



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **303645**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 Q 1/37, C 12 N 9/50, 15/38,
C 12 Q 15/57

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19922029	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	22.05.1992	søknadsnummer	
(24) Løpedag	22.05.1992	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	25.11.1992	(30) Prioritet	24.05.1991, US, 705814
(45) Meddelt dato	10.08.1998		07.02.1992, US, 832855

(73) Patenthaver	Arch Development Corp, 1101 E. 58th Str., The University of Chicago, Chicago, IL 60637, US
(72) Oppfinner	Bernard Roizman, Chicago, IL, US
(74) Fullmektig	Fenyong Liu, Chicago, IL, US Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** **Testmetode for å identifisere en forbindelse som er i stand til å inhibere en herpes simplex (HSV) protease og anvendelse av et proteinsubstrat og anvendelse av inhibitor**

(56) **Anførte publikasjoner** DE A1 3800233
J. of virology, 65, 1, jan 1991, s. 206-212
J. of Cellular Biochem. Suppl., part G, vol. O, nr. 15, 1991, s. 138
J. of Virology, 49, 3, mars 1984, s. 947-959
J. of Virology, 64, 2, s. 941-943, febr. 1990
J. of General Virology, 71, 4, 1990, s. 841-850
J. of General Virology, 69, 1988, s. 1531-1574

(57) **Sammendrag**

Den foreliggende oppfinnelse omfatter påvisning og rensning av en herpesprotease og et nukleinsyresegment som koder for to proteiner. Det første proteinet er herpesproteasen som er i stand til å spalte seg selv og også spalte det andre proteinet. Denne protease kreves for sammensetning av herpesviruskapsidet, og er derfor vesentlig for replikasjon. Det andre proteinet er tidligere blitt betegnet som familien av proteiner i virusinfiserte celler, ICP35. Proteasen og dets substrater blir kodet for av overlappende nukleinsyresegmenter. Denne oppfinnelse omfatter også en promotorsekvens for det andre proteinet. Fremgangsmåter beskrives for å fremstille en virusprotease, undersøkelse av en proteasehemmer som kan bli benyttet i et medikament bestemt for behandling av herpessykdommen, fremgangsmåter for å behandle herpes og andre virusinfeksjoner, hvor viruset benytter en protease som i det vesentlige ligner herpesproteasen for kapsidproduksjon. Fremgangsmåter beskrives også for påvisning av herpesinfeksjoner og andre virusinfeksjoner.

Regjeringen har visse rettigheter i den foreliggende oppfinnelse ifølge bevilgninger fra det nasjonale kreftinstitutt (CA47451) og det nasjonale institutt for allergi og infeksjonssykdommer (A1124009 og A11588-11), De Forente Staters offentlige helsetjeneste.

Den foreliggende oppfinnelse omhandler en testmetode for å identifisere en forbindelse som er i stand til å inhibere en herpes simplex (HSV) protease og anvendelse av et proteinsubstrat omfattende minst ett spaltningssete til proteasen for å velge en virusprotease.

Virusinfeksjoner representerer store helseproblemer

Behandling og prevensjon av virusinfeksjoner er en medisinsk hovedmålsetting. For å forstå dagens situasjon med hensyn til å utvikle fremgangsmåter for å behandle og hindre virusinfeksjoner, er det viktig å forstå strukturen og funksjonen til infeksjøs virus. Et virus er et lite genetisk element som inneholder enten enkelt- eller dobbelkjedet DNA eller RNA og kan veksle mellom to bestemte tilstander: intracellulær og ekstracellulær. Et virus er en vanlig intracellulær parasitt som ikke kan formere seg alene. I virkeligheten tar virus over det biosyntetiske apparatet til vertscellen og benytter det for virussyntese. Noen av proteinproduktene av viralt DNA er spesielle enzymer eller hemmende forbindelser som stopper vertscellemetabolismen, men de fleste viruskodede proteinene blir benyttet i konstruksjon av nye virioner (viruspartikler). Virusbestemt proteinsyntese lager nødvendige komponenter for sin replikasjon og pakking, f.eks. kapsidet. Disse komponentene må bli samlet på en bestemt måte avhengig av viruset, og nye partikler må unnsnippe cellen, hvis de skal infisere andre celler.

De generelle trinn for intracellulær virusreplikasjon (lytisk syklus) er:

1. binding av viruset til en vertscelle (absorpsjon);
2. transport av viruset eller dets nukleinsyre inn i vertscellen;
3. replikasjon av virusnukleinsyren;

4. produksjon av virusproteiner og andre vesentlige komponenter;
5. sammensetning av virusnukleinsyre og proteinkomponenter; og
6. frigjøring av modne viruspartikler fra vertscellen.

Totalresultatet av den lytiske syklus er nye viruspartikler og døde vertsceller fordi virus har overtatt vertens vitale krefter. I visse typer infeksjon, slik som forårsakes av herpes, kan det være en latensperiode hvor virus befinner seg i vertscellen.

Undersøkelser av virusgenetiske systemer åpner døren for forskning på mekanismer for virusinfeksjon og replikasjon som ikke bare er av enkel akademisk interesse, men som er rettet mot påvisning, forhindring og behandling av virussykdommer. Vertsmotstand overfor virusinfeksjon kan skje gjennom fravær av et virusreseptorsete som hindrer binding av virus til vertscellen; ødeleggelse av virusnukleinsyrer etter at de er injisert inn i vertscellen, f.eks. ved spalting av virusnukleinsyrer ved hjelp av vertsenzymer; hemming av sentral virusproteinsyntese; eller ødeleggelse av virusproteiner etter at de er dannet i vertscellen.

Utvikling av antivirale legemidler for å supplere naturlig motstand, er et kommersielt hovedmål for å motvirke de ødeleggende virkningene av mange virusinfeksjoner i mennesker. Imidlertid er behandling som er tilgjengelig i dag ikke tilstrekkelige for de fleste typer virus. F.eks. interferoner er cellulære antivirale forbindelser, lavmolekylvekt-proteiner som hindrer virusformering. Imidlertid er interferoner vertsspesifikke, ikke virusspesifikke, og har ingen effekt på vertsceller som allerede er infiserte. De kan også være giftige i høye konsentrasjoner.

Målet for antivirale forbindelser kan være enzymer som er utelukkende spesifiserte av virus, f.eks. et hovedmål for å angripe HIV-infeksjoner som forårsaker AIDS, er enzymet revers-transkriptasen. Hemming av dette enzymet blokkerer på effektiv måte virusreplikasjon. Imidlertid, så utvikles motstand mot disse legemidlene, f.eks. overfor AZT, og er en hovedbegrensning for slik behandling. Anti-herpes simplex-virusforbindelsene som for tiden er på markedet, rettes mot enzymer som syntetiserer virus-DNA (f.eks. acyklovir). Fordi motstand utvikles overfor disse forbindelsene, er det en betydelig interesse for nye mål.

Produksjon av virusproteiner er av spesiell interesse som et stadium hvor virus kan bli angrepet. I den ekstracellulære eller infeksjøs tilstand, består den basale struktur av virus av en nukleinsyrekjerne omgitt av proteiner (nukleokapsid). Noen virus har også en kapsel som er utvendig for nukleokapsidet, og inneholder lipider og proteiner. Proteindelen blir kalt kapsidet. Mange forskjellige proteiner kan utgjøre kapsidet, avhengig av viruset. Noen virus koder for 3-10 proteiner, andre for mer enn 200. Viruspartikler blir kalt virioner; og deres rolle er å beskytte virusnukleinsyren når den blir overført fra cellen som det replikerer i til en ny vertscelle. Etter overføring til vertscellene, begynner virusets intracellulære tilstand, og replikasjonen av viruset blir forsterket. En rekke ikke-herpesvirus synes å uttrykke proteaser med spaltingssetespesifisitet som er potensielle mål for terapeutisk behandling. Imidlertid har ingen slik protease tidligere blitt identifisert for herpesvirus, en spesielt utbredt infeksjøs forbindelse for hvilken behandling og prevensjonsfremgangsmåter er sterkt inadequate.

Herpesfamilien

Familien av herpesvirus omfatter dyrevirus av stor klinisk interesse fordi de er årsakene til mange sykdommer. Epstein-Barr virus er blitt trukket inn i kreftutvikling; cytomegalovirus er den største infeksjøs trussel overfor AIDS-pasienter; og varicella zoster virus, er av stor bekymring i visse deler av verden hvor vannkopper og helvetesild er alvorlige helseproblemer. En verdensomfattende økning i hyppigheten av seksuelt overført herpes simplex-(HSV)-infeksjon har funnet sted i de siste 10 år, etterfulgt av en økning i nyfødtherpes. Kontakt med aktive sårlesjoner eller asymptomatiske pasienters sekret kan resultere i overføring av den infeksjøs forbindelsen. Overføring skjer ved kontakt med virus på slimhinneoverflater og ødelagt hud, hvilket tillater overføring av virus og start av virusreplikasjon i celler i hud og underhud. I tillegg til kliniske synlige sår, kan latente infeksjoner eksistere, spesielt i nerveceller. Forskjellige

stimuleringer kan forårsake reaktivering av HSV-infeksjonen. Derfor er det en vanskelig infeksjon å fjerne. Dette problem har stort sett vært mindre påaktet p.g.a. utilstrekkelighet i behandlingstilbudene.

Herpes simplex virus subtyper 1 og 2 (HSV-1, HSV-2), er herpesvirus som er blant de mest kjente infeksiose forbindelser overfor mennesker (Corey og Spear, 1986; Whitley, 1990). Disse virus forårsaker en lang rekke sykdommer som varierer fra relativt ubetydelige og bagatellmessige infeksjoner slik som tilbakevendende herpes simplex labialis, til alvorlige og livstruende sykdommer slik som herpes simplex encefalitt (HSE) i eldre barn og voksne, eller de generelle infeksjoner i nyfødte. Klinisk resultat av herpesinfeksjoner avhenger av tidlig diagnose og rask igangsetting av antivirusterapi. Imidlertid, til tross for noen vellykkede behandlinger, gjenoppstår sår i underhud og hud, og HSV-infeksjoner i nyfødte og infeksjoner i hjernen blir forbundet med høy sykkelighet og dødelighet. Tidligere diagnose enn det som er mulig idag ville forbedre den behandlingsmessige suksess. I tillegg er det et desperat behov for forbedrede behandlinger.

Utvendig assistanse er blitt gitt for å infisere celler, spesielt i form av kjemiske forbindelser. F.eks., kjemisk inhibering av herpesvirusreplikasjon er blitt utført ved hjelp av en rekke nukleosidanaloger slik som 5-fluordeoksyuridin (FUDR), 5-jododeoksyuridin, 5-jododeoksyuridin, tymin-arabinosid og lignende.

En viss beskyttelse er blitt gitt i eksperimentelle dyremodeller ved hjelp av polyspesifikke eller monospesifikke anti-HSV-antistoffer, HSV-behandlede lymfocytter, og klonede T-celler overfor spesifikke virusantigener (Corey og Spear, 1986). Imidlertid har ingen tilfredsstillende behandling blitt funnet.

Proteaser har ikke blitt påvist i herpesvirus, men det er en viss kunnskap når det gjelder biologien til herpesvirus-familien. Herpesvirus er dobbeltkjedet DNA-virus som replikerer i vertscellekjerner. Herpesvirionet består av over 30 forskjellige proteiner som er satt sammen inne i vert-cellen. Omtrent 6-8 blir benyttet i kapsidet. De foretrukne vertsceller for herpesvirus er vertebratceller.

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) genomet koder for mange kapsidproteinkomplekser som i denaturerende geler lager mange bånd på grunn av de forskjellige molekylvekter i protein-komponentene. Noen foreløpig identifikasjon av disse proteiner er blitt rapportert. Et sett herpes simplex virus 1 (HSV-1) kapsidproteiner ble beskrevet av Gibson og Roizman (1972, 1974). En genetisk og immunologisk beslektet familie av viruskapsidproteiner som identifiseres ved hjelp av deres bånd i denaturerende geler, er blitt betegnet infiserte celle-proteiner 35 (ICP35). (Braun et al., 1983, 1984). Minst fire hoved- og en rekke mindre bånd i en-dimensjonal denaturerende polyakrylamidgeler er blitt beskrevet, og adskillige områder i todimensjonale geler er blitt beskrevet.

Braun et al. (1984) som brukte en rekke monoklonale antistoffer vist som eksempel ved H745, fortalte at ICP35-proteiner blir behandlet post-translasjonelt til minst 6 former (ICP35a,b,c, d,e,f) som adskilte seg med hensyn til elektroforetisk vandring på SDS-polyakrylamidgeler. Skjønt de ble karakterisert ved hjelp av forskjellige molekylvekter, påvises denne gruppe viruspolypeptider ved hjelp av de samme monoklonale antistoffene og blir kodet for av en region i HSV-1-genomet. Tomme kapsider inneholder ikke disse polypeptidene. Et sett proteiner som muligens er analoge til ICP35 ble omtalt av Preston et al. (1983).

Nukleotidsekvensering er blitt utført på HSV-1-genomet, og forsøk, vanligvis ikke-vellykkede, ble gjort for å korrelere forskjellige kapsidproteiner til sekvenser i genomet. F.eks. foreslås det at ICP36 proteiner blir kodet for av den åpne lese-ramme som betegnes U_L26 (McGeoch et al., 1988). I den foreliggende oppfinnelse vises det at dette postulat ikke var riktig eller i det minste ufullstendig. Grov kartlegging av regionen som kodes for av ICP35 ble forsøkt av Braun et al. (1984) på basis av analysen av HSV-1 x HSV-2 intertypiske rekombinanter. Disse forfatterne foreslo at ICP35 blir kodet for av en region som er lokalisert mellom genene for tymidinkinase (U_L23) og glykoprotein B (U_L27). Dette er ikke en meget presis antagelse fordi det dekker et område som nå er kjent å omfatte fire gener.

Den foreliggende oppfinnelse var et resultat av vellykket forskning for et nytt terapeutisk virusmål. Forskningen begynte

ved tilfeldig valg av HSV-1 ICP35-proteinfamilien som et substrat. Et proteasemål for antiviruskjemoterapi, spesielt, slik det relaterer til herpesvirusinfeksjoner, ble identifisert på denne måten. Fremgangsmåter for å lage og påvise protease, fremgangsmåter for å velge inhibitorer av proteasen, så vel som påvisning og behandlingsbeskrivelser basert på hemming av proteasen, er også deler av beskrivelsen. Funnet som viste likheten mellom genet for herpesproteasen i HSV-1 og den i human cytomegalo-virus antyder at den foreliggende oppfinnelse er anvendbar i bredt omfang overfor alle herpesvirus, inklusive HSV, CMV, EBV og VZV.

Oppfinnelsen beskriver en testmetode for å indentifisere en forbindelse som er i stand til å inhibere en herpes simplex virus (HSV) protease, og som er karakterisert ved at den omfatter:

- (a) tilveiebringning av nevnte rensete HSV protease som er kodet for av i det minste områdene II og III av U_L26 genet;
- (b) tilsetning til nevnte protease av et proteinsubstrat inneholdende spaltningssete til nevnte protease under betingelser egnet for proteolytisk spaltning av nevnte substrat;
- (c) tilsetning til nevnte protease av en kandidatinhibitorforbindelse, og
- (d) bestemme hvorvidt nevnte proteinsubstrat har blitt spaltet.

Proteasen i den foreliggende oppfinnelse kan videre bli definert som serinproteaser med de forventede egenskapene som denne katagori proteaser har. En serinprotease er et enzym som katalyserer hydrolyse av peptidbindinger, og som typisk har en serinrest i det aktive sete. (White, Handler og Smith, 1973). Serinproteaser omfatter også typisk et system av en triade av katalytiske rester, som er til en viss grad fjernet fra hverandre i det lineære arrangement av aminosyrer, men som bringes sammen som en "proteolytisk spalte" i den riktige foldede proteasen. Ulike forskjeller er blitt observert i denne katalytiske triade fra protease til protease. F.eks. i både trypsin- og subtilisin-serinproteaser, Asp, His og Ser er aminosyrene i den katalytiske triade. Imidlertid blir de i trypsinlignende serinproteaser arrangert som His, Asp, Ser, mens i subtilisinlignende proteaser er de arrangert som Asp, His, Ser. Det er også forskjeller i den

relative fordeling av disse nøkkelrestene. I tillegg er det andre evolusjonsmessige konserverte egenskaper til disse proteasene som tillater dem å bli identifisert som serinproteaser og klassifisert deretter. Tilstedeværelsen av de katalytisk viktige Asp-, His- og Ser-restene er imidlertid de endelige testene for medlemskap og klassifisering i serinproteasegruppen.

Proteasene ifølge metoden i den foreliggende oppfinnelse synes å være vesentlig for utviklingen av kapsidet i viruset. Derfor vil hemming av proteasevirkningen føre til avbryting av den lytiske syklus i viruset. Det er klart at slike proteaser er optimale mål for antivirusbehandling. Spesielt er målet nyttig for angrep på herpesviruset overfor hvilken ingen protease har hittil blitt beskrevet.

Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse er anvendelse av et proteinsubstrat omfattende minst et spaltningssete til proteasen ifølge krav 1, for å velge en virusprotease.

Som en illustrerende utførelsesform, har en protease blitt rensset fra HSV-1, en subtype av herpes simplex viruset. Den tilsynelatende molekylvekt for denne protease som bestemt av SDS-polyakrylamid PAGE-gelelektroforese er omtrent 75-85 kd, vanligvis omtrent 80 kd. Herpesproteasen blir videre karakterisert ved å ha en aminosyresekvens på omtrent 450-635 aminosyrer. Imidlertid er disse områdene varierende. F.eks., den 635 aminosyresekvensen kan ha minst 329 aminosyrer fjernet fra dens karboksylende og fremdeles vedlikeholde sin serinproteaseaktivitet. I den 635 aminosyreutførelsesformen er proteasespaltningssetet lokalisert i posisjon omtrent 18-25 aminosyrer fra karboksylenden, fortrinnsvis omtrent 20 aminosyrer fra karboksylenden. Proteasene blir oppnådd enten fra celler injisert med HSV-1 og 2, celletransfektet med en DNA-sekvens som koder for proteasen, eller i rensset form ved å bli syntetisert in vitro eller i cellefrie systemer, ved bruk av retikulocytlysat, f.eks. fra en kanin. Etter syntese av proteinet, vil proteinet vandre som et enkelt bånd på en denaturerende gel og blir lett påvist med ³⁵S-merket metionin. Etter omtrent 5 timers proteinsyntese, vil to bånd komme tilsyne. Som vist i etterfølgende deler, er det andre båndet et selvspaltnings-produkt av det første.

Egenskapene til denne protease omfatter: (i) det inneholder fire områder, flere av disse er ikke nødvendige for dets katalytiske aktivitet og (ii) det aktive sete er nær aminotermus til proteasen. Mutasjoner som omfatter aminosyresubstitusjoner (erstatninger), fjernelser, innsetting av stoppkodon eller av 20 aminosyreområder i proteasen, har avgrenset de unødvendige områder nr. I og nr. IV ved amino- og karboksylområdene i genet. Det vesentlige karboksylnære område i nr. III kan adskilles fra det vesentlige aminonære område i nr. II ved minst 20 aminosyrer, og proteasen vil forbli funksjonell.

Det aminosyrenære område er det mest konserverte område blant varicella zoster virus- og human cytomegalo-virushomologer av U_L26. Av de konserverte aspartat-, histidin- eller serin- aminosyrekodonene som ble undersøkt i dette område, kunne bare histidinrestene 61 og 148 ikke bli erstattet uten å redusere den proteolytiske aktiviteten til proteasen. Tredimensjonale krystallstrukturanalyser kan gi videre innsyn i strukturen til de aktive setene (Skalka, 1989).

Som en illustrerende utførelsesform, har utstrakt endring av nukleinsyresekvensene innenfor HSV-1-genomet avslørt hemmelighetene til virusmekanismene og tillatt isolering og opprensing av anvendbare nukleinsyresegmenter og deres kodede produkter. Eksempler på slik forskning omfatter innsetting av utvalgte segmenter av nukleinsyresekvensen med passende promotorer og markører inn i plasmider for å bestemme virkningene og samvirke til de genetiske områdene, deres ekspresjonsprodukter, og kontrollmekanismene for deres aktivering.

En annen del som beskrives er det kodende område innen nukleinsyresegmentet for familien av herpes simplex virus 1 kapsidproteiner som er betegnet ICP35. Dette nylig definerte kodende område er blitt betegnet U_L26,5. I en illustrerende utførelsesform av den kodende sekvensen for ICP35-proteiner, har segmentet blitt avgrenset ved hjelp av restriksjonsendonuklease-spaltningsseter Hpa-I og Pst-I. Disse to spaltningssetene er lokalisert i kartposisjonene +832 og +2761. Disse kartstedene defineres som avstander fra transkripsjonsstartstedet til den U_L26 åpne leseramme i HSV-1-genomet. Dette sted er blitt betegnet +1.

Genet som koder for ICP35-proteinene består også av de sekvensene som er nedstrøms fra KpnI-setet som er i kartposisjon +2104, og fortsetter hele veien til et poly A-sete i posisjon +2138.

Nukleinsyresegmentene defineres videre som overlappende åpne leserammer for proteasen og ICP35-proteinene (Fig. 2). Disse overlappende segmenter er "3'ko-terminale". Det første segmentet, det lengste av de to, koder for et første protein. Dette første protein har en molekylvekt på omtrent 75-85 kd. Den andre åpne leseramme, den minste av de to overlappende åpne leseramme-sekvensene, koder for et annet protein som har en tilsynelatende omtrent molekylstørrelse på 40-55 kd som bestemt ved hjelp av SDS-polyakrylamidgelelektroforese, fortrinnsvis 45 kd. Det første proteinet defineres til å kode for et proteolytisk molekyl som er i stand til å spalte en aminosyresekvens ifølge virkningen til serinprotease. Substratet som er i stand til å spaltes kan enten være proteasesekvensen selv som er kodet for av U_L26-genet, eller ICP35 forløperproteinene, som tidligere er blitt betegnet ICD35 c, d basert på vandring i en- eller todimensjonale geler. Innsetting av en 20 aminosyreepitop utelukker ikke spaltning.

Et nukleinsyresegment, enten DNA eller RNA, som koder for det andre proteinet omfatter omtrent 990 basepar i en HSV-1-utførelsesform. I visse anvendelser er det nødvendig at segmentet som kodes for omfatter bare sekvensene som vil gi ICP35 e og f ved spaltning. I andre bruksområder, kan det ønskes at bare spaltingsstedet per se skal kodes for, f.eks. i kandidatinhibitormetoden beskrevet etterpå. I en eksempelvis utførelsesform, omfattes nukleinsyresegmentet av de deler som hovedsakelig er vist i Fig. 1 a, linje 5, i den foreliggende spesifikasjon, eller dens funksjonelle likeverdige del.

Som brukt her, refererer funksjonelle ekvivalenter (deler) til de enzymene, og deres kodende nukleinsyre-sekvenser, til visse strukturelle forandringer som er blitt gjort, men som ikke desto mindre er, eller koder for, katalytiske aktive proteaser som er i stand til å spalte ICP35. Det er vanligvis kjent i feltet at forandringer og/eller endringer kan gjøres i strukturen til proteiner og at det fremdeles oppnås et molekyl som har lignende eller på annen måte ønskelige egenskaper. Således kan visse

aminosyrer bli erstattet for av andre aminosyrer i en proteinstruktur uten nevneverdig tap av reaktiv bindingsevne som, f.eks., overfor substratmolekyler eller spesifikke antistoffer. Siden det er reaksjonsevnen eller utgangspunktet for et protein som definerer proteinets biologiske funksjonelle aktivitet, kan visse aminosyresekvenserstatninger bli gjort i en proteinsekvens (eller, selvfølgelig, dens bakenforliggende DNA-kodende sekvens) og ikke desto mindre oppnå et protein med likeverdige egenskaper. Det vurderes således av oppfinnerne at forskjellige endringer kan bli gjort i herpesprotease-DNA eller proteinsekvensene uten nevneverdig tap av deres biologisk nytte eller aktivitet.

Når slike forandringer gjøres, kan hydropatiindeksen til aminosyrene bli vurdert. Viktigheten av hydropatiamino-syreindeksen, dvs. hydrofobisitet og ladningsegenskaper, når det gjelder å overføre interaktiv biologisk funksjon til et protein, er vanligvis forstått i feltet (Kyte et al., 1982). F.eks., det er kjent at visse aminosyrer kan bli erstattet for andre aminosyrer som har en sammenlignbar hydropatisk indeks eller ladning, dvs. generell ± 1 , og som fremdeles beholder en lignende biologisk aktivitet. Den relative hydropatiskarakter til aminosyren menes å bestemme den sekundære strukturen til det resulterende proteinet, som til gjengjeld definerer reaksjonen til proteinet med substratmolekyler. Således foreslås det f.eks. at isoleucin, som har en hydropatiindeks på +4,5, kan erstattes med valin (+4,2) eller leucin (+3,8), og fremdeles ha et protein med lignende biologisk aktivitet. Alternativt, ved den andre enden av skalaen, antas det at lysin (-3,9) kan erstattes med arginin (-4,5), og så videre.

Aminosyreerstatninger er derfor vanligvis basert på den relative likhet til sidekjedegruppene, f.eks., størrelse, elektrofil karakter, ladning og lignende. Eksempler på substitusjoner som vurderer noen av de foregående egenskapene er vel kjente for dem som er erfarne i feltet og omfatter f.eks.: alanin, glycin og serin; arginin og lysin; glutamat og aspartat; serin og treonin; og valin, leucin og isoleucin.

Nukleinsyresekvensene er også anvendbare som hybridiseringsprober, som vil ha en rekke anvendelsesområder. Hybridiserings-

prober kan bli benyttet f.eks. til å velge ut muterte genkloner fra bibliotek, i å lage antisensmolekyler (f.eks. stabilisert antisens RNA-molekyler), som PCR-primere og prober, for å nevne noen få av mange bruksområder som omfatter hybridisering anvendt på (eller i tillegg til) proteinkodende evne. Selvfølgelig kan anvendbare hybridiseringsprober bli laget i omtrent enhver lengde, avhengig av den ønskede bruk og hybridiseringsbetingelser. F.eks. forventes prober så små som 10 til 14 nukleotider i lengde ikke desto mindre å lage et stabilt hybrid med et templatmolekyl, så lenge hybridiseringsbetingelsene er passende for graden av sekvenshomologi mellom proben og templatet. På samme måte, molekyler som varierer i lengde opp til det som er tilstrekkelig for å kode for et gen, eller endog multiple gener, kan benyttes som hybridiseringsprober.

I ethvert tilfelle kan nukleinsyremolekyler som er nyttige som hybridiseringsprober eller primere, variere i størrelse fra f.eks. 10-14 til 20, 30, 40 eller 50 eller så nukleotider, opp til 100, 200, 500 eller endog 1000 eller 2000 nukleotider i lengde foretrekkes, avhengig av den planlagte bruk og hybridiseringsbetingelsene.

Således kan nukleinsyresegmenter omfatte en sekvens som enten er større eller lengre enn de som er vist i Fig. 1, f.eks., kan det svare til en omtrent 14 nukleotidbaseparlang region som er i stand til å hybridisere til nukleinsyresegmentene i Fig. 1 under stringente betingelser. Små segmenter slik som de som er benyttet som prober for å påvise tilstedeværelsen av den proteasekodende regionen.

Et nukleinsyresegment kan også være en mRNA-sekvens for proteasen eller ICP35-proteinene. mRNA for den sistnevnte blir transkribert ved omtrent nukleotidposisjon +1000 (en konstruert distanse fra herpes U_L26-transkripsjonsstartsetet som blir betegnet +1) til posisjon +2138. Et mRNA blir translatert fra metioninstarttkodon som er lokalisert ved +1099. Mindre eller større segmenter blir også vurdert avhengig av bruken til det benyttede segmentet. Disse mRNA-segmentene er anvendbare til å syntetisere ICP35-spaltningsssetet.

Forskjellige nukleinsyresegmenter i herpesgenomet er blitt

isolert og klonet. Et nukleinsyresegment som koder for en herpesprotease kan oppnås fra herpesgenomet fra en region som korresponderer til kartlokaliseringene i den U_L26 herpesåpne leseramme. Et mindre segment innenfor det proteasekodende segmentet ligger mellom tymidinkinasegenet og glykoprotein gB-genet og omfatter en DNA-sekvens fra posisjon +832 til +2138. Denne kodende sekvens kan ikke bare bli uttrykt som ICP35-herpeskapsid familieproteiner, men omfatter en promotorsekvens for å regulere den ICP35-kodende sekvensen.

ICP35-promotoren er blitt isolert og vist å være en ytterst aktiv promotor, som bevist ved observasjonen at økte antall kopier av substratet blir laget av ICP35-kodende enhet sammenlignet med produksjonen av proteasen fra den lengre U_L26 åpne leserammen. Den omfatter mellom 135 og 168 basepar og ligger mellom posisjon +832 og +1000 i den første åpne leseramme til U_L26. Denne promotor-region er i stand til å starte produksjon av ICP35-proteinene. Den er også nyttig i å øke produksjon i øket hastighet i andre nukleinsyresekvenser, f.eks. herpes simplex genene U_S5 og U_L10.

Isolering og håndtering av den kodende sekvensen til ICP35-proteinene var viktige fordi disse proteinene benyttes i konstruksjon av herpesviruskapsidet. For å bli funksjonelle medlemmer av kapsidet, må ICP35-proteinforløperen ICP35 c, d, bli spaltet av herpesproteasen som blir laget fra den U_L26 kodende sekvensen, for å gi e og f. Denne protease er i stand til å klyve effektivt forstadieproteinene selv om begge genene som koder for proteasen og forstadiet er i en transposisjon.

Nukleinsyresegmentene som har kodende sekvenser kan bli ført videre i en rekombinant ekspresjonsvektor som er i stand til å produsere de kodede virusserinproteasene. Eksempler på slike nukleinsyresegmenter er de som er vist for herpesvirus, HSV-1 i Fig. 1A betegnet som A-Z, AA-NN i den foreliggende spesifiseringen. Disse nukleinsyresegmentene eller deres funksjonelle likeverdige forbindelser kan bli operativt bundet, valgfritt, til utvalgte promotor- og/eller kontrollerelementer, så vel som til andre elementer slik som et terminerings- (avslutnings-) sete, et poly-A-sete og til andre elementer, etter behov (se f.eks. plasmidene A-Z, AA-NN). Disse komponentene kan omfatte promotorer

slik som de som er i stand til å kontrollere herpes $\alpha 4$, ICP35-genene eller praktisk talt enhver annen promotor som er i stand til å styre ekspresjon i den utvalgte vertscellen. De rekombinante ekspresjonsvektorene kan omfatte en promotor av enten eukaryot eller prokaryot type, og kan omfatte et polyadenyleringssignal i posisjon 3' for karboksylterminal-aminosyren. Promotoren kan være innenfor transkripsjons-enheten i det kodete proteinet. Vektorer kan også omfatte markører som er blitt benyttet for analysen vist her. Eksempler på vertsceller er BHK-celler, Vero, E. coli eller andre eukaryote eller prokaryote celler kjent av dem som er erfarne i feltet for å tillate ekspresjon av overførte vektorer.

Det beskrives videre fremgangsmåter for å lage en herpes-protease. En utførelsesform av slike fremgangsmåter omfatter de følgende trinn:

- (1) Konstruksjon av et nukleinsyresegment som koder for herpes-proteasen; og
- (2) utvikle segmentet slik at det blir uttrykt for å lage proteinet.

Som en illustrerende utførelsesform omfatter fremgangsmåten for å lage en protease, bruk av en vertscelle som har fått overført nukleinsyresegmentet. Vertscellen blir dyrket under betingelser som er passende for ekspresjon, og proteinet blir derved produsert. Fremgangsmåten omfatter også et trinn hvor proteinet blir isolert og renses ved fremgangsmåter vel kjent for de som er dyktige i feltet. Graden av rensing som kreves vil avhenge av den planlagte bruk av proteinet. Alternativt kan nukleinsyresegmentet bli uttrykt i et cellefritt system slik som et kaninretikulocyttlysatsat, eller syntetisert ved hjelp av en automatisk proteinsyntesemaskin som referanse omtalt her.

Et nukleinsyresegment som koder for herpesproteasen eller for ICP35-proteinene kan lages ved å oppnå virusgenomisk DNA fra celler som er blitt infisert med herpes, forsterkning av den nukleinsyresekvensregionen som inneholder det proteolytiske sete av interesse, og lagring av rekombinante kloner som omfatter slike opp-produserte nukleinsyresekvenser. Klonene kan så velges slik at de inneholder de ønskede forsterkede nukleinsyresegmentene ved

å benytte monoklonale antistoffer som er rettet mot minst regionen som koder for det proteolytiske område i protease eller spaltningssetet i ICP35-proteinet for å undersøke slike kloner. Andre klonings og klonings-undersøkende fremgangsmåter vel kjent til de som er dyktige i feltet er også passende (Sambrook et al., 1989).

Denne oppfinnelse omhandler også en anvendelse for å spalte et herpesmolekyl som omfatter å behandle molekylet med proteasen under betingelser som muliggjør spaltning. Slike betingelser er de hvor serinproteaser vanligvis er aktive.

I en eksemplifisert utførelsesform, består fremgangsmåter for å påvise herpesproteasen i vev i å lage antistoffer rettet mot proteasen, merking av disse antistoffene, å reagere vevsprøvene med det merkede antistoffet, og påvisning av det merkede antistoffproteinheterokonjugat ved standard fremgangsmåter vel kjente for de erfarne i feltet. Disse markørene kan være fluorescerende markører eller radioaktive markører.

En fremgangsmåte for å påvise nukleinsyresegmentene i biologiske prøver er å lage en nukleotidprobe som er i stand til å hybridisere til et nukleinsyresegment som i det vesentlige er slik som vist i Fig. 1, enten linje 5 eller 6, eller som beskrevet i andre områder av spesifikasjonen her som koder for en herpesprotease eller ICP35-proteinene. Nukleotidproben kan være merket. Proben blir så inkubert med den biologiske prøven som skal undersøkes, under selektive betingelser som passer for dannelsen av de spesifikke hybridene. De spesifikke hybridene som er dannet mellom probene og nukleinsyrene i den biologiske prøven blir så påvist ved hjelp av en rekke undersøkelsesmåter som er vel kjente for dem som er erfarne i feltet, f.eks., ved å påvise en radioaktiv markør på proben. Dannelsen av slike hybrider viser tilstedeværelsen av nukleinsyresegmentet som først var søkt etter.

Fremgangsmåte for å behandle virusinfeksjoner gjør bruk av målproteaser beskrevet her som er vitale for virusets livssyklus. Eksempel på en slik fremgangsmåte er karakterisert av å lage en effektiv mengde av en inhibitor av proteasen. Mengden vil avhenge av behandlingsmåten. Denne kan være i form av hudkremer, oljer eller spray som benyttes direkte på huden, eller intravenøs injeksjon for systeminfeksjoner. Hemmeren vurderes å bli kombinert

med en farmasøytisk akseptert bærer som ville være passende for bruk i mennesker avhengig av tilførselsmåten. Endelig blir en terapeutisk mengde av inhibitoren bestemt slik at herpesviruset selv blir hemmet i å formere seg, men vertscellene blir ikke ødelagt. Fremgangsmåten for behandling beskrevet her er spesielt nyttig overfor herpes virus simplex subtypene 1 eller 2, men vil generelt være anvendbare overfor herpesfamilien, disse medlemmene er kjent for å ha uttalte DNA-homologier. På grunn av sterk sekvenshomologi til HSV-1 U_L26 i andre organismer, f.eks. cytomegalovirus (U_L80), varicella zoster virus (ORF33), Epstein-Barr virus, er disse behandlingsstrategiene sann-synligvis vidt anvendbare overfor alle herpesvirus.

Denne hemming kan enten skje på nivå av transkripsjon, translasjon eller proteinvirkning. Påvirkning av transkripsjonen nødvendiggjør forstyrrelse av mRNA-dannelse på et DNA-templat. Forstyrrelse av translasjon ville nødvendiggjøre hemming av syntesene av proteiner på mRNA-templatet. Alternativt kan virkningen til proteasen selv avbrytes enten ved å ødelegge strukturen til proteasen, spesielt dens proteolytiske område, forandring av spaltningsstedet til dets substrat, eller ved å gi et falskt substrat som inaktiverer proteasen. En annen form for inhibitor omfatter et nukleinsyresegment som er i stand til å hybridisere med den kodende sekvensen til en herpesprotease, men danner et hybrid som hemmer transkripsjon av mRNA fra hvilken proteasen ville translateres.

Flere hemmere synes å være passende for oppfinnelsens formål. Det er påvist at chymostatin og diisopropylfluorfosfat gir 100% hemming av proteasen i en in vitro-metode. Fenylmetansulfonylfluorid gir minst 50% hemming, denne reduksjon skyldes ustabiliteten til inhibitoren over tid. Resultatene av slike studier med en rekke proteasehemmere viste at U_L26-proteasen ble hemmet av serinproteasehemmere, men ikke av cystein, aspartat eller metalloproteasehemmere. Andre vurderte hemmere omfatter antipain, aprotinin, leupeptin, (4-amino-fenyl)-metansulfonylfluorid, og enhver annen serinproteasehemmer som gir positivt resultat i kandidat undersøkelsesmetoden ifølge foreliggende oppfinnelse. I spesielle utførelsesformer blir ikke-giftige forbindelser av hemmerne beskrevet her, også vurdert.

For å finne frem til andre hemmere blir kandidatforbindelsene undersøkt ved å lage en virusprotease, blande proteasen med den mulige inhibitorforbindelsen, og velge et substrat som er i stand til å bli klyvet av proteasen. Metoden blir utført ved å reagere substratet med protease-kandidatforbindelseskombinasjonen, og bestemme hvorvidt kandidatforbindelsen har hemmet virkningen av proteasen på substratet. I en illustrerende utførelsesform er virusproteasen som er benyttet for å undersøke en kandidatforbindelse den rensede herpesproteasen som er syntetisert in vitro i et kaninretikulocyttlysats ved hjelp av beskrevne fremgangsmåter.

Proteasen blir kombinert med den hemmende kandidatforbindelsen enten i en laboratorie in vitro-metode eller i en testorganisme. Substratet som velges er i stand til å bli klyvet av proteasen, og kan være proteasen selv, eller minst spaltningsstedet til ICP35-proteinforstadiet c, d. Etter å reagere substratet med en protease og den hemmende kandidatforbindelsen, kan det bestemmes hvorvidt forbindelsen har hemmet virkningen til proteasen på substratet ved å bestemme hvor spalting av substratet har funnet sted. I en utførelsesform kan dette bestemmes ved å undersøke hvis ICP35 c-, d-proteinene har laget ICP35-subenheterne e og f som bestemt på SDS-gelelektroforese, som bare blir laget ved spalting av c, d av proteasen. Hvis proteinene ikke er blitt spaltet, er konklusjonen at kandidatforbindelsen faktisk hemmer virusproteasen. Denne hemmer (inhibitor) kan så bli benyttet i behandlingsmessige forsøk.

Virusproteasen som benyttet i testingen av den hemmende kandidatforbindelse kan lages ved hjelp av genteknologi, hvor, f.eks. en ekspresjonsvektor omfatter minst den proteolytiske delen av proteasen. Ekspresjonsvektoren blir så overført til en passende vertscelle under betingelser som tillater ekspresjon av den kodende sekvensen. Etter at sekvensen er uttrykt i form av en protease eller proteasesegment, kan proteasen bli isolert fra cellen og renses videre hvis ønskelig, ved hjelp av fremgangsmåter som er vel kjente for fagmannen.

En alternativ fremgangsmåte for å lage herpesproteasen er å oppnå en prøve som inneholder proteasen, f.eks. en herpesinfisert

vevsbit eller infeksjonsvæske. Prøven blir så homogenisert og analysert for å oppnå en proteasefraksjon. Proteasefraksjonen kan så bli videre isolert og rensset ved hjelp av fremgangsmåter kjent for fagmannen avhengig av den spesielle anvendelse.

Denne oppfinnelse omhandler også en anvendelse for å velge en virusprotease med funksjoner som ligner de beskrevet her i forskjellige arter av herpes eller ikke-herpesvirus eller, faktisk, enhver organisme. For å velge proteasen, blir en aminosyresekvens som omfatter minst spaltningsstedet til proteasen, som beskrevet i den foreliggende spesifikasjon, laget. Kandidaten for virusprotease blir så reagert med spaltningsstedet som inneholder aminosyresekvensen som er følsom for spaltning av en virusserinprotease. Endelig blir en beslutning tatt hvorvidt en spaltning har funnet sted ved bruk av ICP35-substratet og bestemmelse hvorvidt ICP35 c, d er blitt endret til e og f. Ved hjelp av disse fremgangsmåter er det vist at HSV-2-proteasen er i stand til å spalte ICP35 c, d til e og f.

Den foreliggende oppfinnelse har gjort det mulig å identifisere vesentlige serinproteaser fra andre arter. Fremgangsmåtene er generelt anvendbare, kun kilden for genom vil endres. Det forventes at disse serinproteasene blir kodet for av konservative segmenter og at de finnes over alt. For herpesvirus er fire av de seks virus-DNA-sekvensene (HSV-1, EBV, VZV, CMV) rapportert innførte i en database som er tilgjengelig for fagmannen. Homologier av aminosyresekvenser og funksjon er forventet basert på den konservative natur av serinproteasene, og homologier påvist tidligere blant beslektede arter, f.eks. herpesfamilien. (Davison et al., 1986; McGeoch et al., 1988). Således kan det forutsies at U_L26 fra HSV-1, BVRF2 fra EBV, U_L80 fra CMV, gen 33 fra VZV spiller den samme eller lignende rolle i modningen av kapsidet og koder for en protease. Fordi ekstensiv homologi ble funnet mellom disse antatte proteasene og HSV-1 U_L26, antas det at virkningen eller spaltningsmekanismen for disse proteasene er den samme som for HSV-1 U_L26. Således er det ikke overraskende at den foreliggende oppfinnelse omfatter hemmere som er beskrevet mot herpes simplex virus (HSV-1 og HSV-2) og kan anvendes for behandling av andre herpesvirus (EBV, VZV, CMV og human herpesvirus).

Som en indikasjon på at serinproteasene ikke begrenses til herpesfamilien, finnes rapporter på kapsidsammensetning i andre mikrober. Bakteriofag T_4 og lambda er mest studert for kapsidsammensetning. I disse fag, blir først et på forhånd laget kapsid satt sammen gjennom reaksjon mellom ytterdekkeprotein og indre membranprotein. Så blir membranproteinet klyvet ved en fagkodet protease og fjernet fra kapsidet. På samme tid blir fag-DNA pakket inn i kapsidet og gir et modent kapsid. Spaltingen av membranprotein er vesentlig for å lage modent kapsid. Nylig viste kryoelektromikroskopiske studier likheten mellom kapsidstrukturen i HSV og lambda-fag. Sekvensen til human CMV-stamme AD169 er blitt bestemt, og et gen som er analogt til HSV UL26 identifisert. ICP35 er foreslått å fungere som membranfoldings- eller sammensetningsprotein i utviklingen av HSV-kapsidmodning. Spaltingen av ICP35 av proteasene i den foreliggende oppfinnelse kreves for kapsidmodning og er vesentlig for replikasjon av viruset. Proteasene beskrevet her fungerer som en motpart til de fag som spalter ICP35-proteinet for å starte DNA-pakking. Derfor, bestemmelsesmetoder for kandidatproteasehemmere og fremgangsmåte for behandling beskrevet her, har en utstrakt anvendelighet ut over utelukkende herpesfamilien.

Et område beskriver en del eller region av et protein definert ved en aminosyresekvens i et polypeptid eller protein, i det foreliggende tilfelle defineres et område funksjonelt ved hjelp av virkningen av aminosyrefjernelser eller erstatninger i en sekvens på funksjonen eller erstatning av proteinet.

Nedstrøms refererer seg til nukleinsyresekvenser funnet i en 3'-retning fra et gitt referansepunkt langs nukleinsyremolekylet.

En epitop er en aminosyresekvens som er en antigen determinant.

En åpen leseramme (ORF) inneholder en serie av tripletter som koder for aminosyrer uten noen avslutnings-(terminerings-)kodon. Sekvenser av denne type er potensielt translaterbare til et protein.

Vesentlig renset med hensyn til DNA, beskriver DNA-segenter isolert fritt for sin naturlige tilstand slik de kan være tilstede i genomet i en organisme, og er ment å omfatte segenter som

eksisterer etter genetisk arbeid, f.eks. ved innsetting i en rekombinant vektor.

En transkripsjonsenhet er avstanden mellom stedene for start og avslutning av RNA-polymerasen.

Oppstrøms refererer seg til nukleinsyresekvenser funnet i en 5'-retning fra et gitt referansepunkt langs et nukleinsyremolekyl.

En virusprotease er et enzym som er i stand til å spalte virusforstadieproteiner på et spesifikt sted.

HSV	herpes simplex virus
CMV	cytomegalo virus
ORF	åpen leseramme
ICP	infisert cellulært polypeptid
DFP	diisopropylfluorfosfat
TPCK	L-1-tosylamido-2-fenyletylklormetylketon
TLCK	N- α -p-tosyl-L-lysinklormetylketon
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
EGTA	etylenglykol-bis (β -aminoetyleter) N,N,N',N'-tetraeddiksyre

Fig. 1A. Sekvensarrangement av HSV-1-genomet, posisjonene til U_L26 og U_L26,5 åpne leserammer og deres transkripter, og strukturen til testplasmidene laget for bruk i den foreliggende oppfinnelse.

Fig. 1B. Nukleotid og aminosyresekvens i den U_L26 åpne leseramme. +1-setet svarer til translasjonsstartsetet i den U_L26 åpne leseramme.

Fig. 2. En skjematisk fremstilling av forholdet mellom HSV-1-genomisk DNA, U_L26 og U_L26,5 åpne leserammer (ORF), og translasjons- og post-translasjonsproduktene i dette genetiske system.

Fig. 3. Autoradiografisk avbildning av DNA-probe 1 (A) og probe 2 (B) hybridisert til total cytoplasmisk RNA fra kontrollinfiserte og 12-timers infiserte Vero-celler og spaltet med S1-nuklease.

Fig. 4. Fotografi av polypeptider fra cellelysater transfektert med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med virus, elektroforetisk adskilt i polyakrylamidgeler, elektrisk overført

til en nitrocellulosemembran, og reagert med geit-monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) mot HSV-1 ICP35.

Fig. 5. Fotografi av polypeptider fra lysater i celler transfektet med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med virus, elektroforetisk adskilt i polyakrylamidgeler, elektrisk overført til nitrocellulosemembraner, og reagert med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff).

Fig. 6. Fotografi av polypeptider fra lysater i celler transfektet med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med HSV-1, elektroforetisk adskilt i polyakrylamidgeler, elektrisk overført til nitrocellulosemembraner, og reagert med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff).

Fig. 7. Autoradiografisk bilde og fotografi av polypeptider fra lysater fra celler transfektet med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med virus, elektroforetisk separert i polyakrylamidgeler, elektrisk overført til nitrocellulosemembraner, og reagert med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff).

Fig. 8. Autoradiografisk bilde av ^{35}S -metioninmerkede polypeptider translatert i et nukleasebehandlet kaninretikulocyt-lysat og elektroforetisk adskilt på en 9,5% denaturerende polyakrylamidgel.

Fig. 9. Fotografi av elektroforetisk adskilte polypeptider fra celler transfektet med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med HSV-1(F) enten ved 34°C (34°) eller ved 39°C (39°), elektroforetisk separert i polyakrylamidgeler, elektrisk overført til en nitrocellulosemembran og reagert med monoklonalt antistoff H725 til HSV-1 ICP35 (HSV antistoff) og farget med geit-antimus-IgG-antistoff koblet til peroksidase.

Fig. 10. Fotografi av elektroforetisk adskilte polypeptider fra celler transfektet med plasmider og enten kontrollinfisert eller superinfisert med HSV-1(F) (HSV-1) enten ved 34°C, ved 39°C eller ved 37°C, elektroforetisk adskilt på polyakrylamidgeler, elektrisk overført til en nitrocellulosemembran, reagert med monoklonalt antistoff H725 til HSV-1 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff) og farget med geit-antimus-IgG-antistoff koblet til peroksidase.

Fig. 11. Fotografi av polypeptider fra celler transfektet med plasmider og enten kontrollinfisert eller superinfisert med HSV-1(F) (HSV-1) eller HSV-2(G) (HSV-2) enten ved 34°C, ved 39°C eller ved 37°C, elektroforetisk adskilt på denaturerende polyakrylamidgeler, elektrisk overført til en nitrocellulose-membran, reagert med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff) og farget med geit-antimus-IgG-antistoff koblet til peroksidase.

Fig. 12. Autoradiografisk bilde av ^{35}S -metioninmerkede polypeptider kodet for av $\text{U}_\text{L}26$ åpen leseramme elektroforetisk adskilt på en denaturerende polyakrylamidgel.

Fig. 13. Autoradiografiske bilder og fotografi av polypeptider enten syntetisert in vitro fra sekvensene kodet for i plasmidene U eller Y eller inneholdt i lysater til celler transfektet med plasmidene X eller Z og superinfisert med HSV-1(F) eller HSV-1(G).

Fig. 14. Autoradiografisk bilde av ^{35}S -metioninmerkede polypeptider kodet for av $\text{U}_\text{L}26$ åpen leseramme elektroforetisk adskilt på en denaturerende gel for å vise virkningen til PMSF som proteasehemmer.

Fig. 15. Fotografi av elektroforetisk adskilte polypeptider fra lysater til celler transfektet med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med HSV-1(F) enten ved 34°C (34°) eller ved 39°C (39°), elektroforetisk adskilt på polyakrylamidgeler, elektrisk overført til en nitrocellulosemembran og reagert først med monoklonalt antistoff H725 til HSV-1 ICP35 (HSV antistoff) eller CH28-2 til CMV-epitopen (CMV antistoff), og farget med geit-antimus-IgG-antistoff koblet til peroksidase.

Fig. 16. Autoradiografiske bilder av elektroforetiske adskilte polypeptider translatert in vitro i et nukleasebehandlet kaninretikulocyttylsat fra de syntetiske RNA'ene transkribert in vitro fra $\text{U}_\text{L}26$ ORF klonet i plasmid-konstruksjon Y.

Fig. 17. Skjematisk tegning av resultatene fra mutagenesestudier.

Den foreliggende oppfinnelse involverer herpesproteaser og nukleinsyresegmenter som koder for slike proteaser. De protease-

kodende segmenter inneholder også minst ett kodende område for proteiner benyttet i kapsidproduksjon under virusreplikasjon. Substratene for proteasen omfatter sin egen aminosyresekvens og forstadiene til viruskapsidproteiner (Fig. 2). Hemmere av proteasen stopper viral livssyklus, og derved tilbyr en mulighet for behandlingsmessig tilbud. En illustrerende utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, benytter HSV-1 som en proteasekilde.

En ny herpesprotease er blitt identifisert i HSV-1, renset og forkortet som "Pr". Et våpen laget for å kunne angripe virusproduksjon direkte er tilstede ved å hemme virkningen til Pr-proteasen. Fordi proteasen er vesentlig for å pakke DNA i viruskapsidet, avbryter proteasehemmingen replikasjonssyklus til virus. Behandling med hemmere av proteasen opphever kliniske virkninger og reduserer over-føringsrisiko.

Herpesproteasen er et produkt av en region i HSV-genomet, den U_L26 åpne leseramme. Proteasen er både en nødvendig og det eneste virusprotein som er tilstrekkelig til å utføre sin egen spaltnings og av produktet for $U_L26,5$ åpen leseramme (ORF), en region identifisert og renset som en del av den foreliggende oppfinnelse. Produktet til U_L26 ORF, et protein som er blitt betegnet Pra, er en hittil ikke beskrevet herpesprotease, den første protease som noen gang er renset fra herpesvirus. I cellefrie systemer spalter Pra seg selv til Prb og gir derved holdepunkter for at translasjonsproduktet Pra kan fungere som en protease. (Fig. 1) Prb, betegnelsen tilskrevet produktet av den autokatalytiske spaltnings av Pra, er omtrent 20 aminosyrer mindre enn Pra.

Det er karakteristisk for proteasen som benyttes i den foreliggende oppfinnelse at den ikke bare katalyserer sin egen spaltnings, men overraskende, et annet substrat som den virker på, dette mer rikelige tilgjengelige substrat, blir kodet for av en sekvens som finnes fullstendig i genet som koder for proteasen. Proteasen og det andre substratet deler aminosyresekvenser ved deres karboksylander. Et overraskende og uventet funn var at det kodende segment for det andre substratet koder for viruskapsidproteinene betegnet ICP35, og er et nylig identifisert gen betegnet $U_L26,5$.

Det uttrykte U_L26-genet i form av en protease er vesentlig for virusmodning. Beviset for dette utsagn er en temperaturfølsom mutasjon beskrevet av Preston, et. (1983), var at den U_L26 åpne leseramme har en dødelig effekt på kapsidmodningen. Derfor, ødeleggelse av funksjonen til proteasen hemmer virusmodning, hvilket tilbyr en terapeutisk mulighet.

Tre generelle muligheter ble benyttet av oppfinnerne for å identifisere og karakterisere en herpesprotease. Disse omfattet: 1) transfeksjon av celler med testplasmider og så infisere dem med herpes; 2) transfeksjon av celler med to plasmider; og 3) in vitro-translasjon. Av disse studier identifiserte oppfinnerne to overlappende herpes simplex virus 1 (HSV-1) nukleinsyresekvenser, som omfatter to gener (uavhengige transkripsjonenheter). Størsteparten av sekvensene blir betegnet U_L26 og koder for et protein med en tilsynelatende molekylvekt på ca. 75-85 kd som bestemt ved SDS-PAGE. Dette protein er en serinprotease som er i stand til å spalte seg selv og ICP35-proteinforstadiene ved karboksyl-terminal proteolytisk spaltning. Den mindre sekvensen blir betegnet U_L26,5 og koder for et protein med en tilsynelatende molekylvekt på omtrent 35-50 kd som bestemt av SDS-PAGE. Begge genene er blitt klonet.

En av grunnene til at proteasene involvert i den foreliggende oppfinnelse er blitt isolert og rensset på en vellykket måte, var fordi man kunne velge et nøkkelttestsubstrat, ICP35-proteinene. For å forstå bedre herpesgenomet, var et annet nyttig trinn konstruksjonen av et stort antall plasmider med spesifikk konstruksjonsstrategi ment for å besvare et spesifikt spørsmål vedrørende mekanismen for herpesgenetiske virkemåter. I noen plasmider ble en markørsekvens satt inn for å tillate å spore den genetiske virkningsmåte. Markørene i en serie plasmid-konstruksjoner omfattet fjernelser eller innsettinger av en α 4-promotor eller en sekvens som kodet for en cytomegalo-virusepitop som var i stand til å reagere med et musemonoklonalt antistoff. Disse konstruksjoner viste dramatiske og overraskende forskjeller i den genetiske virkningen til en region av herpesgenomet fra den som var forutsagt fra tidligere arbeid på strukturen og virkningen til U_L26 ORF.

I et tidligere arbeid forutsa McGeoch et al. (1988) at U_L26 -rammen koder for ICP35. Produktet av U_L26 antatt fra nukleotid-sekvensene i den åpne leseramme, viste seg imidlertid å være betraktelig større enn ICP35. Et hierarki av genetisk kompleksitet ble avslørt som ansvarlig for produksjon av herpeskapsidproteinet. Det som beskrives i den foreliggende oppfinnelse er en disseksjon av området betegnet U_L26 i to overlappende transkripsjonsenheter som gir proteiner som deler delvis en aminosyresekvens. Hva som tidligere er blitt betegnet ICP35 viser seg å være kodet for bare av en del av den U_L26 åpne leseramme. I den foreliggende oppfinnelse har den enheten blitt betegnet $U_L26,5$.

Homologer av substratet til Pra-proteasen, som spalter et forstadium slik at det dannes ICP35-proteiner, er blitt påvist i andre herpesvirus. Det er derfor sannsynlig at fremgangsmåten i den foreliggende oppfinnelse vil avsløre proteasen i andre medlemmer av virusfamilien, og i andre arter. Som et eksempel, er det nylig blitt rapportert at CMV-ekvivalenten til ICP35-proteinet blir spaltet ved karboksylenden (Gibson et al., 1990, Schenk et al. 1991), skjønt CMV-proteasen er ikke blitt identifisert hittil i den arten. Den herpesspaltede protease klyver derfor sannsynligvis to andre herpesvirus. Mer nylig er det en rapport vedrørende en proteinase i cytomegalovirus. En aktiv protease blir rapportert og blir frigitt etter spalting av fulllengde-proteasen ved aminosyre 248, men den foreliggende oppfinnelse antyder at resultatet av en slik spalting vil være inaktiv.

Tilstedeværelsen av en homolog åpen leseramme for ICP35 i varicella zoster virus-(VZV)-genomet (Davison og Scott, 1986; Davison og McGeoch, 1986) antyder at ICP35-ekvivalenten og den korresponderende proteasen er bevart blant forskjellige herpesvirus. Fordi aminosyresekvensen til ICP35 er fullstendig inneholdt i karboksylterminus til Pr og fordi ICP35 ikke viser påvisbar proteolytisk aktivitet, forventes det at den proteolytiske aktivitet vist av Pr uttrykkes ved den aminoterminalen delen av proteinet. Det er av interesse å bemerke at i VZV-genomet (Davison og Scott, 1986), viser den åpne leseramme som koresponderer til U_L26 en større homologi i aminosyresekvens i den aminoterminalen enn i den karboksylterminalen del.

Forandring av herpes simplex virus-(HSV)-genomet

Viktigheten av en virusprotease som et terapeutisk mål er klart fra betraktning omkring virusreplikasjonsmekanismer. F.eks., herpes simplex virus har et genom som består av et lineært, dobbelkjedet DNA-molekyl (molekylvekt omtrent 100×10^6) stort nok til å kode for 7^3 forskjellige genprodukter. Strukturen til genomet er vanligvis blant DNA-virus slik at to enkeltstående nukleotidsekvenser flankeres av omvendt repeterte sekvenser.

Virusgenomet er pakket i et regelmessig ikosahedralprotein-skall (kapsid) som består av 162 kapsomer. Det ytre som dekker viruset er et lipidinnholdende membranhylster som stammer fra en modifisert cellemembran. Celleproteiner påvises ikke i virion-kapselen. Glykoproteiner i lipidbilaget til kapselen formidler binding av virus til vertscellen og overflate, og transport av virus inn i cellen og virusmodning og utskillelse. Et skille eksisterer mellom kapsidet og lipidbilaget. Innenfor kapsidet er DNA-polyaminer og DNA-bindingsproteiner.

Kliniske problemer oppstår når celleinfeksjon etterfølges av replikasjon og spredning av virus. Etter at virusgenomet når cellekjernen, uttrykkes virusgenene på en meget regulert måte. Celledød kan oppstå fra virusinfeksjon og replikasjon. Proteasehemming vil blokkere replikasjon. In vivo-infeksjoner av visse celler, spesielt sensoriske neuroner, resulterer ikke nødvendigvis i replikasjon av virus og celledød. En latentfase kan inntre.

Sekvensarrangement av HSV-1-genom, posisjoner til U_L26 og $U_L26,5$ åpne leserammer og deres transkripter og strukturen til testplasmidene som er laget for deler av oppfinnelsen, er vist i Fig. 1:

Linje 1, -skjematisk tegning av sekvensarrangementet til HSV-1-genomet. U_L og U_S refererer seg til lange enkeltstående og korte enkeltstående sekvenser flankert av terminale, omvendte, repeterte sekvenser vist som rektangler.

Linjene 2 og 3, -genomkartposisjon, nukleotidnummerering relativ til det omtrent transkripsjonsstartsetet i U_L26 vist ved bokstaven I ved +1, og restriksjonsendonukleasetene til HSV-1 EcoRI-PstI DNA-fragmentet. Linje 3 viser også posisjonen til

translasjonstermineringskodon (T) og det enkle poly(A) signal (A) som tjener både U_{L26} og $U_{L26,5}$ RNA'ene.

Linjene 4 og 5, -de fylte rektanglene (tykke streker) representerer kodende områder i U_{L26} og $U_{L26,5}$ åpne leserammer. Tallene refererer seg til posisjonene på transkripsjonsstartsetet, translasjonsstart og termineringskodoner og til poly(A) signal for begge åpne leserammer relatert til nukleotid +1 i U_{L26} .

Linje 6 er et restriksjonsendonukleasekart i skala med referanse til linjene A gjennom Z og AA gjennom NN som er skjematisk tegninger av HSV-1-sekvensene som inneholdes i plasmid-konstruksjoner benyttet i studiene beskrevet i denne rapport. Konstruksjonen av plasmidene vist skjematisk i linjene A gjennom Z og AA gjennom NN er beskrevet i Eksempel 1. Kilden til $\alpha 4$ -promotoren (åpen rektangel) vist i plasmidene B, D, H, J, K, L, M, P, W, X, Z, AA til NN, var et BamHI Z DNA-fragment (Post et al., 1981) innsatt i riktig transkripsjonsorientering. CMV-epitopen er vist som en fylt oval. Oligonukleotid C med sitt komplement er vist som fylt rektangel, og det nydannede PmlI-setet er markert som P*. Restriksjonsendonukleasesetene ble forkortet som følger: B, BamHI; Ba, BalI; BS, BstEII; E, EcoNI; H, HpaI; K, KpnI; Ms, MstII; P, PmlI; Ps, PstI; S, SalI; X, XmaI. Me representerer metionintranslasjonsstartkodon til $U_{L26,5}$ åpen leseramme.

For å identifisere in vitro-translasjon av U_{L26} og $U_{L26,5}$, ble de ikke-klyvede former av ICP35, åpne leserammer, både U_{L26} og $U_{L26,5}$ åpne leserammer klonet inn i PGEM3Z-f(+) til å gi henholdsvis plasmidene T og U, (Fig. 1). RNA som tilsvarende mRNA'ene i U_{L26} og $U_{L26,5}$, ble transkribert ved Sp6RNA-polymerase og translatert i nukleasebehandlet kaninretikulocyttylsater. Resultatene viste at U_{L26} og $U_{L26,5}$ spesifiserer proteiner, hver av disse danner dobbelte bånd med tilsynelatende molekylvekter på henholdsvis 80 kd (Pra) og 45 kd (ICP35d, c). De to formene av $U_{L26,5}$ (ICP35) protein laget in vitro ble funnet å vandre sammen med ICP35c, d syntetisert in vitro i HSV-1(F)-infiserte celler. Det ble videre funnet at de ikke-klyvede formene av $U_{L26,5}$, som er ICP35c, og d, kan bli spaltet til ICP35e og f.

Det var mulig å kartlegge (lokalisere) og rense DNA-sekvensene i virusgenomet som krevdes for spaltning av ICP35c,

d til ICP35e, f. BHK-celler ble transfektert med en serie plasmider som inneholdt forskjellige lengder av HSV-1-DNA-sekvenser, hver inneholdt et intakt ICP35-gen og ble superinfisert med HSV-1(F) ved 39°C. BHK-celler transfektert med plasmid A inneholdt det intakte U_L26 -genet (Fig. 1), laget ICP35e, f i tillegg til ICP35 c, d, mens celler transfektert med plasmid C hvor promotorregionen til U_L26 -genet var fjernet, og bare inneholdt den kodende sekvensen til U_L26 (Fig. 1), laget utelukkende ikke-spaltet ICP35c, d. Disse resultater antydte at genproduktet til U_L26 var krevet for å spalte ICP35c, d i e, f.

Produktet til U_L26 -genet var i stand til å spalte ICP35c, d til e, f når tilstede i transposisjonen. For å bestemme hvorvidt U_L26 virker i trans eller i cis, ble BHK-celler transfektert med plasmid N som substrat for spalting og en serie plasmider som inneholdt mangler innen den U_L26 åpne leseramme, og så infisert med HSV-1(F) og beholdt ved 39°C. Resultatene viste følgende:

- (i) ICP35c, d autokatalyserte ikke deres egen spalting til ICP35e, f, siden lysatene i cellene kotransfektet med plasmidene N og E (Fig. 1) ikke inneholdt ICP35-formene e og f som reagerte med CMV-monoklonale antistoffer.
- (ii) ICP35c, d ble ikke spaltet i BHK-celler kotransfektet ved plasmidene N og C eller I. Plasmidene C og I inneholder mangler i henholdsvis promotorregionen og i polyadenyleringssetet i U_L26 åpen leseramme, (Fig. 1).
- (iii) ICP35c, d ble spaltet til e, f i BHK-celler kotransfektet med plasmidene N og A eller B. Plasmidene A og B inneholder den intakte U_L26 -promotoren og henholdsvis den åpne leseramme og den U_L26 -kodende sekvensen dirigert av $\alpha 4$ -promotoren. α -transduksjonsfaktoren i HSV-1(F) aktiverer $\alpha 4$ -promotoren i høy grad (Post et al., 1981; Battreson og Roizman, 1983) ved 39°C. Det høye produksjonsnivået av U_L26 kan forklare tilstedeværelsen av de spaltede formene av ICP35 (formene e og f) i cellelysaten som ble ko-transfektet med plasmidene N og B.

Viktigheten av proteasen kodet for av U_L26 antydes av resultatene som viste det å være i stand til å spalte ICP35c, d til e, f. Det vises at U_L26 og spaltning av ICP35d, d til e, f er begge viktige for kapsidproduksjon fordi en mutasjon i den region (i 5'enden til U_L26 ORF) ble ansett som dødelig (Preston et al., 1983).

Enda mer spennende fra synspunktet når det gjelder å benytte proteasen som mål for å angripe herpesinfeksjoner, er at proteasen synes å være det eneste proteinet som kreves for spaltning av ICP35c, d til e-, f-proteiner nødvendige for kapsidproduksjon. Dette antyder at proteasen er vesentlig for kapsiddannelsen. For å bestemme hvorvidt U_L26 er det eneste virusprotein som kreves for denne spaltning og for å utelukke muligheten at virusgener uttrykt av HSV-1(F)-genomet ved 39°C bidrar til å spalte ICP35, ble BHK-celler kotransfektet med en konstant mengde plasmid L og forskjellige mengder plasmid B som genene som koder for henholdsvis substratet og spaltningens enzymet. I plasmid L (Fig. 1) ble U_L26 , 5' åpen leseramme regulert av $\alpha 4$ -promotoren og CMV-epitopen ble satt inn ved MstII-restriksjonsendonukleasetet, mens plasmid B inneholdt den intakte U_L26 åpne leseramme aktivert av den samme promotoren. Fordi $\alpha 4$ er en sterk eukaryot promotor som er permanent uttrykt i transfektete celler (Post et al., 1981; Kristie og Roizman, 1984), krevdes ikke at produksjonen av U_L26 , 5'- og U_L26 -proteinene i cellene transfektet med plasmid L og B superinfeksjon med HSV-1(F). Resultatene var som følger:

- (i) I fravær av virusinfeksjon var ICP35c og d de eneste to former produsert i celler transfektet med plasmid L. Den epitopmarkerte ICP35 uttrykt av plasmid L var fullt kløvet i celler superinfisert med HSV-1(F) ved permissiv temperatur. Som ventet produserte ikke plasmid B produkter som reagerte med anti-CMV-antistoff.
- (ii) I nærvær av plasmid B som inneholdt U_L26 , ble den epitopmarkerte ICP35c, d produsert av plasmid L, spaltet til ICP35e, f. I små konsentrasjoner av plasmid B, var mengden av dannet ICP35e, f direkte proporsjonal med mengden U_L26 -plasmid-DNA ko-transfektet med plasmid L i BHK-celler.

Reduksjonen i mengdene av ICP35e, f observert i nærvær av de største mengdene av plasmid B, kan reflektere konkurranse mellom de to plasmidene eller redusert utbytte som et resultat av giftigheten på grunn av høye DNA-mengder.

Fra resultatene av disse studiene ble det konkludert at produktet til U_L26 er den eneste virusfaktor som både er i stand til og tilstrekkelig for å spalte ICP35c, d til ICP35e, f. Proteasen er derfor vesentlig for kapsidutviklingen, som til gjengjeld er vesentlig for herpesvirusets replikasjonslivssyklus.

De aktive forbindelsene til slike medikamenter omfatter en hemmer av proteasen. Hemmeren kan virke for å motvirke den proteolytiske virkningen til en allerede tilgjengelig protease, eller å avbryte eller hindre translasjons- eller transkripsjonsstarten for nukleinsyresegmenter som koder for proteaseproduksjon. Inhibitoren kan være i form av en kjemisk sammensetning, i det tilfellet må den kombineres med en sammensetning som påvirker celleopptak.

Hvis hemmeren er i form av nukleinsyresegment, kan den inkorporeres i infiserte celler ved hjelp av en rekke fremgangsmåter som er vel kjente for fagmannen. Disse fremgangsmåtene er beskrevet her og omfatter transfeksjon av en rekombinant vektor, elektroporering eller bruk av en "gen-revolver" for å tvinge mekanisk akselererte nukleinsyre-partikler inn i infiserte celler.

EKSEMPEL I

Konstruksjon av plasmider og deres forbindelse med HSV-genomet

Et sett plasmider ble konstruert til å inneholde segmenter av nukleinsyresekvenser som kunne forandres slik at de identifiserte deler av nukleinsyresekvensen til HSV-genomet som kontrollerer produksjon av spesifikke polypeptider, og å isolere disse segmentene og rense deres produkter.

Disse nyttige verktøy ble laget for å identifisere og håndtere nukleinsyresekvenser som benyttes i virusinfeksjoner. I noen plasmider ble markører satt inn på spesifikke steder for å

spore spaltingsproduktene, for å definere nukleotidsekvensene som ble benyttet for forskjellige infeksjonsprosesser. CMV-epitopen er vist som en utfylt oval i Fig. 1. Oligonukleotidet C med dets komplement er vist som et fullt rektangel. Det nylig dannede PmlI-setet er markert P*. Restriksjonsendonukleasesetene er forkortet som følger: B, BamHI; Ba, BalI; Bs, BstEII; E, EcoNI; H, HpaI; K, KpnI; Ms, MstII; P, PmlI; Ps, PstI; S, SalI; X, XmaI.

Tilslutt inneholder HSV-1-sekvensene som finnes i plasmidene A til Z, AA til NN, mangler som omfatter hele området i den U_L26 åpne leseramme. I noen tilfeller, f.eks. i plasmidkonstruksjonene B og D, ble promotoren til α 4-genet satt ved siden av hverandre i form av BamHI Z-fragmentet for å tvinge frem en sterkere grad av transkripsjon.

Plasmidkonstruksjonene betegnet J til N i Fig. 1 bærer i HSV-DNA'ene en sekvens som koder for en CMV-epitop satt inn i det enkeltstående MstII-setet i disse fragmentene. I alle, bortsett fra en plasmidkonstruksjon, ble BamHI Z-fragmentet også satt inn for å øke transkripsjon av α 4-promotoren som dette fragment inneholdt. Unntaket var plasmidkonstruksjon N.

I plasmid O og P ble CMV-epitopen satt inn i det enkeltstående HpaI-setet og bare P-plasmidet inneholder α 4-promotoren i form av BamHI Z-fragmentet.

De følgende plasmidene ble konstruert:

A (pRB4057), B (pRB4060), C (pRB4058), D (pRB4089),
E (pRB4093), F (pRB4056), G (pRB4087), H (pRB4088),
I (pRB4026), J (pRB4092), K (pRB4094), L (pRB4096),
M (pRB4095), N (pRB4102), O (pRB4079), P (pRB4080),
Q (pRB4140), R (pRB4184), S (pRB4185), T (pRB4103),
U (pRB4090), V (pRB4186), W (pRB4188), X (pRB4213),
Y (pRB4214), Z (pRB4215).

pRB4026 ble konstruert ved innsetting av HSV-1-fragmentet i KpnI-setet til pUC18. pRB4057 inneholder den hele kodende sekvensen til den U_L26 åpne leseramme, som går fra 3'-enden av nukleotid -900 relativ til translasjonsstartsetet i genet og omtrent 650 nukleotider nedstrøms fra dets polyadenyleringssete.

pBR4060 ble konstruert ved å erstatte virus-DNA-sekvensen 23 bp oppstrøms fra translasjonsstartsetet til den U_L26 åpne leseramme i pRB4057 med HSV-1 DNA BamHI Z-fragmentet. BamHI Z-fragmentet inneholder en ende, deler av 5'-transkribert ikke-kodende sekvenser til α 4-genet som starter med nukleotid +33 og oppstrøms ikke-transkriberte områder av dette gen. BamHI Z-fragmentet ble satt inn i orienteringen som ville sette α 4-promotoren ved siden av i den riktige transkripsjonsorientering i forhold til de intakte og forkortede områder i den U_L26 åpne leseramme. pRB4056, pBR4058, pRB4087 og pRB4093 stammet fra pRB4057 og pBR4088 og pRB4089 fra pRB4060 ved å lage mangelmutasjoner ved hjelp av subkloningsfremgangsmåtene beskrevet av Sambrook et al. (1988).

To par oligonukleotider, dvs. oligonukleotid A (5'-AAGGGACAGAAGCCCAACCTGCTAGACCGACTGCGACACCGCAAAAACGGGTACCGACAC-3') med sin komplementære sekvens, oligonukleotid B (5'-AAAGGGACAGAAGCCCAACCTGCTAGACCGACTGCGACACCGCAAAAACGGGTACCGACACGA3') med sin komplementære sekvens, og oligonukleotid C (5'-TCGACGTTGACACGGCCCCGCGCCGCGATTCTTCTCGTCTCTCAGATGATGGGGGCCCCGCC-ACGTGTGA-3'), ble syntetisert i et Applied Biosystems DNA-syntesemaskin 380A (Foster City, Calif.). Oligonukleotidene A, B og deres komplementære sekvenser koder for epitopen til CH28-2 monoklonalt antistoff og inneholder et KpnI-sete ved 3'-enden for å lette undersøkelse av oligonukleotidinnsettingen i plasmidene. pRB4079 og pRB4080 ble oppnådd ved å innsette oligonukleotid A-sekvensen inn i henholdsvis det enkeltstående HpaI-setet til pRB4057 og pRB4060. pRB4092 ble oppnådd ved å sette inn oligonukleotid B-sekvensen inn i det enkeltstående MstII-setet til pRB4060. pRB4094, pRB4095, pRB4096 og pRB4102 stammet fra pRB4092 ved å lage fjernelser ved hjelp av vanlige subkloningsfremgangsmåter (Sambrook et al., 1989). Alle innsettingsseter i disse plasmidene ble sekvensert for å bekrefte at CMV-epitopen ble satt inn i den samme leseramme som den U_L26 åpne leseramme.

Plasmid Q (pRB4140) ble oppnådd ved å sette inn oligonukleotid A med sin komplementære sekvens inn i det enkeltstående PmlI-setet i plasmid A. Sekvensen koder for den autentiske U_L26-sekvensen fra PmlI-setet til translasjonstermineringssetet, men med tillegg av et nytt PmlI-sete i den U_L26 åpne leseramme i den

riktige orienteringen som resulterte i dannelsen av et nytt PmlI-sete mellom den karboksylterminale aminosyren og stoppkodon i den U_L26 åpne leseramme. I tillegg, sekvensen 'GTG' ved det naturlige PmlL-setet er blitt forandret til sekvens 'GTC'. Ved innsetting av sekvensen C inn i det enkeltstående PmlL-setet i den U_L26 åpne leseramme fra den riktige orienteringen, resulterte i dannelsen av et nytt PmlI-sete mellom den karboksylterminale aminosyren og stoppkodonet i U_L26 . Det opprinnelige, naturlige PmlI-setet ble ødelagt uten å forandre U_L26 -aminosyresekvensen fordi kodonet "GTG" og "GTC" koder for den samme aminosyren. Derfor var nettoeffekten ved innsetting av oligonukleotidet C med dets komplementære sekvens i U_L26 åpen leseramme, at U_L26 hadde to ytterligere aminosyrer mellom sin naturlige karboksylterminale aminosyre og dens stoppkodon som var kodet for av den nydannede PmlI-gjenkjennelsesekvensen. Plasmid R (pRB4184) ble oppnådd ved å sette inn sekvens C inn i PmlL-setet til plasmidene E (pRB4093), og S (pRB4185) ble oppnådd ved å sette inn oligonukleotidet A med sin komplementære sekvens inn i PmlL-setet i plasmid R. Plasmidene T, U, V og W (pRB4103, pRB4090, pRB4186 og pRB4188) stammet fra plasmidene B og S ved subkloning. Plasmidene X, Y og Z (pRB4213, pRB4214 og pRB4215) ble konstruert ved å sette i riktig leseramme inn i den U_L26 åpne leseramme på stedet mellom 3'-enden av CMV-sekvensen og stoppkodonet, enten en sekvens som kodet for 256 aminosyrer som omfattet fem homologer av IgG-bindende områder til stafylokokkprotein A eller en sekvens som kodet for 129 aminosyrer og som omfattet to slike områder. Disse sekvensene var henholdsvis BclI-HincII-fragmentet og HindIII-HincII-fragmentet i protein A-genfusjonsvektoren pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ). Vektoren for plasmidene T, U, V og Y stammet fra pGEM3Zf(+) (Promega, Madison, WI), og disse plasmidene kunne bli benyttet som templatere for in vitro-transkripsjon av T7 eller Sp6 RNA-polymerasene. Vektorene for alle andre plasmider stammet fra pUC18 (New England Biolabs, MA). Alle innsettingsstedene til oligonukleotidsekvensene A og C med deres komplementære sekvenser i plasmidene, ble sekvensert for å bekrefte at CMV-epitopen og aminosyresekvensen kodet for av oligonukleotid C med deres komplementære sekvens, var satt inn i ramme med den U_L26 åpne leseramme.

Konstruksjonene AA, BB, CC, DD og MM ble laget ved å sette inn et translasjonsstoppkodon inn i pRB4060 ved henholdsvis PmlI-, MstII-, BssHII-, HpaI-setene, og setet som koder for translasjonsstartkodon til ICP35. Konstruksjon NN ble laget ved å fjerne sekvensen mellom ICP35-translasjonsstartsetet og stoppkodon. U_L26 ORF koblet til BamHI Z klonet i pGEM3zf(+) som pRB4245, ble mutagenisert til å gi II, JJ, KK, LL, HH og GG ved hjelp av mutagen-kittet (Bio-Rad) ifølge produsentens anbefalinger. 40 mer oligonukleotidene benyttet for dette formål ble laget i en Applied Biosystems modell 380B DNA-syntesemaskin. Plasmidene EE og FF ble laget ved spaltning med XbaI og kobling av konstruksjonene GG og HH for å fjerne henholdsvis de første 10 og 33 aminosyrene til U_L26. Symbolene benyttet i Fig. 1 er som følger: åpen firkant; BamHI Z-fragmentet benyttet som utgangspunkt for α 4-promotoren og satt inn i riktig transkripsjonsorientering relativ til den til U_L26 og U_L26,5 åpne leseramme; fylt oval: den 20 aminosyre CMV-epitop, beskrevet her; fylt rektangel: DNA-sekvensen som kodet for IgG-bindingsområdet til protein A; P*: et nytt PmlI-sete laget i samband med innsettingen av IgG-bindingsområdet til protein A. De nye translasjonsstartkodoner laget ved in vitro-mutagenese er markert "ATG". De fylte triangler representerer innsettingsstoppkodon. Restriksjonsendonukleasesetene ble forkortet som følger: B, BamHI; Ba, BalI; Bs, BstEII; E, EcoNI; H, HpaI; K, KpnI; Ms, MstII; P, PmlI; Ps, PstI; S, SalI; X, XcmI. Me representerer metionintranslasjonsstartkodon til den U_L26 åpne leseramme.

Et restriksjonsendonukleasekart er laget i skala på linje 9 i Fig. 1 med referanse til linjene A til Z som er skjematisk tegninger av HSV-1-sekvensene som inneholdt i plasmidkonstruksjonene benyttet i studier beskrevet her.

EKSEMPEL 2

Bruk av plasmider for å isolere og rense viruskomponenter

Vertsceller ble transfektert med plasmidkonstruksjonene i Fig. 1. I tillegg ble proteasen syntetisert in vitro fra kanin-retikulyocytlysatsystemet med plasmidene. Fotografier av polypeptidene fra celler som ble transfektert med plasmidkonstruksjonene og superinfisert med virus, tatt etter elektroforetisk separering i polyakrylamidgeler, elektrisk overføring til en nitrocellulosemembran, og reaksjon med geit-antimus-immunoglobulinantistoff koblet til peroksidase, ble benyttet for å analysere nukleinsyresekvensene som var ansvarlige for infeksjonsmekanismene. Eksperimentelle detaljer i polypeptidopprensing er beskrevet i Materialer og Metoder.

Konstruksjonene MM og NN ble benyttet for å bestemme hvorvidt noen ICP35-kodende sekvenser i proteasen er vesentlig for ICP35-spalting.

EKSEMPEL 3

Analyse av transkripsjonsenheter

Nukleotidsekvensene til U_L26 ble overraskende og uventet funnet å bli inneholdt i to transkripsjonsenheter. To prober ble konstruert for å kartlegge transkriptene i U_L26 . Probe 1, betegnet for å identifisere 5'-enden i U_L26 i RNA, besto av EcoNI-BamHI-fragmentet merket i BamHI-setet, mens probe 2 besto av XcmI-BstEII-fragmentet merket ved BstEII-setet.

Et autoradiografisk bilde av DNA-probe 1 (A) og probe 2 (B) hybridisert til total cytoplasmatisk RNA fra kontrollinfiserte og 12-timer-infiserte Vero celler og spaltet med S1-nuklease, er vist i Fig. 3. RNA'ene ble laget som beskrevet i Materialer og Metoder her. I Fig. 3, spor 1 (PS), vises en S1-fordøyet probe 1 slik det er under de samme betingelser for hybridisering og spalting som de vist i sporene MOCK og HSV-1.

Sporene 2 og 8 (MOCK), viser RNA ekstrahert fra celler 12 timer etter kontrollinfeksjon. Sporene 3 og 9 (HSV-1), viser RNA ekstrahert fra celler infisert med HSV-1(F) og dyrket i 12 timer.

Sporene 4 og 7 (P), viser posisjonene til de ikke-fordøyde probene (probe 1 eller 2).

Sporene 5 og 7 (M), viser 5'-endemerkede fragmenter oppnådd etter spalting av PGEM3Z DNA med enzymet MspI.

Pilene i Fig. 3 viser den beskyttede 5'-enden til U_L26(A) og U_L26,5(B) RNA'ene. T, posisjon til HSV-1-sekvensene i probe 2 beskyttet av U_L26 RNA.

Resultatene av S1-analysene illustrert i Fig. 3 er at cytoplasmatisk RNA hybridisert i probe 1 beskyttet et fragment på omtrent 300 nukleotider (spor 3).

Nukleotid 300 oppstrøms fra BamHI-setet ble betegnet +1 i U_L26. Det første metioninkodon etter det omtrentlige transkripsjonsstartsetet i er posisjon +180.

Cytoplasmatisk RNA hybridisert til probe 2 ga to sett fragmenter beskyttet fra S1-fordøyelse (spor 9). Det første fragmentet inneholdt alle HSV-1 DNA sekvensene (bånd T). Den andre sett av beskyttede fragmenter dannet flere bånd som varierte fra 35-40 nukleotider i lengde (spor 2, bånd U_L26,5). Således var transkripsjonsstartsetet i dette transkriptet omtrent ved nukleotid +100 relativ til nukleotid +1 i U_L26. Det første metioninkodon nedstrøms fra transkripsjonsstart-setet i dette RNA var ved posisjon +1099. Det lengere RNA ble betegnet U_L26.

EKSEMPEL 4

Lokalisering og isolering av ICP35-genet

For å lokalisere posisjonen til det kodende område for genet som spesifiserer ICP35, ble en serie mangelkonstruksjoner i den åpne leseramme U_L26 testet for deres evne til å produsere ICP35.

BHK-celler ble transfektert med plasmidkonstruksjonene O, N og P (Fig. 1), så infisert med HSV-2 (Fig. 4). Bokstavene over toppen av gelen vist i Fig. 4 identifiserer plasmidkonstruksjonene med hvilke cellene ble transfektert. En stipling eller fravær av en bokstav indikerer at cellene ble infisert, men ikke transfektert. De vertikale linjene identifiserer de langsomt vandrende båndene. Det korteste fragmentet som ga HSV-1 ICP35 var plasmid E

(spor 2). Fordi denne plasmidkonstruksjonen ble uttrykt fra sin naturlige promotor, viser resultatene at sekvensene som var inneholdt i HpaI-PstI-fragmentet inkluderte både de kodende sekvensene og promotoren til genet som kodet for ICP35. Plasmid E inneholder alle sekvensene til $U_L26,5$ RNA pluss 168 nukleotider.

EKSEMPEL 5

Åpen leserammepåvisning og karakterisering

I Fig. 5 ble et bilde at polypeptider som ble ekstrahert fra celler transfektert med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med virus, tatt etter elektroforetisk separering i polyakrylamidgeler, elektrisk overføring til nitrocellulosemembraner, og reaksjon med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff). Bokstavene over toppen av gelen identifiserer plasmidkonstruksjonene med hvilken cellene ble transfektert. En strek eller fravær av en bokstav indikerer at cellene blir infisert, men ikke transfektert. De vertikale linjene identifiserer de langsomt vandrende båndene.

Fig. 5 viser at BHK-celler transfektert med konstruksjonene J, K eller L laget en familie av proteiner som reagerte med både anti-HSV-1 ICP35(H725) og anti-CMV(CH28-2) monoklonale antistoffer. Dannelsen av de fire karakteristiske ICP35-båndene som produkter av transfeksjon av plasmid-konstruksjon L, indikerer at startmetioninkodonet for ICP35 er i posisjon 1099.

Disse resultatene viser at de $U_L26,5$ kodende sekvenser spesifiserer ICP35 utgjør en del av, og er i leseramme med, de til U_L26 . I den foregående delen var det vist at ICP35 kunne bli uttrykt ved transaktivering av DNA-sekvensene som var inkludert i HpaI-PstI-fragmentet. Fordi plasmidkonstruksjon E kunne bli transaktivert av HSV-2, kan det også bli konkludert at de kodende sekvensene til U_L26 omfatter både de kodende sekvensene og promotorområdet i genet som koder for ICP35.

EKSEMPEL 6**Anvendelse av anti-CMV monoklonalt antistoff (mAb)**

Et fotografi av polypeptider fra celler transfektert med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med HSV-1, ble tatt etter elektroforetisk separering i SDS-polyakrylamidgeler, elektrisk overføring til nitrocellulosemembraner, og reaksjon med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff). Bokstavene over toppen av gelen vist i Fig. 6, identifiserer plasmidkonstruksjonene som cellene ble transfektert med. En strek eller fravær av en bokstav indikerer at cellene ble infisert, men ikke transfektert. De vertikale strekene viser de langsomt vandrende båndene. Disse resultatene viser at bruk av anti-CMV monoklonalt antistoff fjerner behovet for å superinfisere cellen med et heterologt virus.

EKSEMPEL 7

**Identifikasjon, isolering og karakterisering av
produktet til U_L26 ORF**

Fig. 7 viser autoradiografiske bilder og et fotografi av polypeptider fra BHK-celler transfektert med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med virus, etter at cellene ble elektroforetisk separert i polyakrylamidgeler, elektrisk overført til nitrocellulosemembraner, og reagert med monoklonalt antistoff H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff). Bokstavene over toppen av gelen identifiserer plasmidkonstruksjonene som cellene ble transfektert med. Den vertikale strek og pil identifiserer produktet i U_L26 proteinet.

I Fig. 7, sporene 1, 2 og 3 er autoradiografiske bilder av proteinet merket med [³⁵S]metionin som beskrevet i Materialer og Metoder. De infiserte celleproteiner (ICPs) i HSV-2, ble nummerert ifølge Morse et al. (1978).

Sporene 8, 9 og 10 viser lysater av de samme cellene som vist i sporene 4, 5 og 6 farget med H725 istedenfor med CH28-2 monoklonale antistoffer.

Spor 7 viser lysatet fra celler transfektert med plasmid-

konstruksjon J, hvor U_L26 blir drevet av $\alpha 4$ -promotoren, infisert med HSV-1(F) og dyrket ved 39°C. Under disse betingelser, er bare α og noen få β proteiner uttrykt, men ICP35 i HSV-1(F) er ikke uttrykt. ICP35 i HSV-1(F) viralgenomet er ikke uttrykt. ICP35 kodet for av plasmidkonstruksjonen er uttrykt siden det transfekterte genet blir regulert som et β -gen.

I de foregående seksjoner var det vist at sekvensene som kodet for ICP35 overlappet bare en del med sekvensen betegnet U_L26 ORF. Formålet for studiene vist i de følgende delene var å identifisere produktet fra full-lengde U_L26 åpen leseramme. BHK-celler ble transfektert med plasmidkonstruksjon O, N eller P (Fig. 1) og så infisert med HSV-2. De elektroforetisk separerte proteinene fra cellene transfektert med plasmidene O, N og P, ble reagert med monoklonale antistoffer mot enten HSV-1(H725) eller CMV(CH28-2) (Fig. 7 sporene 4 til 6 og 8 til 10) og så autoradiografert for å gi molekylvektmarkører (sporene 1 til 3). De nøkterne tolkningene av resultatene var som følger:

- (1) plasmidkonstruksjonene O og P som inneholder CMV-epitopen satt inn i ramme med U_L26 produserte proteiner som dannet to bånd med elektroforetiske vandringar som korresponderte omtrent til proteinene med omtrent molekylvekter på 75.000 til 78.000 (Fig. 7, sporene 4 og 6). Det CMV-monoklonale antistoffet reagerte ikke med ICP35-båndene laget av plasmidene O og P (sporene 4 og 6). CMV-epitopen ble satt inn i HpaI-restriksjonsendonukleasetet (+832), dvs. foran translasjonsstartsetet til ICP35 i posisjon +1099.
- (2) Alle plasmidkonstruksjonene laget ICP35 som reagerte med H725 monoklonale antistoffer mot HSV-1 ICP35. Ulikheten i den elektroforetiske bevegelse til ICP35-proteinene laget av plasmidkonstruksjonene N og P, avspeiler innsettingen i plasmidkonstruksjonen N av et oligonukleotid som koder for ytterligere 21 aminosyrer.
- (3) Mengden proteiner som ble laget av hele U_L26 ORF i forhold til det ICP35-proteinet kan bli avledet fra observasjonen at mens begge Mr 75.000-78.000 kd proteinene og ICP35 reagerer med det samme monoklonale antistoff, CH28-2, er reaktiviteten eller mengde av det større proteinet betraktelig mindre enn det som er observert for ICP35.

Det sterke beviset for at de to proteinene deler aminosyre-sekvenser er basert på observasjonen at konstruksjon J under betingelser for overproduksjon av U_L26-proteiner, ga proteiner som vandret sammen med både det større proteinet og ICP35 og reagerte med det CH28-2 monoklonale antistoffet (pil, Fig. 7, spor 7).

EKSEMPEL 8

Karakterisering av U_L26- og U_L26,5-proteinen

Et autoradiografisk bilde av ³⁵S-metioninmerkede polypeptider translatert i et nukleasebehandlet kaninretikulocyttylsat og elektroforetisk adskilt i en 9,5% denaturerende polyakrylamid gel er vist i Fig. 8.

I spor 1 er translasjonsproduktene av brommosaikkvirus-templater gitt med et kitt fra Promega Biotec, WI som transkribert ifølge produsentens anvisninger. Spor 2 viser translasjonsprodukter til den U_L26-åpne leseramme i plasmid U. Spor 3 viser translasjonsproduktet til den U_L26-åpne leseramme i plasmid T. Disse resultatene viste at U_L26 og U_L26,5 spesifiserer proteiner som viser dobbeltbånd med tilsynelatende molekyllvekter på henholdsvis 80.000 kd (Pra) og 45.000 (ICP35d, c).

EKSEMPEL 9

Genproduktet til U_L26 kreves for å spalte ICP35c, d til e, f i transposisjon

Et fotografi av elektroforetisk adskilte polypeptider fra BHK-celler transfektert med plasmidkonstruksjoner og superinfisert med HSV-1(F) enten ved 34°C (34°) eller ved 39°C (39°), elektroforetisk separert i polyakrylamidgeler, elektroforetisk overført til en nitrocellulosemembran og reagert med monoklonalt antistoff H725 mot HSV-1 ICP35 (HSV antistoff) og farget med geit-antimus-IgG-antistoff koblet til peroksydase, er vist i Fig. 9. Eksperimentelle detaljer er beskrevet i Materialer og Metoder her. Bokstavene over toppen til gelen identifiserer plasmidkonstruksjonene som cellene ble transfektert med. En strek indikerer at cellene ble infisert, men ikke transfektert.

Bokstavene på siden beskriver forskjellige former av ICP ifølge Braun et al. (1984).

ICP35-båndene e og f er produktene av spaltning av proteinene i båndene c og d. Proteinene som vandrer i båndene c', d', e' og f' inneholder CMV-epitopen og vandrer derfor langsommere enn de henholdsvis autentiske proteinene i båndene c, d, e og f.

Tidligere eksperimenter viste at ICP35c, d var forstadier av ICP35e, f (Braun et al., 1984; Preston et al., 1983). For å teste denne hypotese, ble BHK-celler transfektert med plasmid E som inneholder $U_L26,5$ -gen (Fig. 1) og superinfisert med HSV-1(F) ved 39°C. Dette virus er temperaturfølsomt og ved 39°C uttrykker det ikke sine egne U_L26 og U_L26 åpne leserammer. Resultatene (Fig. 10) viser følgende:

- (1) ICP35-genet i virusgenomet ble uttrykt ved 34°C (spor 1), men ikke ved 39°C (spor 2) som vist ved nærværet og fraværet og ICP35-båndene som reagerte med henholdsvis H725 monoklonalt antistoff til ICP35.
- (2) ICP35c, d var de eneste to former av ICP35-proteiner uttrykt fra den ene leserammen i plasmid E ved 39°C (spor 4), mens minst ICP35c, d, e og f kunne bli påvist i lysater av produktivt infiserte celler dyrket ved 34°C (spor 1). Disse resultater ledet til konklusjonen at:
 - (a) ICP35c, d er de ikke-spaltede formene av ICP35-proteiner; som
 - (b) de kan bli spaltet til ICP35e, f; og at
 - (c) spaltingen krever en transvirkende faktor fordi prosesseringen ikke skjedde i fravær av HSV-1(F) sene genaktivering.

EKSEMPEL 10

U_L26 kan virke i trans til å spalte ICP35c og -d til ICPe og -f, og U_L26 er kompetent til og det eneste virusprotein som kreves for spalting av ICP35 c og -d til ICP35e og -f

For å bestemme hvorvidt U_L26 virker i trans eller i cis, ble BHK-celler transfektert med plasmid N som substrat for spaltning og med en serie plasmider som inneholdt mangler i den U_L26 åpne leseramme, infisert med HSV-1(F), og dyrket ved 39°C. Resultatene (Fig. 10A) viste følgende:

- (i) ICP35c og -d autokatalyserte ikke deres spaltning til ICP35e og -f, idet lysatene fra cellene kotransfektet med plasmid N og E (Fig. 1) ikke inneholdt ICP35e og -f som reagerte med det CMV-monoklonale antistoffet (spor 8).
- (ii) ICP35c og -d ble ikke spaltet i BHK-celler kotransfektet med plasmidene N og C eller I (sporene 7 og 6). Plasmidene C og I inneholder mangler i henholdsvis promotor-regionen og ved polyadenyleringssetet i den U_L26 åpne leseramme (Fig. 1).
- (iii) ICPc og -d ble spaltet i ICP35e og -f i BHK-celler kotransfektet med plasmidene N og A eller B. Plasmidene A og B inneholder henholdsvis den intakte U_L26 -promotoren og åpen leseramme og den U_L26 kodende sekvensen aktivert av $\alpha 4$ -promotoren (sporene 5 og 4). Den $\alpha 4$ -aktiverende faktor er HSV-1(F), og aktiverer $\alpha 4$ -promotoren til et høyt nivå ved 39°C. Det høye nivå for produksjon av U_L26 kan forklare nærværet av de spaltede formene av ICP35 (formene e og f) i lysatene fra celler kotransfektet med plasmidene N og B (spor 4).

Resultatene viser at U_L26 koder for et protein som deltar i spaltningen av ICP35c og -d til ICP35 e og -f.

For å bestemme hvorvidt U_L26 er det eneste virusprotein som kreves for denne spaltning for å utelukke muligheten av at virusgener som produseres av HSV-1(F)-genomet ved 39°C bidrar til katalysen av ICP35, ble BHK-celler kotransfektet med en bestemt mengde plasmid L og forskjellige mengder av plasmid B siden genene koder henholdsvis for substratet og enzymet for spaltningen. I plasmid L (Fig. 1), var den U_L26 åpne leseramme regulert av $\alpha 4$ -promotoren, og CMV-epitopen ble satt inn ved MstII-restriksjonsendonukleasetet, mens plasmid B inneholdt den intakte U_L26 åpne leseramme drevet av den samme promotoren. Siden $\alpha 4$ -promotoren er en sterk eukaryot promotor som permanent uttrykkes i transfektete celler (Kristie & Roizman, 1991; Post et al., 1981), krevet ikke ekspresjon av $U_L26,5$ - og U_L26 -proteiner i celler transfektet med plasmidene L og B superinfeksjoner med HSV-1(F). Resultatene (Fig. 10B) var som følger:

- (i) I fravær av virusinfeksjon var ICP35c og -d de eneste to formene uttrykt i cellene transfektert med plasmid L (spor 17). Den epitopisk markerte ICP35 uttrykt av plasmid L, var fullt spaltet i celler superinfisert med HSV-1(F) ved den permissive temperaturen (spor 18). Som ventet laget ikke plasmid B produkter som reagerte med anti-CMV-antistoffet (spor 11).
- (ii) I nærvær av plasmid B som inneholder U_L26, ble den epitop-markerte ICP35c og -d uttrykt av plasmid L, spaltet til ICP35e og -f. Ved lave konsentrasjoner av plasmid B, var omfanget av ICP35e- og -f-produksjon direkte proporsjonal med mengden av U_L26-plasmid-DNA ko-transfektet med plasmid L i BHK-celler (sporene 12 til 16). Nedgangen i mengdene av ICP35e og -f observert i nærværet av de høyeste mengdene av plasmid B, kan avspeile konkurranse mellom de to plasmidene eller redusert utbytte som et resultat av giftvirkning forårsaket av de store mengdene DNA.

Konklusjonen fra disse studiene er at produktet U_L26 er den eneste virusfaktor som er både nødvendig og tilstrekkelig til å spalte ICP35c og -d til ICP35e og -f.

EKSEMPEL 11

Proteasen forårsaker karboksylterminal spaltning

Et fotografi av polypeptidet fra celler transfektet med plasmider og enten kontrollinfiserte eller superinfiserte med HSV-1(F) (HSV-1) eller HSV-2(G) (HSV-2) enten ved 34°C (34°, sporene 1 og 4), ved 39°C (39°, sporene 2 og 5), eller ved 37°C (sporene 3 og 6-14), elektroforetisk separert i denaturerende polyakrylamidgeler, elektrisk overført til en nitrocellulosemembran, reagert med monoklonalt antistoff H725 (HSV-antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff) og farget med geit-antimus-IgG-antistoff koblet til peroksydase, er vist i Fig. 11. Bokstavene over toppen på gelen identifiserer plasmidkonstruksjonene som cellene ble transfektet med. En strek indikerer at cellene ble infisert, men ikke transfektet.

En annen side ved denne oppfinnelse er typen spaltning utført av proteasen. Spaltning av ICP35c, d til e, f omfatter karboksyl-terminal proteolytisk spaltning.

Siden ICP35e, f, spesifisert av plasmid N, vandret sammen i denaturerende geler med ICP35c, d laget i HSV-1 infiserte celler (Fig. 10, panel A, sporene 1 og 5), kan det antas at delen av ICP35 spaltet under prosesseringen er omtrent lik størrelsen på den CMV-aminosyresekvensen som er satt inn i plasmid N. For å bestemme hvorvidt ICP35-prosessering omfatter karboksylterminal proteolytisk spaltning, ble BHK-celler transfektert med plasmidene J, R, S og W og superinfisert med HSV-2. Plasmid R inneholdt CMV-epitopen (sekvens A) innsatt i PmlI-setet til $U_L26,5$, mens i plasmidene S og W var innsettingen ved den karboksylterminale aminosyre. Analyser av de elektroforetisk adskilte, elektrisk overførte polypeptidene med de anti-HSV-1- (H725) og anti-CMV- (CH28-2) monoklonale antistoffene avslørte følgende (Fig. 11):

- (1) Celler transfektert med plasmid J hvor CMV-epitopen ble satt inn i MstII-setet 122 aminosyrer oppstrøms for U_L26 stoppkodonet, laget både forløperen ICP35 c, d og produktene ICP35e, f som reagerte med CMV-antistoffet (spor 8).
Nedgangen i den elektroforetiske vandring til ICP35c, d, e og f i forhold til villtypeproteinene, svarte til økningen i molekylvekten på grunn av innsettingen av CMV-epitopen.
- (2) Bare ICP35c, d ble laget i celler transfektert med plasmid Q (sporene 3 og 6). I dette plasmidet ble CMV-epitopen satt inn i PmlI-setet til U_L26 , som er 21 aminosyrer oppstrøms fra $U_L26,5$ -stoppkodonet. Identifiseringen av ICP35c, d formene ble basert på observasjonen at de vandret sammen med de korresponderende formene som var spesifisert av plasmid L som uttrykte bare ICP35c, d i transfekterte celler (Fig. 10, panel B, spor 17).
- (3) Innsetting av sekvens C i plasmid R ved PmlI-restriksjons-
endonukleasesetet ødela dette setet og laget et nytt PmlI-spaltingssete mellom den karboksylterminale aminosyre og stoppkodonet til U_L26 uten å forandre aminosyresekvensene til enten U_L26 eller $U_L26,5$. ICP35c, d, e og f påvist med H725-monoklonalt antistoff vandret sammen med de naturlige

proteinene (spor 11), hvilket antydte at innsettingen av sekvens C ikke hadde noen virkning på ICP35-ekspresjon og spaltning.

- (4) I plasmid S og W ble CMV-epitopen satt inn i det nye PmlI-setet i plasmid R ved karboksylenden i $U_L26,5$. Celler transfektert med disse plasmider laget ICP35c, d, e og f som reagerte med HSV-1 H725-monoklonalt antistoff (sporene 10, 14), men bare ICP35c og d-formene reagerte med CMV CH28-2-monoklonalt antistoff (sporene 9, 14). Det betydelige funnet er at mens ICP35c, og d-formene i plasmid S vandret sammen med de tilsvarende former i plasmid J, dvs. de var 21 aminosyrer lengere enn villtype, indikerte ICP35e, f at den innsatte aminosyresekvensen som kodet for CMV-epitopen var fjernet (sporene 9 og 10). Produktene som var spesifisert av plasmid W, oppførte deg på samme måte (Fig. 11). ICP35e, og f spesifisert av plasmid W var mer rikelig enn de som var laget av plasmidene S og R, muligens fordi plasmid W var den hele U_L26 åpne leseramme satt sammen igjen, og mer av proteinproduktet ble uttrykt og gjort tilgjengelig for prosessering.

Spaltingen av forløpet ICP35-protein er omtrent 20 aminosyrer fra det karboksylterminale kodon. Bevis for denne konklusjon var at

- (1) innsetting av CMV-epitopen 21 aminosyrer fra enden hemmet med spaltingen, mens innsettingen av epitopen ved karboksylenden gjorde at spaltingen fungerte;
- (2) den felles elektroforetiske mobilitet til ICP35e', og f' (med CMV-epitop) og ICP35c, d. Den felles vandring plasserer CMV-innsatt e og f i den omtrentlige samme gelposisjon som c, d i den naturlige proteasen.

En uventet korrelasjon mellom spaltningsmekanismen benyttet for å lage ICP35-subenheter og å autospalte U_L26 -proteasen var at begge omfatter karboksylterminal proteolytisk spaltning. I seksjonene foran, ble det vist at U_L26 er den eneste virusfaktor som er ansvarlig for den karboksylterminale proteolytiske behandling av ICP35. U_L26 som koder for proteasen og $U_L26,5$ som koder for ICP35, deler også den samme karboksylterminale amino-

syresekvensen. Muligheten at U_L26 spalter seg selv kom fra observasjonen at i BHK-celler transfektert med plasmid P (Fig. 1) og superinfisert med HSV-1(F) enten ved 34°C eller ved 39°C, uttrykte et dobbeltbånd av U_L26 (Fig. 11, spor 4 og 5) som reagerte med CH28-2-monoklonalt antistoff. Denne observasjon antydde muligheten at U_L26 kan katalysere sin egen spalting fordi HSV-1(F) uttrykker primært α -gener ved 39°C.

EKSEMPEL 12

Proteasen spalter seg selv

I Fig. 12 er vist et autoradiografisk bilde av ^{35}S -metionin-merkede polypeptider kodet for av den U_L26 åpne leseramme, og elektroforetisk adskilt på en denaturerende polyakrylamidgel. Den U_L26 åpne leseramme inneholdt i plasmidene U og V (Fig. 1) ble transkribert in vitro og translatert i et nukleasebehandlet kaninretikulocyttylsat. Sporene som vises gir posisjonene etter at prøve fra translasjonsblandingen er fjernet ved 10, 20, 90 og 360 minutter etter translasjonsstart. For eksemplene vist i sporene 4-7 og 12-15, ble cykloheksimid tilsatt translasjonsblandingen i 10 minutter etter start av translasjonen for å hemme videre translasjon. I sporene 1-3 ble translasjonsblandingen ved 10 minutter etter translasjonsstart fortynnet 10 ganger i fosfatbufret saltvann som inneholdt cykloheksimid (100 $\mu\text{g/ml}$).

Ytterligere bevis for at U_L26 kan katalysere sin egen spaltningskom fram fra in vitro-studier. RNA transkribert fra plasmidene U eller V (Fig. 1) in vitro ved T7 i Sp6 RNA-polymerasen, ble translatert i et nukleasebehandlet kaninretikulocyttylsat i nærvær av [^{35}S]-metionin. Analyser av de elektroforetisk separerte produktene fra translasjonsreaksjonen var som følger (Fig. 12):

- (1) Inkubasjon av translasjonsproduktene fra U-plasmidet i nærvær av cykloheksimid resulterte i gradvis oppsamling av spaltningsproduktet (Prb) av U_L26 -proteinet. Mengden oppsamlet spaltningsprodukt var proporsjonal med varigheten av inkubasjonen (sporene 16-19).

- (2) Identiske resultater ble oppnådd med translasjon av produktene fra plasmid V. Betydningen av dette eksperiment kommer fra nærværet av CMV-epitopen ved den karboksyl-terminale ende av U_L26. Som ventet, vandret forløperformen til U_L26 laget fra plasmid V langsommere enn det naturlige proteinet som stammet fra plasmid U. Imidlertid, den spaltede form av U_L26 syntetisert fra plasmid V vandret sammen med det naturlige proteinet fra plasmid U, hvilket antyder at U_L26- autospaltning omfatter karboksylterminal proteolytisk spaltning.

EKSEMPEL 13

Spaltning av ICP35c, d og Pra er sekvensspesifikke og skjer på samme sted

Autoradiografiske bilder (Fig. 13, panel A) og et fotografi av polypeptider (Fig. 13, panel B), enten syntetisert in vitro fra sekvenser kodet for i plasmidene U eller Y eller inneholdt i lysater fra celler transfektert med plasmidene X eller Z og superinfisert med HSV-1(F) eller HSV-1(G), er vist i Fig. 13. In vitro-syntetiserte polypeptider og de som cellelysaten inneholdt, ble elektroforetisk adskilt i den samme denaturerende 12% polyakrylamidgel, elektrisk overført til en nitrocellulosemembran, og reagert med monoklonalt antistoff-antimus-IgG konjugert med pepperrotperoksydase (anti-IgG) bare, eller med dette anti-IgG antistoff i tillegg til det monoklonale antistoffet H725 (HSV antistoff) eller CH28-2 (CMV antistoff). En strek indikerer at cellene ble infisert, men ikke transfektert. Polypeptidene vist i panel A ble merket med ³⁵S-metionin. Båndbetegnelse var som følger: Bokstavene c, d, e, f uten apostrof identifiserer naturlig ICP35-produkter fra U_L26,5 åpen leseramme. Pra og Prb er translasjonsspaltede former fra proteaseproduktene til den U_L26 åpne leseramme. Dobbel og trippel apostrof viser at proteinet også inneholder CMV-epitopen og sekvensen som koder for henholdsvis to IgG og fem IgG-bindingsområder fra stafylokokkus-

protein A. PA'' og PA''' er karboksylterminale produkter fra spaltningen av ICP35c, d, og Pra-proteiner som inneholder deler av CMV-epitopen og IgG-bindingsområdene.

Spaltingen av ICP35c, d og Pra er sekvensspesifikke og skjer på samme sted. Resultatene fra eksperimentene vist her, viste at spaltning/prosessering av produktene fra U_L26 og U_L26,5 opptrådte på et sted omtrent 18-25 aminosyrer fra karboksylenden til proteinene. For å vise at prosesseringen av disse proteinene opptrer på det antatte stedet, var det nødvendig å vise begge produktene fra spaltningsreaksjonen på samme gel. For å synliggjøre begge produktene, var det nødvendig å sette inn i den kodende sekvensen ved den antatte karboksylenden både epitopen for CMV-monoklonalt antistoff og sekvensene som kodet for IgG-bindingsområdene fra stafylokokkprotein A. Plasmidene X og Z ble konstruert ved å sette inn i ramme sekvensene som kodet for 129 og 256 aminosyrer som besto av henholdsvis to og fem IgG-bindingsområder fra protein A, i leseramme mellom 3'-enden til CMV-epitopen og stoppkodonet til U_L26 (Fig. 1).

To eksperimenter ble utført. I det første ble de HSV-1 åpne leserammene i plasmidene U og Y transkribert og translatert i seks timer. Proteinene translatert in vitro ble så elektroforetisk adskilt på en denaturerende gel (Fig. 13, panel A). I det andre eksperimentet ble BHK-celler transfektet med plasmidene Z eller X og så superinfisert med HSV-2(G). Cellelysaten ble elektroforetisk adskilt på den samme gel som den benyttet for adskillelsen av det in vitro-translaterte proteinet, elektroforetisk overført til en nitrocellulosemembran og reagert med antistoff til CMV, HSV eller med anti-IgG-antistoff som ville binde til IgG-bindingsområder i protein A (Fig. 13, panel B). Resultatene var som følger:

- (i) Autokatalytisk spaltning av de in vitro-transkriberte, translaterte HSV-1-sekvensene i plasmid U ga som ventet proteinbåndene betegnet som Pra og Prb. Lignende autokatalytisk spaltning av produktene i Z-båndet ga tre bånd. Det første båndet vandret langsommere enn det naturlige forløper-Pra-båndet, som ville bli forventet fra tilstedeværelsen av

ytterligere 256 aminosyrer av protein A, og 21 aminosyrer som representerte CMV-epitopen. Det andre båndet vandret sammen med Prb-båndet og er derfor produktet fra den autokatalytiske spaltningen av translasjonsproduktet. Det tredje båndet vandret sammen med båndene beskrevet nedenfor og som reagerte med CMV så vel som med anti-IgG-antistoffet.

- (ii) De forventede translasjonsproduktene fra plasmid X var ICP35c, d og Pra. Det kunne forventes at translasjonsproduktene fra plasmid Z skulle være like, bortsett fra at, fordi de innsatte protein A-sekvensene var mindre, skulle disse proteinene følgelig vandre hurtigere enn de fra plasmid X. Dette var faktisk tilfelle (sammenlign sporene 3, 5 og 8 med de i 4, 6 og 9). Det kunne også forutses at hvis spaltingen av ICP35c, d, opptrer som forventet 20 aminosyrer fra karboksylenden til det naturlige protein, skulle de aminoterminal produktene av spaltningsreaksjonen vandret sammen med den naturlige ICP35 og reagere bare med det HSV-1-monoklonale antistoff. Dette var faktisk tilfelle siden ICP35e og f laget av plasmid Z og X (sporene 5 og 6) vandret sammen med de naturlige ICP35 e og f (spor 7) og kunne påvises utelukkende ved hjelp av det HSV-1-spesifikke monoklonale antistoffet. Omvendt, kunne det forventes at de karboksylterminale produktene av spaltningsreaksjonen skulle vandre ifølge deres størrelse, og skulle reagere med både anti-IgG og CMV-antistoffer. Som vist i panel B i Fig. 7 vandret båndene som reagerte med anti-IgG-antistoffet fra cellelysaten transfektert med plasmid X langsommere enn de korresponderende Z-båndene. Imidlertid, fordi alle de karboksylterminale spaltningsproduktene inneholdt IgG-bindingsområdene til protein A, ville alle proteinproduktene forventes å reagere med IgG uansett spesifisitet av immunoglobulinet (f.eks. båndene 5 og 6).

Siden begge produktene ble påvist, antyder resultatene at ICP35c, d og Pra, at produktene fra henholdsvis $U_{L26,5}$ og U_{L26} , er begge translasjonelt prosessert ved spalting. Fordi de to

proteinene deler aminosyresekvenser for hele lengden av ICP35c, d og fordi produktene av spaltningen av de to proteinene går sammen, er de to proteinene spaltet ved identiske steder. Endelig, translasjonsproduktene fra begge de åpne leserammene in vitro løser seg opp i doble bånd. De dobbelte båndene bemerkes spesielt i tilfelle med ICP35 (formene c og d). I alle eksperimentene gjort hittil, inklusive de vist i Fig. 11, dannet det karboksylterminale produktet av spaltningen et enkelt bånd. Denne observasjon er overstemmende med hypotesen at forskjellene i proteinene som danner dublettene er ved den aminosyreterminale heller enn ved den karboksylterminale del av proteinene.

EKSEMPEL 14

Ekspresjonssystemer for protease som en undersøkelsesmåte

Vist i Fig. 14 er det autoradiografiske bilde av ^{35}S -metioninmerkede polypeptider kodet for av U_L26 åpen leseramme elektroforetisk adskilt på en denaturerende gel. Den U_L26 åpne leseramme inneholdt i plasmid U og Y (Fig. 1) ble transkribert in vitro og translatert i nukleasebehandlet kaninretikulocyttylsater. Spor 1 viser en prøve fjernet fra translasjonsblandingen ved 360 minutter etter translasjonsstart. Sporene 2-5 viser prøver fjernet fra translasjonsblandingen etter 10 minutter (0) eller ved 360 minutter (360) etter translasjonsstart. For eksemplene vist i sporene 2-5, ble den tilsvarende mengde translasjonsblanding ved 10 minutter etter translasjonsstart fortynnet 20 ganger i fosfatbufret saltvann som inneholdt cykloheksimid (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) og enten natriumdodecylsulfat (SDS) (0,4%) (spor 3) eller fenylmetan-sulfonylfluorid (PMSF) (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (spor 4).

Som vist i Fig. 14, var PMSF i stand til å delvis hemme proteasens selvspaltning. I spor 5 er normal cellespaltning vist. I spor 3 er det en 100% hemming av SDS. Tolkningen av Fig. 14 er at 1) SDS, et denatureringsmiddel, hemmer fullstendig proteaseaktiviteten (spor 3); 2) proteasen kan klyve seg selv i fravær av en proteasehemmer; og 3) det er en delvis hemming av proteasen av PMSF, en serinproteasehemmer.

EKSEMPEL 15**Karakterisering av områder i proteaseproteinet**

Proteaseproteinet er karakterisert ved: (i) det inneholder flere områder som ikke er krevet for dets katalytiske aktivitet og (ii) det aktive sete er den aminoterminalen delen av proteasen.

Den eksperimentelle protokoll som ble benyttet for å nå disse konklusjoner ble basert på to observasjoner. Først, innsetting av ytre aminosyresekvenser som omfatter IgG-bindingsområdene fra stafylokokkprotein A i den karboksylterminale delen av proteasen hemmer ikke selvspaltingen av proteasen, men gir et påvistbart reaksjonsprodukt. For det andre, innsetting av sekvensen som koder for en 20 aminosyrers epitop fra human cytomegalovirus monoklonalt antistoff i leseramme med de kodende områdene i U_L26 og U_L26,5 ORF'ene, tjener to formål. Først tjener det å identifisere spesifikt produktene fra disse ORF'ene. For det andre, adskillelse av forskjellige områder i proteasen, tjener til å identifisere regioner i proteasen som må være sammenhengende for dens katalytiske funksjon.

A. Kartlegging av de funksjonelle områdene i U_L26-proteinet

Tre sett mutanter av U_L26-proteasen (Tabell I) ble benyttet for å undersøke proteaseområdene. Første sett ble laget for å kartlegge de U_L26 og U_L26,5 åpne leserammene og besto av 3 U_L26-gener som ble innsatt i ramme på forskjellige steder, DNA-sekvensene kodet for en 20 aminosyre CMV-epitop.

Det andre settet besto av 10 U_L26-genkonstruksjoner med enten stoppkodons eller fjernelser som omfattet forskjellige regioner i genet (Tabell I).

Tredje sett består av 6 U_L26-gener som inneholder erstatningene i antatte aminosyresekvenser som startet i regionen for aminosyren 7 til 215. Som beskrevet i de følgende kapitler, ble U_L26-genet i hver av disse plasmidene uttrykt fra en α 4-promotor. Målet for proteasen var vanligvis U_L26-genet klonet i plasmid L (Fig. 1) og tilstede i leseramme med CMV-eptiopinnsettingen. Unntakene, klonene P og J inneholdt U_L26-genet som inneholdt CMV-epitopen enten i den kodende sekvensen til både U_L26- og U_L26,5-genet (plasmid J) eller bare i det U_L26-kodende område (plasmid P).

Typisk ble BHK-celler transfektert med plasmid L og ett av plasmidene som kodet for en protease, og superinfisert med HSV-1(F) ved 39°C. Cellelysatsene ble elektroforetisk adskilt i denaturerende geler, overført til en nitrocellulosemembran og reagert med det HSV-monoklonale antistoffet H725 som reagerer med alle U_L26,5-produktene, og CMV-monoklonalt antistoff CH28-2 som reagerer bare med U_L26,5-produktene som inneholder CMV-epitopen (se Fig. 15). Fordi HSV-1(F) inneholder en temperaturfølsom skade i α 4-genene som spesifiserer det hoved-HSV-1-regulatoriske-protein, uttrykker den ikke sin egen U_L26-protease eller substrat ved 39°C. Imidlertid, α -gen transinduserende faktor (VP16) er funksjonell ved høyere temperaturer (Post et al., 1981; Batterson et al., 1983) og transaktiverer manifestasjonen av genene som spesifiserer både proteasen (U_L26) og substratet (U_L26,5). Resultatene (Fig. 15) var som følger:

- (1) U_L26,5-genet som er i virusgenomet ga proteinbånd som reagerte med det HSV-monoklonale antistoffet ved 34°C (sporene 1 og 14), men ikke ved 39°C (sporene 2 og 15). Videre, tilstedeværelsen av produktene av proteolytisk spaltning (båndene e og f) viser at virusproteasen kodet for av U_L26 også ble laget ved 34°C.
- (2) U_L26-proteasen kodet for i virusgenomet ble ikke uttrykt ved 39°C (spor 3). Således i fravær av plasmidet som kodet for proteasen, ble substratet kodet for av plasmid L laget (båndene c, d), men ikke spaltet til å gi båndene e, f, hvilket indikerte at proteasene kodet for i virusgenomet ikke var uttrykt ved en ikke-permissiv temperatur.
- (3) Bare forstadieformene av ICP35c, d fra plasmid L ble produsert i celler transfektert med de muterte U_L26-genene i plasmidene H (spor 4), G (spor 5), CC (spor 7), D (spor 9), DD (spor 11), FF (3 spor 13), II (spor 21) og JJ (23). I disse plasmidene ble proteaseaktiviteten i genproduktet inaktivert.
- (4) Både forstadiet og produktformene av ICP35 fra plasmid L, ble produsert i celler transfektert med de muterte U_L26-genene AA (spor 6), B (Fig. 15, spor 8), BB (spor 10), EE (spor 12), GG (spor 20), HH (3 spor 19), KK (spor 22), P (spor 25), MM (spor 26) og NN (spor 27).

- (5) Som vist ovenfor var i plasmid P den 20 aminosyre-epitopen satt inn etter aminosyre 218, dvs. oppstrøms for det kodende område i substratproteinet kodet for av U_L26,5. Proteasen kodet for av plasmid P spaltet seg selv (sporene 16, 17) og ICP35 (spor 25). Plasmid J inneholdt CMV-innskuddet etter aminosyren 514 (Fig. 1). I undersøkelsene (spor 18) spaltet det produktet av U_L26 kodet for i plasmid J selv. Det eneste spaltningsproduktet påvist i denne undersøkelse var bånd e. Fordi epitopen også ble satt inn i U_L26,5-proteinet, er det sannsynlig at den innsatte 20 aminosyreepitopen hindret, og reduserte effektiviteten og klyvingen. Proteasen kodet for av plasmid Q (Fig. 1 og Tabell I) koder for en protease som spaltet produktet fra U_L26-genene spesifisert i andre plasmider, men ikke genproduktet kodet for i sitt eget område.

TABELL I

Liste av mutasjoner i genet som koder for U_L26-proteasen.
Mutasjonsbetegnelse innført i villtypegen

Innsettingsmutanter (20 aminosyre CMV-epitop)

P Innsetting etter aminosyre 218
J Innsetting etter aminosyre 514
Q Innsetting etter aminosyre 615

Konstruksjon av mangelmutanter

D Fjernelse av aminosyrer 1-220
G Fjernelse av aminosyrer 219-615
EE Fjernelse av aminosyrer 1-9
FF Fjernelse av aminosyrer 1-32
AA Innsetting av stoppkodon etter aminosyre 615
BB Innsetting av stoppkodon etter aminosyre 514
CC Innsetting av stoppkodon etter aminosyre 287
DD Innsetting av stoppkodon etter aminosyre 218
MM Innsetting av stoppkodon etter aminosyre 306
NN Fjernelse av aminosyrer 307-635

Aminosyreerstatninger

GG Gly₇AspArg med SerArgThr (nytt XbaI-sete)
 HH Asp₃₁SerGly med LeuAspMet (nytt XbaI-sete)
 II His₆₁ med Val (nytt AatII-sete)
 JJ His₁₄₈ med Ala (nytt PstI-sete)
 KK Ser₂₁₅ med Ala (nytt NheI-sete)
 LL Asp₃₄ med Ala (nytt NheI-sete)

* De erstattede sekvenser var som følger: plasmid GG: CCGGGAGACCGATG med CCGTCTAGAACCATG; plasmid HH: TATGACAGCGGGGA med TATCTAGACATGGAC; plasmid II: GACCACCGC med GACGTCCGC, plasmid JJ: GCGCACGTC med GCTGCAGTC; plasmid KK: ACGCTTCCACC med ACGCTAGCCACC; plasmid LL: GGGGACTCGGGG med GGGGCTAGCGGC.

fordi epitopen satt inn etter aminosyre 615 hindret spaltningen.

Fig. 16 er en oppsummering i form av en skjematisk tegning av resultatene fra mutagenesestudiene. Tallene refererer seg til aminosyretallene antatt fra nukleotidsekvensen i U_L26 ORF omtalt av McGeoch et al. (1988). Aminosyrene vist for innsetting er like foran innsettingssetet. Aminosyrene er identifisert ved hjelp av en enkel bokstavkode. Åpne symboler indikerer at proteasen ble inaktivert ved mutagenese. Linjen ved bunnen i figuren identifiserer områdene i proteasen (nr. I-IV). Restriksjonsendonuklease-setene ble forkortet som følger: B: BstEII, H: HpaII, M: MstII, P: PmlI. Me representerer metionintranslasjonsstartkodon i U_L26 åpen leseramme.

B. Områdekarakterisering av U_L26-proteasen

Resultatene vist i Fig. 15 og summert i Fig. 16 indikerer at U_L26-proteasen består av 4 områder hvor to kan fjernes og to ikke. De unødvendige områdene I og IV går fra aminosyre 1 til 9, men ikke til 32, og fra henholdsvis karboksylenden (aminosyre 635) til minst 307, men ikke til aminosyre 287. Område nr. III synes å gå fra minst aminosyre 218 til maksimum aminosyre 306. Dette område kan bli erstattet ved minst 20 aminosyrer (CMV-epitoppinnsetting etter aminosyre 218) relativ til den aminoterminale delen i proteasen. Område nr. II kan også erstattes og er tilsynelatende lokalisert mellom aminosyrene 10 og 218.

C. Det katalytiske område i U_L26-proteasen

Studiene med proteasehemmere antyder at U_L26 kunne forutsies å tilhøre enten chymotrypsin- eller subtilisinsuperfamiliene av serinproteasene (Kraut, 1977; Neurath, 1983). En felles egenskap av de to serinproteasesuperfamiliene er aktive seter som inneholder histidin, asparaginsyre og serinaminosyrer.

Substratet av proteasen, ICP35, er blitt rapportert å spille en rolle som et foldeprotein i sammensetningen av HSV-kapsidet (Newcomb et al., 1991). Sekvensen av begivenheter i replikasjonen av andre herpesvirus er lik, og homologer av ICP35 er blitt omtalt (Robson og Gibson, 1989). Av spesiell interesse var spørsmålet hvorvidt homologer av U_L26 ORF i andre herpesvirus inneholdt konserverte histidin, asparaginsyre og serinaminosyrer som triade spiller en rolle i den proteolytiske aktiviteten til U_L26-proteasen.

Nukleotidsekvenssammenligninger antyder at ORF 33 i varicella zoster-virus og CMV U_L80 ORF i human cytomegalo-virus koder for homologer til U_L26 ORF i HSV-1 (McGeoch et al., 1988; Chee et al., 1990; Davison og Scott, 1986). Aminosyresekvenssammenligning mellom HSV U_L26, CMV U_L80 og VZV-gen 33 proteinet antydte at aminosyreenden er den mest konserverte del av U_L26-proteasen. Konklusjonen at proteasen ligger i det aminosyreproksimale område til U_L26 ORF, er overensstemmende med observasjonen at ICP35, produktet av U_L26,5 ORF, mangler enzymaktivitet. For å undersøke de konserverte aminosyrene i det aminosyrenære område i U_L26, ble erstatningen i aminosyrene kodet for i plasmidene GG, II, JJ, KK og LL forsøkt Asp₃₁Ser₃₂, Asp₃₄, His₆₁, His₁₆₈ og Ser₂₁₅. Resultatene viste at bare aminosyrene hvis substitusjoner fjernet enzymaktivitet, var de konserverte histidinene i posisjonene 61 og 148. I påvente av mer presise kartleggingsstudier, lokaliserer det katalytiske område i proteasen mest sannsynlig til område II i U_L26-proteasen.

D. Funksjonen til andre områder i U_L26-proteasen

Funksjonene til områdene I, II og III er ikke kjente. Fordi substratet, ICP35, aggregerer til å danne foldingen av HSV-kapsidene, er det sannsynlig at proteasen også er inn-blandet i foldingen og at minst område III og mulig også I og IV kreves for å kompleksere med ICP35.

EKSEMPEL 16

U_L26-genet koder for en serinprotease

Den 20 aminosyre CMV-epitopen beskrevet her og det 256 aminosyre IgG-bindende område til protein A (plasmid Y, Fig. 1) ble satt inn mellom den siste aminosyren og stoppkodonet for U_L26 ORF. Transkriptene fra det kodende område i plasmid Y fra Sp6 RNA-polymerasen ble translatert i et nukleasebehandlet kaninretikulocyttyllysats i nærvær av [³⁵S]-metionin i 10 minutter. Cykloheksimid ble tilsatt for å stoppe videre translasjon, og translasjonsproduktet fra Y-plasmidet ble inkubert for ytterligere 6 timer for å tillate selvspalting i nærvær av proteasehemmere. Produktene av reaksjonen ble så elektroforetisk adskilt på denaturerende polyakrylamidgeler. Autoradiografiske bilder av de elektroforetisk adskilte polypeptidene translatert in vitro i et nukleasebehandlet kaninretikulocyttyllysats fra de syntetiske RNA'ene transkribert in vitro fra U_L26 ORF klonet i plasmidkonstruksjon Y, er vist i Fig. 17. Sporene som er vist representerer prøver denaturert fra elektroforese like etter 10 minutters syntese (spor 15, 28) eller etter ytterligere 6 timer inkubasjon i nærvær av cykloheksimid (100 µg/ml) alene eller med proteasehemmere (µM) (sporene 1-4, 16-27 og 29-47). Alle proteasehemmerne ble løst opp i dimetylsulfoksyd (DMSO) før bruk.

Resultatene (Fig. 17) ble som følger:

- (1) Produktene av 10 minutters translasjon ga et enkelt merket polypeptidbånd som inneholdt ikke-spaltet protease (Pra) (sporene 15 og 28).
- (2) Etter seks timers inkubasjon i nærvær av cykloheksimid (100 µg/ml), men i fravær av proteasehemmere, ga translasjonsblandingen tre bånd som svarte til det intakte translasjonsproduktet (Pra), de aminoterminalene (Prb) og de karboksylterminale (PA) delene av spaltningsproduktene i translasjonen (sporene 9, 10, 21, 22 og 33).
- (3) Mengden spaltningsprodukter, Prb og PA ble redusert i translasjonsblandinger som ble reagert med cykloheksimid og de mindre konsentrasjonene av serinproteasehemmerne diisopropylfluorofostat (DFP, Sigma, St. Louis, MI), L-1-tosylamido-2-fenyletylklormetylketon (TPCK, Sigma), fenylmetyl-

sulfonylfluorid (PMSF, Sigma) og chymostatin (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). I de høyeste konsentrasjonene testet, ble spaltningsproduktene ikke påvist (sporene 1, 29, 34, 39 og 44).

- (4) Spaltingen av translasjonsproduktet (Pra) ble ikke påvirket av cysteinproteasehemmerne jodeddiksyre (Sigma) og cystatin (Boehringer Mannheim; sporene 5-9, 22-27), av etylenglykolbis (β -aminoetyleter), N,N,N',N'-tetraeddiksyre (EGTA), en chelator og hemmer av metalloprotease (sporene 12-14), eller av asparaginsyreproteasehemmeren pepstatin (Boehringer Mannheim; sporene 15-21).

Disse resultatene er overensstemmende med hypotesen at U_L26 -genproduktet er en serinprotease.

EKSEMPEL 17

Påvisning av en kandidathemmersubstans

I fremdeles videre utførelsesformer omfatter den foreliggende oppfinnelse en metode for å identifisere nye herpesvirusproteasehemmende forbindelser, som kan bli betegnet som "kandidatforbindelser". Det er antatt at denne undersøkelsesteknikk vil være anvendbar i en generell påvisning av enhver forbindelse som vil ha som formål å hemme herpesproteasen. Det er videre antatt at anvendbare forbindelser i dette henseende ikke på noen måte vil være begrenset til forbindelser av protein- eller peptidnatur. Faktisk kan det vise seg å være tilfelle at de mest anvendbare farmakologiske forbindelser for identifisering gjennom bruk av undersøkelsesmetoden vil være av ikke-peptidnatur, og, f.eks., vil bli gjenkjent og bundet av enzymet, og tjene til å inaktivere enzymet gjennom en tett binding eller annen kjemisk reaksjon.

Således, i disse utførelsesformene, er den foreliggende oppfinnelse rettet mot en metode for å bestemme evnen til en kandidatforbindelse når det gjelder å hemme en herpes simplex virusprotease, fremgangsmåten er generelt karakterisert av trinnene:

- (a) fremstilling av en sammensetning som består av en herpesprotease som er i stand til å spalte sin egen aminosyresekvens, eller spalte ICP35-proteinet eller enhver aminosyresekvens som inneholder spaltningssetet for denne protease;
- (b) blanding av en kandidatsubstans med proteasesammensetningen; og
- (c) bestemmelse av evnen til proteasen og utføre spaltning i nærværet av kandidatforbindelsen.

En viktig side av kandidatforbindelsesundersøkellesmetoden her er evnen til å lage en proteasesammensetning i en relativt rensert form, f.eks. på en måte som diskutert her. Dette er en viktig side av kandidatforbindelsesundersøkellesmetoden i at uten minst et relativt rensert preparat, vil en ikke være i stand til å undersøke spesifikt proteasehemming, i forhold til virkningene av hemming av andre forbindelser i ekstraktet som kan påvirke proteasen. Ethvert tilfelle, den vellykkede isoleringen av proteasen tillater nå for første gang å identifisere nye forbindelser som kan bli benyttet for å hemme dette herpesavledede protein.

Kandidatundersøkellesmetoden er ganske enkel å sette opp og utføre, og er beslektet på mange måter til fremgangsmåten diskutert ovenfor for å bestemme proteaseaktivitet. Etter å ha oppnådd et relativt rensert preparat av proteasen, ønsker man å blande en kandidatforbindelse med proteasepreparatet, fortrinnsvis under betingelser som tillater proteasen å utføre sin spaltningsfuksjon, men inkludere en hemmende forbindelse. Således, f.eks., ønsker en typisk å inkludere i blandingen en mengde av et kjent proteasesubstrat slik som aminosyresekvensen kodet for av den U_L26-kodende sekvens eller minst spaltningssetet der proteasen klyver ICP35c, d til e og f. På denne måten kan en måle kandidatforbindelsenes evne til å redusere eller forandre spaltningen av herpesproteasesubstratet sammenlignet med når kandidatforbindelsen er tilstede.

Følgelig ønsker en å måle eller på annen måte bestemme aktiviteten til den relativt rensede proteasen i fraværet av den målte kandidatforbindelsen, sammenlignet med aktiviteten i nærværet av kandidatforbindelsen for å bedømme den relative hemmende evnen til kandidatforbindelsen.

I fremdeles en annen utførelsesform, omhandler den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å hemme en protease som omfatter inkubering av proteasen med en effektiv konsentrasjon av en proteasehemmer slik som en av familien til peptidforbindelsene diskutert ovenfor, eller med en kandidatforbindelse som er identifisert ifølge kandidatundersøkelserutførelsesformene. Dette er selvfølgelig en viktig del av oppfinnelsen ved at det antas at ved å hemme herpesproteasen, vil en være i stand til å behandle forskjellige sider av herpesinfeksjonene. Det antas at bruk av slike hemmere til å blokkere virkningen av proteasen til å lage kapsidproteiner vil tjene til å behandle eller lindre infeksjonen, og kan være anvendbar i seg selv eller sammen med andre herpes-behandlinger.

1. Markører (sporforbindelser)

To monoklonale antistoffer ble benyttet som markører (sporforbindelser), en mot den stasjonære epitopen kodet for av både U_L26 og $U_L26,5$ åpne leserammer og en som reagerte med en "bevegelig epitop". Den sistnevnte var et uvurderlig verktøy i påvisning av produktene fra de to åpne leserammene, i bestemmelsen av funksjon til proteinene, og i kartlegging av spaltningssetet. Uten den "bevegelige epitopen" ville analysen avhenge bare av radioaktive markører eller monoklonale antistoffer mot oligopeptider som svarte til forskjellige områder i genene. Den bevegelige epitopen tillater øyeblikkelig antistoff mot produktet fra en av de åpne leserammene og, når benyttet i sammenheng med den foreliggende oppfinnelse, underletter den sterkt identifiseringen av genproduktets funksjon hvori den er blitt innsatt.

Ved å innsette den kodende sekvens til en epitop som reagerer med et cytomegalovirus monoklonalt antistoff og homologer av det IgG-bindende område til stafylokokkprotein A i de 3'-endene til de kodende områdene i de to åpne leserammene, ble produktene av proteasespaltningen identifisert, den spaltede proteasen, betegnet Prb og ICP e og f. Det ble også bestemt ved denne fremgangsmåte at spaltningssetet for ICP35-proteinene og at separering av hele proteasesekvensen i Pra og Prb, er omtrent 20 aminosyrer fra karboksylenden til begge proteasene og ICP-forstadiet.

Som eksempel for undersøkelsen av herpesvirusgenomet ved bruk

av plasmider med markører, er effekten av en av de markørinnsatte plasmidene, S (Fig. 1), som ble benyttet for å transfektere celler med en del av herpesgenomet, illustrerende. I dette plasmid ble CMV-epitopen satt inn ved den karboksylterminale ende av sekvensen av ICP35. Cellene som ble infisert med en del av herpesgenomet på denne måte, ble så samlet og ødelagt slik at proteinene i cellene kunne bli analysert. Disse proteinene ble så elektroforetisk adskilt ved hjelp av molekylvektbestemmelse i bånd. ICP35 er immunologisk identifiserbart ved HSV-antistoffet. CMV-epitopen ble lett etter blant båndene ved å reagere antistoffet med epitopen og påvise et signal som indikerte produksjonen av et antigen-antistoffkompleks. Resultatene av disse immunologiske analyse viste at CMV-epitopen ble påvist i båndene c og d, men ikke i e og f. Dette viste at spaltingen av karboksylenden til c og d, hadde funnet sted slik at e og f ble dannet.

2. Cellefri proteinsyntese

En annen nyttig fremgangsmåte var et cellefritt proteinsyntesystem. RNA'er som korresponderte til mRNA'ene til U_L26 og $U_L26,5$ ble transkribert ved Sp6 RNA-polymerase og translatert i nukleasebehandlet kaninretikulocyttlysater, en cellefri, "ribosom-maskin". Proteinene translatert i cellefrie systemer in vitro ble merket med radioaktive markører, adskilt ved gelelektroforese, og undersøkt med autoradiografi for å lokalisere båndet som inneholdt markørene. Det var to sett eksperimenter hvor denne generelle fremgangsmåte ble benyttet:

- (i) Inkubasjon av translasjonsproduktene til U-plasmidet i nærvær av cykloheksimid, hvilket resulterte i gradvis oppsamling av spaltningsproduktet (Prb) fra U_L26 -proteinene. Mengden av oppsamlet spaltningsprodukt var proporsjonal med varigheten av inkubasjonen (Fig. 12, sporene 12-15).
- (ii) Identiske resultater ble oppnådd med translasjonsproduktene til plasmid V (sporene 4-7). Betydningen av dette eksperimentet stammer fra nærvær av CMV-epitopen ved karboksylenden til U_L26 . Som ventet, vandret translasjonsproduktet Pra fra U_L26 laget fra plasmid V, langsommere enn det naturlige

proteinet som stammet fra plasmid U. Imidlertid vandret den spaltede form Prb fra U_L26 syntetisert fra plasmid V sammen med det naturlige proteinet fra plasmid U, hvilket antydte at U_L26-autoprosessering omfatter karboksylterminal proteolytisk spaltning.

3. HSV-1(F), en temperaturfølsom mutant

Et annet verktøy benyttet i analyse av HSV-genomet var HSV-1(F), en temperatursensitiv mutant som ved 39°C ikke uttrykker sin egen U_L26 og U_L26,5 åpne leseramme. Istedenfor induserer HSV-1(F) ved ikke-permissiv temperatur α -gen-promotorer (Post et al., 1981) og uttrykker primært α -typegenene.

4. Identifisering og bruk av proteasehemming

Hvis virkningen til proteasen hemmes, kan ikke kapsidet bli laget og viruset vil ikke bli replikert. Denne hemming kan være enten på nivået av transkripsjon, translasjon eller på proteinvirkning. Hemming av transkripsjon ville nødvendiggjøre hemming av mRNA-dannelse på et DNA-templat. Hemming av translasjon nødvendiggjør hemming av proteinsyntesen på mRNA-templatet. Alternativt, virkningen av proteasen kan selv bli avbrutt enten ved å ødelegge strukturen til proteasen, spesielt dens proteolytiske del, ved å endre spaltningsstedet til substratet, eller binding av proteasen til irreversible hemmere.

Spesifikke konstruerte peptider som blokkerer funksjonen til proteasen er meget verdifulle i å hindre og behandle herpesinfeksjoner. Utførelsesformer av disse blokkerne omfatter enhver substratanalog eller serinproteasehemmer, f.eks. oligopeptider eller deres forbindelser som inneholder aminosyresekvensen til spaltningsstedet som gjenkjennes av proteasen. Fremgangsmåter for å identifisere passende proteasehemmere fra kandidatforbindelser er beskrevet i Eksempel 17.

Det er en ytterligere hensikt å gi greie hjelpemidler for å lage virusproteasen for bruk i å påvise hemmere, for å utvikle behandlingssystemer, for å utvikle antistoffer for påvisning av virusinfeksjon, og for å utvikle inaktive mutanter av proteasen.

Et eksempel på utførelsesform for å lage proteaseproteinet er å lage et nukleinsyresegment som omfatter et nukleinsyresegment som er i stand til å kode for det ønskede proteaseproteinet eller polypeptidet. Dette segment kan være slik at det koder for hele proteasen eller bare for en del av det, f.eks., det proteolytiske område i proteasen. Segmentet kan være så lite som det som er i stand til å utløse et positivt signal med et antistoff, derved, identifisere tilstedeværelsen av en virusinfeksjon. Segmenter som er funksjonelt likeverdige til de vist i Fig. 1, som ble utviklet for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse, kan også bli valgt avhengig av det ønskede polypeptidet som skal produseres. Funksjonell likeverdighet kan bli bestemt ved å teste hvorvidt segmentet kan spalte enten ICP35-forstadiet eller Pr-proteasen, f.eks., ved bruk av fremgangsmåter beskrevet her for å påvise proteasehemmere blant kandidatforbindelser.

Nukleinsyresegmentet som er valgt blir overført til et miljø som passer for å uttrykke segmentet som et polypeptid. Dette miljø kan være et kar som inneholder en blanding som er i stand til å sette i gang produksjon, f.eks., et kaninretikulocyttylsat. Alternativt kan segmentet bli overført til en vertscelle ved transformasjon, transfeksjon via en rekombinant produksjonsvektor, elektroporering eller en "gen-revolver". Vertscellen kan bli valgt fra BHK-celler, Vero, Hela, E. coli, og lignende.

Den rekombinante produksjonsvektor kan omfatte en promotor. Utførelsesformer vedrørende promotorer er α 4-promotoren, den naturlige promotoren til U_L26,5, og enhver annen prokaryot eller eukaryot promotor.

I en annen utførelsesform, kan nukleinsyresegmentet bli laget ved å benytte genomiske nukleinsyrer fra herpesceller, opproduksjon av et proteolytisk setebevart nukleinsyresekvensområde i den genomiske nukleinsyren, fremstilling av rekombinante kloner som omfatter nevnte opproduserte nukleinsyresekvenser, og seleksjon av kloner som er karakterisert ved den ønskede forsterkede nukleinsyresekvens.

Virusproteasen kan også bli laget ved å oppnå en prøve som inneholder proteasen, homogenisering av prøven, og oppdeling av homogenatet for å lage en proteasefraksjon. Prøver som inneholder proteasen vil omfatte biologiske prøver, f.eks. virusinfisert vev.

5. Behandling av herpesinfeksjoner

Behandlingssystemer som vurderes omfatter overflate- og systemiske medikamenter. For underhud og hudsykdommer blir kremer, oljer eller spray som inneholder en proteasehemmer, vurdert. Alternativt, systembehandling ved hjelp av intravenøs injeksjon eller inntak antas å hindre alvorlige utbrudd av virusreplikasjon på grunn av reaktivering av latent virus som bebor vertsceller.

6. Virus og celler

Egenskapene til HSV-1(F) og HSV-2(G), henholdsvis prototypen HSV-1- og HSV-2-stammene, benyttet i oppfinnelsen, og opprettelse og videreføring av tymidinkinase minus babyhamsternyre- (BHK) celler, er blitt beskrevet tidligere og er inntatt her som referanse (Arsenakis et al., 1986; Ejercito et al., 1968; Roizman og Spear, 1968).

7. Monoklonale antistoffer

Monoklonalt antistoff H725 og CH28-2 mot henholdsvis ICP35 og CMV-glykoprotein B, er blitt beskrevet tidligere (Braun et al., 1983, 1984; se også Zweig, 1980, Liu og Roizman, 1991). Det monoklonale antistoffet H725 reagerer med ICP35 fra HSV-1, men ikke med HSV-2-proteiner (Braun et al., 1983, 1984). CH28-2 ble oppnådd fra L. Pereira (Liu og Roizman, 1991a; Braun et al., 1984). Som erstatning kan enhver kommersielt antistoff for enhver kjent epitop bli benyttet. CH28-2 er et monoklonalt antistoff rettet mot humant cytomegalovirus (CMV) glykoprotein B. Epitopen til dette antistoff er blitt kartlagt til et 20 amino-syrepeptid, N-KGQKPNLLDRLRHRKNGYRH-C, ved å undersøke reaksjonen mot en rekke overlappende peptider syntetisert ifølge den antatte nukleotidsekvensen til proteinet.

8. In vitro-transkripsjon og translasjon

5 µg plasmid DNA-templater linearisert med EcoRI eller HindIII ble laget og transkribert i nærvær av kappanalogen GppG (New England Biolabs, MA) med Sp6 eller T7 RNA polymerase som anbefalt av Promega Biotec, Madison, WI. 1 µg av RNA'ene ble

translatert i 10 minutter i 50 μ l reaksjonsblandinger som inneholdt nukleasebehandlet kaninretikulocyttlysatsat (Promega Biotech, WI) og [^{35} S]-metionin (Dupont, NEN Research Product), og translasjonen ble så avsluttet enten ved tilsetning av en stoppbuffer (0,5M Tris pH 7,0, 8,5% vol/vol sukrose, 5% vol/vol β -merkaptotanol og 2% vol/vol natriumdodecylsulfat) eller en 20 gangers fortynning i fosfatbufret saltvann som inneholdt cykloheksimid (100 μ g/ml endelig konsentrasjon) og forskjellige konsentrasjoner av proteasehemmere. Etter 6 timers reaksjon i nærvær av cykloheksimid ble blandningene denaturert i stoppbuffer, og elektroforesert i polyakrylamid-geler, elektrisk overført til nitrocellulosemembraner som beskrevet her (se også Liu og Roizman, 1991 og Braun, 1984) og pålagt Kodak X-Omat-filmer.

9. Transfeksjoner og superinfeksjon av celler transfektert med plasmid-DNA

Transfeksjoner ble utført som beskrevet av Kristie og Roizman (1984) bortsett fra at cellene generelt ble transfektert med 10 μ g plasmid-DNA. 6-brønn Costar (Cambridge, Mass.) skålkultur av BHK-celler inneholdt omtrent 10^6 celler pr. brønn. I de fleste eksperimentene ble de transfekterte cellene utsatt i 18-20 timer etter transfeksjonen for 10 pfu HSV-1(F) eller HSV-2(G) pr. celle som omtalt i resultatene. Etter 2 timers inkubasjon av cellene med virus ved 10°C, ble inokulet erstattet med Dulbecco's modifiserte Eagle's medium supplert med 10% føtalt bovint serum, og cellene ble inkubert ved 34°C, 37°C eller 39°C i 20 timer. I eksperimentene som ikke omfattet virusinfeksjon, ble cellene høstet 40-42 timer etter transfeksjonen. 20 timer etter infeksjonen ble cellene merket i 2 timer med 50 μ Ci ^{35} S-metionin i 1 ml medium (199 uten metionin supplert med 1% kalveserum). De høstede cellene ble vasket en gang med fosfatbufret saltvann, sentrifugert ved 4000 rpm i 5 minutter i en SS34 Sorvall rotor i en DuPont sentrifuge, suspendert i stoppbufferen, sonikert i 20 sekunder på is, og kokt i 1 minutt før elektroforetisk separering i denaturerende geler (se også Liu og Roizman, 1991a og b; Ejercito et al., 1968).

10. Elektroforetisk adskillelse og farging av infiserte celleproteiner med monoklonalt antistoff

De denaturerte, solubiliserte polypeptidene fra cellysatene eller fra in vitro-translasjon ble adskilt på 9,5% eller 12% (vol/vol) SDS-polyakrylamidgeler kryssbundet med N,N'-diallyltartardiamid som beskrevet av Gibson og Roizman (1972, 1974) og Braun et al. (1984). De adskilte polypeptidene fra BHK-celler ble overført elektrisk til nitrocellulosemembraner og reagert i en enzymbundet immunmetode med bare antimus-IgG konjugert med pepperrotperoksidase (Amersham, Arlington Heights, IL) eller med dette antimus-IgG i tillegg til de monoklonale antistoffene H725 mot HSV-1, ICP35 eller CH28-2 mot CMV-epitopen, som tidligere beskrevet (Braun et al., 1984). Gelene som inneholdt de adskilte polypeptidene translateret fra retikulocyttylsatet ble tørket og påsatt Kodak X-Omat-film.

11. Isolering og S1-analyse av cytoplasmatisk RNA

Cytoplasmatisk RNA ble rensert som beskrevet tidligere av Jenkins og Howett (1984) fra Vero-celler kontrollinfiserte eller infiserte med 20 PFU HSV-1(F) pr. celle og dyrket i 12 timer. HSV-1 DNA-probe (0,02 pmol) ble 5'-endemerket med [α ³²P]ATP (Dupont, NEN Research Products), hybridisert til 50 μ g totalt cytoplasmatisk RNA, fordøyet med S1-nuklease, og adskilt på 7% polyakrylamidgeler i nærvær av 8M urea (Jenkins og Howett, 1984).

12. Fremgangsmåter for fremstilling av proteinene anvendt i den foreliggende oppfinnelse

Rekombinante vektorer er anvendbare både som hjelpemidler for å lage mengder av proteasen eller ICP35-kodende DNA selv, eller til bruk for å lage de kodede proteinene. Det antas at der hvor proteiner anvendt i oppfinnelsen blir laget ved hjelp av gen-teknologi, kan en benytte enten prokaryote eller eukaryote ekspresjonssystemer.

Hvor ekspresjon av herpes nukleinsyresegmenter i en eukaryot vert benyttes, kan det være ønskelig å benytte en vektor, slik som et plasmid, som har et eukaryot replikasjonsstartsted, slik som

eksemplifisert av vektorer i pCMV-seriene, liksom pCMV4. I tillegg, med formål for å produsere i eukaryote systemer, ønsker en å posisjonere proteasene eller den ICP-kodende sekvensen ved siden av og under kontroll av en effektiv eukaryot promotor, slik som en SV40- eller CMV-promotor. For å bringe en kodende sekvens under kontroll av en promotor, hvorvidt det er en eukaryot eller prokaryot promotor, alt som er generelt nødvendig er å posisjonere 5'-enden til transkripsjonsstartstedet i transkripsjonsleserammen til proteinet mellom omtrent 1 og omtrent 50 nukleotider nedstrøms fra promotoren som er valgt.

Videre, der hvor eukaryot ekspresjon vurderes, ønsker en å ta inn i transkripsjonsenheten som omfatter det ønskede peptid eller protein, et passende polyadenyleringssete (f.eks. 5'-AATAAA-3'). Typisk blir poly A-setet plassert omtrent 30 til 2000 nukleotider "nedstrøms" for avslutningssetet til proteinet på et sted før transkripsjonsterminering.

Anvendbare eukaryote vektorer som omfatter alt det foregående, og hvor herpesgenene anvendt i den foreliggende oppfinnelse kan bli satt inn med liten vanskelighet, er godt kjent. F.eks., passende vektorer omfatter pCD og pCMV, med det mest foretrukne system som pCMV. I tillegg til pCD- og pCMV-vektorer, omfatter andre foretrukne eukaryote ekspresjonsvektorer pMSG og pSVL fra Pharmacia LKB Technology, Piscataway, N.J. Disse benytter henholdsvis MMTV og SV40 sene promotorer. Et cDNA som innbefatter hele leserammen til herpesprotein slik som vist i Fig. 1, kan lett bli satt inn i en av de foregående vektorer via HindIII-restriksjonssetet (AAGCTT) "oppstrøms" for (dvs. 5' for) startkodon (ATG) som begynner translasjon av det kodede ICP35 forstadium.

Det vurderes at omtrent en hvilken som helst av de vanlig benyttede eukaryote vertsceller kan bli benyttet i samband med herpes genekspresjon ifølge denne beskrivelse. Eksempler som omfatter linjer som typisk benyttes for eukaryot produksjon slik som AtT-20-, HepG2-, VERO-, HeLa-, CHO-, WI 38-, BHK-, COS-7 RIN- og MDCK-cellelinjer. En foretrukket linje for bruk i eukaryote produksjonsutførelsesformer er BHK-systemet.

Prokaryot produksjon er et alternativ som kan bli benyttet når ønskelig. Skjønt det ikke kreves, der hvor prokaryot ekspres-

sjon benyttes, ønsker en generelt å benytte en transkripsjonsenhet som innbefatter en leseramme som korresponderer bare til det ønskede peptid selv, vist av utførelsesformene i Fig. 1, slik at videre prosessering ikke vil være nødvendig. Typisk er prokaryote promotorer som kan bli benyttet $P_{L}T7$ - og lac-promotoren, med T7 som generelt foretrukket. Andre foretrukne bakterielle ekspresjonsvektorer omfatter plasmid PKK233-2 og PKK233-3, tilgjengelig fra Pharmacia LKB Technology. Disse benytter henholdsvis tac- og trc-promotorer.

Selvfølgelig, enda hvor en eukaryot løsning og ekspresjon blir benyttet, ønsker en ikke desto mindre å omfatte en prokaryot ekspresjonsstart, så vel som selektive markører som kan fungere i prokaryote systemer, for å tillate "dobbeltfungerende" sekvenser fra konstruksjon i prokaryote til ekspresjon i eukaryote systemer.

I bestemte utførelsesformer ønskes det å lage herpesproteiner eller peptider ved hjelp av ikke-rekombinante syntetiske fremgangsmåter, slik som kjemisk syntese av peptider eller cellefri ribosomal "maskin". Passende peptidsyntesemaskiner er kommersielt tilgjengelige (Applied Biosystems), og kan bli benyttet.

I visse utførelsesformer antas det at DNA-fragmenter av både kortere og lengere type som omfatter sekvensene fra Fig. 1 vil finne ytterligere nytte, inklusive bruk i å lage korte aktive peptider eller endog som korte DNA-fragmenthybridiseringsprober, f.eks., i undersøkelse av klonbanker. I ethvert tilfelle, fragmenter som korresponderer til Fig.1-sekvensen for områder så korte som 14-20 eller så nukleotider, vil finne anvendelse ifølge disse eller andre utførelsesformer. Ved å ha områder på minst omtrent 14 nukleotider felles med nukleinsyresegmentene i Fig. 1, eller deres komplementære sekvenser, vil et DNA-segment ha evnen til å danne et spesifikt hybrid med herpes DNA-former, spesielt under mer stringente betingelser slik som 0,15M NaCl og 0,02M natriumcitrat pH 7,4 ved 50°C. Mens en komplementær eller felles strekning på omtrent 14 eller så nukleotider vil sikre evnen til å danne stabilt hybrid, kan lengre sekvenser med komplementaritet vise seg å være mer ønskelig for visse formål. Således kan det være ønskelig for visse anvendelser å benytte DNA-segmenter som har lengre komplementære områder, f.eks. i størrelsen av 18, 22 eller endog 25 eller så baser.

13. Antistoffer mot proteiner anvendt i den foreliggende oppfinnelse

I andre utførelsesformer fremstilles antistoffer mot herpesproteasen og former som stammer fra denne, enten laget rekombinant eller ikke-rekombinant. F.eks. antas det at antistoffer laget mot herpesproteasen i Fig.1, eller andre ikke-humane former slik som storfe eller gris, vil ha visse fordeler over antistoffer laget mot de humane formene, spesielt i utførelsesformer hvor immunbinding under redusert styrkeforhold er ønskelig.

Sammensetninger som omfatter monoklonale antistoffer kan lages ved først å fusjonere miltceller fra en gnager med myelomceller fra den samme gnagerarten, hvor gnageren gir miltceller som har blitt immunisert med herpespeptidet, forløperen eller beslektede peptider. Gnagerartene benyttet vil generelt være en mus, spesielt hvor en ønsker å lage et antistoff mot herpesproteasen i Fig. 1. Selvfølgelig, hvor en protease lages som omfatter strukturvariasjoner av denne, vil en sannsynligvis være i stand til å benytte med suksess et hybridomsystem ifølge arten av interesse.

Det er mulig å isolere proteaser fra andre arter som kan være antigen kryssreagerende med HSV-1. Fremgangsmåten omfatter fremstilling av immunadsorbsjonsmateriale som har bundet til seg et antistoff mot proteasen. Tallrike immunadsorbsjonsforbindelser er kjent for de erfarne i feltet og omfatter f.eks., Affi-Gel, Cn-Sepharose, protein A-Sepharose, og tallrike andre velkjente immunadsorbsjonsfremgangsmåter. Alle slike fremgangsmåter er brukbare og bør vise seg nyttige i isoleringen av immuno-logiske kryssreagerende former (for en mer komplett liste, se Monoclonal Hybridom Antibodies: Techniques and Applications, John G. Hurell, ed., CRC Press, 1982, intatt her som referanse).

Videre kan kitt bli laget for å tillate en klinisk påvisning av herpesproteasen, og beslektede proteaser, i en biologisk prøve. Slike kitt vil omfatte polyklonale eller monoklonale antistoffer som har spesifisitet for proteasen eller immunologisk beslektet protease, sammen med en immunpåvisningsreagens. Et immunpåvisningsreagens er definert som ethvert reagens for å påvise eller kvantitere dannelsen av antistoff/antigenkomplekser.

Typiske immunpåvisningsreagenser omfatter bruken av radioaktivt merkede eller enzymmerkede antigener eller antistoffer. Teknikker som omfatter merkede antistoffer omfatter f.eks., RIA (radio-immunoassay) og ELISA (enzymbundet immunoassay). Imidlertid, tallrike andre fremgangsmåter er kjent som kan bli benyttet i immunpåvisningskitt. Patenter som omtaler passende fremgangsmåter omfatter f.eks., U.S. patenter 4.446.232; 4.407.943; 4.399.299 og 454.233.

Således skulle et typisk herpesprotease påvisningskitt basert på ELISA-fremgangsmåten omfatte det antiherpesprotease monoklonale antistoff eller rensset proteaseantigen (hvor en ønsker å påvise sirkulerende antistoffer), og et annet "immunpåvisnings"-antistoff som er i stand til å reagere spesifikt med det rensede antigen eller antiproteaseantistoffet. Det andre antistoffet kunne ha en fargedannende enzymaktivitet koblet til seg, f.eks., et bundet peroksydasemolekyl. Når et annet "immunpåvisnings"-antistoff benyttes på dette måten, vil en først generelt danne et immun-kompleks mellom den biologiske prøve som skal undersøkes, f.eks., serum, plasma, urin- eller vevsprøver, og antistoffet. Etter at immunkomplekset er dannet, blir immunpåvisningsantistoffet tilsatt for å reagere kvantitativt med proteasebundet antistoff. Dannelsen av dette komplekset blir så kvantitert ved hjelp av den kalorimetriske peroksydasemetoden.

Et alternativ til å bruke den ovenfor nevnte dobbeltantistoff-fremgangsmåten er kobling av enzymet eller radioliganden direkte til antiproteaseantistoffet, og direkte kvantitering ved bruk av dette direkte merkede antistoff.

Den foran nevnte kitt og fremgangsmåte er vel kjent og kan generelt bli sett på som å omfatte trinnene fra å oppnå en biologisk prøve fra en pasient, reaksjon av den biologiske prøve med anti-herpesprotease monoklonalt antistoff under betingelser som vil fremme dannelsen av antistoff/antigenkomplekser og påvisning av en spesifikk immunologisk reaksjon mellom det monoklonale antistoff og prøven.

Nøytraliserende antistoffer vurderes også, når de er bundet til proteasen eller et segment av denne, blir den proteolytiske evnen til proteasen ikke-funksjonell.

14. Vertscellekulturer og vektorer

Generelt blir prokaryote foretrukket for den første kloning av DNA-sekvensene og konstruksjon av vektorer som er anvendbare i oppfinnelsen. F.eks., *E. coli* K12-stamme 294 (ATCC nr. 314460) er spesielt nyttig. Andre mikrobiologiske stammer som kan bli benyttet omfatter *E. coli*-stammer slik som *E. coli* B, og *E. coli* X 1776 (ATTC nr. 31537). Disse eksemplene er ment å være illustrerende.

Prokaryoter kan også bli benyttet for ekspresjon. De foran nevnte stammene så vel som *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrofe eller bacilli slik som *Bacillus subtilis*, eller andre enterbacteriaceae slik som *Salmonella Typhimurium* eller *Serratia marcesans*, og forskjellige *Pseudomonas*-arter kan bli benyttet.

Generelt, plasmidvektorer som inneholder replikon og kontrollsekvenser som stammer fra arter forenelig med vertscellen, blir benyttet sammen med disse verter. Vektoren har vanligvis et replikasjonssete, så vel som markørsekvenser som er i stand til å gi fenotypisk seleksjon i transformerte celler. F.eks., *E. coli* blir typisk transformert ved bruk av PBR322, et plasmid som stammer fra en *E. coli*-art, pBR322, som inneholder gener for ampicillin og tetracyklinmotstandsdyktighet, og gir således enkle hjelpemidler for å identifisere transformerte celler. PBR-plasmidet eller andre mikrobiologiske plasmider eller fag må også inneholde, eller bli modifisert slik at de inneholder, promotorer som kan bli benyttet av mikroorganisme for produksjon av sitt eget protein.

Promotorene mest vanlig benyttet i rekombinant DNA-konstruksjon omfatter B-laktamase (penicillinase) og laktose-promotorsystemer og et tryptofan- (*trp*) promotorsystem. Mens disse er mest vanlig benyttet, har andre mikrobiologiske promotorer blitt oppdaget og benyttet, og detaljer vedrørende deres nukleotidsekvenser er blitt publisert, hvilket muliggjør for en dyktig fagmann å binde dem funksjonelt sammen med plasmidvektorer.

I tillegg til prokaryoter, kan eukaryote mikrober, slik som gjærkulturer også bli benyttet. *Saccharomyces cerevisiae*, eller vanlig bakegjær er den mest vanlig benyttede blant eukaryote mikroorganismer, skjønt et antall andre stammer er generelt tilgjengelige. For produksjon i *Saccharomyces* blir plasmidet

Yrp7, f.eks., ofte benyttet. Dette plasmid inneholder allerede trp1-genet som gir en seleksjonsmarkør for en mutert stamme i gjær som mangler evnen til å gro i tryptofan, f.eks. ATCC nr. 44076 eller PEP4-1. Nærværet av trp1-lesjonen som en karakteristisk egenskap til gjærvertscellegenomet gir så et effektivt miljø for å påvise transformasjon ved vekst i fraværet av tryptofan.

Passende promotorsekvenser i gjærvektorer omfatter promotorene for 3-fosfoglyceratkinase eller andre glykolytiske enzymer, slik som enolase, glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, heksokinase, pyruvatdekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-6-fosfatisomerase, 3-fosfoglycerat-mutase, pyruvatkinase, triosefosfatisomerase, fosfoglukose-isomerase og glukokinase. I konstruksjon av passende ekspresjonsplasmider, blir termineringssekvensene forbundet med disse genene også bundet inn i ekspresjonsvektoren 3' for sekvensen som ønskes uttrykt for å gi polyadenylering av mRNA-avslutningen. Andre promotorer som har ytterligere fordel av transkripsjonskontroll ved hjelp av vekstbetingelser, er promotorregionen for alkoholdehydrogenase 2, isocytokrom C, sur fosfatase, degraderende enzymer forbundet med nitrogen-metabolisme, og den foran nevnte glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase, og enzymer som er ansvarlig for maltose- og galaktosespaltning. Enhver plasmidvektor som inneholder en gjærforenelig promotor, replikasjonsstart og termineringssekvenser er passende.

I tillegg til mikroorganismer, kan også kulturer av celler som stammer fra multicellulære organismer bli benyttet som verter. I prinsippet er enhver slik cellekultur anvendbar, uansett om det stammer fra vertebrat eller invertebrat kultur. Imidlertid har interessen vært størst for vertebratceller, og dyrkning av vertebratceller i kultur (vevskultur) har blitt en rutinefremgangsmåte i de siste år. Eksempler på slike anvendbare vertscellelinjer er AtT-20 VERO og HeLa celler, kinenisk hamster ovarie (CHO) cellelinjer, og WI38, BHK, COS-7 293 og MDCK-cellelinjer. Ekspresjonsvektorer for slike celler omfatter vanligvis (hvis nødvendig) en replikasjonsstart, en promotor som er lokalisert foran genet som skal uttrykkes, sammen med nødvendige ribosombindingssteder, RNA spleisesteder, polyadenyleringssete og transkripsjonsterminatorsekvenser.

For bruk i pattedyrceller blir kontrollfunksjoner på ekspressionsvektorer ofte gitt av virus. F.eks. er vanlig benyttede promotorer avledet fra polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus og hyppigst simianvirus 40 (SV40). De tidlige og sene promotorene til SV40-virus er spesielt nyttige fordi de kan oppnås lett fra virus som et fragment som også inneholder SV40-virusreplikasjonsstart. Mindre eller større SV40-fragmenter kan også bli benyttet, forutsatt at de er inkludert i nærheten av 250 baseparsekvens som går fra HindIII-setet mot Bgl-setet lokalisert i virusreplikasjonsstart. Videre er det også mulig, og ofte ønskelig, å benytte promotor eller kontrollsekvenser som normalt er forbundet med den ønskede gensekvensen, forutsatt at slike kontrollsekvenser er forenelige med vertscellessystemene.

En replikasjonsstart kan også gis enten ved konstruksjon av vektoren slik at den omfatter en ytre start, slik som kan komme fra SV40 eller andre virus (f.eks. polyoma, adeno, HSV, BPV, CMV-kilde), eller kan stamme fra vertscellekromosomreplikasjonsmekanismen. Hvis vektoren blir integrert i vertscellekromosomet, er det sistnevnte ofte tilstrekkelig.

15. Nukleinsyrehybridisering for å påvise sekvensene som er i stand til å kode for serinproteaser, ICP35-proteinene eller deres biologisk funksjonelle homologer

Nukleinsyresekvensinformasjonen tillater å lage relativt korte DNA- eller RNA sekvenser som har evnen til å hybridisere spesifikt til gensekvenser som koder for minst det proteolytiske område i proteasene eller spaltningssetet ICP35-proteinene. I disse anvendelsesformer, blir nukleinsyreprober av en passende lengde laget basert på å betrakte sekvensen vist i Fig. 1. Evnen til slike nukleinsyreprober til å hybridisere spesifikt til proteasene eller ICP35-gensekvensene gjør dem spesielt nyttige i en rekke utførelsesformer. Viktigste kan probene bli benyttet i en rekke undersøkelsesmetoder for å påvise tilstedeværelsen av komplementære sekvenser i en gitt prøve. Andre anvendelser blir planlagt, inklusive bruken av sekvensinformasjon for å lage muterte former av primere, eller primere for bruk i å lage andre genkonstruksjoner.

For å være sikker på fordelene ifølge oppfinnelsen, omfatter den foretrukne nukleinsyresekvensen som benyttes for hybridiseringsstudier eller undersøkelsesmetoder, sekvenser som er komplementære til minst en 14 base nukleotidsekvens fra sekvensen vist i Fig. 1. En størrelse på minst 14 nukleotider i lengde sikrer at fragmentet vil være av tilstrekkelig lengde for å lage et dupleksmolekyl som er både stabilt og selektivt. Slike fragmenter kan lett bli laget, f.eks., ved å syntetisere direkte fragmentet ved hjelp av kjemisk syntese, ved å bruke nukleinsyreproduksjonsteknologi, slik som PCR-teknologien i U.S. patent 4.603.102, eller ved å innføre utvalgte sekvenser i rekombinante vektorer for rekombinant produksjon. Segmenter av fra 18 til 25, eller enda 30 til 40 baser, helt opp til størrelser som er store nok for å kode for et komplett gen eller gener er også anvendbare.

Følgelig er nukleinsyresekvensene viktige for deres evne til å danne selektive dupleksmolekyler med komplementære sekvenser i genet. Avhengig av bruksformen som planlegges, kan forskjellige betingelser for hybridisering bli benyttet for å oppnå forskjellige grader av selektivitet av prøven mot målsekvensen. For bruk som krever en høy grad av selektivitet, kan relativt stringente betingelser bli benyttet for å lage hybrider, f.eks., ved å velge relativt lave salt og/eller høye temperaturbetingelser, slik som gis ved 0,02M-0,15M NaCl ved temperaturer på 50 til 70°C. Disse betingelsene er spesielt effektive, og tåler lite, hvis noe, feil mellom proben og templatet eller målkjeden.

Selvfølgelig, for visse bruksområder, f.eks., blir fremstilling av mutanter som benytter en mutert primerkjede hybridisert til et underliggende templat, eller å isolere protease eller ICP35-kodende sekvenser fra beslektede former, funksjonelle homologer eller lignende, er reduserte hybridiseringsbetingelser nødvendige for å tillate dannelsen av heterodupleksen. Under disse forhold ville betingelser benyttet være, f.eks., slik som 0,15M-0,9M salt, ved temperaturer som varierer fra 20 til 55°C. Krysshybridiseringsformene kan derfor lett identifiseres som positive hybridiseringssignaler med hensyn til kontrollhybridiseringer. I ethvert tilfelle vil det generelt forstås at betingelser kan bli gjort mer stringente ved tilsetning av økende mengder formamid, som tjener til å destabilisere hybridduplexen

på samme måte som øket temperatur. Således kan hybridiseringsbetingelser bli lett endret, og vil således være en fremgangsmåte som kan benyttes avhengig av de ønskede resultatene.

I visse utførelsesformer vil det være fordelaktig å benytte nukleinsyresekvenser sammen med passende hjelpemidler, slik som en markør, for å bestemme hybridisering. En lang rekke passende indikatorer er kjent i feltet, inklusive radioaktive, enzymatiske eller andre ligander, slik som avidin/biotin, som er i stand til å gi et påvisbart signal. I foretrukne diagnostiske utførelsesformer, kan et enzymmerke slik som urease, alkalisk fosfatase eller peroksydase, bli benyttet istedenfor radioaktive eller andre miljømessige uheldige forbindelser. I tilfelle med enzymmerkelapp, er kalorimetrisk indikatorsubstrater kjent som kan bli benyttet til å gi et hjelpemiddel som er synlig for det menneskelige øye eller spektrofotometrisk, for å identifisere spesifikk hybridisering med komplementær nukleinsyreinnholdende prøver.

Generelt forstås det at hybridiseringsprober beskrevet her vil være anvendbare både som reagenser i løsningshybridisering så vel som i utførelsesformer som benytter solid fase. I utførelsesformer som omfatter en solid fase, blir test-DNA eller RNA adsorbert eller på annen måte festet til en bestemt matriks eller overflate. Denne festede, enkeltkjededde nukleinsyre blir så gjenstand for spesifikk hybridisering med utvalgte prober under ønskede betingelser. De ønskede betingelsene vil avhenge av de spesielle omstendighetene basert på de spesielle krav (avhengig, f.eks., av G+C-innholdet, type målnukleinsyre, kilde av nukleinsyre, størrelse på hybridiseringsprobe, osv.). Etter vasking av hybridisert overflate slik at ikke-spesifikt bundede probe-molekyler fjernes, blir spesifikk hybridisering påvist, eller endog kvantitert, ved hjelp av markøren.

En fremgangsmåte for å lage molekyler for påvisning i celle-ekstrakter er å benytte fluorescerende prober. Fluorescerende prober er vel kjente for de som er erfarne i feltet. Et eksempel på en fremgangsmåte er å binde fluoresceinmerket avidin (Vector Laboratories, Burlingame, Ca) til et biotinmerket protein. Signalet kan bli forsterket.

Den foreliggende oppfinnelse er blitt beskrevet i form av spesielle utførelsesformer som er funnet eller foreslått av de

foreliggende oppfinnerne som omfatter foretrukne former for utøvelsen av den foreliggende oppfinnelse. Det vil forstås av de som er erfarne i feltet at tallrike modifikasjoner og forandringer kan bli gjort i de spesielt beskrevne utførelsesformene uten å fravike ånden og rammen for oppfinnelsen. F.eks., på grunn av kodon-uspesifisitet, kan forandringer bli gjort i den underliggende DNA-sekvensen uten å påvirke proteinsekvensen. Videre, på grunn av biologisk funksjonelle homologbetraktninger, kan forandringer gjøres i proteinstrukturen og fremdeles oppnå en anvendbar protease eller antigen subfragment. Alle slike endringer er ment å inkluderes i rammen for de ledsagende krav.

Referanser

Referansene oppført nedenfor er tatt inn her som referanser i den utstrekning at de supplerer, forklarer, gir en bakgrunn for, eller lærer fremgangsmåter, teknikker og/eller sammensetninger benyttet heri.

- Arsenakis, M., Hubenthal-Voss, J., Campadelli-Fiume, G., Pereira, L., og Roizman, B. (1986), Construction and properties of a cell line constitutively expressing the herpes simplex virus glycoprotein B dependent on functional $\alpha 4$ protein synthesis. J. Virol. 60:674-682.
- Batterson, W. og Roizman, B. (1983), Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of α genes. J. Virol., 46:371-377.
- Braun, D.K., Pereira L., Norrild, B., og Roizman, B. (1983), Application of denatured, electrophoretically separated, and immobilized lysates of herpes simplex virus-infected cells for the detection of monoclonal antibodies and for studies of the properties of viral proteins. J. Virol., 46:103-112.
- Braun, D.K., Roizman, B., og Pereira, L. (1984), Characterization of post-transnational products of herpes simplex virus gene 35 proteins binding to the surfaces of full capsids but not empty capsids. J. Virol., 49:142-153.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S. et al. (1990), Current Topics in Microbiology and Immunology, 154:127-169.
- Corey, L. og Spear (1986), PG Infections with herpes simplex viruses. N. Eng. J. Med., 314:686-691.
- Davison, A.J. og McGeoch, D.J. (1986); Evolutionary comparisons of the S segments in the genomes of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus. J. Gen. Virol., 67:597-611.

- Davison, A.J. og McGeoch, D.J. (1986),
J. Gen. Virol., 67:1759-1816.
- Ejercito, P.M., Kieff, E.D., og Roizman, D. (1986),
Characterization of herpes simplex virus strains differing in
their effect on social behavior of infected cells.
J. Gen. Virol., 2:357-364.
- Gibson, W., Marcy, A.I., Comolli, J.C. og Lee, J. (1990),
Identification of precursor to cytomegalovirus capsid
assembly protein and evidence that processing results in loss
of its carboxyl-terminal end. J. Virol., 64:1241- 1249.
- Gibson, W., og Roizman, B. (1972), Proteins specified by herpes
simplex virus VIII. Characterization and composition of
multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. J. Virol.,
10:1044-1052.
- Gibson, W., og Roizman, B. (1974), Protein specified by herpes
simplex virus. Staining and radiolabeling properties of
B capsids and virion proteins in polyacrylamide gels.
J. Virol., 13:155-165.
- Jenkins et al. (1984), Characterization of the mRNAs mapping
in the Bp1II N fragment of the herpes simplex virus type
2 genome. J. Virol., 52:99-107.
- Kraut, J. (1977), Annual Rev. Biochem., 46:331-358.
- Kristie, T.M., og Roizman, B. (1984), Separation of sequences
defining basal expressing from those conferring α gene
recognition within the regulatory domains of herpes simplex
virus 1 α genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:4065-4069.
- Kyte, J., et al. (1982), J. Mol. Biol., 157:105-132.

- Liu, F., og Roizman, B., (1991a), The promoter, transcriptional unit, and coding sequence of herpes simplex family 35 proteins are contained within and in frame with the U_L26 open reading frame. J. Virol., 65:206-212.
- Liu, F., og Roizman, B. (1991b), J. Virol., 65:5149-5156.
- McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E., og Taylor, P. (1988), The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. J. Gen. Virol., 69:1531-1574.
- Morse, L.S., Pereira, L., Roizman, B. et al. (1978), Preparation of herpes simplex virus of high titer. J. Virol., 2:83-84.
- Neurath, H. (1983), Science., 224:350-357.
- Newcomb, W.W., og Brown, J.C. (1991), Structure of the herpes simplex virus capsid effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. J. Virol., 65:613-620.
- Newcomb, W.W., Brown, J.C., Booy, F.P., og Steven, A.C. (1989), Nucleocapsid mass and capsomere protein stoichiometry in equine herpes virus 1: scanning transmission electron microscopic study. J. Virol., 63:3777-3783.
- Post, L.E., Mackem, S. og Roizman, B. (1981), The regulation of α genes of herpes simplex virus: expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with α gene promoters. Cell, 24:555-565.
- Preston, V.G., Coates, J.A.V., og Rixon, F.J. (1983), Identification and characterization of a herpes simplex virus gene product required for encapsodation of virus DNA. J. Virol., 45:1056-1064.

- Preston, V.G. (1992), Processing of the herpes simplex virus assembly protein ICP35 near its carboxy terminal end requires the product of the whole of the UL26 reading frame, *Virology*, 186:87-98.
- Robson, L. og Gibson, W. (1989), Primate cytomegalovirus assembly protein: genome localization and nucleotide sequence. *J. Virol.*, 63:669-676.
- Roizman, B., og Spear, P. ZG. (1968), Preparation of herpes simplex virus of high titer. *J. Virol.*, 65:1525-1529.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. og Moniatis, T. (1989), *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratories.
- Schenk, P. et al. (1991), The 45-kilodalton protein of cytomegalovirus (Colburn) B-capsids is an amino-terminal extension form of the assembly protein. *J. Virol.*, 65:1525-1529.
- Skalka, A.M. (1989), Retroviral Proteases: First glimpses at the anatomy of a processing machine. *Cell*, 58:911-913.
- Welch, A.R. et al. (1991), A herpes virus maturational proteinase, assemblin: identification of the gene, putative active site domain, and cleavage site. *PNAS*, 88:10792-10796.

P a t e n t k r a v

1. Testmetode for å identifisere en forbindelse som er istand til å inhibere en herpes simplex virus (HSV) protease, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter.
 - (a) tilveiebringning av nevnte rensete HSV protease som er kodet for av i det minste områdene II og III av U_L26 genet;
 - (b) tilsetning til nevnte protease av et proteinsubstrat inneholdende spaltningssete til nevnte protease under betingelser egnet for proteolytisk spaltning av nevnte substrat;
 - (c) tilsetning til nevnte protease av en kandidatinhibitorforbindelse, og
 - (d) bestemme hvorvidt nevnte proteinsubstrat har blitt spaltet.
2. Testmetode ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at områdene II og III har aminosyresekvensen av enhetene 10-306 av SEKV ID NR. 2.
3. Testmetode ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HSV protease er kodet for av hele U_L26 genet.
4. Metode ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte HSV protease er et rekombinant enzym.
5. Metode ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte substrat er HSV ICP35.
6. Metode ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte bestemmelsestrinn omfatter deteksjon av substratfragmenter ved elektroforese.

7. Metode ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte substratfragmenter er ICP35e og ICP35f.
8. Metode ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte trinn for tilveiebringning omfatter:
- (i) fremstilling av en ekspresjonsvektor inkludert U_L26 genet, og
 - (ii) plassering av ekspresjonsvektoren i en egnet vertscelle under betingelser som tillater ekspresjon av den kodende sekvens.
9. Metode ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte tilveiebringning videre omfatter trinnet:
- (iii) tilveiebringning av nevnte protease fra nevnte vertscelle.
10. Metode ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte U_L26 gen er under kontroll av en eukaryot promoter.
11. Metode ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte vertscelle er en eukaryot vertscelle.
12. Anvendelse av et proteinsubstrat omfattende minst et spaltningssete til proteasen ifølge krav 1 for å velge en virusprotease, k a r a k t e r i s e r t v e d at: det fremstilles en kandidatvirusprotease som blandes med den spaltningsseteinneholdende aminosyresekvensen og bestemmelse av hvorvidt spaltning har funnet sted.
13. Anvendelse av en effektiv mengde av en inhibitor av proteasen påvist ved hjelp av testmetoden ifølge krav 1, for å fremstille en farmasøytisk sammensetning for inhibering av HSV replikasjon, infeksjon og/eller sykdom.

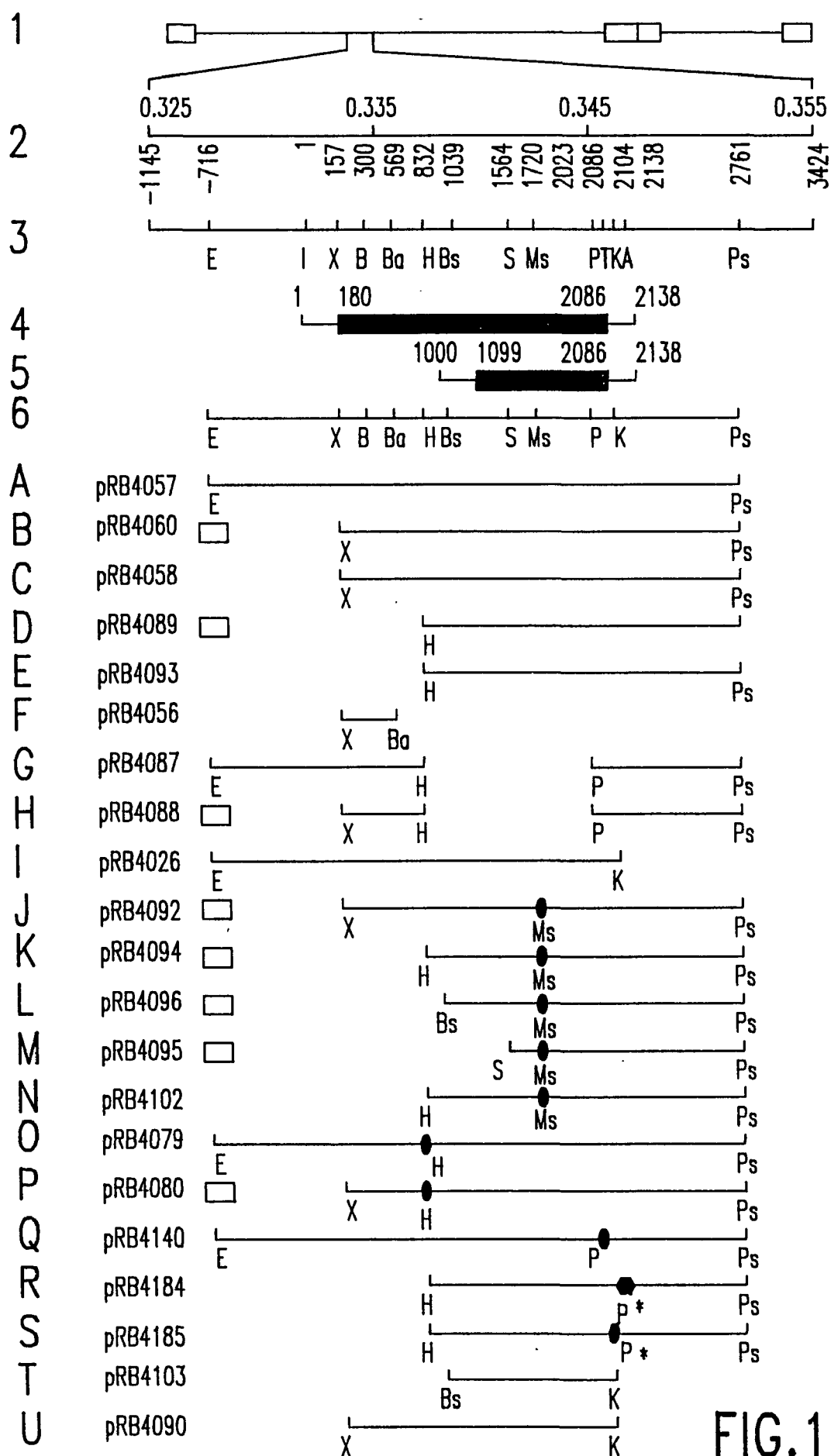


FIG.1A

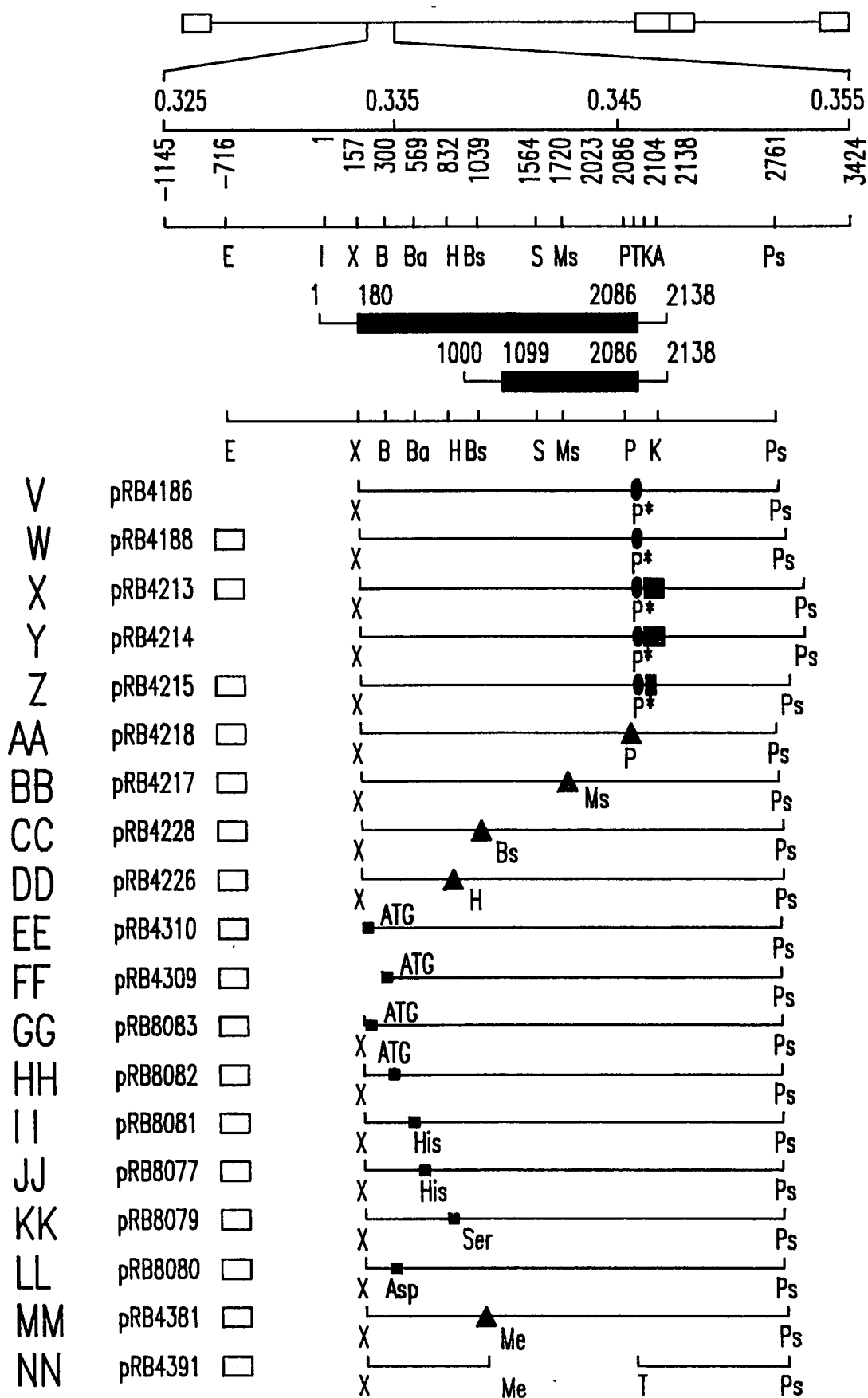


FIG.1A Forts.

MetAlaAlaAspAlaProGlyAspArgMetGluGluProLeuProAspArgAlaValPro
1 ATGGCAGCCGATGCCCGGAGACCGGATGGAGAGCCCTGCCCGACAGGCCGTGCCCC
TACCGTCGGCTACGGGGCCCTCTGGCCTACCTCCTCGGGACGGGCTGTCCCGGCACGGG
IleTyrValAlaGlyPheLeuAlaLeuTyrAspSerGlyAspSerGlyGluLeuAlaLeu
61 ATTACGTGGCTGGGTTTTTTGGCCCTGTATGACAGCGGGGACTCGGGCGAGTTGGCATTC
TAAATGCACCGACCCAAAACCGGGACATAGTGTGCCCCCTGAGCCCCGCTCAACCGTAAC
AspProAspThrValArgAlaAlaLeuProProAspAsnProLeuProIleAsnValAsp
121 GATCCGGATACGTGCGGGCGGCCCTGCCCTCCGGATAACCCACTCCCGATTAAACGTGGAC
CTAGGCCTATGCCACGCCCGCGGGACGGAGGCCTATTGGGTGAGGGCTAATTGCACCTG
HisArgAlaGlyCysGluValGlyArgValLeuAlaValValAspAspProArgGlyPro
181 CACCGCGCTGGCTGCGAGGTGGGGCGGTGCTGGCCGTGCTCGACGACCCCGGGCCCG
GTGGCGGACCCGCTCCACCCCGCCACGACCGGCACGCTGCTGGGGCGGCCCGCGC
PhePheValGlyLeuIleAlaCysValGlnLeuGluArgValLeuGluThrAlaAlaSer
241 TTTTGTGGGCTGATCGCCTGCGTCAGCTGGAGCGCGTCTCGAGACGGCCGCCAGC
AAAAACACCCCGACTAGCGGACCGACGTCGACCTCGCGCAGGAGCTCTGCCGGCGGTCCG
AlaAlaIlePheGluArgArgGlyProProLeuSerArgGluGluArgLeuLeuTyrLeu
301 GCTGCGATTTCGAGCGCGCGGGCCCGCTCTCCCGGAGGAGCGCCTGTGTACCTG
CGACGCTAAAGCTCGCGGGCGCGGGCGGAGAGGGCCCTCCTCGCGGACACATGGAC

FIG.1B(I)

IleThrAsnTyrLeuProSerValSerLeuAlaThrLysArgLeuGlyGlyGluAlaHis
361 ATCAACCACTACCTGCCCTCGGTCTCCCTGCCACAAACGCCCTGGGGCGGAGCGGCAC
TAGTGGTTGATGGACGGGAGCCAGAGGACCGGTGTTTGGCGACCCCCCGCTCCGCGGTG

ProAspArgThrLeuPheAlaHisValAlaLeuCysAlaIleGlyArgArgLeuGlyThr
421 CCCGATCGCACGCTGTTCCGGCACGTCGGCTGTGCGCGATCGGGCGGCGCTCGGCACT
GGCTAGCGTCCGACAAGCGCGTGCAGCGCGACACGCGCTAGCCCCGCGGAGCCCGTGA

IleValThrTyrAspThrGlyLeuAspAlaAlaIleAlaProPheArgHisLeuSerPro
481 ATCGTCACCTACGACACCGGTCTCGACGCGCCCATCGCGCCCTTTTCGCCACCTGTCCGCCG
TAGCAGTGGATGCTGTGCGCCAGAGCTCGCGCGGTAGCGCGGGAAGCGGTGGACAGCGCG

AlaSerArgGluGlyAlaArgArgLeuAlaAlaGluAlaLeuAlaLeuSerGlyArg
541 GCGTCTCGCGAGGGCGCGGCTGCGCGCGCGAGCGCGAGCTCGCGCTGTCCGGCGCG
CGCAGAGCGCTCCCCCGCGCGCTACCGCGCGCTCCGGCTCGAGCGCGACAGCGCGCG

ThrTrpAlaProGlyValGluAlaLeuThrHisThrLeuLeuSerThrAlaValAsnAsn
601 ACCTGGGGCCCCGGCGTGAGGCGCTGACCCACACGCTGCTTCCACCGCGTTAACAAAC
TGGACCCGGCGCGCACCTCCGCGACTGGGTGTGCGACGAAGGTGGCGGCAATTGTTG

MetMetLeuArgAspArgTrpSerLeuValAlaGluArgArgGlnAlaGlyIleAla
661 ATGATGCTGCGGACCGCTGAGCCTGGTGGCCGAGCGCGCGGCGGATCGCC
TACTACGAGCCCTGCGGACCTCGGACCACCGGCTCGCGCGCGCGCTCGGGCCCTAGCGG

FIG.1B (II)

721 GlyHisThrTyrLeuGlnAlaSerGluLysPheLysMetTrpGlyAlaGluProValSer
GGACACACCTACCTCCAGCGAGCGAAATTCAAAATGTGGGGCGGAGCCTGTTC
CCTGTGTGATGAGGTCCGCTCGCTTTTAAGTTTACACCCCCCGCCTCGGACAAAGG

781 AlaProAlaArgGlyTyrLysAsnGlyAlaProGluSerThrAspIleProProGlySer
GCGCCGCGCGCGGTATAAGAACGGGCCCCGAGTCCACGGACATACCGCCCGCTCG
CGCGCCGCGCGCCCATATTCTTGCCCCCGGGCCTCAGTGCCCTGTATGGCGGGCCGAGC

841 IleAlaAlaProGlnGlyAspArgCysProIleValArgGlnArgGlyValAlaLeu
ATCGCTGCCGCGCGAGGTACCGGTGCCCAATCGTCCGTACGCGGGGTCCGCTTG
TAGCGACGCGCGCGCTCCCACTGGCCACGGGTTAGCAGGCAGTCGCGCCCCCAGCGGAAC

901 SerProValLeuProProMetAsnProValProThrSerGlyThrProAlaProAlaPro
TCCCCGGTACTGCCCCCATGAACCCCGTTCCGACATCGGGCACCCCGCCCCCGCGG
AGGGCCCATGACGGGGGTACTTGGGGCAAGGCTGTAGCCCGTGGGGCGGGCGCGCGG

961 ProGlyAspGlySerTyrLeuTrpIleProAlaSerHisTyrAsnGlnLeuValAlaGly
CCGGCGGACGGAGCTACCTGTGGATCCGGCCTCCCATTAACAACCACTCGTCCCGG
GGCCCGCTGCCCTCGATGGACACCTAGGGCCGAGGGTAATGTTGTCGAGCAGCGCGCG

1021 HisAlaAlaProGlnProGlnProHisSerAlaPheGlyPheProAlaAlaGlySer
CATGCCGCGCCCCAACCCAGCCGCAATCCGCGTTTGGTTTCCCGGCTGCGGGGGTCC
GTACGGCGCGGGGTTGGGGTCGGCGTAAGGGCGCAACCAAGGGCCGACGCGCCCCCAGG

FIG. 1B(III)

ValAlaTyrGlyProHisGlyAlaGlyLeuSerGlnHisTyrProProHisValAlaHis
1081 GTGGCCTATGGCCCTACGGTGGGGTCTTTCCAGCATTAACCTCCCCACGTGCGCCCAT
CACCGATACCCGGAGTGCCACGCCAGAAAGGTCGTAATGGAGGGGTGCAGCGGGTA
GlnTyrProGlyValLeuPheSerGlyProSerProLeuGluAlaGlnIleAlaAlaLeu
1141 CAGTATCCCGGGTGCTGTTCTCGGACCCAGCCACTCGAGCGCAGATAGCCGGTTG
GTCATAGGGCCCCACGACAAGAGCCCTGGGTGAGTCCGGTCTATCGGGCGAAC
ValGlyAlaIleAlaAlaAspArgGlnAlaGlyGlyGlnProAlaAlaGlyAspProGly
1201 GTGGGGCCATAGCCCGGACCGCCAGCGGGCGGTACAGCGCGCGGAGACCTGGG
CACCCCGGTATCGGGCCTGGCGTCCGCCCGCCAGTCGGCGCGCCCTCTGGGACCC
ValArgGlySerGlyLysArgArgTyrGluAlaGlyProSerGluSerTyrCysAsp
1261 GTCCGGGGTCCGGAAGCGTCGCCGTACGAGCGGGCGGTCCGAGTCCCTACTGCGAC
CAGGCCCCAGCCCTTTCGCAGCGGCCATGCTCCGCCCGGCAGCCTCAGGATGACGCTG
GlnAspGluProAspAlaAspTyrProTyrTyrProGlyGluAlaArgGlyAlaProArg
1321 CAGGACGAACCGGACCGGACTACCCGTACTACCCCGGGAGGCTCGAGCGCGCGCGC
GTCCTGCTTGGCCTGCGCCTGATGGGCATGATGGGCCCCCTCCGAGCTCCGCGCGCGCG
GlyValAspSerArgAlaAlaArgHisSerProGlyThrAsnGluThrIleThrAla
1381 GGGTCGACTCCCGCGCGCGGCCCATTTCTCCGGGACCAACGAGACCATCAGCGCG
CCCCAGCTGAGGGCGCGCGCGCGGTAAGAGGGCCCCGTGCTGCTCTGCTAGTCCCCC

FIG.1B (IV)

1441 LeuMetGlyAlaValThrSerLeuGlnGlnGluLeuAlaHisMetArgAlaArgThrSer
CTGATGGGGCGGTGACGTCTCTGCAGCAGGAACACTGGCGCACATCGGGCTCGGACCAGC
GACTACCCCGCCACTGCAGAGACGTCTCTGACCGCGTGTACGCCCGAGCCTGGTCCG

1501 AlaProTyrGlyMetTyrThrProValAlaHisTyrArgProGlnValGlyGluProGlu
GCCCCCTATGGAATGTACACGCCGGTGGCGCACTATCGCCCTCAGGTGGGGAGCCGGAA
CGGGGATACCTTACATGTGCGGCCACCGCGTGATAGCGGAGTCCACCCCTCGGCCTT

1561 ProThrThrThrHisProAlaLeuCysProProGluAlaValTyrArgProProProHis
CCAACAACGACCCACCGGCCCTTTGTCCCCCGGAGCGCGTGATCGCCCCCACACAC
GGTTGTTGCTGGTGGCCCGGAAACAGGGGCCCTCCGGCACATAGCGGGGTGTGTG

1621 SerAlaProTyrGlyProProGlnGlyProAlaSerHisAlaProThrProProTyrAla
AGCGCCCCCTACGTCTCTCCCCAGGTCGGCGTCCCATGCCCCCACTCCCCGTATGCC
TCGCGGGGATGCCAGGAGGGTCCACGGCCGAGGTACGGGGTGAGGGGCCATACGG

1681 ProAlaAlaCysProProGlyProProProProProCysProSerThrGlnThrArgAla
CCAGCTGCCCTGCCCGCAGGCCCGCCACCGCCCCCATGTCTCTCCACCCAGACCGCGCC
GGTCGACGACGGCGGTCCGGCGGTGGCGGGGTACAGGAAGGTGGTCTGCGCGCGG

1741 ProLeuProThrGluProAlaPheProProAlaAlaThrGlySerGlnProGluAlaSer
CCTCTACCGACGAGCCCGGTTCCTCCCCCGCGCCACCGGATCCCAACCGGAGCATCC
GGAGATGGCTGCCCTCGGGCGCAAGGGGGGGCGGTGGCCTAGGGTTGGCCTCCGTAGG

FIG.1B(V)

1801 AsnAlaGluAlaGlyAlaLeuValAsnAlaSerSerAlaAlaHisValAspValAspThr
AACGCGAGGCCGGGCCCTTGTCAACGCCAGCAGCGCACACGTTGGACGTTGACACG
TTGCGCCTCCGGCCCGGGAACAGTTGCCGTCTCGTGTGTGCACCTGCAACTGTGC

1861 AlaArgAlaAlaAspLeuPheValSerGlnMetMetGlyAlaArg
GCGCGCGCGCGCGATTGTTCGTCTCTCAGATGATGGGGGCCCCGC
CGGCGCGCGCGGCTAAACAAGCAGAGAGTCTACTACCCCCCGGGCG

FIG. 1B (VI)

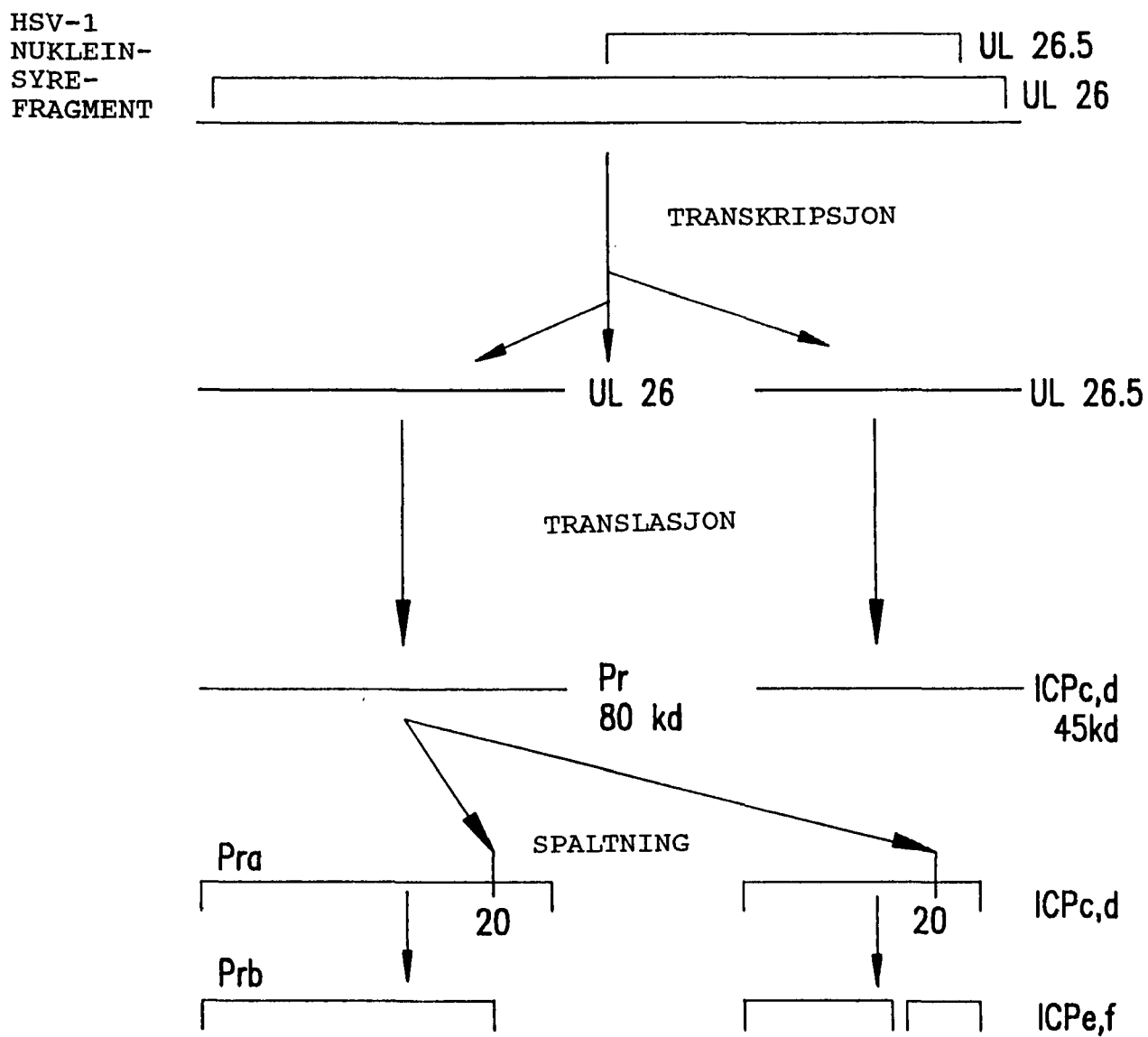


FIG.2

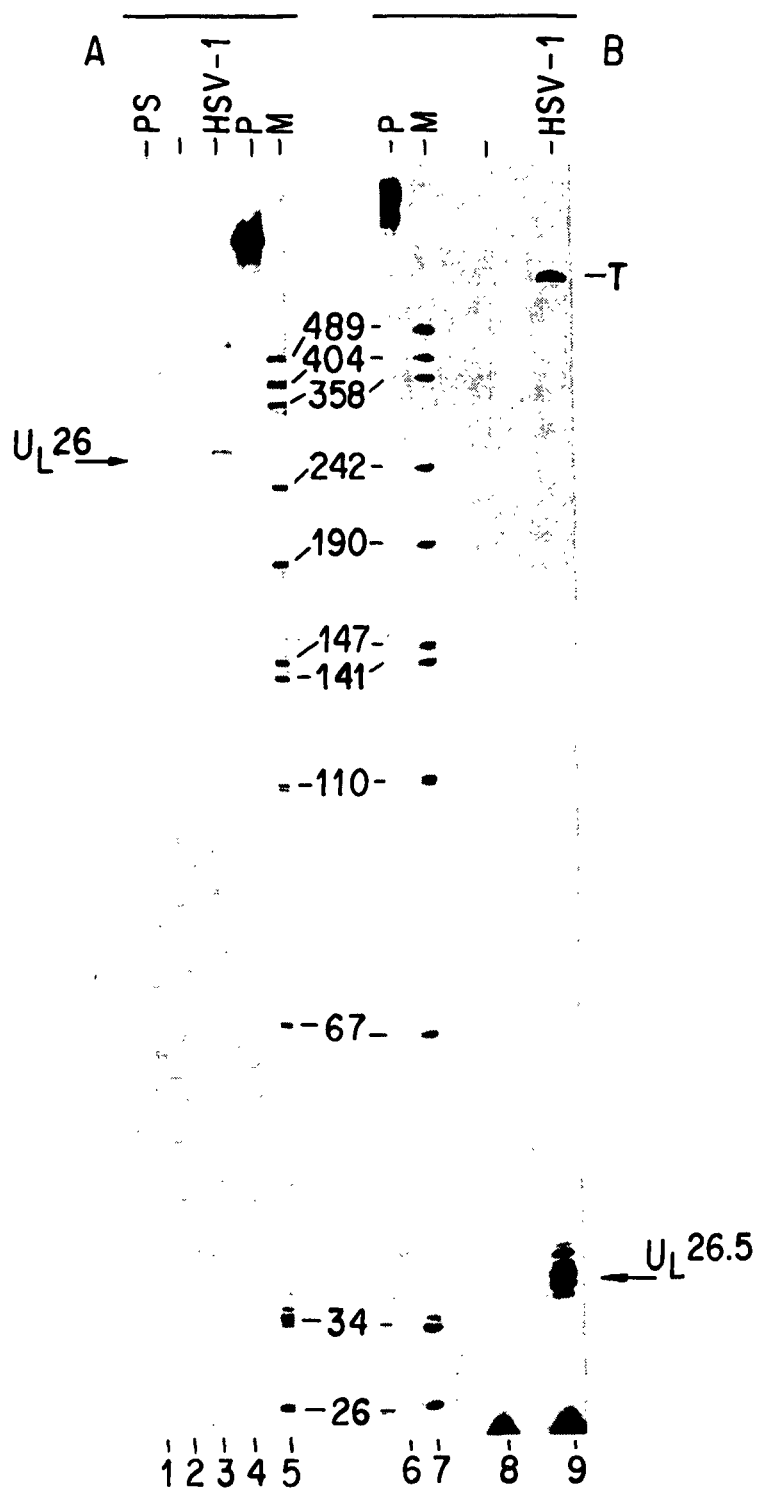


FIG. 3

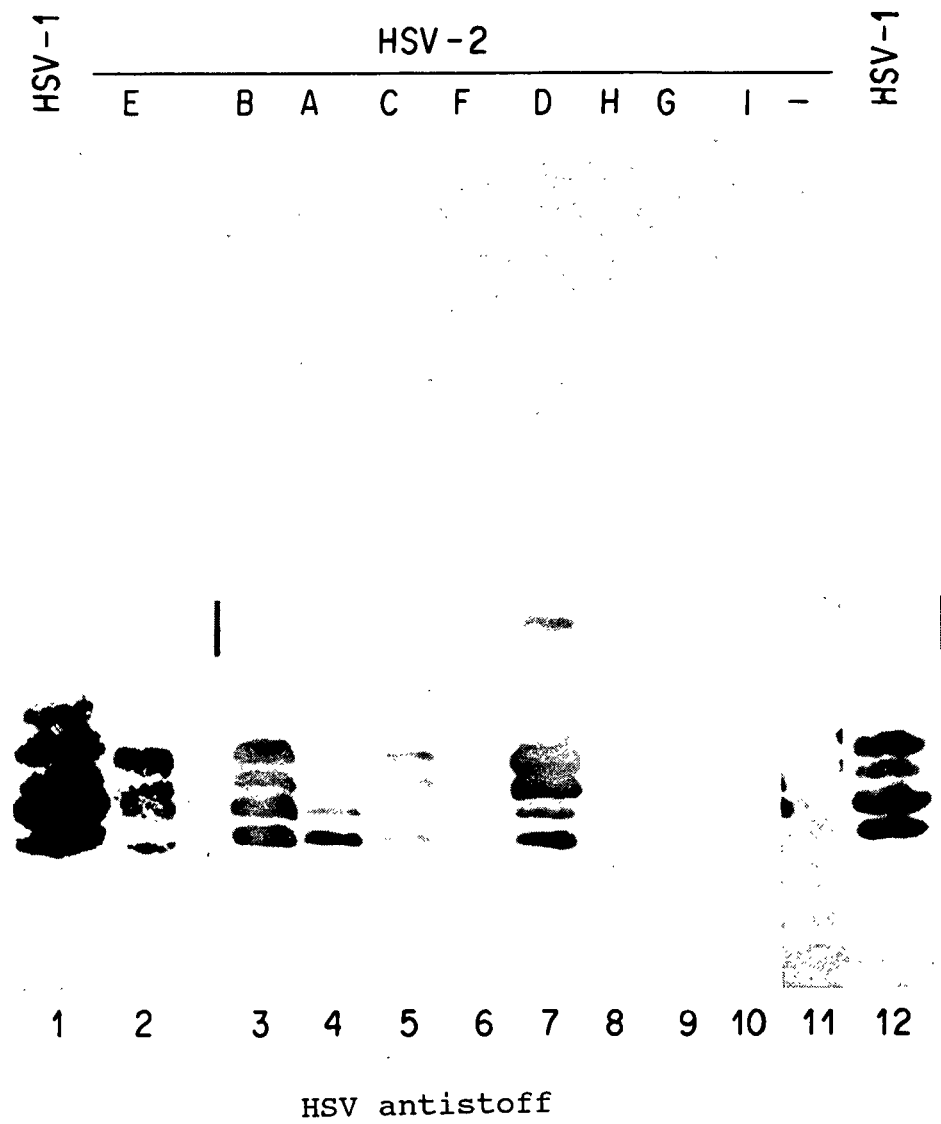


FIG. 4

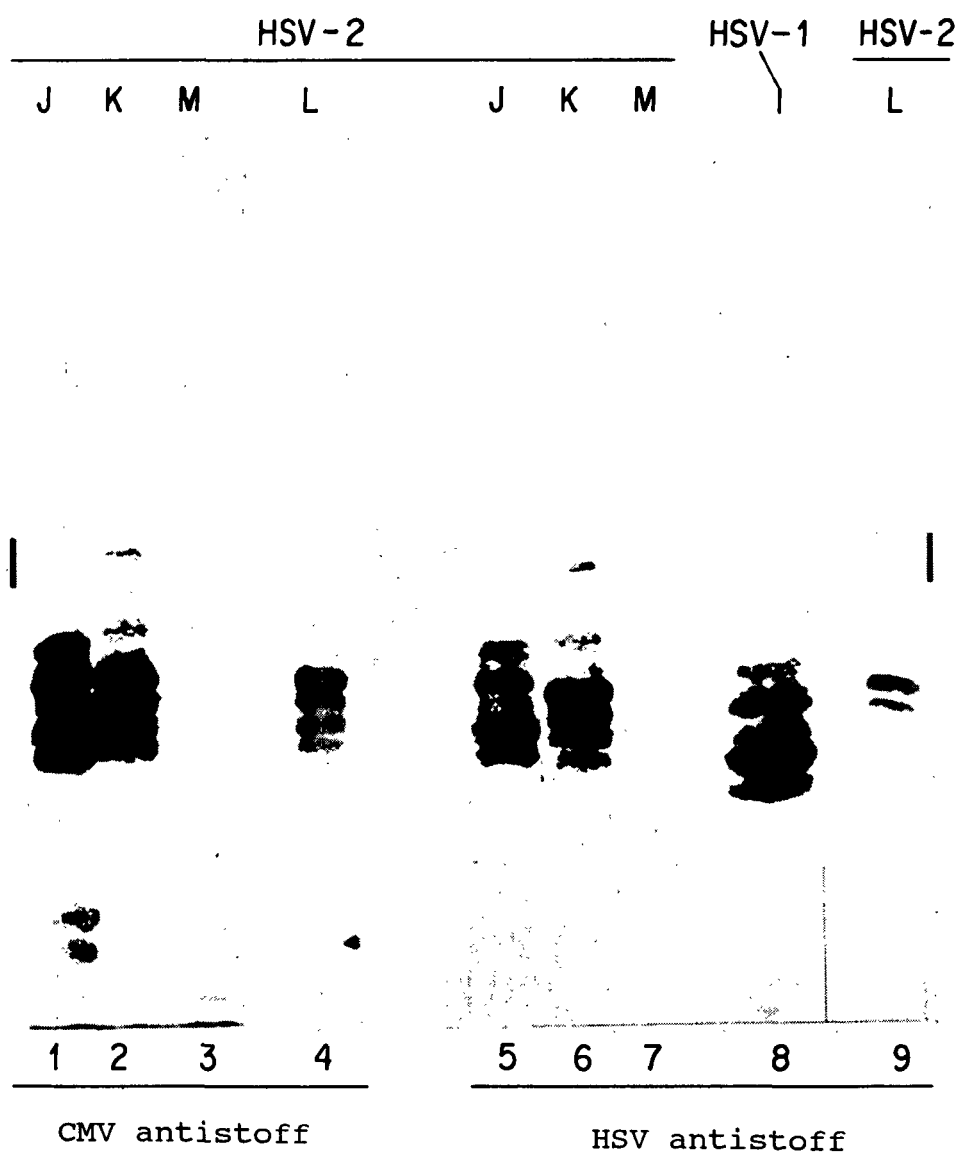


FIG. 5

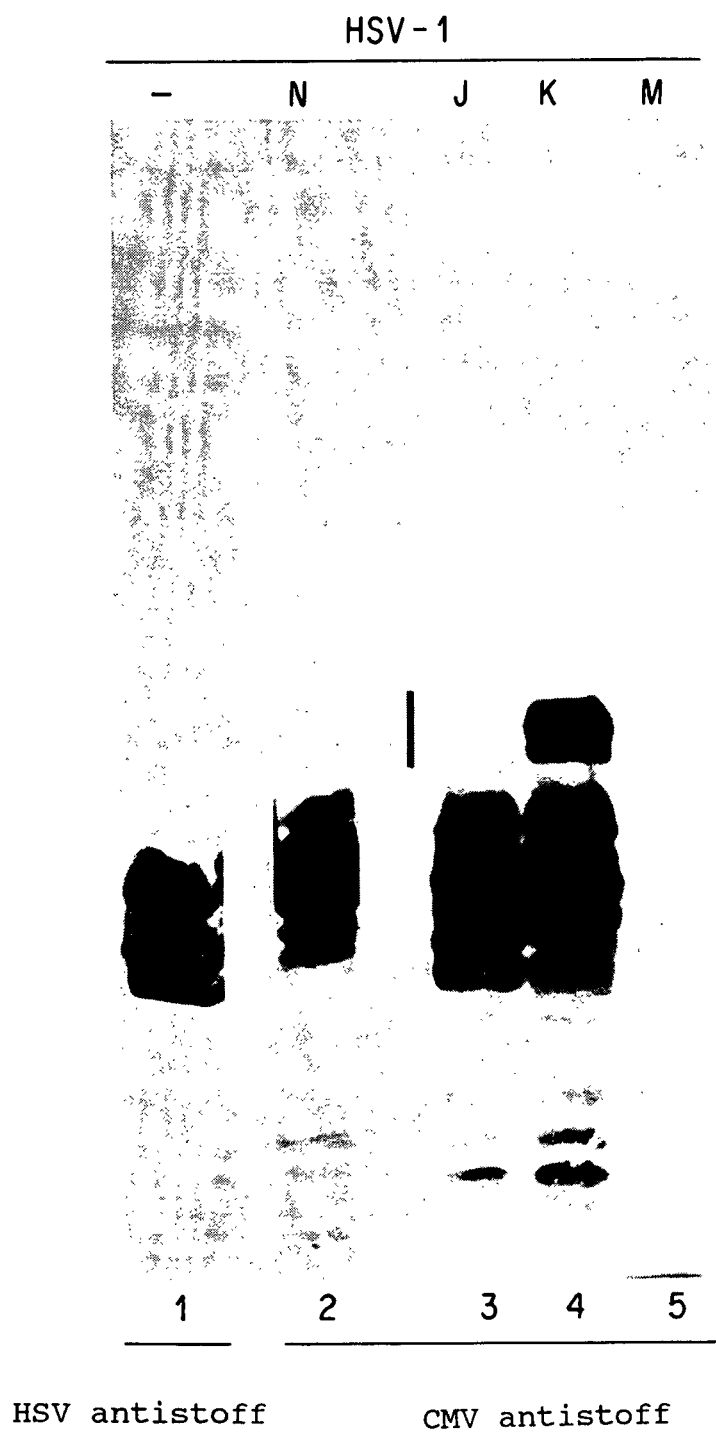


FIG. 6

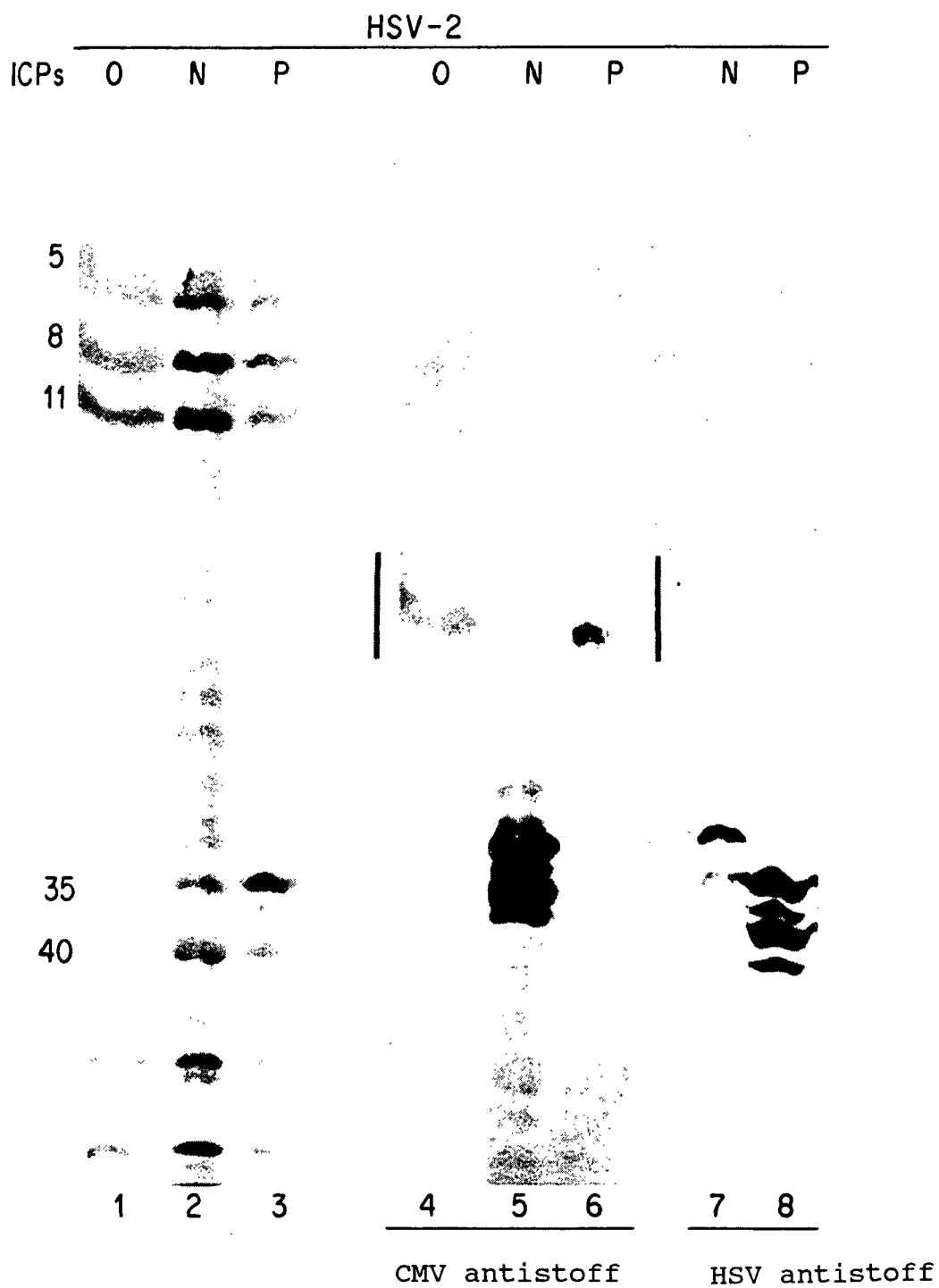


FIG. 7

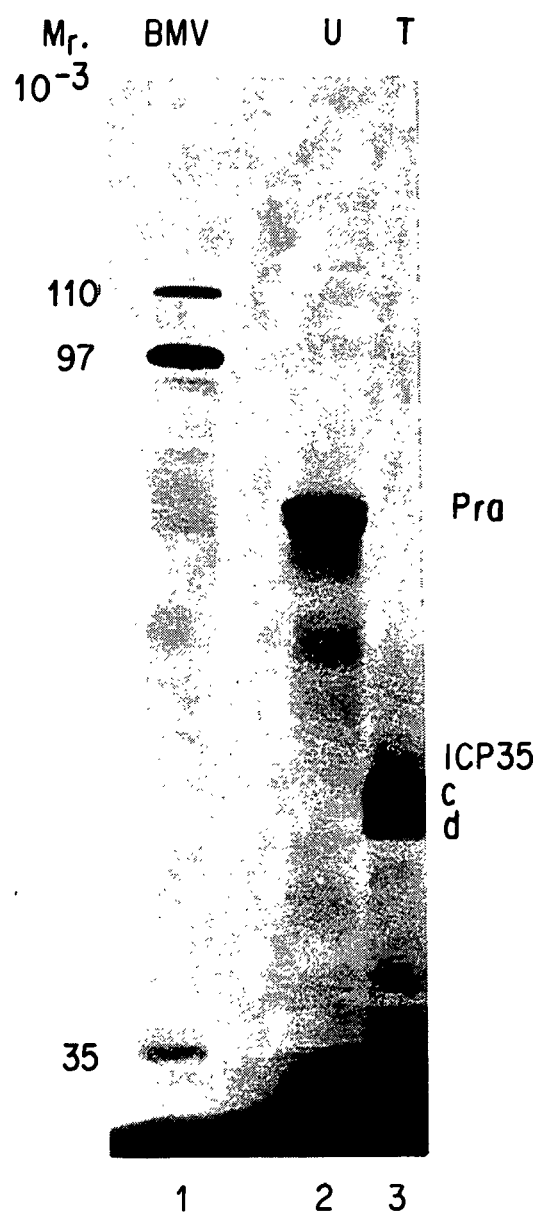


FIG. 8

HSV - 1					
34°	39°			34°	39°
—	—	A	E	—	C C

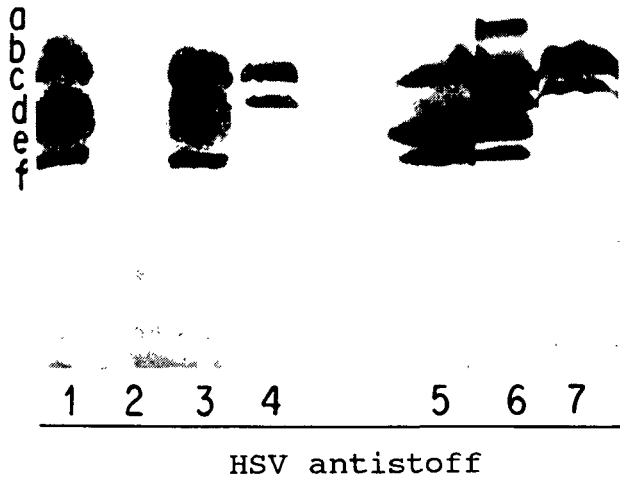


FIG. 9

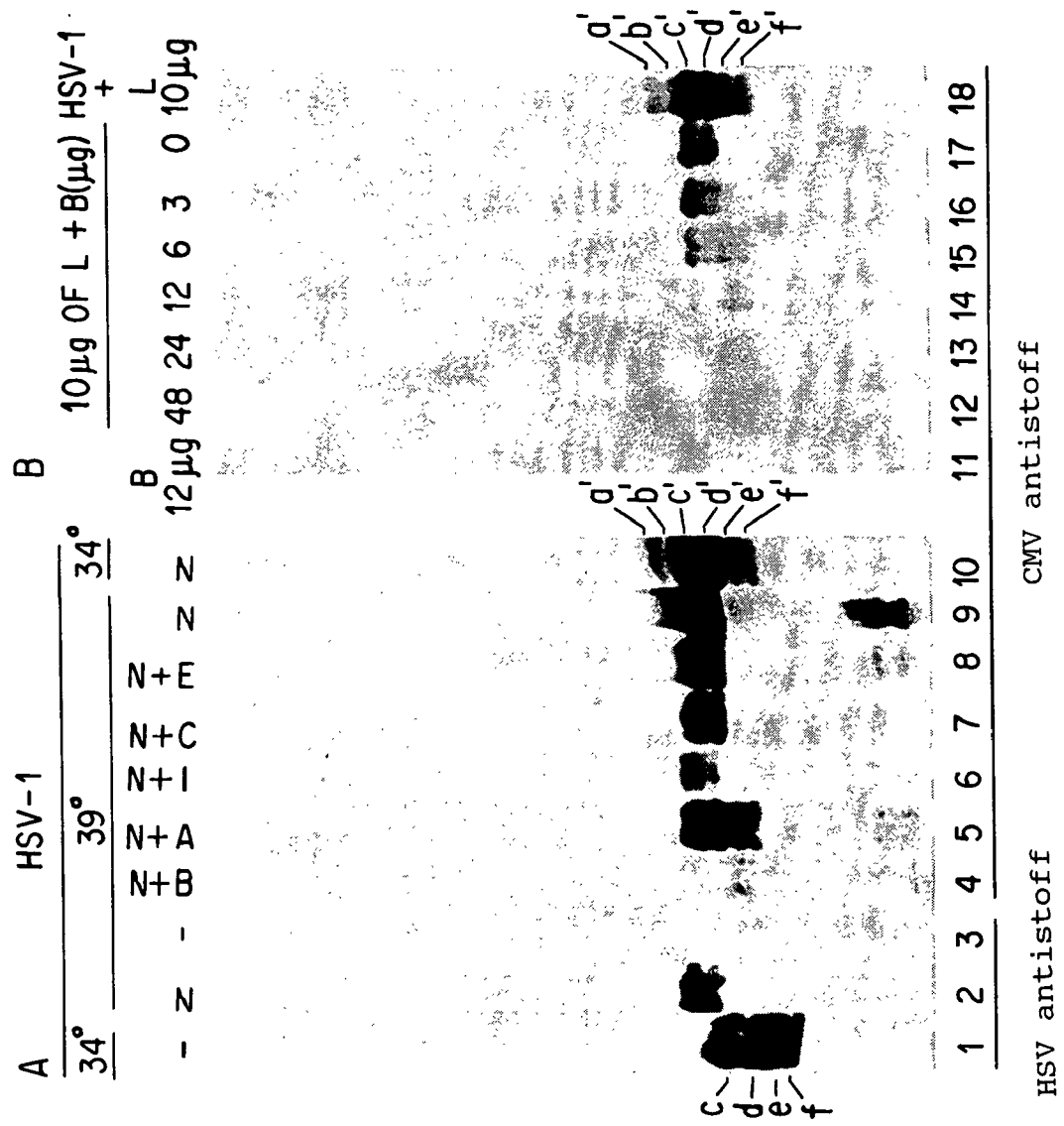
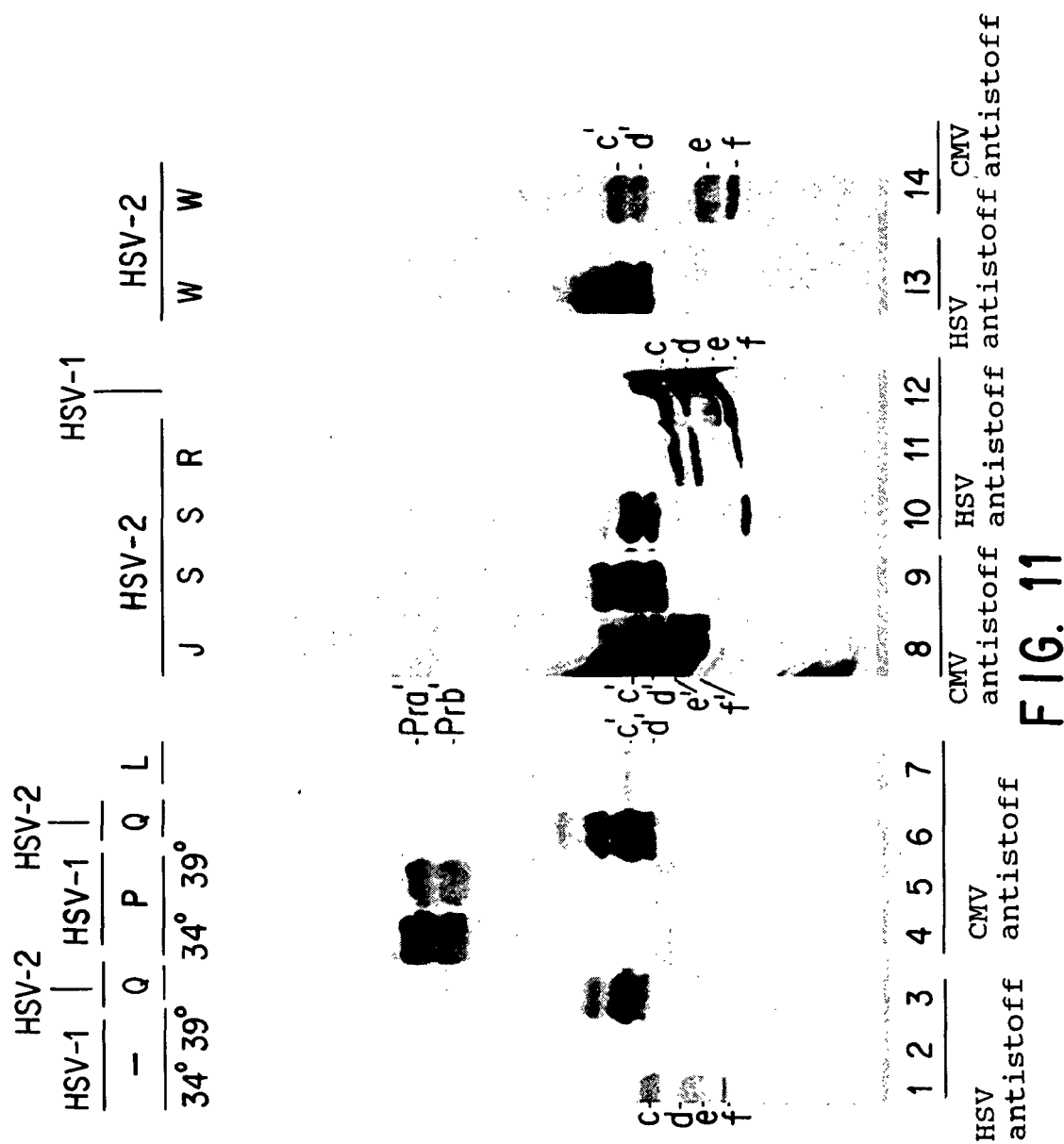


FIG. 10



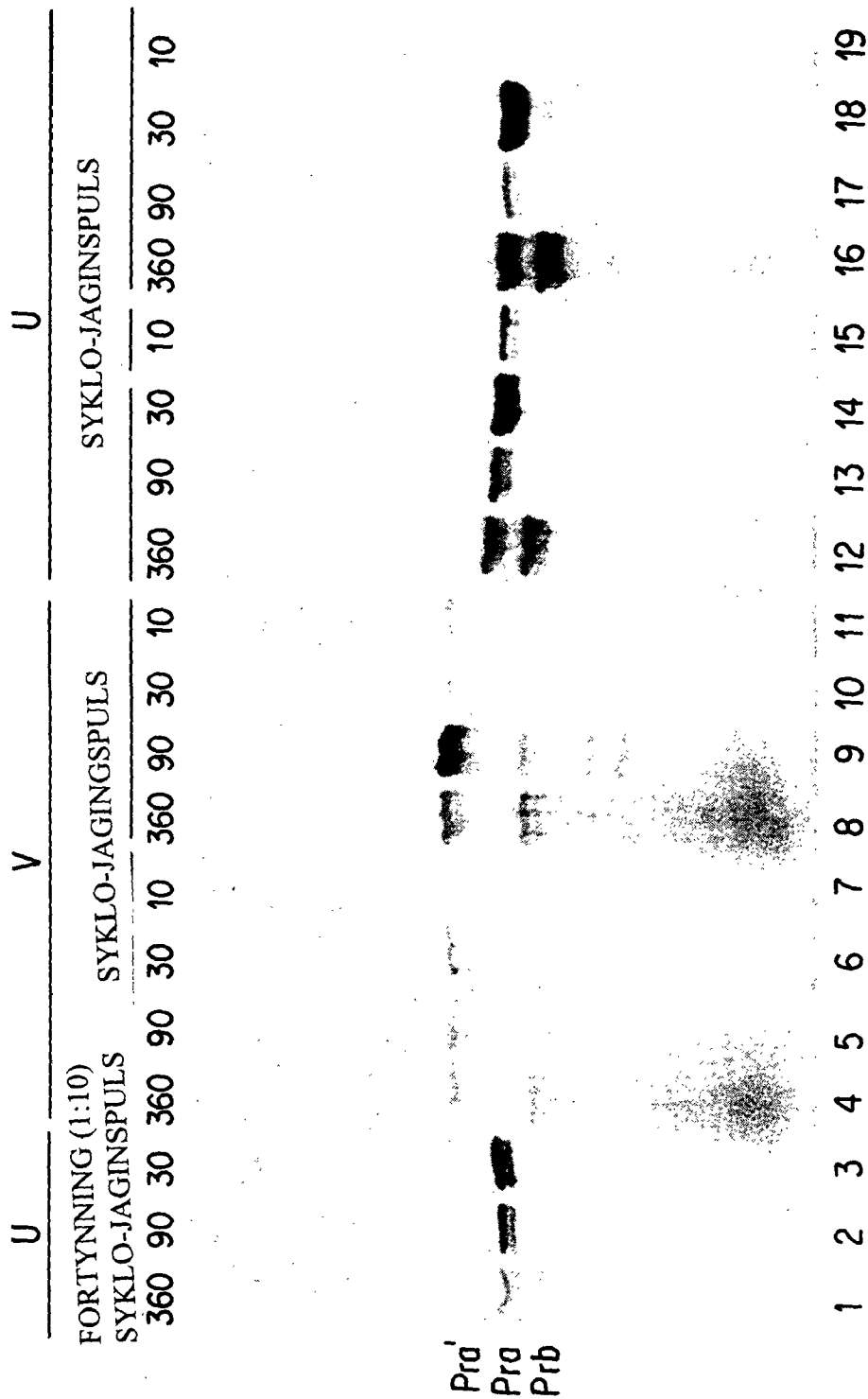


FIG. 12

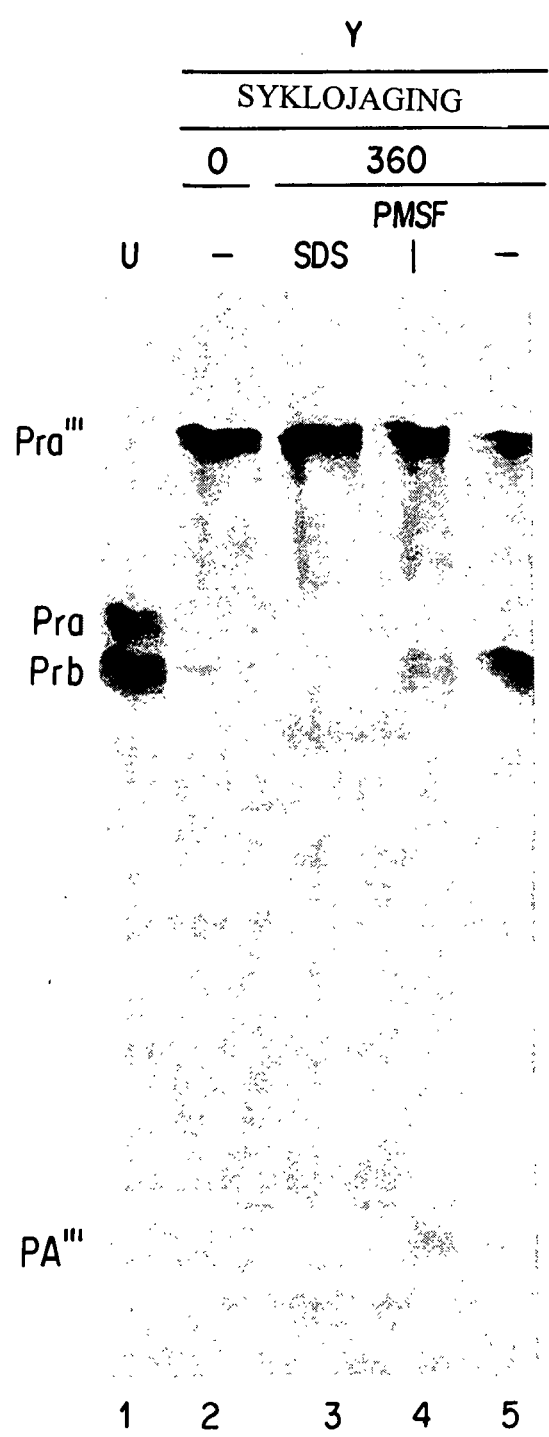


FIG. 14

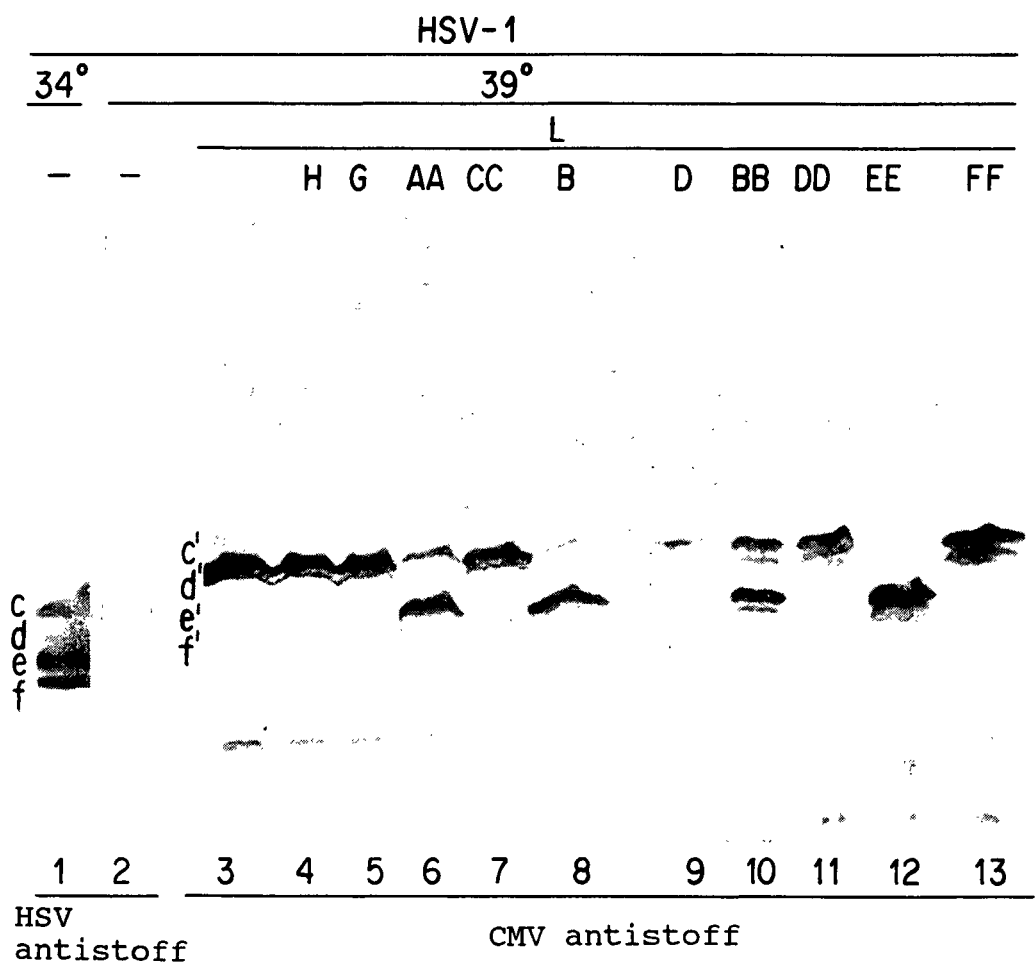


FIG. 15A

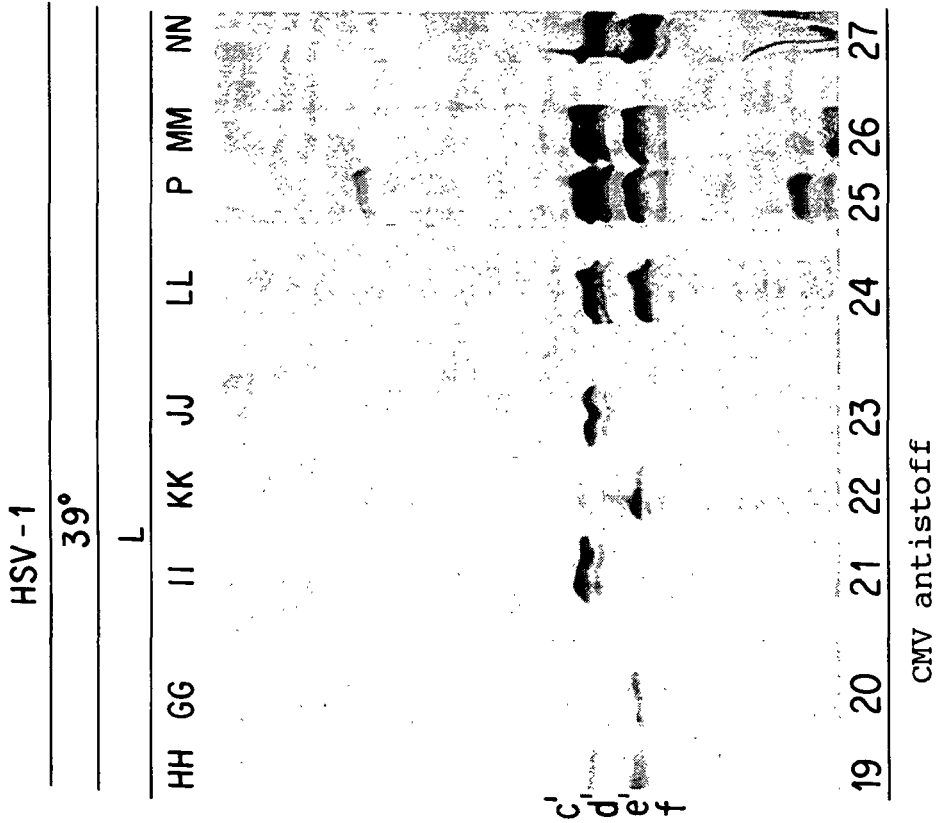


FIG. 15C

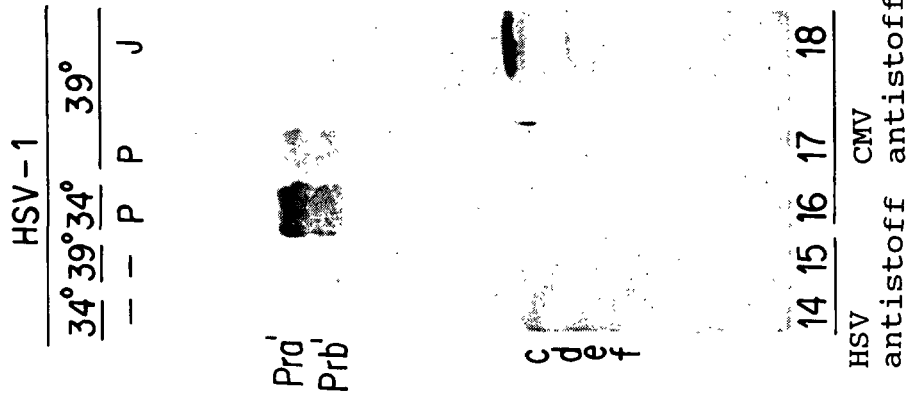


FIG. 15B

JODOACETAMID

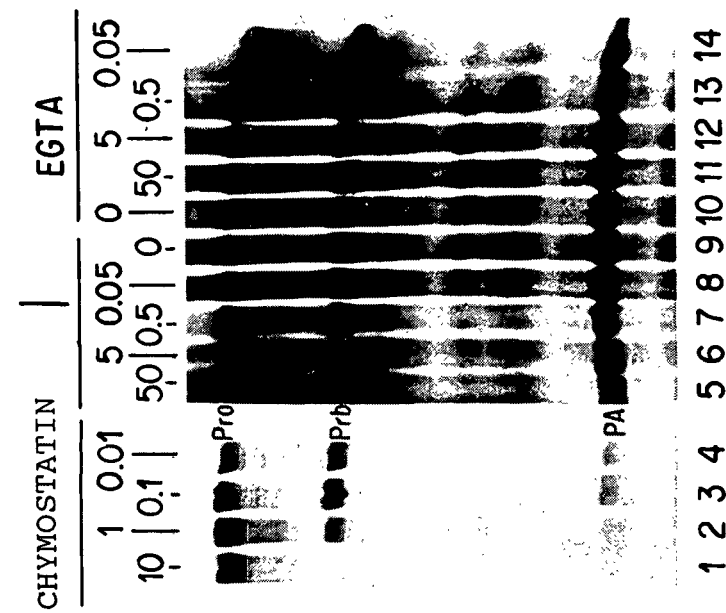


FIG. 16A

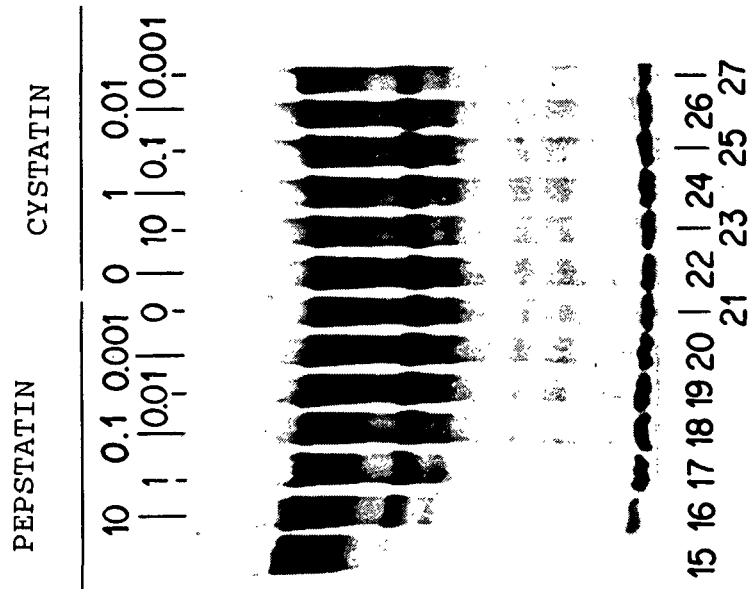


FIG. 16B

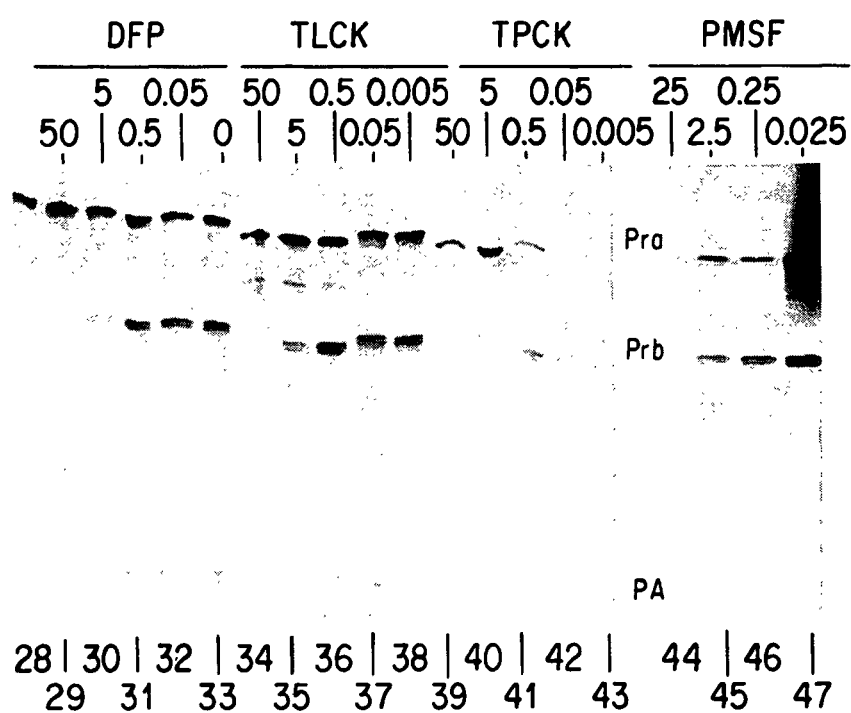
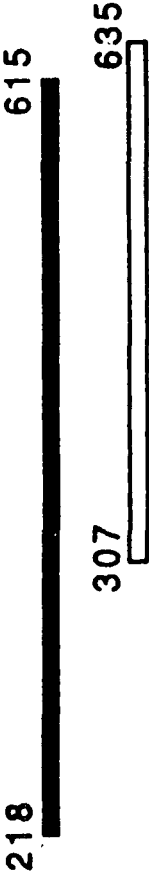
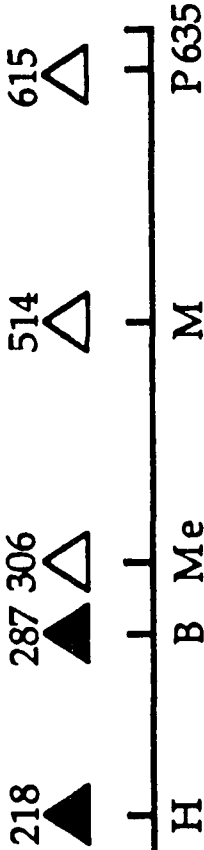


FIG. 16C



FJERNELSER



STOPPKODON-
INNSETTINGER

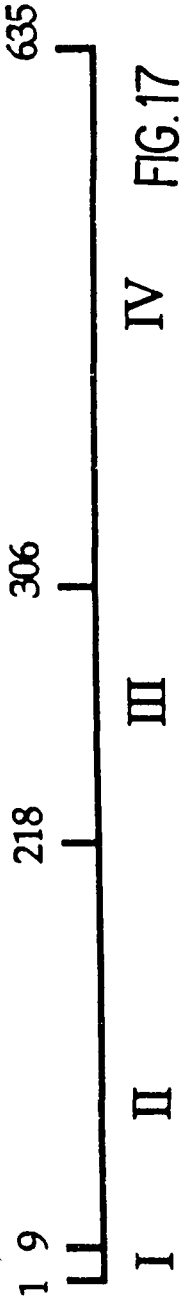
UL26

7 31 34 61 148 215
GDR DSG D H H S
SRT LDM A V A A
□ □ □ □ ■ ■ □ □

ERSTATNINGER



CMV EPITOP-
INNSETTINGER



OMRÅDER

FIG.17