (RSV) F proteini; respiratuar sinsityal virüs (RSV) G proteini; parainfluenza virüsü tip 1 (PIV-1) proteini; parainfluenza virüsü tip 2 (PIV-2) proteini; parainfluenza virüsü tip 3 (PIV-3) proteini, parainfluenza virüsü tip 4 (PIV-4) proteinini içeren gruptan seçilir.

35

7. İstem 4'e göre rekombinant Sendai virüsü vektörü olup, burada bahsedilen yabancı gen bir raportör gendir.
- 5 8. İstem 1, 2, 3, 4, 5, 6 veya 7'ye göre Sendai viral vektörü veya rekombinant Sendai viral vektörü olup, bir hayvanın aşılınması için bir yöntemde kullanılmak içindir.
9. İstemler 1-8'den herhangi birine göre Sendai viral vektörü ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya seyreltici veya herhangi bir taşıyıcı, adjuvan
10 veya seyreltici içeren bir bileşimdir.
10. İstemler 1-7'den herhangi birine göre rekombinant Sendai viral vektörü ve istem 8'e göre kullanım için Sendai viral vektörü veya rekombinant Sendai viral vektörü, veya İstem 9'e göre bileşim olup, burada bahsedilen yabancı gen bir
15 Sendai virüsü P geni ve bir Sendai virüsü M geni arasına eklenir;
burada bahsedilen yabancı gen, bir Sendai virüsü M geni ve bir Sendai virüsü F geni arasına eklenir; veya
burada bahsedilen yabancı gen, bir Sendai virüsü F geni ve bir Sendai virüsü HN geni arasına eklenir.
20
11. İstemler 1-8'den herhangi birine göre rekombinant Sendai viral vektörü olup, burada bahsedilen vektör en az bir başka antijen veya immünojen ile karıştırılır.

TARİFNAME

MODİFİYE SENDAI VİRÜS AŞISI VE GÖRÜNTÜLEME VEKTÖRÜ

BULUŞ SAHASI

5

Mevcut buluş, rekombinant virüs vektörleri, vektörleri oluşturma yöntemleri ve bu türlü vektörlerin kullanımı ile ilgilidir. Özellikle mevcut buluş, patojenlere karşı koruma için modifiye edilmiş bir Enders suşu Sendai viral vektörü için yöntemler, rekombinant virüs yapıları ve bileşimleri ve kitler sağlar. Ayrıca, bazı yönler viral yayılımı, klirensi ve bulaşmayı görüntüleme veya izleme için vektörleri içerir.

10

BULUŞUN ALT YAPISI

Aşı, enfeksiyöz hastalıkların kontrolü için tek etkili mekanizmadır, ancak aşılardan olmadığı birçok patojen bulunmaktadır. Örneğin, paramiksovirüsler, insan solunum sinsityal virüsü (RSV), parainfluenza virüsleri (PIV'ler), insan metapnömovirüsü, kızamık virüsü ve kabakulak virüsü (Brown et al. 2007 J. Virol 81: 12535, Hall et al., 2009 N. Engl. J. Med. 360:588) gibi solunum yolu yoluyla iletilen bir takım önemli insan patojenlerini içerir. İnsan PIV'leri (hPIVs), dört serotipten (hPIV1-4) oluşur ve RSV ve metapneumovirüs ile birlikte, çocuklarda solunum yolu viral enfeksiyonlarının en yaygın nedenleridir. PIVler, RSV ve metapneumovirüs, doğrudan temas ve nazofaringeal sekresyonlara maruziyet yoluyla etkili bir şekilde bulaşır (Hall et al., 2009 N. Engl. J. Med. 360:588; Hall et al., 1981 J. Pediatr. 99:100). Neredeyse bütün çocuklar RSV ile 1 yaşına kadar hPIV3 ile 2 yaşına kadar ve hPIV1 ve hPIV2 ile 5 yaşına kadar enfekte olurlar (Schickli et al. 2009 Hum. Vaccin. 5:582; Graham et al. 2011 Immunol. Rev. 239 :146). Amerika Birleşik Devletlerinde, RSV, bir RSV sezonunda küçük çocuklara %20'ye varan oranlarda hastaneye yatmasına neden olabilir ve yıllık maliyeti 0,4 milyar dolar gibi yüksek bir seviyededir (Hall et al. 2009 N. Engl. J. Med. 360:588; Schickli et al., 2009 Hum.Vaccin, 5:582, Graham et al., 2011 Immunol, Rev. 239:146, Shay et al., 30 J. Infect, Dis 183:16, Shay et al., 1999 JAMA 282: 1440; Paramore et al., 2010 Pediatr Pulmonol 45:578, Hall et al., 2001 N. Engl. J. Med. 344:1917, Bourgeois et al., 2009 Pediatri 124:e1072, Boyce et al., 2000 J. Pediatr. 137:865). Bronşiolit ve pnömoni olan hastalar için RSV, sırasıyla %90 ve %50 vakada etiyolojik ajan olarak tanımlanmıştır (Paramore et al. 2010 Pediatr. Pulmonol. 45: 578; Hall et al. 2001 N. Engl). J. Med. 35 344: 1917). Bu insan patojenlerinin hiçbirisi için lisanslı aşı bulunmamaktadır.

Sendai virüsü (SeV), atraktif bir aşı ve aşı vektörü içerir. İki virüs arasındaki amino asit dizisi ve antijenik benzerliklere dayanan laringotrakeobronşitin (pediatrik krup) başlıca nedeni olan hPIV-1 için bir Jennerian aşısı olarak hareket edebilir (Gorman et al. 1990 Virology 175: 211; Dave et al. 1994 Virology 199: 376; Smith et al., 1994 Virology 205: 453). SeV, aynı zamanda, seçilen herhangi bir başka patojen(ler)e karşı aşılabilen rekombinant aşılar üretmek için ters genetik tarafından da manipüle edilebilir. Sendai virüs tabanlı bir vektörün arzu edilebilirliği, aşağıdakilere bağlıdır: (i) ters genetik tarafından kolay kurtarılma kapasitesi, (ii) *in vivo* ve *in vitro* virüs izlemesi için bir markör gen taşıma kapasitesi, (iii) ekspresyon desteği ve ilgili genler SeV genomunda farklı pozisyonlara dahil edildiğinde yabancı proteinlerin immünojenikliği, (iv) primatlarda sınırlı büyüme, (v) primatlarda aşılama ve immünojenisiteyi desteklemek için uygun replikasyon yeterliliği. HPIVs ve RSV, savunmasız çocuk, bebek ve yaşlı popülasyonunda solunum yolu viral hastalık enfeksiyonlarının çoğuna neden olduğundan, insanları parainfluenza virüsü ve respiratuar sinsityal virüs enfeksiyonlarından korumak için yeni yöntemler ve bileşimlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Sendai Virüsünün Enders suşu, örneğin Vaccine, 26, 2008, 3480-3488'de gösterildiği gibi teknikte iyi bilinmektedir.

US2010/196993, 214 pozisyonunda bir modifikasyona sahip olan mutant bir L proteini ile suş z'ye dayanan modifiye edilmiş bir rekombinant Sendai virüsü vektörünü tarif etmektedir.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

25

Mevcut tarifnamenin ilgili olduğu buluş, bu buluşa eklenen istemlerde belirtilmiştir.

Mevcut buluş, rekombinant virüs vektörleri, vektörleri oluşturma yöntemleri ve bu vektörlerin kullanımı ile ilgilidir. Bir yönüyle mevcut buluş, patojenlere karşı koruma için modifiye edilmiş bir Enders suşu Sendai viral vektörü için yöntemler, rekombinant virüs yapıları ve bileşimleri ve kitler sağlar. Bazı yönleri, viral yayılımı, klirensi ve bulaşmayı görüntüleme veya izleme için vektörleri içerir. Bir yönüyle, buluş aşağıdaki özelliklere sahip yeni bir rekombinant Sendai virüsü aşısı vektörü ile ilgilidir: ((i) ters genetik tarafından kolay kurtarılma kapasitesi, (ii) *in vivo* ve *in vitro* virüs izlemesi için bir markör gen taşıma kapasitesi, (iii) ekspresyon desteği ve ilgili genler SeV genomunda

farklı pozisyonlara dahil edildiğinde yabancı proteinlerin immünojenikliği, (iv) primatlarda sınırlı büyüme, (v) primatlarda aşılama ve immünojenisiteyi desteklemek için uygun replikasyon yeterliliği. Ayrıca, bazı yönler ayrıca (vi) 33°C'de sınırlı büyüme ve 37°C'de daha az büyüme özelliği sağlar. Açıklanan yönler, beklenmedik bir virüs vektörü atenüasyon dengesi, virüs vektörü büyümesi, yabancı gen ekspresyonu için kapasite ve bu arzu edilen özelliklerin her birini desteklemek için immünojenisite sergiler.

Bir yönüyle, buluş, modifiye edilmemiş Enders veya Z suşları dahil olmak üzere diğer SeV vektörlerine beklenmedik şekilde üstün olan, kolayca kurtarılabilen ve primatlarda hem atenüasyon hem de immünojeniklik sergileyebilen bir vektör sağlar. Bir aşı olarak kullanımına ek olarak, mevcut buluş, bir yönüyle, yöntemler, rekombinant virüs yapıları ve formülasyonları ve kitlerinin, bu Sendai virüs vektörünün bir laboratuvar aracı olarak veya bir klinik öncesi/klinik araştırma ortamında kullanılmasını kolaylaştıracığı üzerinde durmaktadır.

Mevcut buluşun amacı paramiksovirüslere karşı koruma ile sınırlı olmamakla birlikte, ilgili bir immünojeni kodlayan herhangi bir yabancı genin (veya bunun bir bölümünün), bu buluşun uygulamalarının aşı vektörüne dahil edilebileceği üzerinde durulmaktadır. Örneğin, sınırlayıcı olmaksızın, mevcut buluşta, yabancı genin bir patojen/hastalığı hedefleyen ilgili fragmanlar, homologlar, analoglar ve herhangi bir başka gen dahil olmak üzere RSV, PIV ve HIV'den genler arasından seçilen uygulamalar üzerinde durulmaktadır. Ayrıca bir yönüyle, buluş, bir solunum sinsityal virüs (RSV) proteini, bir insan parainfluenza (hPIV) proteini, bunun bir antijenik fragmanı ve bunların kombinasyonlarından en az birini kodlayan bir yabancı geni içeren bir rekombinant Sendai viral vektörü üzerinde durulmaktadır. Bazı yönleriyle, yöntem ayrıca, rekombinant Sendai viral vektörünü içerir, burada RSV proteini, bir tip A protein G, bir tip A protein F, bir tip B protein G ve bir tip B protein F grubundan seçilir. Yöntem ayrıca, rekombinant Sendai viral vektörünü içerir, burada hPIV proteini, bir tip 1 protein HN, bir tip 1 protein F, bir tip 2 protein HN, bir tip 2 protein F, bir tip 3 protein HN ve bir tip 3 protein F grubundan seçilir.

Yine başka bir yönüyle, buluş, bir respiratuar sinsityal virüs (RSV) proteininin en az birini kodlayan bir yabancı gene sahip bir modifiye Enders suşu Sendai genomu içeren rekombinant bir Sendai viral vektörü üzerinde durulmaktadır. Bazı yönleriyle,

rekombinant Sendai viral vektörü, bir Sendai virüsü F geni ve bir Sendai virüsü HN geni arasında bahsedilen yabancı geni içerir.

Yine başka bir açıdan, yabancı gen veya genler herhangi bir patojenden başka bir yabancı antijen olabilir.

Yine başka yönleriyle yabancı gen, bir Sendai virüsü P geni ve bir Sendai virüsü M geni arasına eklenir. Yine başka yönleriyle yabancı gen, bir Sendai virüsü M geni ve bir Sendai virüsü F geni arasına eklenir.

10

Diğer yönleriyle, rekombinant Sendai viral vektörü, bir enfeksiyöz virüs vektörünün cDNA'dan kurtarılmasını kolaylaştırmak ve virüsün atenüasyonunu ancak primatlarda immünojenik olmasını sağlamak için bir Enders/Z suşu kimera içeren modifiye bir Enders aşısının yaratılması için yöntemler içerir. Bir yönüyle, Enders/Z suş kimera bir vektördür, burada, Enders suşunun L geninin bir bölümü, Sendai virüsünün Z-suşundan karşılık gelen bölümle değiştirilir. Bir yönüyle, Sendai virüsü L geni, Z suşundan aşağıdaki amino asit değişikliklerini kodlayan nükleik asidi içerecek şekilde modifiye edilmiştir: 155. pozisyonda S ile G, 258. pozisyonda R ile K, 466. pozisyonda G' ile E, 482. pozisyonunda G ile E, 581. pozisyonunda S ile R, 717. pozisyonunda Q ile R, 800. pozisyonunda T ile I ve 852. pozisyonunda R ile K arasındadır.

20

Başka bir yönüyle, mevcut buluş, rekombinant Sendai viral vektörünü ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya seyreltici veya herhangi bir taşıyıcı, adjuvan veya seyreltici içeren bir bileşim üzerinde durulmaktadır.

25

Mevcut buluş, aşağıdakileri içeren bir yöntem üzerinde durmaktadır: a) i. RSV'ye karşı aşılama ihtiyacı olan bir hasta; ii. burada tarif edilen ve burada bir RSV geni veya bunun bir bölümünü içeren yeni Sendai vektörlerinden birinin; ve b) bahsedilen bileşimi, bir immünite yanıtı oluşturmak için etkili bir miktarda bahsedilen hastaya uygulanmasının sağlanması.

30

Yine bir başka yönüyle, mevcut buluş, bir NP, PM, bir MF, F-HN ve HN-L gen bağlantıları veya genom içindeki diğer herhangi bir pozisyonu(ları) içeren gruptan seçilen bir intergenik bağlantı arasına eklenen yabancı bir gen (veya bunun bir bölümü) ile modifiye edilmiş bir Enders suşu Sendai genomu içeren bir rekombinant Sendai viral

35

vektörünü sağlar. Bir uygulamada yabancı gen bir raportör gendir. Bir özelliğe göre, raportör gen, lusiferaz olabilir, ancak başka bir yönüyle, başka herhangi bir raportör gen olabilir (örneğin, bir flüoresan proteini kodlayan bir gen).

- 5 Başka yönlerde, Sendai virüs vektör genomundaki transkripsiyon başlatma veya durdurma dizileri, aşağı yönde genlerin transkripsiyonunu arttırmak veya azaltmak için değiştirilebilir. Örneğin, Sendai virüsü F geninin yukarı yöndeki Sendai virüsü transkripsiyon başlatma dizisi, Sendai virüs genomunun M ve F genleri arasına yerleştirilen eklenen bir yabancı genin aşağı yönde transkripsiyonunu arttırmak için
- 10 AGGGATAAAG'dan (SEQ. ID. NO.:19) AGGGTGAAAG'ye (SEQ. ID. NO.:20) dönüştürülebilir.

Mevcut buluş aşağıdakileri içeren bir kit üzerinde durmaktadır: a) i) adjuvan içeren veya içermeyen bir Sendai virüsü vektörü (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni

15 vektörlerin birinin); ve ii) hedeflenen bir patojene karşı aşılama için kullanım talimatlarının sağlanması.

Mevcut buluş aşağıdakileri içeren bir kit üzerinde durmaktadır: a)

i) adjuvanlı veya adjuvan içermeyen ve/veya başka bir aşı ile kombinasyon halinde

20 bir Sendai virüsü vektörünün; ve ii) hedeflenen bir patojene karşı aşılama için kullanım talimatlarının sağlanması.

Mevcut buluş aşağıdakileri içeren bir kit üzerinde durmaktadır:

a) i) bir markör geni taşıyan bir vektörün; ve ii) virüsü görselleştirmek için kullanım

25 talimatlarının sağlanması.

Bir yönüyle, mevcut buluş, modifiye bir L içeren bir Enders/Z kimera oluşturmak için Enders Sendai virüsü suşu genomuna bir Z suş genomunun eklendiği modifiye Sendai viral vektörü içeren bir rekombinant Sendai viral vektör tasarlanmaktadır, burada

30 bahsedilen modifiye L geninin 155. pozisyonda S ile G, 258. pozisyonda R ile K, 466. pozisyonda G ile E, 482. pozisyonda G ile E, 581. pozisyonda G ile E, 717. pozisyonda Q ile R, 800. pozisyonunda T ile I, 852. pozisyonunda R ile K arasında ve bunların kombinasyonlarını içeren gruptan seçilen nükleik asit kodlayan amino asit içerir.

Daha başka yönleriyle burada açıklanan bir rekombinant Sendai viral vektörü ayrıca immünojenik özelliklere sahip bir vektör içerir.

Diğer yönleriyle yukarıda açıklanan rekombinant Sendai viral vektörleri olup ayrıca, bir
5 NP, bir PM, bir MF, bir F-HN, bir HN-L ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen bir veya birden fazla intergenik bileşimi içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan herhangi bir pozisyon(lar)a eklenmiş yabancı gen(ler)e sahiptir.

Yine başka yönleriyle, yabancı bir gene sahip rekombinant Sendai viral vektör olup,
10 burada bahsedilen yabancı gen, *in vitro*, *in vivo* veya bunların kombinasyonlarının virüs takibini kolaylaştırır.

Bir başka yönüyle, rekombinant Sendai viral vektörü olup, burada bahsedilen izleme için bahsedilen yabancı gen, bir lusiferaz, bir yeşil floresan proteini ve bunların
15 kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilir.

Başka yönleriyle burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada en az bir gen başlatma/durdurma bölgesi, gen transkripsiyonunu değiştirmek için manipüle edilir.
20

Bir başka yönüyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada bahsedilen yabancı gen bir respiratuar sinsitiyal virüs (RSV) F proteinidir.

Diğer yönleriyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada
25 bahsedilen yabancı gen bir respiratuar sinsitiyal virüs (RSV) G proteinidir.

Diğer yönleriyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada bahsedilen yabancı gen bir parainfluenza virüsü tip 1 (PIV-1) proteinidir.

Yine başka yönleriyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada bahsedilen yabancı gen bir parainfluenza virüsü tip 2 (PIV-2) proteinidir.
30

Yine başka yönleriyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada bahsedilen yabancı gen bir parainfluenza virüsü tip 3 (PIV-3) proteinidir.

Yine başka yönleriyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada bahsedilen yabancı gen bir parainfluenza virüsü tip 4 (PIV-4) proteinidir.

5 Bir yönüyle, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada yabancı gen bir raportör genidir.

Bir yönüyle mevcut buluş, bir hayvanı enfeksiyona karşı aşılama yönteminde kullanılmak üzere burada tanımlandığı gibi bir Sendai vektörünü üzerinde durmaktadır.

10 Bir yönüyle, mevcut buluş burada tarif edildiği gibi Sendai viral vektörünü ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı veya seyreltici veya herhangi bir taşıyıcı, adjuvan veya seyreltici içeren bir bileşimi üzerinde durmaktadır.

15 Bir yönüyle yöntem ayrıca rekombinant Sendai viral vektörünü (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni vektörlerden biri) veya burada tarif edilen bileşimi içerir, burada bahsedilen yabancı gen bir Sendai virüsü P geni ve bir Sendai virüsü M geni arasına eklenir.

20 Bir yönüyle, yöntem ayrıca rekombinant Sendai viral vektörünü (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni vektörlerin biri) veya burada tarif edilen bileşimi içerir, burada bahsedilen yabancı gen bir Sendai virüsü M geni ve bir Sendai virüsü F geni arasına eklenir.

25 Bir yönüyle, yöntem ayrıca rekombinant Sendai viral vektörünü (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni vektörlerden biri) veya burada tarif edilen bileşimi içerir, burada bahsedilen yabancı gen bir Sendai virüsü F geni ve bir Sendai virüsü HN geni arasına eklenir.

30 Yine başka bir yönüyle, mevcut buluş, bir NP, bir PM, bir MF, bir F-HN, bir HN-L ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen bir intergenik bağlantı(lar) içine eklenmiş bir yabancı gen veya bunun bir bölümü ile değiştirilmiş bir Enders suşu Sendai genomu içeren bir rekombinant Sendai viral vektörünü üzerinde durmaktadır.

35 Yine başka yönlerden, rekombinant Sendai viral vektörü ayrıca bir yabancı gen içerir, burada bahsedilen yabancı gen bir raportör genidir.

Mevcut buluş aşağıdakileri içeren bir kit üzerinde durmaktadır: a) i) vektör (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni vektörlerin birinin); ve ii) hedeflenen bir patojene karşı aşılama için kullanım talimatlarının sağlanması.

- 5 Mevcut buluş aşağıdakileri içeren bir kit üzerinde durmaktadır: a) i) bileşim (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni bileşimlerden birinin); ve ii) hedeflenen bir patojene karşı aşılama için kullanım talimatlarının sağlanması.

- 10 Mevcut tarifname aşağıdakileri içeren bir kit üzerinde durmaktadır: a) i) vektör (diğer bir deyişle, burada tarif edilen yeni vektörlerden biri); ve ii) vektörü görselleştirmek için kullanım talimatları.

- 15 Mevcut tarifname, rekombinant Sendai viral vektörü (diğer bir deyişle burada tarif edilen yeni vektörlerden biri) üzerinde durmaktadır, burada bahsedilen vektör, en az bir başka antijen veya immünojen ile karıştırılır.

Yine başka yönlerden, burada tarif edilen rekombinant Sendai viral vektörleri olup, burada yabancı gen bir metapneumovirüs proteindir.

- 20 Ayrıca, sunulan yönlerin açıklamaları sınırlayıcı değildir ve teknikte uzman kişilerce bilinen tüm eşdeğer, karşılaştırılabilir teknolojileri, reaktifleri, kaynakları, seyrelticileri, kullanımları vb. içerir. Örneğin, sadece ve sınırlandırılması amaçlanmayan şekilde spesifik diziler sunulur fakat moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve ilgili herhangi bir ve tüm tekniklerde bilinen ilgili sens, antisens, tamamlayıcı, homologlar, bölümler, fragmanlar,
- 25 5' ila 3' ve 3' ila 5' ve analoglar içerir. Ayrıca, solunum yolu viral enfeksiyonu için insanların tedavi edilmesinden bahsedilmekle birlikte, Jennerian aşı vektörünün, genel olarak memelileri, ve özellikle insanları tanı etmek veya tedavi etmek için *in vitro* veya *in vivo* kullanılan diğer aşılardan veya prosedürlerin geliştirilmesi için bir omurga olarak kullanılabileceği üzerinde durulmaktadır. Örneğin, sadece ve sınırlandırılması
- 30 amaçlanmayan şekilde aşı vektörünün köpekler, kediler, atlar, sığırlar ve primatlar gibi insan olmayan memelilerde kullanımı üzerinde durmaktadır. Ayrıca, aşılardan ve/veya bileşimler isteğe bağlı olarak farmasötik olarak kabul edilebilir seyrelticiler ve/veya adjuvanlar içerir, fakat aynı zamanda araştırma tipi seyreltici/katkı maddeleri ve/veya seyreltici/adjuvanların kullanımını içerir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Patent veya başvuru dosyası, renkle yürütülen en az bir çizim içerir. Bu patentin veya patent başvurusu yayınlarının renkli çizim(ler)inin kopyaları, talep edilmesi ve gerekli ücretlerin ödenmesi suretiyle Ofis tarafından sağlanacaktır.

Şekil 7'de sunulan dizi içinde, dizilerle bir araştırma yaparak farklı Sendai virüs genlerini bulabilirsiniz. Şekil 7B-7H'de sunulan diziler, 7A'daki vektör dizisinden doğrudan alınmıştır ve ayrı ayrı sunulmaktadır. İlgili protein dizileri detaylı açıklama içerisinde sağlanmıştır.

Şekil 1. Lusiferazı eksprese eden Sendai virüslerinin *in vitro* ve *in vivo* fenotipleri. (A) P-M, M-F ve F-HN gen bağlantılarına eklenen ateş böceği lusiferaz genini (luc) içeren rekombinant Sendai virüsleri üretilmiştir. (B) 33°C'de (kapalı semboller) ve 37°C'de (açık semboller) 0,01 PFU/hücrenin çok sayıda enfeksiyonda (MOI) enfekte edilmiş LLC-MK2 hücre kültürlerinde yabani tip (WT) ve lusiferazı eksprese eden SeV'lerin çoklu adım replikasyon kinetikleri. (C) Lüminesans ile ölçülen 5 PFU/hücresinin bir MOI'sinde rekombinant SeV'ler ile enfekte edilmiş LLC-MK2 hücrelerinde lusiferaz raportör gen ekspresyonunun kinetiği. (D) SeV'lerin intranazal aşılmasından sonra farelerin vücut ağırlıklarındaki değişiklikler. (E) SeV'lerin intranazal aşılmasından sonra farelerin hayatta kalma yüzdesi. (F) Akış sitometrisi ile ölçüldüğü üzere, enfeksiyondan 10 gün sonra farelerin bronkoalveolar lavaj sıvısından (BALF) geri kazanılan toplam lenfosit sayıları. (G) ELISA deneylerinde karşılıklı uç nokta seyreltmeleri ile ölçüldüğü üzere enfeksiyondan 10 gün sonra toplanan farelerin serumlarında SeV spesifik bağlanma antikoru titreleri. D-G panelleri için, beş adet 8 haftalık 129/Sv-suşu fareleri grupları, 7.000 PFU rekombinant SeV veya fosfat tamponlu salin (PBS) ile intranazal olarak aşılmıştır ve deneyler iki kez gerçekleştirilmiştir. Kümülatif veriler, D ve E panellerinde gösterilmektedir ve temsili veriler, F ve G panellerinde gösterilmektedir.

Şekil 2. Canlı farelerin solunum yollarında SeV enfeksiyonunun non-invaziv biyoluminesans görüntülemesi. Sekiz haftalık fareler 7.000 PFU SeVc-luc (P-M), SeVc-luc(F-HN) veya SeVc-luc (M-F*) ile intranazal olarak aşılmıştır. Her 24 saatte fareler lusiferin substratı ile intraperitoneal olarak

enjekte edilmiş, izofluran ile anestezi edilmiş, bir Xenogen Lumina cihazı ile görüntülenmiş ve daha sonra iyileşmeye bırakılmıştır. Bir deneyde, biyoluminesans SeVc-luc (P-M) SeVc-luc (P-M), SeVc-luc(F-HN) veya SeVc-luc (M-F*) ile enfekte edilmiş 129/SvJ fareleri için 2. günde **(A)** veya; enfeksiyon sonrası (p.i.) 7. günde **(B)** gösterilmektedir. İkinci bir deneyde, biyoluminesans, SeVc-luc (M-F*) ile enfekte edilmiş 129/SvJ, DBA/2, BALB/c veya C57BL/6 fareleri için 2. günde **(C)** veya 7. günde **(D)** gösterilmektedir. Veriler, bir gökkuşağı kütlesi ölçeğinde, bir biyoluminesans yoğunluğunun bir ölçümü olan radyans olarak görüntülenir. Radyans değerleri 1×10^6 (mavi) ile 1×10^9 (kırmızı) foton/sn/cm²/steradian arasında değişir. Kırmızı daireler, nazofarenks içindeki toplam akış (foton/sn) hesaplamak için ilgili bölgeleri (ROI) gösterir ve kırmızı dikdörtgenler trakea ve akciğerler için ROI alanlarını gösterir.

Şekil 3. 129/Sv farelerin solunum yollarında SeV yayılımı ve klirensinin kinetiği. **(A)** Enfeksiyonun boyutları, her 24 saatte bir canlı, anestezi uygulanmış farelerin invaziv olmayan biyoluminesans görüntülemesi ile belirlenmiştir. Her bir veri noktası 6 farenin ortalama biyoluminesansını temsil eder. Biyoluminesans yoğunluğunun toplam akışı (foton/sn), ilgili bölgedeki radyans toplamı olarak hesaplanır. **(B - D)** Nazal konkalar, trakea ve akciğerlerde virüs replikasyonunun kapsamı, bildirilen günlerde 3 fareden oluşan grupların kurban edilmesi ve LLC-MK2 hücrelerindeki enfeksiyöz virüslerin titreleri ölçülerek belirlenmiştir. Her iki deney tekrarlanmış ve temsili veriler gösterilmiştir.

Şekil 4. Virüs dozu ve fare suşunun bir fonksiyonu olarak virüs replikasyonu ve patojenez. SeVc-luc(MF*) ile 129-suş farelerin 70 ila 7.000 PFU arasında değişen dozlarda intranazal aşılmasından sonra, biyoluminesans yoğunluklarının **(A)** ve viral titrelerin **(B)** toplam akışı Şekil 3'te açıklandığı gibi ölçüldü. **(C)** Vücut ağırlığı değişimlerinin yüzdeleri, 129-suş farelerinde 70 ila 7.000 PFU SeVc-luc(MF*) enfeksiyonundan sonra on fare grubu için ölçüldü. Deney tekrarlanmış ve temsili veriler gösterilmiştir. **(D)** 129-suş farelerin serumlarındaki SeV-spesifik bağlanma antikoru titreleri, 70 ila 7.000 PFU SeVc-luc (M-F*) ile aşılmasından 10 gün sonra toplandı ve ELISA deneylerinde karşılıklı uç nokta seyreltileri olarak rapor edildi. İki kez gerçekleştirilen deneyde beş enfekte ve iki kontrol faresi kullanıldı. Temsili veriler gösterilmiştir. **(E)** Biyoluminesans yoğunluklarının toplam akışı SeVc-luc(MF*) ile 129-Sv, DBA/2, BALB/c veya C57BL/6-suş farelerin 7.000 PFU

intranazal aşılmasından sonra nazofarenks, trakea ve akciğerlerde bulunmaktadır. Ortalamalar altı hayvan içindir, deney tekrarlanmış ve temsili bir denemenin sonuçları gösterilmiştir. **(F)** Vücut ağırlığı değişiminin yüzdeleri, 7.000 PFU SeVc-luc (M-F*) ile enfekte edildikten sonra 10 fare grubu için ölçüldü. Deney tekrarlanmış ve temsili veriler gösterilmiştir.

Şekil 5. Temasla bulaşma sonrası SeV enfeksiyonu ve immünite. Kafes başına bir fare, 70 PFU **(A, C, E)** veya 7.000 PFU **(B, D, F)** SeVc-luc (M-F*) ile doğrudan aşılandı ve bir gün sonra 3 saf hayvanla bir kafese yerleştirildi. Bireysel 129-susu **(A - B)** ve BALB/c-susu **(C - D)** farelerinin nazofaringeal kavitelerinde toplam biyoluminesans yoğunlukları gösterilmektedir. Serum, 60. günde toplandı ve temas fareleri, 63. günde 7.000 PFU SeVc-luc (M-F*) ile test edildi, böylece potansiyel yeniden enfeksiyon, biyoluminesans ile izlenebilir hale geldi. SeV-spesifik bağlanma antikoru titreleri, 70 PFU **(E)** veya 7.000 PFU **(F)** ile aşılanmış hayvanlarla birlikte yerleştirilmiş farelerden alınan 60. günde toplanan serumların karşılıklı uç nokta seyreltileri olarak ölçülmüştür. Açık çubuklar doğrudan olarak 0 günde aşılanmış farelere karşılık gelir ve kalın çubuklar temas farelerine karşılık gelir. Deney, 129-suş fareler (3 donör hayvan ve 9 bulaşmış) için üç kopya halinde gerçekleştirildi ve BALB/c-suş fareler için kopyalandı (2 donör hayvan ve 6 bulaşmış).

Şekil 6. Temasla bulaşma sonrası SeV enfeksiyonunun zamanlaması ve doku-tropik yayılması. SeVc-luc(MF*) ile aşılanmış fareler ile temas farelerinin ortak barınması Şekil 5'te açıklanmıştır. Bireysel, temsili 129-suş **(A - B)** ve BALB/c-suş **(C - D)** fareler biyoluminesans yoğunluklarının toplam akışı, nazofarenks (üçgenler), trakea (daireler) ve akciğerler (kareler) için gösterilmiştir. 70 PFU **(E)** veya 7.000 PFU **(F)** ile donörlerin aşılmasından sonra nazofarinkste (limit:> 6 log10 foton/s) biyoluminesansın saptanmasına kadar geçen süre. BALB/c **(G)** ve 129/SvJ farelerinde **(H)** ortalama yüzde ağırlık değişimi. Temasla bulaşma deneyi 129/SvJ fareleri için üç kopya halinde ve BALB/c fareleri için iki kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Açık semboller ve çubuklar doğrudan aşılanmış farelere karşılık gelir ve katı semboller ve çubuklar temas farelerine karşılık gelir. Panel g ve h'de X sembolü, enfekte edilmemiş, PBS aşılanmış kontrol farelerine karşılık gelir.

Şekil 7. Dizi Listeleri. Şekil 7A-H, aşağıdaki gibidir: A, Modifiye edilmiş bir SeV yapısının dizisi (pSeVc) (Ayrıca bakınız Tablo 1) ve tek tek Sendai virüs genleri için diziler sağlanır; **B,** NP cDNA: (SEQ. ID. NO.:4); **C,** P cDNA: (SEQ.

ID. NO.: 6); D, C cDNA (SEQ. ID. NO.: 8); E, M cDNA: (SEQ. ID. NO.: 10); F, F cDNA (SEQ. ID. NO.: 12); G, HN cDNA (SEQ. ID. NO.:14); ve H, L cDNA (SEQ. ID. NO.: 16). İlgili translasyonlar ayrıntılı tarifnamede gösterilmiştir. Diziler 5' ila 3' (soldan sağa) olarak listelenmiştir. Şeklin anahtarı aşağıdaki gibidir:

5

PSeVc plazmidinde içindeki genler için Dizi Anahtarı

 = Başlangıç Kodonu

 = Durdurma Kodonu

Menekşe = NP gen dizisi

10

Mor = P gen dizisi

MOR TÜM CAPS = C gen dizisi (P geninde dahili başlangıç alanı)

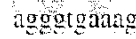
turuncu = M gen dizisi

Koyu mavi = F gen dizisi

Pembe = HN gen dizisi

15

Koyu siyah = L gen dizisi



= Transkripsiyon başlatma sinyali



= NotI (ilgili gende klonlama için, örneğin hPIV-2)

20

Şekil 8 Sendai virüs vektör genomuna yabancı genlerin eklenebildiği alanların örnekleri. Ekleme alanları, P, M, F ve HN genlerinin yukarı akışındaki pozisyonları içerebilir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Yabancı gen kasetleri, NotI kısıtlama endonükleaz alanları tarafından kuşatılmıştır ve Sendai virüs vektörü cDNA plazmidleri, çeşitli Sendai virüs genlerinin yukarı yönde akışında özgün *NotI* kısıtlama endonükleaz bölgelerine sahip olacak şekilde tasarlanmıştır.

25

Şekil 9. Lusiferazı eksprese eden Sendai virüslerinin yapımı. (A) Ateş böceği lusiferaz gen kasetinin nükleotid dizisi. Bir pGEM3 klonlama plazmid, kuşatan *NotI* kısıtlama bölgelerini, ateş böceği lusiferaz raportör genini, gen ucunu ve gen başlangıç dizilerini içerecek şekilde tasarlandı. **(B)** Lusiferaz raportör gen kasetini üç gen bağlantısına eklemek için, üç pSeV genom plazmid, P-M, M-F ve F-HN gen bağlantılarının her birinde özgün bir *NotI* kısıtlama bölgesi içerecek şekilde klonlanmıştır. PSeV-luc(MF*) genom plazmid için, yabancı gen ve ek gen bağlantı eklenmesi nedeniyle beklenen

30

atenüasyonu kompanse etmek amacıyla doğal olarak oluşan suboptimal başlatma sinyali AGGGATAAAG (SEQ. ID. NO.: 19), daha etkili başlatma sinyaline AGGGTGAAAG (SEQ. ID. NO.: 20) değişmiştir. Ateş böceği lusiferaz gen kaseti (panel **A**), pGEM3 plazmidinden, NotI kısıtlama bölgeleri kullanılarak pSeV genom plazmidlerine alt klonlanmıştır. **(C)** WT ve lusiferaz raportör gen (luc) içeren rekombinant SeV'leri kurtarmak için pSeV cDNA plazmidlerinin tasarımı. SeV genlerinin nükleoprotein (N), polimeraz (P), matriks (M), füzyon (F), hemaglutinin-nöraminidaz (HN) ve büyük (L) proteinin konumlarının yanı sıra T7 RNA polimeraz promotörü (T7) ve hepatit delta virüsü ribozim dizisi (ribo) gösterilmiştir. Gen başlatma dizileri yeşil renktedir ve doğal olarak oluşan, subtestimal AGGGATAAAG (SEQ. ID. NO.: 19) gen dizisi WT SeV'nin M ve F genleri arasında diziliş sarı olarak gösterilmiştir. Gen uç dizileri kırmızı olarak gösterilmiştir. N geninin yukarıdaki 3' lider dizi ve L geninin aşağı yöndeki 5' fragman dizisi basitlik açısından gösterilmemiştir.

Şekil 10. SeV protein ekspresyonu ve virionlara dahil olma. **(A)** LLC-MK2 hücrelerinde SeV protein ekspresyonu. LLC-MK2 hücrelerinin konfluent tekli tabakaları, 5 PFU/hücrenin bir MOI'sinde rekombinant SeV'ler ile enfekte edildi ve 16 saat süreyle inkübe edildi. Radyo-etiketleme ve immünopresipitasyonun ardından, lizatlardaki viral proteinler SDS-PAGE ile çözülmüş ve bir fosfor görüntüleyici ile görselleştirilmiştir. **(B)** SeV protein ekspresyon oranları. Protein ekspresyonu, ImageQuant® 5.2 yazılımı ile ölçülmüş ve N proteininin ekspresyon seviyesine normalize edilmiştir. Veriler, üç deneyin ortalamalarını (+/- standart sapma) temsil eder. **(C)** SeV bileşimi. Rekombinant SeV'ler, embriyonlu tavuk yumurtasının allantoik kavitelelerinden toplandı, SDS-PAGE ile ayrılan ve Coomassie Mavisi ile görselleştirilen bir sukroz gradyanı ile santrifürlenerek saflaştırıldı.

Şekil 11. Farelerde rekombinant SeV'ler tarafından enfeksiyona karşı immünolojik yanıtlar. Beş adet 8 haftalık 129/SvJ fare grubu, 7.000 PFU rekombinant SeV veya PBS içeren 30 µl ile intranazal olarak aşılanmıştır. 10. günde, serum toplandı ve farelere bronkoalveolar lavaj sıvısını (BALF) geri kazanmak için ötanazi uygulandı. Deneyler, gösterilen temsili verilerle iki kez gerçekleştirilmiştir. Her veri noktası tek bir hayvanı temsil eder ve yatay çubuklar grup ortalamalarını gösterir. BALF'dan geri kazanılan CD4 + **(A)** ve CD8 + **(B)** T hücrelerinin sayısı, akış sitometrisi ile belirlenmiştir. **(C)** Serumdaki

lusiferaz-spesifik bağlanma antikorlu titreleri, ELISA deneyleri ile belirlendi ve karşılıklı uç nokta seyreltmeleri olarak eksprese edildi.

Şekil 12. 129/SvJ farelerinin solunum yollarında Bioluminesans ve Sendai

virüsü titreleri. 8 haftalık üç fare grubu, 7.000 PFU rekombinant SeV ile intranazal olarak aşılanmıştır. **(A)** *In vivo* bioluminesans, 4 ve 6. günlerde üç

lusiferazı eksprese eden virüslerin tümü için ölçülmüş, sonrasında akciğerler hemen hasat edilmiş ve homojenize edilmiş, böylece *ex vivo* lusiferaz aktivitesi ölçülebilmektedir. En küçük kareler doğrusal regresyon modeline sahip verilerin bir

uyumu, 0.878'lik bir R2 değeri vermiştir. RLU bağılı ışık birimleri anlamına gelir. **(B)** Kamera tarafından algılanan ışık ile nazofarenks (üçgenler), trakea (daireler) ve akciğerlerden (kareler) homojenatların viral titreleri arasındaki karşılaştırma. Her bir nokta, SeVc-luc(MF*) ile enfekte edilmiş tek bir fareden alınan verileri temsil eder ve 2, 3, 5 veya 7 no.lu günlerde çalışılır. En küçük kareler lineer regresyon, sırasıyla nazofarenks, trakea ve akciğerler için 0.864, 0.915 ve 0.961 R2 değerlerini verir.

Şekil 13. BALB/c ve 129/SvJ farelerinin solunum yollarında Bioluminesans

ve Sendai virüsü titreleri. 8 haftalık üç fare grubu, 70 veya 7.000 PFU SeVc-luc (M-F*) ile intranazal olarak aşılandı. **(A)** *In vivo* bioluminesans, 2, 3, 5 ve 7 nci günlerde 7.000 PFU virüsü ile enfekte edilmiş BALB/c farelerinde ölçüldü.

Daha sonra hayvanlara ötanazi yapıldı ve dokular hasat edildi, böylece doku homojenatlarından virüs titreleri, LLC-MK2 hücrelerinde plak titrasyonu ile ölçülebildi. Doku homojenatlarında virüs titreleri ile kamera tarafından algılanan ışık arasındaki korelasyonlar, sırasıyla, nazofarenks, trakea ve akciğerler için 0.928, 0.656 ve 0.846 R2 değerleri ile bulunmuştur. Nazofarenks

(B) homojenatlarında ve 70/7.000 PFU SeVc-luc(MF*) ile enfekte edilen BALB/c- ve 129-strain farelerinin akciğerlerinin **(C)** virüs titreleri, LLC-MK2 hücrelerinde plak titrasyonu ile ölçüldü. Veriler, altı farenin ortalama virüs titrelerini (+/- standart sapma) temsil etmektedir.

Şekil 14. Aşılama ve temasla bulaşma sonrasında bozulmamış farelerin

solunum yollarına yayılan Sendai virüsünün doku spesifik zamanlaması ve büyüklüğü. Her bir grupta, bir BALB/c veya 129/SvJ faresi, 70 veya 7.000

PFU SeVc-luc(MF*) ile intranazal olarak aşılandı ve üç temas hayvanı, Şekil 5'te tarif edildiği gibi bir gün sonra ortak barınmaya alındı **(A – D)**. Doğrudan aşılanmasından (açık çubuklar) sonra ve temasla bulaşmadan sonra (sert çubuklar) nazofarenks (nazop), trakea ve akciğerlerde (tespit sınırı: > 6 log₁₀

foton/sn) biyoluminesansın saptanmasına kadar geçen süre. **(E - H)** Doğrudan aşılardan (açık çubuklar) ve temasla bulaşma sonrası (kalın çubuklar) toplam akışın günlük ölçümlerinin zamana göre entegrasyonu ile belirlenen toplam enfeksiyon büyüklüğü. Bioluminesansın eğri altındaki alanlar (AUC) $\log_{10}$ ölçeğinde toplam foton miktarı olarak ifade edilir. Deney, 129-suş fareler (3 donör hayvan ve 9 bulaşmış) için üç kopya halinde gerçekleştirildi ve BALB/c-suş fareler için kopyalandı (2 donör hayvan ve 6 bulaşmış).

Şekil 15. PSEV yapı diyagramı. Sendai virüsü Enders suşu cDNA, bir yukarı yönde T7 promotör ve aşağı yönde bir RNA kendiliğinden yarılan HDV dizisi içeren pUC vektörüne klonlanmıştır.

Şekil 16. İntranazal ve intratrakeal aşılardan sonra primatlarda Z suş aşısının ve Enders bazlı aşılarda kalıcılığı. Afrika yeşil maymunları, Sendai virüsü Z aşısı (**A** ve **B** (Skiadopoulos et al. 2002 Virology 297:153)) veya Sendai virüsü Enders-bazlı aşılarda (**C** ve **D**) ile intranazal ve intratrakeal yollar ile aşılanmıştır. Virüs yükleri, enfeksiyonları takiben URT veya LRT'de izlendi.

Şekil 17. Modifiye edilmemiş Enders Sendai virüsü ve rekombinant modifiye edilmiş Sendai virüsünün Afrika yeşil maymunlarında RSV F (SeVc-RSVF(F-HN)) eksprese eden Enders bazlı aşılarda immünojenikliği. Serumlar aşılardan 25 gün sonra alındı ve ELISA ile RSV F (**A**) ve Sendai virüsüne (**B**) antikor yanıtı açısından test edildi.

Şekil 18. RSV F eksprese eden modifiye Sendai virüsü Enders bazlı aşı primatları RSV'den korur. Kontrol (sol, **A**) ve test (sağ, **B**) hayvanlara aşılardan yaklaşık 1 ay sonra RSV ile test edildi. Bronkoalveolar lavaj (BAL) örnekleri, testten sonraki 10 gün boyunca toplandı ve RSV büyümesi için test edildi. RSV F (SeVc-RSVF(F-HN)) eksprese eden modifiye edilmiş Sendai virüsü Enders-bazlı aşı alan tüm hayvanlarda alt solunum yolu RSV enfeksiyonundan korunmuştur.

Şekil 19. RSV F (SeVc-RSVF(F-HN)) eksprese eden modifiye Sendai virüsü Enders bazlı aşı, düşük dozda RSV'ye karşı koruyucudur. RSVF'yi eksprese eden modifiye Sendai virüsü Enders-bazlı aşı, 10^6 , 10^4 ve 10^2 dozlarında hayvanları aşılamak için kullanıldı. Bütün aşılanmış hayvanlar, testten sonra akciğerdeki virüsün ölçülmesiyle gösterildiği gibi RSV testinden korunmuştur.

TANIMLAR

Bu buluşun anlaşılmasını kolaylaştırmak için aşağıda (bu Tanımlar bölümünde tırnak işaretleri içinde yer alan) birkaç terim tanımlanmıştır. Burada tanımlanan terimler (aksi belirtilmedikçe), mevcut buluşla ilgili alanlarda normal vasıflara sahip bir kişi tarafından yaygın olarak anlaşılan anlamlara sahiptir.

5

Burada kullanıldığı şekliyle "denek" veya "hasta" terimi, buluşa uygun bileşimlerin, örneğin deneysel, tanı edici, profilaktik ve/veya terapötik amaçlarla uygulanabileceği herhangi bir organizmaya karşılık gelir. Tipik denekler arasında hayvanlar (örneğin, fareler, sıçanlar, tavşanlar, insan olmayan primatlar ve insanlar gibi memeliler; böcekler; solucanlar; vb.) bulunur. *In vitro* sistemler de (örneğin hedef hücre içinde ve/veya izolasyon için çalışmak üzere SeV veya diğer proteinleri eksprese etmek için) kullanılabilir. Örneğin, yalnızca kültürde LLC-MK2 hücrelerinin sınırlandırılması amaçlanmamıştır (Bakınız Şekil 1).

10

15 Burada kullanıldığı şekliyle "immün yanıt" terimi, bir antijene maruz kaldığında bir organizmanın immün sisteminin reaktivitesindeki değişikliği ifade etmektedir. "Immün yanıt" terimi, aşağıdaki yanıtlardan birini veya her ikisini de kapsar: antikör üretimi (örneğin humoral immünite) ve hücre aracılı immünitenin indüksiyonu (örneğin, yardımcı T hücresi ve/veya sitotoksik T hücre yanıtları dahil olmak üzere hücresel immünite).

20

Burada kullanıldığı şekliyle "primer" terimi, bir oligonükleotid ile ilgilidir, ister doğal olarak (örneğin saflaştırılmış bir restriksiyon sindiriminde olduğu gibi) ister sentetik olarak üretilmiş olsun, bir nükleik asit zincirine tamamlayıcı olan bir primer uzatma ürününün sentezinin indüklendiği (diğer bir deyişle, nükleotitlerin varlığında, DNA polimeraz gibi bir indükleyici ajan ve uygun sıcaklık ve pH koşulları altında) koşullar altında yerleştirildiğinde nükleik asit sentezinin bir başlangıç noktası olarak hareket edebilir. Primer tercihen amplifikasyonda maksimum verim için tek ipliklidir, ancak alternatif olarak çift iplik olabilir. Çift iplikse, primer, önce uzatma ürünlerini hazırlamak için kullanılmadan öncesinde ipliklerini ayırmak için işleme tabi tutulur. Tercih edilen uygulamalarda, primer bir nükleik asidin ucuna eklenir, şöyle ki bir saç tokası self-hibridizasyondan oluşur. Tercihen, primer bir oligodeoksiribonükleotiddir. Primer, indükleyici maddenin varlığında uzatma ürünlerinin sentezini hazırlamak için yeterince uzun olmalıdır. Primerin tam uzunlukları sıcaklık, primer kaynağı ve yöntem kullanımı gibi birçok faktöre bağlı olacaktır. Ayrıca, nükleik asit dizilerinin uçlarında arzu edilen

25

30

35

nükleotid dizilerinin yapay olarak eklenmesi için primerlerin PCR'de (aşağıya bakınız) kullanılabileceği de üzerinde durulmaktadır.

Burada kullanıldığı şekliyle "polimeraz zincir reaksiyonu" ("PCR") terimi, K. B. Mullis
 5 U.S. Pat. 4,683,195, 4,683,202 ve 4,965,188'deki yöntem ile ilgilidir, burada bir DNA dizisi içindeki bir hedef dizinin bir konsantrasyonunu klonlama veya saflaştırma olmaksızın arttırmak için bir yöntem tarif etmektedir. Hedef dizinin arzu edilen amplifiye edilmiş segmentleri, karışımındaki baskın diziler (konsantrasyon açısından) olduğu için, bunların "PCR amplifiye" olduğu söylenir. Benzer şekilde, burada kullanılan "modifiye
 10 edilmiş PCR" terimi, bir RNA dizisinin RNA polimeraz varlığında bir DNA şablonundan amplifiye edildiği veya bir DNA dizisinin bir RNA şablonundan ters transkriptaz varlığında amplifiye edildiği amplifikasyon yöntemlerini ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle "restriksiyon endonükleazları" ve "restriksiyon enzimleri"
 15 terimleri, her biri spesifik bir nükleotit dizisinde veya bunun yakınında çift-iplikli DNA'yı kesen bakteriyel enzimleri ifade eder.

"Antijen", "antijenik" ve "antijenik olarak aktif" terimleri, spesifik bir hümmoral ve/veya hücre aracılı immün tepkisi tarafından tanınabilen herhangi bir madde ile ilgilidir.
 20 "İmmünojen", "immünojenik" ve "immünolojik açıdan aktif" terimleri, spesifik bir hümmoral ve/veya hücre aracılı immün tepkisini indükleyebilen herhangi bir madde ile ilgilidir. Bir antijen veya immünojen genellikle en az bir epitop içerir. Antijenler ve immünojenler, bir peptid, polisakarit, nükleik asit dizisi ve/veya lipid içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan şekilde örneklendirilir. Glikopeptid, lipopeptid, glikolipid, vb. dahil (sınırlama olmaksızın)
 25 lipidler, polisakkaritler veya nükleik asit dizileri olan peptidlerin kompleksleri üzerinde durulmaktadır. Bu kompleksler, az sayıda epitopa sahip küçük moleküllerin tatmin edici bir immün yanıtı kendi kendilerine uyarmadığı özellikle yararlı immünojenlerdir.

Burada kullanılan "nükleik asit dizisi" terimi, bir oligonükleotid, bir nükleotid veya bir
 30 polinükleotid ve bunların fragmanları veya bölümleri ve bunun tersi ile ilgilidir ve tek veya çift iplikli olabilen genomik veya sentetik orijinli DNA veya RNA'ya karşılık gelir ve duyu veya antisens ipliği temsil eder. Benzer şekilde, burada kullanılan "amino asit dizisi", peptid veya protein dizisi ile ilgilidir.

Burada kullanıldığı şekliyle "antisens" terimi, DNA'ya referans olarak kullanıldığında, bir DNA dupleksinin bir sens dizisine tamamlayıcı olan bir dizi ile ilgilidir. Bir DNA dupleksinin bir "sens ipliği", bir DNA duplexi içinde, bir doğal yolla bir hücre tarafından bir "sens mRNA'sı"na transkribe edilen bir ipliğe değinmektedir. Dolayısıyla bir

5 "antisens" dizisi, bir DNA dupleksinde kodlamayan iplikle aynı diziye sahip olan bir dizidir.

Burada kullanıldığı şekliyle "tamamlayıcı" veya "tamamlayıcılık" terimleri, baz eşleme kuralları ile ilgili polinükleotidlere (diğer bir deyişle, bir nükleotid dizisi) referans olarak

10 kullanılmaktadır. Örneğin, "5'-A-G-T-3' " dizisi için "3'-T-C-A-5' " dizisi tamamlayıcıdır. Tamamlayıcılık, nükleik asitlerin bazlarının baz eşleştirme kurallarına göre eşleştirildiği şekilde "kısmi" olabilir. Veya nükleik asitler arasında "tam" veya "toplam" tamamlayıcılık olabilir. Nükleik asit iplikleri arasındaki tamamlayıcılık derecesinin, nükleik asit iplikleri arasındaki hibridizasyonun etkinliği ve gücü üzerinde önemli etkileri vardır. Bu,

15 amplifikasyon reaksiyonlarında ve nükleik asitler arasındaki bağlanmaya bağlı olan tespit yöntemlerinde özellikle önemlidir.

"Homoloji" terimi, bir dereceye kadar tamamlayıcılık anlamına gelir. Kısmi homoloji veya tam homoloji (diğer bir deyişle, kimlik) olabilir. Kısmen tamamlayıcı bir dizi, tam

20 tamamlayıcı bir nükleik asit molekülünün bir hedef nükleik asite hibritlenmesinden en azından kısmen inhibe eden bir nükleik asit molekülüdür, "büyük ölçüde homolog"dur. Tam tamamlayıcı dizinin hedef diziye hibridizasyonunun inhibisyonu, düşük sertlik koşulları altında bir hibridizasyon analizi (Southern veya Northern blot, solüsyon hibridizasyonu ve benzeri) kullanılarak incelenebilir. Büyük ölçüde homolog bir dizi

25 veya prob, düşük sertlik koşulları altında tamamen homolog bir nükleik asit molekülünün bağlanmasına (diğer bir deyişle hibridizasyona) karşı rekabet eder ve inhibe eder. Bu, düşük sertlik koşullarının, spesifik olmayan bağlanmaya izin vereceği anlamına gelmez; düşük sertlik koşulları, iki dizinin birbirine bağlanmasının spesifik (diğer bir deyişle, seçici) bir etkileşim ile olmasını gerektirir. Spesifik olmayan

30 bağlanmanın yokluğu, esas olarak tamamlayıcı olmayan (örneğin yaklaşık %30'dan daha az özdeşlik) ikinci bir hedefin kullanılmasıyla test edilebilir; spesifik olmayan bağlanmanın yokluğunda prob, tamamlayıcı olmayan ikinci hedefe hibridlenmeyecektir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "aşı" terimi, bir konakçıya bir hedef virüs veya patojenden

35 bir enfeksiyon ve/veya hastalıktan bir dereceye kadar koruma sağlamak için uygulanan

- bir immünojenik bileşim ile ilgilidir. Ayrıca, bir dereceye kadar koruma, bir enfeksiyon ve/veya hastalığın bir veya daha fazla semptomunun azaltılması, hafifletilmesi, modifiye edilmesi ve/veya iyileştirilmesini içerir ancak bunlarla sınırlı değildir. Genel olarak, solunum yolu hastalıklarının bazı semptomları, bilinen soğuk algınlığı
- 5 semptomları ve daha özel olarak, örneğin sadece ve sınırlayıcı olmayacak şekilde, nefes alma zorluğu veya solunum yetmezliği, öksürük, ateş, krup öksürük (çoğunlukla "havalama" öksürüğü olarak tarif edilir), siyanoz (oksijen eksikliği nedeniyle mavimsi cilt rengi), burun akması, tıkalı burun, hışırtılı tıkanıklık ve/veya burun akıntısını içerir. Dahası, solunum hastalıkları akciğerleri etkileyerek bronşiyolit veya zatürreye neden
- 10 olabilir. Bu tür bir bileşim, "farmasötik olarak kabul edilebilir" bir seyreltici ve/veya taşıyıcı veya herhangi bir taşıyıcı, adjuvan veya seyreltici içerebilir. Örneğin, sadece ve sınırlı olmayacak şekilde kabul edilebilir seyrelticileri taşıyıcıları Remingtons "The Science and Practice of Pharmacy," 21st Ed. 2005'te bulunabilir. "Farmasötik olarak kabul edilebilir" ifadesi, insan ve hayvan dokuları ile temas halinde kullanım için uygun
- 15 olan, sağlam tıbbi yargı kapsamında olan aşırı toksisite, irritasyon, alerjik yanıt veya başka bir sorun veya komplikasyon olmaksızın, makul bir yarar/risk oranı ile orantılı bileşikler, maddeler, bileşimler ve/veya dozaj formlarını ifade etmek için kullanılmaktadır. Sayısız aşı formülasyonları, teknikte uzman kişilerce bilinir.
- 20 Aşılar, tek başlarına veya çeşitli yardımcı maddeler/taşıyıcılar ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Farmasötik taşıyıcılar teknikte uzman kişilerce bilinmektedir. Bu tipik olarak, fizyolojik pH'de steril su, salin ve tamponlu çözeltiler gibi çözeltiler dahil olmak üzere insanlara aşıların uygulanması için standart taşıyıcılar olacaktır. Diğer bileşenler arasında ekspiyanlar, taşıyıcılar, kalınlaştırıcılar, seyrelticiler, tamponlar, koruyucu
- 25 maddeler ve yüzey aktif maddeler bulunur.

Burada kullanıldığı şekliyle "uygulamak" ve "uygulama" terimleri birbirinin yerine kullanılabilir ve sadece ve sınırlandırıcı olmayacak şekilde, aerosol, damlacık, parenteral enjeksiyon (örneğin intraperitoneal, subkutan veya intramüsküler) ile,

30 damlacık yoluyla intranazal olarak, inhalasyon ile uygulamayı içerir. Bakınız Remingtons et al. "The Science and Practice of Pharmacy", 21. Ed. 2005.

Burada kullanılan "Sendai virüsü" terimi, hPIV-1'in murin homologu olan bir fare parainfluenza virüsüdür.

Burada kullanılan "raportör gen" terimi, virüs izlemeyi kolaylaştıran bir araç içerir. Örneğin sadece ve sınırlayıcı olmayacak şekilde, burada tarif edilen haberci gen, teknikte uzman kişilerce bilinen görsel olarak izleme (örneğin işaretli probalar veya antikolar) ile birlikte lusiferaz, yeşil floresan protein, kırmızı floresan protein içerir.

5 Ayrıca, spesifik örnekler verilirken, mevcut buluş tarafından izlenmesi için yararlı olan, flüoresan, biyoluminesan, luminesan ve ilgili raportör proteinlerin başka herhangi bir yolu üzerinde durulmaktadır.

Burada kullanıldığı şekliyle "konakçı hücre" terimi, bir heterolog geni çoğaltabilen ve/veya kopyalayabilen ve/veya çevirebilen herhangi bir hücre ile ilgilidir. Dolayısıyla,

10 bir "konakçı hücre", *in vitro* veya *in vivo* olarak bulunsun bulunmasın herhangi bir ökaryotik veya prokaryotik hücre (örneğin, LLC-MK2 hücreleri (bakınız Şekil 1), bakteriyel hücreler, E. coli, maya hücreleri, memeli hücreleri, kuş hücreleri, amfibi hücreler, bitki hücreleri, balık hücreleri ve böcek hücreleri ile ilgilidir.

15 Burada kullanıldığı şekliyle "yabani tip" terimi, bir gene referans olarak verildiği zaman, doğal olarak oluşan bir kaynaktan izole edilmiş bir genin özelliklerine sahip olan bir gene karşılık gelir. Bir gen ürününe referans olarak "yabani tip" terimi, doğal olarak oluşan bir kaynaktan izole edilen bir gen ürününün özelliklerine sahip olan bir gen

20 ürünü ile ilgilidir. Bir nesneye uygulanan ve burada kullanıldığı şekliyle "doğal olarak meydana gelen" terimi, bir nesnenin doğada bulunabileceği gerçeğini ifade eder. Örneğin, doğada bir kaynaktan izole edilebilen ve laboratuvarında insan tarafından kasıtlı olarak modifiye edilmemiş bir organizmada (virüsler dahil) bulunan bir polipeptid veya polinükleotid dizisi doğal olarak meydana gelir. Bir yabani tip gen, bir popülasyonda en

25 sık gözlenen ve dolayısıyla, genin "normal" veya "yabani tip" formunu gelişigüzel olarak belirleyen bir gendir.

Aksine, bir gen veya bir gen ürününe referans olarak "modifiye" veya "mutant" terimi, sırasıyla bir gen veya dizi ve/veya fonksiyonel özelliklerde modifikasyonlar sergileyen

30 bir gen ürününe atıfta bulunur (diğer bir deyişle, yabani tip gen veya gen ürünü ile karşılaştırıldığında değiştirilmiş özellikler). Doğal olarak oluşan mutantların izole edilebileceğine dikkat edilmelidir; bunlar, yabani tip gen veya gen ürününe kıyasla karakteristik özelliklerini değiştirdikleri gerçeği ile tanımlanır.

Burada kullanıldığı şekliyle "bir modifiye Enders" terimi, bir Z Sendai virüs suşu genomunun bir bölümünü içeren bir Enders Sendai virüs suşu genomu anlamına gelir.

5 Burada kullanıldığı şekliyle, bir "kimera", işlevsel kombinasyon içinde farklı bir Sendai virüs suşu genomunun bir ya da daha fazla bölümünü içeren bir Enders Sendai virüs suşu genomu anlamına gelmektedir. Daha özel olarak, örneğin bir uygulamada sadece (ve sınırlayıcı olmayacak şekilde) mevcut buluş, bir Z Sendai virüs suşu genomunun bir veya daha fazla bölümünü içeren bir Enders Sendai virüs suşu genomunun üzerinde durmaktadır.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "saflaştırılmış" terimi, doğal ortamlarından ayrılan, izole edilmiş ya da ayrılmış olan nükleik asit ya da amino asit dizileri olan molekülleri belirtmektedir. Dolayısıyla bir "izole edilmiş nükleik asit dizisi", saflaştırılmış bir nükleik asit dizisidir. "Büyük ölçüde saflaştırılmış" moleküller, doğal olarak bağlı oldukları diğer 15 bileşenlerden en az %60 serbest, tercihen en az %75 serbest ve daha tercihen en az %90 serbesttir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "saflaştırılmış" ya da "saflaştırmak" terimi aynı zamanda bir numuneden kirletici maddelerin çıkarılması ile ilgilidir. Kirletici proteinlerin 20 uzaklaştırılması, numunedeki ilgili polipeptidin yüzdesinde bir artışa neden olur. Başka bir örnekte, rekombinant polipeptidler bitki, bakteri, maya veya memeli konakçı hücrelerinde eksprese edilir ve polipeptidler, konakçı hücre proteinlerinin çıkarılmasıyla saflaştırılır; bu şekilde, rekombinant polipeptidlerin yüzdesi, örnekte artmıştır.

25 Burada kullanıldığı şekliyle "*in vitro*" terimi, bir çoklu-hücreli organizmadan ziyade, yapay bir ortamda, örneğin bir test tüpü veya reaksiyon kabında, hücre kültüründe, vb. meydana gelen olayları belirtir.

Burada kullanılan "*in vivo*" terimi, bir çoklu-hücreli organizma içinde meydana gelen 30 olayları ifade eder. Örneğin, sadece ve sınırlayıcı olmayacak şekilde bir memeli, özellikle de bir insan ve/veya insan olmayan bir hayvan gibi.

Burada kullanıldığı şekliyle "gen" terimi, bir polipeptid, öncü veya RNA (ör., RRNA, tRNA) üretimi için gerekli olan kodlama dizilerini içeren bir nükleik asit (örneğin DNA) 35 dizisi ile ilgilidir. Polipeptid, tam uzunluktaki bir kodlama dizisi veya kodlama dizisinin

herhangi bir bölümü ile, tam uzunluktaki veya fragmanın arzu edilen aktivite veya fonksiyonel özellikleri (örneğin enzimatik aktivite, ligand bağlanması, sinyal transdüksiyonu, immünojenisite, vb.) korunduğu sürece kodlanabilir. Terim ayrıca bir yapısal genin kodlama bölgesini ve her iki uçta da 5' ve 3' uçlarında kodlama bölgesine bitişik bulunan dizileri kapsar, böylece gen tam uzunluktaki mRNA'nın uzunluğuna karşılık gelir. Kodlama bölgesinin 5' konumunda bulunan ve mRNA üzerinde bulunan diziler 5' translasyona tabi tutulmamış diziler olarak adlandırılır. 3' veya kodlama bölgesinin aşağı yönünde bulunan ve mRNA üzerinde mevcut olan diziler, 3' translasyona tabi tutulmamış olarak adlandırılır. "Gen" terimi, bir genin hem cDNA'sı hem de genomik formlarını kapsar. Bir genin bir genomik formu veya klonu, "intronlar" veya "araya giren bölgeler" veya "araya giren diziler" olarak adlandırılan kodlamayan diziler ile kesintiye uğrayan kodlama bölgesini içerir. Intronlar, nükleer RNA'ya (hnRNA) transkribe edilen bir genin parçalarıdır; intronlar, arttırıcılar gibi düzenleyici elemanlar içerebilir. Intronlar nükleer veya birincil transkriptten çıkarılır veya "ayrılır"; bu nedenle intronlar raportör RNA (mRNA) transkriptinde bulunmaz. mRNA, translasyon sırasında, yeni ortaya çıkan bir polipeptidde amino asitlerin dizisini veya sırasını belirtmek için işlev görür.

Burada kullanıldığı şekliyle "heterolog gen" terimi, doğal ortamında olmayan bir gen ile ilgilidir. Örneğin, bir heterolog gen, başka bir türe dahil edilen bir türden bir gen içerir. Bir heterolog gen ayrıca, bir şekilde değiştirilmiş bir organizmaya natif bir geni (örneğin mutasyona uğramış, çok sayıda kopya halinde eklenmiş, natif olmayan düzenleyici dizilere bağlanmış, vb.) içerir. Heterolog genler, heterolog gen dizilerinin, tipik olarak, kromozomdaki gen dizileriyle doğal olarak ilişkili bulunmayan veya doğada bulunmayan kromozomun bölümleri ile ilişkili olan (örneğin, genlerde eksprese edilen genler) ile bağlantılı olan DNA dizilerine tipik olarak dahil edildiği için endojen genlerden ayırt edilir. (örnç genin normal olarak eksprese edilmediği ortamda eksprese edilen genler).

Burada kullanıldığı şekliyle "işlenebilir kombinasyonda", "çalıştırılabilir durumda" ve "işlevsel olarak bağlantılı" terimleri burada kullanıldığı şekliyle nükleik asit dizilerinin bağlantısı ile ilgilidir, şöyle ki nükleik asit molekülü, belirli bir genin transkripsiyonunu yönlendirebilir ve/veya arzu edilen bir protein molekülünün sentezi üretilebilir. Terimler ayrıca, amino asit dizilerinin, fonksiyonel bir proteinin üretileceği şekilde bağlanması anlamına da gelir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "hücre kültürü" terimi, herhangi bir *in vitro* hücre kültürünü ifade etmektedir. Bu terime, sürekli hücre hatları (örneğin bir ölümsüz fenotipine sahip), birincil hücre kültürleri, dönüştürülmüş hücre çizgileri, sonlu hücre hatları (örneğin dönüştürülmemiş hücreler) ve *in vitro* muhafaza edilen diğer hücre popülasyonları dahildir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "Çoklu Enfeksiyon (MOI)" terimi, enfeksiyöz virüs parçacıklarının hedef hücrelere oranını (diğer bir deyişle, bir kuyucukta biriken enfeksiyöz virüs parçacıklarının, buradaki hedef hücrelerin sayısına oranını) ifade eder.

10

Burada kullanıldığı şekliyle, "Plak Oluşturan Birimler (PFU)" terimi, hücreleri enfekte edebilen ve sonuç olarak bir hedef hücre mono tabakasında plaklar oluşturabilen virüs parçacıklarının sayısının bir ölçüsünü ifade eder.

15 Burada kullanıldığı şekliyle "terapötik olarak etkili miktar" terimi, arzu edilen terapötik etkiyi sağlamak için toksik olmayan ancak yeterli miktarda bir madde veya bileşik içerir. Gereken tam miktar, tedavi edilen türler, deneğin yaşı ve genel durumu, tedavi edilen durumun şiddeti, uygulanan özel ajan ve uygulama şekli gibi faktörlere bağlı olarak denekten deneğe değişecektir. Böylece, kesin bir "etkili miktar" belirtmek mümkün
20 değildir. Bununla birlikte, herhangi bir durumda, uygun bir "etkili miktar", teknikte uzman bir kişi tarafından sadece rutin deneyler kullanılarak belirlenebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle "kit" terimi, maddelerin iletilmesi için herhangi bir uygulama sistemini ifade eder. Reaksiyon deneyleri bağlamında, bu tür uygulama sistemleri, reaksiyon reaktiflerinin (örneğin uygun kaplarda oligonükleotidler, enzimler, vb.)
25 ve/veya destekleyici materyalleri (örneğin, tamponlar, tahlil gerçekleştirme talimatları vb.) bir konumdan diğerine depolanmasını, taşınmasını veya uygulanmasını sağlayan sistemlerdir. Örneğin kitler, ilgili reaksiyon reaktiflerini ve/veya destekleyici materyalleri içeren bir veya daha fazla muhafaza (örneğin kutular) içerir. Burada kullanılan
30 "parçalanmış kit" terimi, her biri toplam kit bileşenlerinin bir alt-grubunu içeren iki ya da daha fazla ayrı kap içeren dağıtım sistemlerini ifade eder. Kaplar amaçlanan alıcıya birlikte veya ayrı olarak uygulanabilir. Örneğin, bir birinci kap bir analizde kullanılmak için bir enzim içerebilirken, ikinci bir kap oligonükleotidler içerebilir. "Parçalanmış kit" teriminin, Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası'nın 520 (e) bölümü altında
35 düzenlenen Analit spesifik reaktifleri (ASR'ler) içeren kitleri kapsamı amaçlanmıştır,

ancak bunlarla sınırlı değildir. Aslında, her biri toplam kit bileşenlerinin bir alt bölümünü içeren iki ya da daha fazla ayrı kap içeren herhangi bir uygulama sistemi "parçalanmış kit" terimine dahil edilir. Tersine, bir "kombine kit", bir reaksiyon deneyinin tüm bileşenlerini tek bir kapta (örneğin, arzu edilen bileşenlerin her birini barındıran tek bir kutuda) içeren bir uygulama sistemi ile ilgilidir. "Kit" terimi, parçalanmış ve kombine kitleri içerir.

Burada kullanıldığı şekliyle SeVc terimi, aşağıda tarif edilen SeVc omurgasına dayanan herhangi bir yapı ile ilgilidir. Örneğin, sınırlayıcı olmayacak şekilde, bir yön, M-F gen bağlantısına klonlanan bir lusiferaz raportör genini içeren bir modifiye SeVc yapısını gösteren bir SeVc-luc (M-F*)'dir. Tablo 1'e bakınız.

DETAYLI AÇIKLAMA

Mevcut buluş rekombinant virüs vektörleri, vektörleri oluşturma yöntemleri ve bu vektörlerin kullanımı ile ilgilidir. Mevcut buluş, patojenlere karşı koruma için modifiye edilmiş bir Sendai viral vektörü için yöntemler, rekombinant virüs yapıları ve bileşimleri ve kitler sağlar. Ayrıca, bazı yönleriyle viral yayılımı, klirensi ve bulaşmayı görüntüleme veya izleme için vektörler içerir. Bazı yönleri, viral yayılımı, klirensi ve bulaşmayı görüntüleme veya izleme için vektörleri içerir. Bir yönüyle, buluş aşağıdaki özelliklere sahip yeni bir rekombinant Sendai virüsü aşısı vektörü ile ilgilidir: ((i) ters genetik tarafından kolay kurtarıma kapasitesi, (ii) *in vivo* ve *in vitro* virüs izlemesi için bir markör gen taşıma kapasitesi, (iii) ekspresyon desteği ve ilgili genler SeV genomunda farklı pozisyonlara dahil edildiğinde yabancı proteinlerin immünojenikliği, (iv) primatlarda sınırlı büyüme, (v) primatlarda aşılama ve immünojenisiteyi desteklemek için uygun replikasyon yeterliliği. Ayrıca, bazı yönler ayrıca (vi) 33°C'de sınırlı büyüme ve 37°C'de daha az büyüme özelliği sağlar. Mevcut buluş, beklenmedik bir virüs vektörü atenüasyon dengesi, virüs vektörü büyümesi, yabancı gen ekspresyonu için kapasite ve bu arzu edilen özelliklerin her birini desteklemek için immünojenisite sergiler.

Bir yönüyle, buluş, modifiye edilmemiş Enders veya Z suşları dahil olmak üzere diğer SeV vektörlerine beklenmedik şekilde üstün olan, kolayca kurtarılabilen ve primatlarda hem atenüasyon hem de immünojeniklik sergileyebilen bir vektör sağlar. Yöntemler, rekombinant virüs yapıları ve formülasyonları ve kitleri, bu Sendai virüs vektörünün bir

Aşağıda, bir RSV F geni dizileri, modifiye edilmiş bir Sendai virüsü yapısında (pSeVc) sunulan farklı Sendai virüs genleri için protein dizileri ve Sendai virüs genomunda (pSeVc-RSVF (F-HN)) F-HN pozisyonunda eklenen RSV F genini taşıyan pSeVc rekombinantı için bir dizi bulunmaktadır. İlgili translasyonlar da gösterilmektedir. Tüm diziler 5' ile 3' (soldan sağa) olarak listelenmiştir. (Ayrıca, diziler için Şekil 7'ye bakın).

[illegible]

MEIHKARAITTITAMTECFASGQNIETFFYQSTSAVSKGY-SALRTGWYTSVITELSNIKKNKNGTDAKAKIKQFELD
KYKNAVTELQLLMQSTQATNARARELPREFMNYTLNNAKKNVTLSKKKRRBTGLGVLGVSASASGVAVSVLHLECE
VNIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDRKNIYDKQLLPVYNKQSCS-SN-ETV-EHQKNNRLLLTREFSVNASVITP
VSTYALTNSELLINDMPITNDQKCLMSNNVQVIRQQSYSM-SIKEVLAIVVQLPLYGVMDBTPQWLHTSP
LITNTKEGSNIELTRTORGWYCDNAGSYSEFQAECTKVQSNRVFEDTMSLTPSEWNLCNVDFENPKYDCKIMTSK
TDVSSW-TSLGAPSCYGRKTKLASKKNAGIKTFNGEDVYSKKGVDVSVGNILYYVNIQIGKS-VVAGEPIHFXLP
LVEPSDFEDASISQVNEKINQS-ABIRKDELLHNW-AGKSTEN-MITTIIVINILSHAGGELLVYCARSTPVT-S
KDQLSGINNIASFNI

NP protein dizisi: (SEQ. ID NO.:5)

MAGLLSTEDTSSRRSESINKSGGAWIPGQRSTVSVFVLPGSVTDADKLFZATTELAHSLOTDKQHSQRRGFLVSLLAM
 AYSSPEFLVLTATGVNADNVKYVLYNTFKDKPKRTKTDGFEVKTROPEYERTTEWLEGPNNKSEFLTGGQRDAADPDTELTQTYG
 YPAQLGAILVQVNIWLVKAITSSASLRSGEENLEAFRQDGTVRGALVEITGEIVEGIGSVMSQQSLVSLMVEITLVIMTA
 RSDLTTEKNTQIWNMYRDAGTASFYNTIKYGVETKPAALTLSHLRPGDINKIRSLIDTYLSKGRAPFICILKDPVIGEF

5

AFSVPFALNSYAMGVAVVQNKAMQQYVTRTYLDMEMFLGQAVAKDAESKISSALEDFLGVTDTACERIRHFLANISGGD
 GAYIKRTGGGAIEVALDNADIDLETCAHADQDARGWGGESGERKARQVSGGHVTVLHGAERLEEETDQEDVSDIERRIAMP
 LAFFRQEDSATHGDEGRNNGVDHDFDDTAANAGIGGI

P protein dizisi: (SEQ. ID NO.:7)

MDQDAFLKEDSEVEREAPGGRESLSDVIGFLDAVLSSEPTDIGGDRSWLHNTINTPQPGSAIRAKSECEGEVSTPSTQD
 NPSGEESEVSGRTSKPEAEAHAGNLKQNIHRAFGGRTGTNSVSQDLGGGDSGILENFFNERCYPRSEIEDENREMAAHP
 DKRGEDQATGLPTEYRGGTSLPDFGEGGASNNGRSMFGSSHSAPVTGVIVPSPELEFAVIRNKQPRFINSCKEPLTPAT
 VFGTRSPPLNRYNSTGSPRGKPRSTQDEHINSGBTPANRVKDRKPPIGTRSVSDCFANCRPIHPELETDSTKKCIGENTSS
 MKEMATLLTSLGVTSQAQEFESSRDSYVFAARRALKSANYAEMTFNVGGLLSAEKSSARKVDENKQLLKQIQESVESFRD
 IYKRFSEYQKEQNSLLYSNLSTLHILIDRSGKTDNTDSLTRSPSVFAKSKENKTKATRFDPSELTLEUMKYKPOLIHEDF
 RDELINPVYQERDEPKASNAKLLPSKEKPHSLRLVJESSPLSRKKAAYKSLSKCKLUXEVKAVMELVEEDIESLI
 N

C protein dizisi: (SEQ. ID NO.:9)

MPSELKKIKLRGRQGEESRSMISDSSMLSCRVMQLTSEGTEAGSTTPSTLPKQQAIPTEPKVRAKERKSQHRPRKTIQV
 VRFVESLUGEQASQRQKHMLETLINKIVTGPLGEELVQTLVLRNAYDETPESLKLQMPREDIRQVLMKMTERKWLTLRG
 FKTKLKDFQKRYTEVHPFLMKCKVEQWTFANSAAHCVQE

10

M protein dizisi: (SEQ. ID NO.:11)

MAQVYRFPRKFSYEDVSTVEPLPLRTGPDKKAIPYIRCIKVGDPKKGVRVLDLLLGFETPKQTTLGVSVDLTERTSYS
 TGGGSEPIGVAKYVGTDQFELKACTDLBITVRRTVRAGEYVWYVDSGAPLPWSGRIRQWTFENANKVALPQCLPVD
 KDIHERVVEVNGTSLGAILIAKIPKTLADLALPMSISYNLUVTKTGESTEQRSWLPVLDQGEKKLNFMYLGLIRKKG
 KLYSVVEYKSKIERMRLTESLGLTGGTSEHVQVTELSKTEPSQLAHRRAVCFPLMXNIPHMVIVKAAASVELTGVDAVEQ
 PALPRDEHYVAVVAKNIGHIRKIL

F protein dizisi (SEQ. ID NO.:13)

MTAVTQFSQITSTSLVYLTLVSCQEPDRLSNIGVTVDFGKSLKIAQSHESRYTVLSLVPGVDLENGGTAQVITQYKSL
 ENRLLIPEDALDQLALCLVNDITQNAQVPUSRFGAVIGITAIQVATSQETIAGIALALAPAKRDIALINKSMKTH
 KSTELLQNAVGEQCALKTLQDFVNDEIKPATSELGCTTAALRLGIKITQHYSGELTAFGSNFGTIGTKSLTQALSSLYS
 ANITEIMTITRTGQSNIVDVIYTEQIKGTVIDWDLRYMVTLSVKIPILSEVPCVLIMKASSISYNIDGEEWYVTVPSHIL
 SRASELGGADITDQVESRLTYCEPRDPAQLIPDSQQRCTLGDTTRCPVTKVDSITPKFAFVNGGVVANGTASTETGTSR
 RPTSQDRSKGVVETHDNGLIGVNGVEYANRRGHDAWGVQNTVGPATATRPVDTSINADATNELQDSKAFLEKARK
 ILSEVGRWYNSREFWITCEWYVVLVYCEVENVLYRLRSMIMGNPQDRIPRDYTLFEKTRHYITNGGFDAMAER

HN protein dizisi (SEQ. ID NO.:15)

MDGDRGRDSYNSTSPSGSTKASGWERSEKVDTLCTSETQWASLATVLEITISARQQVSMKFSYMTVEALNMSSR
 EVKESITSLTRQEVIRAVNTQSSVQTGIPVLLNKNSRDVQMDKSCSRQELTQLCESTIAVHHAFGIAPLEPHSEWRCP
 WSEPYLSDPKISLPGPSLLSGSLESGGVLPSTSEGAAYSSNLTQGCADIGKSYQLQLEYISLKSMDHFDLNP
 VVSHYDINDNRKSCSVVATGTRGVQLCSPTVDERTDVSSDGEDVLDVLDLKGSTKSHRYNSFVNDHPSAISVSV
 GNGIATEGSLIFLGYSGLTTPLQGDTKORTQGCQVNSQDTNEALKITWLGKQVWSVIIQVNDYLSERPKIRVTTIFITQ
 NYLGAGRLIKLGDVYCYTRSSGNNSQLQIGVLDVSHPLTNNTPHEALSRPGNEFCNWNTPKFCISGVYTDAYPLSP

15

DAANVATVLIYANTSRVNPPTIMYSNTTNIINMFKIKVQLFAAYTTTSCITMEKGYCFHITETNQKSLNTLQPMLEKTSI
 PKLQKAES

L protein dizisi (SEQ. ID NO.:17)

MDGQESSQNPSDILYPECHLNSPIVRGKIAQLHVLIDVYNQPYRIKDDSHNITKHKIRNGG
 LSPRQIKIRSLGKALQRITIKDIDRYTFEPYPITYSQELURIDIPFICDKIRSVFAYSDRIETREI
 SSCIQDIWLNIEKQIGNIEGREGYDEIQDIGTIPFITDKYSRNRWYRPELTWTSIKYDMR
 WMQKTRPGGPIDTSNSHNITFEKSYTLATYGDIA'MI'NKITLTGYHTPELVI MYCDV
 VTCRWNMISAACHIDKKSIGHSKCELUWLVDSIESSELGELIYNVATLEPLSLAIQEN
 DPEVPELRCAPMRHIVLELQIVL' SRDVTDAEADIVLSILAHITLSDIEKAEIESERTI
 GHPSILAVLVAADKYRAMMYAQKAIKUKTLYECLAVETIHINGYRERHCGQWPPCDEPD
 HVCLIELRNAQGSNTAISYEC'AVDNYISFIEGKERKIEPQIDEDITTYMKDKAISPRKEA
 WDSVYPDSNLYYKAPESSEIRRIIEVEINDENENPEEJINYVESGDWIKDEEFNISYSIKEL
 KLIKQELGRLEAKMTYKMRVQVLAETLAKCICELERENGMYKGEIDILKRIITLSVSG
 VPRIDSVYNNSKSSEKRNENEGMENKNSGGYWDKKRSRHEFKATDSSIDGYETLSCHLT
 IDLKKYCLNWRFEESTALFGQRC'NEIEGFKTEFNWMHPVLERCTIYVGDOPYCFVADRMH
 RQIQDEHADSGIHHNPRGIEGYCQKIWLISIAHLAAVRVGVVRSAMVQCDNQALA
 VTSRVPVAQTYKQKKNHVYEETKYFGALRHVMFDVGHLEKLNEIISSKMEVYSKRIY
 YDGLILPQCLKALFKCVFWSSETLADENRSACSNISTIAKAIENGYSPIIGYCIALYKICQ
 QVCSLGMILNPIISPVRDQYFKCKNWLRC'AVIPANVGGENYMYSTRCEVRNIGDPAY
 AALADIKREIRADEIDKQVLYRVMNQEPGDSSELDWASDPYSCNIPHSQSITTHKNITA
 RSVIQESPNI'LSCLFTETSGEEDINLASELMDRKVILPRVAHEILGNSITGVREALAGMI
 DTTKSLVRASVRKCGLSYGHRRIVNYDILQYETLTRTERKPKVKDNIFYEYMU'SVFLAV
 GLRQKMWHITYGRIPIHGETPDPIELRGIEIEGAEVCKLORSEGADPIYTWETYPDNID
 LDIIL
 NGCPAIRIPYIGSATIDERSIAQLCYVRNISKPAKAARL'AMVY'FWAYGIDEISWMAVAL
 IAQIRANISLENKLELPVSTSTNSHREKDIATQMKISSATLVRASREHISNDNMAIK
 LAGLSKDIENLYQQ'MLIGLSLEENMRYKKCSUGKPLILHLHLNNGCCIMESPQELANP
 PRSTLDLEITQENNKLIYDPDPLKDV'DLELPSKVRDVVHTVDMTYWSDDEVIRATISICTA
 MLIADTMSQLDRDNLKEMIALVNDDDVNSLIEFMVIDVPLECSTFGGLVNOFAYSLY
 GLNIRGREEIWGHVVRILKDTSHAVLKVLSNALSHPKIEKRFWNAGVVEPVYCPNLSNQ
 DKILLALSVCEYSVDLEMHDWQEGVPLEIFIC'DNDPDVADMRRSSEFLARHLAYLC'SLAE
 ISRDGPRLESMSLIERLESISKYLEITELDDPVLRYSQITGLVTKVTPSTLT'YIRKSSIKVL
 RIRGIGYPEVLELDWDPEADNALLDGLAALIQQNIFLGHQIRAPFWGLRVSKSQVLRURG
 YKETIRGIEGRSGVCLITPDGRYLSHQIRLEGINSTSLKALELTYLISPLVADKDKDRUY
 LIGEGAGAMIESCYDALLGICINYYNSGVYSUDVNGQREINYPALVALAGKKUNNATSL
 GQRYKVIENGXPGSTWIGNDECTALWNEIQNSSIGVHCDMEGGDIHKDDQVATHEH
 YSVIRIAYL'VGDRDVA'ISKIAPRI'GTDWTRQISIVLYRYWDEVNIVIKTSNPASTEMYI
 LSRHPKSDIIE'DSKIVLASLIPISKEPDSIKIEKWIL'FKAKAHVWTRITREGSSSSGMIRP
 YHIQALQTEGFEFNIYKISRDFLSTMNIADTHNC'MIAFNRYIKDTIFFWARITFSDKRIKI
 JGKYDLYPVRDSC'KUKIJSRRIVLSWISLSMSTRIVTGSFPDQKE'ARLQLCIVLS'SSREI
 RNI'RVITKLLIYREEDIHSTYRIELTKLIKIMKILGAVKMI'GARQNFYITVIE'DGSLGDI
 EPHYDSS

pSeVc-RSVF(F-HN) (SEQ. ID NO.:18)

ACCAATCAAGACAAAAAATGCTATGGCATATATAATCAAGCTAGACACCGATTCTTAGGCT
 CAAAGCTATCCACCTTGAGGAGCAAGCTTCTAGACCTTTGGCTTTGGCTGGCAAAAGCTACCA
 TGGCTCGGCTTGGTGAAGCACTTCCATACATTTACCTCTAGGACAGAGCGAAAGCTATTAATA
 AGCTGGGACAGCACTGCTGCTATCCCTGGCCACAGGAGGACACTCTTAGGCTTCCCTACTAG
 CTCCAACTCTGACTGATGATGAGAGCACTAGCTATCTCATTTGCAACTACCTTCTTAGGCTTACT
 CATTGCACTACATAAGGAGGACCTCTACAGACGACCTTCTCTGGCTCTCTTGGCTTGTCTA
 TGGCTTACAGTAGCTCAGAACTGCTACTTGGCAACAAACGGAGTAAACGCTGATGCTAAAT
 ATCTGATCTACAACTATAGAGAAAGACTCTAACAGGACGAAGCAAGACGGATCTATTTGCTA
 AGACGACACATATCGAATATGACAGCACTACAGAAATGGCTGCTTGGACCTATGGCTAACA
 AGAGCTCACTCTCTCAGGGTCAAGGCTATGCTATGCAAGCACTGACACACTCTCAACCT
 ATCTGGTATCTGCTATCCCTAGGAGCAATAAATTTGCTAAGCTCTGATCTGCTGCTGAAAG
 CTATCACTAAGCAAGCTCTGGCTTAAAGCAAAAGGCTTCTCAACAGCTTAGAGGCTCTAGAC
 AAGACCTCACTGGTGAAGGCTGCTTAACTTCTACTTCTGAGACACTTGGACCTGCACTGCT
 CGCTTATATAGATCTAGCAAAAGCTTTGCTATCTCTATGCTTCTAGACTTCTCTCTCTATGA
 ATACTGCAAGATCTGATCTACTCAATTAGAGAAAGCACTCACTCACTCTGGGCACTTAA
 TCTGGAGATGCTAGGCTTGGCTTCTCTATGAACTATTAATATATGGGCTGAGAGCAAAAGA
 TGGCACTCTAAGCTTGGTAAAGCTGAGGCTGATATTAATAGATTAAGAACTCTAATAG
 ACACCTTATCTCTCAAAAGGCTCTCAGACCTCTCTTATCTCTATCTCTAAGCACTCTGCT
 ATGGCTGAATTTGCTCTAGGCAATTAATCTGGCACTAGGAGCTAAAGCTATGGGACTGGCT
 TCTTACAGCAACAAAGCAATCTAGGAGTACTTCAAGGGAGCAATATCTGATATGGAAA
 TGTCTTACTAGGCAAGCTGGTGGCAAGGCTATCTGAACTGGAAGCTCACTGGCTCTT
 AAGATGAGCTAGGAGCTGAGGATACAGCTCAAGCAAGCACTCACTCACTCACTGGCAAGCT
 TCTCTGGTGGGCTAGGCTCTTACTCAAACTCAAGGCTGGTGGGCTCACTGCACTAGCT
 TACTCACTCTCTCTATCTGACTTACTCACTAGAGCTTATGCTGACTAGGAGCTTACTGGCTT
 GGGCTGAGAAAGCTGCTCAAGATGGCTCACTGAGCTGAGGCTGAGCTCACTTCTGCTCACT
 TACTGCTCTGAACTCTAGAGCTAGGCAACCAATGATGAGGATGATAGACATAGAGA
 GAAGCAATAGCTATGAGACTCTGAGAGAGAGCTCAAGAGGATCTCTCAAGCTATGAGAGT
 AAGCTCTCACTCAAGGCTGCTCACTGACTCACTATGAGCACTCAAGAGCTAGCTGCTGCTA
 TAGGAGCACTTACTCACTATAGGCTTCAAGGCTTCTGATCTCTAGTAAAGCAAACTT
 AAGCTGCAAACTTCTCACTCACTGATGGCTCAAGCAAGCTCACTCACTCACTCACTCACT
 ACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 CATCTTAAAGCAAGCTTCTGAGCTGAGAGGAGGCTCAAGAGCAAGAGAGCTCTCTCT
 GGTGCTTATCTGATCTCTCTATCTGCTCTGCTGAGCTGAAGCACTGATATGCTAGGCTGA
 CCAAACTGGCTCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 CAAAACTAGGCTCAAGGAGAGAGCTCTCACTCACTGCTGACTCAAGATCACTCACTAGGCTGA
 GAGAGCTAGAGCTCTCTGGAGCACTAAGCAAGCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 TGTATCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 TGTATCTGCTCTGATGAGGAGCACTCTGGAATCTTTGAAATCTCTCACTATGAGAGGAGATA
 TCTGAGATCACTATTTGAGATGCAAACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 AGAAGCACTAGCTGCACTCACTCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 AGGAGCAAGCTGCTAGCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 AAGAGTCACTCTGCTCTGCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 GAACAAACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 CACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 ATCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 GAACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 CTCTGCTTCTAGAGAGCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT
 AGAGATGGCTCACTTCTGCTGAGCTCTGCTGCTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACT

[illegible]

TTGAGTCCAGGTTACCTATATATGCCCCAGGGATCCGGACAMTGATACCTGACAGCT
 AGCAAAAAGTGTACTTGGGGGACACAAACAAAGTGTGCTGTCACAAAAGTTGAGACAGCT
 TTATCTCAACTTTGGTTTCTGAAATGRRGGCTTTTGGCTAACTGCTATAGCATCCACAT
 GTACCTGGGGACACGGCAGGACCAATCAGTACGGATCCCTCAAAAGGTTGAGTATCT
 TAACTCATGACAACTGTGGTCTTATAGGTGTCAATGGGGTAGAATGTATCTCAACTGGA
 GAGGGACGGATGCCATTTGGGGGGTCCAGCACTTGACAGTGGCTCTGCAATTTGCTATCA
 GACCTGTTATATTTCTCTCAACTTGGTGTGCTACCAATTTCTTGCAGATCTCAAGCT
 CTGACCTTGAGAAAACACCGAAAATCTCTCTGAGGTAGCTACATCTGACAACTCAAGAG
 AGATCTCTATTACGATATAGTAGTTATGGTCTGAATATTTGGTCTATTATAGTGTATCT
 TCAATGGCTTTATAGACCTAGAGCTCAATGGCTAAATGGTAACTCAGATCTCTGATAC
 CCAAGGACACATATATATACACCGAAGATCACACATATGTCACCAAAACGGTGGTTTG
 ATGCCATCTCTGAGAAAACATCATACGAGTTTAAATAGATGCTTCTAAAGCACCAATG
 GTATCCGTTGAGATCTGTATATAAAGAAAAACCTAGCTCTCAAAAGTGGTCTGGCTGGT
 ACTTATGCTGGCTGGTACAAATGGAGTTCTAAATCTCAAAAGCAATGCAATTCACAA
 TCTCTACTGGTGTGCTATTTCTTTTGGTTCTGGTCAAAACATCTGAAGAATTTATCT
 AATCAACATGGTGTGCTAGCTAGCTAAAGCTATCTTACTGGCTCTGACAACTGGTGGTATA
 CCAAGTGTATATATAGAAATAGTAAATCTCAAGAAAATAGTCTAAATGGTAACTAGT
 CCAAGCTAAAATTTGATAAACAAAGATAGATATAATATAAAATCTCTGACAGAAATGG
 AGTTGCTCATGCAAGGACACCAAGCAATCAACATGGAGCTAGAAAGCAATLACCAAGCT
 TTATGAAATATACATCAACAAATGCCAAAAAAACAAATGTAATATTAGCAAGAAAGCA
 AAGTAAGATTTCTGGCTTTTCTTGAAGTGTGGATCGCAATGCCAGTGGCTGTGCTG
 TATCTAACGCTCTGACCTACCAAGGGGAAGTGAACAGATCAAAAGTGTCTACTATCTCA
 CAACCAAGGCTGTAGTCACTTATCAATGGGAGTTACTGTCTAACCACTCAAGTGTAG
 ACTCTCAAAACCTATATATATAAACAATTTGTACTATTTGTGAATTAAGCAATGTGACCA
 TATCAATATAGAACTCTGATAGAGTTCAACAAAAGAACAACTAGATCTAGATATTA
 CCAAGGCAATTTAGCTCTAAATGCAAGCTTACACCTGTGTAAGCACTTCAATGTAACTA
 ATAGTGAATTTCTCAATATCAATGATATGCCATATACAAATCATAGAAAAGTTAA
 TGTCAACCAATGTTCAATATTTAGACAGCAAAAGTTACTATATGTTCTATATATAAAG
 AGGAGTGTAGCTATCTAGTACAAATTCACCTATATGGTCTTATGTGATACACCTGTGT
 GGAACCTACACACTCTCTCTATGTACACCTAACCAAAAGCAAGTCTCAACATCTGT
 TAAACAGAACCTGACAGAGTATGGTCAATGGTCAATGTAGGATAGATCTCTCTCTCACT
 AAGCTCAACATGTAAACCTTAACTCAATGACATTTGTGTGACCAATGAAACAGTTTAA
 CATTCACAAATGAAGTAAATCTCTCAATGTGACATATCTCACTCAAAATGATTTTA
 AAATATGACCTCAAAACAGATGTAACTCTCTCTTATACATCTCTAGTAGCTATG
 TGTATGCTATGGCAAAACATAATGTACAGCATCAATAAAAATCTGTCAATATAAAGA
 CATTTCTAACGGCTGTGATTAATGATCAAAATAAGGGGGTGGTACTCTGTCTGTAGGTA
 ACACATTAATTAATGAAATAGCAACAGCTTAAAGTGTCTATGTAAAAGCTGACCAAA
 TAAATAATTTCTATGACCTATAGTATTTCCCTCTGATGAATTTGATCATCAATATCTC
 AAGTCAACGAGAACATTAACCACTACCTTAGCATTTATGCTGAAATCTGGATGAATTAAT
 ATAAATGAATTTGCTGGTAAATCACTCAAAATATAGTAACTACTATATATATAGTGA
 TTATAGTAAATTTCTATCATTAATTTGCTGTGTGACCTCTCTATATCTCAAGGCTAGAA
 GCTACCTAGCTACACTAAGCAAGATCAACTGAGTGTATATAATATATGCAATTTAGTA
 ACTAATATAAGAAAACCTAGGCTGAAAGTGAAGCTGGTGGCAAAACAAAGCAAGATATGG
 AATGGTGAATGGGGCAAACTGACCTGTGACCTGGCTTACCTCTCTTATCTCTATGCTCACTCAAA
 AATTAGCAATAGGTTGCTCAAGGCTCACTAAAGTGTACATGTGTGCTGTATCTCTAT
 CTACCTAGTGGCTTTGCTCAATGTCTCAAGTGTCACTGTGATATAATTTGTGTAGAC
 AAGGTATAGTATGAACACTACTCAATGACTGTAGAGGTATCACTAATGAGCTAGTACCTG
 AGTGTAAAGAGTCACTTACTATCTCAATAGGCTAAGAGGTATCTGCAAGGRTGTGTAACT
 TCTCAAGCTCTGTGTCAAACTGGTATCTAGTCTGTGTCACTCAAAACAGCACTGATGTA
 TCTAGATGATGATACATGCTGTGTAGCTCACTCAAGAGCTCACTCAAGCTCTGTGTAGAGTACGA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Ayrıca, mevcut buluşun yönleri, sadece aşağıdakileri içeren ve sınırlayıcı olmaksızın, bazı avantajlar üzerinde durmaktadır: (i) modifiye edilmemiş bir Sendai virüsü aşısı, Faz I klinik deneylerine dayanan insanlarda iyi tolere edilir, (ii) insanlar, Sendai virüsünün doğal bir konakçısı değildir ve insanlarda teyit edilmiş Sendai viral enfeksiyonu vakaları bildirilmemiştir, (iii) hayvan çalışmaları uzun vadede immünite (hayvanlar aşılardan sonraki aylarda patojene maruz kaldıklarında koruma görülür (Jones et al. 2009, Vaccine 27: 1848) ile birlikte Sendai virüsü aşısının intranazal aşılama üzerine antikör üretimi ve hücresel bağışıklığın uyarılmasını göstermiştir.

I. Modifiye Enders Suşlarının Geliştirilmesi

Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bir yabancı gen ve modifiye edilmiş bir L geninden oluşan rekombinant Sendai viral vektörünün, bir aşı olarak kullanılmak üzere verimli ve güvenli bir vektör sağladığına inanılmaktadır. Virüs kurtarma ve büyümesini etkileyen bölgeyi tanımlayabilmek için Z suşu ve Enders suşu genleri içeren çeşitli pSeV gen kimeraları oluşturulmuştur. Virüsün kurtarılması ve büyümesinin sonuçları, bir kimerik Enders/Z viral vektörünün arzu edildiğini göstermektedir. Örneğin sadece ve sınırlayıcı olmayacak şekilde, L geninin N-terminali yarısını içeren bir AscI/NheI fragmanının verimli büyüme için önemli olduğuna inanılmaktadır. Bu bölümü Z suşundan içeren virüsler diğer test yapılarına göre daha iyi hale gelmiştir. Yapı ve virüs büyüme verileri aşağıdaki Şekil 15 ve Tablo 1'de özetlenmiştir.

Çeşitli Enders Suşu/Z Suşu Sendai Virüsleri için Kurtarma Sonuçlarının Özeti:

Tablo 1. Enjekte edilen yumurtalardan alınan allantoik sıvıdan HA titresinin incelenmesiyle Virüs Büyümesinin Karşılaştırılması

Tablo 1. Çeşitli Enders/Z kimerik SeV'lerin kurtarılması.

Virüs	Z suşundan bölüm	pSeVE(3)'den bölüm	Genlerin orijini						Maksimum HA titre
			NP	P	M	F	HN	L	
SeV(E)3			E	E	E	E	E	E	370

Virüs	Z suşundan bölüm	pSeVE(3)'den bölüm	Genlerin orijini						Maksimum HA titre
			NP	P	M	F	HN	L	
SeVa	KpnI/NotI (15,281-6,670)	KpnI/NotI (6670-15281)	Z	Z	Z	Z	E	E	730
SeVb	NotI/AscI (6,670-8,441)	NotI/AscI (8,441-6,670)	E	E	E	E	Z	E	240
SeVc	AscI/NheI (8,441-11,960)	AscI/NheI (11,960-8,441)	E	E	E	E	E	*Z/E(1-1,135 Z; 1,136-2,228E)	6,600
SeVd	Sall/NotI (6,670-2,074)	Sall/NotI (2,074-6,670)	Z	E	E	E	Z	Z	2,200

Yöntem: 6 odacıklı plakalardaki 293T hücreleri, 1 saat boyunca rekombinant vaksinia virüsü vTF7.3 (10 ul/çukur) ile enfekte edildi ve pTF1 vektöründe Sendai virüsü NP, P ve L genleri ile birlikte tam genom Sendai virüsü cDNA'ları ile transfekte edildi. Hücreler 2 gün süreyle kültürlendi ve daha sonra toplanan hücreler embriyonlanmış yumurtalara enjekte edildi. 35°C'de üç günlük kültürden sonra, allantoik akışkanlardaki virüs titreleri ölçüldü. Z: Suşu Z, E: Suşu Enders.

Genleri Enders ve Z kaynaklı olarak birleştiren tam bir Sendai virüsü genomu oluşturmak için dört kimera yapıldı. Kurtarılan virüsler daha sonra büyüme için test edildi ve maksimum HA titresi ile ölçüldü. *SeVc durumunda, L geni kısmi olarak Enders ve kısmen Z'den türetildi, bu da Enders L proteinine sekiz amino asit değişikliği olan bir modifiye Enders suşuna neden oldu. Bu modifikasyon beklenmedik bir şekilde, ters genetik, primatlarda atenüasyon ve primatlarda immünojenisiteyi desteklemek için yeterli replikasyon yeterliliği ile fevkalade kurtarma kapasitesine sahip bir virüs üretti. Sendai virüsleri SeVb, SeVc ve SeVd de çeşitli konsantrasyonlarda seyreltildi ve büyümelerini görmek için yumurtalara enjekte edildi. Veriler ayrıca SeVc ve SeVd'nin SeVb'den çok daha iyi olduğunu gösterdi. Dolayısıyla, bu verilere dayanarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, pSeVc, rekombinant virüslerin daha fazla yapımı için kullanıldı. Aşağıdaki, RSV F genini taşıyan modifiye Enders-bazlı aşının davranışını tarif etmektedir.

Modifiye Enders tabanlı aşı primatlarda attenüe edildi

Şekil 16, Afrika yeşil maymunlarında Sendai virüsü Z, Sendai virüsü Enders ile modifiye edilmiş bir Sendai virüsü Enders-bazlı aşı SeVc-RSVF (F-HN) arasındaki büyüme farkını göstermektedir. Sendai virus Enders aşısı ve Sendai virus Enders-bazlı SeVC-RSVF (F-HN) aşısı, SeV Z suşuna kıyasla Afrika yeşil maymunlarının hem üst hem de alt solunum yollarında (URT ve LRT) daha az titreye büyüdü (aşağıdaki MPIV1).

- 10 Şekil 16'ya referansla, 16A ve B, bir Z suşunun Sendai virüsü (MPIV1) ve insan parainfluenza virüsü tip 1'in (HPIV1) sırasıyla intranazal ve intratrakeal aşılama sonrası bir nazofaringeal swab (URT) veya trakeal lavaj (LRT) içindeki ortalama günlük virüs titrelerini göstermektedir. (Skiadopoulos et al. 2002 Virology 297:153). Bu panelde gösterildiği gibi, 10e6 dozdan sonra (BT ve IN uygulanan) pik MPIV1 titresi URT'de 15 10e4'ü aşmış ve LRT'de 10e6'yı aşmıştır.

- Şekil 16'ya referansla, 16C ve D, Sendai virüsü Enders aşısı (SeV) veya RSV F (SeVc-RSVF (F-HN)) eksprese eden rekombinant modifiye Sendai virüsü Enders-bazlı aşı ile aşılanmanın ardından günlük titreleri göstermektedir. Aşı dozları 10e6 olduğunda (IT ve 20 IN verilen) pik viral titreleri Z'den düşüktü. URT'de yaklaşık 10e3 (Z'ye kıyasla 16C, üst, 1 log azaltılmıştır) ve LRT'de yaklaşık 10e4 (16D, altta, Z'ye kıyasla 2 log azaltılmıştır). Enders bazlı Sendai virüsü vektörü, Sendai virüsü Z'ye kıyasla açıkça attenüe edilmiş, ancak immünojenisiteyi korumuştur.

- 25 Sendai virüsü Enders-bazlı aşılar ayrıca Afrika yeşil maymunlarına uygulandıktan sonra b/hPIV-3 bazlı bir RSV F aşısına kıyasla titrelerde önemli ölçüde daha düşük olmuştur. B/hPIV-3 bazlı RSV F aşısı bebeklerde zaten klinik çalışma halindedir. B/hPIV-3-bazlı RSV F aşısı, aşı sadece 2 x 10e5'lik bir dozda uygulandığında bile, Afrika yeşil maymunlarında sırasıyla URT ve LRT'de > 10e5 ve 10e7 pik titrelerine 30 ulaşmıştır (Tang et al. 2004 J. Virol 78: 11198).

Enders bazlı Sendai virüsü aşısı, Afrika yeşil maymunlarında bir immünite yanıtı ortaya çıkarmaktadır.

Şekil 17, F-HN pozisyonunda (SeVc-RSVF (F-HN)) RSV F genini taşıyan modifiye Sendai virüsü Enders-bazlı aşısının, Afrika yeşil maymunlarda RSV F (A) ve Sendai virüs bileşenleri (B)'ye karşı bir immünite yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. RSV F'ye karşı antikor tepkisi, aşılardan yaklaşık 3 hafta sonra bir enzime bağlı immünosorbant analizinde (ELISA) hayvan serumlarının test edilmesiyle gösterilmiştir. Kontrol hayvanları, yaklaşık 3 hafta önce intranazal ve intratrakeal yollarla PBS alan Afrika yeşil maymunlarıydı. İkinci hayvan grubu, aynı yollarla değiştirilmemiş bir Sendai virüsü (SeV) aldı ve üçüncü hayvan grubu, F-HN pozisyonunda (SeVc-RSVF (F-HN)) RSV F genini taşıyan modifiye SeV Enders bazlı aşığı almıştır.

RSV F (SeVc-RSVF (F-HN)) eksprese eden rekombinant modifiye Sendai virüsü Enders-bazlı aşı, Afrika yeşil maymunlarını RSV enfeksiyonundan korur

Şekil 18, F-HN pozisyonunda RSV F genini taşıyan modifiye Sendai virüsü Enders-bazlı aşısının, Afrika yeşil maymunlarını alt solunum yolunun RSV enfeksiyonundan tamamen koruduğunu göstermektedir. Sonuçlar, RSV tehdidinden üç ila on gün sonra BAL numunelerinin analizini göstermektedir. RSV F genini taşıyan (SeVc-RSVF(F-HN)) değiştirilmiş Sendai virüsü Enders-bazlı aşığı alan test hayvanları, soldaki kontrol hayvanları (mavi ve kırmızı, A) ile karşılaştırıldığında BAL'de (yeşil, sağ panel B) hiçbir test virüsü göstermemiştir.

Düşük doz modifiye Sendai virüsü RSV F eksprese eden Enders bazlı aşı koruyucudur

Şekil 19, RSV F geninin Enders-bazlı SeV'nin (SeVc-RSVF (F-HN)) F-HN pozisyonuna yerleştirilmesi durumunda, 10e2 kadar düşük bir dozda uygulandığı halde aynı zamanda, pamuk sıçanlarda RSV'ye karşı tam koruma sağladığını da göstermektedir. Böyle düşük bir dozda aşı aktivitesi, hem aşı etkinliği hem de aşı üretimi açısından caziptir. Sonuçlar, kontrol ve aşılınmış pamuk sıçanlarındaki testten üç gün sonra akciğerlerdeki RSV test virüsünün titrelerini göstermektedir.

Böylece, F-HN pozisyonunda (muhtemelen P-M ve M-F'de veya diğer pozisyonlarda) RSV ile SeV Enders-bazlı RSV aşısı, hem Afrikalı yeşil maymunları hem de pamuk sıçanları RSV testinden korumak için yeterli büyümeye sahiptir. Aşı dozları 10e2 kadar düşük olabilir. Virüs, SeV Z suşuna kıyasla Afrika yeşil maymunlarında attenüe edilir ve

şu anda bebeklerde klinik deneme halindeki b/hPIV3-RSV F aşısı ile karşılaştırılır. SeV Enders bazlı aşının, hPIV-1 için rekombinant olmayan bir aşı olarak ve diğer herhangi bir patojen için rekombinant bir aşı olarak son derece çekici bir aday olduğu üzerinde durulmaktadır.

5

II. Lusiferaz Kullanan PIV Model Sistemi

Doku kültürü ve hayvan modellerinde hPIV enfeksiyonu üzerine yapılan deneysel çalışmalar temel replikasyon mekanizmalarının ortaya konmasına ve prelinik aşı adaylarının değerlendirilmesine yardımcı olmuştur [Murphy et al. 2002, J Clin Invest 110: 21-27; Moscona, A. 2005, J Clin Invest 115: 1688-1698; ve Schaap-Nutt et al. 2010, Vaccine 28: 2788-2798]. Bununla birlikte, PIV enfeksiyonunun PIV ile ilişkili hastalığa tam olarak duyarlı olan bireysel, canlı hayvanlarda yayılmasının görselleştirilmesi, PIV patojenezi, virüs-konak etkileşimleri ve virüs iletimi hakkında daha kapsamlı araştırmalara olanak sağlayacaktır. Sendai virüs omurgasında bir markör genin yerleştirilmesi virüs büyümesi, virüs lokalizasyonu ve virüs iletiminin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak çalışılmasına yardımcı olabilir.

İşaretleme sisteminin gösterimi olarak, lusiferaz geni modifiye Sendai virüsü vektörü içinde çeşitli pozisyonlara yerleştirilmiştir. Şekil 9, stratejiyi göstermektedir. Şekil 9'a referansla, panel A'da yan taraftaki NotI kısıtlama bölgelerini, ateş böceği lusiferaz raportör genini, gen ucunu ve gen başlangıç dizilerini içerecek şekilde tasarlanmış bir pGEM3 klonlama plazmidi içindeki diziler gösterilmektedir. Lusiferaz raportör gen kasetini üç gen bağlantısına (panel B) eklemek için, üç pSeV genom plazmidi, P-M, M-F ve F-HN gen bağlantılarının her birinde özgün bir NotI kısıtlama bölgesi içerecek şekilde klonlanmıştır. PSeV-luc(MF*) genom plazmidi için, doğal olarak oluşan suboptimal başlatma sinyali AGGGATAAAG (SEQ. ID. NO.: 19) ayrıca, daha verimli başlatma sinyali AGGGTGAAAG (SEQ. ID. NO.: 20) için dengelenmek üzere mutasyona uğramıştır. Yabancı gen ve ek gen eklemi eklenmesi nedeniyle beklenen atenüasyonu kompanse etmek için ateş böceği lusiferaz gen kaseti (panel a), pGEM3 plazmidinden NotI kısıtlama bölgeleri kullanılarak pSeV genom plazmidlerine alt klonlanmıştır. Panel C, WT'nin kurtarılması için pSeV cDNA plazmidlerinin ve lusiferaz raportör genini (luc) içeren rekombinant SeV'lerin tasarımını gösterir. Sendai virüs genlerinin nükleoprotein (N), polimeraz (P), matriks (M), füzyon (F), hemagglutinin-nöraminidaz (HN) ve büyük (L) proteinin konumlarının yanı sıra T7 RNA polimeraz

promotör (T7) ve hepatit delta virüsü ribozim dizisi (ribo) gösterilmiştir. Gen başlatma dizileri yeşil olarak gösterilmiştir ve doğal olarak oluşan, suboptimal AGGGATAAAG (SEQ. ID.NO.: 19) gen başlatma dizisi WT Sendai virüsünün M ve F genleri arasında dizi sarı olarak gösterilmiştir. Gen uç dizileri kırmızı olarak gösterilmiştir. N geninin yukarı yönündeki 3' lider dizisi ve L geninin aşağı yönündeki 5' fragman dizisi basitlik açısından gösterilmemiştir.

Lusiferaz genini eksprese eden kurtarılmış virüsler, farelere uygulanabilir ve uzun bir süre boyunca izlenebilir. Üst ve alt solunum yolu bu şekilde izlenebilir. Canlı farelerin solunum yollarında Sendai virüsü enfeksiyonunun non-invaziv biyoluminesans görüntülemesi Şekil 2'de gösterilmiştir. Sekiz haftalık fareler, 7.000 PFU SeVc-luc (PM), SeVc-luc(F-HN), veya SeVc-luc(MF*) ile intranasal olarak aşılandı. Her 24 saatte fareler, bir Xenogen Lumina cihazı ile görüntülendi, izofluran ile anestezi edildi, lusiferin substratı ile intraperitoneal olarak enjekte edildi ve daha sonra iyileşmeye bırakıldı. Şekil 2'ye referansla, bir deneyde, SeVc-luc(P-M), SeVc-luc(F-HN) veya SeVc-luc(MF*) ile enfekte edilmiş 129/SvJ fareleri için 2. günde (panel a) veya 7. günde (panel b) enfeksiyon sonrası (p.i.) biyoluminesans gösterilmektedir. İkinci bir deneyde, SeVc-luc(MF*) ile enfekte edilmiş 129/SvJ, DBA/2, BALB/c veya C57BL/6 fareleri için 2. günde (panel c) veya 7. günde (panel d) biyoluminesans gösterilmektedir. Veriler, gökkuşağı kütlesi ölçeğinde, radyans, biyoluminesans yoğunluğunun bir ölçümü olarak görüntülenir. Radyans değerleri 1×10^6 (mavi) ile 1×10^9 (kırmızı) foton/snn/cm²/steradian arasında değişir. Kırmızı daireler, nazofarenks içindeki toplam akışı (foton/sn) hesaplamak için ilgili bölgeleri (ROI) gösterir ve kırmızı dikdörtgenler trakea ve akciğerler için ROI alanlarını gösterir. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, metodolojinin ayrıca (i) in vitro virüs büyümesi çalışmaları, (ii) çoklu fare suşlarında virüs araştırmaları (iii) hayvanlar arasında virüs bulaşma çalışmaları, (iv) virüs dozu ile ilgili çalışmalar, (v) aşı hacimleri çalışmaları ve (vi) adjuvan çalışmalarını (örnekler aşağıda verilmiştir) da destekleyebileceğine inanılmaktadır. Aşağıdaki metin, lusiferaz sistemini daha ayrıntılı olarak açıklamaktadır ve sayısız uygulamayı vurgulamaktadır.

A. GİRİŞ

Fareler, hPIV'ler tarafından enfeksiyona karşı zayıf bir şekilde izin vermektedir ve pamuk sıçanlarında, hamsterlerde, gine domuzlarında ve yaban gelinciğinde hPIV

enfeksiyonu, genellikle akciğerlerde minimal veya saptanamayan patoloji ile asemptomatiktir [Karron et al. 2007, Parainfluenza Viruses. 5. Ed. pp. 1497-1526]. Sonuç olarak, bir dizi çalışmada, deneysel bir ortamda PIV patogenezi araştırmak için bir model olarak farelerde Sendai virüsü (SeV) enfeksiyonu kullanılmıştır [Nagai, Y. 1999, Rev Med Virol 9: 83-99 ve Faisca et al. 2007, Res Vet Sci 82: 115-125]. Sendai virüsü, laringotrakeobronşitin (pediatrik krup) önde gelen nedeni olan hPIV1'in murin karşılığıdır [Denny et al. 1983, Pediatri 71: 871-876]. Sendai virüsü ve hPIV1 %78 amino asit dizi özdeşliğine sahiptir [Takimoto et al. 2005, Viral Immunol 18: 255-266], çapraz koruyucu bağışıklığı ortaya çıkarmıştır [Dave et al. 1994, Virology 199: 376-383; Hurwitz et al. 1997, Vaccine 15: 533-540; ve Sangster et al. 1995, Virology 207: 287-291] ve doku-tropik ve epidemiyolojik benzerlikleri paylaşır [Karron et al. 2007, Parainfluenza Viruses. 5. Ed. pp. 1497-1526 ve Faisca et al. 2007, Res Vet Sci 82: 115-125]. Dahası, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, Sendai virüsünün hPIV1 için bir Jennerian aşısı [Slobod et al. 2004, Aşı 22: 3182-3186] ve hRSV, hPIV3 ve hPIV2 için bir aşı vektörü [Jones et al. 2009, Aşı 27: 1848-1857; Zhan et al. 2007, Vaccine 25: 8782-8793; ve Zhan et al. 2008, Vaccine 26: 3480-3488] olarak umut vaat ettiği üzerinde durulmaktadır.

Sendai virüsüne ve 1950'lerde ilk izole edilen ve 50 yıldan uzun süredir incelenen hPIV'lere rağmen [Karron et al. 2007, Parainfluenza Viruses. 5. Ed. pp. 1497-1526], PIV enfeksiyonu ve bağışıklığının temel yönleri halen bilinmemekle birlikte, PIV patogenezi ve bulaşması konusundaki anlayışımızda ve kontrol önlemlerinin gelişiminde de doğrudan etkili olacaktır. Örneğin, Sendai virüsünün bulaşması sonrası solunum yolundaki doğal enfeksiyonun uzamsal ve zamansal yayılımı bilinmemektedir, çünkü kurban edilmiş farelerden gelen virüs titrelerini ölçen klasik deneyler, büyük ölçüde hayvanlar arası değişkenlik ve hata ile sınırlanmıştır, bu da belirsiz sonuçlara neden olur [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 ve van der Veen et al. 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246]. Ayrıca hPIV ve Sendai virüs bulaşmasının, doğal konakçılarında ciddi patolojiye neden olmadan immünite ile sonuçlandığı da bilinmemektedir. LRT enfeksiyonunun bulaşmaya katkısı bilinmemektedir. Son olarak, akciğerlerde enfeksiyon ve eşlik eden konakçı yanıtı hastalık şiddeti ile açıkça ilişkiliken [Karron et al. 2007, Parainfluenza Viruses. 5. Ed. pp. 1497-1526; Faisca et al. 2007, Res Vet Sci 82: 115-125; Hall, CB 2001, N Engl J Med 344: 1917-1928; ve Henrickson, KJ 2003, Clin Microbiol Rev 16:242-264], URT ve trakeadaki enfeksiyonun klinik sonuca ve koruyucu immüniteye katkısı ile ilgili birçok soru mevcuttur [Sealy et al.

2010, Aşı 28: 6749-6756 ve Rudraraju et al. 2011, Virology 410: 429-436]. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, virüs inokülümünün dozunun, virüsün replikasyonunun nasıl geliştirildiğini veya konakçının genetik yatkınlığının URT ve trakeadaki Sendai virüsünün büyüme ve klerensini nasıl etkilediğini araştıran yayınlanmış bir çalışma bulunmadığına inanılmaktadır.

Dolayısıyla, mevcut buluş, canlı hayvanlarda PIV enfeksiyonunun ve bağışıklığın *in vivo* dinamiklerini ölçmek için yolları ele almaktadır. Bu nedenle, farelerde non-invaziv biyoluminesans görüntüleme için üç lusiferazı eksprese eden SeV'ler üretilmiştir. Analog sistemler daha önce DNA ve pozitif iplikli RNA virüsleri için bildirilmiştir [Luker et al. 2008, Antiviral Res 78: 179-187] ancak bugüne kadar büyük ölçüde virüs atenüasyonu nedeniyle negatif iplikli RNA virüsleri [Hasan et al. 1997, J Gen Virol 78 (Pt 11): 2813-2820] ya da raportör gen eklenmesinden kaynaklanan genetik instabilite [Manicassamy et al. 2010, Proc Natl Acad Sci U S A 107: 11531-11536] için zorlayıcı olmuştur. Sendai virüsünün invazif olmayan görüntüleme için ideal bir aday olduğuna inanılmaktadır çünkü (i) paramiksovirus vektörleri ile yabancı gen ekspresyonu genellikle genetik olarak stabildir [Bukreyev et al. 2006, J Virol 80: 10293-10306], (ii) intakt farelerde replike olmayan bir Sendai virüsünün *in vivo* görüntülenmesi başarılı bir şekilde gösterilmiştir [Griesenbach et al. 2008, Biomaterials 29: 1533-1540] ve (iii) Sendai virüsü ve murin konakçının uyumu patogeneze çalışmalarına olanak sağlayacaktır [Faisca et al. 2007, Res Vet Sci 82: 115-125]. Burada tarif edilen patojenez ve transmisyon çalışmaları için, raportör virüsü SeVc-luc(M-F*) yapılandırılmıştır, yüksek düzeylerde lusiferaz eksprese eder, çoğaltır ve yabancı tip (WT) virüsüne benzer şekilde farelerde hastalığa neden olur. Sendai virüs enfeksiyonunun *in vivo* dinamikleri, doğrudan aşılmasından sonra ve temasla bulaşma sonrası intakt farelerde virüs dozu ve fare suşu fonksiyonu olarak görüntülendi. Beklenmedik bir şekilde, URT ve trakea, akciğerlerde çok az enfeksiyona neden olan koşullar altında bile güçlü virüs büyümesi, etkin bulaşma ve koruyucu immüniteyi destekleyen bir ikilemli doku tropizmi keşfedilmiştir. Genel olarak, burada bildirilen PIV enfeksiyonundaki biyoluminesans görüntüleme sistemi ve doku-tropik farklılıklar, *in vivo* enfeksiyon ve solunum paramiksovirusleri yoluyla bulaşmanın anlaşılması için bir model ve antiviral tedavileri hedefleme ve dokuya özel bazda canlı aşıları yönlendirmek için bir araç sunmaktadır.

B. MALZEME VE YÖNTEMLER

I. Hücre kültürü. LLC-MK2 hücrelerinin mono tabakalı kültürleri, Dulbecco'nun %10 fetal bovin serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve %1 streptomisin ile desteklenmiş minimum 37°C + %5 CO₂ ortamındaki (DMEM) büyütülmüştür.

II. Rekombinant Sendai virüsleri. Özgün Notl tanıma sahaları, daha önce tarif edilen klonlama bölgeleri kullanılarak bir Enders bazlı pSeV viral genom plazmidinin P-M, M-F ve F-HN intergenik bağlantılarına klonlanmıştır [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38]. Ateş böceği lusiferaz geni, PCR ile, pGL3 Basic vektörü (Promega) ve bir çift AscI etiketli primerler kullanılarak büyütülmüş, bir Sendai virüsü intergenik bağlantısı içeren ve Notl kısıtlama bölgelerini kuşatan bir mekik plazmidi içine alt klonlanmıştır [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38] ve daha sonra pSeV viral genom plazmidlerinin her birinin özgün Notl bölgesine alt klonlanmıştır. PSeV-luc (MF) plazmidi içinde, F proteininin yukarıdaki başlatma sinyali, QuikChange™ Alana Yönelik Mutajenez Kiti (Stratagene Corp) olarak kullanılarak AGGGTGAAAG (SEQ. ID. NO.: 19) AGGGATAAAG (SEQ. ID. NO.: 19) olarak değiştirilmiştir. Rekombinant SeV'ler, daha önce tarif edildiği gibi pSeV genom plazmidlerinden kurtarılmıştır [Zhan et al. 2008, Vaccine 26: 3480-3488]. Modifiye Enders suşu Sendai genomu, aşağıdaki amino asit değişikliklerini içeren modifiye edilmiş bir Sendai virüsü L geninden oluşur: 155. pozisyonda S ile G, 258. pozisyonda R ile K, 466. pozisyonda G ile E, 482. pozisyonda G ile E, 581. pozisyonda S ile R, 717. pozisyonda Q ile R, 800. Pozisyonda T ile I ve 852. Pozisyonda R ile K.

III. Lusiferaz *in vitro* ekspresyonu. SeV ile enfekte edilmiş LLC-MK2 hücreleri (MOI 5 PFU/hücre), 33°C + %5 CO₂'de inkübe edildi ve lizatlar çeşitli zamanlarda toplandı p.p. Lusiferaz deneyleri, Lusiferaz Tahlil Sistemi (Promega) kullanılarak ölçüldü ve daha önce tarif edildiği gibi bir otomatik luminometre (Turner Biosystems, Inc.) kullanarak ekspresyon seviyeleri ölçüldü [Luque et al. 2007, J Virol 81: 3130-3141].

IV. Viral Titre ve Biyoluminesans Görüntüleme. Çok adımlı büyüme eğrilerinden (0.01 PFU/hücre MOI'si) ve homojenize edilmiş dokulardan virüs titreleri, daha önce tarif edildiği gibi LLC-MK2 hücrelerinde plak titrasyonu ile belirlendi [Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821]. Sekiz haftalık dişi 129x1/SvJ farelere veya BALB/c farelere (Jackson Laboratories), izofluran (Baxter Health Care Corporation) kullanılarak anestezi uygulandı ve 30 µl PBS veya virüs ile intranazal olarak (i.n.) aşılandı. Şekil 1D, 1E, 2, 3, 4E, 4F ve 12 için, PBS veya virüs ile aşılamadan önce 3 gün, farelere 300 µl avertin (300 mg/kg

konsantrasyon) IP enjeksiyonu ile anestezi uygulandı ve göğüs kılları traşlanarak ve tüy dökücü bir kremin uygulanması ile alındı. Hayvanlar günlük olarak kilo kaybı, morbidite ve mortalite açısından izlenmiştir. Görüntüleme öncesinde farelere, 150 mg/kg vücut ağırlığı dozunda lusiferin (Xenogen Corp) intraperitoneal olarak enjekte edildi ve 5 dakika boyunca izofluran ile anestezi uygulandı. *In vivo* görüntüler IVIS CCD kamera sistemi (Caliper Life Sciences) ile elde edildi ve 60'lar, 30'lar veya 5'lerin (4 ve 1 f/durma gruplama) bir pozu kullanarak Living Image 3.2 yazılımı (Caliper Life Sciences) ile analiz edildi. Farelerin psödocolor görüntüleri (biyoluminesansın temsili), bir cm^2 doku bırakan ve bir steradianın sert bir açısına yayılan fotonların sayısı olarak tanımlanan 1×10^6 ila 1×10^9 yüzey radyansından (foton/sn/ cm^2 /steradian) bir kolorimetrik ölçekte 4'lük bir gruplama kullanılarak gösterilmektedir. Bioluminesansı ölçmek için, ilgili bölgeler (ROI) manüel olarak tanımlandı ve grafik veriler, ROI alanı (cm^2) x 4π 'üzerinde toplanan her bir pikselde radyans olarak tanımlanan toplam akış (foton/sn) olarak ifade edildi. Tüm hayvan çalışmaları St. Jude Çocuk Araştırma Hastanesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmış ve ilgili kurumsal politikalar, Laboratuvar Hayvan Bakım Yönetmeliği Akreditasyon Derneği, Ulusal Sağlık düzenlemeleri ve yerel, eyalet ve federal yasalar ile uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir.

V. İmmünoloji. Ötenazi uygulanan hayvanlardan serum ve p.i. BALF, 10. gün veya 60. günde toplandı. BALF numuneleri (3 ml), hücresel maddeyi toplamak için santrifüj edildi ve yapışkan hücreleri çıkarmak için 1 saat boyunca 37°C 'de bir doku kültürü tabakasına yerleştirildi. Süspansiyon hücreleri toplandı, toplam lenfositler mikroskopik olarak sayıldı ve alyuvarlar parçalandı. Akış sitometrik analizleri için, hücreler FITC-konjuge anti-CD4 (RM4-4) ve PE-konjuge anti-CD8b (53-5.8) antikoru (BD Biosciences Pharmingen) ile boyandı. Lenfositler, ileri ve yan saçılımlara dayalı olarak kapandı ve CD4+ ve CD8+T hücre popülasyonlarının yüzdeleri bu geçit içerisinde ölçüldü. Serumda bulunan Sendai virüsüne özgü veya lusiferaz-spesifik antikoru seviyelerini ölçmek için ELISA'lar kullanıldı. Kısaca, 96 kuyucuklu plakalar, kesintili, saflaştırılmış Sendai virüsü (10 $\mu\text{g/ml}$) veya ateş böceği lusiferazı (1 $\mu\text{g/ml}$, Abcam) ile gece boyunca kaplanmıştır. Plakalar %1 BSA içeren PBS ile bloke edildi ve daha sonra 10 kat seri olarak seyreltilmiş serum örnekleri ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, plakalar yıkandı, HRP-Goat anti fare IgG'si (Southern Biotechnologies) ile inkübe edildi ve daha sonra tekrar yıkandı. Antikor

seviyelerini ölçmek için, kuyulara TMB substratı (Kirkegaard and Perry Laboratories) ilave edildi, ardından durdurma çözeltisi eklendi ve absorbans 450 nm'lik bir dalga boyunda okundu. Antikor titrelerini hesaplamak için GraphPad Prism doğrusal olmayan regresyon yazılımı kullanıldı.

5 **VI. Temas yoluyla Bulaşma.** Donör hayvanlar 30 µL SeVc-luc(MF*) ile intranazal olarak aşılandı ve 24 saat p.i. içinde 3 saf temas faresini içeren kafeslere ayrı ayrı yerleştirildi. Bioluminesans günlük olarak luminesans seviyeleri sürekli olarak arka plan seviyelerine (-15 gün) gelene kadar izlendi. Sera 60. günde toplandı, böylece Sendai virüsüne özgü antikor seviyeleri

10 yukarıda tarif edildiği gibi ölçülebilirdi. 63. günde, fareler intranazal yoldan uygulanan 7000 PFU SeVc-luc (M-F*) ile test edildi ve her gün bioluminesans ölçüldü.

C. Tamamlayıcı Materyal ve Yöntemler

15

I. Sendai Virüs Proteinlerinin *in vitro* Ekspresyonu. Viral protein ekspresyon seviyeleri daha önce bildirildiği gibi radyoimmunopresipitasyon ile analiz edilmiştir [Luque et al. 2007, J Virol 81: 3130-3141 ve Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821]. Kısaca, LLC-MK2 hücreleri 5 PFU/hücre MOI'de enfekte edilmiş,

20 50µCi [³⁵S]Promix (Amersham Pharmacia Biotech) ile etiketlenmiş, çok soğuk RIPA tamponuyla lize edilmiş ve santrifüjleme ile berraklaştırılmıştır. Süpernatant, gece boyunca 4°C'de fare anti-NP, P, M, F ve HN monoklonal antikorları ile inkübe edildi ve immün kompleksler, %12 NuPAGE bis-Tris SDS-PAGE jeller (Invitrogen) üzerinde fraksiyona ayrılmadan önce G-Sepharose

25 proteinine (GE Healthcare) adsorbe edildi ve daha önce tarif edildiği gibi görselleştirildi [Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821].

II. Sendai Virüs Bileşimi. 10 günlük embriyonlaşmış tavuk yumurtasının allantoik kavileri virüslerle aşılanmıştır. Allantoik sıvı 72 hpi'de toplandı ve hücre kalıntıları çıkarmak için 3000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi.

30 Süpernatantlar %60-20 sükröz gradyanı üzerinde tabakalandı ve viryonları izole etmek için 3.5 saat 24.000 rpm'de santrifüjlendi. İzole edilmiş viryonlar, TNE tamponunda seyreltildi ve 15 saat süreyle 24,000 rpm'de santrifüj yoluyla %20'lik bir sakroz yastığı üzerinde daha fazla saflaştırıldı. Virüs pelletleri, RIPA tamponu içinde yeniden süspanse edildi ve toplam protein konsantrasyonları,

35 BCA protein analiz kiti (Thermo Sci.) kullanılarak belirlendi. Eşit protein

seviyeleri bir %4-12 SDS-PAGE jel üzerinde çalıştırıldı, jel Blue BANDit™ protein boyası (Amresco) kullanılarak boyandı ve daha sonra 45 dakika 60°C'de bir BioRad jel kurutucu ile kurutuldu.

5 **III. *In vivo* Enfeksiyon ve Bulaşma.** CD4+ ve CD8+ T hücreleri için BALF içindeki T-lenfosit akışının ölçümü ana metinde açıklanmıştır. Lusiferaz-spesifik ELISA'lar esasen, 96-kuyucuklu plakaları kaplamak için ateş böceği lusiferaz proteini (Abcam) kullanılması dışında ana metinde anlatıldığı gibi Sendai virüs spesifik ELISA'lar olarak gerçekleştirildi. Ana metinde biyoluminesans görüntüleme ve diseke edilmiş dokulardan viral titre belirlemeleri de 10 açıklanmaktadır. Temasla bulaşma deneylerinde, ilk gün biyoluminesans $>10^6 \log_{10}$ foton/sn olarak tespit edilene kadar geçen süre kaydedildi. Eğri altındaki biyoluminesans alanları (EAA), biyoluminesans yoğunluklarının IgorPro yazılımı (Wavemetrics) kullanılarak zamana göre integrallenmesiyle hesaplanmıştır.

15

D. SONUÇLAR

I. Lusiferazı eksprese eden virüslerin *in vitro* özellikleri

20 PIV enfeksiyonunun intakt olmayan farelerde invaziv olmayan bir şekilde görselleştirilebildiği bir model geliştirmek için, üç adet rekombinant Sendai virüsü (SeVc virüsleri) üretildi; burada Sendai virüsünün PM, MF ve F-HN gen bağlantılarına ateş böceği lusiferazı eklendi (Şekil 1a, Şekil 9).

25 Sendai virüs genomuna ek bir gen ve gen bağlantısının eklenmesinin, aşağı yönde viral gen ekspresyonunu azaltması ve sonuç olarak virüs replikasyonunu azaltması beklenir [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38]. Çok az veya hiçbir atenüasyon görülmemesi beklenen bir lusiferazı eksprese eden Sendai virüsü üretmek için, SeVc-luc(MF*) virüsü, hem lusiferaz raportör genini hem de F geninin yukarı yönde daha 30 etkili bir transkripsiyon başlatma dizisi AGGGTGAAAG'yı (SEQ. ID. 20) içermek üzere yapılmıştır (Şekil 9). Böylelikle, raportör gen eklenmesinin attenüe edici etkileri, doğal olarak etkisiz gen başlatma dizisininin F geninin yukarı akışının optimizasyonu ile giderilebilir [Kato et al. 1999, J Virol 73: 9237-9246]. Lusiferaz geninin sırasıyla PM ve F-HN gen bağlantılarına eklendiği SeVc-luc (PM) ve SeVc-luc(F-HN) yapıları için, F

geninin yukarı yönünde doğal olarak oluşan suboptimal transkripsiyon başlatma dizisi intakt bırakılmıştır (Şekil 9).

Virüslerin attenüe edilmiş veya sıcaklığın kısıtlı olup olmadığını belirlemek için, 33 ve 37°C'de LLC-MK2 hücrelerinde 0.01-PFU/hücrenin çok sayıda enfeksiyonunda (MOI) çok adımlı büyüme eğrileri ölçüldü (Şekil 1b). SeVc-luc(M-F*), SeVc-luc(F-HN) ve WT'nin titreleri, her iki sıcaklıkta benzer ve birbirine benzer olup, bu iki lusiferazı eksprese eden virüslerin büyük ölçüde attenüe olmadığını veya sıcaklığın kısıtlanmadığını göstermişlerdir. Aksine, SeVc-luc (P-M) virüsü 33°C'de büyüme kinetiğini azaltmış ve 37°C'de daha da yavaş büyümüştür. SeVc virüslerinin raportör geni ne kadar etkili bir şekilde eksprese ettiğini belirlemek için, LLC-MK2 hücre lizatlarında (MOI 5 PFU/hücre) *in vitro* lusiferaz ekspresyonu bir luminometre ile ölçüldü (Şekil 1c). SeVc-luc(P-M) içerisindeki raportör genin yukarı yönde eklenmesi, daha önce salgılanmış alkalın fosfatazin eklenmesi için tarif edildiği gibi, SeVc-luc(F-HN)'de aşağıya yönde eklenmeden daha yüksek raportör gen ekspresyonuna yol açmıştır [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38]. SeVc-luc (M-F*) ile lusiferaz ekspresyonu, 6 saat p.i. (post-enfeksiyon) içinde SeVc-luc(P-M)'yi aşmıştır, bu da M-F* virüsüne (Şekil 9) işlenmiş geliştirilmiş gen başlatma dizisini gösterir, belki de L polimeraz geninin daha büyük aşağı yönde transkripsiyonuna bağlı olarak, daha sonraki zaman noktalarında raportör gen transkripsiyonunu artırır. Raportör gen eklemelerinin, Sendai virüs genlerinin ekspresyonunu nasıl değiştirdiğini belirlemek için, LLC-MK2 hücrelerinde (MOI 5 PFU/hücre) Sendai virüs protein ekspresyonu, radyo-immünopresipitasyon ile ölçüldü. SeVc-luc(P-M) virüsü (Şekil 10a) tarafından M, F, HN ve muhtemelen L proteinlerinin düşük ekspresyon seviyeleri, büyük olasılıkla bu virüs yapısının yüksek düzeyde atenişyonuna neden olmuştur. SeVc-luc(MF*) ve SeVc-luc(F-HN) ile viral protein ekspresyonu, WT benzeri bileşimlere sahip viryonlar oluşturmak için yeterliydi (Şekil 10b, c) ve bu iki raportör virüs, *in vitro* yabancı tip virüslere benzer seviyelerde büyüdü.

II. Lusiferazı eksprese eden virüslerin virülansı

Non-invaziv biyoluminesans görüntüleme ve patogenezi çalışmaları için ideal bir lusiferaz-raportör virüsü, WT virüsü ile karşılaştırıldığında doğal murin konakçıda virüs replikasyonu ve hastalık şiddetini değiştirmeden lusiferazın yüksek seviyelerini eksprese edecektir. Burada üretilen üç lusiferazı eksprese eden SeVc virüslerinin *in*

vivo WT Sendai virüsünün virülansını koruyup korumadığını belirlemek için, 129/SvJ fareleri intranazal olarak 7.000 PFU virüsü ile aşılanmıştır, bu fare suşunda önemli seviyelerde morbidite ve mortalite indüklediği bilinen bir dozdur [Faisca et al. 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L777-787]. Bu deneyde fareler, izofluran ile anestezi edilmiş ve 30 µl'lik bir hacimde virüs ile intranazal olarak aşılanmıştır, bir hacmin ~1/3'ü nazofarenkse ve hacmin ~1/2'sini akciğerlere veren bir aşılama yöntemidir [Southam et ark. 2002, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: L833-839]. WT, SeVc-luc(MF*) ve SeVc-luc(F-HN) enfeksiyonu, bu iki lusiferazı eksprese eden virüslerin bu dozda tamamen virülan kaldığını gösteren, %-25'lik ortalama ağırlık kayıpları ve %80'lik mortalite oranlarıyla sonuçlandı (Şekil 1d, e). Bu. Aksine, attenüe edilmiş SeVc-luc (P-M) virüsü sadece %12 ağırlık kaybına neden olmuş ve hiçbir mortalite oranına neden olmamıştır. 129/SvJ farelerinin 70.000 veya 700.000 PFU SeVc-luc (P-M) ile enfekte edilmesi de %100 hayatta kalma ile sonuçlandı (veriler gösterilmemiştir), bu da attenüe edilmiş SeVc-luc (P-M) virüsünün avirulent olduğunu göstermektedir.

Sendai virüsü ile akut viral pnömoni, bronkoalveolar lavaj sıvısında (BALF) yüksek lenfosit infiltrasyon seviyelerini -10 dpi pikte indüklemiştir [Mo et al. 1995, J Virol 69: 1288-1291]. Lusiferazı eksprese eden virüslerin WT'ye benzer lenfosit akışını teşvik edip etmediğini belirlemek için, 7.000 PFU ile enfekte edilmiş 129/SvJ fareleri, BALF'ın geri kazanımı için 10 dpi'de kurban edildi. Benzer şekilde, WT, SeVc-luc(MF*) ve SeVc-luc(F-HN) ile enfeksiyondan sonra BALF'da toplam yüksek lenfosit, CD4+ T-lenfosit ve CD8+ T-lenfosit sayıları saptanmış, bu arada attenüe edilmiş SeVc-luc(PM)'ye sahip enfeksiyondan sonra lenfosit akışı ~10 kat azalmıştır (Şekil 1f; Şekil 11a-b). Raportör virüslerin, Sendai virüsüne veya lusiferazına bağlanan antikoranı ortaya çıkardığı kapsamı belirlemek için, sera da 10 dpi toplanmıştır. Üç SeVc virüsünün tümü, WT'ye benzer anti-Sendai virüsü antikor titrelerini ortaya çıkardı (Şekil 1g). Anti-lusiferaz antikorlarının titreleri, üç raportör virüs için de birbirine benzerdi (Şekil 11c). Böylece 129/SvJ farelerinde atenüasyon ve avirulent olmasına rağmen, SeVc-luc (P-M) güçlü bir antikor yanıtı ortaya çıkarmıştır. SeVc-luc(M-F*), yüksek düzeyde lusiferaz eksprese ederken, WT-benzeri morbidite ve mortaliteyi indüklemiştir, bu da patogenez ve bulaşma üzerine biyoluminesans görüntüleme deneylerinde WT virüsü için bir temsilci olarak en uygun hale getirmektedir.

III. Canlı Hayvanlarda Enfeksiyon Dinamiği

Non-invaziv biyoluminesansın *in vivo* enfeksiyonu doğru bir şekilde yansıtip yansıtmadığını belirlemek için, 129/SvJ fareleri bir Xenogen IVIS cihazı ile görüntülenen 7.000 PFU ile intranazal olarak aşılandı ve hemen ötenazi uygulandı, böylece lüminesans ve viral titrelerin *ex vivo* ölçümü için solunum dokuları toplanabildi.

5 İmmün yetersizliği olan farelerde önceki çalışmalarla tutarlılık [Tashiro et al. 1988, Virology 165: 577-583 ve Miyamae et al. 2005, J Vet Med Sci 67: 369-377], viral titreler ve bioluminesans solunum yolu ile sınırlıydı ve bu çalışmalarda nazofarenks, trakea ve akciğerlerde belirgin bir şekilde görselleştirildi. Şekil 12'de gösterildiği gibi canlı hayvanlardaki *in vivo* bioluminesans yoğunlukları, tekniğin validasyonu

10 nazofarenks (R2 0.864), trakea (R2 0.915) ve akciğerlerde (R2 0.961) *ex vivo* lüminesans (R2 0.878) ve viral titreler ile invaziv olmayan *in vivo* enfeksiyonu ölçmek için bir araç olarak iyi korelasyon göstermiştir. Lusiferaz-raportör genlerin üç SeVc virüsünde genetik olarak stabil olup olmadığını belirlemek için, 7.000-PFU-aşılanmış 129/SvJ farelerinden 7 dpi'de akciğer dokuları geri kazanılmış, homojenize edilmiş ve

15 LLC-MK2 hücrelerinde süzölmüştür. Üç lusiferazı eksprese eden virüsün her biri için beş plak seçildi, RT-PCR kopyalandı ve dizildi. Tek tek plakların hepsi lusiferaz eki içermekteydi, mutasyona sahip değildi ve LLC-MK2 hücrelerinde enfeksiyondan sonra lusiferazı eksprese etti. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bunun, lusiferaz raportör geninin, *in vivo* olarak 7 günlük replikasyondan sonra SeVc

20 virüslerinin üçünde genetik olarak kararlı olduğunu gösterdiğine inanılmaktadır.

Burada sunulan bioluminesans görüntüleme sistemi kullanılarak, enfeksiyonun kinetiği ve tropizmi, intakt 129/SvJ farelerinde ölçüldü ve sonuçlarımız disseke edilmiş dokulardan virüs titresinin belirlenmesi için geleneksel yöntemle karşılaştırıldı (Şekil 2

25 ve 3). SeVc-luc(M-F*) ve SeVc-luc(F-HN) *in vitro* replikasyon oranlarına ve WT'ye benzer *in vivo* patojenitelere sahip olduğu gibi, bu SeVc virüsleri de nazal konka, trakea ve akciğerlerde WT benzeri titrelerle sahipti. Nazal konkalarda, yüksek virüs titreleri (> 10⁵ PFU) 2 dpi ile tespit edildi ve 9 dpi'ye kadar sürdürüldü, ardından hızlı klirens oluştu (Şekil 3b). Nazofarenksden (>10⁸ foton/sn) yüksek seviyelerde bioluminesans

30 benzer şekilde SeVc-luc (M-F*) ile enfekte edilmiş 129/SvJ fareleri için 2 ve 9 dpi arasında 5 dpi'lik bir pik ile gözlenmiştir (Şekil 3a). Akciğerlerde, virüs titreleri 5 dpi ile pik yaptı ve 9 dpi ile düşük seviyelere indirildi. Attenüe edilmiş SeVc-luc (PM) enfeksiyonu, 5 dpi'de 10⁴ PFU'luk pik akciğer titrelerinde, WT'den yaklaşık 100 kat daha düşük (Şekil 3d) sonuçlanmıştır ve benzer şekilde akciğerlerde attenüe edilmiş ve

35 avirulent fenotip ile tutarlı düşük seviyelerde bioluminesans gözlenmiştir (Şekil 3a).

Bununla birlikte SeVc-luc (PM), 7 dpi'de WT'ye benzer bir seviyede nazal konkalardaki yüksek pik titrelerine ($\sim 10^5$ PFU) büyüdü (Şekil 3c) ve nazofarenkste 3 ila 6 dpi arasında yüksek seviyelerde biyoluminesansa sahipti. (Şekil 3a).

5 IV. Doku Tropizmi ve Viral Doz

Sendai virüsünün düşük aşılama dozlarının akciğerlerdeki enfeksiyon ve patolojiyi azalttığı bilinirken, URT veya trakeada enfeksiyonun doza bağımlılığı üzerine yayınlanmış herhangi bir çalışmadan bilgimiz yoktur. Ön çalışmalar, SeVc-luc(MF*) için fare enfeksiyöz dozu 50'nin (MID_{50}) 9 PFU olduğunu ve farelerde WT Sendai virüsü [Kiyotani et al. 1993, J Virol 67:7618-7622] ve insanlarda hPIV1 [Reichelderfer et al. 1958, Science 128:779-780] için elde edilen sonuçlara benzer bir 70-PFU dozunun %100 enfeksiyona neden olduğunu gösterdi 129/SvJ fareleri intranasal olarak 70, 700 veya 7.000 PFU SeVc-luc(M-F*) ile 30 μ l hacimde aşılandı ve daha sonra bioluminesans ve viral titreler ölçüldü. 7.000-PFU dozuna kıyasla 70 PFU-aşılanması akciğerlerde ~ 10 kat düşük viral titreleri ve bioluminesansı (Şekil 4a, b) ve daha düşük kilo kaybı ile sonuçlandı (Şekil 4c). Buna karşılık, 70-PFU aşılama sonrası nazofarenks ve trakeadaki enfeksiyon, sadece 7.000-PFU'ya kıyasla ~ 1 gün geciktirildi, seviye ~ 5 dpi ile benzer bir düzeye ulaştı (Şekil 4a, b) ve Sendai virüsüne özgü antikorlar ($>10^5$) nispeten yüksek titreleri indükledi (Şekil 4d). Bu nedenle, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, WT-benzeri SeVc-luc(MF*)'nin düşük dozda aşılmasının, URT ve trakeaya neden olan enfeksiyona yol açtığı ve şiddetli patojeniteye neden olmaksızın güçlü bir antikor yanıtı indüklediğine inanılmaktadır.

25

V. Doku Tropizmi ve Konakçı Genetiği

Rekombinant soy içi farelerin çeşitli suşları, Sendai virüsü tarafından akciğer enfeksiyonuna yatkınlıklarında farklılık gösterir [Faisca et al. 2005 Am J Physiol Lung Celi Mol Physiol 289: L777-787; Brownstein, DG 1987, J Virol 61: 1670-1671; Brownstein et al. 1981, Am J Pathol 105: 156-163; ve Brownstein et al. 1986, Lab Anim Sci 36: 126-129]. Örneğin, 129/SvJ ve DBA/2 fareleri, akciğer enfeksiyonuna ve sonuçta ortaya çıkan patojenezine oldukça duyarlıdır, BALB/c ve C57BL/6 fareleri ise oldukça dirençlidir. Konakçı genetiğin URT ve trakeadaki Sendai virüs replikasyonunu nasıl etkilediği daha önce bildirilmemiştir. Bu nedenle, Sendai virüs enfeksiyonunun *in*

35

vivo dinamiği, 129/SvJ, DBA/2, C57BL/6 ve 7.000 PFU SeVc-luc(M-F*) ile aşıl原因an farelerin BALB/c suşlarında ölçülmüştür. Önceki çalışmalardan beklendiği gibi, akciğerlerdeki enfeksiyonun derecesi ve kilo kaybı birbiriyle ilişkiliydi ve C57BL/6 <BALB/c << DBA/2 <129/SvJ'yi takip etti (Şekil 2 ve 4). Tersine, URT ve trakea, dört

5 farenin tüm suşları için benzer şekilde yüksek düzeylerde biyoluminesansa sahip olan Sendai virüsü enfeksiyonuna oldukça yatkındı. Böylelikle, BALB/c ve C57BL/6 farelerinin URT ve trakeaları, akciğerlerdeki genetik dirence rağmen, Sendai virüsü enfeksiyonuna oldukça yatkındı. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bu sonuçların Sendai virüsü enfeksiyonuna genetik yatkınlığın dokuya spesifik

10 olduğunu ve akciğerlerdeki azalmış enfeksiyonun URT veya trakeadaki düşük enfeksiyona bağlı olmadığını gösterdiğine inanılmaktadır. Bulaşma ile ilgili sonraki deneylerde, farelerin ışıqla kaplanmış BALB/c ve 129/SvJ suşları kullanıldı. Bu nedenle, kesilen BALB/c farelerinin gruplarındaki Sendai virüs titreleri ölçüldü ve ex vivo titrelerin intakt farelerde (Şekil 13a) 129/SvJ fareleri için olduğu gibi

15 bioluminesans ile korele olduğu bulundu. 129/SvJ farelerine kıyasla, BALB/c farelerinin akciğerlerindeki enfeksiyon, hem bioluminesans (Şekil 4e) hem de viral titreler (Şekil 13b-c) ile ölçüldüğünde en az 10 kat azalmıştır. Sonuç olarak, BALB/c fareleri çok az kilo kaybı dahil olmak üzere sadece çok hafif klinik semptomlara sahipti (Şekil 4f). Aksine, BALB/c farelerinde nazofarenks enfeksiyonu, her iki bioluminesans

20 (Şekil 4e) ve viral titrede (Şekil 13b-c) ile ölçüldüğü gibi 129/SvJ farelerinde 3 dpi kadar bir seviyeye ulaşmıştır. Genel olarak, bioluminesans görüntüleme çalışmalarının, akciğerlerde azalmış enfeksiyona ve az belirgin kilo kaybına rağmen URT ve trakeada güçlü enfeksiyonun gözlemlendiği üç koşul ortaya çıkarmıştır: attenüe edilmiş bir virüs, düşük bir virüs dozu ve dirençli bir fare suşu.

25

VI. Temasla Bulaşma Sırasında Enfeksiyon Dinamiği

Enfeksiyon kontrolü, patojenlerin nasıl bulaştığının anlaşılmasını gerektirir. Sendai virüsü, hPIVler ve hRSV'nin, esas olarak küçük parçacık aerosollerinin uzun mesafeli

30 bulaşmasına karşı solunumsal salgılarla temasa geçtiği bilinmektedir [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75; van der Veen et al. 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246; Henrickson, K.J. 2003, Clin Microbiol Rev 16: 242-264; Hall et al. 1981, J Pediatr 99: 100-103; ve McLean et al. 1967, Can Med Assoc J 96: 1449-1453]. Ayrıca Sendai virüsünün [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75] ve influenza virüsünün URT'de

35 büyümesinin [Lowen et al. 2007, PLoS Pathog 3: 1470-1476], bulaşmayı teşvik ettiği

bilinmektedir. Bilinmeyen PIV bulaşması ile ilgili uzun süredir sorulan iki temel soru şunlardır: (i) donörlerin akciğerlerindeki virüsün büyümesinin bulaşmayı nasıl etkilediği ve (ii) bulaşmanın zamanlamasını ve bulaşmadan sonra doku spesifik yayılımı belirleyen faktörler. PIV bulaşması ile ilgili bu temel soruları yanıtlamak için, BALB/c veya 129/SvJ donör fareleri 70 veya 7.000 PFU SeVc-luc(MF*) ile aşılanmış ve sonra 1 dpi'de 1 donör fare bulunan bir kafes içine 3 saf temas faresi yerleştirilmiştir. Biyoluminesans, birincil enfeksiyon temizlenene, 60. günde serum toplanana, fareler 63. günde 7.000 PFU SeVc-luc(MF*) ile test edilene kadar, aşılanmış ve temas farelerinde günlük olarak ölçülmüş ve ardından fareler yeniden enfekte edilmek üzere günlük olarak görüntülenmiştir (Şekil 5). Nazofarengeal biyoluminesans ve serokonversiyon ile, düşük dozda aşılanmış donör hayvanlara maruz kalan dirençli BALB/c fareler dahil her saf kontakt fareye bulaşmanın gözlemlendiğine inanılmaktadır. Bulaşmaların zamanlaması akciğer donörlerinin akciğer titrelerinin kapsamından etkilenmemiştir, çünkü BALB/c'de 129/SvJ donör farelere karşı 7.000-PFU aşılardan (Şekil-13c) sonra bulaşma süreleri (aşılanmış hayvanlara karşı bulaşan hayvanların tespitine kadar geçen süre farkı) sırasıyla 3.3 ve 3.4 gün idi (Şekil 6f). LRT enfeksiyonu her iki farede de meydana gelmiştir ve bu durum da bulaşmaya katkıda bulunabilir. Ne olursa olsun, iletimin birincil belirleyicisi URT ve trakeada virüs bulaşması gibi görünmektedir. Örneğin, 129/SvJ donör farelerinin (Şekil 4a, b) nazal kavileri ve trakeaları içinde bulaşan yüksek titre ($>10^5$ PFU) ve temasla bulaşma (Şekil 6e, f) 70-PFU ile karşılaştırıldığında 7.000-PFU aşılardan 1 gün önce meydana geldi. Genel olarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bu sonuçların, küçük ölçüde görünür kilo kaybına sahip hayvanların, Sendai virüs Enders suşunun etkili bir şekilde bulaşmasını nasıl destekleyebildiğini gösterdiğine inanılmaktadır.

25

Bulaşma sonrası Sendai virüsü enfeksiyonunun büyüklüğünü araştırmak için, önceki çalışmalar enfekte edilmiş aynı kafeste bulunan hayvanlara maruz bırakıldıktan sonra farklı zamanlarda kurban edilen temas farelerinin gruplarında *ex vivo* titreleri ölçmüşlerdir [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 ve van der Veen et al. 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246]. Bu klasik çalışmalar, titrelerin günden güne 100 kat farklılık gösterdiği ve bulaşmadan sonra solunum yolundaki enfeksiyonun ilerlemesinin net olmadığı konusunda oldukça belirsiz sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, non-invaziv bioluminesans görüntüleme, bulaşmadan sonra bireysel, canlı farelerde solunum yolu boyunca PIV enfeksiyonunun zamansal ve uzamsal yayılımını ilk kez ölçmek için kullanılmıştır. Aşılanan doz donörlerde ve fare suşlarında değişiklik gösterir, böylelikle

35

viral ve konakçıların belirleyici faktörleri araştırılabilir. Test edilen dört koşul altında (70 veya 7.000 PFU'da enfekte edilmiş 129/SvJ veya BALB/c fareleri), bulaştıktan sonraki temas hayvanlarındaki enfeksiyonun tropizm ve büyüklüğü, 70-PFU dozunda intranazal yolla SeVc luc (MF*) ile doğrudan aşılama sonrası gözlemlenene benzer olmuştur.

5 Bulaşma sonrası, biyoluminesans ilk olarak nazofarenkste gözlemlendi ve daha sonra trakeaya ve akciğerlere sırasıyla ortalama 0.8 ve 1.0 günde yayıldı (Şekil 14a-d). Nazofarenks ve trakeada kuvvetli enfeksiyon gözlemlendi (Şekil 6a-d, Şekil 14e-h) ve düşük seviyeli akciğer enfeksiyonu, bulaşma sonrası düşük kilo kaybı ile tutarlıydı (Şekil 6g-h). Dört farelik grubun hepsinde, 60. güne ait Sendai virüse özgü antikor

10 titerleri benzer şekilde yüksekti ($\sim 10^6$) ve hayvanlar 63. günde test sırasında universal olarak korunmuştur (Şekil 5). Testten sonra, 5-12. günlerde (Şekil 5b, kalın siyah daireler) primer enfeksiyondan sonra en düşük biyoluminesans düzeyine sahip hayvan olan 30 arasından sadece 1 temas faresinde düşük bir biyoluminesans seviyesi ($<10^6$ foton/sn) saptandı, ancak kilo kaybı saptanmadı. Bu hayvan aynı zamanda testten 60

15 gün önce en düşük Sendai virüsüne özgü antikor düzeyine sahip olduğundan, koruyucu immünite için bir eşik seviyesinde enfeksiyon gerekli olabilir. Genel olarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bulaşma sonrası Sendai virüsü enfeksiyonunun, URT ve trakeada yeterince güçlü olduğu, ancak akciğerlerde yeterince sınırlı olduğuna ve önemli bir kilo kaybına neden olmadan Sendai virüsü

20 enfeksiyonuna duyarlı olan eşleştirilmiş murin konakçıda koruyucu immüniteyi indüklediğine inanılmaktadır.

E. TARTIŞMA

25 Mevcut öğreti, doğrudan aşılama ve temasla bulaşma sonrası canlı farelerde PIV enfeksiyonunun kinetiğini ilk kez incelemek için lusiferaz-raportör virüslerin üretilmesini ve kullanılmasını sağlamaktadır. WT Sendai virüsü ile karşılaştırıldığında, lusiferazı eksprese eden virüs SeVc-luc(M-F*), *in vivo* olarak benzer bir replikasyon oranına sahipti ve BALF'deki benzer kilo kaybı, mortalite, lenfosit akışı ve serum antikor

30 titrelerini ortaya çıkardı. Hem duyarlı (129/Sv) hem de dirençli (BALB/c) suşları intranazal olarak 70 ve 7.000 PFU dozları SeVc-luc(MF*) ile enfekte edildi ve enfeksiyonun yayılması intakt farelerde hem biyoluminesansla hem de kurban edilmiş hayvanlardan *ex vivo* virüs titreleri ile ölçüldü. URT ve trakeadaki enfeksiyonun sonuçları akciğerlerdeki enfeksiyondan farklı bulunmuştur. Beklenmedik şekilde,

35 dirençli BALB/c farelerinde 70 PFU aşılama dahil olmak üzere test edilen tüm

- koşullar altında, URT ve trakea, güçlü Sendai virüsü büyümesini, etkili temasla bulaşmayı ve akciğerlerde enfeksiyonun kapsamını bağımsız olarak koruyucu immüniteyi desteklemiştir. Aksine, akciğerlerdeki enfeksiyonun büyüklüğü virüs dozu ve fare suşu ile değişti ve aynı zamanda kilo kaybı ve mortalite ile yüksek oranda ilişkiliydi.
- 5 Genel olarak, burada bildirilen sonuçlar, solunum yolunda dokuya özel bir dikotomi ortaya koymaktadır, burada URT ve trakeadaki asemptomatik enfeksiyon etkili bulaşmayı desteklemekte ve akciğerlerdeki enfeksiyonun boyutu ve konak yanıtı klinik sonuçları belirlemektedir.
- 10 Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, mevcut buluş ilk kez bir negatif-iplik RNA virüsü ile, canlı hayvanlar boyunca enfeksiyonu görselleştirmek için, prototypik respiratuar paramiksovirus Sendai virüsü kullanarak invaziv olmayan bir biyoluminesans görüntüleme sisteminin geliştirilmesini öngörmektedir. Küçük hayvanlarda invaziv olmayan görüntüleme için yeterince yüksek bir raportör geni
- 15 eksprese eden attenüe olmamış bir paramiksovirusün geliştirilmesi sorun olmuştur, çünkü segmentlerine ayrılmamış negatif iplik RNA virüsleri polarize bir transkripsiyon mekanizmasına sahiptir [Lamb et al. 2007, Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. 5. E Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38] d. pp. 1449-1496]. Burada tarif edilen önemli bir ilerleme, raportör gen eklemenin beklenen attenüe edici etkilerinin
- 20 F geninin [Kato et al. 1999, J Virol 73: 9237-9246] [yukarıdaki doğal olarak oluşan, suboptimal gen-başlatma dizisinin geliştirilmesi ile karşılandığı SeVc-luc(M-F*) virüsünün üretilmesidir. F geninin ekspresyonu, bir virülans faktörü [Anderson et al. 2008, J Virol 82: 10510-10518 ve Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821], aynı zamanda hPIV1 [Bousse et al. 2002, J Virol 76: 8244-8251], hPIV3 [Spriggs et al.
- 25 1986, J Virol 59: 646-654], PIV5 [Rassa et al. 1998, Virology 247: 274-286], kızamık virüsü [Cattaneo et al. 1987, Virology 160: 523-526] ve köpek distemper virüsü (CDV) [Anderson et al. 2008, J Virol 82: 10510-10518] transkripsiyon veya uzun ve çevrilmemiş bölgeler tarafından aşağı yönde regüle edilmiştir.
- 30 Bu nedenle, örneğin, sadece ve sınırlayıcı olmaksızın, mevcut buluşun yönleri, yüksek seviyelerde lusiferaz eksprese eden diğer WT benzeri raportör paramiksoviruslerin, raportör geni M-F bağlantısına ekleyerek ve dengeleyici mutasyonlar yoluyla F gen ekspresyonunu koruyarak tasarlanabilir. Sendai virüsünün ateniasyonu olmadan raportör gen ekspresyonu, bir iç ribozom giriş yeri içeren bir bisistronik genin yapımıyla
- 35 da başarılmıştır [Touzelet et al. 2009, Virus Res 140: 40-48], bu alternatif yaklaşımın *in*

vivo enfeksiyonun non-invazif görüntülenmesi için yeterli lusiferaz ekspresyonu sağlayıp sağlamadığı henüz net değildir. Attenüe olmamış bir CDV'nin H-L bağlantısında aşağı akış yönünde geliştirilmiş bir yeşil flüoresan proteini (eGFP) raportör geninin eklenmesi, kesikli ferret dokularında paramiksovirus yayılımının *ex vivo* olarak görüntülenmesini sağlamıştır [Rudd et al. 2006, J Virol 80: 9361-9370 ve von Messling et al. 2004, Proc Natl Acad Sci U S A 101: 14216-14221]. Bununla birlikte, atenüasyonu önlemek için genomun 5' ucuna yakın bir lusiferaz raportör genin eklenmesinin, nispeten düşük raportör gen ekspresyon seviyelerine yol açması beklenir, burada SeVc-luc(F-HN) raportör virüsü ile gözlemlendiği gibi invazif olmayan görüntüleme tekniklerinin duyarlılığı sınırlanır.

Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, mevcut çalışmadaki lusiferaz raportör geninin kullanımının, intakt hayvanların tüm solunum yolları boyunca enfeksiyonun ölçümünü mümkün kıldığına inanılır, böylece enfeksiyon doğrudan aşılama veya bulaşma sonrası ölçülebilir. Dolayısıyla, bu Sendai virüsü vektörünün alternatif bir formunun, eGFP gibi bir flüoresan protein dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, farklı bir raportör genin kullanıldığı şekilde oluşturulabileceği beklenmektedir. eGFP eksprese eden raportör virüsler ayrıca ferretlerde CDV enfeksiyonunun [Rudd et al. 2006, J Virol 80: 9361-9370 ve von Messling et al. 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101: 14216-14221] ve maymunlarda kızamık virüsü enfeksiyonunun [Lemon et al. 2011, PLoS Pathog 7: e1001263 ve de Swart et al. 2007, PLoS Pathog 3: e178] dinamiklerini incelemek için de kullanılmıştır. EGFP raportör geninin bir avantajının, disseke edilmiş dokularda enfeksiyonun tropizminin bir hücresel seviyede çalışılabileceği olduğu üzerinde durulmaktadır. Ayrıca, eGFP eksprese eden virüsler, canlı hayvanların periferik kanında, deride ve ağızlarında enfekte edilmiş hücreleri ölçmek ve yazmak için de kullanılabilir. eGFP-eksprese eden hPIV3 ve SeVs, iyi farklılaştırılmış, primer epitelyal kültürlerde PIV enfeksiyonunun hücresel tropizmini incelemek için kullanılmıştır. HPIV3 durumunda, enfeksiyonun siliyer epitel hücreleri ile sınırlı olduğu ve küçük sitopatolojiye neden olduğu bulunmuştur [Zhang et al. 2005, J Virol 79: 1113-1124]. Buna karşılık, Sendai virüsünün, goblet hücreleri değil, siliyer olayan hücreleri enfekte ettiği bulunmuştur ve silostazın, hücre sıyrılması, apoptoz ve hücresel dejenerasyonu indüklediği gözlemlenmiştir [Villenave et al. 2010, J Virol 84: 11718-11728]. Hücre içermeyen virüsün veya hücre ilişkili virüsün Sendai virüs bulaşımı ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir.

Şaşırtıcı bir şekilde, URT'nin akciğerlerdeki enfeksiyonu sınırladığı bilinen koşullar altında bile Sendai virüsü enfeksiyonuna karşı oldukça yönelik olduğu bulunmuştur: düşük bir virüs dozundan sonra, attenüe edilmiş bir virüs için ve dirençli fare suşlarında. İnsan deneklerde RSV'nin intranasal aşılmasının da son zamanlarda, 5 100 katlık bir aralığa yayılan viral dozlar için eşit derecede yüksek pik nazal titreleri ile sonuçlandığı gösterilmiştir [Devincenzo et al. 2010, Am J Respir Crit Care Med 182: 1305-1314]. Elbette, insanlarda RSV veya hPIV'lerin doğal bulaşmasından sonra, akciğerlerde yüksek miktarda aşılana virüs dozları, farelerde Sendai virüsünün yüksek dozda aşılması için burada görüldüğü üzere, ciddi hastalıkların gelişiminde rol 10 oynayabilir.

Bu nedenle, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, mevcut buluşun yönleri, Sendai virüsünün hPIV1'e karşı umut verici bir Jennerian aşısı olduğunu üzerinde durmaktadır [Karron et al. 2007, Parainfluenza Viruses. 5. Ed. pp 15 1497-1526 ve Takimoto et al. 2005, Viral Immunol 18: 255-266] ve F-HN gen bağlantısına eklenen RSV, hPIV3 veya hPIV2'den bir zarf genini içeren rekombinant Sendai virüsü aşı vektörlerinin, küçük hayvan modellerinde zorlamadan korunmak için hem B- hem de T- hücresi yanıtlarını ortaya çıkardığı gösterilmiştir [Jones et al. 2009, Vaccine 27: 1848-1857; Zhan et al. 2007, Aşı 25: 8782-8793; ve Zhan et al. 2008, 20 Vaccine 26: 3480-3488]. Sendai virüsü farelerde patojenik iken, devam eden bir klinik çalışma, Sendai virüsünün insanlarda iyi tolere edildiğini göstermiştir [Slobod et al. 2004, Aşı 22: 3182-3186]. İnsan olmayan primatlarda, Sendai virüsünün, ilişkili yan etkilerle birlikte hPIV1 tehdidine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir [Hurwitz et al. 1997, Aşı 15: 533-540 ve Skiadopoulos et al. 2002, Virology 297: 153-160]. Sonuçlar 25 muhtemelen kısmen Sendai virüsünün insan IFN aracılı doğal immüniteye olan duyarlılığından kaynaklanmaktadır [Bousse et al. 2006, Virus Res 121: 23-32]. Ayrıca, mevcut buluşun uygulamaları, Sendai virüsünün bir aşı vektörü olarak geliştirildiği için, burada lusiferazı eksprese eden SeV'ler ve geliştirilen görüntüleme sisteminin, aşı dozunun, hacminin ve yabancı antijen eklemesinin nasıl konumlandırıldığının 30 araştırılmasında yararlı olacağı üzerinde durulmaktadır. Sendai virüs genomu, küçük hayvan modellerinde dokuya özgü vektör büyümesini ve immünite yanıtını etkiler. Sendai virüsündeki bir lusiferaz raportör geninin bir aşı antijeni ile değiştirilmesi, vektörün vivoreplikasyonunda değişiklik gösterebilir. Örneğin, hPIV1 HN, hPIV2HN'yi ya da P-M gen bağlantısına eklenen kızamık virüsü HA'yı eksprese eden üç farklı

rekombinant hPIV3 vektörünün, hamsterlerde farklı seviyelere çoğaldığı bulunmuştur [Skiadopoulos et al. 2002, Virology 297: 136-152].

Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, burada ortaya çıkan yeni bir bulgunun, Sendai virüs bulaşmanı etkinliği ve zamanlamasının, pulmoner enfeksiyon, klinik semptomlar ve konakçı genetiğin kapsamından bağımsız olarak gerçekleştiğine inanılmaktadır. Asemptomatik insan donörlerinden hPIV1 bulaşması da deneysel bir ortamda gözlemlenmiştir [Reichelderfer et al. 1958, Science 128: 779-780] ve genel olarak PIV salgınları için epidemiyolojik gözlemlerle tutarlıdır [Hall, CB 2001, N Engl J Med 344: 1917-1928 ve Henrickson, KJ 2003, Clin Microbiol Rev 16: 242-264]. Bu gözlemler, LRT enfeksiyonunun ve klinik semptomların şiddetinin, gözetim ve enfeksiyon kontrol çabaları için bulaşma potansiyelinin zayıf belirleyicileri olacağını göstermektedir. Önceki çalışmalarla tutarlı olarak [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 ve Kiyotani et al. 1993, J Virol 67: 7618-7622], Sendai virüs iletiminin, URT'de yüksek titreli virüs büyümesi ile çakıştığı ve virüsün yüksek enfektivitesinden dolayı (örneğin, Sendai virüsünün $MID_{50} < 10$ PFU) oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. hPIV1, hPIV3 ve hRSV benzer şekilde oldukça bulaşıcıdır ve aynı zamanda baskın sekresyonlara doğrudan temas veya dolaylı olarak maruz kalma ile de baskındır [Hall et al. 1981, J Pediatr 99: 100-103; McLean et al. 1967, Can Med Assoc J 96: 1449-1453; Hall et al. 1981, Infect Immun 33: 779-783; Parrott et al. 1975, Dev Biol Stand 28: 389-399; ve Tyrrell et al. 1959, Br Med J 2: 909-911]. Yüksek riskli gruplarda (örneğin, prematüre bebekler ve immünite sistemi baskılanmış) enfekte olmamış bireyler için mevcut bir profilaktik ilacın yokluğunda, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, burada açıklanan sonuçların enfeksiyon kontrolüne işaret ettiğine inanılmaktadır. PIV, enfekte bireylerden kaynaklanan URT dökülmesini azaltmaya, kirlenmiş yüzeyleri dezenfekte etmeye ve el yıkamaya en iyi şekilde odaklanacaktır. En iyi URT enfeksiyonunun sınırlandırılmasıyla sağlanacak olan enfeksiyon kontrolünün aksine, terapötik antiviraller PIV ile ilişkili hastalığın klinik belirtilerini kontrol etmek için LRT'ye hedeflenecektir.

30

İnsanlarda [Stephens, HA 2010, Curr Top Microbiol Immunol 338: 99-114; Zhang et al. 2009, Infect Genet Evol 9: 1148-1157; ve Arkwright et al. 2008, Curr Opin Infect Dis 21: 217-222] ve farelerin akciğerlerinde [Faisca et al. 2005 Am J Physiol Lung Celi Mol Physiol 289: L777-787; Brownstein, DG 1987, J Virol 61: 1670-1671; Brownstein et al. 1986, Lab Anim Sci 36: 126-129; Simon et al. 2009, Infect Genet Evol 9: 1253-1259;

35

Boon et al., 21009, J Virol 83: 10417-10426; Anh et al. 2006, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291: L426-435; Itoh et al. 1991, J Vet Med Sci 53: 275-279; ve Stark et al. 2002, J Med Virol 67: 92-100] viral duyarlılık ve hastalık şiddetini modüle eden genetik faktörler tanımlanmıştır. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, 5 mevcut sonuçların, duyarlı 129/Sv fareleri ile karşılaştırıldığında, dirençli BALB/c farelerinin akciğerlerinde virüs büyümesini sınırlandıran genetik faktörlerin ilk kez sınırlandırılmadığını gösterdiğine inanılmaktadır, bu URT ve trakeada güçlü virüs büyümesi ve sonuç olarak, bulaşmayı sınırlandırmaz. Ayrıca, benzer şekilde, URT ve trakeada yüksek düzeydeki enfeksiyonlar ve akciğerlerdeki düşük seviyede 10 enfeksiyonlar, BALB/c veya 129/Sv farelerinin, yüksek veya düşük viral dozlarda aşılınmış olan kafesteki diğer canlılara maruz kalmalarından sonra gözlemlenmiştir. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bu konakçı genetiğin PIV bulaşmasında, en azından bu farelerin suşları için önemli bir rol oynamadığını gösterdiğine inanılmaktadır. Bu gözlemler, burada sunulan kavramları, bulaşma ve 15 patogenezin, sırasıyla, LRT enfeksiyonuna karşı URT enfeksiyonunun bağımsız sonuçları olduğunu ve dokuya spesifik stratejilerle en etkili şekilde karşılanabileceğini desteklemektedir. Akciğerlere kıyasla URT ve trakeanın Sendai virüsü enfeksiyonuna yüksek permisivitesinden sorumlu mekanizmaları tanımlamak için ek deneyler gereklidir. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, potansiyel 20 mekanizmaların nazal kavitede aşılama alanı, URT'de daha düşük sıcaklık, virüs replikasyonunda doku spesifik farklılıklar ve doğuştan gelen immünite ve sürfaktan proteinlerinin varlığı gibi akciğerlerdeki antiviral mekanizmaları içerdiği üzerinde durulmaktadır. Akciğerlerdeki replikasyonun azaltılmasında potansiyel bir faktör, F proteininin inaktive edici bir prekürsörden ayrılması için gerekli olan daha düşük 25 seviyelerde salgılanan triptaz Clara olabilir, böylece viral giriş meydana gelebilir [Kido et al. 1992, J Biol Chem 267: 13573-13579 ve Tashiro et al. 1992, J Virol 66: 7211-7216].

İmmuniteyi ve bulaşmayı destekleyen asemptomatik enfeksiyon, hem virüs hem de 30 konakçıya yarar sağlayan dengeli bir ilişkiyi temsil eder. Bu durum Sendai virüsünün bazı enzootik (klinik olarak açık olmayan) epidemiklerinde geçerlidir, burada subklinik enfeksiyonlar yıllar içinde fare ve hamster kolonilerinde, artan patojenisite gelişmeden ve sadece zaman zaman emziren ve yaşlı hayvanlarda görünürde hastalıklara neden olacak şekilde muhafaza edilir [Profeta et al. 1969, Am J Epidemiol 89: 316-324 ve 35 Zurcher et al. 1977, Lab Anim Sci 27: 955-962]. Bu tür epidemiyolojik gözlemler,

burada tarif edilen ters genetik mühendisliği yapılmış Sendai virüsünün, düşük virölanslı ancak yüksek oranda bulaşabilirliğini andırır. Bu, embriyonlu tavuk yumurtasındaki çeşitli geçiş turları boyunca attenüe edilmiş olan ve L geninde modifikasyonlar içeren Enders suşundan türetilmiştir. Etki mekanizmasının anlaşılması
 5 gerekli olmamakla birlikte, Enders bazlı suş için burada bildirilen sonuçlar akciğerlerde virüsün artan bulaşmasının ne bulaşma süresini ne de bulaşma etkinliğini arttırdığı, dolayısıyla akciğerlerde artmış Sendai virüs replikasyonu için selektif bir avantajı olmadığına inanılmaktadır. Bunun yerine, Sendai virüsünün enzootik epidemilerinde simbiyotik virüs-konak etkileşimi için aşağıdaki mekanizma önerilmektedir: bulaşmadan
 10 sonra doğal enfeksiyon, akciğerlerde yeterince klinik hastalık belirtilerini önlemek için yeterince sınırlı olmakla birlikte, nazofarenks ve trakeada etkili bulaşma ve koruyucu immüniteyi indüklemek için yeterince güçlüdür.

Sendai virüsünün epizootik (klinik olarak ortaya çıkan) salgınları da ortaya çıkmış olup,
 15 fare kolonilerinde morbidite ve yüksek mortalite oranlarına neden olmuştur [Bhatt et al. 1974, Am J Epidemiol 100: 222-229; Ishida et al. 1978, Adv Virus Res 23: 349-383; ve Nakagawa et al. 1980, Nippon Juigaku Zasshi 42: 337-344]. Sendai virüsünün yakından ilişkili iki yüksek patojenik alan izolatu, Ohita ve Hamamatsu suşlarıdır [Sakaguchi et al. 1994, Arch Virol 135: 159-164 ve Itoh et al. 1997, J Gen Virol 78 (Pt
 20 12): 3207-3215]. Sadece birkaç PFU ile aşılanmış geçişsiz Hamamatsu suşu olan Sendai virüsü ile aşılama farelerde mortalite ile sonuçlanırken, yumurtalarda 50 geçişten sonra virüs MLD₅₀'de 400 kat kadar azalmıştır [Kiyotani et al. 2001, Arch Virol 146: 893-908]. Yüksek derecede patojen olan Ohita ve Hamamatsu suşlarının LLC-MK2 hücrelerine ve tavuk yumurtasına adaptasyonunun, C proteininde ve çevrilmemiş
 25 lider bölgede mutasyonlar için seçildiği, kültür hücrelerinde replikasyonun arttığı, fakat farelerin akciğerlerinde replikasyon ve patojenezi azalttığı bulunmuştur. [Garcin et al. 1997, Virology 238: 424-431; Fujii et al. 2002, J Virol 76: 8540-8547; ve Sakaguchi et al. 2003, Virology 313: 581-587]. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, burada tarif edilen biyoluminesans görüntüleme sisteminin, akciğerlerdeki
 30 replikasyonu attenüe eden mutasyonların, aynı zamanda URT ve trakeada replikasyonu attenüe edip etmediğini ve böylece bulaşmayı attenüe edip etmediğinin veya attenüe edici mutasyonların, akciğerlerdeki patojenezi azaltırken, virüsün nazal ve trakeal bulaşmasını destekleyerek sürekli bulaşmayı teşvik edip etmediğinin belirlenmesinde faydalı olacağına inanılmaktadır. Bu deneyler, Sendai virüsü
 35 üzerindeki gözlemlerin yayılıp yayılmadığını ve attenüe, yumurtaya uyarlanmış Enders

suşu için burada bildirilen bulaşmanın, geçirimsiz, yüksek patojenik alan izolatlarına uzanıp uzanmadığını ortaya çıkarabilir.

Özet olarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, attenüe
5 olmamış raportör virüsten SeVc-luc(MF*) gelişiminin, canlı farelerde doku spesifik enfeksiyonu ve tercihen URT'de replike olan bir aday aşı vektörü SeVc-luc(PM)'u ölçmek için kullanılabilecek şekilde tanımlandığına inanılmaktadır. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, sonuçların, Sendai virüsü Enders suşunun, doğrudan aşılmasından sonra ve bulaşmadan sonra canlı hayvanlarda nasıl
10 yayıldığını ortaya çıkardığı üzerinde durulmaktadır. Başlıca yeni bir bulgu, URT ve trakeada, akciğerlere kıyasla, patogenez ve bulaşmanın gözlenen ayrışmasıyla sonuçlanan, görünür bir fenotipik dikotomidir. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, burada geliştirilen görüntüleme araçlarının, enfeksiyon ve bulaşma dinamiğinin viral faktörler, konakçı genetiği, konakçı yaşı, immünite durumu, çevresel
15 koşullar ve aşılama modu ile nasıl belirlendiğini incelemek için bir yöntem sağlayacağına inanılmaktadır. Örneğin sadece ve sınırlayıcı olmayacak şekilde, enfeksiyon, WT ve nakavt farelerde non-invaziv olarak izlenebilir ve *ex vivo* immün tepkileri ölçülür ve daha sonra önceki enfeksiyon açısından anlaşılır. Benzer bir strateji, küçük hayvan modellerinde diğer paramiksoviruslerin görüntü enfeksiyonu için de
20 geliştirilebilir. Genel olarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmakla birlikte, mevcut buluşun uygulamaları, PIV enfeksiyon kontrolüne ve aşı geliştirilmesine doku hedefli yaklaşımlar öneren model sistemi ve sonuçları ve invazif olmayan biyoluminesans görüntüleme tekniğinin aşı adaylarının ve antiviral terapötiklerin prelinik testine yardımcı olacağı üzerinde durmaktadır

25

III. Araçlar

Bu nedenle, bir yönüyle açıklama, herhangi bir geni veya bir genden daha fazlasını herhangi bir pozisyonda ekprese etmek için rekombinant olmayan bir vektör olarak
30 veya rekombinant bir vektör olarak kullanılabilen, süstitüe edilmiş amino asitlerle bir Enders L genini içeren bir aday Sendai virüsü vektörünü üzerinde durmaktadır. Başka bir yönüyle bu açıklama, Sendai virüs genomunun F-HN pozisyonunda ya RSV F ya da G genini ekprese edebilen bir modifiye Enders/ZL geni gibi bir Enders/Z kimera olan bir aday Sendai virüsü aşı vektörünü üzerinde durmaktadır.

35

Yine başka bir yönüyle yabancı gen P-M intergenik bağlantı içine yerleştirilebilir. Ayrıca başka açılardan, buluş tarafından üzerinde durulan yabancı gen, hPIV tip 1-4'ten bir gen veya genleri içerir, burada bahsedilen gen(ler), P-M ve/veya F-HN genleri arasına eklenir. Ayrıca, diğer yönleriyle, buluş ayrıca, bir veya daha fazla sayıda intergenik pozisyona yerleştirilmiş birden fazla kaynaktan gelen bir veya daha fazla yabancı gen ile aşı adaylarını da hedefler; böylece hedeflenen bir immünite yanıtını belirlemek için bir veya daha fazla hedeflenmiş hastalık bir kerede hareket edebilir. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, modifiye edilmemiş bir rekombinant olmayan veya rekombinant SeV aşısı vektörünün aşağıdaki amino asit süstitüsyonlarını içeren modifiye edilmiş bir L genini kapsayabileceği üzerinde durulmaktadır: S155G, R258K, G466E, G482E, S581R, Q717R, T800I ve R852K. Ayrıca, başka bir yönden, açıklama biyoluminesans kullanılarak enfeksiyonun izlenmesi için görsel bir araç üzerinde durmaktadır. Mevcut tarifname, hedeflenen hastalıklara karşı koruma sağlamada yardımcı aşı vektörlerini araştırabilen bir canlı hayvan içindeki virüs ve ilişkili patojenik hastalığın ilerlemesini görüntüleyebilen bir lusiferaz vektörünü içeren bir sistem üzerinde durmaktadır. Ayrıca, bazı yönleriyle, buluş viral proteinlerin ekspresyonu için konakçı hücreler üzerinde durmaktadır. Bir örnekte ve sınırlayıcı olmayacak şekilde, eksprese edilen viral proteinler, hedeflenen bir patojene veya çoklu hedefli patojenlere karşı bir denekten bir immünite tepkisi oluşturmak için bir immünojen olarak kullanılabilir. Örneğin sadece ve sınırlayıcı olmayacak şekilde, konakçı hücreler LLC-MK2 hücrelerini içerir (Bkz. Şekil 1).

Diğer yönleriyle, buluş terapötik ve/veya tanı kullanımlarını üzerinde durmaktadır. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, mevcut buluş, modifiye virüs, modifiye viral proteinler, fragmanlar, analoglar, homologlar, peptitler ve/veya bunların kombinasyonları dahil olmak üzere kullanım için antikorların oluşturulmasını öngörmektedir. Bu gibi antikorlar, örneğin ELISA, RIA ve İmmünopresipitasyon gibi bir diyagnostik immünoanaliz içinde enfeksiyon ve/veya hastalığın tanımlanması/tanı için diğerleri arasında kullanılabilir. Antikorların üretimi, teknikte uzman kişilerce bilinmektedir. Ayrıca, laboratuvar prosedürleri/yönergeleri Antibodies: A Laboratory Manual by Harlow et al. (1988); Using Antibodies: A Laboratory Manual by Harlow et al. (1999); Kohler, G.; Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". Nature 256 (5517): 495'de bulunabilir.

Ayrıca, bazı yönleriyle, mevcut buluş, diğerlerinin yanı sıra ikincil ilaçların, toksinlerin verilmesi için antikörlerin kullanımı dahil olmak üzere, hedeflenen patojenlere karşı tedavi için bir terapötik olarak üretilen antikörlerin kullanımını öngörmektedir. Ayrıca, virüslere karşı aşı için viral proteinlerin kullanılabileceği üzerinde durulmaktadır. Sayısız aşı formülasyonu, teknikte uzman kişilerce bilinir. Aşılar, tek başlarına veya çeşitli adjuvanlar/taşıyıcılar ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Farmasötik taşıyıcılar teknikte uzman kişilerce bilinmektedir. Bu tipik olarak, fizyolojik pH değerinde steril su, salin ve tamponlu çözeltiler gibi çözeltiler dahil olmak üzere insanlara aşılardan uygulanması için standart taşıyıcılar olacaktır. Diğer bileşenler arasında ekspiyantlar, taşıyıcılar, koyulaştırıcılar, seyrelticiler, tamponlar, koruyucu maddeler ve yüzey aktif maddeler bulunur.

Diğer yönleriyle, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, mevcut buluş, SeVc omurgasının tek başına veya ilgili diğer genler ile kombinasyon halinde bir aşı, bir araştırma aracı, bir tanı aracı, bir görüntüleme aracı olarak kullanım için kullanılması üzerinde durur ve teknikte uzman bir kişi tarafından benzer, eşdeğer, ilgili kullanımları içerir.

DENEYSEL

20

Aşağıdaki örnekler açıklayıcı amaçlı verilmiştir.

ÖRNEK I

25 Hücre kültürü

LLC-MK2 hücrelerinin mono tabakalı kültürleri, Dulbecco'nun %10 fetal bovin serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve %1 streptomisin ile desteklenmiş minimum 37°C + %5 CO₂ ortamındaki (DMEM) büyütülmüştür.

30

ÖRNEK II

Rekombinant Sendai virüsleri

Özgün Notl tanıma sahaları, daha önce tarif edilen klonlama bölgeleri kullanılarak bir Enders bazlı pSeV viral genom plazmidinin P-M, M-F ve F-HN intergenik bağlantılarına klonlanmıştır [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38]. Ateş böceği lusiferaz geni, PCR ile, pGL3 Basic vektörü (Promega) ve bir çift Ascl etiketli primerler kullanılarak
5 büyütülmüş, bir Sendai virüsü intergenik bağlantısı içeren ve Notl kısıtlama bölgelerini kuşatan bir mekik plazmidi içine alt klonlanmıştır [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38] ve daha sonra pSeV viral genom plazmidlerinin her birinin özgün Notl bölgesine alt klonlanmıştır. PSeV-luc (MF) plazmidi içinde, F proteininin yukarısındaki başlatma sinyali, QuikChange™ Alana Yönelik Mutajenez Kiti (Stratagene Corp) olarak
10 kullanılarak AGGGTGAAAG (SEQ. ID. NO.: 19) AGGGATAAAG (SEQ. ID. NO.: 19) olarak değiştirilmiştir. Rekombinant SeV'ler, daha önce tarif edildiği gibi pSeV genom plazmidlerinden kurtarılmıştır [Zhan et al. 2008, Vaccine 26: 3480-3488]. Modifiye Enders suşu Sendai genomu, aşağıdaki amino asit değişikliklerini içeren modifiye edilmiş bir Sendai virüsü L geninden oluşur: 155. pozisyonda S ile G, 258. pozisyonda
15 R ile K, 466. pozisyonda G ile E, 482. pozisyonda G ile E, 581. pozisyonda S ile R, 717. pozisyonda Q ile R, 800. Pozisyonda T ile I ve 852. Pozisyonda R ile K.

ÖRNEK III

20 Lusiferaz *in vitro* ekspresyonu

SeV ile enfekte edilmiş LLC-MK2 hücreleri (MOI 5 PFU/hücre), 33°C + %5 CO₂'de inkübe edildi ve lizatlar çeşitli zamanlarda toplandı p.p. Lusiferaz deneyleri, Lusiferaz Tahlil Sistemi (Promega) kullanılarak ölçüldü ve daha önce tarif edildiği gibi bir otomatik
25 luminometre (Turner Biosystems, Inc.) kullanarak ekspresyon seviyeleri ölçüldü [Luque et al. 2007, J Virol 81: 3130-3141].

ÖRNEK IV

30 Viral Titrele ve Biyoluminesans Görüntüleme

Çok adımlı büyüme eğrilerinden (0.01 PFU/hücre MOI'si) ve homojenize edilmiş dokulardan virüs titreleri, daha önce tarif edildiği gibi LLC-MK2 hücrelerinde plak titrasyonu ile belirlendi [Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821]. Sekiz haftalık dişi
35 129x1/SvJ farelere veya BALB/c farelere (Jackson Laboratories), izofluran (Baxter

Health Care Corporation) kullanılarak anestezi uygulandı ve 30 µl PBS veya virüs ile intranasal olarak (i.n.) aşılandı. Şekil 1D, 1E, 2, 3, 4E, 4F ve 12 için, PBS veya virüs ile aşılamadan önce 3 gün, farelere 300 µl avertin (300 mg/kg konsantrasyon) IP enjeksiyonu ile anestezi uygulandı ve göğüs kılları traşlanarak ve tüy dökücü bir kremin uygulanması ile alındı. Hayvanlar günlük olarak kilo kaybı, morbidite ve mortalite açısından izlenmiştir. Görüntüleme öncesinde farelere, 150 mg/kg vücut ağırlığı dozunda lusiferin (Xenogen Corp) intraperitoneal olarak enjekte edildi ve 5 dakika boyunca izofluran ile anestezi uygulandı. *In vivo* görüntüler IVIS CCD kamera sistemi (Caliper Life Sciences) ile elde edildi ve 60'lar, 30'lar veya 5'lerin (4 ve 1 f/durma gruplama) bir pozunu kullanarak Living Image 3.2 yazılımı (Caliper Life Sciences) ile analiz edildi. Farelerin psödocolor görüntüleri (biyoluminesansın temsili), bir cm² doku bırakan ve bir steradianın sert bir açısına yayılan fotonların sayısı olarak tanımlanan 1x10⁶ ila 1x10⁹ yüzey radyansından (foton/sn/cm²/steradian) bir kolorimetrik ölçekte 4'lük bir gruplama kullanılarak gösterilmektedir. Biyoluminesansı ölçmek için, ilgili bölgeler (ROI) manüel olarak tanımlandı ve grafik veriler, ROI alanı (cm²) x 4π 'üzerinde toplanan her bir pikselde radyans olarak tanımlanan toplam akış (foton/sn) olarak ifade edildi. Tüm hayvan çalışmaları St. Jude Çocuk Araştırma Hastanesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmış ve ilgili kurumsal politikalar, Laboratuvar Hayvan Bakım Yönetmeliği Akreditasyon Derneği, Ulusal Sağlık düzenlemeleri ve yerel, eyalet ve federal yasalar ile uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir.

ÖRNEK V

İmmünoloji

Ötenazi uygulanan hayvanlardan serum ve p.i. BALF, 10. gün veya 60. günde toplandı. BALF numuneleri (3 ml), hücresel maddeyi toplamak için santrifüj edildi ve yapışkan hücreleri çıkarmak için 1 saat boyunca 37°C'de bir doku kültürü tabakasına yerleştirildi. Süspansiyon hücreleri toplandı, toplam lenfositler mikroskopik olarak sayıldı ve alyuvarlar parçalandı. Akış sitometrik analizleri için, hücreler FITC-konjuge anti-CD4 (RM4-4) ve PE-konjuge anti-CD8b (53-5.8) antikorları (BD Biosciences Pharmingen) ile boyandı. Lenfositler, ileri ve yan saçılımlara dayalı olarak kapandı ve CD4+ ve CD8+T hücre popülasyonlarının yüzdeleri bu geçit içerisinde ölçüldü. Serumda bulunan Sendai virüsüne özgü veya lusiferaz-spesifik antikorların seviyelerini ölçmek için ELISA'lar kullanıldı. Kısaca, 96 kuyucuklu plakalar, kesintili, saflaştırılmış Sendai virüsü (10

µg/ml) veya ateş böceği lusiferazı (1 µg/ml, Abcam) ile gece boyunca kaplanmıştır. Plakalar %1 BSA içeren PBS ile bloke edildi ve daha sonra 10 kat seri olarak seyreltilmiş serum örnekleri ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, plakalar yıkandı, HRP-Goat anti fare IgG'si (Southern Biotechnologies) ile inkübe edildi ve daha sonra tekrar yıkandı. Antikor seviyelerini ölçmek için, kuyulara TMB substratı (Kirkegaard and Perry Laboratories) ilave edildi, ardından durdurma çözeltisi eklendi ve absorbans 450 nm'lik bir dalga boyunda okundu. Antikor titrelerini hesaplamak için GraphPad Prism doğrusal olmayan regresyon yazılımı kullanıldı.

10 ÖRNEK VI

Temas yoluyla Bulaşma

Donör hayvanlar 30 µL SeVc-luc(MF*) ile intranazal olarak aşılandı ve 24 saat p.i. içinde 3 saf temas faresini içeren kafeslere ayrı ayrı yerleştirildi. Biyoluminesans günlük olarak luminesans seviyeleri sürekli olarak arka plan seviyelerine (-15 gün) gelene kadar izlendi. Sera 60. günde toplandı, böylece Sendai virüsüne özgü antikor seviyeleri yukarıda tarif edildiği gibi ölçülebilirdi. 63. günde, fareler intranazal yoldan uygulanan 7000 PFU SeVc-luc (M-F*) ile test edildi ve her gün bioluminesans ölçüldü.

20

ÖRNEK VII

Sendai Virüs Proteinlerinin *in vitro* Ekspresyonu

Viral protein ekspresyon seviyeleri daha önce bildirildiği gibi radyoimmünopresipitasyon ile analiz edilmiştir [Luque et al. 2007, J Virol 81: 3130-3141 and Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821]. Kısaca, LLC-MK2 hücreleri 5 PFU/hücre MOI'de enfekte edilmiş, 50µCi [³⁵S]Promix (Amersham Pharmacia Biotech) ile etiketlenmiş, çok soğuk RIPA tamponuyla lize edilmiş ve santrifüjleme ile berraklaştırılmıştır. Süpernatant, gece boyunca 4°C'de fare anti-NP, P, M, F ve HN monoklonal antikorları ile inkübe edildi ve immün kompleksler, %12 NuPAGE bis-Tris SDS- PAGE jeller (Invitrogen) üzerinde fraksiyona ayrılmadan önce G-Sepharose proteinine (GE Healthcare) adsorbe edildi ve daha önce tarif edildiği gibi görselleştirildi [Luque et al. 2010, J Virol 84: 810-821].

35 ÖRNEK VIII

Sendai Virüs Bileşimi

10 günlük embriyonlaşmış tavuk yumurtasının allantoik kaviteleri virüslerle aşılانmıştır. Allantoik sıvı 72 hpi'de toplandı ve hücre kalıntıları çıkarmak için 3000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar %60-20 sükröz gradyanı üzerinde tabakalandı ve viryonları izole etmek için 3.5 saat 24.000 rpm'de santrifüjlendi. İzole edilmiş virionlar, TNE tamponunda seyreltildi ve 15 saat süreyle 24,000 rpm'de santrifüj yoluyla %20'lik bir sakroz yastığı üzerinde daha fazla saflaştırıldı. Virüs peletleri, RIPA tamponu içinde yeniden süspanse edildi ve toplam protein konsantrasyonları, BCA protein analiz kiti (Thermo Sci.) kullanılarak belirlendi. Eşit protein seviyeleri bir %4-12 SDS-PAGE jel üzerinde çalıştırıldı, jel Blue BANDit™ protein boyası (Amresco) kullanılarak boyandı ve daha sonra 45 dakika 60°C'de bir BioRad jel kurutucu ile kurutuldu.

ÖRNEK IX

15

In vivo Enfeksiyon ve Bulaşma

CD4+ ve CD8+ T hücreleri için BALF içindeki T-lenfosit akışının ölçümü ana metinde açıklanmıştır. Lusiferaz-spesifik ELISA'lar esasen, 96-kuyucuklu plakaları kaplamak için ateş böceği lusiferaz proteini (Abcam) kullanılması dışında ana metinde anlatıldığı gibi Sendai virüs spesifik ELISA'lar olarak gerçekleştirildi. Ana metinde biyoluminesans görüntüleme ve diseksi edilmiş dokulardan viral titre belirlemeleri de açıklanmaktadır. Temasla bulaşma deneylerinde, ilk gün biyoluminesans $>10^6 \log_{10}$ foton/sn olarak tespit edilene kadar geçen süre kaydedildi. Eğri altındaki biyoluminesans alanları (EAA), biyoluminesans yoğunluklarının IgorPro yazılımı (Wavemetrics) kullanılarak zamana göre integrallenmesiyle hesaplanmıştır.

ÖRNEK X

30 Lusiferazı eksprese eden virüslerin *in vitro* özellikleri

PIV enfeksiyonunun intakt olmayan farelerde invaziv olmayan bir şekilde görselleştirilebildiği bir model geliştirmek için, üç adet rekombinant Sendai virüsü (SeVc virüsleri) üretildi; burada Sendai virüsünün PM, MF ve F-HN gen bağlantılarına ateş böceği lusiferazı eklendi (Şekil 1a, Şekil 9).

- Sendai virüs genomuna ek bir gen ve gen bağlantısının eklenmesinin, aşağı yönde viral gen ekspresyonunu azaltması ve sonuç olarak virüs replikasyonunu azaltması beklenir [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38]. Çok az veya hiçbir atenüasyon
- 5 görülmemesi beklenen bir lusiferazı eksprese eden Sendai virüsü üretmek için, SeVc-luc(MF*) virüsü, hem lusiferaz raportör genini hem de F geninin yukarı yönde daha etkili bir transkripsiyon başlatma dizisi AGGGTGAAAG'yı (SEQ. ID. 20) içermek üzere yapılmıştır (Şekil 9). Böylelikle, raportör gen eklenmesinin attenüe edici etkileri, doğal olarak etkisiz gen başlatma dizisininin F geninin yukarı akışının optimizasyonu ile
- 10 giderilebilir [Kato et al. 1999, J Virol 73: 9237-9246]. Lusiferaz geninin sırasıyla PM ve F-HN gen bağlantılarına eklendiği SeVc-luc (PM) ve SeVc-luc(F-HN) yapıları için, F geninin yukarı yönünde doğal olarak oluşan suboptimal transkripsiyon başlatma dizisi intakt bırakılmıştır (Şekil 9).
- 15 Virüslerin attenüe edilmiş veya sıcaklığın kısıtlı olup olmadığını belirlemek için, 33 ve 37°C'de LLC-MK2 hücrelerinde 0.01-PFU/hücresinin çok sayıda enfeksiyonunda (MOI) çok adımlı büyüme eğrileri ölçüldü (Şekil 1b). SeVc-luc(M-F*), SeVc-luc(F-HN) ve WT'nin titreleri, her iki sıcaklıkta benzer ve birbirine benzer olup, bu iki lusiferazı eksprese eden virüslerin büyük ölçüde attenüe olmadığını veya sıcaklığın
- 20 kısıtlanmadığını göstermişlerdir. Aksine, SeVc-luc (P-M) virüsü 33°C'de büyüme kinetiğini azaltmış ve 37°C'de daha da yavaş büyümüştür. SeVc virüslerinin raportör geni ne kadar etkili bir şekilde eksprese ettiğini belirlemek için, LLC-MK2 hücre lizatlarında (MOI 5 PFU/hücre) *in vitro* lusiferaz ekspresyonu bir luminometre ile ölçüldü (Şekil 1c). SeVc-luc(P-M) içerisindeki raportör genin yukarı yönde eklenmesi, daha
- 25 önce salgılanmış alkalın fosfatazin eklenmesi için tarif edildiği gibi, SeVc-luc(F-HN)'de aşağıya yönde eklenmeden daha yüksek raportör gen ekspresyonuna yol açmıştır [Tokusumi et al. 2002, Virus Res 86: 33-38]. SeVc-luc (M-F*) ile lusiferaz ekspresyonu, 6 saat p.i. (post-enfeksiyon) içinde SeVc-luc(P-M)'yi aşmıştır, bu da M-F* virüsüne (Şekil 9) işlenmiş geliştirilmiş gen başlatma dizisini gösterir, belki de L polimeraz
- 30 geninin daha büyük aşağı yönde transkripsiyonuna bağlı olarak, daha sonraki zaman noktalarında raportör gen transkripsiyonunu artırır. Raportör gen eklemelerinin, Sendai virüs genlerinin ekspresyonunu nasıl değiştirdiğini belirlemek için, LLC-MK2 hücrelerinde (MOI 5 PFU/hücre) Sendai virüs protein ekspresyonu, radyo-immünopresipitasyon ile ölçüldü. SeVc-luc(P-M) virüsü (Şekil 10a) tarafından M, F, HN
- 35 ve muhtemelen L proteinlerinin düşük ekspresyon seviyeleri, büyük olasılıkla bu virüs

yapısının yüksek düzeyde ateniasyonuna neden olmuştur. SeVc-luc(MF*) ve SeVc-luc(F-HN) ile viral protein ekspresyonu, WT benzeri bileşimlere sahip viryonlar oluşturmak için yeterliydi (Şekil 10b, c) ve bu iki raportör virüs, *in vitro* yabancı tip virüslere benzer seviyelerde büyüdü.

5

ÖRNEK XI

Lusiferazı eksprese eden virüslerin virülansı

- 10 Non-invaziv biyoluminesans görüntüleme ve patogenezi çalışmaları için ideal bir lusiferaz-raportör virüsü, WT virüsü ile karşılaştırıldığında doğal murin konakçıda virüs replikasyonu ve hastalık şiddetini değiştirmeden lusiferazın yüksek seviyelerini eksprese edecektir. Burada üretilen üç lusiferazı eksprese eden SeVc virüslerinin *in vivo* WT Sendai virüsünün virülansını koruyup korumadığını belirlemek için, 129/SvJ fareleri
- 15 intranazal olarak 7.000 PFU virüsü ile aşılanmıştır, bu fare suşunda önemli seviyelerde morbidite ve mortalite indüklediği bilinen bir dozdur [Faisca et al. 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: L777-787]. Bu deneyde fareler, izofluran ile anestezi edilmiş ve 30 µl'lik bir hacimde virüs ile intranazal olarak aşılanmıştır, bir hacmin ~1/3'ü nazofarenkse ve hacmin ~1/2'sini akciğerlere veren bir aşılama yöntemidir [Southam et
- 20 ark. 2002, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: L833-839]. WT, SeVc-luc(MF*) ve SeVc-luc(F-HN) enfeksiyonu, bu iki lusiferazı eksprese eden virüslerin bu dozda tamamen virülan kaldığını gösteren, %-25'lik ortalama ağırlık kayıpları ve %80'lik mortalite oranlarıyla sonuçlandı (Şekil 1d, e). Bu. Aksine, attenüe edilmiş SeVc-luc (P-M) virüsü sadece %12 ağırlık kaybına neden olmuş ve hiçbir mortalite oranına neden
- 25 olmamıştır. 129/SvJ farelerinin 70.000 veya 700.000 PFU SeVc-luc (P-M) ile enfekte edilmesi de %100 hayatta kalma ile sonuçlandı (veriler gösterilmemiştir), bu da attenüe edilmiş SeVc-luc (P-M) virüsünün avirulent olduğunu göstermektedir.

- Sendai virüsü ile akut viral pnömoni, bronkoalveolar lavaj sıvısında (BALF) yüksek-
- 30 lenfosit infiltrasyon seviyelerini -10 dpi pikte indüklemiştir [Mo et al. 1995, J Virol 69: 1288-1291]. Lusiferazı eksprese eden virüslerin WT'ye benzer lenfosit akışını teşvik edip etmediğini belirlemek için, 7.000 PFU ile enfekte edilmiş 129/SvJ fareleri, BALF'ın geri kazanımı için 10 dpi'de kurban edildi. Benzer şekilde, WT, SeVc-luc(MF*) ve SeVc-luc(F-HN) ile enfeksiyondan sonra BALF'da toplam yüksek lenfosit, CD4+ T-
- 35 lenfosit ve CD8+ T-lenfosit sayıları saptanmış, bu arada attenüe edilmiş SeVc-

luc(PM)'ye sahip enfeksiyondan sonra lenfosit akışı ~10 kat azalmıştır (Şekil 1f; Şekil 11a-b). Raportör virüslerin, Sendai virüsüne veya lusiferazına bağlanan antikorları ortaya çıkardığı kapsamları belirlemek için, sera da 10 dpi toplanmıştır. Üç SeVc virüsünün tümü, WT'ye benzer anti-Sendai virüsü antikor titrelerini ortaya çıkardı (Şekil 1g). Anti-lusiferaz antikorlarının titreleri, üç raportör virüs için de birbirine benzerdi (Şekil 11c). Böylece 129/SvJ farelerinde atenüasyon ve avirulent olmasına rağmen, SeVc-luc (P-M) güçlü bir antikor yanıtı ortaya çıkarmıştır. SeVc-luc(M-F*), yüksek düzeyde lusiferaz eksprese ederken, WT-benzeri morbidite ve mortaliteyi indüklemiştir, bu da patogenez ve bulaşma üzerine biyoluminesans görüntüleme deneylerinde WT virüsü için bir temsilci olarak en uygun hale getirmektedir.

ÖRNEK XII

Canlı Hayvanlarda Enfeksiyon Dinamiği

Non-invaziv biyoluminesansın *in vivo* enfeksiyonu doğru bir şekilde yansıtıp yansıtmadığını belirlemek için, 129/SvJ fareleri bir Xenogen IVIS cihazı ile görüntülenen 7.000 PFU ile intranazal olarak aşılandı ve hemen ötenazi uygulandı, böylece lüminesans ve viral titrelerin *ex vivo* ölçümü için solunum dokuları toplanabildi. İmmün yetersizliği olan farelerde önceki çalışmalarla tutarlılık [Tashiro et al. 1988, Virology 165: 577-583 ve Miyamae et al. 2005, J Vet Med Sci 67: 369-377], viral titreler ve biyoluminesans solunum yolu ile sınırlıydı ve bu çalışmalarda nazofarenks, trakea ve akciğerlerde belirgin bir şekilde görselleştirildi. Şekil 12'de gösterildiği gibi canlı hayvanlardaki *in vivo* biyoluminesans yoğunlukları, tekniğin validasyonu ile nazofarenks (R2 0.864), trakea (R2 0.915) ve akciğerlerde (R2 0.961) *ex vivo* lüminesans (R2 0.878) ve viral titreler ile invaziv olmayan *in vivo* enfeksiyonu ölçmek için bir araç olarak iyi korelasyon göstermiştir. Lusiferaz-raportör genlerin üç SeVc virüsünde genetik olarak stabil olup olmadığını belirlemek için, 7.000-PFU-aşılanmış 129/SvJ farelerinden 7 dpi'de akciğer dokuları geri kazanılmış, homojenize edilmiş ve LLC-MK2 hücrelerinde süzölmüştür. Üç lusiferazı eksprese eden virüsün her biri için beş plak seçildi, RT-PCR kopyalandı ve dizildi. Tek tek plakların hepsi lusiferaz eki içermekteydi, mutasyona sahip değildi ve LLC-MK2 hücrelerinde enfeksiyondan sonra lusiferazı eksprese etti. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bunun, lusiferaz raportör geninin, *in vivo* olarak 7 günlük replikasyondan sonra SeVc virüslerinin üçünde genetik olarak kararlı olduğunu gösterdiğine inanılmaktadır.

Burada sunulan biyoluminesans görüntüleme sistemi kullanılarak, enfeksiyonun kinetiği ve tropizmi, intakt 129/SvJ farelerinde ölçüldü ve sonuçlarımız disseke edilmiş dokulardan virüs titresinin belirlenmesi için geleneksel yöntemle karşılaştırıldı (Şekil 2 ve 3). SeVc-luc(M-F*) ve SeVc-luc(F-HN) *in vitro* replikasyon oranlarına ve WT'ye benzer *in vivo* patojenitelere sahip olduğu gibi, bu SeVc virüsleri de nazal konka, trakea ve akciğerlerde WT benzeri titrelerle sahipti. Nazal konkalarda, yüksek virüs titreleri (> 10⁵ PFU) 2 dpi ile tespit edildi ve 9 dpi'ye kadar sürdürüldü, ardından hızlı klirens oluştu (Şekil 3b). Nazofarenksden (>10⁸ foton/sn) yüksek seviyelerde biyoluminesans benzer şekilde SeVc-luc (M-F*) ile enfekte edilmiş 129/SvJ fareleri için 2 ve 9 dpi arasında 5 dpi'lik bir pik ile gözlenmiştir (Şekil 3a). Akciğerlerde, virüs titreleri 5 dpi ile pik yaptı ve 9 dpi ile düşük seviyelere indirildi. Attenüe edilmiş SeVc-luc (PM) enfeksiyonu, 5 dpi'de 10⁴ PFU'luk pik akciğer titrelerinde, WT'den yaklaşık 100 kat daha düşük (Şekil 3d) sonuçlanmıştır ve benzer şekilde akciğerlerde attenüe edilmiş ve avirulent fenotip ile tutarlı düşük seviyelerde biyoluminesans gözlenmiştir (Şekil 3a). Bununla birlikte SeVc-luc (PM), 7 dpi'de WT'ye benzer bir seviyede nazal konkalardaki yüksek pik titrelerine (~10⁵ PFU) büyüdü (Şekil 3c) ve nazofarenkste 3 ila 6 dpi arasında yüksek seviyelerde biyoluminesansa sahipti. (Şekil 3a).

ÖRNEK XIII

20

Doku Tropizmi ve Viral Doz

Sendai virüsünün düşük aşılama dozlarının akciğerlerdeki enfeksiyon ve patolojiyi azalttığı bilinirken, URT veya trakeada enfeksiyonun doza bağımlılığı üzerine yayınlanmış herhangi bir çalışmadan bilgimiz yoktur. Ön çalışmalar, SeVc-luc(MF*) için fare enfeksiyöz dozu 50'nin (MID₅₀) 9 PFU olduğunu ve farelerde WT Sendai virüsü [Kiyotani et al. 1993, J Virol 67:7618-7622] ve insanlarda hPIV1 [Reichelderfer et al. 1958, Science 128:779-780] için elde edilen sonuçlara benzer bir 70-PFU dozunun %100 enfeksiyona neden olduğunu gösterdi 129/SvJ fareleri intranazal olarak 70, 700 veya 7.000 PFU SeVc-luc(M-F*) ile 30 µl hacimde aşılandı ve daha sonra biyoluminesans ve viral titreler ölçüldü. 7.000-PFU dozuna kıyasla 70 PFU-aşılanması akciğerlerde ~10 kat düşük viral titreleri ve biyoluminesansı (Şekil 4a, b) ve daha düşük kilo kaybı ile sonuçlandı (Şekil 4c). Buna karşılık, 70-PFU aşılama sonrası nazofarenks ve trakeadaki enfeksiyon, sadece 7.000-PFU'ya kıyasla ~1 gün geciktirildi, seviye ~5 dpi ile benzer bir düzeye ulaştı (Şekil 4a, b) ve Sendai virüsüne

özgü antikorlar ($>10^5$) nispeten yüksek titreleri indükledi (Şekil 4d). Bu nedenle, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, WT-benzeri SeVc-luc(MF*)'nin düşük dozda aşılmasının, URT ve trakeaya neden olan enfeksiyona yol açtığı ve şiddetli patojeniteye neden olmaksızın güçlü bir antikor yanıtı indüklediğine inanılmaktadır.

ÖRNEK XIV

Doku Tropizmi ve Konakçı Genetiği

10

Rekombinant soy içi farelerin çeşitli suşları, Sendai virüsü tarafından akciğer enfeksiyonuna yatkınlıklarında farklılık gösterir [Faisca et al. 2005 Am J Physiol Lung Celi Mol Physiol 289: L777-787; Brownstein, DG 1987, J Virol 61: 1670-1671; Brownstein et al. 1981, Am J Pathol 105: 156-163; and Brownstein et al. 1986, Lab Anim Sci 36: 126-129]. Örneğin, 129/SvJ ve DBA/2 fareleri, akciğer enfeksiyonuna ve sonuçta ortaya çıkan patojenezine oldukça duyarlıdır, BALB/c ve C57BL/6 fareleri ise oldukça dirençlidir. Konakçı genetiğin URT ve trakeadaki Sendai virüs replikasyonunu nasıl etkilediği daha önce bildirilmemiştir. Bu nedenle, Sendai virüs enfeksiyonunun *in vivo* dinamiği, 129/SvJ, DBA/2, C57BL/6 ve 7.000 PFU SeVc-luc(M-F*) ile aşıl原因an farelerin BALB/c suşlarında ölçülmüştür. Önceki çalışmalardan beklendiği gibi, akciğerlerdeki enfeksiyonun derecesi ve kilo kaybı birbiriyle ilişkiliydi ve C57BL/6 <BALB/c << DBA/2 <129/SvJ'yi takip etti (Şekil 2 ve 4). Tersine, URT ve trakea, dört farenin tüm suşları için benzer şekilde yüksek düzeylerde biyoluminesansa sahip olan Sendai virüsü enfeksiyonuna oldukça yatkındı. Böylelikle, BALB/c ve C57BL/6 farelerinin URT ve trakeaları, akciğerlerdeki genetik dirence rağmen, Sendai virüsü enfeksiyonuna oldukça yatkındı. Etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bu sonuçların Sendai virüs enfeksiyonuna genetik yatkınlığın dokuya spesifik olduğunu ve akciğerlerdeki azalmış enfeksiyonun URT veya trakeadaki düşük enfeksiyona bağlı olmadığını gösterdiğine inanılmaktadır. Bulaşma ile ilgili sonraki deneylerde, farelerin ışıkla kaplanmış BALB/c ve 129/SvJ suşları kullanıldı. Bu nedenle, kesilen BALB/c farelerinin gruplarındaki Sendai virüs titreleri ölçüldü ve *ex vivo* titrelerin intakt farelerde (Şekil 13a) 129/SvJ fareleri için olduğu gibi bioluminesans ile korele olduğu bulundu. 129/SvJ farelerine kıyasla, BALB/c farelerinin akciğerlerindeki enfeksiyon, hem bioluminesans (Şekil 4e) hem de viral titreler (Şekil 13b-c) ile ölçüldüğünde en az 10 kat azalmıştır. Sonuç olarak, BALB/c

fareleri çok az kilo kaybı dahil olmak üzere sadece çok hafif klinik semptomlara sahipti (Şekil 4f). Aksine, BALB/c farelerinde nazofarenks enfeksiyonu, her iki biyoluminesans (Şekil 4e) ve viral titrede (Şekil 13b-c) ile ölçüldüğü gibi 129/SvJ farelerinde 3 dpi kadar bir seviyeye ulaşmıştır. Genel olarak, biyoluminesans görüntüleme çalışmalarının, akciğerlerde azalmış enfeksiyona ve az belirgin kilo kaybına rağmen URT ve trakeada güçlü enfeksiyonun gözlemlendiği üç koşul ortaya çıkarmıştır: attenüe edilmiş bir virüs, düşük bir virüs dozu ve dirençli bir fare suşu.

ÖRNEK XV

10

Temasla Bulaşma Sırasında Enfeksiyon Dinamiği

Enfeksiyon kontrolü, patojenlerin nasıl bulaştığının anlaşılmasını gerektirir. Sendai virüsü, hPIVler ve hRSV'nin, esas olarak küçük parçacık aerosollerinin uzun mesafeli bulaşmasına karşı solunumsal salgılarla temasla geçtiği bilinmektedir [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75; van der Veen et al. 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246; Henrickson, K.J. 2003, Clin Microbiol Rev 16: 242-264; Hall et al. 1981, J Pediatr 99: 100-103; and McLean et al. 1967, Can Med Assoc J 96: 1449-1453]. Ayrıca Sendai virüsünün [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75] ve influenza virüsünün URT'de büyümesinin [Lowen et al. 2007, PLoS Pathog 3: 1470-1476], bulaşmayı teşvik ettiği bilinmektedir. Bilinmeyen PIV bulaşması ile ilgili uzun süredir sorulan iki temel soru şunlardır: (i) donörlerin akciğerlerindeki virüsün büyümesinin bulaşmayı nasıl etkilediği ve (ii) bulaşmanın zamanlamasını ve bulaşmadan sonra doku spesifik yayılımı belirleyen faktörler. PIV bulaşması ile ilgili bu temel soruları yanıtlamak için, BALB/c veya 129/SvJ donör fareleri 70 veya 7.000 PFU SeVc-luc(MF*) ile aşılanmış ve sonra 1 dpi'de 1 donör fare bulunan bir kafes içine 3 saf temas faresi yerleştirilmiştir. Biyoluminesans, birincil enfeksiyon temizlenene, 60. günde serum toplanana, fareler 63. günde 7.000 PFU SeVc-luc(MF*) ile test edilene kadar, aşılanmış ve temas farelerinde günlük olarak ölçülmüş ve ardından fareler yeniden enfekte edilmek üzere günlük olarak görüntülenmiştir (Şekil 5). Nazofarengeal biyoluminesans ve serokonversiyon ile, düşük dozda aşılanmış donör hayvanlara maruz kalan dirençli BALB/c fareler dahil her saf kontakt fareye bulaşmanın gözlemlendiğine inanılmaktadır. Bulaşmaların zamanlaması akciğer donörlerinin akciğer titrelerinin kapsamından etkilenmemiştir, çünkü BALB/c'de 129/SvJ donör farelere karşı 7.000-PFU aşılama (Şekil-13c) sonra bulaşma süreleri (aşılanmış hayvanlara karşı bulaşan hayvanların

tespitine kadar geçen süre farkı) sırasıyla 3.3 ve 3.4 gün idi (Şekil 6f). LRT enfeksiyonu her iki farede de meydana gelmiştir ve bu durum da bulaşmaya katkıda bulunabilir. Ne olursa olsun, iletimin birincil belirleyicisi URT ve trakeada virüs bulaşması gibi görünmektedir. Örneğin, 129/SvJ donör farelerinin (Şekil 4a, b) nazal kavimleri ve trakeaları içinde bulaşan yüksek titre ($>10^5$ PFU) ve temasla bulaşma (Şekil 6e, f) 70-PFU ile karşılaştırıldığında 7.000-PFU aşılardan 1 gün önce meydana geldi. Genel olarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bu sonuçların, küçük ölçüde görünür kilo kaybına sahip hayvanların, Sendai virüs Enders suşunun etkili bir şekilde bulaşmasını nasıl destekleyebildiğini gösterdiğine inanılmaktadır.

10

Bulaşma sonrası Sendai virüsü enfeksiyonunun büyüklüğünü araştırmak için, önceki çalışmalar enfekte edilmiş aynı kafeste bulunan hayvanlara maruz bırakıldıktan sonra farklı zamanlarda kurban edilen temas farelerinin gruplarında *ex vivo* titreleri ölçmüşlerdir [Iida, T. 1972, J Gen Virol 14: 69-75 and van der Veen et al. 1970, Arch Gesamte Virusforsch 31: 237-246]. Bu klasik çalışmalar, titrelerin günden güne 100 kat farklılık gösterdiği ve bulaşmadan sonra solunum yolundaki enfeksiyonun ilerlemesinin net olmadığı konusunda oldukça belirsiz sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, non-invaziv biyoluminesans görüntüleme, bulaşmadan sonra bireysel, canlı farelerde solunum yolu boyunca PIV enfeksiyonunun zamansal ve uzamsal yayılmasını ilk kez ölçmek için kullanılmıştır. Aşılardan doz donörlerde ve fare suşlarında değişiklik gösterir, böylelikle viral ve konakçıların belirleyici faktörleri araştırılabilir. Test edilen dört koşul altında (70 veya 7.000 PFU'da enfekte edilmiş 129/SvJ veya BALB/c fareleri), bulaştıktan sonraki temas hayvanlarındaki enfeksiyonun tropizm ve büyüklüğü, 70-PFU dozunda intranasal yolla SeVc luc (MF*) ile doğrudan aşılardan sonra gözlemlenene benzer olmuştur.

25

Bulaşma sonrası, biyoluminesans ilk olarak nazofarenkste gözlemlendi ve daha sonra trakeaya ve akciğerlere sırasıyla ortalama 0.8 ve 1.0 günde yayıldı (Şekil 14a-d). Nazofarenks ve trakeada kuvvetli enfeksiyon gözlemlendi (Şekil 6a-d, Şekil 14e-h) ve düşük seviyeli akciğer enfeksiyonu, bulaşma sonrası düşük kilo kaybı ile tutarlıydı (Şekil 6g-h). Dört farelik grubun hepsinde, 60. güne ait Sendai virüse özgü antikor

30

titerleri benzer şekilde yüksekti ($\sim 10^6$) ve hayvanlar 63. günde test sırasında universal olarak korunmuştur (Şekil 5). Testten sonra, 5-12. günlerde (Şekil 5b, kalın siyah daireler) primer enfeksiyondan sonra en düşük biyoluminesans düzeyine sahip hayvan olan 30 arasından sadece 1 temas faresinde düşük bir biyoluminesans seviyesi ($<10^6$ foton/sn) saptandı, ancak kilo kaybı saptanmadı. Bu hayvan aynı zamanda testten 60 gün önce en düşük Sendai virüsüne özgü antikor düzeyine sahip olduğundan,

35

- koruyucu immünite için bir eşik seviyesinde enfeksiyon gerekli olabilir. Genel olarak, etki mekanizmasının anlaşılması gerekli olmamakla birlikte, bulaşma sonrası Sendai virüsü enfeksiyonunun, URT ve trakeada yeterince güçlü olduğu, ancak akciğerlerde yeterince sınırlı olduğuna ve önemli bir kilo kaybına neden olmadan Sendai virüsü enfeksiyonuna duyarlı olan eşleştirilmiş murin konakçıda koruyucu immüniteyi indüklediğine inanılmaktadır.

REFERANSLAR

- 10 Buluşa ait açıklanan yöntem ve cihazların çeşitli modifikasyonları ve varyasyonları, teknikte uzman kişilerce açıkça görülecektir. Buluş, tercih edilen özel uygulamalarla bağlantılı olarak tarif edilmiş olmasına rağmen, istemde bulunulan buluşun, bu gibi özel uygulamalar ile gereksiz şekilde sınırlandırılmaması gerektiği anlaşılmalıdır. Gerçekten de, buluşun geliştirilmesi için açıklanan modların çeşitli modifikasyonları, aşağıdaki istemler kapsamında aşı geliştirme, enfeksiyöz hastalık, moleküler biyoloji, tanı, biyoteknoloji ve/veya ilgili alanlarda uzman olan kişiler için açıktır.
- Karron RA, Collins PL, editors (2007) Parainfluenza Viruses. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 1497-1526 p.
- 20 Lamb RA, Parks GD, editors (2007) Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 1449-1496 p.
- Williams JV, Edwards KM, Weinberg GA, Griffin MR, Hall CB, et al. (2010) Population-based incidence of human metapneumovirus infection among hospitalized children. J Infect Dis 201: 1890-1898.
- 25 Chanock RM, Parrott RH, Johnson KM, Kapikian AZ, Bell JA (1963) Myxoviruses: Parainfluenza. Am Rev Respir Dis 88: S152-S166.
- Parrott RH, Vargosko AJ, Kimhw, Bell JA, Chanock RM (1962) Acute respiratory diseases of viral etiology. III. parainfluenza. Myxoviruses. Am J Public Health Nations Health 52: 907-917.
- 30 Parrott RH, Vargosko A, Luckey A, Kim HW, Cumming C, et al. (1959) Clinical features of infection with hemadsorption viruses. N Engl J Med 260: 731-738.
- Murphy BR, Collins PL (2002) Live-attenuated virus vaccines for respiratory syncytial and parainfluenza viruses: applications of reverse genetics. J Clin Invest 110: 21-27.

- Moscona A (2005) Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J Clin Invest* 115: 1688-1698.
- Schaap-Nutt A, Scull MA, Schmidt AC, Murphy BR, Pickles RJ (2010) Growth restriction of an experimental live attenuated human parainfluenza virus type 2 vaccine in human ciliated airway epithelium in vitro parallels attenuation in African green monkeys. *Vaccine* 28: 2788-2798.
- Nagai Y (1999) Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev Med Virol* 9: 83-99.
- Faisca P, Desmecht D (2007) Sendai virus, the mouse parainfluenza type 1: a longstanding pathogen that remains up-to-date. *Res Vet Sci* 82: 115-125.
- Denny FW, Murphy TF, Clyde WA, Jr., Collier AM, Henderson FW (1983) Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71: 871-876.
- Takimoto T, Hurwitz JL, Zhan X, Krishnamurthy S, Prouser C, et al. (2005) Recombinant Sendai virus as a novel vaccine candidate for respiratory syncytial virus. *Viral Immunol* 18: 255-266.
- Dave VP, Allan JE, Slobod KS, Smith FS, Ryan KW, et al. (1994) Viral cross-reactivity and antigenic determinants recognized by human parainfluenza virus type 1-specific cytotoxic T-cells. *Virology* 199: 376-383.
- Hurwitz JL, Soike KF, Sangster MY, Portner A, Sealy RE, et al. (1997) Intranasal Sendai virus vaccine protects African green monkeys from infection with human parainfluenza virus-type one. *Vaccine* 15: 533-540.
- Sangster M, Hyland L, Sealy R, Coleclough C (1995) Distinctive kinetics of the antibody-forming cell response to Sendai virus infection of mice in different anatomical compartments. *Virology* 207: 287-291.
- Slobod KS, Shenep JL, Lujan-Zilbermann J, Allison K, Brown B, et al. (2004) Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine* 22: 3182-3186.
- Jones B, Zhan X, Mishin V, Slobod KS, Surman S, et al. (2009) Human PIV-2 recombinant Sendai virus (rSeV) elicits durable immunity and combines with two additional SeVc viruses to protect against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV. *Vaccine* 27: 1848-1857.
- Zhan X, Hurwitz JL, Krishnamurthy S, Takimoto T, Boyd K, et al. (2007) Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. *Vaccine* 25: 8782-8793.

- Zhan X, Slobod KS, Krishnamurthy S, Luque LE, Takimoto T, et al. (2008) Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections. *Vaccine* 26: 3480-3488.
- 5 Iida T (1972) Experimental study on the transmission of Sendai virus in specific pathogen-free mice. *J Gen Virol* 14: 69-75.
- van der Veen J, Poort Y, Birchfield DJ (1970) Experimental transmission of Sendai virus infection in mice. *Arch Gesamte Virusforsch* 31: 237-246.
- Hall CB (2001) Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 344: 1917-1928.
- 10 Henrickson KJ (2003) Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16: 242-264.
- Sealy R, Jones BG, Surman SL, Hurwitz JL (2010) Robust IgA and IgG-producing antibody forming cells in the diffuse-NALT and lungs of Sendai virus-vaccinated cotton rats associate with rapid protection against human parainfluenza virus-type 1. *Vaccine* 28: 6749-6756.
- 15 Rudraraju R, Surman S, Jones B, Sealy R, Woodland DL, et al. (2011) Phenotypes and functions of persistent Sendai virus-induced antibody forming cells and CD8⁺ T cells in diffuse nasal-associated lymphoid tissue typify lymphocyte responses of the gut. *Virology* 410: 429-436.
- 20 Luker KE, Luker GD (2008) Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. *Antiviral Res* 78: 179-187.
- Hasan MK, Kato A, Shioda T, Sakai Y, Yu D, et al. (1997) Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J Gen Virol* 78 (Pt 11): 2813-2820.
- 25 Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, et al. (2010) Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11531-11536.
- Bukreyev A, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL (2006) Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *J Virol* 80: 10293-10306.
- 30 Griesenbach U, Meng C, Farley R, Cheng SH, Scheule RK, et al. (2008) In vivo imaging of gene transfer to the respiratory tract. *Biomaterials* 29: 1533-1540.
- Tokusumi T, Iida A, Hirata T, Kato A, Nagai Y, et al. (2002) Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus Res* 86: 33-38.
- 35

- Kato A, Kiyotani K, Hasan MK, Shioda T, Sakai Y, et al. (1999) Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J Virol* 73: 9237-9246.
- 5 Faisca P, Anh DB, Desmecht DJ (2005) Sendai virus-induced alterations in lung structure/function correlate with viral loads and reveal a wide resistance/susceptibility spectrum among mouse strains. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L777-787.
- Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD (2002) Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L833-839.
- 10 Mo XY, Sarawar SR, Doherty PC (1995) Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *J Virol* 69: 1288-1291.
- Tashiro M, Pritzer E, Khoshnan MA, Yamakawa M, Kuroda K, et al. (1988) Characterization of a pantropic variant of Sendai virus derived from a host range mutant. *Virology* 165: 577-583.
- 15 Miyamae T (2005) Differential invasion by Sendai virus of abdominal parenchymal organs and brain tissues in cortisone- and cyclophosphamide-based immunosuppressed mice. *J Vet Med Sci* 67: 369-377.
- Kiyotani K, Sakaguchi T, Fujii Y, Yoshida T (1993) F0-containing noninfectious Sendai virus can initiate replication in mouse lungs but requires a relatively long incubation period. *J Virol* 67: 7618-7622.
- 20 Reichelderfer TE, Chanock RM, Craighead JE, Huebner RJ, Turner HC, et al. (1958) Infection of human volunteers with type 2 hemadsorption virus. *Science* 128: 779-780.
- 25 Brownstein DG (1987) Resistance/susceptibility to lethal Sendai virus infection genetically linked to a mucociliary transport polymorphism. *J Virol* 61: 1670-1671.
- Brownstein DG, Smith AL, Johnson EA (1981) Sendai virus infection in genetically resistant and susceptible mice. *Am J Pathol* 105: 156-163.
- 30 Brownstein DG, Winkler S (1986) Genetic resistance to lethal Sendai virus pneumonia: virus replication and interferon production in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Lab Anim Sci* 36: 126-129.
- Hall CB, Douglas RG, Jr. (1981) Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 99: 100-103.

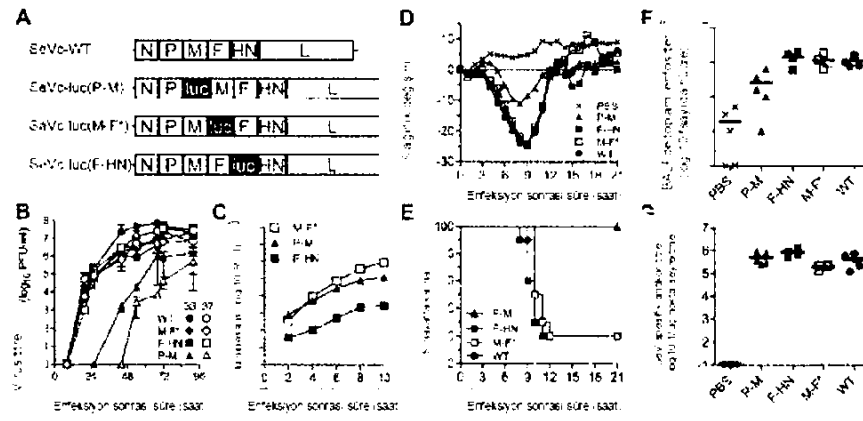
- McLean DM, Bannatyne RM, Givan KF (1967) Myxovirus dissemination by air. *Can Med Assoc J* 96: 1449-1453.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P (2007) Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* 3: 1470-1476.
- 5 Profeta ML, Lief FS, Plotkin SA (1969) Enzootic sendai infection in laboratory hamsters. *Am J Epidemiol* 89: 316-324.
- Zurcher C, Burek JD, Van Nunen MC, Meihuizen SP (1977) A naturally occurring epizootic caused by Sendai virus in breeding and aging rodent colonies. I. Infection in the mouse. *Lab Anim Sci* 27: 955-962.
- 10 Anderson DE, von Messling V (2008) Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol* 82: 10510-10518.
- Luque LE, Bridges OA, Mason JN, Boyd KL, Portner A, et al. (2010) Residues in the heptad repeat A region of the fusion protein modulate the virulence of
- 15 Sendai virus in mice. *J Virol* 84: 810-821.
- Bousse T, Matrosovich T, Portner A, Kato A, Nagai Y, et al. (2002) The long noncoding region of the human parainfluenza virus type 1 f gene contributes to the read-through transcription at the m-f gene junction. *J Virol* 76: 8244-8251.
- Spriggs MK, Collins PL (1986) Human parainfluenza virus type 3: messenger
- 20 RNAs, polypeptide coding assignments, intergenic sequences, and genetic map. *J Virol* 59: 646-654. Rassa JC, Parks GD (1998) Molecular basis for naturally occurring elevated readthrough transcription across the M-F junction of the paramyxovirus SV5. *Virology* 247: 274-286.
- Cattaneo R, Rebmann G, Baczkowski K, ter Meulen V, Billeter MA (1987) Altered
- 25 ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160: 523-526.
- Touzelet O, Loukili N, Pelet T, Fairley D, Curran J, et al. (2009) De novo generation of a non-segmented negative strand RNA virus with a bicistronic gene. *Virus Res* 140: 40-48.
- 30 Rudd PA, Cattaneo R, von Messling V (2006) Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol* 80: 9361-9370.
- von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R (2004) Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host
- 35 immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14216-14221.

- Lemon K, de Vries RD, Mesman AW, McQuaid S, van Amerongen G, et al. (2011) Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog* 7: e1001263.
- de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, et al. (2007)
 5 Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3: e178.
- Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, Watson B, Peeples ME, et al. (2005) Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J Virol* 79: 1113-1124.
- 10 Villenave R, Touzelet O, Thavagnanam S, Sarlang S, Parker J, et al. (2010) Cytopathogenesis of Sendai virus in well-differentiated primary pediatric bronchial epithelial cells. *J Virol* 84: 11718-11728.
- Devincenzo JP, Wilkinson T, Vaishnaw A, Cehelsky J, Meyers R, et al. (2010) Viral load drives disease in humans experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 1305-1314.
- 15 Skiadopoulos MH, Surman SR, Riggs JM, Elkins WR, St Claire M, et al. (2002) Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology* 297: 153-160.
- 20 Bousse T, Chambers RL, Scroggs RA, Portner A, Takimoto T (2006) Human parainfluenza virus type 1 but not Sendai virus replicates in human respiratory cells despite IFN treatment. *Virus Res* 121: 23-32.
- Skiadopoulos MH, Surman SR, Riggs JM, Orvell C, Collins PL, et al. (2002) Evaluation of the replication and immunogenicity of recombinant human
 25 parainfluenza virus type 3 vectors expressing up to three foreign glycoproteins. *Virology* 297: 136-152.
- Hall CB, Douglas RG, Jr., Schnabel KC, Geiman JM (1981) Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect Immun* 33: 779-783.
- 30 Parrott RH, Kim HW, Brandt CD, Chanock RM (1975) Potential of attenuated respiratory syncytial virus vaccine for infants and children. *Dev Biol Stand* 28: 389-399.
- Tyrrell DA, Bynoe ML, Petersen KB, Sutton RN, Pereira MS (1959) Inoculation of human volunteers with parainfluenza viruses types 1 and 3 (HA 2 and HA 1).
 35 *Br Med J* 2: 909-911.

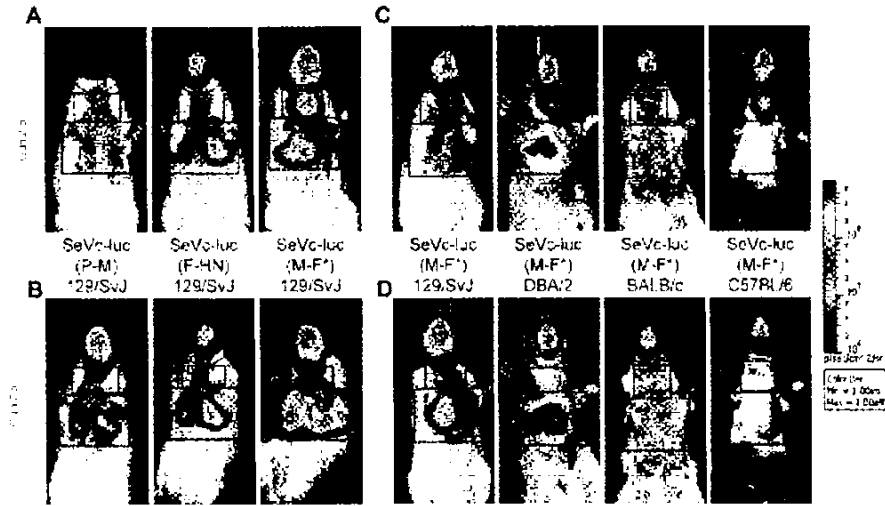
- Stephens HA (2010) HLA and other gene associations with dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 99-114.
- Zhang L, Katz JM, Gwinn M, Dowling NF, Khoury MJ (2009) Systems-based candidate genes for human response to influenza infection. *Infect Genet Evol* 9: 1148-1157.
- Arkwright PD, Abinun M (2008) Recently identified factors predisposing children to infectious diseases. *Curr Opin Infect Dis* 21: 217-222.
- Simon AY, Moritoh K, Torigoe D, Asano A, Sasaki N, et al. (2009) Multigenic control of resistance to Sendai virus infection in mice. *Infect Genet Evol* 9: 1253-1259.
- Boon AC, deBeauchamp J, Hollmann A, Luke J, Kotb M, et al. (2009) Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice. *J Virol* 83: 10417-10426.
- Anh DB, Faisca P, Desmecht DJ (2006) Differential resistance/susceptibility patterns to pneumovirus infection among inbred mouse strains. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L426-435.
- Itoh T, Iwai H, Ueda K (1991) Comparative lung pathology of inbred strain of mice resistant and susceptible to Sendai virus infection. *J Vet Med Sci* 53: 275-279.
- Stark JM, McDowell SA, Koenigsnecht V, Prows DR, Leikauf JE, et al. (2002) Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus infection in inbred mice. *J Med Virol* 67: 92-100.
- Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, et al. (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J Biol Chem* 267: 13573-13579.
- Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, et al. (1992) Trypsin-like Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* 66: 7211-7216.
- Bhatt PN, Jonas AM (1974) An epizootic of Sendai infection with mortality in a barrier-maintained mouse colony. *Am J Epidemiol* 100: 222-229.
- Ishida N, Homma M (1978) Sendai virus. *Adv Virus Res* 23: 349-383.
- Nakagawa M, Saito M, Kinoshita K, Suzuki E, Imaizumi K (1980) Pathogenicity of Sendai virus in mice cage-mated with infectors and their offsprings. *Nippon Juigaku Zasshi* 42: 337-344.

- Sakaguchi T, Kiyotani K, Sakaki M, Fujii Y, Yoshida T (1994) A field isolate of Sendai virus: its high virulence to mice and genetic divergence from prototype strains. *Arch Virol* 135: 159-164.
- 5 Itoh M, Isegawa Y, Hotta H, Homma M (1997) Isolation of an avirulent mutant of Sendai virus with two amino acid mutations from a highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* 78 (Pt 12): 3207-3215.
- Kiyotani K, Sakaguchi T, Fujii Y, Yoshida T (2001) Attenuation of a field Sendai virus isolate through egg-passages is associated with an impediment of viral genome replication in mouse respiratory cells. *Arch Virol* 146: 893-908.
- 10 Garcin D, Itoh M, Kolakofsky D (1997) A point mutation in the Sendai virus accessory C proteins attenuates virulence for mice, but not virus growth in cell culture. *Virology* 238: 424-431.
- Fujii Y, Sakaguchi T, Kiyotani K, Huang C, Fukuhara N, et al. (2002) Involvement of the leader sequence in Sendai virus pathogenesis revealed by recovery of a pathogenic field isolate from cDNA. *J Virol* 76: 8540-8547.
- 15 Sakaguchi T, Kiyotani K, Watanabe H, Huang C, Fukuhara N, et al. (2003) Masking of the contribution of V protein to Sendai virus pathogenesis in an infection model with a highly virulent field isolate. *Virology* 313: 581-587.
- Luque LE, Russell CJ (2007) Spring-loaded heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. *J Virol* 81: 3130-3141.
- 20 Tokusumi et al., "Recombinant Sendai Viruses Expressing Different Levels of a Foreign Reporter Gene" *Virus Res.*, 86(1-2):33-38 (2002).
- Nagai et al., "Recombinant Sendai Virus" U.S. Patent No. 7,442,544 (Also see U.S. Patent Application Publication No. US 2005/0266566 and related continuations.)
- 25 Kano et al., "AIDS Virus Vaccines Using Sendai Virus Vector" U.S. Patent Application Publication No. US 2010/0266633
- Xiaoyan Zhan, "Development of Sendai Virus Vaccines to Prevent Pediatric Respiratory Infections" at http://www7.nationalacademies.org/gdest/_X_Zhan.GDES_China_Presentation.pdf Mar. 29-Apr. 1, 2006.
- 30 Takimoto et al., "Recombinant Sendai Virus as a Novel Vaccine Candidate for Respiratory Syncytial Virus" *Viral Immunology*, 18(2):255-265 (2005).

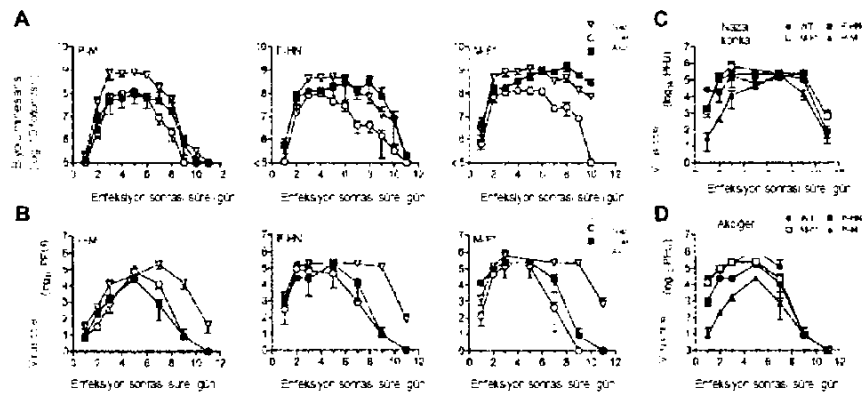
- Jones et al., "Human PIV-2 Recombinant Sendai Virus (rSeV) Elicits Durable Immunity and Combines with Two Additional rSeVs to Protect Against hPIV-1, hPIV-2, hPIV-3, and RSV" Vaccine, 27:1848-1857, (2009).
- 5 Zhan et al., "Sendai Virus Recombinant Vaccine Expressing hPIV-3 HN or F Elicits Protective Immunity and Combines with A Second Recombinant to Prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV Infections" Vaccine, 26:3480-3488 (2008).
- Hurwitz et al., "Use of Sendai Virus as A Human Parainfluenza Vaccine" U.S. Patent Application Publication No. US 2006/0110740.
- 10 Russell, Charles, "Membrane Fusion Proteins of Influenza and Parainfluenza Viruses in Infection and Disease" Emory University Presentation Feb. 1, 2010
- Hurwitz, Julia L., "Development of Recombinant Sendai Virus Vaccines for Prevention of Human Parainfluenza and Respiratory Syncytial Virus Infections" *Pediatr Infect Dis J*, 27(5)Supplement May 2008
- 15 Hurwitz et al., "Development of Sendai Virus-Based Vaccines to Prevent Pediatric Respiratory Virus Infections" *Procedia in Vaccinology*, 1:41-44 (2008).
- Zhan et al., "Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Protein Expressed By Recombinant Sendai Virus Elicits B-cell and T-cell Responses In Cotton Rats and Confers Protection Against RSV Subtypes A and B" Vaccine 25:8782-8793 (2007).
- 20 Takimoto et al., "Recombinant Sendai Virus Expressing the G Glycoprotein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Elicits Immune Protection Against RSV" *J Virol*. 78(11):6043-6047 (2004).
- Tokusumi et al., "Paramyxovirus Vectors Used For Transfer of Foreign Genes" U.S. Patent Başvuru Yayın No. US 2004/0137627 (Aynı zamanda bakınız ilgili
- 25 U.S. Patent No. 6,746,860.)
- Portner et al., "Vaccine and Gene Therapy Vector and Methods of Use Thereof" Uluslararası Yayın No. WO 01/92548.



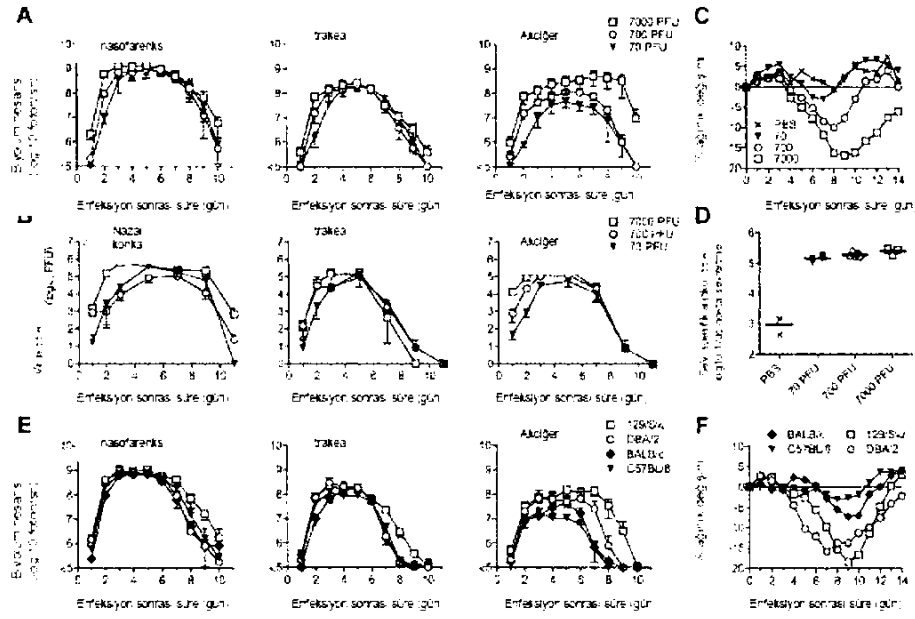
ŞEKİL 1



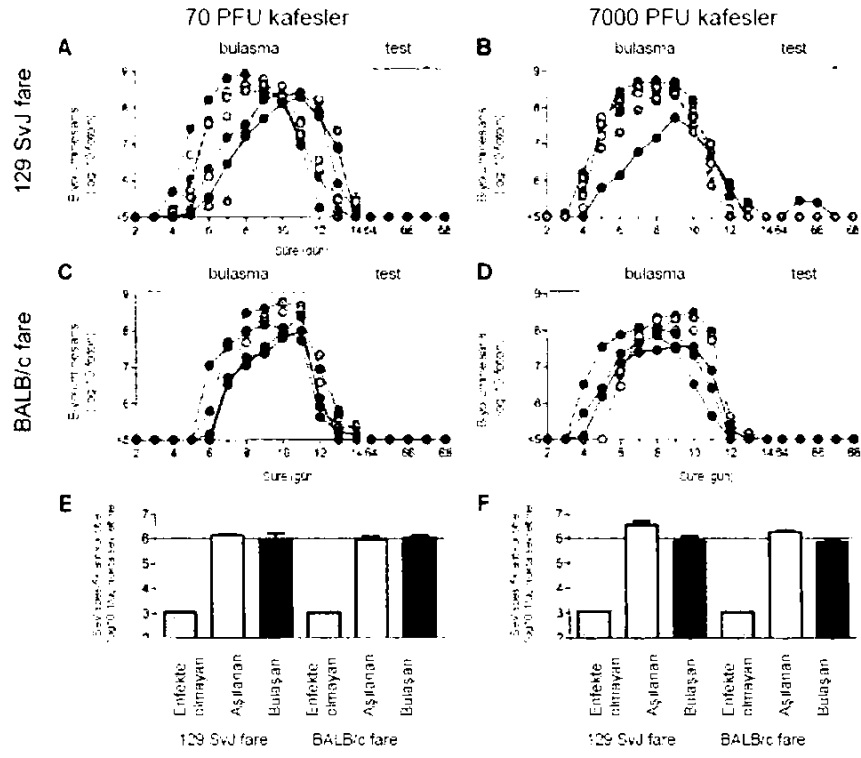
ŞEKİL 2



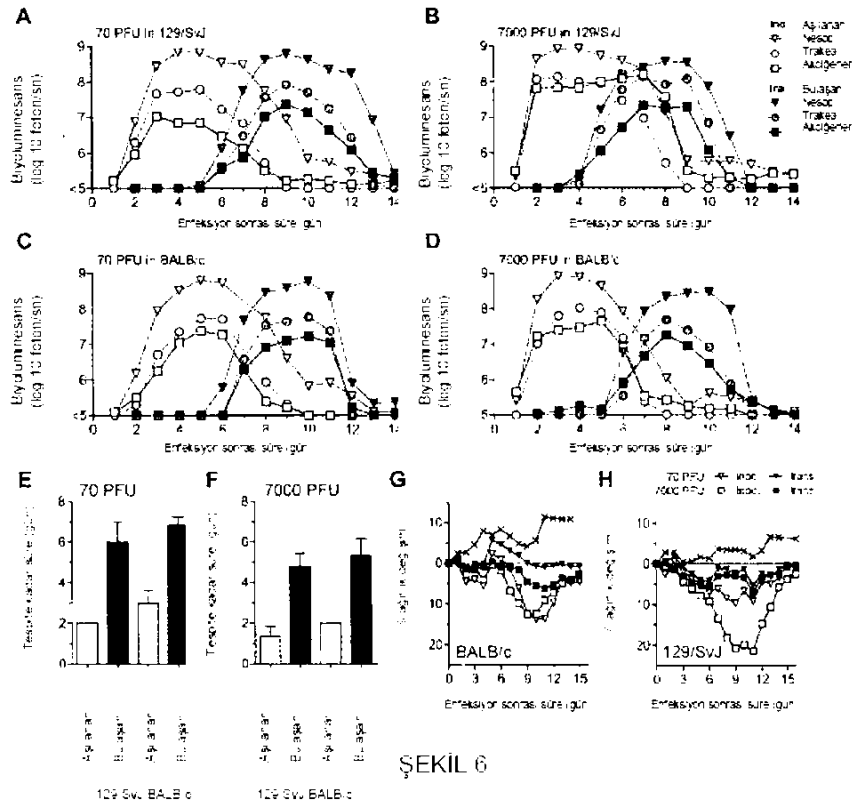
ŞEKİL 3



ŞEKİL 4



ŞEKİL 5



ŞEKİL 6

pSVc Plasmid dizisi (Seq. ID NO.: 3)
 cgttaatacgaactcactataaccaaacagagaaaaaacatgtatgggatalatataatgaagllagacagg
 atttttagggccaagtatccaccctgaggagcaggttcagaccctttgcttgcctgccaagttcacg
 ggggggttgttgagcaccttcgatacttttagctctaggaggagcgaaagtatttaataagtcggggagg
 aggtgctgttatccccggccagaggagcacagtcctcagtggttcgtactaggcccaagtgtagctgatgat
 gcagacaagttattcattgcaactaccttccttagctcactcattggacacagataagcagcactctcaga
 gaggagggttctcctgctctctgcttgccatggcttacagtagtcagaaattgtacttgacaacaacagg
 agtaaacgcgcatgtcaaatatgtgatctacaacatagagaagaccctaagaggacgaagacagacgga
 ttcatitgaagacgagagatatggaaatagagaggaccacagaatggctgtttggacctatggtaaca
 agagccactcttccagggtcaacgggatgctgcagaccctgacacactccttcaaacctatgggtatcc
 tgcatacctaggagcaataattgtccaagtctggattgtgctggtaaggccatcacagcagcggccggc
 ttaaggaaaagggttcttcaacagggttagaggcgttcagacaaggcggcaccgtgaagggtgccttagttt
 tctactggggagacagttgaggggataggctcggttatgagatctcagcaaaccttctatctctcatggg
 tgagacccttgtgactatgaatactgcaagatctgatctcaccacattagagaagaacatccagatcgtt
 gggaactacatccgagatgcagggtcggcttcttcatgaacactattaatatggggtggagacaaaga
 tggcagctctaactgtgtcaaacctgaggcccgatattaataagattagaagcctcatagacacctacct
 gtcaaaaggccccagagctccctttatctgtatcctcaaggaccctgttcatgggtgaatttgcctcaggc
 aattatctcgcactatggagttacgccatgggagtcgctgctgcagacaaggcaatgcagcagtagc
 tcacaggggagacataccttgatatggaaatgttcttactaggacaagccgtggcaagggtatgctgaatc
 gaagatcagcagtgccctggaagatgagttaggagtgacggalacagccaaggagaggctcagacatcat
 ctggcaaaccttgcgggtggggatgggtgcttaccacaacacacaggcgggtgggtgaattgaggtagctc
 tagacaatgccgatctgacctagaacaagaagctcatgcggaccaggacgctagggggtgggggtggaga
 aagtggtgaagatgggcacgctcaggtgagtggtggccactttgtcacactacatggggctgaacgggtta
 gaggaggaaacaaatgatgaggatgtatcagacatagagagaagaatagccatgagactcgcagagagac
 ggcaagaggattctgcaaccctggagatgaaggccgcaataacgggtgtcgatcacgacgaagatgacga
 taccgcagcagtagctgggataggaggaaatcagatatacagggcttcaaggtaacttga:ccgtagla
 agaaaaacttagggtaaggttcatccactgatcggtcaggccaaggccacacccaacccaccgaccac
 acccagcagtcgagacagccacggctcggctacacttaccgcgagatcaagcttcccttccatctttaa
 GAAGATTCTGAAGTTGAGAGGGAGGCGCCAGGAGGAAGAGAGTCGCTCTCGGATGTTATCGGATTCCTCG
 ATGCTGTCTGTGAGTGAACCAACTGACATCGGAGGGGACAGAAGCTGGCTCCACACACCATCAACAC
 ICCCCAAGGACCAAGGCTCTGCCATAGAGCCAAAAGTGAGGGCGAAGGAGAAGTCTAACACCGTCGACC
 CAAGATAATCGATCAGGTGAGGAGAGTAGAGTCTCTGGGAGAACAAAGCAAGCCAGAGGCAGAAGCATG
 CTGGAAACCTTGATAAACAAAATATACACCGGGCCTTTGGGGGAAGAAC TGGTACAAACTCTGTATCTCA
 GGA1CTGGGCGATGGAGGAGACTCCGGAATCCTTGAAAATCTCCAAATGAGAGAGGATATCCGAGATCA
 GGTATTGAAGATGAAAACAGAGAGATGGCTGCGCACCTGATAAGAGGGGAGAAGCAAGCTGAAGGAC
 TTCCAGAGAGGTACGAGGAGGTACATCCCTACCTGATGAAGGAGAAGGTGGAGCAAGTAATAATGGAAG
 AAGCATGGAGCCTGGCAGCTCACATAGTGCAAGAGctgggggtcctgggtatctctagccccgaactC
 gaagaggctgtgtacggaggagaacaaagaagacctaccaacagtggttccaaacctcttactccagcaa
 ccgltgcctggcaccgggtccccaccgctgaaatcgttacaacagcacagggtcaccaccaggaaaaccccc
 alctacacaggatgagcacatcaaclicggggacacccccgcgctcagggtcaagaccggaaacacca
 ataggggaccgctctgtctcagattgtccagccaacggccgccaatccaccgggtctagagaccgact
 caacaaaaaaggcataggagagaacacatcatctatgaagagatggctacattgttgacgagctctgg
 tgtatccagctctgctcaagaattcgagtcacccagacgaggttatgtgtttgcaagacgtgccctta
 aagctctcaaacatagcagagatgacattcaatgtatgctggcctgatcctttctgccgagaaatcttccg
 ctctgaaggtatagagaacaacaactgctcaaacagatccaagagagcgtggaatcatctccgggatal
 ttacaagagatctctlgagtatcagaagaacagaacatctgtgatgtccaacctatctacacttcat
 atcatcacagatagagggtggcaagactgacaacacagactcccttacaagggtccccctccgtttttgcaa
 aatcaaaaagagaacaagactaaggctaccaggtttgacccatctatggagaccctagaagatatgaagta
 caaacgggacctaactccgagaggatgaatttagagatgagatccgcaaccgggtgtaccaagagaggac
 acagaacccagggcctcaaacgcatcagccctctccccctcaaaagagaagcccaaatgcactctctca
 ggctcgtcatagagagcagtccttaagcagagctgagaaagcagcatalgtgaatcattatccaagtg
 caagacagaccaagaggttaaggcagtcaggaactcgtagaaggagacatagagtcactgaccaac

ŞEKİL 7A

[illegible]

ŞEKİL 7A devamı

gagccacatagtttctggagatgccctgtcggagaaccgtatcttagctcagatcctaaatctcattgc
 tgcctgggtccgagcttggtatctcgggtctacaacgatctcggatgtgttaggctcccttcactctcaat
 tggcgaggcaatctatgccctattcatcaaatctcattacacaagggttggtgctgacatagggaaatcatat
 cagggtctcgcagctagggtacatatcactcaattcagatatgttccctgacttaaccccgtagtgctcc
 acacttatgacatcaacgacaatcggaaatcatgctctgtgtggcaaccgggactagggttatcagct
 ttgctccatgccgactgtagacgaagaaccgactactctagtgatgggtatcgaggatctggtcttgat
 gtcttgatctcaaaaggagcactaagctctcaccggtatcgcaacagcgaggtagatcttgatcaccggt
 tctctgcactatacccggtgtaggcaacgggcatigraacagaaggctcattgatatcttctgggtatgg
 tgggctaaccacccctctacagggtgatacaaatgtaggaccgaaggatgccaaagggttgcgaagac
 acatgcaatgaggctctgaaaattacatggctaggagggaacagggtggtcagcggtgatcatcagggtca
 atgactatctctcagagaggccaaagataagagtcacaaccattccaatcactcaaaactatctcggggc
 ggaaagglagattatfaaaattgggtgatcggglgtacatctatacaagatcatcaggctggcactctca
 ctgcagataggagtacttgatgtcagccaccccttgactatcaactggacactcatgaaagctctgtct
 gaccaggaaatgaagagtgcatttggtaacatcgtgtccgaaggaaatgcatacaggcgatatacactga
 tgccttatccattgtcccttgatgcagctaacgtcgtacccgtcagctatgtccaatcatcgcgtgtc
 aaccacaacatctgtattcactacttaacattataaataatgttaaggataaaggatgtcaattag
 aggtctcatataccacgacatcgtgtatcagcattttggtaaggctactgctttcacatcatcaggat
 caatcagaagagcctgaataacctacagccgatgctcttaagacatagcatccctaaattatgcaaggcc
 gagtct[REDACTED]at[REDACTED]taactgactagcaggctggcgccgttctgtacactagagtcattctcgaacatccac
 aatattctctcagctctctacgtctctcagctatttaagaaaaacccagggtgaatgggaagcttgctata
 ggct[REDACTED]gatgggcaggagctctcccaaaccttctgacatactctatccagaatgccacctgaactct
 ccatagtcagggggaagatagcacagttgcacgtcttggtagatgtgaacagccctacagactgaagg
 acgacagcataataaattacaaagcacaataataggaaacggaggttgtcccccgtcaaaataagat
 cagggtctctgggttaaggctcttcaacgcacaataaaggatttagaccgatacacgtttgaaccgtacca
 acctactctcaggaattacttaggcttgatataccagagatgtgacaataatccgatccgtcttcggg
 tctcggatcggctgaccaggaggttatctagtggttccaggatcttgggtgaatatctcaagcaact
 aggcaatatagaaggaagagagggtacgacccgttgcaggatatacggaccatccggagataactgat
 aagtcagcaggaatagatgggtataggccattcttaacttgggtcagcatcaaatatgacatcgggtgga
 tgcagaagaccagaccgggggagcccttgatacctctaattcacataacctcctagaatgcaaatcata
 cactctagtaacataccgagatcttgcagatgactgaacaagttgacattgacaggggtatatcttaacc
 cctgagctggtcttgatgtattgtgatgtttagaagggaagggtgaatatgtctgtcggggcatctag
 ataagaagtcattgggataaacagcaagggtgaggaaattatgggaactagtgattccctctctcaag
 tcttggagaggaaatatacaatgtcatcgcaactattggagccctatcacttgcctctacataactaaat
 gatcctgttatcctctacgtggggcatttatgaggcatgtgtgacagagctacagactgttttaacaa
 gtagagacgtgtacacagatgctgaagcagacactattgtggagctgttactcgccattttccatggaac
 ctctattgatgagaagcagagatcttttcttctttaggacatttggccacccagcttagaggctgtc
 actgccgacgaaggtaaggggcccatatgtatgcacaaaggcaataaagcttaagaccctatacagagt
 gtcagtcagtttttgcactatcatcataaatgggtatagagagaggcatggcggacagtggccccctg
 tgacttccctgatcacgtgtgtctagaactaagggaacgctcaagggtccaatcaggcaatctcttatgaa
 tgtgtcttagacaactatacaagtttcataggcttcaagtttcggaagtttatagaaccacaactagatg
 aagatctcacataatataatgaagacaagcactatccccagggaaggaggcatgggactctgtataacc
 ggatagtaatctgtactataaagcccagagctgaagagaccggcggcttatgaaagtgtcataaat
 gatgaaatttcaaccagagaagaattatcaattatgtggagtcaggagattgggtgaagacgaggagt
 tcaacatctcgtacagtctcaagagaaagagatcaagcaagagggtcgtctattcgcaaaaatgactta
 taagaigcgagccgtacaggtgtctggcagagacactactggctaaaggaaataggagagctattcagggaa
 aatgggatgggttaaggagagatagacctacttaaaagattgactactcttctgtctcaggcgctccca
 ggactgatcaggtgacaaataactctaaatcatcagagaagagaacgaaggcatggaaaaataagaactc
 tggggggtactgggacgaaaagaagggtccagacatgaattcaaggcaacagattcatcaacagacggc
 tatgaaacgttaagttgcttctcacacagacctcaagaaatctgcttaaaactggagatttgagagta
 ctgcattgtttggctcagagatgcaacgagatatttggcttcaagacctctttaaactggatgcattcagt
 ccttgaagggtgtacaatatatgttgagatccttactgtcagtcgccgaccggatgcatcgacaactc
 caggatcatgagactctggcatttctacataaatcttaggggggcatagaaggttactgccagaagc

ŞEKİL 7A devamı

tgtggaccttaatctcaatcagtgcaatccacctagcagctgtgagagtggtgtcagggtctctgcaat
 ggttcagggtgacaatcaagctatagccgtgacatcaagagtacctgtagctcagacttacaagcagaag
 aaaaatcatgtctatgaggagatcaccaaatatttcggtgctctaagacacgctatgtttgatgtagggc
 acgagctaaaattgaacgagaccatcatctagtagcaagatgtttgtctatagtaaaaggatatactatga
 tgggaagattttaccacagtgccctgaaagccttgaccaagtgtgtattctggtccgagacactggtagat
 gaaaacagatctgcttgttcgaacatctcaacatccatagcaaaagctatcgaaaatgggtattctccta
 tactaggctactgcattgctgtgtataagacctgtcagcagggtgtgcatatcactagggtgactalaaa
 tccaactatcagccgaccgttaagagatcaatactttaagggtaaagaattggctgagatgtgcagtggtt
 attccagcaaatgttggaggattcaactacatgtctacatctagatgctttgttagaaatattggagacc
 ccgtagtagcagccctagctgatctcaaaagattcatcagagcggatctgttagacaagcaggatlatata
 cagggtcatgaatcaagaacccggtgactctagttttctagattgggcttcagacccttattcgtgtaac
 ctcccgattctcagagtataactacgattataaagaatatcactgctagatctgtgctgcaggaatccc
 cgaatctctactgtctggtctcttcaccgagactagtggagaagaggatctcaacctggcctcgttcct
 tatggaccggaagtcatcctgcccagagatggctcatgagatctgggtaattccttaactggagttagg
 gaggcgtatgcagggtgcttgatagcaagctctctagttagagccagcgttaggaaggaggatctat
 catatgggattattgaggaggcttgcaattatgatctattgagtagcagacactgactagaactctgat
 gaaacccggtgaaagacaacatcgaaatagtagtatgtgttcagttgagctagctgtcggtctaaaggcag
 aaaatgtggatccacctgacttaaggagacccatatacgggttagaaacaccagaccctttagagctct
 tgagggaatatttatcgaaggttcagaggtgtgcaagcttgcaggcttgaaaggagcagaccctccta
 tcaatgggtctatcttctgacaatatagacctggacacgcttacaaacggatgtcgccgtataaagaatc
 cctattttggatcagccactgatgaaaggtcgggaagcccaactcgggtatgtaagaatctaaagcaaac
 ccgcaaggccgcatccggtatgctatggtgtatagctgggcttacgggactgagagatctggtgat
 ggagccgctcttatagcccaacaagagctaaactgagcttagagaatctaaagctgctgactcctgtt
 tcaacctccactaatclatctcataggttgaagatacggcaaccagatgaagttctctagtgaacac
 tagtccgtgcaagtcggttcataacaatatcaaatgataacatggcactcaaaagacaggggtgctgaa
 ggatactaatctcgigtatcagcagattatgctaactgggctaagcttgttcaggttcaatatgagatat
 aagaagggttcttaggggaagccactgataattgcacttaccttaataacgggtgctgtataatggagt
 cccacagggaggaatatcccccaagggtccacattagatttagagattacacaagagaacaataaatt
 gatctatgatcctgatccactcaaggatgtggaccttgagctatttagcaaggctcagagatgtgtacat
 acagltgacatgacttattggctcagatgatgaagttatcagagcaaccagcatctgtactgcaatgacga
 tagctgatacaatgtctcaattagatagagacaacttaaaagagatgatcgcatagtaaatgacgatga
 tgtcaacagcttgattactaggttatgggtattgatgttcttattttgtcraacgttcgggggtatt
 ctagtcaatcagtttgatactcactctacggcttaaacatcagaggaagggaagaatatggggacatg
 tagtccggattcttaagataacctccacgcagttctaaagcttctaatgtctctatccccatcccaa
 aatcttcaaacgattctggaatgcaggtgtcgtggaacctgtgtatgggctaacctctcaaatcaggat
 aagatactcttggccctctctgtctgtgaatattctgtggtatctattcatgcagactggcaagggggtg
 taccgcttgagatctttatctgtgacaatgaccagatgtggccgacatgaggagggtcctcttcttggc
 aagacatcttgcatacctatgcagcttggcagagatatctagggtgggccaagattagaatcaatgaac
 tctctagagaggctcagtcactaaaggttacctggaactcacatttcttgatgacccggtactgaggt
 acagtcagttgactggcctagtcatacaagatttccatctactttgacctatataccggaagtcactat
 aaaagtgttaaggacaagaggtataggagtcctgaagcttagaagattgggatcccgaggcagataat
 gcactgttagatgggtatcgccgcagaaatacaacagaatattcctttgggacatcagactagagccctt
 tttgggggttgagagatccaagtcacaggtactgcgtctcgggggtacaaggagatcacaaagggtga
 gataggcagatcaggtgttggtctgacgttaccattcagtggaagatatctatctaccagctgaggctc
 tttggcatcaacagtagctgcttgaaagcacttgaacttacctacatttgagcccttagttgaca
 aggataaagataggctatatttaggggaaggagctggggccatgcttctctgttatgacgtactcttgg
 cccatgcatcaactattataactcaggggtatactcttgtgatgtcaatgggcagagagaggttaatatata
 tatctgtgaggtggcactagtggaagaaattaaacaatgttactagtctgggtcaaaaggttaaaag
 tgttattcaacgggaatcctggctcgacatgggttgggaatgatgagtgtaggctttgtattggaatga
 attacagaatagctcgataggccctagtcactgtgacatggaggaggagatcataaggatgatcaagtt
 gtactgcatgagcattacagtgtaatccggtcgcgtatctgggtgggggatcgagacgttgtgcttataa
 gcaagattgctcccaggtgggcacggattggaccaggcagctcagctatctgagatactgggacga

ggtaaactaatagtgcttaaaacatctaaccctgcttccacagagatgtatctcctatcgaggcacc
 aaatctgacattatagaggacagcaagacagtggttagcttagtctcctcctttgtcaaaagaagatagca
 tcaagatagaaaagtggatcttaataagagaaggcaaggctcacgaatgggttactcgggaattgagaga
 aggaagctcttcatcagggatgcttagaccttaccatcaagcactgcagacgttggctttgaacaaac
 ttgtataaattgagcagagatttctgtccacatgaacatagctgatacacacaactgcgatagactt
 tcaacaggggtttgaaggatacaatcttcgaatgggctagaalaactgagtcagataaaaggcttaact
 aactggtaagtatgacctgtatcctgtgagagattcaggcaagttgaagacaatttctagaagacttgtg
 ctatcttgatattctttatctatgtccacaagattggtaactgggtcattcctgaccagaagtttgaag
 caagacttcaattgggaatagtttcattatcatccgtgaaatcaggaaactgagggttatcacaacaaac
 ttattatatacaggtttgaggatattatacatagataacgtatagattcctcaccaaagaaataaagatt
 ttgatgaagatttttaggggcagtcagatgttcggggccaggcaaaatgaatacacgaccgtgattgatg
 atggatcactaggtgatatcgagccatagacagctcg[REDACTED]taattagtccttatcgtgcagaacgatcg
 aagctcgcgggtacctgggaagtcttggacttgtccatagacaatagtaagaaaaacttacaagaagaca
 agaaaaatttaaaaggatacatatctttaaactcttgtcgtgggtgggtcggcatggcatctccacctctc
 ggggtccgacclgggcatcgaaggagagacgctcgtccactcggatggclaaagggaaggggcccccggggg
 ctgctaacaagccccgaagggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataaactagcataacccct
 tggggcctcctaaccgggtcttggagggttttttgcgtgaaggagggaactatatacggatcgagacctcga
 tgcgggctgagtcgggtatttttcttccatcgcctcgttgcgggttatttccacacgcataatggttgcctc
 gtaaatctgctctgtagccgcatagttgaagccagcccgacacccgcacaaccccgctgacccgctc
 accgggttctgtctcctcgggacatcgtctlacagacaagclgtagccgtctcgggagctgcatgtgtcag
 aggttttaccgtcatcacggaacgcgcgagacgaaggggcctcgtgatacgcctatttttatagggtta
 atgtcatgataataatgggtttcttagacgtcagggtggcacttttcggggaatgtgcggcgaacccctat
 tlggttatttttctaatacattcaaatatgtatcgcctcatgagacaataacccctgataaatgcttcaa
 taataatgaaaaaggaaggtatgagttatcaacatttccgtgtcgccttattcccttttttgcggcat
 tttgcttctcgtttttgtctcaccagaagcgttgggtgaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc
 acgagtggtttacatgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcggcgaagaaact
 ttccaatgatgagcacttttaagttctgtatgtggcgcgggtattatccgtattgacggcgggcaag
 agcaactcgggtcggcatatactattctcagaatgacttgggtgagtaactcaccagtcacagaaaagca
 tcttacggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgcataaccatgagtgataacactgcggcc
 aacttactctgacaacgatcggaggacggaaggagctaacgcgttttttgcacaacatgggggcatatg
 taactcgccttgatcgttgggaacgggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgat
 gccgtgtagcaatgggcaacacgttgcgcgaactatttaactggcgaactacttacttagcttcccgcaa
 caattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgtcggcccttccggctggct
 gggttatttgcgtgaactctggagccggtgagcgtgggtctcgggtatcatgtagcactggggccaga
 tggtaagccctcccgatcgtatgltatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaataga
 cagatcgtgagataggtgctcactgattaaagcattggtaactgtcagacaaagtttactcatatatac
 tttagattgatttaaaacttatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttggataatctcat
 gaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatct
 tcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgtcgtctgcaacaaaaaaaccacccgtaccagcgggtgg
 tttgttggcggatcaagagctaccaaccltttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatacc
 aaatactgtccttctagtgtagccgttagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatac
 ctgccltgctaatccgttlaccagtggtcgtgcagtggtgataagtctgtcttaccgggtlggact
 caagacgatagttaccggataaggcgcagcgtcgggtgaaacgggggttcgtgcacacagcccgctt
 ggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttccgaa
 gggaagaaaggcggacaggttctcggtaaggcgggggtcgggaacagggagagcgcacggggggttccag
 ggggaacgcctgggtatctttatagctcgtcgggtttcggcactctgactgagcgtcgatttttgag
 atgctcgtcaggggggcggagcclatggnaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttccggcctt
 tgcgtggccttttgcacatgttcttctcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcct
 ttgagtgagctgatalaccgtcgcgcagccgaacgacgcgagcgcagctcagtgagcgggaagcggg
 agagcggcccaataccgaacccgctctcccgccgcltggcggattcaataatgacgcggcagcagagg
 tttcccgactggaaaggcggcagtgagcgaacgaattatgtgagtttagctcactcattaggcacc
 agcctttacactttatgcttccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaatttccacagg

ŞEKİL 7A devamı

aaacagctatgacctgattacgccaagcttgcctgacctgcaggctgcacg

ŞEKİL 7A devamı

NP cDNA: (SEQ. ID. NO. 4)

gcccgggttggtgagcaacttcgatcatttagctctaggaggagcgaagatttaataagtcgggag
gaggtgctctttatccccggccagaggagcacagctcttagtgttctgtactaggcccaagtgtgactgatga
tgtagacaagttattcattgcaactaccttccctagctcactcattggacacagataagcagacatctcag
agaggagggttctctgctctctctgcttgcctatggcttacagtagtcagaattgtacttgacaacaaacg
gagtcaacgcctgatgtcaaatatgtagacttacaaatagagaaagaccttaaggaggacgaaacagacgg
attcattgtgaagacgagagatatggaatatgagaggaccacagaatggctgttttgacctatgggtcaac
aagagccactcttcagggtcaacgggatgctgcagaccctgacacactctctcaaacctatgggtatc
ctgcatgctcaggagcaataattgtccaagtctggattgtgctggtgaaggccatcacaaagcagcggcgg
cttaaggaaaggggttctcaacaggttacaggcgttcapacaagacggcaccgtgaaaggatgctttagt
ttcactggggagacagttgaggggataggctcggttatgagatctcagcaagccttggatctctcctggt
ttgagacccttctgactatgaatactgcaagatctgactcaccacattagagaaggaacatcagatcgt
taggaactacatccgagatgcagggtggcttccctcatgaacactattaaatatggggtagagacaag
atggcagctctaacgttgtcaaacctgaggcccgatactaatagattagaagcttcatagaacacacc
tgtcaaaaggcccccagagctccctttatctgtatcctcaaggaccctgttcattggtgaatttgcctcagg
caattatctgcactatggagttacgacatgggagtcgcctgctgacagaacaaaggcaatgcagcagta
gtcacaggaggagacataccttgatatggaatatgttcttactaggacaagccgtggcaaggatgctgaat
cgaagatcagcagtgccctggaagatgagttaggagtgacggatcacgccaaaggagaggctcagacatca
tctggcaaaccttgcctggatggggaatgggtgcttaccacaacccaacaggcgggtggtgcaattgaggtagct
ctagacaatgctgatatcgacctagaacaagaagctcatgaggaccaggacgttaggggttggggtagg
aaagtggtgaaagatgggcaagtgcagggtgagtgggggcaatttgtaacattatgggggtgacgggt
agaggaggaaacaaatgatgaggatgtatcagacatagagagaaagaaatagccctgagactcgcagagaga
cggcaaggaggattctgcaacccatggagatgaaggccgaataacgggtgtcgtcatcagcgaagatgacg
aaccgcagcagtagctgggatatggaggaatc

ŞEKİL 7B

P cDNA: (SEQ. ID. NO.:6)

atggatcaagatgccttcattcttaagaagattctgaagttgagaggaggcggcaggagggaagagagt
cgctctcggatglatcggallcctcgatgctgtcctgtcggagtgaaccaactgacatcggaggggacag
aagctggctccacaacaccatcaacactccccaaaggaccaggctctcgccatagagccaaaagtggggc
ggaggaggaggtcacaacaccgtcgaccacagulaalcgultagggtggaggagglagagtcctggggaga
caagcaagccagaggcagaaagcacatgctggaaaccttgataaacaataatataccggggcctttggggg
aagaaatggatcaaaactctgtatctcaggatctggggatggaggagactcgggaatccttgaatacct
ccaaatgagagaggatattccgagatcagggtattgaaagatgaaacagagagatggctgcgcacccctgata
agaggggagaaagacaaagrtgaaggacttccagaagggtacgaggaggctacatccctactrtgatgaagg
agaagggtggagcaagtaataatggagaagcatggagcctggcagctcacatagtgcagagataactggg
gtcctgggtgattcctagccccgaactcgaagaggrrtgtgtatcaggaggaaacaaaagaagacctaccaaca
glgggtccaaacctcttactccaggaacctgtcrtgggacccgggtccaccccgctgaatcgttacaacag
cacagggtcaccaccaggaaaacccccatctacacaggatgagcacaactcctggggacacccccgcc
gtcagggtcaaaagaccggaaaccaccaataggagaccgctctgtctcagattgtccagccaaaggccgc
caatccacccgggtctagagaccgactcaacaaaaagggtcataggagagaacacatcatctatgaaaga
galtggctacattgttgargagttctgggtglaalcagctcggcacaagaattcagagtcacccgagacgg
agttatgtgtttgcaagacgtgcccctaagtcctgcaaaactatgcagagatgacattcaatglatcggcc
tgatcccttctgcccagaaaacttccgctcgtagggtagatgagaacaaacaactgtcacaacagaltca
agagagcgtgggaatcattccgggatatttacaagagattctctgagttacagaagaacagaactcattg
ctgatgtcacaacctatctacacttcatatcatcacagatagagggtggcaagactgacaacacagactccc
ttacaagggtccccctcggtttttgcaaaatcaaaagagaacaagactaaggctaccagggttgaccatc
tatggagaccctagaagatatgaagtacaanaacggacctaatccagagaggtgaatttagagatgagatc
cgcaaccgggtgtaccagagagggaacacagaacccagggtctcaaacgcatcacgctcctccctcca
aaggagaagccacaaatgcacitctcaggctcgtcttagagagaggtcccttaaggagagctgagaadgc
agcatatgtgaaatcattatccaagtgcaagacagaccagagggttaaggcagtcattggaactcgtagaa
gaggacatagagtcactgaccaactag

ŞEKİL 7C

C cDNA (SEQ. ID. NO.:8)

ATGCCCTCATTTCTTAAAGAAGAATCTGAAGTTGAGAGGGAGGCGCCAGGAGGAAGAGATCGCTCTCCGAATGTTATCGGA
TCCTCGATGCTGTCCCTGTCGAGTGAAACCAACTGACATCGGAGGGGACAGAAGCTGGCTCCACAAACCATCAACACTCC
AAGGACCAGGCTCTGCCCATAGAGCCAAAAGTGAAGGCGAAGGAGAAAGTCTCAACACCGTCGACCCCAAGAATAATCGATCAG
GTGAGGACAGTAGAGTCTCTGGGAGAACAAAGCAAGCCAGAGGCCAGAAAGCAATGCTGGAAACCTTCATAAACAATAATAC
ACCGGGCTTTGGGGGAGAAACAGGTAACAACCTCTGTAATCTCAGGATCTGGGCGATGGAGGAGACCTCGGAATCTTGAAA
ATCCCTCAAAATGAGAGAGGAATAACCGAGATCAGGTATTGAAGATGAAAACAGAGAGATGGCTCCGCCACCTTGATAAGAGGG
GAGAAGACCAAGCTGAAGGACTTCCAGAAAGAGGTACGAGGAGGTACATCCCTACCTGATGAAGGAGAAGGTGGAGCAAGTA
ATAATGGAAGAAGCATGGAGCCTGGCAGCTCACATAGTGTGAAGAGTAA

ŞEKİL 7D

[illegible]

ctgggtgtgtcttcaccacacattgggtct
tcgatgaagggaatactcactgaagat
gggggttagaccttgagaatgggtgct
ttaatcccatctggaggatgaccttag
atgccgggtgtccacagtcgagatt
agcacagatcaccgtagggatllgc
gaatcgatgacaaaacacacagat
taaagacactccaggatllcgtgaa
tgaccttaagactgggtataaaattg
ggaaccatcggagagaagagctca
ttatgacacaaatcaggacaggga
ggtgtagatgtggatcttagagaga
ccaggltgctcatcacaaaggat
tccccagccatactcagtcgtgc
gttgacctatatatgccccagggat
gacacaaacagggtgtctgtcaca
ggcgttgltgctaactgcatagcac
ctctaaagggtgtagtattctaaac
gctaaccggagagggcacgatgcca
gacccgtgatatctctcacaact
gaaagcaccggaaaatcctctctgag
gtagtatatggtcgtaatatgggtgg
gtgtaattgggtaatccagatgaccg
gtacacaaacgggtgggtttgatgacg

HN cDNA (SEQ. ID. NO.:14)

atggatggataggg
ggcaaacgtgactcgtactggctctacctctcctagtggttagcactacaaaattagcatcaggttgggaga
ggtaagtaaaagttgacacatgggtgctgattctctcattcaccagtggttcttgaattgccacagt
gatcatctgtatcataatctctgctagacaagggtalagatgaaagagtagtcaatgactgttagaggca
ttgaacatgagcagcaggaggggtgaaagagtcacttaccagttctaataaggcaagaggttatcgcaaggga
ctgtcaacattcagagctctgtgcaaacgggaatccagtcctgttgaaacaaaacagcagggaatgtcat
ccagatgattgataagtcgtgcagcagacaagagtcactcagctctgtgagagtagcatcgcagttccac
catgcccagggaattgccccctcttgagccacatagtttctggagatgccctgtcggagaaccgtatctta
gctragatcctaaaaatctcattgctgctgggtccgagcttggtatctgggttctacaacgactctctggarg
tgtaggtctcccttcaactctcaattggcagggaatctatgcctattcatcaaatctcattacacaagggt
tgtgtgacataggggaatcatalcagggtcctgagcctagggtacatcactcaatcagataltgttcc
ctgatcttaacccgtagtgctccacacttatgacatcaacgacaatcggaatcatgctctgtggtggc
aacrgggactagggggttatcagctttgtctccatgctgactgtagacgaagaaccgactactctagtga
ggatcaggagatctggctctgtatgtcctggatctcaaaaggagcactaagctccaccggatcgcaaca
gcagggtagatcttgatcaccgttctctgactataccacaggttaggcaacggcattgcaacagaagg
ctcattgatatttctgggtatgggtgggtaaccacccctctacagggtgatacaaatgtaggaccacaa
ggatgcacaacagggtgctgcaagacacatgcaatgaggctctgaaaattacatggctaggagggaacagg
tggtcagcgtgatcatcagggtcaatgactatctctcagagaggccaaagataagagtcacacaccattcc
aatcactcaaaactatctcggggcggaaaggtagattataaaattgggtgatcgggtgtacatctataca
agatcactaggctggcactctcaactgcagataggagtagtctgatgtcagccacccttgatctcaact
ggacacctcatgaagccttgctctagaccaggaaatgaagagtgcaattggtaacatacgtgtcggaaagg
atgcatatcaggcgtatacactgatgcttatccattgtccccctgatgcagctaacgtcgtcaccgtcag
ctatgtccaatcacatcggtgtcaacccaacatcatgtattctaacactactaacatataaaatgt
taaggataaaggatgttcaattagagcctgcatataccacgacatcgtgtatcacgcatcttggtaaaagg
ctactgctttcacatcatcgagatcaatcagaagagcctgaataccttacagccgatgctctttaagact
agcatccctaaattatgcaaggccgagtcctaa

ŞEKİL 7G

L cDNA (SEQ. ID. NO.:16)

atggatggcaggag
tcctcccaaaccttctgacatactctatccagaatgccacctgaactctcccatagtcagggggaaga
tagcacagttgcacgtcttgttagatgtgaaccagccctacagactgaaggacgacagcataataaatat
tacaaagcacaaaattaggaacggaggattgtccccctgcaaatgaagatcaggtctctgggttaaggct
cttcaacgcacaataaaggatttagaccgatacacgtttgaaccgtaaccaacctacitcaggaattac
ttaggcttgatataccagagataatgtgacaaaatccgatccgtcttcggtctcggatcggctgaccag
ggagttatctagtgggttccaggatctttggttgaatatcttcaagcaactaggcaatatagaagggaaga
gaggggtacgatccgttgaggatctcggcaccatccggagataactgataagtagcagcaggaatagat
ggtagaggccattcctaacttggttcagcatcaaatatgacatgcgggtggatgcagaagaccagaccggg
gggaccccttgataacctctaattcacataacctcctagaatgcaaatcatacactctagtaacatacggga
gatcttgtcatgatactgaacaagttgacattgacagggtatatcctaaccctgagctggtctttagt
attgtgatgtttagaagggaagggtggaatatgtctgctgcagggcactagataagaagtccattgggat
aacaagcaagggtgaggaattatgggaactagtggattccctcttcaagtcttgagaggaataatac
aatgtcatcgactattggagccctatcacttgcctcacaactaaatgatcctgttatacctctac
gtggggcatttataggcatgtgtgacagagctacagactgttttaacaagtagagacgtgtacacaga
tgctgaagcagacactatttgaggtcgttactcgccattttccatggaacctctattgatgagaaagca
gagatcttttcttcttaggacatttgccaccccagcttagaggctgtcactgcccgcgacaaggtaa
gggcccatatgtatgcacaaaaggcaataaagcttaagaccctatacagtgatgcatgagtttttgac

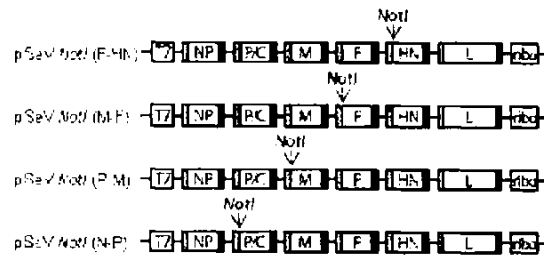
ŞEKİL 7H

tatcatcataaatgggtatagagagaggcatggcggacagtggccccctgtgacttccctgatcacgtg
 tgtctagaactaagggaacgctcaagggtccaatcaggcaatctcttatgaatgtgctgtagacaactata
 caagtttcataggcttcaagtttcggaagtttatagaaccacaactagatgaagatctcacaatatatat
 gaaagacaaagcactatccccagggaaggagcatgggactctgtataccgggatagtaactctgtactat
 aaagccccagagtctgaagagaccggcggttattgaagtgttcataaatgatgagaatttcaaccag
 aagaaattatcaattatgtggagtcaaggagattggttgaaagacgaggagttcaacatctcgtacagtct
 caaagagaaagagatcaagcaaggggctgtctattcgcaaaaatgacttataagatgcgagccgtacag
 gtgctggcagagacactactggctaaaggaataggagagctattcagggaanaatgggatggtaaggag
 agatagacctacttaaaagattgactactctttctgtctcaggcgtccccaggactgattcagtgtaaa
 taactctaaatcatcagagaagagaacgaaggcatggaaaataagaactctggggggtactgggacgaa
 aagaagaggtccagacatgaattcaaggcaacagattcatcaacagacggctatgaaacgttaagtgtct
 tcctcacaacagacctcaagaatactgcttaactggagatttgagagtactgcattgtttggtcagag
 atgcaacgagatatttggcttcaagaccttcttaactggatgcattccagtccttgaaagggttacaata
 tatgttggagatccttactgtccagtcccgaccggatgcattcgacaactccaggatcatgcagactctg
 gcattttcatacataatcctagggggggcatagaaggttactgcccagaagctgtggaccttaatctcaat
 cagtgaatccacctagcagctgtgagagtgggtgtcagggtctctgcaatgggtcagggtgacaatcaa
 gctatagccgtgacatcaagagtactgtagctcagacttacaagcagaagaaaatcatgtctatgagg
 agatcaccataatatttgggtcttaagacacgtcattgttggatgtaggcagcagctaaaattgaacga
 gacctcattagtagcaagatgtttgtctatagtaaaaggatatactatgatgggaagattttaccacag
 tgcctgaaagccttgaccaagtgtgtattctgttccgagacactggtagatgaaaacagatctgctgtt
 cgaacatctcaacatccatagcaaaagctatcgaaaatgggtattctctatactaggctactgcattgc
 gttgtataagacctgtcagcaggtgtgcatatcactagggtatgactataaactcaactatcagccgacc
 gtaagagatcaatactttaagggttaagaattggctgagatgtgcagtgttgattccagcaaatgttggag
 gattcaactacatgtctacatctagatgctttgttagaaatattggagaccccgagtagcagccctagc
 tgatctcaaaagattcatcagagcggatctgttagacaagcaggtattatcaggggtcatgaatcaagaa
 cccggtgactctagttttctagattgggtctcagaccttattctgttaacctcccgacttctcagagta
 taactacgattataaagaatatcactgctagatctgtgctcaggaatccccgaatcctctactgtctgg
 tctcttcaccgagactagtggagaagaggatctcaacctggcctcgttcttatggaccggaagtcac
 ctgcccagagtgggtcatgagatcctgggttaattccttaactggagttagggaaggcagttgagggatgc
 ttgatacgaccaagtctctagttagagccagcgttaggaaaggaggattatcatatgggatattgaggag
 gcttgtcaattatgatctattgcagctacgagacactgactagaactctcaggaaaccggtgaaagacaac
 atcgaatatagttatgtgttcagttgagctagctgtcggcttaaggcagaaaatgtggatccacctga
 cttacgggagaccatacatgggttagaaacaccagaccttttagagctcttgagggaatatttatcga
 aggttcagaggtgtgcaagctttgcaggtctgaaggagcagaccccatctatacatggttctatcttct
 gacaatatagacctggacacgcttacaacggatgtccggctataagaatccccattttggatcagcca
 ctgatgaaagggtcggaagccccaaactcgggtatgttaagaaatctaaagcaaacccgaaaggcgccatccg
 gatagctatgggtgtatagctgggctacgggactgatgagatctgtggatggaagccgctcttatagcc
 caaacaagagctaatctgagcttagagaatctaagctgctgactcctgtttcaacctccactaatctat
 ctcatagggtgaaagatacggcaaccagatgaagttctctagtgaacactagtcctgtgaagtcgggt
 cataacaatatcaaatgataacatggcactcaagaagcaggggagtcgaaggatactaattctctgtat
 cagcagatattgctaactgggctaagcttgttcagttcaatatgagatataagaagggttcttaggga
 agccactgatattgcacttacatcttaataacgggtgtgtataatggagtccccacaggaggcgaatat
 ccccccaggtccacattagatttagagattacacaagagaacaataaattgatctatgatcctgatcca
 ctcaaggatgtggaccttgagctatttagcaaggtcagagatgttgatcacatagttgacatgacttatt
 ggtcagatgatgaagttatcagagcaaccagcatctgtactgcaatgacgalagclgalacaatgtctca
 attagatagagacaacttaaaagagatgatcgactagtaaatgacgatgatgtcaacagcttgattact
 gaggtttattgggtgattgatgttctttattttgtcacaagttcgggggtattctagtcaatcagttlgcat
 actcactctacggcttaaacatcagaggaagggaagaataatggggacatgtagtccggattcttaaga
 tacctcccacgcagttctaaagttcttatctaatgtctctatccccatcccaaatcttcaaacgattctgg
 aatgcagggtgtcgtggaacctgtgtatgggacctaacctctcaaatcaggataagatactcttggccctct
 ctgtctgtgaatattctgtggatctattcatgcacactggcaagggggtgtaccgcttgagatctttat
 ctgtgacaatgaccagatgtggccgacatgaggaggtcctcttcttggcaagacatcttgcatacctta

ŞEKİL 7H devamı

tgcagcttggcagagatatctagggatgggccaagallagaatcaatgaactctctagagaggctcagat
 cactaaagugttacctggaaactcacatttcttgatgacccgggtactgaggtacagtcagttgactggcct
 agtcatcaaaagtattcccatctactttgacctatataccgggaagtcatctataaaagtgttaaggacaaga
 ggatataggagtccttgaagtcttagaagattgggatcccggggcagataaagcacigttagatggatcg
 cggcagaataacaacagaatattcctttgggacalcagactagagcccccttttgggggttgagagatc
 caagtcacaggtaactgcgtctcgggggtacaaggagatcacaaagggtgagataggcagatcagggtgtt
 ggtctgacgttaccattcgaatggagatatctatctaccagctgaggctctttggcalcaacagtaacta
 gctgcttgaagcacttgaacttacctacctatltgagcccccttagttgacaaggataaagataggctata
 tltaggggauaggctggggccatgctttcctgttatgacgctactcttggcccatgcatcaactattat
 aactcaggggtatactcttgtgatgtcaatgggcagagaggttaaatatatacctgctgagggtggcac
 tagtgggaaagaattaaacaatgttactagtcgggtcaaaagagttaaagtgttattcaacgggaatcc
 tggctcgacalggattgggualgatgagltgtaggctttgatttgggaatgaattacagaatagctcgata
 ggcttagtccactgtgacatggaggaggagatcataaggatgatcaagttgtactgcatgagcattaca
 gtgtaatccggatcgcttatctgttgggggaltcgagacgttgtgcttataagcaagattgctcccaggct
 gggtcaggatttggaccaggcagctcagcctatatctgagatactgggacgaggttaacctaatagltgtt
 aaaacatctaacctgcttccacagagatgtatctctatcgaggcaccacaaatctgacattatagagg
 acagcaagacagtggttagctagtctctcctcttcttcaaaagaagatagcatcaagatagaaaagtggat
 cttaatagagaaggcaaggctcacgaatgggttactcgggaattgagagaagggaagctcttcatcaggg
 atgcttagaccttaccatcaagcactgcagacgtlttggctttgaaccaaaacttgtataaattgagcagag
 atttctgtccaccatgaacatagctgalacacacaactgcatgtagctttcaacagggttttgaaggga
 tacaatcttcgaatgggctagaataaactgagtcagataaaaggcttaaaactaactggtaagtatgacctg
 tatctgtgagagattcaggcaagttgaagacaatttctagaagacttltgtatcttggatatttctat
 ctatgtccacaagattggtaactgggtcatlccctgaccagaagtttgaagcaagacttcaattgggaat
 aglttcatlcatccgtgaaatcaggaacctgagggttatcacaaaaactttattatacaggtttgag
 gatattatacatagataacgtatagattcctcaccaagaataaagattltgatgaagattltagggg
 cagtcaagatgttcggggccaggcaaaatgaatcacgaccgtgattgatgatggatcactagggtgat
 cgagccatatgacagctcgtataatltagtcctatc

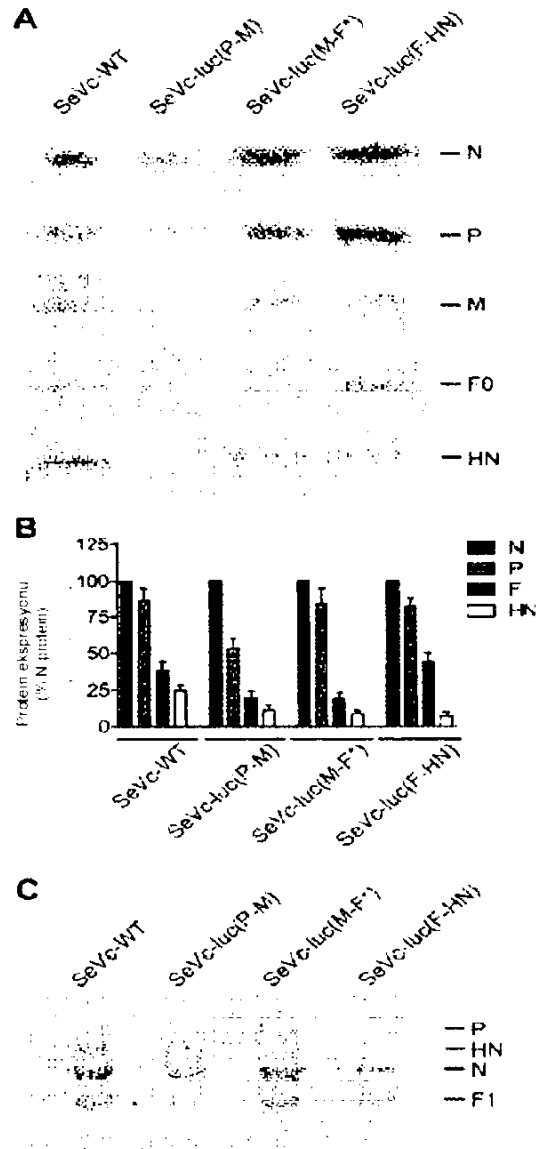
ŞEKİL 7H devamı



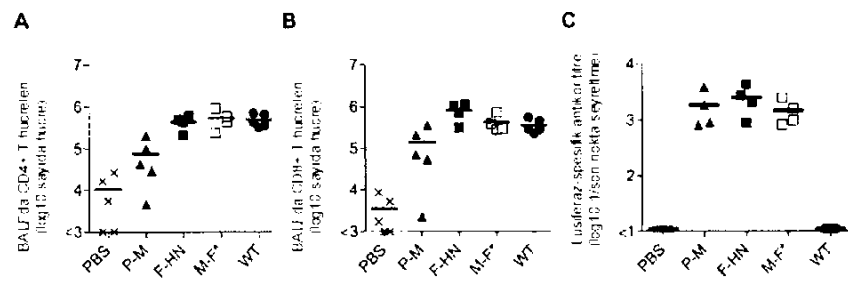
ŞEKİL 8



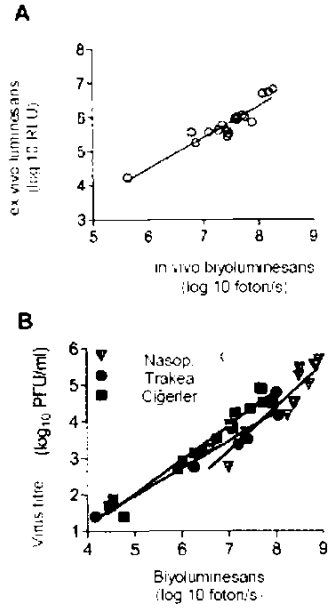
ŞEKİL 9



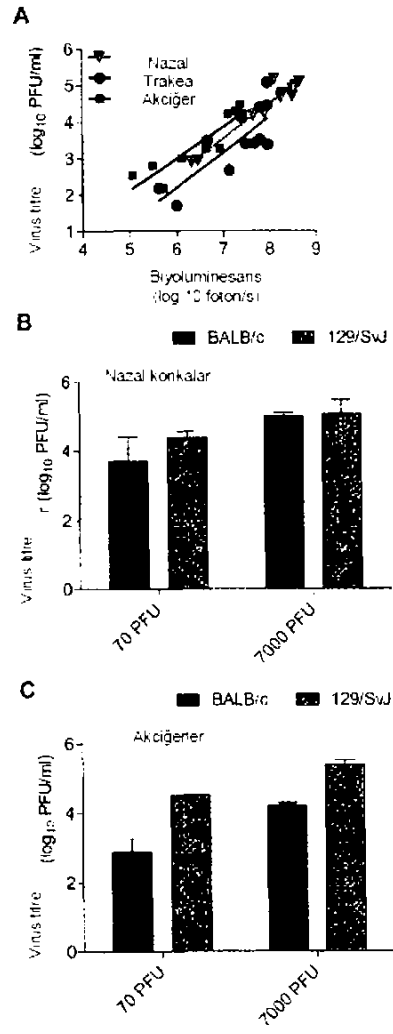
ŞEKİL 10



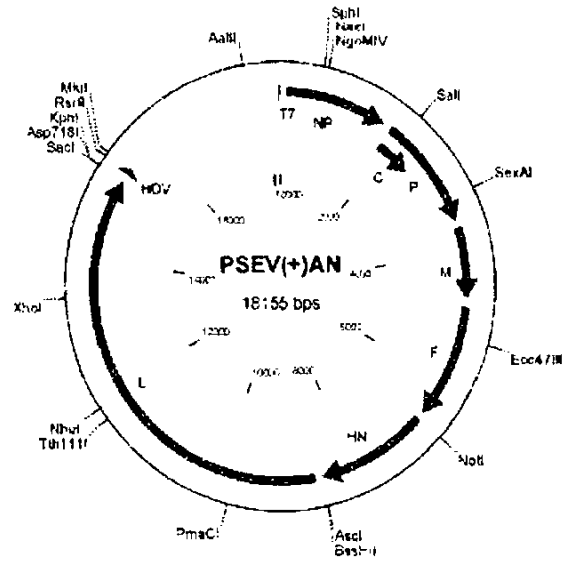
ŞEKİL 11



ŞEKİL 12

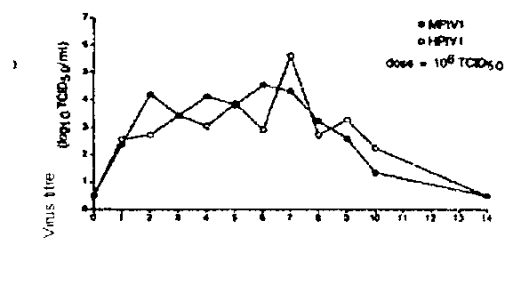


ŞEKİL 13

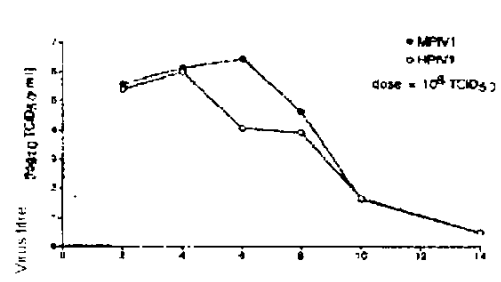


ŞEKİL 15

A
URT

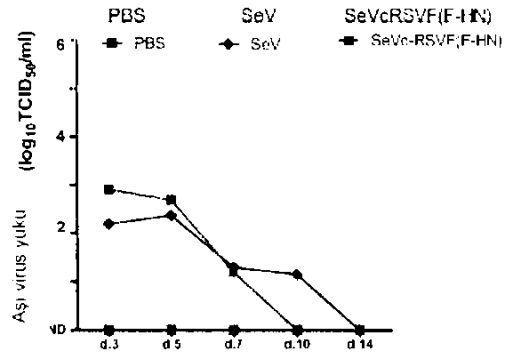


B
LRI

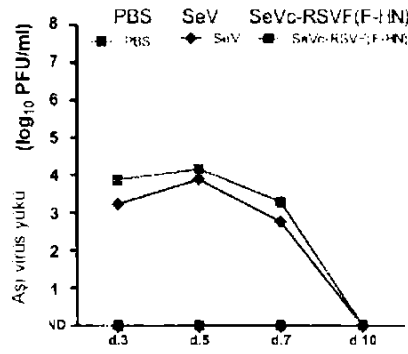


ŞEKİL 16

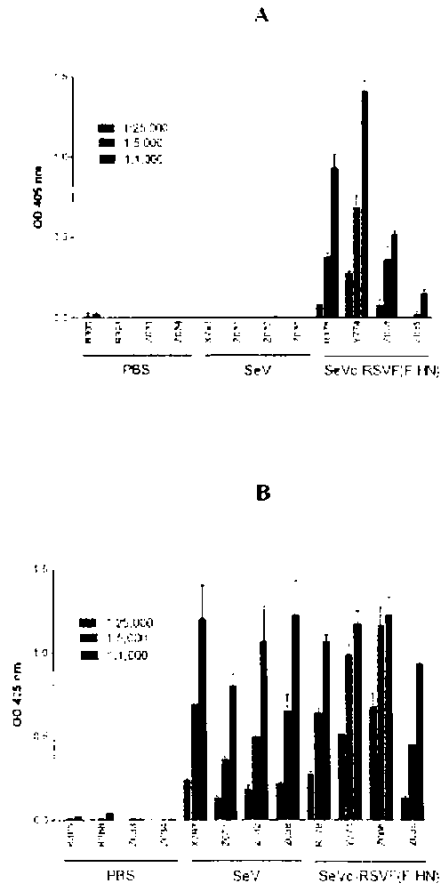
C
URT



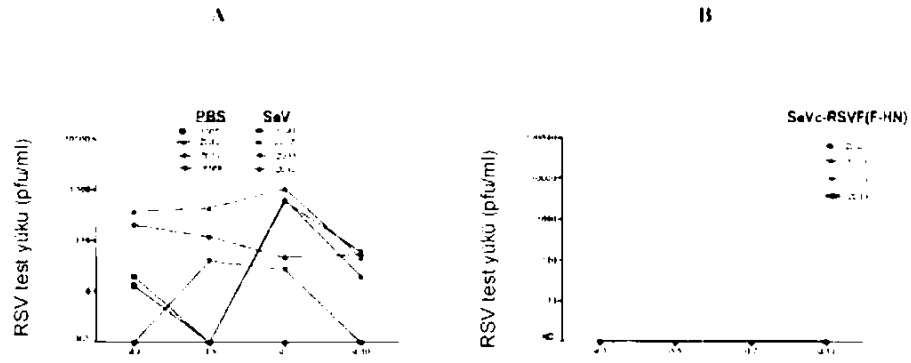
D
URT

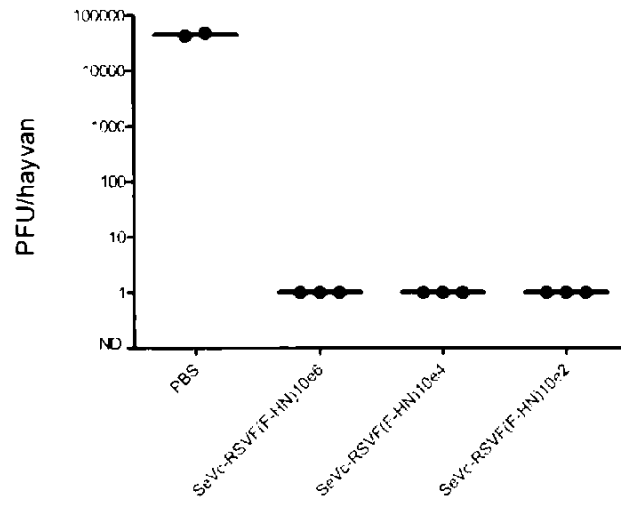


ŞEKİL 16 DEVAMI



ŞEKİL 17





ŞEKİL 19