

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 854257 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **854257**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 39/00
A61K 39/15
A61K 39/235
A61K 39/29
C12N 7/00
C12N 15/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.10.1985**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.10.1985**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.05.1986**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

01.11.1984 US 667233 04.10.1985 US 782638

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • American Home Products Corporation, 685 Third Avenue, New York, NY 10017, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Davis, Alan Robert, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Hung, Paul Porwen, Bryn Mawr, PA 19010, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Suun kautta annettavat rokotteet.

Orala vacciner.

Suun kautta annettavat rokotteet

Biolääketieteellisen tutkimuksen eräs päätavoite on virustaudilta suojaaminen immunisaation avulla. Yksi lähes-
 5 tymistapa on ollut tapettujen rokotteiden käyttö. Tapettua rokotetta varten tarvitaan kuitenkin suuria materiaa-
 limää- riä riittävän suuren antigeenimassan säilyttämiseksi. Tämän lisäksi ei-toivotut tuotteet kontaminoivat usein tapetut
 rokotteet niiden valmistuksen aikana. Heterologiset elävät
 10 rokotteet, jotka perustuvat sopivasti manipuloituun adenovirukseen, joka itse on rokote, Chanock, R.M. et al., JAMA, 195, 151 (1966), vaikuttavat erinomaiselta immunogeenilta. Keksintömme koskee eläviä suun kautta annettavia rokottei-
 ta, jotka perustuvat adenoviruksen käyttöön vektorina.
 15 Tällä hetkellä markkinoitavassa adenorokotteessa on eläviä, infektoivia adenovirusia annostusmuodossa. Rokotettavalle potilaalle annettaessa virus kulkee ylemmän hengitysjärjestelmän kautta (missä sairauden aiheuttavan infek-
 tion ajatellaan tapahtuvan) ja vapautuu suolistossa.
 20 Suolistossa virus lisääntyy suolen seinämässä, missä, vaikka se ei voikaan aiheuttaa adenovirustautia, se kuitenkin indusoi adenovirusvasta-aineiden muodostumisen antaen siten immu-
 niteetin adenovirustaudille. Keksinnössämme annetaan suojapäällystetyssä, suolistossa liukenevassa annostusmuo-
 25 dossa olevia eläviä infektoivia adenovirusia, joita on manipuloitu niin, että niissä on muiden tautia-aiheuttavien organismien tuottamia antigeeneja koodaavia geenejä. Vapauttuaan suolistossa virus lisääntyy suolen seinämässä in-
 dusoiden vasta-aineiden muodostumisen tai indusoi solun
 30 välittämän immu- niteetin sekä adenovirukselle että toiselle tautia-aiheuttavalle organismille. "Elävällä viruksella" tarkoitetaan, erotukseksi "tapetusta viruksesta" virusta, joka pystyy yksin tai yhdessä geneettisen lisämateriaalin kanssa tuottamaan identtisiä jälkeläisiä. "Infektoivalla"
 35 tarkoitetaan sitä, että virus pystyy siirtämään genominsa soluihin.

Yhdysvalloissa saa joka vuosi noin 200 000 ihmistä hepatitis-B-virus -infektion. Hepatitis-B-infektion ja maksasyövän välillä on lisäksi selvä korrelaatio. Tällä hetkellä markkinoitavat hepatitis-B-virusta vastaan tarkoitetut rokotteet ovat injektoitavia tuotteita, jotka on valmistettu terveiden kantajien veriplasmasta pitkäajallisessa prosessissa, johon kuuluu useita eri vaiheita.

Hepatitis-B-viruksessa on kaksi pääantigeeniä: pinta-antigeeni (HB_sAg) ja ydinantigeeni (HB_cAg). HB_sAg :n antigeenirakenne on melko monimutkainen. Siinä on yhteinen ryhmäspesifinen determinantti a. Lisäksi siinä on kaksi toisensa poissulkevaa tyyppispesifistä determinanttiryhmittä d tai y ja w tai r. HB_cAg on tyyppiltään yksinkertainen antigeeni. Tiedetään, että HB_sAg :n tai HB_sAg :n tai HB_cAg :n vasta-aineen tuotto antaa immunitetin hepatitis-B-infektiota vastaan.

Monet ryhmät ovat käyttäneet yhdistelmä-DNA-tekniikkaa HB_sAg :n syntetisoinnissa mikro-organismien avulla. HB_sAg on syntetisoitu *Escherichia coli*ssa fuusioproteiinina (Edman, J.C. et al., *Nature*, 291, 503 (1981)). Se on syntetisoitu myös hiiivassa ADH-promoottoria käyttäen (Valenzuela et al., *Nature* 298, 347 (1982)) tai happamen fosfataasin promoottoria käyttäen (Miyanojara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 80, 1 (1983)). Lehmärokkovirusta on lisäksi käytetty vektorina tuotettaessa elävää virusrokotetta hepatitis-virusta vastaan (Smith et al., *Nature*, 302, 490 (1983)).

Rotavirukset ovat lasten akuuttien maha-suolitulehdusten pääasiallinen aiheuttaja. Näillä viruksilla on yhdentoista kaksoisäikeisen RNA-segmentin genomi, joka on suljettu kapseliin. Kapselissa on sisä- ja ulkokuori. Yksi ulkokuoren proteiineista, VP7, on glykoproteiini, joka reagoi serotyyppispesifisten neutraloivien vasta-aineiden kanssa (Kalica, A.R. et al., *Virology*, 112, 385 (1981)). Tätä proteiinia koodaa ihmisen tyyppiä 1 (Wa) olevan rotaviruksen geeni 9. Tyyppiä 1 olevan ihmisen rotaviruksen

geeni 9 on äskettäin kloonattu *E. coli*ssa ja sen sekvenssi on määritetty (Richardson, M. et al., *J. Virol.*, 51, 860 (1984)). Tämän proteiinin ekspressiosta jossain toisessa systeemissä ei ole toistaiseksi ilmoitettu.

5 Adenovirukset sisältävät lineaarisen kaksois-DNA-molekyylin (mp. 20×10^6 - 25×10^6), joka koodaa 20 - 30 polypeptidiä. Monet näistä ovat mukana viruspartikkelissa, jonka muoto ja rakentumisprosessi ovat monimutkaisia. Aikaisemmin SV-40-T-antigeeni on saatu ilmenemään yhdistelmäadenovirusta käyttäen (Solnick, D. *Cell* 24, 135
10 (1981), Thummel, C. et al., *Cell*, 23, 825 (1981), Gluzman, Y. et al., teoksessa *Eukaryotic Viral Vectors*, s. 187, Cold Spring Harbor (1982)). Myös hiiren dihydrofolaatti-reduktaasi on saatu ilmenemään yhdistelmäadenovirusta
15 käyttäen (Berkner, K. ja Sharp, P.A., *Nucleic Acids Research*, 12, 1925 (1984)).

 Keksintö, jolle haetaan patenttia hoitomenetelmämuodossaan käsittää menetelmän, jolla tuotetaan vasta-aineita tai solun välittämä immuniteetti infektoivalle
20 organismille lämmilverisessä eläimessä antamalla suun kautta mainitulle lämmilveriselle eläimelle suojapäällystetyssä, suolistossa liukenevassa annostusmuodossa eläviä yhdistelmäadenoviruksia, joissa on mainittuja vasta-aineita vastaavaa antigeenia koodaava geeni tai jotka aiheuttavat
25 mainitun solun välittämän immuniteetin.

 Keksintö, jolla haetaan patenttia eräässä hoitomenetelmämuodossaan käsittää menetelmän, jolla tuotetaan hepatitis-B-viruksen tai rotaviruksen vasta-aineita lämmilverisessä eläimessä antamalla suun kautta mainitulle lämmilveriselle eläimelle eläviä yhdistelmäadenoviruksia,
30 joissa on vastaavasti joko hepatitis-B-antigeeniä tai rotavirusantigeeniä koodaava geeni.

 Keksintö, jolle haetaan patenttia tuotemuodossaan, käsittää rokotteen, jolla tuotetaan vasta-aineita tai solun
35 välittämä immuniteetti infektoivalle organismille lämmiverisissä eläimissä ja jossa on eläviä yhdistelmäadeno-

viruksia, joissa on mainittuja vasta-aineita vastaavaa antigeeniä koodaava geeni tai jotka aiheuttavat mainitun solun välittämän immunitetin, mainitun rokotteen ollessa suojapäällystetyssä, suolistossa liukenevassa annostusmuo-

5

Keksintö, jolle haetaan patenttia eräässä tuotemuodossaan, käsittää rokotteen, jolla tuotetaan hepatitis-B- tai rotaviruksen vasta-aineita lämminverisissä eläimissä ja jossa on eläviä yhdistelmäadenoviruksia, joissa on vastaavasti joko hepatitis-B-antigeeniä rotavirusantigeeniä,

10

1. Adenovirusvektorit

Kolme adenovirusvetkroria (Gluzman, Y. et al., teoksessa Eukaryotic Viral Vectors, s. 187, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982) voidaan konstruoida helposti. Insertoitavissa olevan vieraan DNA-jakson pituuden maksimoimiseksi, kaksi virusgenomin tarpeetonta aluetta voidaan poistaa, nimittäin 5-tyypin adenoviruksen virusgenomin aikaiset 1-alueet tai aikainen 3-alue (E1 ja E3) tai molemmat. Δ E1 muodostetaan yhdistämällä plasmidi ja modifioitu adenoviruksen DNA in vivo. (Kaikkia tässä patenttijulkaisussa kuvattuja plasmideja lisätään E. coli:ssa). Plasmidi muodostetaan insertoimalla adenoviruksen DNA-sekvenssejä karttayksiköiden 0 ja 17 väliin pBR322:een ja poistamalla sen jälkeen restriktioendonukleasidigestion ja ligaation avulla 1,4 ja 9,1 karttayksikön välinen sekvenssi ja sijoittamalla Xbal-restriktiokohta tähän yhtymäkohtaan. Tätä plasmidia nimitetään pAC:ksi. Modifioitu adenovirus-DNA, jossa on yksi Xbal-restriktiokohta karttakoordinaatin 4,0 kohdalla, muodostetaan seuraavasti. Xbal katkaisee villin Ad5-tyypin DNAn neljästä kohdasta: karttayksikön 4, 29, 79 ja 85 kohdalta. Modifioitu DNA, josta puuttuvat kohdat 29, 79 ja 85 eristetään katkaisemalla Ad5-DNA Xbal:llä, transfektoimalla DNA ja eristämällä modifioitu adenovirus, josta puuttuvat Xgal-kohdat asemista 29 ja/tai 79. Tämä menet-

15

20

25

30

35

tely toistetaan ja eristetään modifioitu adenovirus, jossa on Xbal-kohta vain asemassa 4. Tällaisia modifioituja adenovirusia voidaan konstruoida helposti myös oligonukleotideihin kohdistuvaa mutatoointitekniikkaa käyttäen (Smith, 5 M. ja Gillam, S. (1981) teoksessa Genetic Engineering, toim. Setlow, J.K. ja Hollaender, A., Vol. 3 s. 1-32, Pnenum, New York). Tässä tekniikassa Xbal-restriktiokohdat tuhotaan käyttäen kemiallisesti syntetisoituja oligonukleotideja, jotka on suunniteltu tuottamaan hiljaisia muutoksia 10 vastaavien Xbal-restriktioendonukleasikohtien määrittämällä aminohappoja koodaavilla alueilla. Vektori $\Delta E3$ konstruoidaan poistamalla E3-alueen sekvenssit. Kaksi modifioitua adenovirusta (tyyppiä 5) muodostetaan yllä kuvatuin menettelytavoin. Toisessa ei ole Xbal-kohtia, toisessa on 15 Xbal-kohdat vain karttakoordinaattien 29, 79 ja 85 kohdalla. Mutantin DNAn vasen puolisko, jossa ei ole Xbal-kohtia, yhdistetään Xbal-kohdat asemassa 79 ja 85 sisältävän mutantin DNAn oikean puoliskon kanssa, jolloin muodostuu modifioitu adenovirus, jossa on Xbal-kohdat ainoastaan kartta- 20 koordinaattien 79 ja 85 kohdalla. Tämän DNAn katkaisu Xbal:llä ja sitä seuraava uudelleenliittäminen ligaasientsyymin avulla tuottaa $\Delta E3$ -virus-DNAn poistamalla E3-alueen karttakoordinaattien 79 ja 85 väliltä ja sijoittamalla ainoan Xbal-kloonauskohdan tähän yhtymäkohtaan. 25 $\Delta E1$ $\Delta E3$ voidaan konstruoida poistamalla jaksoja molemmilta alueilta samaan tapaan.

4 ja 7-tyyppin adenovirusvektorit muodostetaan samaan tapaan kuin 5-tyyppin adenovirusvektorit $\Delta E1$, $\Delta E3$ ja $\Delta E1\Delta E3$. Esimerkiksi 7-tyyppin adenoviruksesta poistetaan 30 E3-alue karttakoordinaatin 80,5 kohdalla olevan Xbal-kohdan ja karttakoordinaatin 85 kohdalla olevan EcoRI-kohdan väliltä.

2. 6X-sarjan plasmidit (Hb_s Ag:ta ja rotavirus-VP7:ää varten)

Plasmidit, jotka mahdollistavat adenoviruksen 2 myöhäisen promoottorin sijoittamisen ennen hepatitis-B-pinta-antigeeniä tai rotaviruksen VP7:ää koodaavaa DNA:ta, jota seuraavat SV40-silmukointisignaalit, voidaan konstruoida.

- 5 Kumpaakin näistä reunustavat Xbal-kohdat insertiota varten adenovirusvektoreihin $\Delta E1$, $\Delta E3$ tai $\Delta E1E3$.

a. p6XH

- Plasmidi 6XH sisältää Xbal-kytkijän kohdassa -400 ep Ad2:n päämyöhäispromoottorista ja EcoRI-kohdan kohdassa
10 +33 ep, 8 ep ennen adenoviruksen ensimmäisen myöhäisen johtojakson loppua. Tätä seuraa EcoRI-kytkijä kohdassa 26 ep ennen HB_sAg:n ATG:tä ja edelleen 678 ep:n HB_sAg-sekvenssi toiseen kohdassa 809 ep sijaitsevaan EcoRI-kytkijään asti. Tätä seuraa SV40-sekvenssi SV40-kartan kohdasta 2753-
15 2516 ep. Kaikki nämä sekvenssit insertoidaan suureen pBR322-BamHI:stä -EcoRI:seen ulottuvaan fragmenttiin XbaI-kytkijöiden avulla.

b. p6XR

- Plasmidi p6XR tehdään yhdistämällä nukleotideissa
20 6 ja 1036 sijaitsevilla EcoRI-kytkijöillä rotaviruksen VP7-geeni Ad2:n päämyöhäispromoottoriin, jossa on Xbal-kohta asemassa -400 ep ja EcoRI-kytkijä asemassa +300 ja liittämällä SV40-sekvenssit kohdasta 2753-2516 VP7-geenin jälkeen kohdassa 2753 (SV40 karttakoordinaatteja) olevalla
25 EcoRI-kytkijällä ja Xbal-kohdan 2516 ep:n kohdalle.

Tämä kasetti insertoidaan suureen EcoRI:stä BamH:hon ulottuvaan pBR322-fragmenttiin.

c. Plasmidisekvenssien siirto virus-DNAhan ja yhdistelmäadenovirusten tuotto

- 30 Kasetti promoottori - vieras geeni - terminaattori siirretään adenovirusvektoriin joko seuraavalla tavalla tai yhdistämällä in vivo (katso jäljempänä esitettyä yksityiskohtaista esimerkkiä). Puhdistettu adenovirusvektorin DNA pilkotaan restriktioendonukleasilla ja käsitellään
35 sen jälkeen vasikan suolen alkaalisella fosfataasilla itseligaation estämiseksi. Plasmidisekvenssit saadaan pilkko-

mallalla p6XH tai p6XR XvaI:llä. Nämä yhdistetään sitten ligaasientsyymien avulla adenovirusvektorin DNAhan. Joko 293-solut (Graham et al., Gen. Virol., 86 10(1978)), Hela-solut tai Wi38-solut transfektoidaan sitten ligaatioseoksella ja peitetään agarilla. Pesäkkeet kerätään 7-10 päivän kuluttua ja virusvarastot valmistetaan.

3. Ilmentymismääritykset

Kolmea määrittämenetelmää on käytetty hepatitis-B-pinta-antigeenin ja rotaviruksen VP7:n ilmentymisen määrittämiseen. Ne ovat:

a) Epäsuora immunofluoresenssi

Joko hiiren monoklonaalisia vasta-aineita tai kaniinin antiseerumia käytetään yhdistelmä- Δ E1- ja - Δ E3-virusvarastojen ekspression selville saamiseen. Värjäys tehdään vuohen antihiiri tai anti-kaniini -FITC:llä.

b. Immunosaostus

Yhdistelmäadenovirusten infektoimissa soluissa oleva HB_s Ag tai rotaviruksen VP7 immunosaostetaan käyttäen joko HB_s Ag:n tai rotaviruksen VP7:n ja proteiini A Sepharose CL4B:n vastaisia hiiren monoklonaalisia vasta-aineita tai niiden vastaista kaniinin polyklonaalista antiseerumia.

c. RIA

HB_s Ag:n ilmentymistä testataan myös kaupallisesti saatavaa radioimmunomäärittämenetelmää (Ausria, Abbot Labs.) käyttäen.

4. Yhdistelmäadenovirusten immunogeeninen luonne

Elävien, lyofilisoitujen suojapäälylysteisessä, suolistossa liukenevassa kapselissa olevien yhdistelmäadenovirusten immunogeenisyys määritetään antamalla niitä (10^4 - 10^5) 50 %:sti infektoivaa annosta/tabletti) hamstereille tai simpansseille ja testaamalla vasta-ainetasot ja suojauksen tartunnalta.

Tällä hetkellä markkinoitavassa adenovirusrokotteessa on eläviä lyofilisoituja joko 4-tyypin tai 7-tyypin adenovirusia sekoitettuna inertteihin aineksiin suojapäälylystetyiksi, suolistossa liukeneviksi tableteiksi val-

mistettuna. Tablettien antaminen (noin 10^4 TCID₅₀:tta virusta) johtaa selektiiviseen maha-suoli-infektioon, mutta ei sairastumiseen. Rokote on turvallinen; aiheutettu infektio rajoittuu spesifisesti suolikanavaan eikä rokote-
5 virus tartu rokotetuista alttiisiin läheisessä kosketuksessa oleviin. Spesifistä neutraloivaa vasta-ainetta havaitaan yli 95 %:ssa rokotetuista yksilöistä 21 päivän kuluttua immunisaatiosta. Tämän keksinnön mukaisissa
10 uusissa rokotteissa, jotka kuvataan eritellysti, on yhdistelmäadenovirusia, jotka ilmentävät hepatitis-B-antigeenin ja rotaviruksen VP7:n ja ne on formuloitu ja toimivat samalla tavoin kuin nykyinen adenovirusrokote, paitsi että hepatitis-B-antigeenin tai rotaviruksen vasta-aineen lisäksi muodostuu myös adenoviruksen vasta-ainetta. Keksinnön
15 mitä tahansa suoritusmuotoa käytettäessä noin 10^4 TCID₅₀:n suuruisen yhdistelmävirusannoksen tai jopa huomattavasti pienemmän antaminen aiheuttaa tietenkin immunogeenisen vasteen. Optimiannostuksen määrittäminen riippuu käytetystä erityisestä yhdistelmäadenoviruksesta: tämän optimin määrittäminen kuuluu alan ammattitaitoon.

5. Yksityiskohtainen esimerkki yhdistelmästä, joka ilmentää autenttisen HB_sAg:n

Esimerkkinä erään yhdistelmäadenoviruksen konstruoinnista adw-alaryypin HB_sAg-geeni reunustettiin kohdasta
25 26 ep ennen HB_sAg:n käännöksen aloituskodonia ja 131 ep käännöksen päätöskodonin jälkeen Ad2:n päämyöhäispromootorin sekvensseillä (ep:sta +33 ep:iin -400; Solnick, Dl., Cell, 24, 135 - 143 (1981)) ja jälkisekvensseillä SV40:stä (ep:sta 2753 ep:iin 2516; Tooze, J. (toim.) Molecular Biology
30 of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, s. 801 - 829 (1980)). Tämä plasmidi nimetään p6XH:ksi (katso yllä). Nämä sekvenssit insertoitiin ainoastaan yhden XbaI-kohdan sisältävään plasmidiin pAC, joka sisältää Ad5-DNA-insertin ulottuen EcoRI-kytkijästä adenovirusgenomin vasemmassa
35 päässä Ad5-karttakoordinatin 17,0 kohdalla olevaan HindIII-kohtaan (Gluzman, Y., Reichl, H. ja Solnick, D., 1982

teoksessa (toim. Y. Gluzman) Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratories, s. 187 - 192). Uudet plasmidit (pACH-2 ja pACH-9) joissa on kasetti Ad2:n päämyöhäispromoottori - HB_sAg-geeni - SV40-prosessointisignaali jommasa kummassa suunnassa, pilkottiin HindIII:lla. Kummankin HindIII-pilkontatuote yhdistettiin adenovirusmutantin Δ E1 suureen XbaI-fragmenttiin, joka ulottuu karttakoordinaatista 9,1 koordinaattiin 100 (Gluzman, Y., Reichl, H. ja Solnick, D., 1982 teoksessa (toim. Y. Gluzman) Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratories, s. 187 - 192). Tämä DNA-seos transfektoitiin (Graham, F.L. ja ven der Eb, A.J., Virology 52, 456 - 467 (1973)) 293-soluihin (Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C. ja Nairn, R., J. Gen. Virol., 36, 59 - 72 (1977)) ja solut peitettiin agarilla plakkien havaitsemista varten. Noin 10 - 14 päivää myöhemmin kerättiin 54 plakkia ja kustakin kehitettiin virusvarastot. Näitä viruksia seulottiin HB_sAg DNA:n mukanaolon selvittämiseksi käyttäen hybridointia ³²P-leimattuun HB_sAg-DNA-koettiin. Positiiviset plakit (49 54:stä) infektoitiin seuraavaksi 293-solujen muodostamiin yksisolukerroksiin ja autenttisen HB_sAg:n ilmentyminen solulysaateissa havaittiin sekä radioimmunomäärityksen (AUSTRIA, Abbot Laboratories, Inc. tai NML-HB_sAg-RIA, Nuclear-Medical Laboratories) että ³⁵S-radioaktiivisesti leimatun HB_sAg:n HB_sAg:n monoklonaalisen vasta-ainetta käyttäen toteutetun immunosaostuksen avulla (anti-a-alatyypin, Boehringer Mannheim Biochemicals).

6. Yllä olevassa erityisessä esimerkissä käytämme Ad2:n päämyöhäispromoottoria, joka ulottuu ainoastaan 33 nukleotidia eteenpäin käynnöksen aloituskohdasta niin että ensimmäinen silmukointikohta ei tule mukaan. Tämä promoottori sisältää vain ensimmäisen osan adenoviruksen päämyöhäispromoottorin kolmiosaisesta johtojaksosta. Muiden, erityisesti 3-, 4-, 5- ja 7-tyypin adenovirusten päämyöhäispromoottoria voidaan kuitenkin käyttää ja tämän promoottorin kokonaista kolmiosaista johtojaksoa voidaan käyttää.

Seuraavassa esimerkissä kuvaamme kahden Ad2-päämyöhäispro-
moottorista ja eniten vasemmalla olevasta 168 ep:sta
200 ep:n kolmiosaista Ad2-johtojaksoa ja sitä seuraavasta
HB_sAg-geenistä ja SV40-viruksen prosessointi- ja polyadeny-
5 laatiosignaaleista koostuvat kasetit sisältävän bakteeri-
plasmidin pHM1 ja pHM2 konstruoinnin. Nämäkin plasmidit
sisältävät edellä mainittua jaksoa reunustavia adenovirus-
sekvenssejä, joten homologista rekombinaatiota voidaan
käyttää jakson insertoimiseen adenoviruksen genomiin. Jak-
10 son vasenta puolta reunustaa Ad5-genomin eniten vasemmalla
olevien 353 ep:n sekvenssi ja oikeaa puolta jakso adeno-
viruksen 5 karttakoordinaattien 8 ja 15,5 väliltä. Plasmidi
pHM1 sisältää 19 ep SV40-virussekvenssiä (SV40-nukleotidit
5173-5174) ennen HB_sAg-geeniä. Plasmidi pHM2 on identtinen
15 pHM1:n kanssa paitsi että siinä ei ole tätä sekvenssiä.

Sekä pHM1:n että pHM2:n kasetit sijoitettiin adeno-
virus-5:n genomin El alueelle homologisella rekombinaatio-
tekniikalla yllä kuvattuun tapaan. Kumpikin plasmidi line-
arisoitiin ja yhdistettiin karttakoordinaatista 9,1 koordi-
20 naattiin 100 ulottuvaan adenovirusmutantin Δ El suureen
XbaI-fragmenttiin (Gluzman, Y., Reichl, H. ja Solnick, D.,
1982 teoksessa (toim. Y. Gluzman) Eukaryotic Viral Vectors,
Cold Spring Harbor Laboratories, s. 187 - 192). Plakit
kerättiin ja kummastakin muodostettiin virusvarastot.

Kun näillä varastoviruksilla (HM1 ja HM2) infektoi-
tiin ihmisen alkion munuais(293-)solulinja (Graham, F.L.,
Smiley, J., Russell, W.C. ja Nairn, R. (1977) J. Gen. Virol.
36, 59 - 72) havaitsimme 40 h infektion jälkeen noin 1 μ g
HB_sAg:ä (perustuen radioimmunomääritykseen ja cpm-lukeman
30 vertailuun NML-HB_sAg-määrityssarjan positiiviseen kontrol-
liin) 5 x 10 infektoitua solua kohti HM2-infektoitujen so-
lutiljelmien supernatanteissa. HM1-virus tuotti noin 60 %
tästä määrästä. Havaitsimme että näiden virusten tuottamat
HB_sAg-polypeptidit olivat glykosyloituja (P2) ja ei-glyko-
35 syloituja (P1) (Marion, P.L., Salazar, F.H., Alexander,
J.J., ja Robinson, W. (1979) J. Virol. 32 796 - 802;

Peterson, D.L. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6975 - 6983).
 40 h kuluttua infektiosta suurin osa HB_sAg:stä (78 %) erit-
 tyi soluista viljelyalustaan partikkeleina (tiheys 1,20 g/l
 jotka olivat samanlaisia tai lähes samanlaisia kuin ihmisen
 5 seerumissa havaitut 22 nm partikkelit (Gerin, J.L., Purcell,
 R.H., Hoggan, M.D., Holland, P.V. ja Chanock, R.M. (1969)
 J. Virol. 4, 763 - 768; Gerin, J.L., Holland, P.V. ja
 Purcell, R.H. (1971) J. Virol. 7, 569 - 576). HM2 tuotti
 noin 40 % enemmän HB_sAg:ä kuin HML. Verrattaessa kuitenkin
 10 HM2:ta aiemmin kuvattuun hybridiadenovirukseen Δ ELH:hon,
 HM2-viruksen tuottaman HB Ag-polypeptidin määrän havaittiin
 olevan 70-kertaisen.

Adenoviruksen päämyöhäispromoottorin asemesta voi-
 daan käyttää mitä tahansa sopivaa eukaryoottipromoottoria,
 15 kuten esimerkiksi ihmisen metallotioneiinipromoottoria
 tai ihmisen dihydrofolaattireduktaasipromoottoria. Esimer-
 keissämme olemme lisäksi käyttäneet 5-tyypin adenoviruksen
 DNA:ta vektorina vieraan geenin ilmentämiseksi; muita ade-
 novirustyyppejä voidaan kuitenkin käyttää vektoreina ja
 20 erityisen käyttökelpoisia ovat 3-, 4- ja 7-tyypit, joita
 käytetään tällä hetkellä rokotteina.

Kuvaamme myös SV40:n DNAsta peräisin olevien proses-
 sointi- ja polyadenylaatio-signaalien käyttöä; mitä tahansa
 sopivia prosessointi- ja polyadenylaatio-signaaleja voidaan
 25 kuitenkin käyttää. Ne voivat olla peräisin adenovirus-
 DNAsta, erityisesti tyypeistä 3, 4 ja 7.

Käytettäessä tämän keksinnön mukaista menetelmää,
 jossa vieras geeni insertoidaan adenoviruksen poistettuun
 aikaiseen 3-alueeseen, yhdistelmävirus säilyy infektoivana
 30 ja rokote ei vaadi muuta kuin sen, että yhdistelmävirus
 toimitetaan suoleen. Aikainen 1-alue on toisaalta olennai-
 nen adenoviruksen infektiokyvylle. Auttajavirus täytyy sii-
 tä syystä antaa mukana, jos vieras geeni insertoidaan pois-
 tettuun aikaiseen 1-alueeseen. Tänä auttajaviiruksena on
 35 sopiva käyttää modifioimatonta, infektoivaa adenovirusta.

Auttajavirus voi itsekin olla defektiivinen virus, johon on tehty poisto, jonka voi korvata yhdistelmävirus. Tällä tavpom viruksen kasvu ja vieraan antigeenin tuotanto saataisiin esiin vain molempien virusten infektoimissa soluis-
 5 sa. Tämä defektiivinen auttajavirus voi olla samaa tai eri alatyyppejä kuin yhdistelmäviirus. Mikäli olisi kyse eri alatyypeistä (esimerkiksi jos yhdistelmävirus olisi Ad4-alatyyppejä ja defektiivinen virus Ad7-alatyyppejä) villin virustyyppin muodostuminen rekombinaatioteitse pitäisi
 10 minimoida. Viruksen lisääminen rokotteen tuottamista varten voidaan toteuttaa virusten yhteisviljelynä ihmisen diploidisissa fibroblasteissa tai virusten erillisviljelynä solulinjoissa, joiden tiedetään korvaavan kunkin defektin.

El ja E3-alueiden lisäksi virusgenomissa on useita
 15 muita alueita, joihin promoottorin, kolmiosaisen johtojakson, vieraan geenin ja prosessointi- sekä polyadenylaatiotiosignaalien muodostama kasetti voidaan insertoida. Näitä ovat Ela:n ja Elb:n välillä oleva alue, genomien vasemmassa ja oikeassa päässä olevat alueet ja E4-alueella ja L5- ja
 20 E4-alueiden välillä olevat alueet. Joitakin esimerkkejä annetaan jäljempänä:

Ad5 sisältää Ela-promoottorin karttakoordinaatin 1,4 kohdalla ja Elb-promoottorin karttakoordinaatin 4,7 kohdalla. Ela:n polyadenylaatiokohta on karttakoordinaatissa 4,6 nukleotidissa 1631, nukleotidissa 1671 on Elb-promoottorin TATA-osa. Nukleotidin 1572 kohdalla on ainoa Hpal-kohta (GTTAAC). Tätä kohtaa voidaan käyttää 2-tyypin adenoviruksen myöhäisen promoottorin ja hepatitis-B-pinta-antigeenin sijoittamiskohtana ja Ela-polyadenylaatiokohtana.
 30 Ela:n polyadenylaatio voidaan toteuttaa sijoittamalla polyadenylaatiotiosignaali SV40-viruksen DNasta Ela:n taakse tai viruksen L4-alueelta. Yllä kuvatussa konstruktiossa oleva lisä-DNA voidaan kompensoida poistamalla ei-oleelliseksi määritettyä DNata E3-alueelta.

35 Muita insertiopisteitä ovat genomien ääri-vasemmat ja -oikeat päät. Vasemmassa päässä asema on 116 ep:n kää-

teisen terminaalitoiston ja E4-promoottorin TATA-osan välillä. Ad2:ssa on MboI-kohta 99,3 karttayksikön kohdalla. Tämä on 19. ep viruksen DNAn äärioikeasta päästä. Ad5:ssä on Thal-(FnU4DII-)kohta 240 ep genomien vasemmasta päästä. Tämä
 5 alue on ITR:n ja edellä olevan E4-TATA-osan välissä. Ylimääräisen DNAn sovittamiseksi insertio tehdään taas, mikäli tarpeen, mutanttiin, josta on poistettu DNA E3-alueelta.

Kussakin tapauksessa näitä samoja alueita voidaan käyttää adenoviruksen pää myöhäispromoottorin, adenoviruksen
 10 kolmiosaisen johtojakson, vieraan geenin ja prosessointi- sekä polyadenylaatio-signaalien muodostaman kasetin insertio-kohtina 4-tyypin ja 7-tyypin adenoviruskannoissa, joita käytetään tällä hetkellä markkinoitaviin adenovirusrokotteisiin.

15 Vaikka edellä esitetty spesifikaatio viittaa erityisesti adenovirustyyppeihin 4, 5 tai 7, mitä tahansa tyyppiä olevia eläviä, infektoivia adenovirusia voidaan käyttää tässä keksinnössä. Adenovirustyyppejä 4 ja 7 ovat edullisia, koska ne ovat tällä hetkellä kaupallisissa adenovirusrokotteissa käytössä olevia tyyppejä. Samoin, vaikka erityisesti
 20 on viitattu rokotteisiin, jotka tuottavat hepatitis-B:n ja rotaviruksen vasta-aineita, keksintömme avulla voidaan tuottaa suun kautta annettavia rokotteita mitä tahansa infektoivaa tekijää vastaan, joka sisältää antigeenin, jota
 25 vastaan lämminverinen eläin tuottaa vasta-aineita tai jota vastaan sille kehittyy solun välittämä immunitaetti ja jota koodaa korkeintaan noin 3000 emäsparista koostuva geeni. Keksinnön alaan kuuluu siten immunisaatio esimerkiksi sellaisia tauteja kuten influenssaa, parainfluenssaa, hengitysteiden synktaaalista virustautia, hepatitis-A:ta, hankittua immuunipuutosoireyhtymää (AIDS), koleraa, E. colia, hinkuyskää, kurkkumätää, jäykkäkouristusta, punatautia, gonorrreaa, mykoplasma-keuhkokuumetta vastaan ja niin edelleen.

Patenttivaatimukset:

1. Yhdistelmäadenovirus, joka sisältää tautia-
aiheuttavan organismin tuottamaa antigeeniä koodaavan gee-
5 nin, mainitun yhdistelmäadenoviruksen ollessa tyyppiä 4,
5 tai 7; geeni koodaa hepatitis-B-pinta-antigeeniä tai ro-
taviruksen ulkokuoriproteiinia; ja geeni sijaitsee pois-
tetulla aikaisella 1-alueella tai poistetulla aikaisella
3-alueella.
- 10 2. Suun kautta annettavan vasta-aineita tai solun
välittämän immunitetin infektoivaa organismia vastaan
tuottavan rokotteen valmistusmenetelmä, johon kuuluu mai-
nittuja vasta-aineita vastaavaa tai mainitun solun välittä-
mää immunitettia aiheuttavaa antigeeniä vastaavan geenin
15 insertointi adenovirusiin elävien yhdistelmäadenovirusten
tuottamiseksi ja mainittujen elävien yhdistelmäadenovirus-
ten formulointi suojapääillystettyyn, suolistossa liukene-
vaan annostusmuotoon.
- 20 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jossa
mainittu infektoiva organismi on hepatitis-B-virus.
4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, jossa
mainittu infektoiva organismi on rotavirus.



Missing part